

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



Funktionelle Charakterisierung von PACRG, dem Parkin-koregulierten Protein

Maria Šadić, geb. Funke

aus Leinefelde

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Frau Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 02. April 2014.

(Maria Sadic)

Dissertation eingereicht am 17.04.2014

1. Gutachter/Gutachterin Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer

2. Gutachter/Gutachterin Prof. Dr. Martin Biel

mündliche Prüfung am 14.07.2014

PUBLIKATIONEN - MARIA ŠADIĆ

The thiol-redox-protein atlas of the mouse - Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse

Godoy J.R. *, **Funke M.** *, Ackermann W., Haunhorst P., Oesteritz S., Capani F., Elsässer H.P., and Lillig C.H.

Biochim Biophys Acta. 2011 Jan;1810(1):2-92. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.05.006. Epub 2010 Jun 1.

*GJR and FM contributed equally to this work

Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-CYS peroxiredoxin PRX3.

Hanschmann E.M., Lonn M.E., Schuette L.D., **Funke M.**, Godoy J.R., Eitner S., Hudemann C., Lillig C.H.

J Biol Chem. 2010 Dec 24;285(52):40699-705. doi: 10.1074/jbc.M110.185827. Epub 2010 Oct 7.

The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO.

Müller-Rischart A.K., Pils A., Beaudette P., Hadian K., Deinlein A., Augustin R., **Funke M.**, Patra M., Motori E., Schweimer C., Kuhn P.-H., Hrelia S., Lichtenthaler S.F., Wurst W., Trümbach D., Langer T., Krappmann D., Dittmar G., Tatzelt J., Winklhofer K.F.

Molecular Cell 2013 Mar 7; 49(5):908-21. Epub 2013 Feb 28.

gewidmet
Mama, Papa, Matthias, Thomas und Dennis

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all den Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben und ohne die ich nicht bis hierher gekommen wäre.

Ich danke an erster Stelle meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer, die mir mit ihrem Fachwissen zur Seite stand und die mich auch in schwierigen Situationen während dieser Promotion unterstützt und motiviert hat. Vielen Dank Konstanze, dass deine Tür immer offen stand und du für alle kleineren und größeren Problemchen ein hilfsbereiter Ansprechpartner warst. Ich habe von dir wirklich sehr viel lernen können.

Bei Prof. Dr. Jörg Tatzelt möchte ich mich für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen bedanken und dafür, dass er immer ein Auge darauf hatte, dass die Berge noch da sind, wo sie hingehören.

Ich danke an dieser Stelle auch Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass für die wissenschaftliche Beratung, das Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass er mir ermöglicht hat, meine Arbeit in seinem Lehrstuhl fertig zu stellen.

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Biel bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle noch bei meiner Prüfungskommission Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer, Prof. Dr. Jörg Tatzelt, Prof. Dr. Martin Biel und Prof. Dr. Stefan Zahler bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Menschen, die täglich für einen reibungslosen Laboralltag gesorgt und damit perfekte Arbeitsbedingungen geschaffen haben. Vielen Dank an Sabine für ihre Hilfsbereitschaft, auch bei sehr kurzfristigen Bitten. Danke auch an Barbara und Annette für die Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Ich bedanke mich bei allen Mitdoktoranden und Kollegen, die mir während meiner Zeit im Winklhofer-Labor begegnet sind und die mir bei vielen wissenschaftlichen Problemen geholfen haben. Danke Anita, für den Hinweis das PACRG-Projekt weiter zu bearbeiten und für deine Vorarbeit. Vielen Dank Anna und Alex, für eure Hilfe bei der Einarbeitung in neue Methoden und die moralische Unterstützung im ersten Doktoranden-Jahr. Ein großes Dankeschön geht auch an Maria, Kathrin und Caro für eure tägliche Unterstützung in allen denkbaren Angelegenheiten. Ich kann gar nicht sagen, wie groß euer Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit war.

Kathrin, Eva, Caro und Maria, ich kann euch nicht genug dafür danken, dass ihr so tolle Kollegen und Freunde seid. Ihr habt meine Promotion zu einer wunderbaren Zeit gemacht, an die ich sehr gern zurückdenken werde. Wir sind jetzt erst seid ein paar Wochen nicht mehr täglich im Labor zusammen und ich vermisse euch jetzt schon unglaublich. Ich danke euch für eure stetige Hilfsbereitschaft in beruflicher und privater Hinsicht, für die unglaublich interessanten Tee-Pausen, bei denen ich so viel Nicht-Wissenschaftliches gelernt habe, für die Versorgung mit Süßigkeiten, fürs Korrektur-Lesen der Arbeit und natürlich für die moralische Unterstützung und die Motivation. Wir waren wirklich ein tolles Team.

Ein weiteres tolles Team, welches an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben darf ist unsere Mittagsrunde: Benni, Daniel, Matthias, Eva, Caro und Kathrin. Dank euch konnte ich mich jeden Tag auf etwas freuen. Vielen Dank für die tollen, lehrreichen und oft auch sehr absurden Gespräche. Ihr habt mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch politisch, gesellschaftlich und nicht zuletzt sportlich (in zahlreichen Kicker-Runden) weitergebildet. Ich werde euch nicht nur initial vermissen.

Der größte Dank geht hier allerdings an die wichtigsten Menschen in meinem Leben, meine Familie: Mama, Matthias, Thomas und natürlich Dennis. Ich danke euch dafür, dass ihr mich in jeder Lebenslage unterstützt und ermutigt und dass ich immer auf euch zählen kann.

Zuletzt möchte ich nun noch ein ganz besonders großes Dankeschön loswerden. Dennis, danke für deine Liebe und Unterstützung. Du hast mich immer in meiner Arbeit bestärkt, meinen Kummer ertragen und mir so viele gute wissenschaftliche Ratschläge gegeben. Ohne dich würde ich heute sicherlich nicht an meiner Doktorarbeit schreiben.

Vielen Dank für die tolle Zeit!

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abstract / Zusammenfassung.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. PACRG - das Parkin-koreguliertes Gen.....	1
1.1.1. Der PACRG/PARK2-Genlocus.....	1
1.1.2. Das PACRG-Protein	2
1.1.3. Mögliche Funktionen von PACRG.....	2
1.1.4. Mit PACRG assoziierte Erkrankungen.....	4
1.2. Parkin.....	4
1.2.1. Morbus Parkinson	4
1.2.2. Die E3-Ligase Parkin	5
1.2.3. Zelluläre Funktionen von Parkin	6
1.2.3.1. Die zytoprotektive Funktion von Parkin.....	6
1.2.3.2. Parkin und Mitochondrien.....	8
1.3. Neurodegeneration – Mitochondrien und Apoptose	10
1.3.1. Mitochondriale Qualitätskontrolle.....	11
1.3.1.1. Mitochondriale Dynamik.....	11
1.3.1.2. Mitophagie – der selektive Abbau defekter Mitochondrien	13
1.3.2. Apoptose und Überleben	14
1.3.2.1. Apoptotischer Zelltod.....	14
1.3.2.2. Zelluläre Überlebens-Signale.....	17
1.3.2.3. Der NF- κ B-Signalweg.....	17
1.4. Ubiquitinierung	21
1.4.1. Der Mechanismus der Ubiquitinierung.....	21
1.4.2. Verschiedene Arten der Ubiquitinierung und deren Funktion	22
1.4.2.1. Lineare Ubiquitinierung	24
1.4.2.2. Ubiquitinierung im kanonischen NF- κ B-Signalweg.....	27
1.5. Ziel der Arbeit.....	29
2. Ergebnisse.....	30
2.1. Charakterisierung von überexprimiertem PACRG.....	30
2.1.1. PACRG ist ein zytosolisches Protein	30
2.1.2. Überexprimiertes PACRG findet sich vorwiegend in der Detergenz-unlöslichen Fraktion.....	31
2.2. PACRG wird proteasomal degradiert.....	33
2.3. Die PACRG-mRNA-Expression wird unter verschiedenen zellulären Stressbedingungen hoch reguliert.....	34

2.4. PACRG hat einen zytoprotektiven Effekt	36
2.4.1. PACRG-Überexpression schützt vor Stress-induziertem Zelltod.....	36
2.4.2. PACRG-defiziente Zellen sind empfindlicher gegenüber zellulärem Stress.....	38
2.4.3. Die zytoprotektive Wirkung von PACRG ist unabhängig von Parkin.....	39
2.5. PACRG beeinflusst die mitochondriale Morphologie.....	40
2.5.1. PACRG-Überexpression schützt vor Drp1-induzierter mitochondrialer Fragmentierung.....	41
2.5.2. PACRG-Knockdown führt zur Fragmentierung von Mitochondrien.....	42
2.6. PACRG zeigt keinen Effekt auf Mitophagie.....	43
2.6.1. PACRG-Überexpression induziert keine Mitophagie und hat keinen Einfluss auf die Parkin-induzierte Mitophagie.....	43
2.6.2. PACRG-Knockdown beeinflusst nicht die Parkin-induzierte Mitophagie.....	46
2.7. PACRG beeinflusst den NF-κB-Signalweg.....	46
2.7.1. Die zytoprotektive Wirkung von PACRG ist abhängig von NEMO.....	47
2.7.2. PACRG-Überexpression aktiviert den NF- κ B-Signalweg.....	48
2.7.3. PACRG-Knockdown hemmt die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges.....	49
2.8. PACRG ist ein Teil des Assemblierungskomplexes für lineare Ubiquitin-Ketten (LUBAC = Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex)	51
2.8.1. PACRG interagiert mit HOIP, HOIL-1L und Sharpin.....	52
2.8.2. PACRG interagiert mit Parkin.....	53
2.8.3. PACRG interagiert nicht mit NEMO.....	54
2.8.4. PACRG ist Teil des LUBAC.....	55
2.9. PACRG beeinflusst den NF-κB-Signalweg über die Aktivierung von linearer Ubiquitinierung.....	56
2.9.1. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges über den LUBAC wird durch PACRG zusätzlich verstärkt.....	56
2.9.2. Weder PACRG noch Parkin können HOIL-1L oder Sharpin im LUBAC ersetzen.....	57
2.9.3. PACRG-Überexpression induziert die lineare Ubiquitinierung von Proteinen.....	58
2.10. Der Mechanismus der LUBAC-Aktivierung durch PACRG.....	60
2.10.1. PACRG-Überexpression verändert nicht die Menge und die Zusammensetzung des aus HOIP und Sharpin aufgebauten LUBAC.....	61
2.10.2. PACRG-Überexpression beeinflusst nicht die Stabilität von überexprimiertem HOIP.....	62
2.10.3. PACRG beeinflusst die Auto-Inhibierung von HOIP.....	64
3. Diskussion.....	67
3.1. Die Bedeutung der Koregulation von PACRG und Parkin	67
3.2. Charakterisierung von PACRG.....	67
3.3. Gemeinsame Eigenschaften von PACRG und Parkin	68
3.4. Unterschiedliche Funktionen von PACRG und Parkin	69

3.5. Das zytoprotektive Potential von PACRG.....	70
3.6. Der Mechanismus der Zytoprotektivität von PACRG.....	73
3.7. Der Mechanismus der LUBAC-Aktivierung durch PACRG.....	74
3.8. Zusammenarbeit von PACRG und Parkin	76
4. Material und Methoden.....	78
4.1. Material.....	78
4.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	78
4.1.2. Kits.....	78
4.1.3. Puffer, Reagenzien und Medien.....	78
4.1.3.1. Puffer.....	79
4.1.3.2. Reagenzien.....	80
4.1.3.3. Medien.....	80
4.1.4. Enzyme und Proteine.....	81
4.1.5. Antibiotika.....	82
4.1.6. Toxine und Inhibitoren.....	82
4.1.7. Farbstoffe und Marker.....	82
4.1.8. Plasmide.....	83
4.1.9. Primer und Oligonukleotide.....	84
4.1.9.1. Klonierungsprimer.....	84
4.1.9.2. RT-PCR Primer.....	84
4.1.9.3. siRNAs.....	85
4.1.10. Antikörper und Beads.....	85
4.1.11. Zellstämme.....	86
4.1.12. Bakterien.....	87
4.1.13. Tierstämme.....	87
4.1.14. Geräte	87
4.1.15. Software.....	89
4.2. Methoden.....	90
4.2.1. Zellkulturmethoden.....	90
4.2.1.1. Kultivieren, Passagieren und Ausplattieren von Zellen.....	90
4.2.1.2. Transiente Transfektion.....	90
4.2.1.2.1. Transiente Transfektion von Expressionskonstrukten mit Lipofectamin.....	90
4.2.1.2.2. Transiente Transfektion von Expressionskonstrukten mit Kalziumphosphat	91
4.2.1.2.3. Transiente Transfektion mit siRNA.....	92
4.2.1.3. Behandlung von Zellen mit Toxinen.....	92
4.2.1.4. Zellernte.....	92
4.2.1.5. Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen.....	93
4.2.1.5.1. Caspase Assay.....	93
4.2.1.5.2. Untersuchung der mitochondrialen Morphologie.....	94
4.2.1.5.3. Mitophagie Assay.....	94
4.2.1.6. Luciferase-Reportergen-Assay.....	95
4.2.2. Nukleinsäuremethoden.....	95
4.2.2.1. Transformation von DNA in kompetente Bakterien.....	95

4.2.2.2. Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien.....	96
4.2.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	96
4.2.2.4. Restriktionsverdau.....	97
4.2.2.5. Ligation.....	97
4.2.2.6. In-Fusion Klonierung.....	97
4.2.2.7. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	98
4.2.2.8. Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren am Nano-Photometer.....	98
4.2.2.9. Generierung von DNA-Expressionskonstrukten.....	98
4.2.2.9.1. HA-PACRG pcDNA3.1.....	98
4.2.2.9.2. PACRG pcDNA3.1.....	99
4.2.2.9.3. HOIP pcDNA3.1.....	99
4.2.2.10. Isolierung von RNA.....	99
4.2.2.11. Reverse Transkription.....	99
4.2.2.12. Semiquantitative RT (real-time) - PCR.....	100
4.2.3. Proteinanalytische Methoden.....	100
4.2.3.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	100
4.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	101
4.2.3.3. SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese).....	101
4.2.3.4. Western Blot / Immunoblot.....	102
4.2.3.5. Gelfiltration.....	102
4.2.3.6. Löslichkeits-Assay.....	103
4.2.3.7. Ko-Immunpräzipitation.....	103
4.2.3.8. Immunpräzipitation von endogenem HOIP.....	104
4.2.3.9. Nachweis linearer Ubiquitin-Ketten mittels Immunpräzipitation.....	105
4.2.3.10. Radioaktive Markierung von Proteinen – Pulse/Chase Experimente.....	106
4.2.4. Mausmethoden.....	107
4.2.4.1. Tierhaltung.....	107
4.2.4.2. Präparation primärer kortikaler Neuronen.....	107
4.2.5. Statistik.....	108
II. Abkürzungsverzeichnis.....	109
III. Referenzen.....	114

I. ABSTRACT / ZUSAMMENFASSUNG

ABSTRACT

PACRG (*Parkin co-regulated gene*) shares a bidirectional promoter with the Parkinson-associated gene *PARK2* (*PARKIN*) and is co-regulated with Parkin in many cell types and tissues and throughout evolution. *PACRG* has been implicated in microtubule stabilization and organization but its precise function is unknown.

Since co-regulated proteins often act in the same cellular pathways, we sought to investigate if *PACRG* is involved in Parkin-mediated processes. Parkin has a neuroprotective activity and regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. Indeed, we found that *PACRG* also has a cytoprotective function and influences the dynamics of the mitochondrial network. Overexpression of *PACRG* reduced the rate of apoptosis under several stress conditions in different cell types, whereas *PACRG* knockdown cells were sensitized against cellular stress. *PACRG* decreased Drp1-induced mitochondrial fragmentation but could not induce mitophagy or influence Parkin-induced mitophagy. In addition, we identified the NF- κ B signaling pathway to mediate the cytoprotective activity of *PACRG*. In cells which are deficient for NEMO, the main regulatory subunit of the NF- κ B signaling pathway, *PACRG* did not show its cytoprotective activity anymore. Moreover, *PACRG* was able to directly activate NF- κ B signaling. Linear ubiquitination of NEMO is a major event in the activation of the NF- κ B signaling pathway. Rescue experiments in NEMO-deficient cells indicate that linear ubiquitination of NEMO is required for *PACRG*-mediated cytoprotectivity. When wildtype NEMO was reintroduced into NEMO-deficient cells, *PACRG* could protect against staurosporine-induced apoptosis, whereas reintroduction of NEMO mutants, which are defective in linear ubiquitination, could not restore *PACRG*-mediated cytoprotectivity. Linear ubiquitination is mediated by the LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex), which is composed of the two E3 ubiquitin ligases HOIP and HOIL-1L and the adaptor protein Sharpin. To investigate, whether *PACRG* is implicated in linear ubiquitination by LUBAC, a possible interaction of *PACRG* with LUBAC components was analyzed in co-immunoprecipitation experiments and size exclusion chromatography. Consistently, we found that *PACRG* interacts with all LUBAC components and is part of the LUBAC. HOIP is the catalytically active subunit of the LUBAC, which mediates the attachment of linear ubiquitin chains to target proteins. Under basal conditions HOIP is auto-inhibited via its own N-terminus. Binding of Sharpin or HOIL-1L to the HOIP N-terminus is necessary to change HOIP protein conformation and to activate its catalytic activity. *PACRG* increased linear ubiquitination of NEMO by LUBAC and consequently activation of the NF- κ B pathway upon overexpression of the LUBAC components HOIP, HOIL-1L and Sharpin, or upon TNF- α treatment. In addition, we provides experimental evidence that *PACRG* facilitates

LUBAC activation by decreasing the auto-inhibition of the catalytic LUBAC subunit HOIP. However, PACRG was not sufficient to fully replace HOIL-1L- or Sharpin-mediated activation of HOIP. Therefore we suggest that PACRG acts as an adaptor protein for the binding of HOIL-1L or Sharpin to the HOIP N-terminus resulting in a decrease of HOIP auto-inhibition and activation of its E3 ligase activity.

Our results provide new insights into PACRG function and for the first time link PACRG to a stress-protective activity via regulating NF- κ B signaling by linear ubiquitination.

ZUSAMMENFASSUNG

PACRG (Parkin-koreguliertes Gen) teilt sich einen bidirektionalen Promotor mit dem Parkinsonismus-assoziierten Gen *PARK2* (*PARKIN*). *PACRG* ist koreguliert mit Parkin in vielen Zelltypen und Geweben und evolutionär hoch konserviert. Bisher wurde *PACRG* hauptsächlich eine Funktion bei der Stabilisierung von Mikrotubuli und der Organisation Mikrotubuli-tragender Strukturen zugeschrieben, die genaue Funktion des Proteins ist allerdings unklar.

Da koregulierte Proteine oft in den gleichen zellulären Signalwegen aktiv sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob *PACRG* in Parkin-vermittelten Prozessen eine Rolle spielt. Parkin besitzt ein breites neuroprotektives Potential und reguliert die mitochondriale Dynamik und die Mitophagie. Tatsächlich konnten wir im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass *PACRG* ebenfalls ein zytoprotektives Potential besitzt und die Dynamik des mitochondrialen Netzwerkes beeinflusst. Die Überexpression von *PACRG* reduzierte die Apoptose-Rate unter verschiedenen Stressbedingungen in unterschiedlichen Zelltypen, während *PACRG-Knockdown*-Zellen anfälliger gegenüber zellulären Stress waren. *PACRG* verminderte die Drp1-induzierte mitochondriale Fragmentierung, konnte aber keine Mitophagie induzieren und hatte keinen Einfluss auf die Parkin-induzierte Mitophagie. In weiteren Experimenten konnten wir den NF- κ B-Signalweg als den zellulären Signalweg identifizieren, der der zytoprotektiven Aktivität von *PACRG* zugrunde liegt. In Zellen, die defizient sind für NEMO, die essentielle regulatorische Untereinheit des NF- κ B-Signalweges, zeigte *PACRG* keine zytoprotektive Aktivität mehr. Außerdem konnte *PACRG* den NF- κ B-Signalweg direkt aktivieren. Die lineare Ubiquitinierung von NEMO ist ein elementarer Prozess bei der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Weitere Experimente in NEMO-defizienten Zellen wiesen darauf hin, dass die lineare Ubiquitinierung von NEMO für die *PACRG*-vermittelte Zytoprotektivität notwendig ist. Nach Einbringung von Wildtyp-NEMO in diese Zellen, konnte *PACRG* die Zellen vor Staurosporin-induziertem Zelltod schützen, während die Einbringung von NEMO-Mutanten, die defizient sind im Hinblick auf lineare Ubiquitinierung, die *PACRG*-vermittelte Zytoprotektivität nicht wieder herstellen konnte. Die lineare Ubiquitinierung von Proteinen wird durch den LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*) vermittelt. Dieser Komplex ist aus den zwei E3-Ubiquitin-Ligasen HOIP und HOIL-1L und aus dem Adaptor-Protein Sharpin aufgebaut. Um zu untersuchen, ob *PACRG* in den Prozess der linearen Ubiquitinierung durch den LUBAC involviert ist, wurde in Ko-Immunopräzipitationen und Gelfiltrations-Versuchen die Interaktion von *PACRG* mit den LUBAC-Komponenten und mit dem Komplex untersucht. In der Tat konnten wir feststellen, dass *PACRG* mit allen LUBAC-Komponenten interagiert und Teil des Komplexes ist. Die katalytisch aktive Komponente des LUBAC ist die E3-Ubiquitin-Ligase HOIP, welche die Anheftung der linearen Ubiquitin-Ketten an Zielmoleküle vermittelt. Unter basalen Bedingungen liegt HOIP auto-inhibiert vor. Durch Bindung von Sharpin

oder HOIL-1L an den N-Terminus von HOIP ändert sich die Protein-Konformation von HOIP und das Protein kann katalytisch aktiv werden. PACRG erhöhte die LUBAC-induzierte lineare Ubiquitinierung von NEMO und daraus resultierend auch die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass PACRG die LUBAC-Aktivität, durch die Reduzierung der Auto-Inhibition von HOIP, unterstützt. Allerdings war PACRG nicht in der Lage HOIL-1L oder Sharpin im Komplex zu ersetzen um HOIP vollständig zu aktivieren. Aus diesem Grund vermuten wir, dass PACRG als Adaptor-Protein für die Bindung von HOIL-1L oder Sharpin an den HOIP-N-Terminus agiert, was in einer Verminderung der HOIP-Auto-Inhibierung und einer Aktivierung seiner E3-Ligase-Aktivität resultiert.

Unsere Ergebnisse bieten neue Einblicke in die Funktion von PACRG und verbinden zum ersten Mal PACRG mit einer zytoprotektiven Funktion, beruhend auf der Regulation des NF- κ B-Signalweges durch lineare Ubiquitinierung.

1. EINLEITUNG

1.1. *PACRG* - das Parkin-koregulierte Gen

Im Jahr 2003 entdeckten West *et al* ein bislang unbekanntes Transkript, welches sich auf dem humanen Chromosom 6q25-27 oberhalb des, mit Parkinsonismus assoziierten, *Parkin*-Gens (*PARK2*) befindet. Es wurde festgestellt, dass dieses Transkript „Kopf an Kopf“ mit *PARK2* auf entgegengesetzten DNA-Strängen liegt und dass beide Gene gemeinsam über einen bidirektionalen Promotor reguliert werden (Abb. 1.1). Aus diesem Grund wurde das neue Transkript *PACRG* (Parkin koregulierte Gen, engl. *Parkin Co-regulated Gene*) genannt (West et al., 2003).

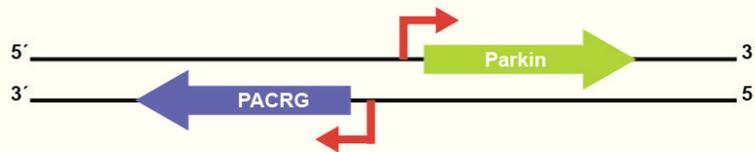


Abb. 1.1: Der Parkin/PACRG Genlokus

PACRG und *Parkin* liegen „Kopf an Kopf“ auf entgegengesetzten DNA Strängen und werden gemeinsam über einen 204 Basenpaare (Bp) langen bidirektionalen Promotor reguliert. *PACRG*, *Parkin Co-regulated Gene*.

1.1.1. Der *PACRG/PARK2*-Genlokus

Der humane *PACRG/PARK2*-Genlokus ist sehr ungewöhnlich. Er umfasst ca. zwei Megabasen (Mb) und ist damit einer der größten des Genoms, kodiert aber im Verhältnis dazu nur für wenige, nämlich nur für 17, Exons. Er besitzt also eine sehr unökonomisch erscheinende Intro/Exon Struktur. Das *PACRG*-Transkript startet 204 Basenpaare (Bp) oberhalb des *Parkin*-Trankripts und umfasst 0,6 Mb und fünf Exons mit einem offenen Leserahmen von 774 Nukleotiden. Der bidirektionale Promotor von *PACRG* und *PARK2* ähnelt im Aufbau dem Promotor von Haushaltsgenen (West et al., 2003), die üblicherweise nicht streng reguliert sind und Grundfunktionen für die Zelle übernehmen (Eisenberg and Levanon, 2003). Der *PACRG/PARK2*-Promotor enthält mehrere CpG-Inseln, aber keine TATA-Box (West et al., 2003) eine Zusammensetzung, die typisch ist für bidirektionale Promotoren (Adachi and Lieber, 2002; Trinklein et al., 2004). Es wird vermutet, dass TATA-Elemente die Richtung der Transkription beeinflussen (Trinklein et al., 2004). Koregulierte Proteine sind aufgrund ihres gemeinsamen Promotors meist ähnlich exprimiert. Die Expression von *PACRG* und *Parkin* ist in vielen, aber

nicht in allen bisher untersuchten Geweben gleich, was darauf schließen lässt, dass beide Gene zwar ähnlich, aber nicht identisch reguliert werden (Brody et al., 2008; West et al., 2003).

1.1.2. Das PACRG-Protein

Die Aminosäuresequenz von PACRG ist hoch-konserviert mit einer Übereinstimmung von 29 % zwischen Mensch und Drosophila. PACRG besitzt 297 Aminosäuren, hat eine Größe von ca. 30 Kilo-Dalton (kDa) und besitzt keine nachgewiesenen bekannten strukturellen Domänen (West et al., 2003). Als einzige mögliche strukturelle Einheit ist ein *ARM-(Armadillo)-type fold* vorhergesagt (www.ensembl.org). Wiederholungen dieses Strukturmotivs, sogenannte *Armadillo repeats*, sind charakterisiert durch eine wiederholte Abfolge von 42 Aminosäuren, die jeweils aus drei α -Helices eine superhelikale Struktur bilden. Proteine mit diesem Motiv können sehr unterschiedliche zelluläre Funktionen ausüben, unter anderem in unterschiedlichen zellulären Signalwegen und bei der Zytoskelett-Organisation. Sie spielen eine Rolle für die Interaktion mit Peptiden und Proteinteilen mit aufgefalteter Struktur (Parmeggiani et al., 2008; Tewari et al., 2010).

1.1.3. Mögliche Funktionen von PACRG

Die Funktion von PACRG ist bisher weitgehend unklar, es deutet allerdings Vieles auf eine Funktion bei der Zusammensetzung und Stabilisierung von Mikrotubuli-enthaltenden Strukturen hin. Erste Hinweise auf die Funktion des Proteins liefern Expressions-Analysen, die von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Geweben durchgeführt wurden. Aus *Microarray*-Daten ist ersichtlich, dass die PACRG-mRNA in allen Geweben basal exprimiert wird, wobei die Expression in *Testis* besonders stark ist (www.biogps.org).

Im Zusammenhang mit der Koregulation von PACRG und dem mit dem Parkinson-Syndrom assoziierten Protein Parkin, ist die Expression von PACRG im Gehirngewebe besonders interessant. Mittels *In-situ*-Hybridisierungs-Experimenten und immunhistochemischen Analysen wurde die PACRG-mRNA- und Protein-Expression in verschiedenen Gehirngeweben analysiert. In murinem Hirngewebe konnte PACRG in Ependymzellen und Zilien Ventrikel-assoziiierter Zellen und in Zellen des *Plexus choroideus* detektiert werden (Wilson et al., 2009a), während eine neuronale Expression hauptsächlich im *Rhombencephalon* und nur geringem Maß auch in *Mesencephalon* und *Prosencephalon* nachweisbar war. In dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta* (*SNpc*) konnte PACRG hingegen nicht detektiert werden (Brody et al., 2008). Das Absterben dieser dopaminergen Zellen ist die Ursache für die Entstehung von Morbus Parkinson (Dickson, 2012). In immunhistochemischen Analysen von humanem *post mortem* Hirngewebe konnte PACRG in Astrozyten von gesundem Gewebe nachgewiesen werden (Taylor et

al., 2007). Die Untersuchung von *post mortem* Morbus Parkinson-Hirngewebe zeigte eine Anreicherung von PACRG in Lewy Körperchen, den Proteinablagerungen, die das pathologische Leitmerkmal der Parkinson-Erkrankung darstellen (Imai et al., 2003; Taylor et al., 2007).

Durch die besonders starke Expression von PACRG in Zilien- oder Flagellen-tragenden Zellen unterschiedlicher Gewebe wurde vermutet, dass PACRG eine Rolle für die Funktion von Mikrotubuli spielt. Die Funktionalität von Zilien und Flagellen hängt von der richtigen Organisation und der Stabilität der Mikrotubuli ab (Haimo and Rosenbaum, 1981). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass PACRG mit dem Axonem, einer Struktur aus mehreren speziell organisierten Mikrotubuli-Paaren, eukaryontischer Zilien und Flagellen assoziiert. PACRG konnte in den Flagellen von *Chlamydomonas reinhardtii* (Ikeda et al., 2007), *Trypanosoma brucei* (Dawe et al., 2005), und murinen Spermatozyten detektiert werden (Lorenzetti et al., 2004). Der *Knockdown* (KD, engl. für „herunterschlagen“; = Herunterregulation der Genexpression) der PACRG-Homologe in *Trypanosoma brucei* resultierte in einer dramatischen Beeinträchtigung der Flagellen-Funktion, hervorgerufen durch den Verlust von äußeren Mikrotubuli-Paaren (Dawe et al., 2005). Die PACRG-mRNA war außerdem in verschiedenen Zilien-tragenden Geweben von Maus, Kaninchen, *Xenopus* und Zebrafisch nachweisbar (Thumberger et al., 2012; Wilson et al., 2009b).

Der Phänotyp der sogenannten Quaking^{viable}-Maus deutet, ebenso wie der *Knockdown* von PACRG in *Trypanosoma brucei*, auf eine Funktion von PACRG für die Stabilisierung von Mikrotubuli und damit der Funktionsfähigkeit von Zilien und Flagellen hin. Die Quaking^{viable}-Maus besitzt eine spontane Deletion eines Bereichs von 1,17 Mb auf Chromosom 17. Dieser Bereich beinhaltet den Promotor des sogenannten *Quaking*-Gens sowie das komplette *PACRG*-Gen, den gemeinsamen Promotor von *Parkin* und *PACRG* und die ersten fünf Exons von *Parkin*. Dies führt zu einem kompletten Verlust von PACRG- und *Parkin*-mRNA in allen Zellen (Lockhart et al., 2004). Das Mausmodell wurde 1964 erstmals beschrieben (SIDMAN et al., 1964). Homozygote Tiere leiden unter einer Dysmyelinierung im zentralen Nervensystem, resultierend in einem Bewegungs-Phänotyp, der durch den Verlust des *Quaking*-Promotors bedingt ist (SIDMAN et al., 1964). Außerdem entwickeln die Tiere einen *Hydrocephalus* und die Männchen sind steril (Bennett et al., 1971). Die beiden letzteren Phänotypen lassen sich allerdings durch die transgene Expression von PACRG revertieren (Lorenzetti et al., 2004; Wilson et al., 2010). Ursache des *Hydrocephalus* ist eine funktionelle Beeinträchtigung der Zilien-Motilität und der daraus resultierende verlangsamte Liquorfluss (Wilson et al., 2010). Die Sterilität ist auf einen Defekt der Spermiogenese zurückzuführen (Bennett et al., 1971). Für die Entwicklung funktionsfähiger Spermien ist die Bildung funktionsfähiger Flagellen und damit die korrekte Organisation und Stabilität von Mikrotubuli ebenso essentiell, wie für die richtige Funktion von den Zilien Ventrikel-assoziiierter

Zellen, die den Liquorfluss regulieren. Der *Hydrocephalus* und die Sterilität lassen sich auf eine funktionelle Beeinträchtigung von Zilien und Flagellen resultierend aus der PACRG-Defizienz zurückführen.

1.1.4. Mit PACRG assoziierte Erkrankungen

Im Jahr 1998 wurden Mutationen im *Parkin*-Gen mit autosomal rezessiv vererbtem juvenilen Parkinsonismus in Verbindung gebracht (Kitada et al., 1998). Da koregulierende Proteine oft in den gleichen Signalwegen agieren oder ähnliche Funktionen in der Zelle ausüben (Bellizzi et al., 2007; Momota et al., 1998; Schmidt et al., 1993) stellte sich die Frage, ob auch PACRG eine Bedeutung für diese Erkrankung spielt. Genetische Analysen von Patienten mit *early onset* (engl. für „früher Ausbruch“ oder „jugendlicher Beginn“) Parkinson-Syndrom ergaben, dass Mutationen in *PACRG* keine oder nur eine sehr geringe Rolle für die Entstehung dieser Erkrankung spielen (Deng et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurden bei genetischen Analysen von Lepra-Patienten Varianten in der Promotorregion von *PARK2* und *PACRG* als Risikofaktoren für die Entstehung von Lepra entdeckt (Alter et al., 2013; Bakija-Konsuo et al., 2011; Mira et al., 2004). Eine Fallstudie von Typhus- und Paratyphus-Patienten zeigte, dass einer der erwähnten Polymorphismen ebenfalls eine Rolle für die Anfälligkeit gegenüber diesen Erkrankungen spielt (Ali et al., 2006).

Die funktionelle Charakterisierung von PACRG kann nicht nur weitere Einblicke in die Mechanismen der Funktion und Organisation von Zytoskelett-Elementen bieten, sondern auch bei der Aufklärung der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen von Morbus Parkinson und Lepra helfen.

1.2. Parkin

Parkin wurde 1998 bei der genaueren Untersuchung einer chromosomalen Deletion eines japanischen Parkinson-Patienten mit junglichem Beginn der Krankheit entdeckt (Kitada et al., 1998). Heute ist bekannt, dass Mutationen im *Parkin*-Gen (*PARK2*) die häufigste Ursache von autosomal rezessiv vererbtem Parkinsonismus mit junglichem Beginn sind (10 – 20 %) (West and Maidment, 2004). Parkin ist ein ubiquitär exprimiertes, zytosolisches Protein (Kitada et al., 1998; Shimura et al., 1999) mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Shimura et al., 2000).

1.2.1. Morbus Parkinson

Die Parkinson-Krankheit oder auch Morbus Parkinson ist nach der Alzheimer-Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit und die häufigste Bewegungsstörung. Die sporadische Parkinson-Erkrankung tritt meist zwischen dem 50. und dem 79. Lebensjahr auf. Andere

Parkinson-Syndrome und genetische Formen der Erkrankung können bereits deutlich früher auftreten (de Lau and Breteler, 2006). Die Kardinal-Symptome betreffen die extrapyramidale Motorik und sind Rigor, Bradykinesie bis hin zur Akinesie, Tremor und posturale Instabilität (Jankovic, 2008). Die Symptomatik entsteht durch das Absterben der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* und dem daraus resultierenden Mangel des Neurotransmitters Dopamin (Dickson, 2012). Die Ursachen für diesen Zelltod sind bis heute nicht vollständig verstanden und scheinen sich aus einem komplexen Zusammenspiel zwischen schädlichen Umwelteinflüssen und genetischen Risikofaktoren zu ergeben. In den letzten Jahrzehnten wurden neben der hauptsächlich auftretenden sporadischen Erkrankung auch familiäre Formen von Morbus Parkinson identifiziert, die insgesamt ca. 10 % der Fälle ausmachen. Für autosomal dominant vererbte Formen der Krankheit wurden Mutationen in den Genen für α -Synuclein und LRRK2 (Leucinreiche-Repeat-Serin/Threoninkinase 2) identifiziert. Rezessiv vererbt werden Mutationen in den Genen für Parkin, PINK-1 (*PTEN-induced Putative Kinase 1*), ATP13A2 und DJ-1 (Hardy, 2010; Martin et al., 2011; Nuytemans et al., 2010).

Bisher sind mehr als 120 mit Parkinsonismus assoziierte Mutationen im *Parkin*-Gen beschrieben, die zur Fehlfaltung des Proteins führen und/oder dessen Funktion beeinträchtigen (Hardy, 2010; Nuytemans et al., 2010). Sie beeinflussen die E3-Ligase-Aktivität, die Interaktion mit E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen, die Expression und Lokalisation und die Löslichkeit des Proteins (Hampe et al., 2006; Matsuda et al., 2006; Schlehe et al., 2008a; Sriram et al., 2005). Der Nachweis von fehlgefaltetem Parkin im Gehirn von Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson legt die Vermutung nahe, dass eine funktionelle Beeinträchtigung von Parkin nicht nur für familiäre Parkinson-Erkrankungen, sondern auch für die sporadisch auftretende Krankheit eine Rolle spielt (LaVoie et al., 2005, 2007; Schlehe et al., 2008b; Wang et al., 2005; Winklhofer et al., 2003).

1.2.2. Die E3-Ligase Parkin

Parkin besteht aus 465 Aminosäuren (Kitada et al., 1998) und besitzt eine N-terminale UBL- (*Ubiquitin-like*)-Domäne, sowie eine C-terminale RBR-Domäne (RBR = *RING Between RING*). Die RBR-Domäne ist aus zwei RING-Finger-Domänen (RING = *Really Interesting New Gene*) und einer IBR-Domäne (IBR = *In-between RING*) aufgebaut (Abb. 1.2). Das Vorhandensein der RBR-Domäne von Parkin spricht für eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität des Proteins (Shimura et al., 2000). Parkin kann verschiedene Arten der Ubiquitinierung vermitteln, sowohl Monoubiquitinierungen, als auch Polyubiquitinierungen mit unterschiedlich verknüpften Ubiquitin-Resten (Winklhofer, 2014). Bisher wurde eine Reihe von Parkin-Substraten beschrieben, die jedoch

keine eindeutige Zuordnung der Funktion von Parkin zu einem spezifischen Signalweg zulassen (Exner et al., 2012; Moore, 2006).

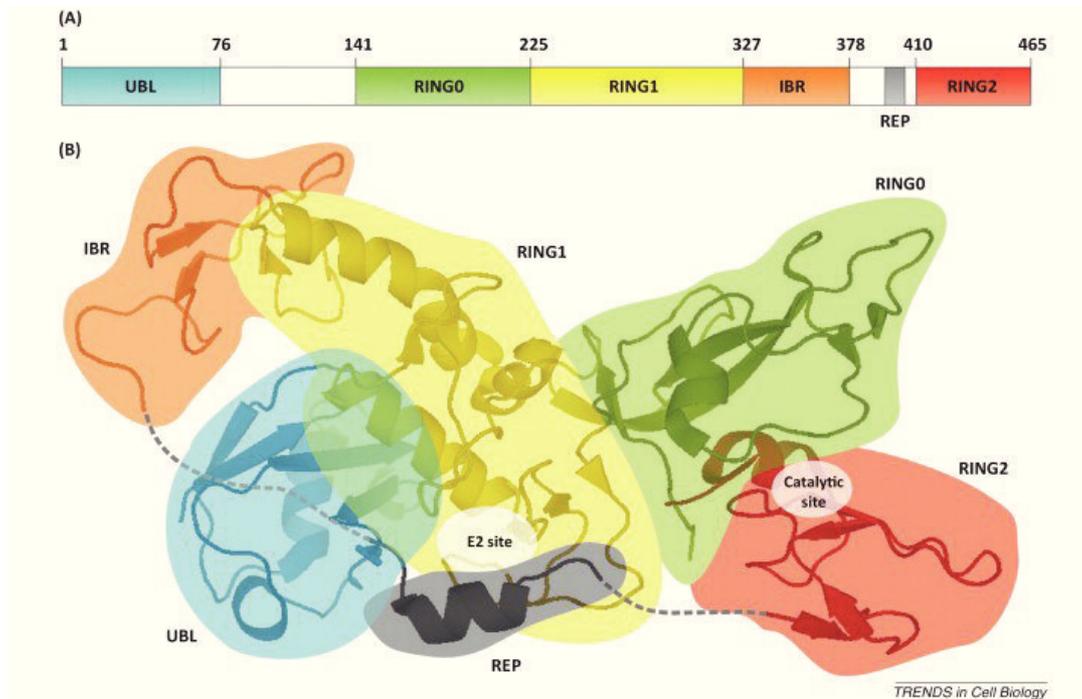


Abb. 1.2: Struktur von Parkin

Modulare Domänenstruktur von Parkin **(A)**. Parkin besteht aus 465 Aminosäuren und besitzt eine N-terminale UBL-Domäne, sowie eine C-terminale RBR-Domäne. Die RBR-Domäne ist aus zwei RING-Finger-Domänen (RING) und einer IBR-Domäne aufgebaut und spielt eine Rolle für die Ubiquitinierung von Proteinen. Zwischen der UBL- und der RBR-Domäne befindet sich eine weitere RING-Domäne, die RING0-Domäne. Schematische Kristallstruktur von Parkin **(B)**. UBL, *Ubiquitin Like*; RING, *Really Interesting New Gene*; RBR, *RING Between RING*; IBR, *In-between RING*. (Winklhofer, 2014)

1.2.3. Zelluläre Funktionen von Parkin

1.2.3.1. Die zytoprotektive Funktion von Parkin

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Parkin-Expression Stress-abhängig reguliert wird und dass Parkin eine starke zellprotektive Aktivität hat. Die Überexpression des Proteins schützt vor Zelltod unter verschiedensten Stressbedingungen (Jiang et al., 2004; Müller-Rischart et al., 2013; Petrucelli et al., 2002; Staropoli et al., 2003), während eine Parkin-Defizienz die Zellen anfälliger gegenüber Stress werden lässt (Bouman et al., 2011; Henn et al., 2007; Müller-Rischart et al., 2013). Es konnten verschiedene Signalwege identifiziert werden, die der protektiven Aktivität zugrunde liegen. So wurde z.B. gezeigt, dass Parkin über die Interaktion und

Ubiquitinierung von PARIS (*Parkin Interacting Substrate*) den PGC-1 α -Signalweg (*PGC-1 α = Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Co-activator-1 α*) aktiviert (Shin et al., 2011). PGC-1 α ist ein transkriptioneller Koaktivator, der die Expression verschiedener Gene für die mitochondriale Biogenese und Funktion reguliert (Scarpulla, 2011; Wenz, 2009). PARIS bindet den PGC-1 α -Promotor und reprimiert dadurch die Expression dieses transkriptionellen Kofaktors. Die Ubiquitinierung von PARIS durch Parkin führt zur proteasomalen Degradation des Proteins und somit zur Aktivierung der PGC-1 α -Expression (Shin et al., 2011). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der NF- κ B-Signalweg (NF- κ B = *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) für die protektive Funktion von Parkin eine essentielle Rolle spielt. Unter Stressbedingungen wird Parkin zum sogenannten LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*) rekrutiert und aktiviert diesen (Abb. 1.3) (Müller-Rischart et al., 2013). Der aktive Komplex vermittelt die lineare Ubiquitinierung von NEMO (*NF- κ B Essential Modulator = IKK γ*), dem hauptsächlichsten Regulator des kanonischen NF- κ B-Signalweges (Tokunaga et al., 2009a). Somit führt Parkin über lineare Ubiquitinierung von NEMO zur Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors, der wiederum die Expression von Überlebensgenen aktiviert (Mattson and Meffert, 2006), (Abschnitt 1.3.2.3). Müller-Rischart *et al* konnten z.B. *OPA1 (Optic Atrophy 1)* als neues Zielgen für den NF- κ B-Transkriptionsfaktor identifizieren (Müller-Rischart et al., 2013). OPA1 ist ein mitochondriales Fusionsprotein. Die Fusion von Mitochondrien oder die Verhinderung der mitochondrialen Fragmentierung wirkt der Apoptose entgegen und stellt somit einen Mechanismus dar, der das Überleben der Zelle unterstützt (Fannjiang et al., 2004; Frank et al., 2001).

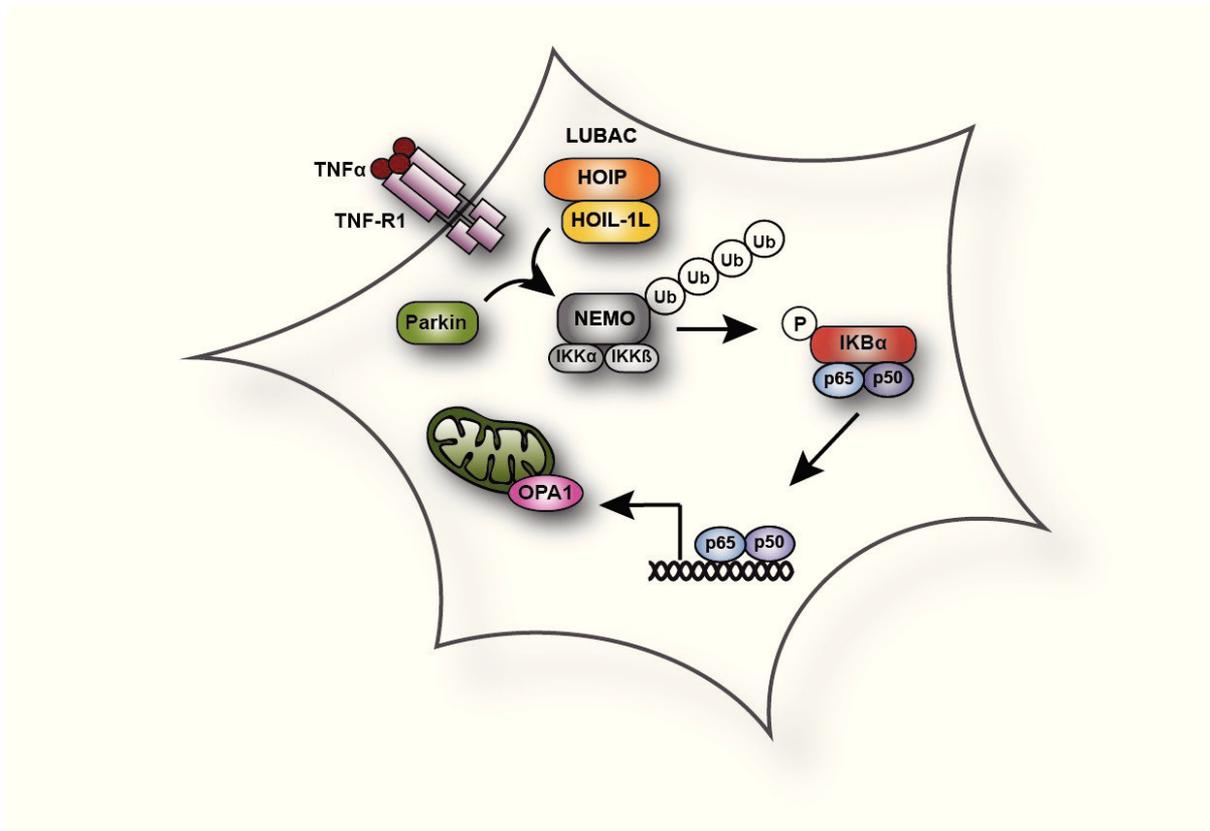


Abb. 1.3: Der Einfluss von Parkin auf den NF-κB-Signalweg

Nach Aktivierung des TNF-Rezeptors-1 durch Bindung von TNF- α auf der Zellmembran wird Parkin zum sogenannten LUBAC, bestehend aus den E3-Ligasen HOIL-1L und HOIP, rekrutiert und aktiviert diesen. Der aktive Komplex vermittelt die lineare Ubiquitinierung von NEMO, dem hauptsächlichen Regulator des kanonischen NF- κ B-Signalweges. NEMO ist der regulatorische Teil des IKK-Komplexes, der mit seinen Kinase-Untereinheiten IKK- α und - β den Inhibitor I κ B phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird der Inhibitor für die proteasomale Degradierung markiert und abgebaut. Das vom Inhibitor abgelöste Transkriptionsfaktor-Dimer kann nun in den Zellkern translozieren, um die Transkription von verschiedensten Zielgenen zu aktivieren. Zu diesen Zielgenen gehören neben z.B. OPA1 zahlreiche Überlebensfaktoren für die Zelle (Müller-Rischart et al., 2013). TNF- α , Tumornekrosefaktor- α ; TNFR1, Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1; LUBAC, *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*; HOIL-1L, *RanBP-type and C3HC4-type Zinc Finger-containing Protein 1*; HOIP, *HOIL-1L Interacting Protein*; NEMO, *NF- κ B Essential Modulator* = IKK γ ; IKK, I κ B-Kinase-Komplex; I κ B- α , Inhibitor von NF- κ B- α ; OPA1, *Optic Atrophy 1*.

1.2.3.2. Parkin und Mitochondrien

Neben seiner zytoprotektiven Funktion hat Parkin Einfluss auf die mitochondriale Morphologie und Funktion. *Parkin-Knockout*-Mäuse (KO, engl. für „außer Gefecht setzen“; = Ausschalten der Genexpression) zeigen Anzeichen von mitochondrialer Dysfunktion und oxidativen Schäden im ventralen Mittelhirn (Palacino et al., 2004). Der akute Verlust von Parkin induziert in Zellen eine Drp1-abhängige (Drp1, engl. *Dynamamin Related Protein 1* = mitochondriales Fissionsprotein) mitochondriale Fragmentierung (Abb. 1.4) einhergehend mit einer reduzierten ATP-Produktion.

Dieser Effekt kann durch verstärkte Expression von mitochondrialen Fusionsproteinen revertiert werden (Lutz et al., 2009a; Pilsl and Winklhofer, 2012).

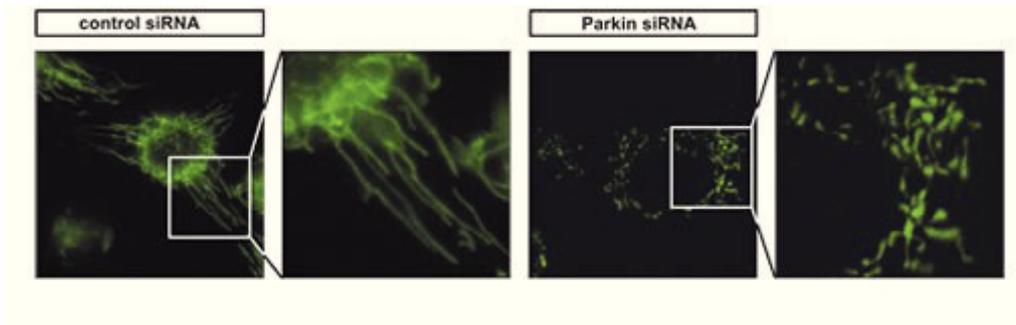


Abb. 1.4: Der Einfluss von Parkin auf die mitochondriale Morphologie

Der *Knockdown* von Parkin mittels Parkin-siRNA-Transfektion führt in kultivierten Zellen (SH-SY5Y) zur Drp1-abhängigen Fragmentierung der Mitochondrien (Lutz et al., 2009a). Control, Kontrolle; Drp1, *Dynamin Related Protein 1*; siRNA, *Small Interfering RNA*.

Darüber hinaus wurde Parkin in den letzten Jahren eine Funktion beim Abbau nicht-funktioneller Mitochondrien, der sogenannten Mitophagie, zugeordnet. Parkin wird zu geschädigten Mitochondrien rekrutiert und ubiquitiniert dort mitochondriale Proteine. Durch diese Ubiquitinierung werden Adaptor-Proteine für die Autophagie rekrutiert und die Mitochondrien in Autophagosomen verpackt. Diese Autophagosomen fusionieren anschließend mit Lysosomen in denen die enthalten Mitochondrien degradiert werden (Narendra et al., 2008; Youle and Narendra, 2011), (Kapitel 1.3.1.2).

Mitochondrien erfüllen eine wichtige Funktion in zahlreichen verschiedenen zellulären Prozessen (Kapitel 1.3). Ein funktionierendes mitochondriales Netzwerk ist ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Störung der mitochondrialen Funktion eine Rolle im Alterungsprozess und bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson, spielt (Müller et al., 2010; Winklhofer and Haass, 2010). Den ersten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Parkinson und der Funktionalität von Mitochondrien gab es in den späten 1970er, frühen 1980er Jahren, als junge Drogensüchtige nach dem Konsum von einem mit MPTP-(1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine)-kontaminierten Meperidin-Analogon (synthetischem Heroin) Parkinson-Symptome entwickelten (Davis et al., 1979; Langston and Ballard, 1983). MPTP ist die Vorstufe eines Toxins, welches spezifisch in dopaminerge Zellen aufgenommen wird und dort den Komplex-1 der mitochondrialen Atmungskette hemmt. Die daraus resultierende verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies führt zum Absterben der Neuronen (Chan et al., 1991;

Nicklas et al., 1985; Przedborski et al., 1996). Zudem wurde in *post mortem Substantia nigra*-Gewebe von Parkinson-Patienten eine Beeinträchtigung der Komplex-1-Aktivität nachgewiesen (Schapira et al., 1989). Nach der Entdeckung der genetischen Faktoren für die Entstehung von Morbus Parkinson, erhärtete sich der Verdacht eines Zusammenhangs zwischen Morbus Parkinson und Mitochondrien, da einige der Parkinson-assoziierten Proteine eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie, Funktion und Dynamik spielen (Winklhofer and Haass, 2010). Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den beiden Parkinson-assoziierten Proteinen Parkin und PINK-1 zu, deren Einfluss auf Mitochondrien intensiv untersucht, und in diesem Abschnitt bereits teilweise besprochen, worden ist (Pisl and Winklhofer, 2012).

Wie bereits erwähnt konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine funktionelle Beeinträchtigung von Parkin sowohl für familiäre als auch für sporadische Parkinson-Erkrankungen eine Rolle spielt. Die Aufklärung der genauen Funktion von Parkin und der zellulären Signalwege, in denen das Protein agiert, bietet einen wichtigen Ansatzpunkt für die Erforschung der pathologischen Mechanismen, die der Parkinson-Krankheit zugrunde liegen. Dies wiederum ist die Grundlage für die Entwicklung von Präventionsstrategien und Therapien, die sich bisher rein auf die Behandlung der Symptome durch Ausgleich des Dopamin-Mangels beschränken. Durch die Koregulation von Parkin und PACRG und aufgrund der Annahme, dass koregulierte Proteine ähnliche Funktionen in der Zelle ausüben, kann auch die funktionelle Charakterisierung von PACRG zur Aufklärung der Parkin-Funktion sowie der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der Parkinson-Erkrankung beitragen.

1.3. Neurodegeneration – Mitochondrien und Apoptose

Den Symptomen vieler neurologischer Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Schlaganfällen, liegt das Absterben von Neuronen zugrunde (Mattson, 2000).

Das Überleben von Zellen hängt stark von der Integrität und Funktionalität der Mitochondrien ab. Eine Reihe von zellulären Überlebens-Strategien zielen darauf ab, die Mitochondrien vor Stress zu schützen um ihre Funktionsfähigkeit zu wahren, oder geschädigte Organellen reguliert abzubauen.

Mitochondrien sind die Zellorganellen, die für die Produktion von ATP (Adenosintriphosphat) in der Zelle hauptverantwortlich sind. Sie spielen allerdings auch für andere zelluläre Prozesse eine wichtige Rolle, wie für die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern, den Harnstoffzyklus, die Speicherung von Kalzium und die Apoptose. Die Organellen sind von einer Doppelmembran umschlossen. In der inneren Membran sind unter anderem die Enzyme für den Prozess der ATP-Gewinnung, der oxidativen Phosphorylierung, lokalisiert. Die äußere Membran enthält hauptsächlich Transportproteine für den Import mitochondrialer Proteine. Die Proteine des

Intermembranraumes spielen eine initiale Rolle für den programmierten Zelltod, die Apoptose (Kapitel 1.3.2.1).

Bei der Produktion von ATP bilden Mitochondrien als Nebenprodukt reaktive Sauerstoffspezies, die zur Modifikation von Proteinen, DNA-Schädigung und Lipid-Peroxidation führen, was die Zelle letztendlich in die Apoptose treiben kann. Auch der Einfluss der Mitochondrien auf die intrazelluläre Kalzium-Homöostase kann zur Initiation des programmierten Zelltods beitragen. Aus diesen Gründen besitzt die Zelle ein komplexes Netzwerk an mitochondrialen Qualitätskontroll-Mechanismen, die nicht-funktionelle Mitochondrien erkennen und zur Reparatur oder zum Abbau der Organellen führen können (Rugarli and Langer, 2012).

1.3.1. Mitochondriale Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle von Mitochondrien tragen verschiedene Mechanismen bei. Ein System aus Hitzeschockproteinen und Proteasen der mitochondrialen Matrix unterstützt die Faltung importierter Proteine, schützt diese vor Stressbedingungen und degradiert fehlerhafte Proteine. Die Dynamik des mitochondrialen Netzwerkes trägt ebenfalls zur Sicherstellung der Funktionalität von Mitochondrien bei. Als letzten Schritt der Qualitätskontrolle können defekte Organellen mittels Mitophagie abgebaut werden (Rugarli and Langer, 2012).

1.3.1.1. Mitochondriale Dynamik

Mitochondrien sind sehr dynamische Zellorganellen (Bereiter-Hahn, 1990). Durch Fusions- und Fissionsprozesse ändert sich die Morphologie des Netzwerkes ständig, abhängig von unterschiedlichsten zellulären Bedingungen (Scorrano, 2013). Unter verschiedenen metabolischen Stressbedingungen oder schädlichen Umwelteinflüssen, wie Nährstoffmangel und oxidativer Stress, können die Mitochondrien verstärkt fusionieren (Tondera et al., 2009). Diese Stress-induzierte Hyperfusion dient dem Austausch von mitochondrialem genetischem Material und verringert damit die Anhäufung von Defekten innerhalb eines Mitochondriums. Dadurch werden die einzelnen Organellen vor dem Abbau geschützt und das Überleben der Zelle unterstützt (Chen et al., 2010; Nakada et al., 2001; Ono et al., 2001). Stark geschädigte Mitochondrien wiederum teilen sich und bilden ein fragmentiertes mitochondriales Netzwerk. Diese Organellen werden dann durch Mitophagie abgebaut (Abb. 1.5) (Twig et al., 2008; Youle and van der Bliek, 2012). Außerdem ist die Fission von Mitochondrien in die Regulation des programmierten Zelltods involviert und stellt ein frühes Ereignis in dieser Kaskade dar. Die Fragmentierung der Mitochondrien geht einher mit der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und der Freisetzung von pro-apoptischen Proteinen, wie Cytochrom-c, aus dem Intermembranraum (Fannjiang et al., 2004; Frank et al., 2001). Die Dynamik des mitochondrialen Netzwerkes spielt

zudem eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und beim Transport der Organellen entlang von Mikrotubuli, z.B. im Axon von Neuronen.

Mitochondriale Fusion und Fission werden durch große hoch-konservierte Guanosintriphosphatasen (GTPasen) der Dynamin-Familie vermittelt (Hoppins et al., 2007). Die Fusion von Mitochondrien erfolgt über die Fusion der mitochondrialen Membranen. Die Fusion von Membranen läuft stets nach einem ähnlichen Prinzip ab. Zunächst müssen die zu fusionierenden Membranen in engen Kontakt gebracht werden, damit dann die Membran durch Einfügen einer Krümmung destabilisiert werden kann und die Lipid-Schichten sich miteinander vereinigen (Martens and McMahon, 2008). Die Fusion der äußeren mitochondrialen Membranen wird durch die Membran-verankerten GTPasen Mitofusin1 und 2 (Mfn1 und Mfn2) vermittelt (Hales and Fuller, 1997; Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998; Santel and Fuller, 2001), während die GTPase OPA1 die Fusion der inneren Mitochondrienmembran katalysiert (Cipolat et al., 2004; Meeusen et al., 2006). Die GTPasen der beiden zu fusionierenden Membranen interagieren miteinander und heften die Membranen eng aneinander. Dadurch können sich die Lipid-Schichten vermischen, während durch die GTPase-Aktivität die biomechanische Energie für den Fusionsprozess zur Verfügung gestellt wird (DeVay et al., 2009; Fritz et al., 2001; Koshiba et al., 2004). Die Fission mitochondrialer Membranen wird von der zytosolischen GTPase Drp1 (*Dynamin Related Protein 1*) vermittelt (Otsuga et al., 1998; Smirnova et al., 2001). Drp1 wird an die äußere mitochondriale Membran rekrutiert (Mozdy et al., 2000; Zhang and Chan, 2007) und polymerisiert dort zu helikalen Strukturen, welche die Membran umspannen. Die GTP-Hydrolyse liefert die Energie für die Abschnürung der Membranen (Ingeman et al., 2005). Der Mechanismus der Fission der inneren mitochondrialen Membran ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise werden innere und äußere Membran gemeinsam von Drp1 abgeschnürt.

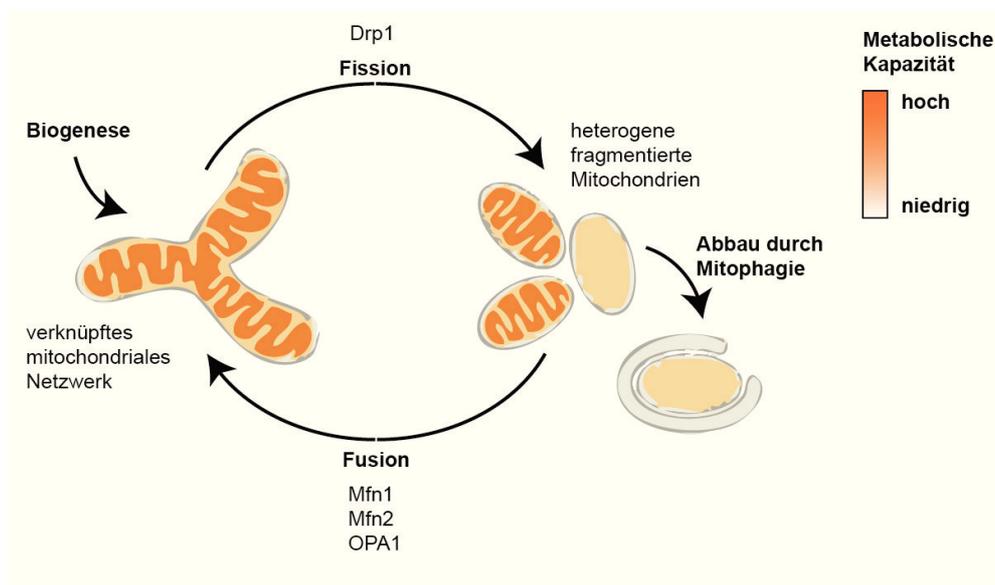


Abb. 1.5: Schema der mitochondrialen Dynamik

Das mitochondriale Netzwerk ist sehr dynamisch. Abhängig von unterschiedlichen zellulären Bedingungen fusionieren Mitochondrien miteinander oder das mitochondriale Netzwerk fragmentiert. Dies hat Einfluss auf die metabolische Kapazität der Mitochondrien. Ein verknüpftes mitochondriales Netzwerk hat eine hohe metabolische Kapazität. Für die Fusion der äußeren Membranen sind die Membran-verankerten GTPasen Mfn1 und Mfn2 verantwortlich, während die Fusion der inneren Membranen durch die GTPase OPA1 katalysiert wird. Die Fragmentierung von Mitochondrien dient unter anderem der Abtrennung defekter Organellen mit niedriger metabolischer Kapazität, die dann mittels Mitophagie abgebaut werden können. Diese Fission wird durch die zytosolische GTPase Drp1 vermittelt (modifiziert aus Westermann, 2010). Mfn, Mitofusin; OPA1, *Optic Atrophy 1*; Drp1, *Dynamamin Related Protein 1*.

1.3.1.2. Mitophagie – der selektive Abbau defekter Mitochondrien

Der Abbau defekter Mitochondrien ist ein wichtiger Prozess zur Aufrechterhaltung eines funktionellen mitochondrialen Netzwerkes (Egan et al., 2011; Komatsu et al., 2005). Selektive Fusions- und Fissions-Ereignisse sorgen für die Abtrennung geschädigter Mitochondrien vom Netzwerk (Twig et al., 2008). Anschließend werden die segregierten Organellen von einer Doppelmembran in ein sogenanntes Autophagosom umschlossen. Dieses Autophagosom fusioniert mit Lysosomen, in denen die Organellen degradiert werden (Eskelinen and Saftig, 2009). Der Prozess der spezifischen Autophagie von Mitochondrien wird auch Mitophagie genannt und von den beiden Parkinson-assoziierten Proteinen PINK-1 und Parkin reguliert. In gesunden Mitochondrien wird die zytosolische Kinase PINK-1, abhängig vom mitochondrialen Membranpotential, an die innere mitochondriale Membran rekrutiert und proteasomal degradiert (Jin et al., 2010; Whitworth et al., 2008). In nicht-funktionellen Mitochondrien mit einem zerstörten Membranpotential kann PINK-1 nicht mehr importiert und degradiert werden und akkumuliert an der äußeren mitochondrialen Membran (Narendra et al., 2010). PINK-1 rekrutiert wiederum die ebenfalls zytosolische E3-Ligase Parkin an die Mitochondrien (Narendra et al., 2008), welche die Ubiquitinierung mitochondrialer Membranproteine, wie z.B. den Mitofusinen katalysiert (Gegg et al., 2010; Glauser et al., 2011; Poole et al., 2010; Ziviani et al., 2010). Die genauen Mechanismen, die anschließend zur Bildung des Autophagosoms führen sind nicht vollständig aufgeklärt (Abb. 1.6).

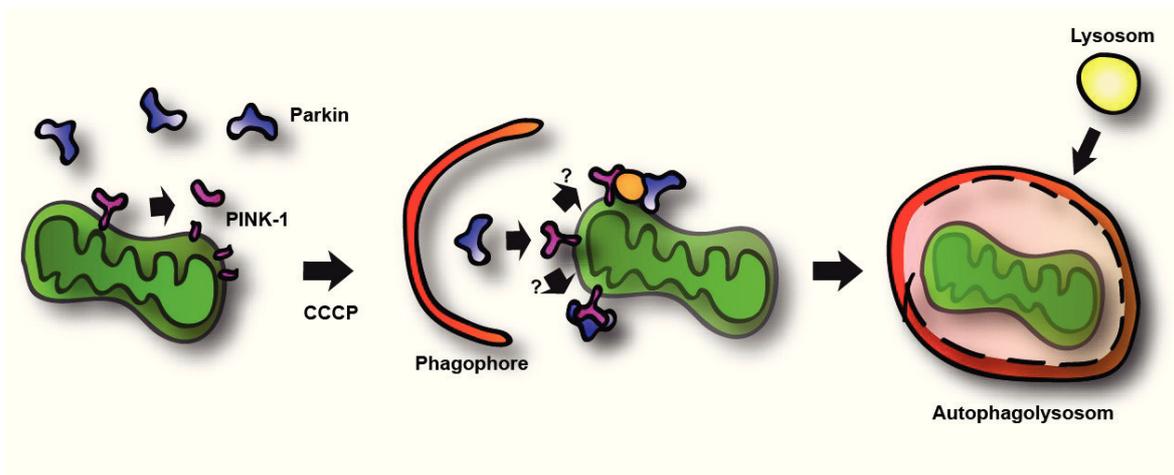


Abb. 1.6: Mitophagie

In funktionsfähigen Mitochondrien wird PINK-1 an die mitochondriale Membran rekrutiert und dort direkt proteolytisch degradiert. Nach Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials durch Behandlung von Zellen mit Carbonyl-Cyanide-*m*-chlorophenyl-Hydrazon (CCCP = Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette) wird PINK-1 nicht mehr abgebaut und rekrutiert Parkin an die mitochondriale Membran. Parkin ubiquitiniert mitochondriale Proteine und markiert die defekten Mitochondrien für die Autophagie. Es bildet sich ein Phagosom, welches mit Lysosomen fusioniert und die Mitochondrien abbaut. PINK-1, *PTEN-induced Putative Kinase 1* (Pisli and Winklhofer, 2012).

1.3.2. Apoptose und Überleben

1.3.2.1. Apoptotischer Zelltod

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein essentieller Prozess für die Entwicklung und die Funktion multizellulärer Organismen. Unregelmäßigkeiten in diesem Signalweg können zur Entstehung verschiedener Krankheiten beitragen, wie z.B. Krebs, Autoimmunität und neurodegenerativen Erkrankungen. Apoptose kann als Antwort auf verschiedenste extrazelluläre oder intrazelluläre Stimuli induziert werden und konvergiert in der Aktivierung der Cystein-Effektor-Proteasen, den Caspasen-3, -6 und -7 (*Cys-dependent Aspartyl-specific Proteases*), welche die biochemischen und morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle verursachen (Thornberry and Lazebnik, 1998). Es werden zwei Signalwege unterschieden die zur Aktivierung dieser Caspasen führen, der intrinsische und der extrinsische Signalweg. Der intrinsische Signalweg wird von Stimuli, wie oxidativem Stress, Mangel an Wachstumsfaktoren, DNA-Schädigung oder Behandlung mit verschiedenen Toxinen, innerhalb der Zelle ausgelöst, während der extrinsische Weg durch Liganden-Bindung an sogenannte Todesrezeptoren auf der Zellmembran in Gang gesetzt wird (Abb. 1.7).

Im intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg führt der Zelltod-Stimulus zur Freisetzung von Cytochrom-c aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Saelens et al., 2004). Cytochrom-c bindet im Zytosol an Apaf-1 (*Apoptose Protease Activating Factor-1*) und bildet zusammen mit diesem Protein und der Pro-Caspase-9 das Apoptosom, einen ca. 1 MDa großen Multi-Protein-Komplex (Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Nach der Rekrutierung in das Apoptosom wird die Pro-Domäne der Pro-Caspase-9 proteolytisch abgespalten und dadurch die Caspase aktiviert, die dann wiederum die Effektor-Caspasen proteolytisch aktiviert (Slee et al., 1999). Die Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium wird von Proteinen der Bcl-2-Familie (Bcl-2 = *B-cell Lymphoma 2*) reguliert. Diese Familie besteht aus anti-apoptotischen Mitgliedern, wie Bcl-2 und Bcl-xl (*BCL-extra large*), und pro-apoptotischen Mitgliedern, wie BID (*BH3-Interacting Domain Death Agonist*), Bax (*Bcl-2-associated X Protein*) und Bak (*Bcl-2 Antagonist or Killer*) (Vander Heiden and Thompson, 1999; Youle and Strasser, 2008). Nach dem pro-apoptotischen Stimulus ändert das zytosolische Bax seine Konformation und inseriert in die mitochondriale Membran. Dort bildet es zusammen mit Bak und anderen Proteinen Mikroporen, durch die Proteine des Intermembranraumes, wie Cytochrom-c, ins Zytosol austreten können und das mitochondriale Membranpotential zerstört wird (Korsmeyer et al., 2000; Kuwana et al., 2002).

Der extrinsische Apoptose-Signalweg wird durch Bindung von Liganden wie FasL (Fas Ligand) oder TNF (Tumornekrosefaktor) an Todesrezeptoren ausgelöst (Ashkenazi and Dixit, 1998). Die Rezeptoren bilden Trimere auf der Zelloberfläche und rekrutieren je nach Rezeptor verschiedenen Adaptor-Proteine, wie z.B. FADD (*Fas-associated Death Domain Protein*), an ihre zytosolische Todesdomäne. FADD dimerisiert und rekrutiert die Pro-Caspase-8, deren Pro-Domäne autokatalytisch abgespalten wird. Die aktive Caspase-8 aktiviert dann wiederum proteolytisch die Effektor-Caspasen (Kischkel et al., 1995).

Der intrinsische und der extrinsische Signalweg sind über das pro-apoptotische *BH3-only*-Protein BID verbunden (Wang et al., 1996). Dieses wird nach Aktivierung des extrinsischen Signalweges durch die Caspase-8 gespalten. Die aktive Form des Proteins, tBID kann direkt Bax aktivieren und so zur Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Mitochondrium führen (Korsmeyer et al., 2000).

Beide Apoptose-Signalwege enden mit der Aktivierung der sogenannten Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Diese Caspasen aktivieren zytosolische Endonukleasen, welche für die Degradierung von Nukleinsäuren zuständig sind, sowie Proteasen, die den Abbau von Proteinen katalysieren (Slee et al., 2001). Die dadurch hervorgerufenen Veränderungen der Zellen beinhalten das Schrumpfen und Abrunden der Zellen und die Kondensation des Chromatins. Es schnüren sich kleine Vesikel von der Plasmamembran ab und der Inhalt der Zelle wird in sogenannte Apoptose-Körperchen (*Apoptotic Bodies*) verpackt. Diese Körperchen werden anschließend von Makrophagen oder Parenchymzellen phagozytiert und lysosomal degradiert (Elmore, 2007).

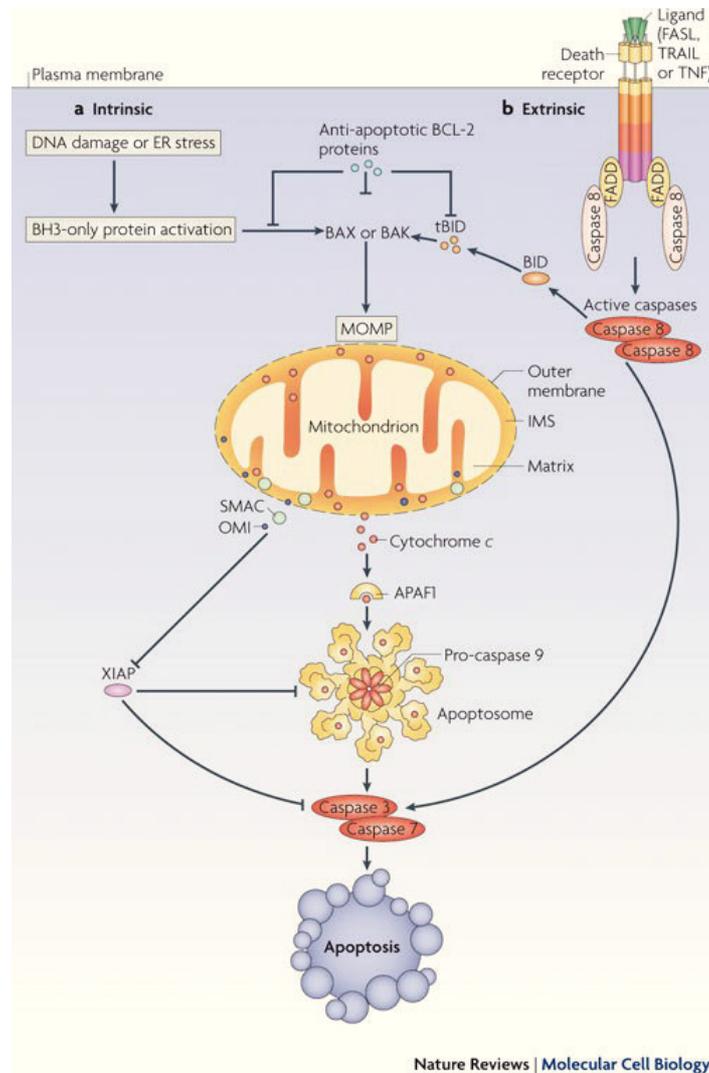


Abb. 1.7: Der extrinsische und der intrinsische Apoptose-Signalweg

A) Stimuli, die den intrinsischen Apoptose-Signalweg in Gang setzen, aktivieren zunächst pro-apoptische BH3-Proteine. Diese aktivieren wiederum Bax und Bak, die zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) und zur Freisetzung von Cytochrom-c aus dem Intermembranraum führen. Freigesetztes Cytochrom-c verbindet sich im Zytosol mit Apaf-1 und der Pro-Caspase-9 zum Apoptosom, welches letztendlich die Effektor-Caspasen-3 und -7 aktiviert. Die Apoptose kann auf verschiedenen Wegen reguliert werden. Die Aktivierung von Bax und Bak kann durch anti-apoptische Proteine der Bcl-2-Familie inhibiert werden. XIAP ist ein Inhibitor der Caspase-Aktivität und wirkt dadurch ebenfalls anti-apoptisch. Die mitochondriale Freisetzung von SMAC und OMI (HTRA2) hemmt die Aktivität von XIAP und wirkt pro-apoptisch. **B)** Der extrinsische Apoptose-Signalweg wird über die Bindung von Liganden (FasL, TRAIL, TNF) an Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche in Gang gesetzt. Über Adaptor-Proteine (FADD) wird die Pro-Caspase-8 an die intrazelluläre Todesdomäne des Rezeptors rekrutiert und dort proteolytisch aktiviert. Die aktive Caspase-8 aktiviert wiederum die Effektor-Caspasen-3 und -7 (Tait and Green, 2010). MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation*; Apaf 1, *Apoptotic Protease Activating Factor 1*; XIAP, *X-linked Inhibitor of Apoptosis*; SMAC, *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*; FasL, *Fas Ligand*; TRAIL, *TNF-related*

Apoptosis-inducing Ligand; TNF, Tumornekrosefaktor; FADD, *Fas-associated Death Domain Protein*; Bax, *Bcl-2-associated X Protein*; Bak, *Bcl-2 Antagonist or Killer*; BID, *BH3 Interacting-domain Death Agonist*; Bcl-2, *B-cell Lymphoma 2*.

1.3.2.2. Zelluläre Überlebens-Signale

Der Zelle stehen verschiedene sogenannte Überlebens-Signalwege zur Verfügung um die Apoptose zu inhibieren. Diese Signalwege haben die Inhibition der Expression pro-apoptotische Proteine, sowie die Expression anti-apoptotischer Proteine zum Ziel. Einer dieser Signalwege ist der Akt/PKB-Signalweg (Akt = *Alternatively Protein Kinase B*), der über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) nach Stimulation unterschiedlicher Transmembranrezeptoren aktiviert wird. Dieser Signalweg führt unter anderem zur Aktivierung des wachstumsfördernden Proteins mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) und zur Phosphorylierung und Inhibierung der pro-apoptotischen Proteine Bad, Bax und Caspase-9 (Song et al., 2005). Ein zweites Beispiel für einen anti-apoptotischen Signalweg ist der JAK-Signalweg (JAK = Januskinase). Januskinasen sind Tyrosinkinasen, die nach ihrer Bindung an die zytosolische Domäne aktivierter Zytokin-Rezeptoren der Zelloberfläche sogenannte STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) phosphorylieren, die im Zellkern als Transkriptionsfaktoren aktiv sind. STATs aktivieren unter anderem die Transkription anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-xL und Bcl-2 (Hebenstreit et al., 2005). Wie bereits erwähnt, gibt es noch viele weitere Signalwege mit dem Ziel die Zelle vor Zelltod zu schützen. Die Aktivierung des TNF-Rezeptors über Bindung von TNF- α kann zwar die Apoptose induzieren, kann aber über die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges auch einen Überlebens-Signalweg in Gang setzen.

1.3.2.3. Der NF- κ B-Signalweg

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse, wie z.B. von Entzündungsprozessen, Immunität, Zellwachstum und Überleben und Entwicklung, zuständig ist. Der NF- κ B-Signalweg wird durch Zytokine, virale oder bakterielle Antigene oder unterschiedliche zelluläre Stresssituationen in Gang gesetzt. Die Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Mitgliedern, den Rel-Proteinen c-Rel, RelA (p65) und RelB, und den NF- κ B-Proteinen p50/p105 (NF κ B1) und p52/p100 (NF κ B2), die verschiedene Homo- oder Heterodimere miteinander bilden können. Das häufigste Dimer ist das p50/RelA Heterodimer. Die Transkriptionsfaktoren werden unter Basalbedingungen über die Bindung an einen Inhibitor (I κ B = *Inhibitor of κ B*) inaktiv im Zytoplasma gehalten. Nach Aktivierung des Signalweges wird der Inhibitor durch einen Kinase-Komplex (I κ B-Kinase-Komplex = IKK-Komplex) phosphoryliert. Diese Modifikation dient als Signal für die Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung des Inhibitors. Dadurch wird der NF- κ B-Transkriptionsfaktor

freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren um dort die Transkription verschiedenster Zielgene zu aktivieren (Abb. 1.8) (Gilmore, 2006).

Man unterscheidet den kanonischen und den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg. Die Aktivierung beider Wege erfolgt über die Bindung von Liganden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Der kanonische Signalweg wird z.B. über die Bindung von Interleukinen, TNF- α oder bakteriellem LPS (Lipopolysaccharid) an TNF-Rezeptoren oder *Toll-like*-Rezeptoren in Gang gesetzt. Nach Aktivierung der Rezeptoren werden unterschiedliche Adaptor-Proteine an die zytosolische Domäne des Rezeptors rekrutiert (TRADD, TRAF, RIP, TRIF, IRAK). Diese Adaptor-Proteine rekrutieren wiederum den IKK-Komplex (Napetschnig and Wu, 2013). Der nicht-kanonische Signalweg spielt für die B- und T-Zell-Entwicklung und die Aktivierung dendritischer Zellen eine Rolle und unterscheidet sich zum kanonischen Signalweg durch die Aktivierung über andere Membran-Rezeptoren und die Zusammensetzung des IKK-Komplexes (Sun, 2011).

Die Mitglieder der NF- κ B-Transkriptionsfaktor-Familie zeigen eine starke Homologie in ihrer Rel-Homologie-Domäne (RHR = *Rel Homology Region*), die für die DNA-Bindung und die Dimerisierung zuständig ist (Gilmore, 1990). Die Rel-Proteine besitzen außerdem eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, während die NF- κ B-Proteine keine solche Aktivierungsdomäne besitzen. Die NF- κ B-Proteine dienen als Koaktivatoren in Heterodimeren mit Rel-Proteinen, oder als transkriptionelle Repressoren, wenn sie Homodimere miteinander bilden. Die Aktivierung der Transkription verschiedener Gene durch den NF- κ B-Signalweg wird also stark über die spezifische Aktivität der unterschiedlichen Dimere reguliert. Von verschiedenen Dimeren werden unterschiedliche, teilweise aber auch überlappende Sets von Zielgenen reguliert. Diese Diversität ergibt sich aus der unterschiedlichen Spezifität der Dimere für die DNA-Bindesequenz und aus den unterschiedlichen Wechselwirkungen mit Koaktivatoren und Korepressoren am Promotor der Zielgene (Smale, 2012).

Bei der Gruppe der Inhibitoren von NF- κ B, den I κ Bs, gibt es ebenfalls mehrere Vertreter (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ), die sich in ihrer Affinität zu unterschiedlichen NF- κ B-Dimeren unterscheiden (Gilmore, 2006). Die Regulation der Inhibitoren erfolgt über die Phosphorylierung durch den IKK-Komplex. Dieser besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK- α und IKK- β), sowie einer regulatorischen Untereinheit (NEMO/IKK- γ = *NF- κ B Essential Modulator*). Nach Aktivierung des IKK-Komplexes wird I κ B von den Kinase-Domänen IKK- α und IKK- β an zwei Serin-Resten phosphoryliert und damit für die Lys48-Ubiquitinierung durch die SCF ^{β TrCP}-Ligase (SCF ^{β TrCP} = *Skp-cullin-F-box- β TrCP*) markiert, um anschließend proteasomal degradiert zu werden (Israël, 2010).

NF- κ B reguliert die Transkription von Genen mit unterschiedlichsten zellulären Funktionen. Zielgene dieses Transkriptionsfaktors sind z.B. Zytokine und Chemokine (Interleukine, IFN- γ und

TNF), Zell-Adhäsions-Moleküle (CD44 und Fibronectin), Gene für die zelluläre Antwort auf Stressbedingungen (SOD und NAD(P)H-Quinone-Oxidoreduktase), Regulatoren der Apoptose (Bax, Bcl-xl, Bcl-2, TRAF1 und 2, XIAP, FLIP), Wachstumsfaktoren (NGF, BDNF, Prolaktin), Transkriptionsfaktoren (c-myc und HIF-1 α) und viele mehr (<http://www.bu.edu/nf-kb/>).

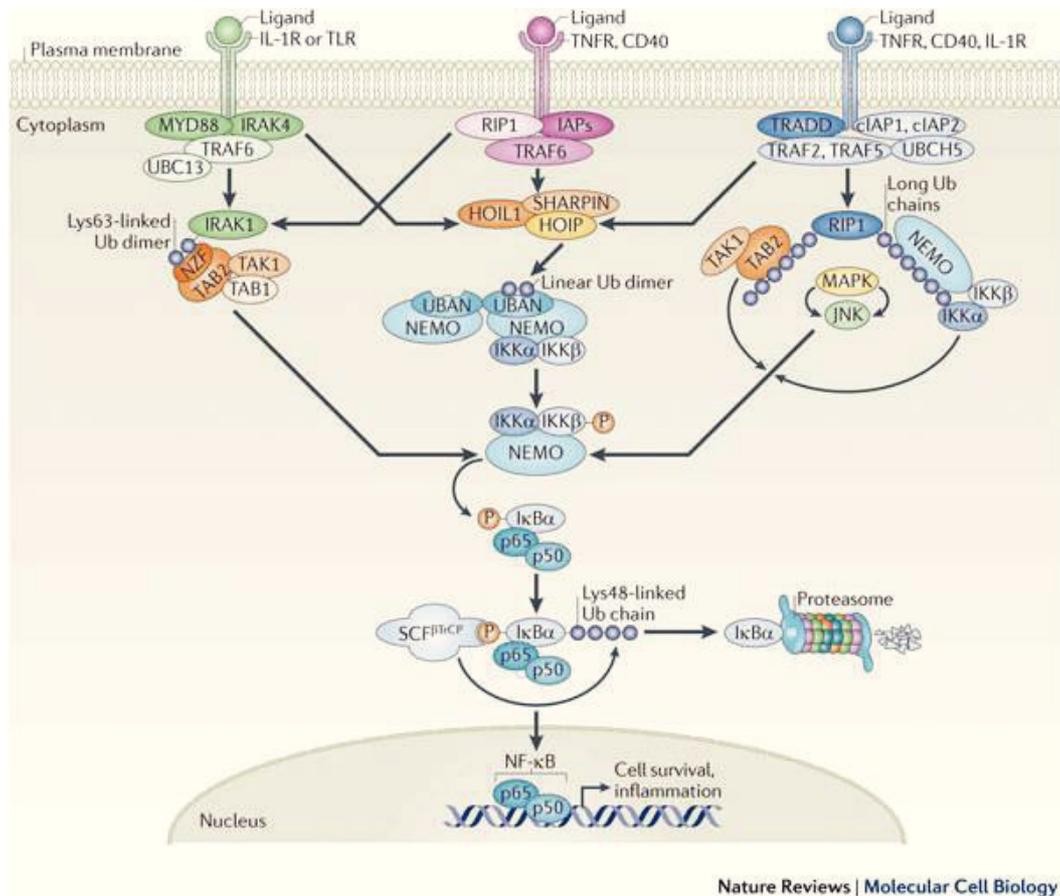


Abb. 1.8: Der NF- κ B-Signalweg

Der NF- κ B-Signalweg wird über die Bindung von Liganden an unterschiedliche Oberflächen-Rezeptoren aktiviert. Dadurch werden an die zytosolischen Domänen dieser Rezeptoren unterschiedliche Adaptor-Proteine rekrutiert. Diese Adaptor-Proteine wiederum rekrutieren und aktivieren den IKK-Komplex, bestehend aus der regulatorischen Untereinheit NEMO und den beiden Kinase-Untereinheiten IKK- α und β , der den NF- κ B-Inhibitor (I κ B) phosphoryliert. Dieser Inhibitor hält unter Basalbedingungen die NF- κ B-Transkriptionsfaktor-Dimere im Zytoplasma zurück. Durch die Phosphorylierung des Proteins wird dieses für die SCF ^{β TrCP}-E3-Ligase markiert und degradierend ubiquitiniert. Nach dem proteasomalen Abbau des I κ B kann der freigewordenen Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren und die Transkription von Zielgenen aktivieren. Die Zielgene von NF- κ B spielen unter anderem eine Rolle für Entzündungsprozesse und das Überleben von Zellen (Grabbe et al., 2011). TNFR, Tumornekrosefaktor-Rezeptor; IL-1R, Interleukin-Rezeptor 1; TLR, *Toll-like*-Rezeptor; NEMO/IKK γ , *NF- κ B Essential Modulator*; IKK, I κ B-Kinase Komplex; I κ B- α , Inhibitor von NF- κ B α .

Wie bereits erwähnt spielt der IKK-Komplex eine essentielle Rolle bei der Regulation des kanonischen NF- κ B-Signalweges. Der gesamte Komplex hat eine molekulare Masse von 700 – 900 kDa und besteht aus zwei katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Die katalytischen Untereinheiten IKK- α und IKK- β haben eine Kinase-Aktivität und phosphorylieren den I κ B (Chen et al., 1996; DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1999). Beide Untereinheiten weisen eine ähnliche Struktur auf und bestehen aus einer N-terminalen Kinase-Domäne, einer *Helix-Loop-Helix*-Domäne, welche die Kinase-Aktivität moduliert, einem *Leucine-Zipper*, der für die Homo- oder Heterodimerisierung zuständig ist und einer C-terminalen NEMO-Bindedomäne (Israël, 2010). Für die Aktivität der Kinase-Einheiten ist wiederum deren eigene Phosphorylierung an jeweils zwei spezifischen Serin-Resten notwendig, deren genauer Mechanismus nicht vollständig aufgeklärt ist (Delhase et al., 1999; Mercurio et al., 1999). In verschiedenen Studien wurden bereits Kinasen beschrieben, welche die Phosphorylierung der IKKs vermitteln (TAK1, MEKK3) (Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Wang et al., 2001; Yang et al., 2001). Möglich wäre weiterhin eine Auto-Phosphorylierung der IKKs, die eventuell von der Anwesenheit von NEMO/IKK- γ abhängt. Es gibt Hinweise, dass die Aktivität von IKK- α und IKK- β unterschiedlich ist. Während IKK- β und NEMO für die schnelle Aktivierung des kanonischen Signalweges über die Degradierung von I κ B verantwortlich zu sein scheinen (Ghosh et al., 1998), wird die Kinase-Aktivität von IKK- α eher dem nicht-kanonischen Signalweg zugeordnet und führt zur Aktivierung von p52 (NFKB2) (Liou et al., 1994; Senftleben et al., 2001). Zusätzlich wurden für IKK- α Aktivitäten außerhalb des NF- κ B-Signalweges beschrieben (Park et al., 2005). Die IKK-Kinase-Untereinheiten phosphorylieren neben I κ B auch andere Substrate, wie NEMO, relA, c-rel und Cyclin-D (Israël, 2010; Kwak et al., 2005; Palkowitsch et al., 2008).

Die regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes, NEMO/IKK- γ , ist, obwohl sie selbst keinerlei katalytische Aktivität besitzt, eine essentielle Komponente für den kanonischen NF- κ B-Signalweg. NEMO-defiziente Zellen sind nicht mehr in der Lage den kanonischen Signalweg zu aktivieren (Mercurio et al., 1999; Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998). Unter Anwesenheit von Interaktionspartnern und nach Polyubiquitinierung bildet NEMO Homodimere, die wiederum die Kinase-Untereinheiten IKK- α und IKK- β binden und deren Aktivität regulieren. Die Aktivität von NEMO selbst wird über nicht-degradierende Ubiquitinierung in Folge unterschiedlichster Stimuli reguliert. NEMO selbst kann Lys63 verlinkte Ubiquitin-Ketten erkennen und selbst auf diese Art ubiquitiniert und aktiviert werden (Tang et al., 2003; Zhou et al., 2004). Beispielsweise erkennt NEMO über seine Ubiquitin-Bindedomäne die Lys63-Ubiquitin-Ketten der RIP1-Kinase (*Receptor-interacting Protein Kinase-1*) nach Aktivierung des TNF-Rezeptors und wird dadurch an den Rezeptor-Komplex rekrutiert, wo IKK- α und IKK- β phosphoryliert und aktiviert werden (Dynek et al., 2010; Ea et al., 2006; Wu et al., 2006). Die Funktion der Lys63-Ubiquitinierung von NEMO im Zusammenhang mit der Aktivierung von IKK- α und β ist nicht vollständig verstanden.

Es ist möglich, dass diese Ubiquitinierung den TAK1-Komplex zur Phosphorylierung und Aktivierung von IKK- α und β an den TNF-Rezeptor rekrutiert (Israël, 2010). Kürzlich wurde eine weitere Form der aktivierenden Ubiquitinierung von NEMO entdeckt, die lineare Ubiquitinierung. Diese Form der Ubiquitinierung wird im Kapitel 1.4.2.1 näher beschrieben.

1.4. Ubiquitinierung

1.4.1. Der Mechanismus der Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung von Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation, bei der ein oder mehrere Ubiquitin-Reste über einen mehrstufigen, enzymatisch katalysierten Prozess an ein Zielprotein geheftet werden. Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 8,5 kDa. Es wird in der Zelle als Poly-Protein aus linear aneinandergängten Ubiquitin-Resten translatiert und posttranslational durch De-Ubiquitinasen in einzelne Reste zerlegt, die dann für die Modifikation von Zielproteinen zur Verfügung stehen (Amerik AYu et al., 1997; Ozkaynak et al., 1984). Bei der Ubiquitinierung von Proteinen werden Ubiquitin-Reste über ihren C-terminalen Glycin-Rest an die ϵ -Aminogruppe des Lysins von Zielmolekülen oder vorangehenden Ubiquitinen geheftet. Der Mechanismus dieser Reaktion ist dreistufig und benötigt drei verschiedene Enzyme. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert Ubiquitin über einen ATP-abhängigen Mechanismus und überträgt es auf einen Cystein-Rest im Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2). Die Übertragung des Ubiquitins auf einen Lysin-Rest im Zielprotein erfolgt über das Ubiquitin-ligierende Enzym (E3) (Abb. 1.9) (Rieser et al., 2013). Im humanen Genom sind zwei E1-Enzyme und 38 E2-Enzyme codiert. Die E1- und E2-Enzyme sind an verschiedensten Ubiquitinierungs-Reaktionen beteiligt, während die E3-Ligasen spezifisch für einzelne oder nur wenige Substrate sind (Tokunaga, 2013). Unterschiedliche Arten der Ubiquitinierung erfüllen unterschiedliche zelluläre Funktionen, wie die Markierung von Proteinen für den proteasomalen Abbau oder die Regulation verschiedener Signalwege.

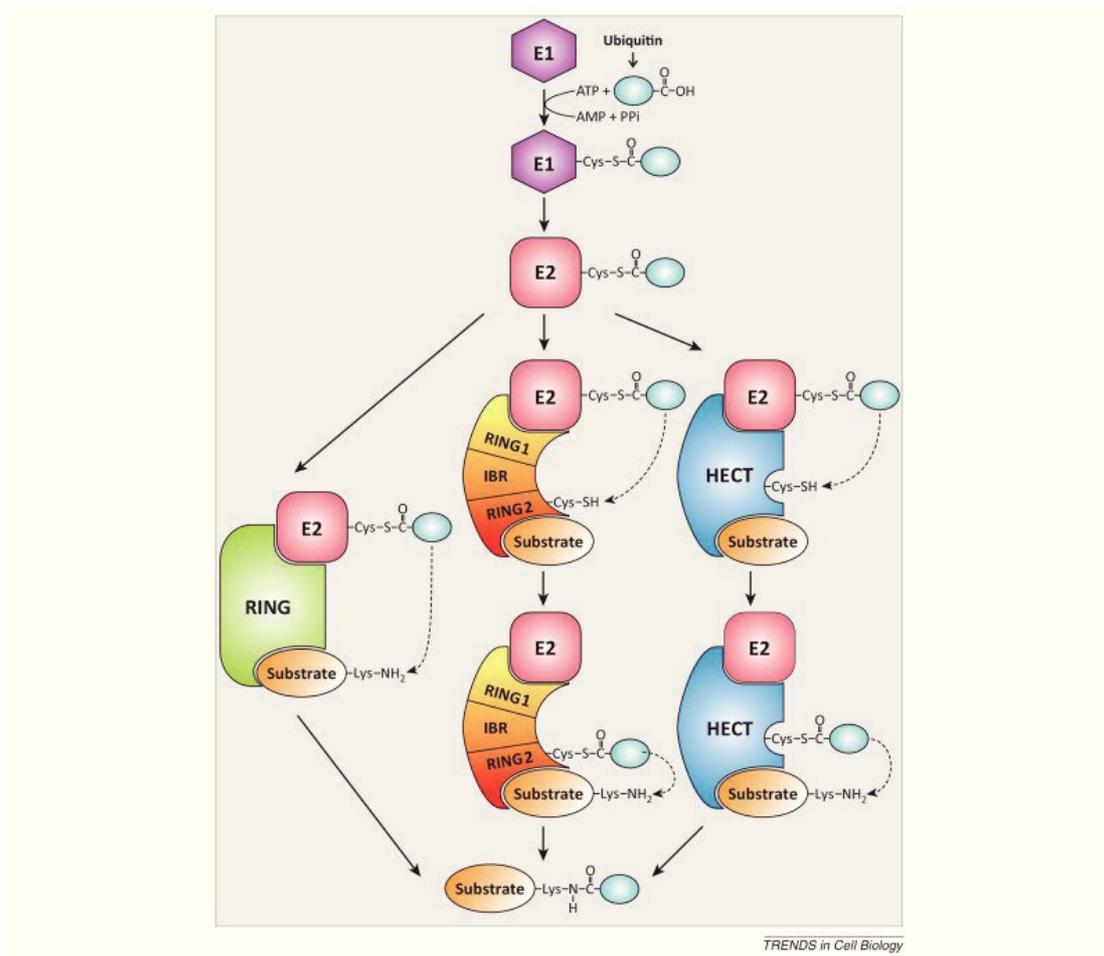


Abb. 1.9: Mechanismus der Ubiquitinierung durch HECT-, RING-Typ und RBR-E3-Ligasen

An der Anheftung von Ubiquitin Resten an Substrate sind drei verschiedene Enzyme beteiligt. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert Ubiquitin über einen ATP-abhängigen Mechanismus und überträgt es auf einen Cystein-Rest im Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2). Die Übertragung des Ubiquitins auf einen Lysin-Rest im Zielprotein erfolgt über das Ubiquitin-ligierende Enzym (E3). Die HECT-Ligasen binden das vom E2 kommende Ubiquitin zunächst an einen aktives Cystein, bevor sie den Ubiquitin-Rest auf das Substrat übertragen. RING-Typ Ligasen assoziieren das E2-Enzym und das Substrat und vermitteln die Übertragung des Ubiquitins vom E2 Enzym direkt auf das Substrat ohne selbst zuvor das Ubiquitin-Molekül zu binden. Die RBR-Ligasen agieren über einen RING/HECT-Hybridmechanismus. Hierbei bindet die RING1-Domäne des Proteins das E2-Enzym. Der Ubiquitin-Rest wird dann über die Bildung eines Thioester-Intermediats vom E2 auf ein Cystein der RING2-Domäne des E3-Enzyms übertragen, bevor es von dort an das Substrat angeheftet wird. (Winklhofer, 2014). Ub, Ubiquitin. RING, *Really Interesting New Gene*; HECT, *Homologous to E6-AP C-terminus*; IBR, *In-between Ring*; RBR, *RING Between RING*; Cys, Cystein; Lys, Lysin; ATP, Adenosintriphosphat; AMP, Adenosinmonophosphat.

1.4.2. Verschiedene Arten der Ubiquitinierung und deren Funktion

Die Ubiquitinierung von Proteinen dient als eine Art Code, bei dem die Art der angeknüpften Ubiquitin-Ketten Informationen über die weitere Funktion des Proteins in der Zelle enthält. Es

können einzelne Ubiquitin-Reste an Proteine angehängt werden (Monoubiquitinierung) oder ganze Ketten von zwei bis zu mehr als zehn Resten (Polyubiquitinierung). Bei der Polyubiquitinierung können einzelne Ubiquitin-Reste über sieben verschiedene Lysin-Reste (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63) oder über das Start-Methionin miteinander verknüpft werden. Die daraus resultierenden Ketten haben, je nach Verknüpfung, eine unterschiedliche Struktur und erfüllen darüber verschiedene zelluläre Funktionen (Abb. 1.10). Während Lys6-, Lys11- und Lys48-Verknüpfungen eine eher geschlossene Konformation mit wenig Konformations-Freiheit einnehmen (Bremm et al., 2010; Eddins et al., 2007; Hospenthal et al., 2013; Tenno et al., 2004; Varadan et al., 2002), haben Lys63- und lineare Ubiquitin-Ketten eine eher auseinandergezogene, flexible Form (Komander et al., 2009; Tenno et al., 2004; Varadan et al., 2004). Diese große strukturelle Diversität der Ketten dient als Erkennungssignal für unterschiedliche UBDs (*Ubiquitin Binding Domains* = Ubiquitin-Bindedomänen) möglicher Bindeproteine, die letzten Endes die spezifischen Ubiquitin-Modifikationen in eine zelluläre Reaktion übersetzen. Die Unterscheidung der einzelnen Ubiquitin-Ketten erfolgt aufgrund ihrer verschiedenen geometrischer Eigenschaften. Die UBDs können je nach ihrer Architektur die Distanz zwischen einzelnen Resten einer Kette, die Flexibilität der Kette oder die Umgebung der Peptidbindung innerhalb der Kette unterscheiden (Dikic et al., 2009). Die genaue zelluläre Funktion einer angehefteten Ubiquitin-Kette hängt neben der Struktur der Kette auch von anderen Faktoren ab, wie dem Zeitpunkt der Reaktion und der De-Ubiquitinierung, der Lokalisation der Komponenten und der spezifischen Interaktion zwischen dem E3-Enzym und dem Substrat (Komander et al., 2009). Eine lange bekannte Funktion von Ubiquitinierungen ist die Markierung von Proteinen für den proteasomalen Abbau. Diese Funktion wurde zunächst Ubiquitin-Ketten, die über Lys48 verknüpft sind, zugesprochen (Chau et al., 1989). Später konnte gezeigt werden, dass auch andere Ubiquitin-Ketten Zielproteine für deren Degradation markieren. So spielen Lys11-Ubiquitin-Ketten eine Rolle bei der Degradierung von Zellzyklus-Proteinen (Jin et al., 2008; Matsumoto et al., 2010) und auch Lys63-Ketten wurden als Marker für den proteasomalen Abbau beschrieben (Saeki et al., 2009). Neben dem proteasomalen Abbau dient die Ubiquitinierung von Proteinen auch zu deren lysosomaler Degradation. Diese Funktion wurde für Monoubiquitinierungen und Lys63-Ketten beschrieben (Mukhopadhyay and Riezman, 2007). Neben den proteolytischen Aufgaben von Ubiquitinierungen spielt diese Art der Modifikation eine wichtige Rolle bei der Regulation von Protein-Aktivität, -Lokalisation und -Interaktion. Monoubiquitinierungen und Lys63-Ubiquitinierungen regulieren z.B. die Interaktion von Proteinen beteiligt an der Antwort auf DNA-Schädigungen (Al-Hakim et al., 2010; Hoege et al., 2002), Transkription (Dupont et al., 2009), *mRNA-Splicing* (Bellare et al., 2008) und Translation (Spence et al., 2000). Ein Beispiel für die Kontrolle der Lokalisation von Proteinen durch Ubiquitinierung ist der Transkriptionsfaktor p53, der nach Monoubiquitinierung aus dem Zellkern exportiert wird (Li et al., 2003). Der kanonische NF-κB-Signalweg bietet Beispiele für die

Regulation der Aktivität von Proteinen durch verschiedene Arten der Ubiquitinierung. Der IKK-Komplex, der regulatorische Komplex des Signalweges, wird über ein Zusammenspiel von linearer Ubiquitinierung, sowie Lys11- und Lys63-Ubiquitinierung aktiviert (Dynek et al., 2010; Laplantine et al., 2009; Rahighi et al., 2009; Wang et al., 2001). Die genaue Rolle der Ubiquitinierung für die Aktivität des IKK-Komplexes und die Regulation des NF- κ B-Signalweges wird in Abschnitt 1.4.2.2 genauer erläutert.

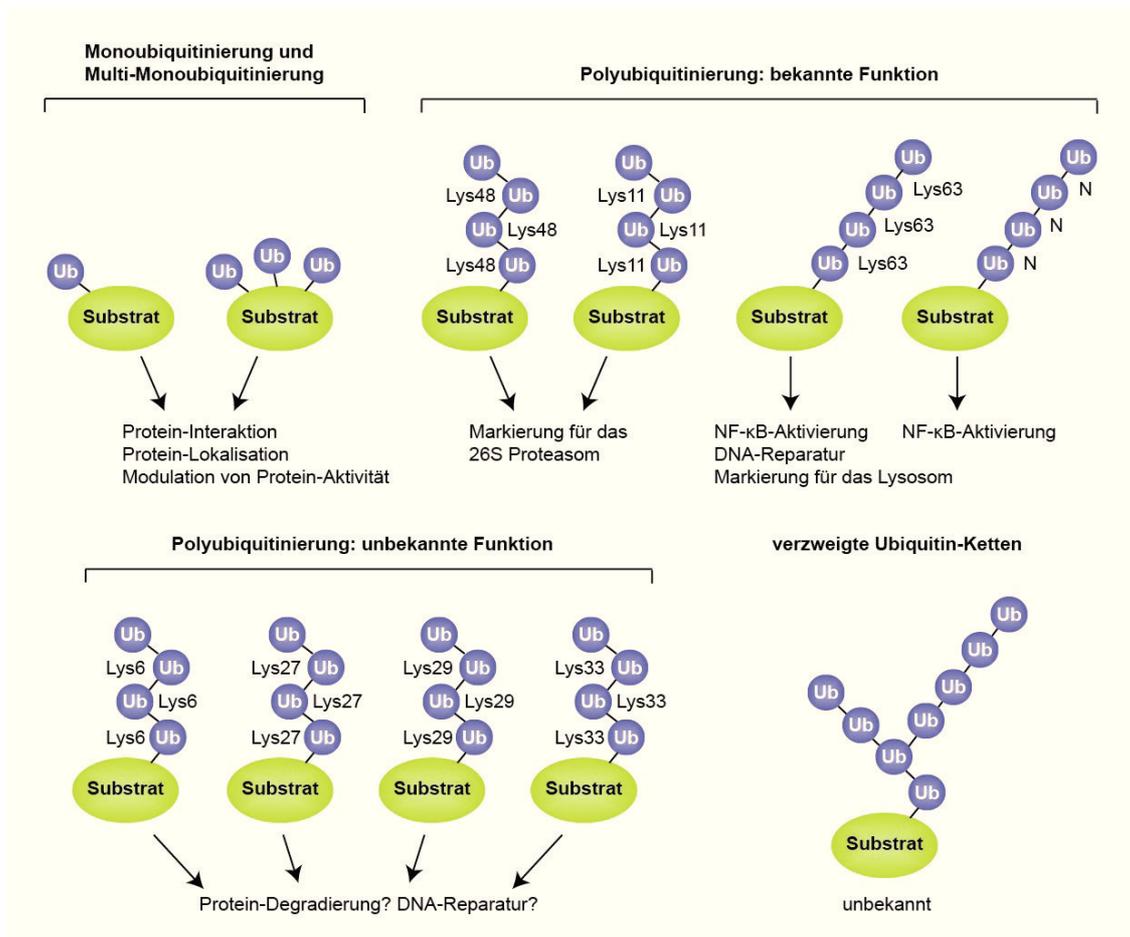


Abb. 1.10: Arten der Ubiquitinierung und deren Funktion

Verschiedene Ubiquitin-Ketten markieren Substrate für unterschiedlichste Schicksale in der Zelle. Monoubiquitinierungen und Multi-Monoubiquitinierungen beeinflussen Interaktion, Lokalisation und Aktivität der Proteine. Polyubiquitinierungen können je nach Verknüpfung der Kette für den proteasomalen oder lysosomalen Abbau markieren, oder Proteine für die den NF- κ B-Signalweg oder die DNA-Reparatur aktivieren (modifiziert aus Ye and Rape, 2009). Ub, Ubiquitin.

1.4.2.1. Lineare Ubiquitinierung

Die Verknüpfung einzelner Ubiquitin-Reste zwischen dem N-terminalen Methionin und dem C-terminalen Glycin des vorhergehenden Ubiquitins wird als lineare Ubiquitinierung bezeichnet

und erfüllt eine regulatorische Funktion. Diese Art der Ubiquitinierung wird von einem ca. 600 kDa großen Enzymkomplex, dem sogenannten LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*), vermittelt und spielt eine essentielle Rolle in der Regulation des NF- κ B-Signalweges (Tokunaga et al., 2009a). Die an der Bildung des LUBAC beteiligten Proteine sind die E3-Ligasen HOIP (*HOIL-1L Interactin Protein*; 120 kDa) und HOIL-1L (*RBCK1, RanBP-type and C3HC4-type Zinc Finger-containing Protein-1*; 58 kDa) und das Adaptor-Protein Sharpin (*SHANK-associated RH Domain Interacting Protein in Postsynaptic Density*; 43 kDa) (Abb. 1.11) (Ikeda et al., 2011; Kirisako et al., 2006; Tokunaga et al., 2011), wobei nur HOIP die Bildung linearer Ubiquitin-Ketten katalysiert, während die beiden anderen Proteine für die Aktivierung von HOIP verantwortlich sind. HOIP liegt unter basalen Bedingungen, in Abwesenheit eines Bindepartners, in einem auto-inhibierten Zustand vor und zeigt nur wenig E3-Ligase-Aktivität. Im ungebundenen Zustand blockiert der N-Terminus des Proteins das aktive Zentrum, den katalytischen Cystein-Rest der RING2-Domäne, und die LDD-Domäne (*Linear Ubiquitin Chain Determining Domain*) und inhibiert damit die Aktivität. HOIL-1L und Sharpin können über ihre UBL-Domäne (*Ubiquitin-like Domain*) an die N-terminale UBA-Domäne (*Ubiquitin-associated Domain*) von HOIP binden. Durch diese Bindung verändert sich die Struktur von HOIP, die Blockierung der RING2- und der LDD-Domäne wird aufgehoben und HOIP kann katalytisch aktiv werden (Abb. 1.12) (Dove and Klevit, 2012; Smit et al., 2012; Stieglitz et al., 2012).

E3-Ligasen werden nach dem Mechanismus, über den sie die Ubiquitinierung von Substraten vermitteln in drei Unterfamilien eingeteilt, HECT-Ligasen, RING-Ligasen und RBR-Ligasen. Die HECT-Ligasen binden das vom E2 kommende Ubiquitin zunächst an ein aktives Cystein und bilden ein E3-Ubiquitin/Thioester-Intermediat, bevor sie den Ubiquitin-Rest auf das Substrat übertragen. RING-Typ-Ligasen assoziieren das E2-Enzym und das Substrat und vermitteln die Übertragung des Ubiquitins vom E2-Enzym direkt auf das Substrat ohne zuvor selbst das Ubiquitin-Molekül zu binden (Abb. 1.9) (Komander and Rape, 2012). Die RBR-Ligasen nutzen einen RING/HECT-Hybridmechanismus. Sie binden mit ihrer RING1-Domäne das Ubiquitin-tragende E2-Enzym und übertragen dann das Ubiquitin auf einen katalytischen Cystein-Rest in der RING2-Domäne, wobei ein Thioester-Intermediat gebildet wird (Wenzel and Klevit, 2012). HOIP und Parkin sind Beispiele für solche RBR-Ubiquitin-Ligasen (Smit et al., 2012; Stieglitz et al., 2012; Wenzel et al., 2011). Nach der Aufhebung der Auto-Inhibierung von HOIP bindet ein Ubiquitin-tragendes E2-Enzym die RING1-IBR-Domäne von HOIP und überträgt das Ubiquitin auf einen katalytischen Cystein-Rest in der RING2-Domäne. Die HOIP-LDD-Domäne bindet das Akzeptor-Ubiquitin eines Substrates und das Cystein-gebundene Ubiquitin der RING2-Domäne wird an den N-Terminus dieses Akzeptor-Restes übertragen (Smit et al., 2012; Stieglitz et al., 2012, 2013; Tokunaga, 2013).

Der Mechanismus, über den lineare Ubiquitin-Ketten in der Zelle abgebaut werden, war bis kürzlich ungeklärt. Keusekotten *et al* identifizierten die De-Ubiquitinase Otulin als erstes Abbauezym spezifisch für lineare Ubiquitin-Ketten. Die Spezifität für diese Ketten ergibt sich aus der Struktur der Ubiquitin-Bindestelle des Enzyms und aus einem Substrat-assistierten Reaktionsmechanismus, bei dem ein Ubiquitin-Rest einer linearen Kette direkt an der Organisation des katalytischen Zentrums von Otulin beteiligt ist und die Aktivität des Enzyms reguliert. Otulin ist somit ein direkter Antagonist der LUBAC-Aktivität und reguliert so die zelluläre Antwort auf TNF- α -Stimulation. Die Deubiquitinase interagiert direkt mit dem LUBAC, vermutlich über die Bindung an die linearen Ubiquitinketten von auto-ubiquitiniertem HOIP. Die genaue Funktion dieser Interaktion ist allerdings unklar (Keusekotten *et al.*, 2013).

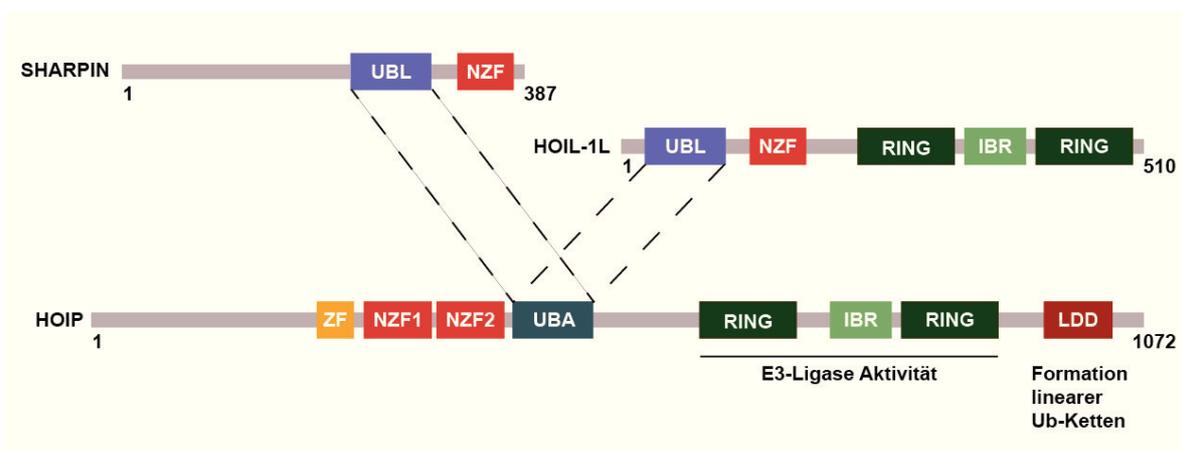


Abb. 1.11: Modularer Aufbau der LUBAC-Komponenten

Der LUBAC ist aus mindestens zwei von drei Proteinen zusammengesetzt. Die essentielle Komponente des Komplexes ist HOIP, da HOIP allein die Bildung der linearen Ubiquitin-Ketten katalysiert. Für die lineare Ubiquitinierung von Substraten besitzt HOIP eine RBR-Domäne mit E3-Ligase-Aktivität und eine LDD-Domäne für die Bindung und Ausrichtung von Akzeptor-Ubiquitin-Resten. Über seine UBA-Domäne interagiert HOIP mit der UBL-Domäne von HOIL-1L oder Sharpin. Diese Interaktion dient der Aktivierung von HOIP (modifiziert aus Gautheron and Courtois, 2010; Tokunaga *et al.*, 2011). RBR, *RING Between RING*; RING, *Really Interesting New Gene*; IBR, *In-between RING*; LDD, *Linear Ubiquitin Chain Determining Domain*; UBA, *Ubiquitin-associated Domain*; UBL, *Ubiquitin-like Domain*; NZF, *Nuclear Protein Localization 4 Type Zinc Finger*; ZF, *Zinc Finger*.

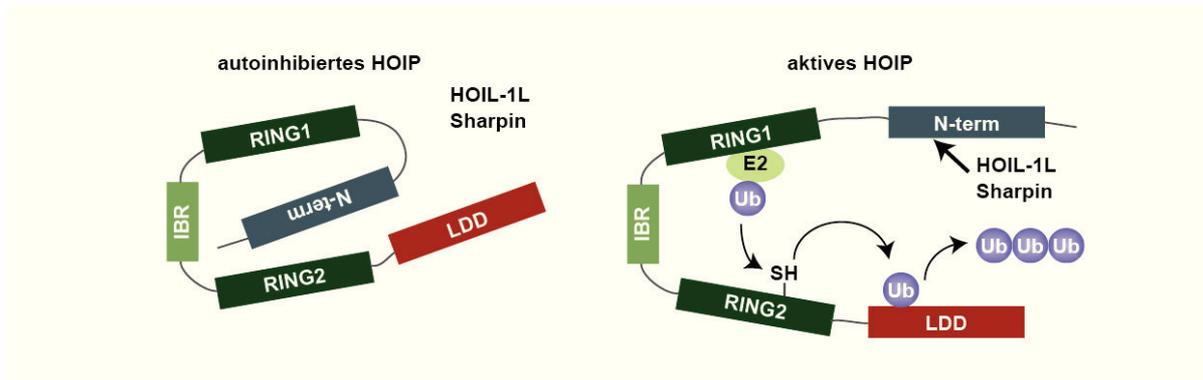


Abb. 1.12: Auto-Inhibition von HOIP

Unter Basalbedingungen liegt HOIP in einem auto-inhibierten Zustand vor. Der N-Terminus des Proteins inhibiert die E3-Ligase-Aktivität. Der genaue Mechanismus dieser Inhibition ist bisher nicht bekannt. Durch Bindung von HOIL-1L oder Sharpin an die N-terminale UBA-Domäne von HOIP wird die Auto-Inhibition aufgehoben. Ein Ubiquitin-tragendes E2-Enzym bindet an die RING1-IBR-Domäne von HOIP und überträgt das Ubiquitin auf einen Cystein-Rest in der RING2-Domäne. Die HOIP-LDD-Domäne bindet das Akzeptor-Ubiquitin eines Substrates und überträgt das Cystein gebundene Ubiquitin auf den N-Terminus dieses Akzeptor-Restes (modifiziert aus Dove and Klevit, 2012). RING, Really Interesting New Gene; IBR, In-between-RING; LDD, Linear Ubiquitin Chain Determining Domain, Ub, Ubiquitin.

1.4.2.2. Ubiquitinierung im kanonischen NF- κ B-Signalweg.

Wie bereits erwähnt, wird der kanonische NF- κ B-Signalweg über unterschiedliche Arten der Ubiquitinierung aktiviert (Wertz and Dixit, 2010). Die am Ende einer komplexen Signalkaskade stehende Aktivierung der NF- κ B- und Rel-Transkriptionsfaktoren geschieht durch die proteasomale Degradation des Inhibitors I κ B infolge seiner Lys48-Ubiquitinierung durch SCF ^{β TrCP} (Tanaka et al., 2001). Dieser degradierenden Ubiquitinierung voran geht die Phosphorylierung des I κ B durch den IKK-Komplex. Die Aktivierung dieses Komplexes, bzw. dessen regulatorischer Untereinheit NEMO, kann über zwei unterschiedliche Rezeptor-Signalwege in Gang gesetzt werden, den TNF-Rezeptor-1 oder IL1- und Toll-like-Rezeptoren, und wird über verschiedene Arten der aktivierenden Ubiquitinierung reguliert. An den durch Bindung von TNF- α aktivierten TNF-Rezeptor-1 werden verschiedenen Adaptor-Proteine rekrutiert, unter anderem auch RIP1, TRAF2, TRAF5 (*TNFR-associated Factor-2 und 5*) und die E3-Ubiquitin Ligase cIAP (*Cellular Inhibitor of Apoptosis*) (Kapitel 1.3.2.3). cIAP katalysiert die Lys63- und die Lys11-Ubiquitinierung von RIP1, welche für die Rekrutierung von NEMO an den Rezeptor-Komplex verantwortlich ist (Dynek et al., 2010; Ea et al., 2006; Wu et al., 2006). Die Polyubiquitinierung von cIAP selbst rekrutiert die Komponenten des LUBAC, HOIL-1L und HOIP, an den Rezeptor-Komplex (Haas et al., 2009; Silke and Brink, 2010). LUBAC katalysiert die lineare Ubiquitinierung von NEMO (Tokunaga et al., 2009a). Die NEMO-UBAN-Domäne erkennt und

bindet selbst lineare Ubiquitin-Ketten. Diese Bindung löst eine Konformationsänderung von NEMO aus und führt zur NEMO-Dimerisierung und zur, vermutlich allosterischen, Aktivierung des IKK-Komplexes (Rahighi et al., 2009). Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges kann auch über Ligandenbindung an IL1- und *Toll-like*-Rezeptoren erfolgen. Hier werden andere Adaptor-Proteine, wie z.B. IRAK1 und 4 (*Interleukin-1 Receptor-associated Kinase 1*) sowie die E3-Ligase TRAF6 an den Rezeptor rekrutiert (Akira and Takeda, 2004; Janssens and Beyaert, 2003). TRAF6 katalysiert seine Autoubiquitinierung (Lamothe et al., 2007) und die Polyubiquitinierung von IRAK1 (Conze et al., 2008). Infolgedessen kann IRAK1/TRAF6 NEMO mit Lys63-Ketten ubiquitinieren. Ubiquitiniertes TRAF6 rekrutiert und aktiviert den TAK-Komplex, welcher die Phosphorylierung von IKK- α und IKK- β katalysiert (Kanayama et al., 2004; Yamazaki et al., 2009). Diese Phosphorylierung zusammen mit der Lys63-Ubiquitinierung von NEMO führt zur Aktivierung des IKK-Komplexes über IL1- und *Toll-like*-Rezeptoren (Abb. 1.13).

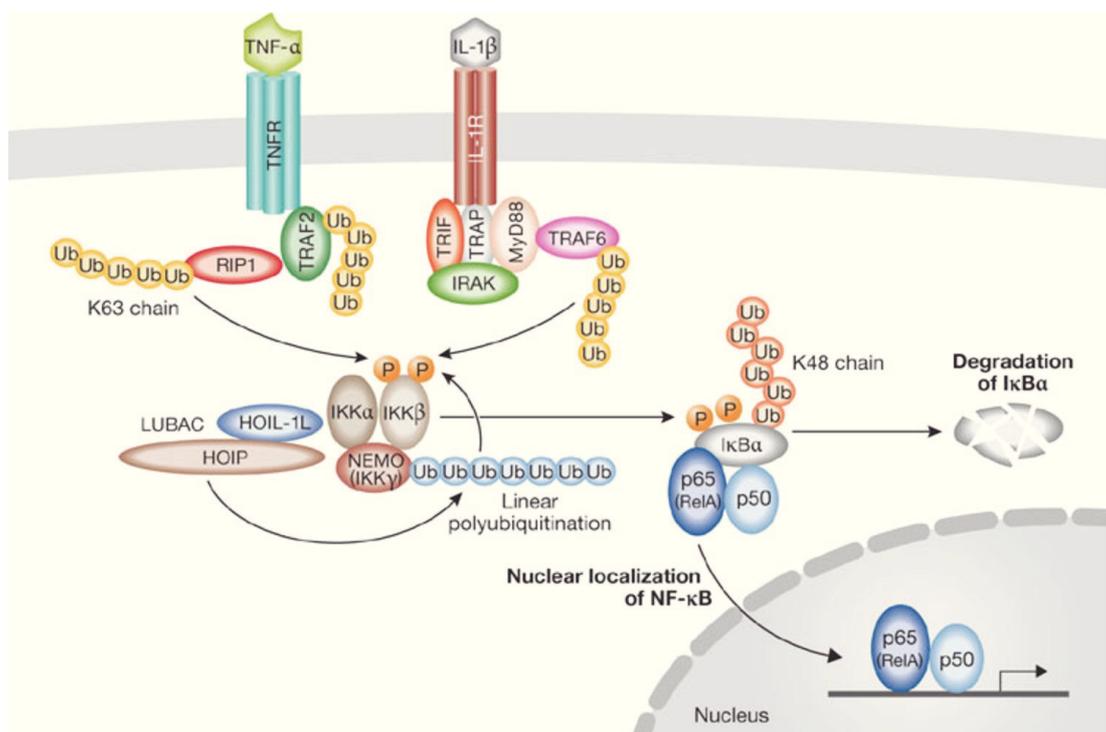


Abb. 1.13: Ubiquitinierungen im kanonischen NF- κ B-Signalweg

Die Lys48-Ubiquitinierung (rot) von I κ B führt zu dessen proteasomaler Degradation, wodurch der NF- κ B-Transkriptionsfaktor freigesetzt wird und im Zellkern aktiv werden kann. Voraussetzung für diese Ubiquitinierung ist die Phosphorylierung von I κ B durch den IKK-Komplex. Dieser Komplex wird durch Anheftung linearer Ubiquitin-Ketten (blau) durch den LUBAC aktiviert. Diese Ubiquitinierung wiederum hängt von der Aktivität Lys63-ubiquitinerter (gelb) Adaptor-Proteine der TNF- und IL-Rezeptoren ab (Iwai and Tokunaga, 2009). LUBAC, *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*; HOIL-1L, *RanBP-type and C3HC4-type zinc finger-containing protein 1*; HOIP, *HOIL-1L Interacting Protein*; I κ B α , *Inhibitor of κ B*; IKK, *Inhibitor of κ B Kinase*; NEMO, *NF- κ B Essential Modulator*; NF- κ B, *Nuclear Factor κ B*; Ub, Ubiquitin

1.5. Ziel der Arbeit

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Parkin koregulierten Proteins PACRG. Das *PACRG*-Gen teilt sich einen bidirektionalen Promotor mit *Parkin*. Die zelluläre Funktion des Proteins ist allerdings, bis auf einige Hinweise auf eine Funktion bei der Mikrotubuli-Organisation, weitestgehend ungeklärt. Da, wie bereits erwähnt, Gene mit einem bidirektionalen Promotor oft ähnlich reguliert werden und deren Proteine in den gleichen Signalwegen agieren, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob PACRG ähnliche Funktionen in der Zelle ausübt wie sein koreguliertes Protein Parkin. Für Parkin ist eine breite zytoprotektive Aktivität und eine Funktion bei der Regulation der mitochondrialen Dynamik und der Mitophagie beschrieben. Parkin schützt Zellen unter verschiedenen Stressbedingungen vor dem Eintritt in die Apoptose. Sein protektives Potential vermittelt Parkin über die Aktivierung des NF- κ B-Überlebens-Signalweges. Dieser Signalweg wird stark über verschiedene Formen der Ubiquitinierung reguliert. Eine besondere Rolle nimmt hierbei die lineare Ubiquitinierung von NEMO ein, der essentiellen regulatorischen Untereinheit des NF- κ B-Signalweges. NEMO wird durch die Anheftung linearer Ubiquitin-Ketten aktiviert, was wiederum die Aktivierung des gesamten Signalweges und die Transkription von Überlebens-Faktoren für die Zelle zur Folge hat. Die lineare Ubiquitinierung von Proteinen wird über den LUBAC katalysiert. Müller-Rischart *et al* konnten zeigen, dass Parkin mit dem LUBAC interagiert und dessen Aktivität steigert. Hierdurch verstärkt Parkin die lineare Ubiquitinierung von NEMO und damit die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges. In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob PACRG ähnliche Funktionen in der Zelle ausübt wie sein koreguliertes Protein Parkin. Es wurde analysiert, ob es ebenso wie Parkin Zellen vor Stressbedingungen schützen kann und ob es einen Einfluss auf die mitochondriale Dynamik und die Mitophagie hat. Diese Analyse kann nicht nur weitere Funktionen von PACRG aufklären, sondern auch zur funktionellen Charakterisierung des Parkinsonismus-assoziierten Proteins Parkin beitragen. Möglicherweise bieten sich zudem auch neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, die dem Absterben dopaminerger Neuronen als Ursache der Parkinson-Erkrankung zugrunde liegen.

2. ERGEBNISSE

Als Ausgangspunkt für die funktionelle Charakterisierung von PACRG diente in dieser Arbeit die Annahme, dass Gene mit einem bidirektionalen Promotor oft ähnlich reguliert werden und deren Proteine in den gleichen Signalwegen agieren (Bellizzi et al., 2007; Momota et al., 1998; Schmidt et al., 1993). Aus diesem Grund wurde hier untersucht, ob PACRG ähnliche Funktionen in der Zelle ausübt wie sein koreguliertes Protein Parkin. Parkin besitzt ein breites zytoprotektive Potential, beeinflusst mitochondrialen Dynamik und induziert Mitophagie. Es wurde daher zunächst untersucht, ob PACRG ähnliche Funktionen in der Zelle ausübt. Vor dieser funktionellen Charakterisierung wurden allerdings zunächst einige Eigenschaften von PACRG, wie die subzelluläre Lokalisation, die Löslichkeit und der Abbau des Proteins in der Zelle, näher untersucht.

2.1. Charakterisierung von überexprimiertem PACRG

Der erste Schritt zur funktionellen Charakterisierung von PACRG war die Untersuchung einzelner biochemischer und zellbiologischer Eigenschaften von überexprimiertem PACRG, da zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit endogenes Protein in Ermangelung eines geeigneten Antikörpers nicht detektiert werden konnte.

2.1.1. PACRG ist ein zytosolisches Protein

Für die funktionelle Charakterisierung von Proteinen ist es zunächst hilfreich zu untersuchen, in welchem zellulären Kompartiment das Protein lokalisiert ist. Es wurde zunächst also die intrazelluläre Lokalisation von überexprimiertem PACRG analysiert. HA-getagtes PACRG wurde in SH-SY5Y-Zellen transfiziert und mit Hilfe eines anti-HA Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Zusätzlich zu PACRG wurde p62 angefärbt. p62/SQSTM1 ist ein zytosolisches Ubiquitin-bindendes Protein (Vadlamudi et al., 1996). Es fungiert als Adaptor-Protein um Aggregate ubiquitiniertes Proteine für die Degradierung durch Autophagie (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007) oder für den proteasomalen Abbau zu markieren (Babu et al., 2005; Seibenhener et al., 2004). Die mikroskopische Analyse der durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbten Zellen zeigt in den meisten Zellen eine gleichmäßige zytosolische Verteilung von PACRG und p62. In etwa einem Viertel der transfizierten Zellen (Quantifizierung nicht gezeigt) sind zytosolische Aggregationen von PACRG erkennbar, die mit p62/SQSTM1 kolokalisieren (Abb. 2.1). Die detektierten Aggregate, lassen vermuten, dass PACRG, wenn es in großen Mengen in der Zelle exprimiert wird, zur Aggregation neigt.



Abb. 2.1: Überexprimiertes PACRG ist zytosolisch lokalisiert und kolokalisiert teilweise mit p62.

HA-PACRG-überexprimierende SH-SY5Y-Zellen wurden mit einem anti-HA Antikörper (rot) und einem anti-p62 Antikörper (grün) durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. Beide Färbungen sind in den meisten Zellen gleichmäßig zytosolisch und in wenigen Zellen punktuell aggregiert im Zytosol. Bei der Kombination der Einzelfärbungen miteinander zeigt sich eine Kolokalisation von p62 und PACRG in den Zellen mit punktueller Färbung.

2.1.2. Überexprimiertes PACRG findet sich vorwiegend in der Detergenz-unlöslichen Fraktion

Nachdem in der Immunfluoreszenz-Färbung PACRG-Aggregationen gefunden wurden, wurde die Löslichkeit von überexprimiertem PACRG biochemisch analysiert. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen mit HA-getagtem PACRG und/oder Parkin transfiziert und mit 1 % Triton X 100 / 0,5 % DOC in PBS lysiert. Nach Zentrifugation der Proben für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm wurden Überstand (Detergenz-lösliche Fraktion) und Pellet (Detergenz-unlösliche Fraktion) voneinander getrennt und jeweils mit Lämmli-Probenpuffer + β -Mercaptoethanol versetzt. Die Verteilung der exprimierten Proteine zwischen der Detergenz-löslichen und der Detergenz-unlöslichen Fraktion des Lysates wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Überexprimiertes PACRG findet sich hauptsächlich in der Detergenz-unlöslichen Fraktion. Bei höheren Proteinmengen in der Zelle nach Koexpression mit Parkin oder nach Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus durch MG132-Behandlung, ist PACRG auch zu einem geringen Teil in der löslichen Fraktion nachweisbar. Als Kontrolle für dieses Experiment wurde Parkin überexprimiert, welches sich im Löslichkeits-Assay in der Detergenz-löslichen Fraktion nachweisen lässt. Bei stärkerer Expression dieses Proteins erscheint es allerdings auch zu einem geringeren Teil in der Detergenz-unlöslichen Fraktion (Abb. 2.2).

Später in dieser Arbeit wird näher auf den Zusammenhang zwischen PACRG und HOIP eingegangen, der katalytisch aktiven Komponente des LUBAC, welche die lineare Ubiquitinierung von Proteinen katalysiert. Endogenes HOIP findet sich üblicherweise ebenso wie Parkin in der

löslichen Fraktion. In diesem Versuch wurde untersucht, ob PACRG oder Parkin Einfluss auf die Löslichkeit von endogenem HOIP haben. Unabhängig von der Expression von PACRG oder Parkin bleibt HOIP in der Detergenz-löslichen Fraktion nachweisbar und ändert seine Verteilung zwischen den beiden Fraktionen nicht. Es kann also geschlussfolgert werden, dass die Überexpression von PACRG oder Parkin keinen Einfluss auf die Löslichkeit von HOIP hat (Abb. 2.2).

Die Expression von Parkin und PACRG ist deutlich stärker, wenn beide Proteine gemeinsam überexprimiert wurden, im Vergleich zur einzelnen Überexpression. Möglicherweise beeinflussen sich die beiden Proteine gegenseitig in ihrer Stabilität. Nach Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus durch MG132-Behandlung sind in den Zellen höhere PACRG- und Parkin-Proteinmengen nachweisbar. Dies legt den Schluss nahe, dass beide Proteine proteasomal degradiert werden. Die Verteilung von PACRG und Parkin zwischen Detergenz-löslicher und -unlöslicher Fraktion änderte sich jedoch weder durch deren Koexpression noch durch die Hemmung des Proteasoms (Abb. 2.2).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Detektion von überexprimiertem PACRG in der Detergenz-unlöslichen Fraktion die Vermutung bestätigt, die sich bereits aus der Immunfluoreszenz-Färbung ergeben hat, dass überexprimiertes PACRG zur Aggregation neigt.

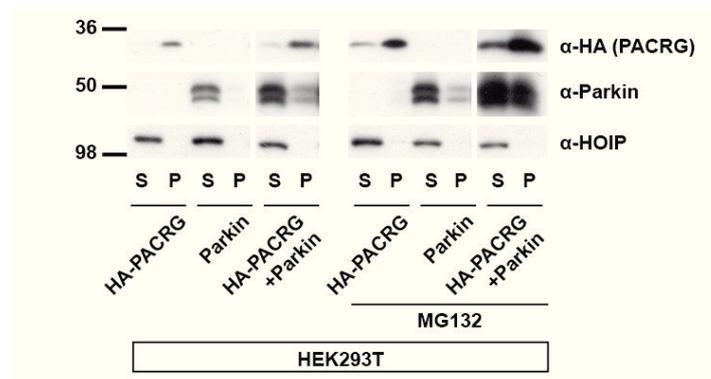


Abb. 2.2: Überexprimiertes PACRG findet sich vorwiegend in der Detergenz-unlöslichen Fraktion.

PACRG- und/oder Parkin-überexprimierende HEK293T-Zellen wurden in 1 % Triton X 100 / 0,5 % DOC in PBS lysiert und zentrifugiert. Der Überstand (S, engl. *Supernatant*, lösliche Fraktion) und die Pellet-Fraktion (P, unlösliche Fraktion) wurden anschließend mittels Immunoblot analysiert. PACRG findet sich hauptsächlich in der Detergenz-unlöslichen Fraktion, während Parkin und HOIP in der Detergenz-löslichen Fraktion nachweisbar sind.

2.2. PACRG wird proteasomal degradiert.

Unterschiedliche Proteine haben abhängig von ihrer Funktion eine unterschiedliche Lebensdauer in der Zelle. Die intrazellulären Proteinmengen werden über die Neusynthese der Proteine und deren Abbau reguliert, der entweder über das Proteasom oder über das Lysosom erfolgen kann. Defekte im Abbau von Proteinen und die Akkumulation fehlerhafter Proteine in der Zelle spielen für verschiedene Erkrankungen, wie auch für die Parkinson-Erkrankung eine Rolle (McNaught et al., 2003). Die Untersuchung des Abbaus von Proteinen ist also ein wichtiger Teilaspekt zur funktionellen Charakterisierung. Im Löslichkeits-Assay wurde nach Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 ein Anstieg der PACRG-Proteinmengen beobachtet (Abb. 2.2). Nach Hemmung des Proteasoms akkumuliert PACRG also in der Zelle, was darauf schließen lässt, dass das Protein proteasomal degradiert wird. Für fehlgefaltete Parkin Mutanten wurde bereits ebenfalls eine proteasomale Degradation beschrieben (Schlehe et al., 2008b). Zur funktionellen Charakterisierung von PACRG wurde überprüft, ob die PACRG-Proteinmengen in der Zelle ausschließlich über den proteasomalen, oder auch über den lysosomalen Proteinabbau reguliert werden können. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit PACRG transfiziert und die Zellen anschließend für 16 h mit dem proteasomalen Inhibitor Epoxomycin (0,1 μ M) (Meng et al., 1999) oder dem lysosomalen Inhibitor Bafilomycin (25 nM) (Yoshimori et al., 1991) behandelt. Nach der Lyse der Zellen wurden die PACRG-Proteinmengen im Immunoblot analysiert. Unter Epoxomycin können im Vergleich zu unbehandelten Zellen höhere PACRG-Proteinmengen detektiert werden. Die PACRG-Proteinmengen unter Bafilomycin unterschieden sich nicht von denen unbehandelter Zellen (Abb. 2.3). PACRG akkumuliert also nach Hemmung des Proteasoms, nicht aber nach Hemmung des Lysosoms in der Zelle. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die intrazellulären PACRG-Proteinmengen über proteasomalen Abbau reguliert werden und dass der lysosomale Proteinabbau hierbei keine Rolle spielt.

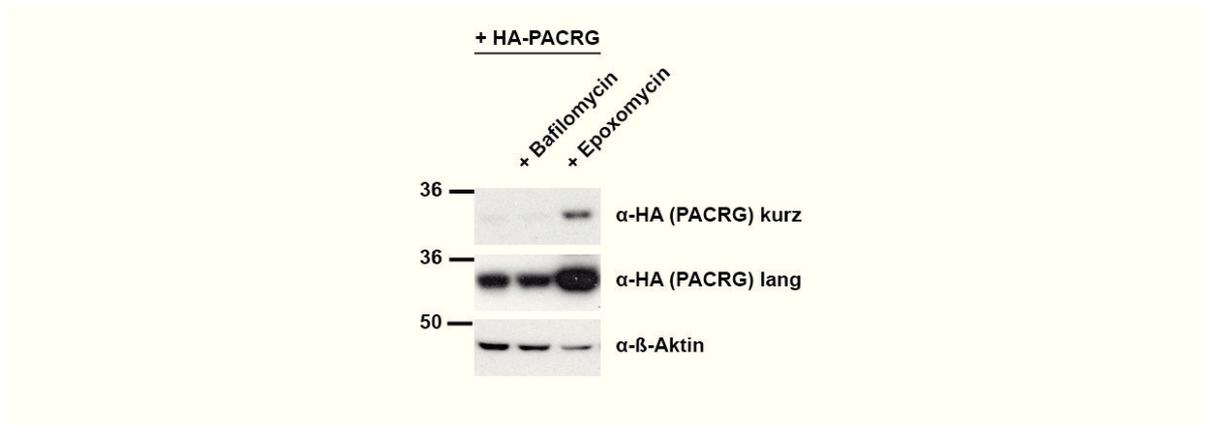


Abb. 2.3: PACRG wird proteasomal degradiert.

PACRG-überexprimierende HEK293T-Zellen wurden 16 h mit dem proteasomalen Inhibitor Epoxomycin (0,1 μ M) oder dem lysosomalen Inhibitor Bafilomycin (25 nM) behandelt. Unter Epoxomycin-Behandlung akkumuliert PACRG in den Zellen, während die Bafilomycin-Behandlung keinen Einfluss auf die PACRG-Proteinmengen hat.

2.3. Die PACRG-mRNA-Expression wird unter verschiedenen zellulären Stressbedingungen hoch reguliert

Nach der Analyse der intrazellulären Lokalisation von PACRG und der Regulation der Proteinmengen in der Zelle durch Proteinabbau stellt sich nun die Frage nach der Regulation der Synthese von PACRG. Es ist bekannt, dass die Expression von Parkin unter verschiedenen zellulären Stressbedingungen auf transkriptioneller Ebene und auf Proteinebene hoch reguliert werden kann (Bouman et al., 2011; Henn et al., 2007; Tan et al., 2005; Wang et al., 2007). Da die Transkription von Parkin und PACRG von einem gemeinsamen bidirektionalen Promotor kontrolliert wird, wurde in diesem Experiment analysiert, ob die Expression von PACRG ebenfalls Stress-abhängig reguliert wird. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen und primäre kortikale Neuronen mit mitochondrialen Stressoren (MPP⁺, Oligomycin) und einem Toxin, welches auf das endoplasmatische Retikulum wirkt (Thapsigargin = TG), behandelt. MPP⁺ (1-Methyl-4-Phenylpyridinium) ist ein Inhibitor des Komplex-I der mitochondrialen Atmungskette (Nicklas et al., 1987) und Oligomycin blockiert den Protonen-Kanal der ATP-Synthase (Jastroch et al., 2010). Für die Behandlung primärer kortikaler Neuronen wurde des mitochondriale Toxin Oligomycin verwendet, da diese Zellen keinen Dopamin-Transporter auf ihrer Zelloberfläche exprimieren über den MPP⁺ in die Zellen aufgenommen werden könnte. Thapsigargin inhibiert die sarco/endoplasmatische Ca²⁺-ATPase und führt so zu erhöhten Ca²⁺-Konzentrationen im Zytosol (Lytton et al., 1991). Nach der Behandlung wurde die mRNA der Zellen extrahiert und die relativen mRNA-Mengen von PACRG und Parkin mittels quantitativer *real-time*-Polymerase Kettenreaktion (PCR = engl. *Polymerase Chain Reaction*) bestimmt. Als Referenzprobe dienten unbehandelte

Zellen und als Referenzgen wurde β -Actin genutzt. Die mRNA-Mengen von PACRG und Parkin werden sowohl in SH-SY5Y, als auch in primären kortikalen Neuronen, unter den untersuchten Stressbedingungen in ähnlichem Ausmaß hoch reguliert. Diese Regulation ist dosis- und zeitabhängig (Abb. 2.4 A - C). Die PACRG-Genexpression wird also ebenso wie die Parkin-Expression durch mitochondrialen Stress und durch eine Störung der Kalzium-Homöostase aktiviert. Es ist zu vermuten, dass der gemeinsame Promotor von PACRG und Parkin die Transkription beider Gene Stress-abhängig ähnlich reguliert.

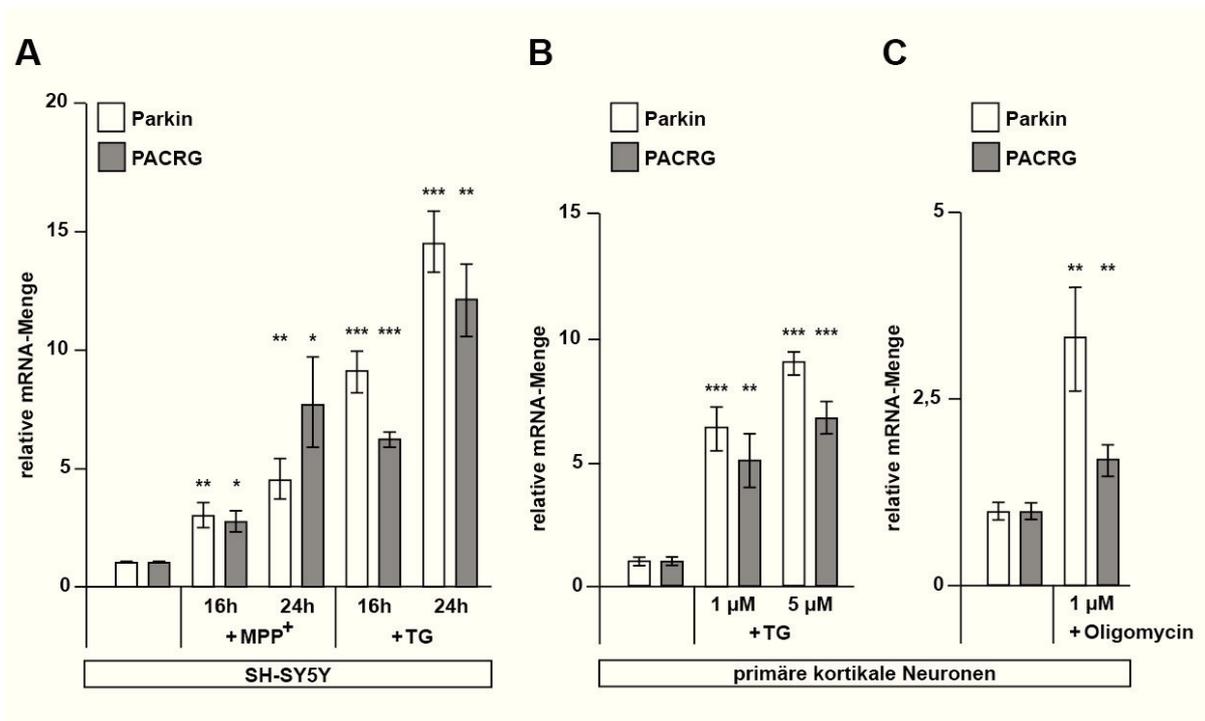


Abb. 2.4: Die PACRG-mRNA-Expression wird Stress-abhängig hoch reguliert.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 2 mM MPP⁺ bzw. 10 μ M TG für 16 und 24 h behandelt **A**). Primäre kortikale Neuronen wurden mit 1 μ M und 5 μ M Thapsigargin **B**) bzw. 1 μ M Oligomycin für 16 h **C**) behandelt. Die mRNA-Menge von PACRG und Parkin wurde mittels quantitativer *real-time*-PCR quantifiziert. Die Expression von PACRG- und Parkin-mRNA ist im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen in behandelten Zellen unter allen untersuchten Stressbedingungen zeit- und dosisabhängig erhöht. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei bis fünf unabhängigen Experimenten. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Die statistische Auswertung der Hoch-Regulation erfolgte bei allen Proben im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Zellen.

2.4. PACRG hat einen zytoprotektiven Effekt

2.4.1. PACRG-Überexpression schützt vor Stress-induziertem Zelltod

Um die zelluläre Funktion von PACRG aufzuklären wurde zunächst überprüft, ob das Protein, ähnlich wie sein koreguliertes Protein Parkin eine zytoprotektive Aktivität besitzt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Parkin-Expression in Zellkultur- und in Tier-Modellen protektiv gegenüber verschiedenen Stressbedingungen wirkt (Dawson and Dawson, 2010; Exner et al., 2012; Henn et al., 2007; Müller-Rischart et al., 2013). Zur Analyse einer potentiellen Zellprotektivität von PACRG wurden Apoptose-Assays in PACRG- und/oder Parkin-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Um die Zellen unterschiedlichen Stressbedingungen auszusetzen wurden sie mit Staurosporin (STS) (1 μ M, 3 h) oder MPP⁺ (7,5 mM, 4 h) behandelt. Wie erwähnt, induziert MPP⁺ mitochondrialen Stress (Nicklas et al., 1987), während STS ein genereller Kinase-Inhibitor ist (Rüegg and Burgess, 1989; Tamaoki et al., 1986). Die Apoptose-Rate der Zellen wurde nach der Behandlung durch die mikroskopische Auswertung von Immunfluoreszenz-Färbungen gegen aktive Caspase-3 oder aktiviertes Bax ermittelt.

In Kontroll-transfizierten SH-SY5Y-Zellen ist nach Behandlung mit STS oder MPP⁺ eine Erhöhung der Anzahl Caspase-3-positiver Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen von ca. 5 – 10 % auf ca. 25 % feststellbar. Durch Überexpression von PACRG wird die Apoptose-Rate unter beiden Toxinen um mehr als die Hälfte gesenkt und erreicht unter MPP⁺ sogar basale Werte. Gleiches ist durch Überexpression von Parkin zu beobachten. Ein additiver Effekt von PACRG und Parkin auf die Reduktion der Apoptose-Rate kann hier nicht beobachtet werden (Abb. 2.5 A und C).

Der protektive Effekt von PACRG kann auch auf Ebene der Aktivierung von Bax gezeigt werden. Die Aktivierung von Bax ist ein Ereignis in der Apoptose-Kaskade, welches vor der Aktivierung der Effektor-Caspasen-3 und -7 stattfindet. Nach Behandlung der SH-SY5Y-Zellen mit STS ist in den Kontroll-transfizierten Zellen eine Erhöhung der Anzahl an Zellen, die positiv für aktiviertes Bax gefärbt wurden, von ca. 7 % in unbehandelten Zellen auf ca. 40 % detektierbar. Durch Überexpression von PACRG oder Parkin wird die Rate an Zellen, die positiv für aktives Bax sind, wieder um etwa die Hälfte reduziert. Auch auf dieser Ebene ist kein additiver Effekt von PACRG und Parkin zu beobachten (Abb. 2.6 A).

Auf zwei unterschiedlichen Ebenen der Apoptose-Kaskade kann die Überexpression von PACRG unter verschiedenen Stressbedingungen die Apoptose-Rate signifikant reduzieren. Die Erhöhung der PACRG-Proteinmengen in der Zelle hat also eine protektive Wirkung.

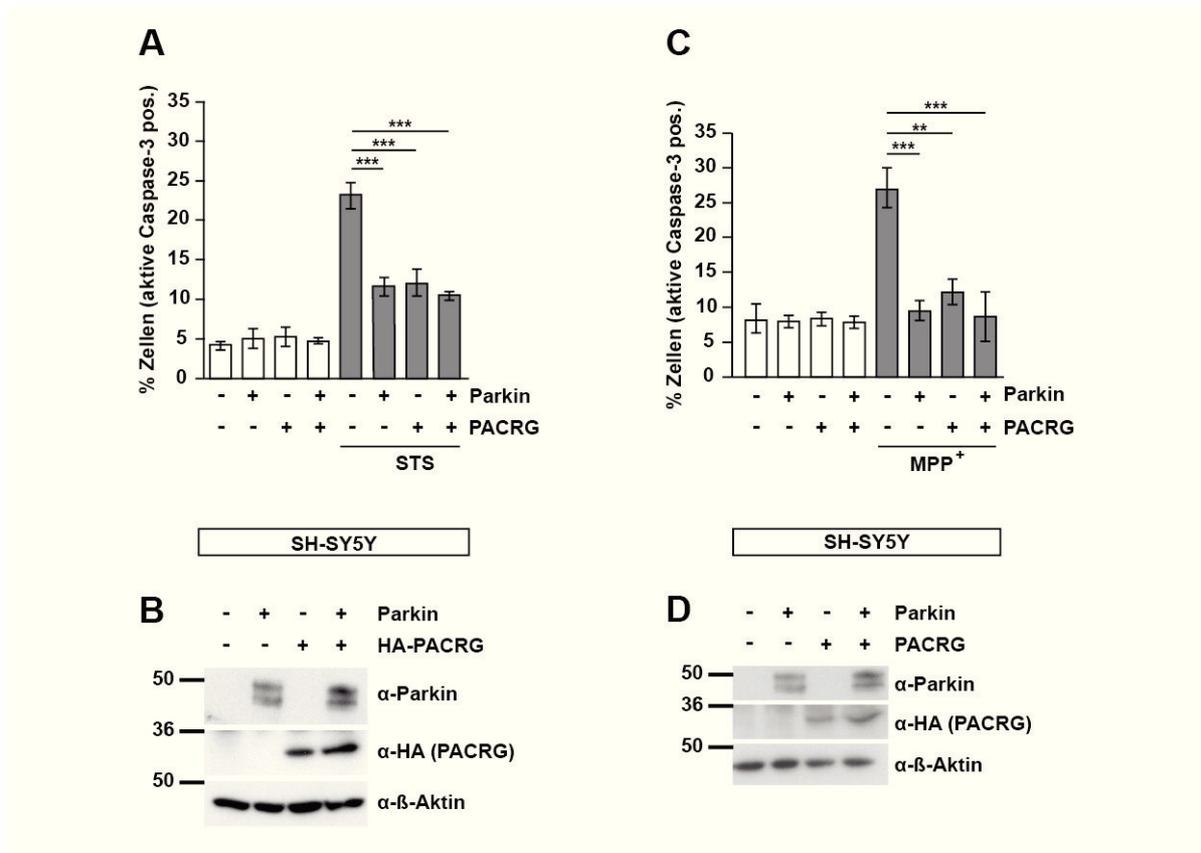


Abb. 2.5: PACRG-überexprimierende Zellen zeigen eine verringerte Caspase-3-Aktivierung unter Stressbedingungen.

Mit PACRG und/oder Parkin transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden mit 1 μ M STS für 3 h **A und B**) bzw. 7,5 mM MPP⁺ für 4 h **C und D**) behandelt. Die Zellen wurden gegen aktive Caspase-3 durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und die Apoptose-Rate durch mikroskopische Auszählung der transfizierten und Caspase-3-positiven Zellen ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ transfizierte Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. **B und D**) zeigen die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in **A und C**) quantifizierten Experimente.

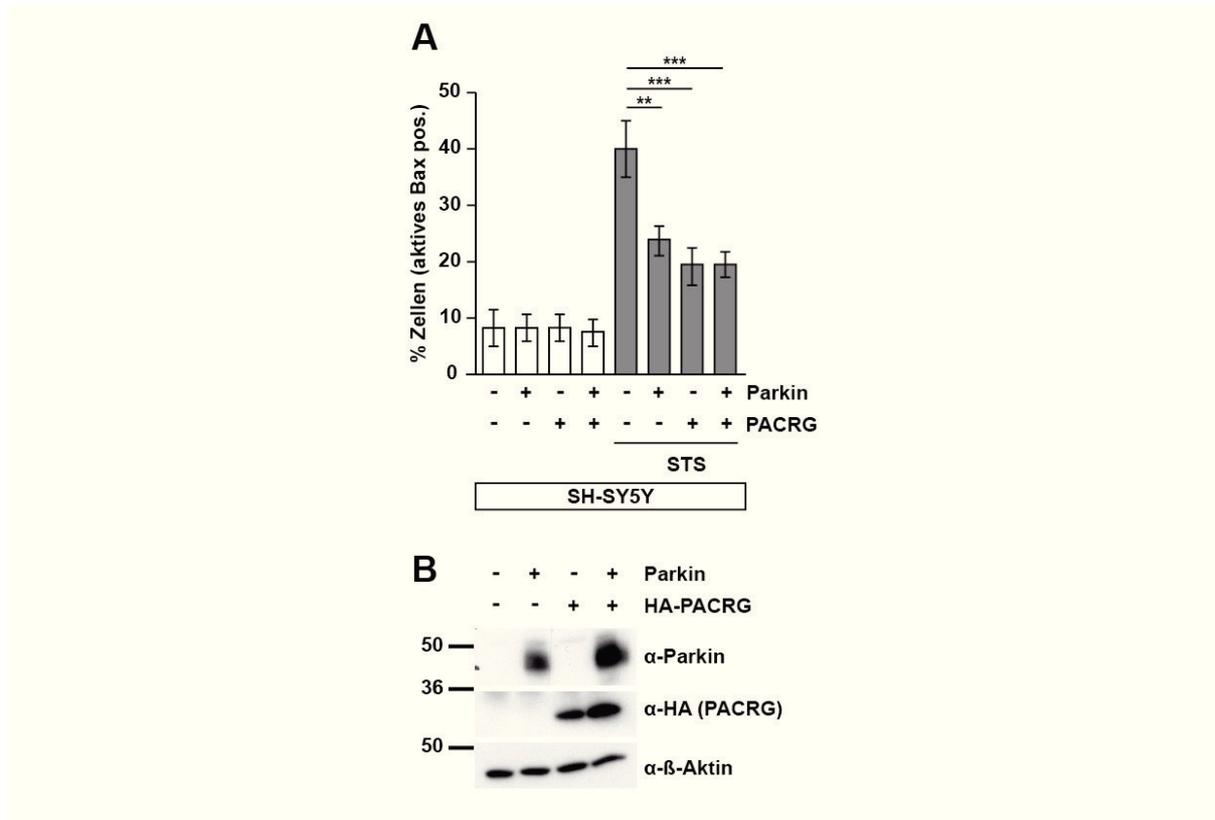


Abb. 2.6: PACRG-überexprimierende Zellen zeigen eine verringerte Bax-Aktivierung unter Stressbedingungen.

Mit PACRG und/oder Parkin transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden mit 1 μ M STS für 3 h behandelt. Die Zellen wurden gegen aktiviertes Bax durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und die Apoptose-Rate durch mikroskopische Auszählung der transfizierten und aktives-Bax-positiven Zellen ermittelt **A**). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ transfizierte Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. **B**) zeigt die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in **A**) quantifizierten Experimente.

2.4.2. PACRG-defiziente Zellen sind empfindlicher gegenüber zellulärem Stress

Um die Funktion von PACRG beim Schutz von Zellen gegenüber Stressbedingungen zu bestätigen, wurde die Apoptose-Rate in PACRG-defizienten SH-SY5Y-Zellen untersucht. Hierfür wurde PACRG mit Hilfe von zwei verschiedenen siRNAs in diesen Zellen herunter reguliert (engl. *Knockdown*) und die Zellen anschließend mit STS (1 μ M, 3 h) behandelt und gegen aktive Caspase-3 durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. PACRG-defiziente Zellen zeigen nach STS-Behandlung eine signifikant höhere Apoptose-Rate im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Unter basalen Bedingungen können keine Unterschiede der Apoptose-Rate zwischen Kontroll- und PACRG-*Knockdown*-Zellen detektiert werden (Abb. 2.7 A und C). Die Herunter-Regulation der

PACRG-Expression hat also den gegenteiligen Effekt auf gestresste Zellen, wie die Überexpression des Proteins. PACRG-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber STS-Behandlung als Kontrollzellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass PACRG eine zytoprotektive Funktion gegenüber unterschiedlichen Stressbedingungen hat.

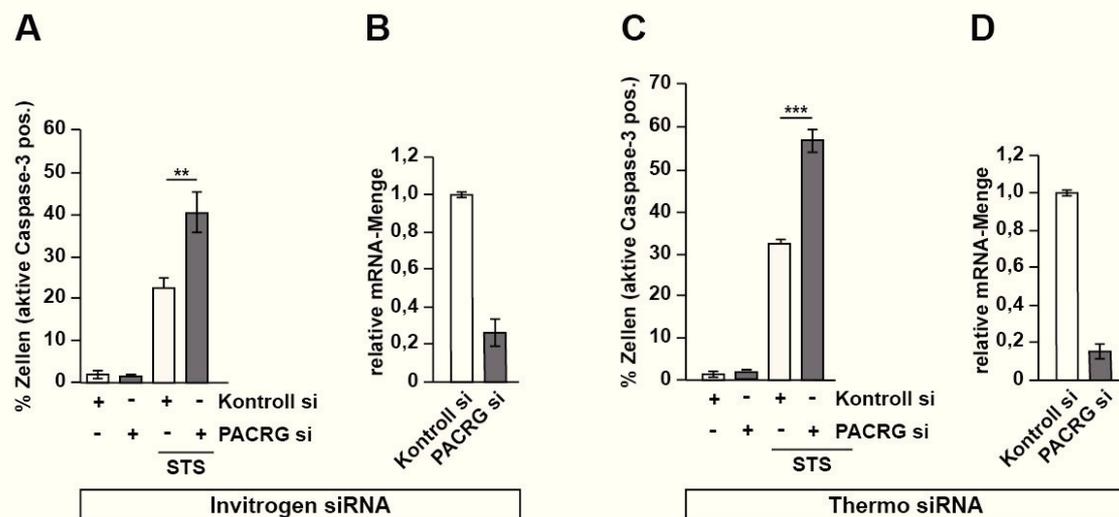


Abb. 2.7: PACRG-Knockdown führt zu erhöhter Apoptose-Rate unter Stressbedingungen.

Mit PACRG-siRNA der Firma Invitrogen **A und B**) oder Thermo **C und D**) transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden mit 1 μ M STS für 3 h behandelt. Die Zellen wurden wie in Abb. 2.5 gefärbt und ausgewertet. **B und D**) zeigen die Mittelwerte der, mittels quantitativer *real-time*-PCR ermittelten, relativen mRNA-Expressions-Mengen der in **A und C**) quantifizierten Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

2.4.3. Die zytoprotektive Wirkung von PACRG ist unabhängig von Parkin

Um zu untersuchen, ob die protektive Funktion von PACRG abhängig ist von der Expression von Parkin, wurden Apoptose-Assays in Parkin-defizienten Zellen durchgeführt. PACRG-überexprimierende embryonale Maus-Fibroblasten (engl. *Mouse embryonic fibroblast* = MEF) aus Wildtyp-(WT)- und Parkin-*Knockout*-Mäusen wurden mit STS (1 μ M, 3 h) behandelt und die Apoptose-Rate nach Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen mikroskopisch durch Quantifizierung der transfizierten, Caspase-3-positiven Zellen ermittelt. Nach STS-Behandlung ist die Apoptose-Rate in Parkin-*Knockout*-Zellen ca. ein Drittel höher als in WT-Zellen (Abb. 2.8 A und C). Die Parkin-defizienten Zellen sind also generell anfälliger gegenüber STS-Stress als die WT-Zellen. In beiden Zelltypen konnte durch PACRG-Überexpression die Apoptose-Rate unter STS um etwa die

Hälfte gesenkt werden im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen. Ähnliche Werte wurden nach Überexpression von Parkin und nach gemeinsamer Expression beider Proteine in diesen Zellen erreicht. Somit konnte auch in diesem Versuch im Hinblick auf die Zytotoxizität kein additiver Effekt von Parkin und PACRG beobachtet werden (Abb. 2.8 A und C). Da die PACRG-Überexpression auch in den Parkin-defizienten Zellen die Apoptose-Rate unter Stressbedingungen senkt, kann geschlussfolgert werden, dass die protektive Funktion von PACRG unabhängig von der Anwesenheit von Parkin ist.

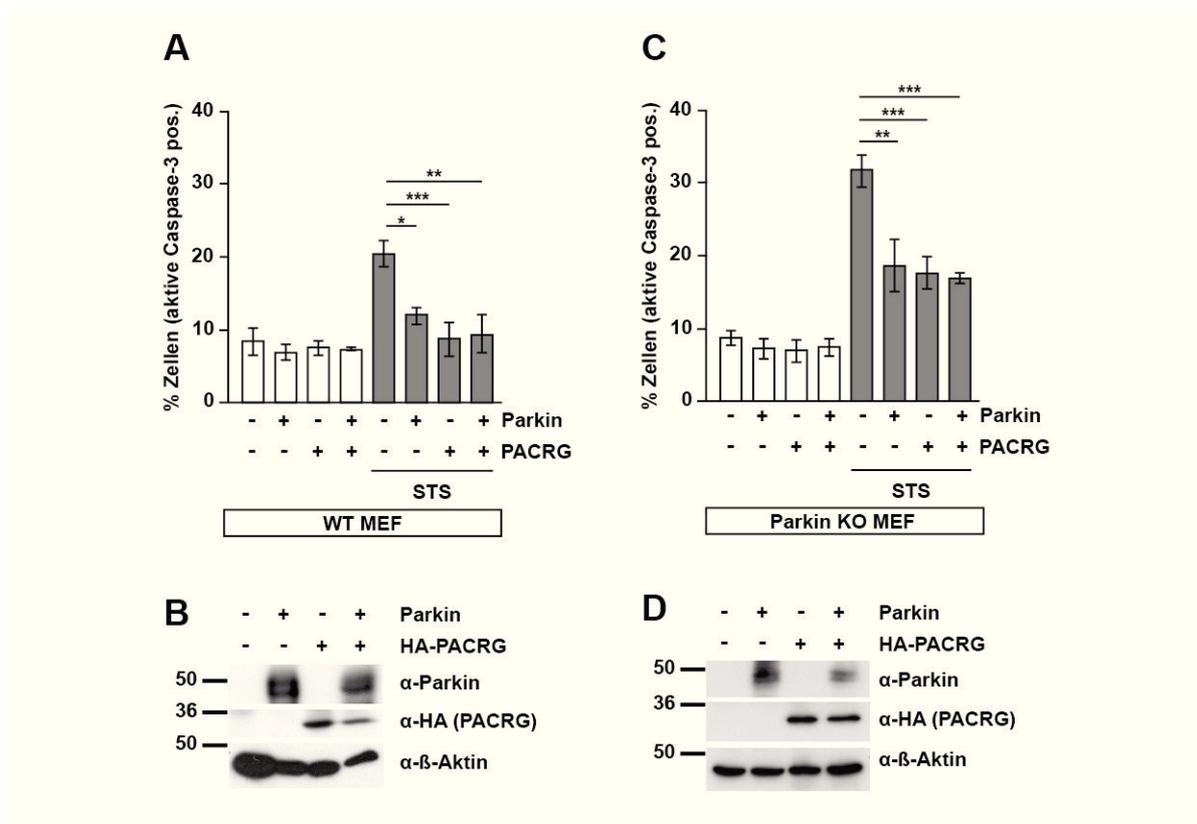


Abb. 2.8: PACRG-Überexpression reduziert die Apoptose-Rate unter Stressbedingungen in Parkin-defizienten Zellen.

Mit PACRG und/oder Parkin transfizierte WT-MEFs **A und B**) bzw. Parkin-*Knockout*-MEFs **C und D**) wurden mit 1 μ M STS für 3 h behandelt. Die Zellen wurden wie in Abb. 2.5 gefärbt und ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ transfizierte Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. **B und D**) zeigen die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in **A und C**) quantifizierten Experimente.

2.5. PACRG beeinflusst die mitochondriale Morphologie

Nachdem für PACRG, ähnlich wie für Parkin, eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob das Protein auch eine Funktion in der Regulation der

mitochondrialen Morphologie besitzt. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Parkin einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion und Dynamik hat. Die Überexpression von Parkin schützt vor Drp1-abhängiger mitochondrialer Fragmentierung, während der *Knockdown* von Parkin die Drp1-abhängige mitochondriale Fragmentierung induziert (Lutz et al., 2009a).

2.5.1. PACRG-Überexpression schützt vor Drp1-induzierter mitochondrialer Fragmentierung

Um zu überprüfen, ob PACRG, ebenso wie Parkin, einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie hat, wurde zunächst die Wirkung der PACRG-Überexpression auf die Drp1-induzierte mitochondriale Fragmentierung in SH-SY5Y-Zellen untersucht. Drp1 ist ein mitochondriales Fissionsprotein, welches die Teilung von Mitochondrien katalysiert und damit zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes führt (Abb. 2.9 B) (Otsuga et al., 1998; Smirnova et al., 2001). Zusätzlich zu Drp1 wurden die Zellen mit PACRG und/oder Parkin sowie der Parkin- Δ UBL-Mutante transfiziert. Der Δ UBL-Mutante von Parkin fehlt die N-terminale UBL-Domäne, für deren Funktion es zwar einige Hinweise gibt, die aber nicht vollständig aufgeklärt ist (Finney et al., 2003; Haber, 2004). Diese Parkin-Mutante zeigt allerdings keine zytoprotektive Funktion mehr und wurde in diesem Experiment als Negativkontrolle eingesetzt (Müller-Rischart et al., 2013). Die Mitochondrien der Zellen wurden mit Hilfe eines anti-Tom20 Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. Die transfizierten Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt und die Morphologie ihres mitochondrialen Netzwerkes begutachtet. Die Zellen wurden nach ihrer mitochondrialen Morphologie in zwei Kategorien eingeteilt: in Zellen mit einem tubulären und Zellen mit einem nicht-tubulären, fragmentierten mitochondrialen Netzwerk. Durch Überexpression des Fissionsproteins Drp1 verdoppelt sich der Anteil der Zellen mit einem nicht-tubulären mitochondrialen Netzwerk von basal ca. 28 % auf ca. 50 %. Die Überexpression von PACRG oder Parkin zusammen mit Drp1 kann die Drp1-induzierte mitochondriale Fragmentierung signifikant reduzieren und auf die basale Menge von nicht-Drp1-überexprimierenden Kontrollzellen zurückführen. Die Δ UBL-Mutante von Parkin hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Fragmentierung unter Drp1-Überexpression (Abb. 2.9 A). Ähnlich wie bei der Untersuchung der zytoprotektiven Aktivität, kann kein additiver Effekt von PACRG und Parkin auf die mitochondriale Morphologie detektiert werden. PACRG beeinflusst also ähnlich wie Parkin die mitochondriale Morphologie, indem es nach Überexpression die Drp1-induzierte Fragmentierung von Mitochondrien reduziert.

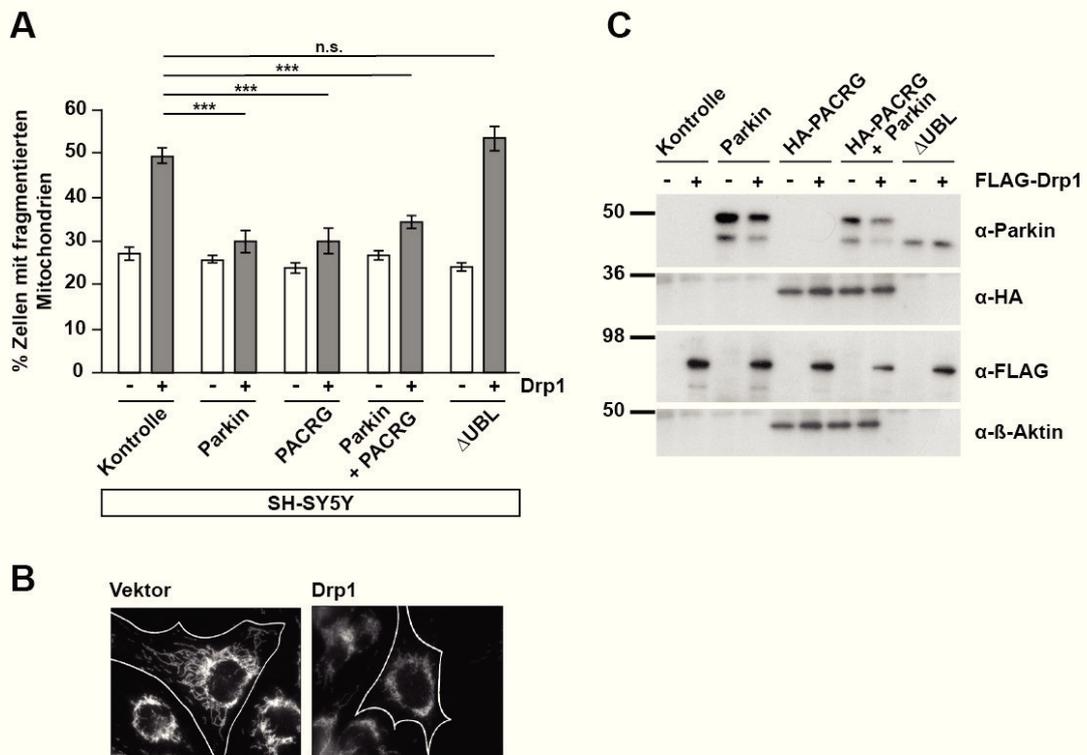


Abb. 2.9: PACRG-Überexpression reduziert die Drp1-induzierte mitochondriale Fragmentierung.

In Drp1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen wurden nach Transfektion mit PACRG, Parkin oder der Parkin-ΔUBL-Mutante, Mitochondrien mit einem anti-Tom20 Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und die mitochondriale Morphologie mikroskopisch ausgewertet. Die Zellen wurden kategorisiert in Zellen mit tubulärem und in Zellen mit nicht-tubulärem, fragmentiertem mitochondrialen Netzwerk. Transfizierte Zellen wurden quantifiziert und einer der beiden Gruppen zugeordnet **A**). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ transfizierte Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. **B**) zeigt ein repräsentatives Bild einer Vektor-transfizierten Kontroll-Zelle, die in die Kategorie „tubuläres mitochondriales Netzwerk“ eingeteilt wurde, und eine Drp1-überexprimierende Zelle, mit fragmentiertem mitochondrialen Netzwerk. **C**) zeigt die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in **A**) quantifizierten Experimente.

2.5.2. PACRG-Knockdown führt zur Fragmentierung von Mitochondrien

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von PACRG auf die mitochondriale Morphologie wurden die PACRG-Proteinmengen in SH-SY5Y-Zellen mittels siRNA-Transfektion reduziert. Die mitochondriale Morphologie dieser Zellen wurde wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben mikroskopisch untersucht und kategorisiert. PACRG-defiziente Zellen zeigen einen signifikant erhöhten Anteil an Zellen mit nicht-tubulärem mitochondrialen Netzwerk im Vergleich zu Kontroll-siRNA-

transfizierten Zellen von ca. 30 % auf ca. 45 %. Die *Knockdown*-Effizienz in diesem Versuch liegt bei ca. 75 % (Abb. 2.10). Die PACRG-Defizienz löst also, ähnlich wie die Parkin-Defizienz (Lutz et al., 2009a), eine mitochondriale Fragmentierung aus und hat somit den gegenteiligen Effekt wie die Überexpression von PACRG.

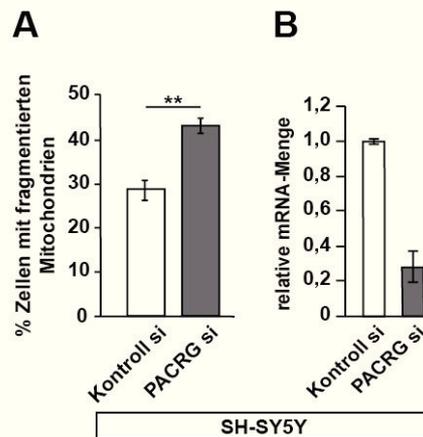


Abb. 2.10: PACRG-Knockdown führt zu mitochondrialer Fragmentierung.

Mit PACRG-siRNA transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden wie in Abb. 2.9 gefärbt und ausgewertet **A**). **B**) zeigt die Mittelwerte der, mittels quantitativer *real-time*-PCR ermittelten, relativen mRNA-Expressions-Mengen der in **A**) quantifizierten Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

2.6. PACRG zeigt keinen Effekt auf Mitophagie

Mitophagie ist der Abbau von in ihrer Funktion beeinträchtigten oder nicht mehr benötigten Mitochondrien durch Autophagie (Kapitel 1.3.1.2). In verschiedenen Studien konnten gezeigt werden, dass Parkin selektiv zu beeinträchtigten Mitochondrien rekrutiert wird und die Autophagie der Organellen induziert (Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2008), (Kapitel 1.3.1.2). Da als Grundlage dieser Arbeit angenommen wurde, dass PACRG in ähnlichen Signalwegen aktiv ist wie sein koreguliertes Protein Parkin, wurde neben der zytoprotektiven Funktion und dem Einfluss auf die mitochondriale Dynamik auch der Einfluss von PACRG auf die Mitophagie untersucht.

2.6.1. PACRG-Überexpression induziert keine Mitophagie und hat keinen Einfluss auf die Parkin-induzierte Mitophagie

Zur Untersuchung eines potentiellen Einflusses von PACRG auf die Mitophagie wurde in HeLa-Zellen, die kein endogenes Parkin exprimieren, PACRG und/oder Parkin überexprimiert. Die Zellen wurden für 1 h oder für 24 h mit CCCP behandelt. CCCP ist ein Entkoppler der

mitochondrialen Atmungskette (Lou et al., 2007) und zerstört damit das mitochondriale Membranpotential, was zur Einleitung der Mitophagie führt (Narendra et al., 2008). Nach der Behandlung wurden die Mitochondrien der Zellen mit Hilfe eines anti-Tom20 Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und mikroskopisch analysiert. Nach 24-stündiger Behandlung mit CCCP sind in den meisten Parkin-exprimierenden Zellen keine Mitochondrien mehr zu detektieren. Der Anteil der Zellen ohne Mitochondrien wurde quantifiziert. Im basalen Zustand sind sowohl PACRG, als auch Parkin in den Zellen zytosolisch lokalisiert. Nach einstündiger CCCP-Behandlung ist eine Translokation von Parkin an die Mitochondrien zu beobachten, während PACRG weiterhin gleichmäßig zytosolisch verteilt bleibt. Nach 24-stündiger CCCP-Behandlung können bei den Parkin-transfizierten Zellen, Zellen ohne Mitochondrien detektiert werden. In PACRG-überexprimierenden Zellen kann dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abb. 2.11 A). In Parkin-transfizierten Zellen liegt der Anteil an Zellen ohne Mitochondrien bei ca. 70 %, während, wie bereits erwähnt, in PACRG-transfizierten Zellen keine Mitophagie detektiert werden kann. Überexpression von beiden Proteinen zusammen führt zu einem Mitophagie-Anteil von ca. 75 % (Abb. 2.11 B). Die PACRG-Überexpression kann also im Gegensatz zur Parkin-Überexpression unter den hier verwendeten Bedingungen keine Mitophagie induzieren. PACRG unterscheidet sich also in diesem Punkt in seiner Funktion von seinem koregulierten Protein.

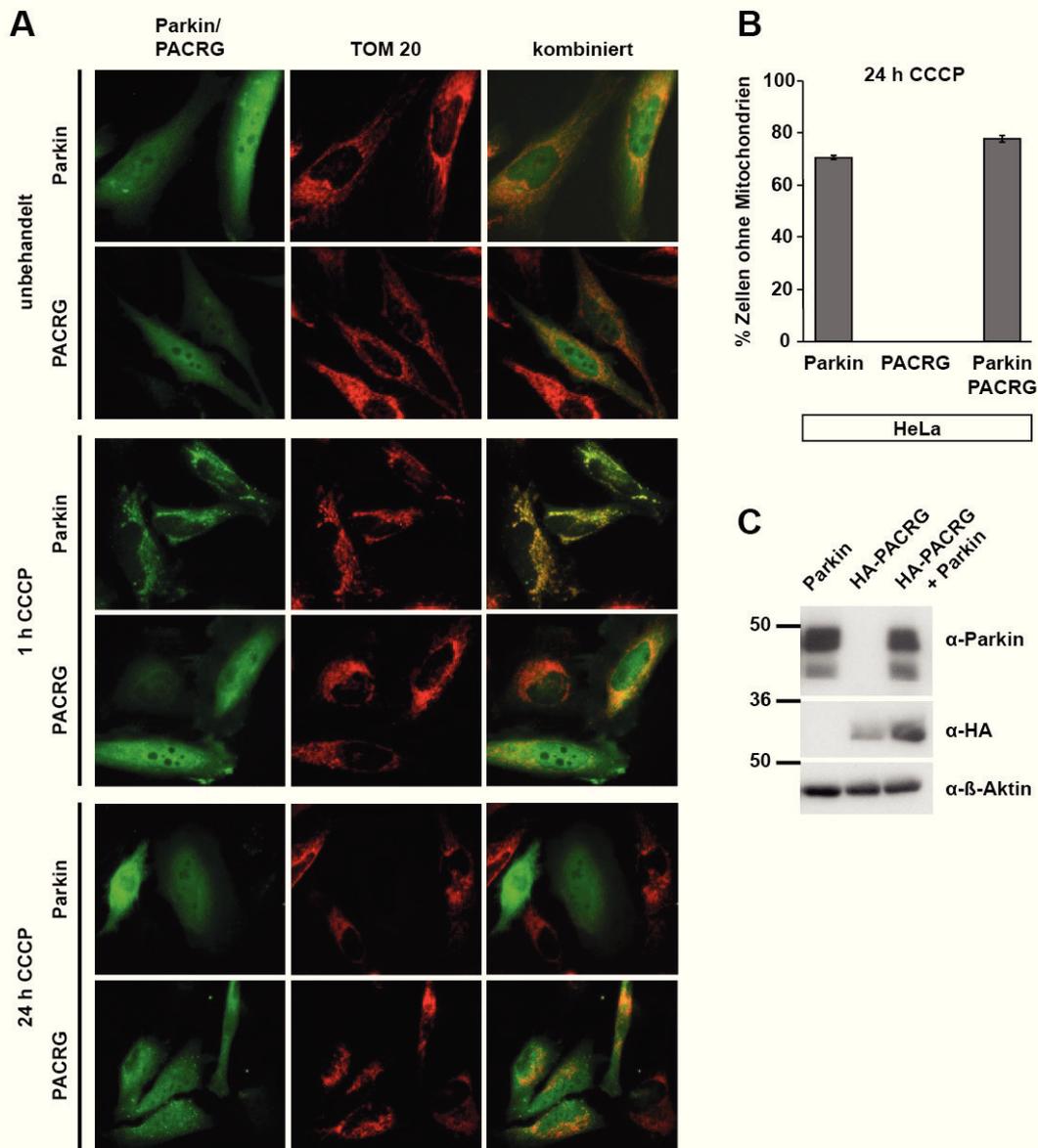


Abb. 2.11: PACRG-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Mitophagie.

PACRG- und/oder Parkin-überexprimierende HeLa-Zellen wurden mit 10 μ M CCCP für 1 h und für 24 h behandelt. In den Zellen wurden Mitochondrien mit einem anti-Tom20 Antikörper sowie Parkin und PACRG durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und die Zellen mikroskopisch ausgewertet. **A**) zeigt repräsentative mikroskopische Bilder der in **B**) quantifizierten Zellen. Transfizierte Zellen ohne Mitochondrien wurden quantifiziert **B**). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ transfizierte Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. **C**) zeigt die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in **B**) quantifizierten Experimente.

2.6.2. PACRG-Knockdown beeinflusst nicht die Parkin-induzierte Mitophagie

Da die Überexpression von PACRG keine Mitophagie induzieren kann, wurde in diesem Experiment untersucht, ob eine PACRG-Defizienz Einfluss auf die Parkin-induzierte Mitophagie hat. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen mit PACRG-siRNA und Parkin-cDNA transfiziert und für 24 h mit CCCP behandelt. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Die PACRG-defizienten Zellen zeigen keinen Unterschied in der Mitophagie-Rate verglichen mit den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 2.12). Zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 2.6.1 kann geschlussfolgert werden, dass PACRG keinen Einfluss auf die Mitophagie hat.

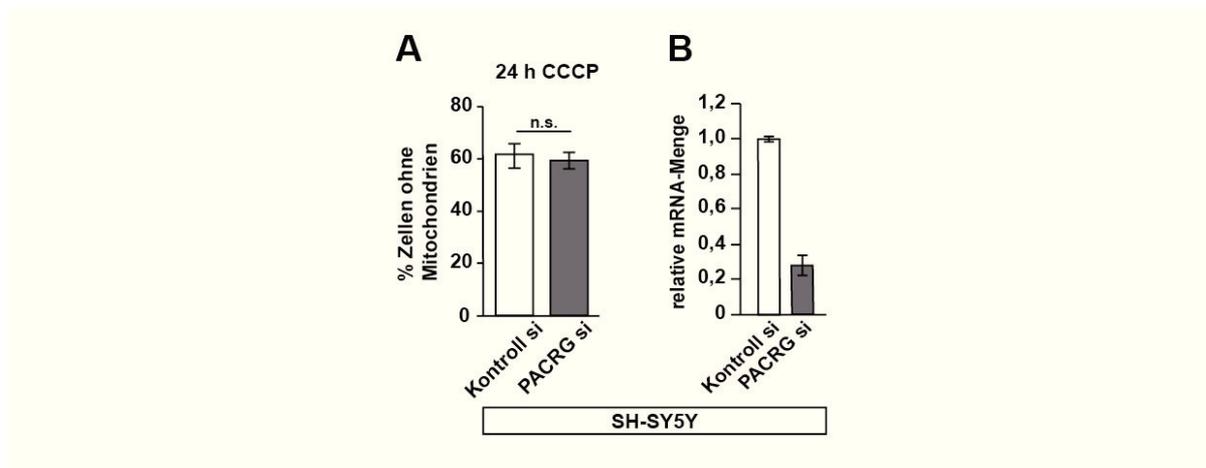


Abb. 2.12: PACRG-Knockdown hat keinen Einfluss auf die Parkin-induzierte Mitophagie.

PACRG-siRNA- und Parkin-cDNA-transfizierte Zellen wurden mit 10 μ M CCCP für 24 h behandelt. Die Zellen wurden wie in Abb. 2.11 gefärbt und ausgewertet und transfizierte Zellen ohne Mitochondrien quantifiziert **A**). **B**) zeigt die Mittelwerte der, mittels quantitativer *real-time*-PCR ermittelten, relativen mRNA-Expressions-Mengen der in **A**) quantifizierten Experimente. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ transfizierte Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

2.7. PACRG beeinflusst den NF- κ B-Signalweg

Für PACRG wurde in Kapitel 2.4 eine zytoprotektive Funktion gezeigt. Um diese Funktion des Proteins genauer zu charakterisieren ist es notwendig den Signalweg zu analysieren, über den diese protektive Aktivität vermittelt wird. Parkin vermittelt seine zytoprotektive Aktivität über die Aktivierung des NF- κ B-Überlebens-Signalweges durch Beeinflussung der linearen Ubiquitinierung von NEMO (Henn et al., 2007; Müller-Rischart et al., 2013). Unter Stressbedingungen wird Parkin zum LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*) rekrutiert, aktiviert diesen und steigert

damit die lineare Ubiquitinierung von NEMO, dem essentiellen Regulator des NF- κ B-Signalweges (Müller-Rischart et al., 2013). Dies führt über einige Zwischenschritte zur Aktivierung des Signalweges und zur Translokation der Transkriptionsfaktor-Dimere in den Zellkern. Dort aktivieren diese die Transkription verschiedener Zielgene, wie z.B. von Überlebensfaktoren für die Zelle (Kapitel 1.3.2.3).

2.7.1. Die zytoprotektive Wirkung von PACRG ist abhängig von NEMO

In diesem Versuch wurde analysiert, ob PACRG, ebenso wie Parkin, seine zytoprotektive Aktivität über den NF- κ B-Signalweg vermittelt. Hierfür wurden Apoptose-Assays in NEMO-defizienten MEFs (NEMO-*Knockout*-MEFs) durchgeführt, die den kanonischen NF- κ B-Signalweg nicht mehr aktivieren können. Die NEMO-*Knockout*-MEFs wurden mit PACRG und zusätzlich mit Leervektor, WT-NEMO oder den NEMO-Mutanten D311N und K285/309R transfiziert. Diese Mutanten sind nicht mehr in der Lage lineare Ubiquitin-Ketten zu binden (Hadian et al., 2011; Rahighi et al., 2009; Tokunaga et al., 2009b), was die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges beeinträchtigt. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit STS (1 μ M, 3 h) behandelt, mit Hilfe eines Antikörpers gegen aktive Caspase-3 durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und die Apoptose-Rate mikroskopisch quantifiziert. Die Apoptose-Rate erhöht sich durch die STS-Behandlung in Kontroll-transfizierten Zellen von basal ca. 12 % auf ca. 27 %. PACRG zeigt in diesen NEMO-defizienten Zellen keinen protektiven Effekt unter STS-induziertem Stress. Erst nach Wiedereinbringung von WT-NEMO kann die Zell-Protektivität von PACRG detektiert werden, indem die Apoptose-Rate hier wieder auf ca. 15 % reduziert wird. Diese Resultate zeigen, dass die zytoprotektive Funktion von PACRG abhängig von der Expression von NEMO und damit von der Funktion des NF- κ B-Signalweges ist. Unter zusätzlicher Expression der beiden beschriebenen NEMO-Mutanten kann ebenfalls keine Protektivität durch PACRG-Überexpression festgestellt werden. Die Apoptose-Rate liegt in diesen Zellen wie in Kontroll-transfizierten Zellen bei 27 – 33 % nach STS-Behandlung (Abb. 2.13 A). Die protektive Aktivität von PACRG hängt also nicht nur von der Expression von NEMO ab, sondern auch von dessen linearer Ubiquitinierung.

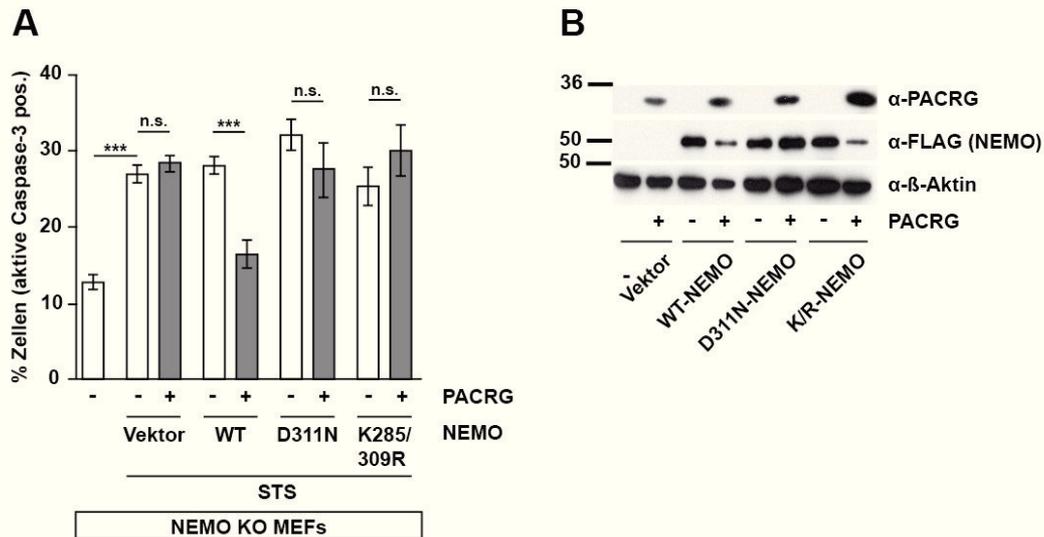


Abb. 2.13: In NEMO-defizienten Zellen wirkt die Überexpression von PACRG nicht Stress-protektiv.

Es wurden Apoptose-Assays in PACRG-überexprimierenden NEMO-*Knockout*-MEFs durchgeführt. Zur Kontrolle wurden WT-NEMO oder die NEMO-Mutanten D311N und K285/309R durch Transfektion in die Zellen eingebracht. Die Zellen wurden mit 1 μ M STS für 3 h behandelt und wie in Abb. 2.5 aktive Caspase-3 durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt und mikroskopisch ausgewertet **A**). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. $n \geq 900$ transfizierte Zellen. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ **B**) zeigt die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in **A**) quantifizierten Experimente.

2.7.2. PACRG-Überexpression aktiviert den NF- κ B-Signalweg

Nachdem festgestellt wurde, dass die protektive Funktion von PACRG abhängig vom kanonischen NF- κ B-Signalweg ist, wurde hier untersucht, ob PACRG einen direkten Einfluss auf diesen Signalweg hat. Hierfür wurde zunächst analysiert, ob durch Überexpression von PACRG der Signalweg aktiviert werden kann. Zu diesem Zweck wurde in HEK293T-Zellen nach PACRG- oder Parkin-Überexpression ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür mit einem NF- κ B-Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfiziert. Dieses Konstrukt enthält Bindestellen für verschiedene NF- κ B-Dimere in einem minimalen Promotor, der vor ein Luciferase-Gen geschaltet ist (Krappmann et al., 2001). Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wird in diesem Versuch durch die gesteigerte Expression und damit die erhöhte Aktivität der Luciferase messbar gemacht. Die Aktivität der Luciferase wird über deren Umsetzung des Substrates Luciferin zu dem lumineszierenden Oxy-Luciferin gemessen. Je stärker die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges, desto mehr Luciferase wird exprimiert und desto höher ist die Umsetzung

des Substrates und die Bildung von Oxy-Luciferin (Abb. 2.14 A). Die gemessene Lumineszenz von PACRG- und Parkin-transfizierten Zellen wurde auf die Lumineszenz in Kontroll-transfizierten Zellen normalisiert. Die Lumineszenz in Kontroll-transfizierten Zellen wurde auf eins gesetzt. Die Überexpression von PACRG erhöht, ähnlich wie die Überexpression von Parkin, die Luciferase-Aktivität im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen ca. zweifach (Abb. 2.14 B). Eine Erhöhung der PACRG-Proteinmenge in der Zelle führt also zur Aktivierung des NF- κ B-Signalweges.

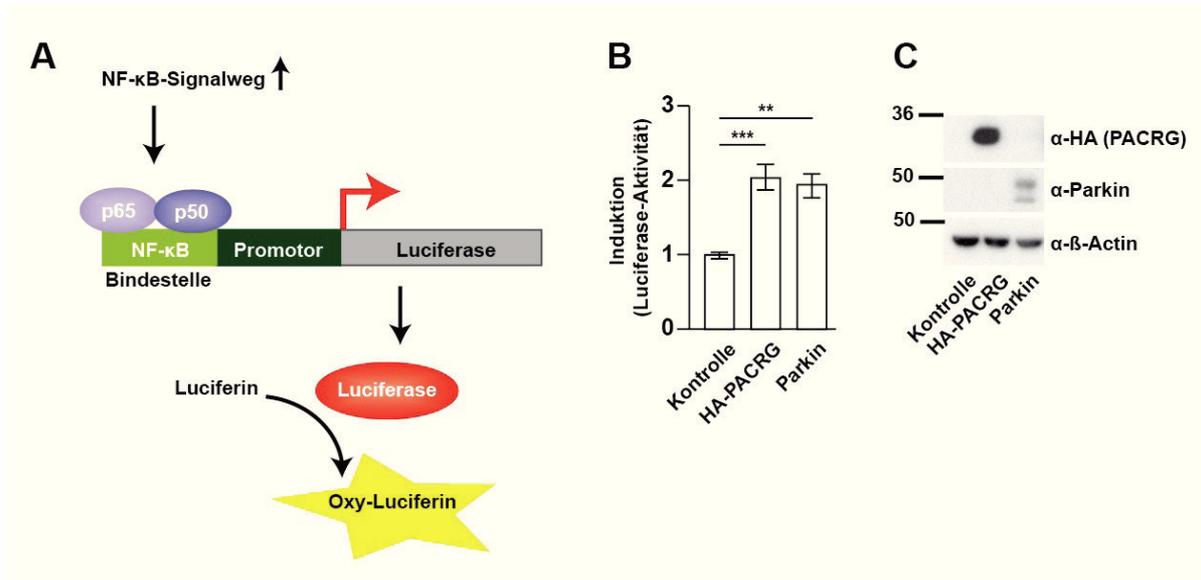


Abb. 2.14: PACRG-Überexpression aktiviert die Transkription eines NF- κ B-Luciferase-Reportergen-Konstrukts.

HEK293T-Zellen wurden mit PACRG oder Parkin sowie einem Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfiziert, welches Bindestellen für NF- κ B vor einem minimalen Promotor enthält. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt zur Aktivierung der Luciferase-Transkription, die die Umwandlung von Luciferin in das lumineszierende Oxy-Luciferin katalysiert (A). Die Aktivität der Luciferase wurde luminometrisch gemessen und auf die Aktivität in Kontroll-transfizierten Zellen normalisiert (B). Die Daten repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei bis fünf unabhängigen Experimenten. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. C) zeigt die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in B) quantifizierten Experimente.

2.7.3. PACRG-Knockdown hemmt die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges

Zusätzlich zur Analyse des Einflusses der Überexpression von PACRG auf den NF- κ B-Signalweg wurde untersucht, ob der *Knockdown* von PACRG die Aktivierung des Signalweges hemmen kann. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen mit PACRG-siRNA sowie dem beschriebenen NF- κ B-Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfiziert und zur Stimulation des NF- κ B-Signalweges mit TNF- α (10 ng/ μ L; 16 h) behandelt. Die Messung und Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.7.2. In unbehandelten Zellen ist die Aktivität der Luciferase zwischen Kontroll- und PACRG-siRNA-

transfizierten Zellen nicht signifikant unterschiedlich. Nach TNF- α -Stimulation erhöht sich die Luciferase-Aktivität in den Kontroll-transfizierten Zellen um ca. 10-fach. Die Luciferase-Aktivität in PACRG-*Knockdown*-Zellen ist hingegen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen signifikant reduziert nach TNF- α -Stimulation (Abb. 2.15). Reduzierte PACRG-Proteinmengen beeinträchtigen also in der Tat die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TNF- α .

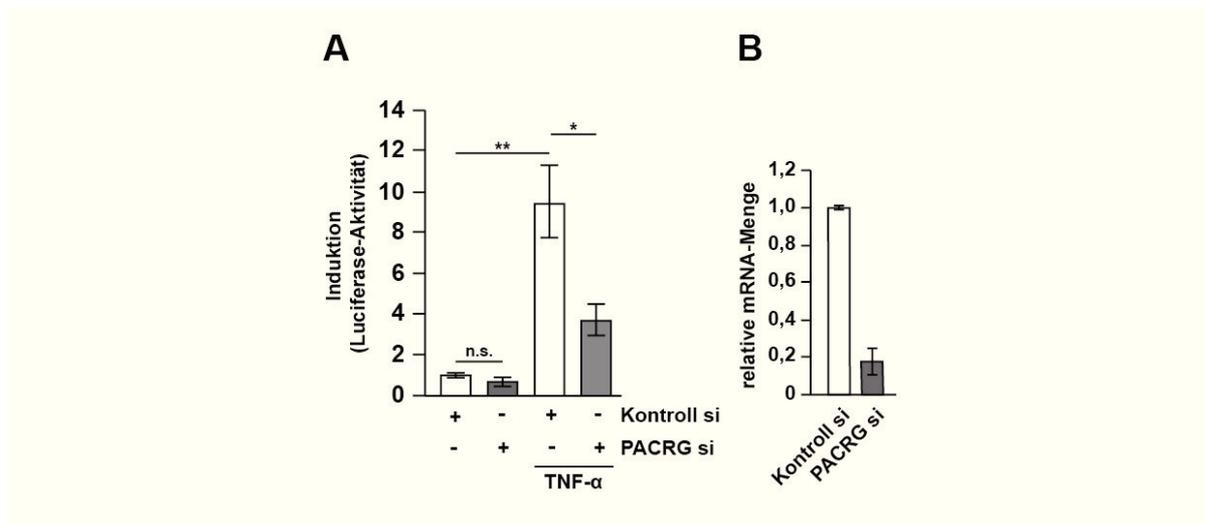


Abb. 2.15: PACRG-*Knockdown* hemmt die TNF- α -induzierte Aktivierung der Transkription des NF- κ B-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukts.

HEK293T-Zellen wurden mit PACRG-siRNA sowie einem Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert, welches Bindestellen für NF- κ B vor einem minimalen Promotor enthält. Die Zellen wurden vor der Messung mit 10 ng/ μ L TNF- α für 16 h behandelt. **A)** Die Proben wurden wie in Abb. 2.14 beschrieben ausgewertet. **B)** zeigt die Mittelwerte der, mittels quantitativer *real-time*-PCR ermittelten, relativen mRNA-Expressions-Mengen der in **A)** quantifizierten Experimente. Die Daten repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei bis fünf unabhängigen Experimenten. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Der Einfluss von PACRG auf den NF- κ B-Signalweg wurde mit Hilfe eines zweiten Versuchsaufbaus überprüft. Hierfür wurden ebenfalls SH-SY5Y-Zellen mit PACRG-siRNA transfiziert und der NF- κ B-Signalweg durch Behandlung mit TNF- α (15 ng/ μ L; 10 min) stimuliert. Anstelle des Reporter-Gen-Assays wurde die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges über die Translokation der p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors in den Zellkern untersucht. Unter basalen Bedingungen wird diese Untereinheit vom I κ B im Zytosol zurückgehalten und kann nach Stimulation des Signalweges in den Zellkern translozieren (Baldwin, 1996). Die Zellen wurden nach der Behandlung fixiert und die p65-Untereinheit des NF- κ B-Transkriptionsfaktors für die mikroskopische Analyse mit Hilfe eines anti-p65 Antikörpers durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Unter den hier angewandten Bedingungen zur Stimulation des NF- κ B-Signalweges wurde entweder eine vollständige oder eine partielle Translokation von p65 in den Nukleus beobachtet und quantifiziert. Während in Kontroll-

transfizierten Zellen ca. 95 % der Zellen eine vollständige p65-Kern-Translokation zeigen, ist die nukleäre p65-Translokation unter PACRG-*Knockdown*-Bedingungen signifikant beeinträchtigt, sodass nur ca. 8 % der Zellen eine vollständige Translokation, und 92 % eine partielle p65-Translokation aufweisen (Abb. 2.16 A). Eine Beeinträchtigung der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in PACRG-defizienten Zellen kann also sowohl durch den Reporteragen-Assay, als auch durch die Analyse der nukleären p65-Translokation gezeigt werden. Dieser Versuch wurde von Dr. Anne Kathrin Müller-Rischart durchgeführt.

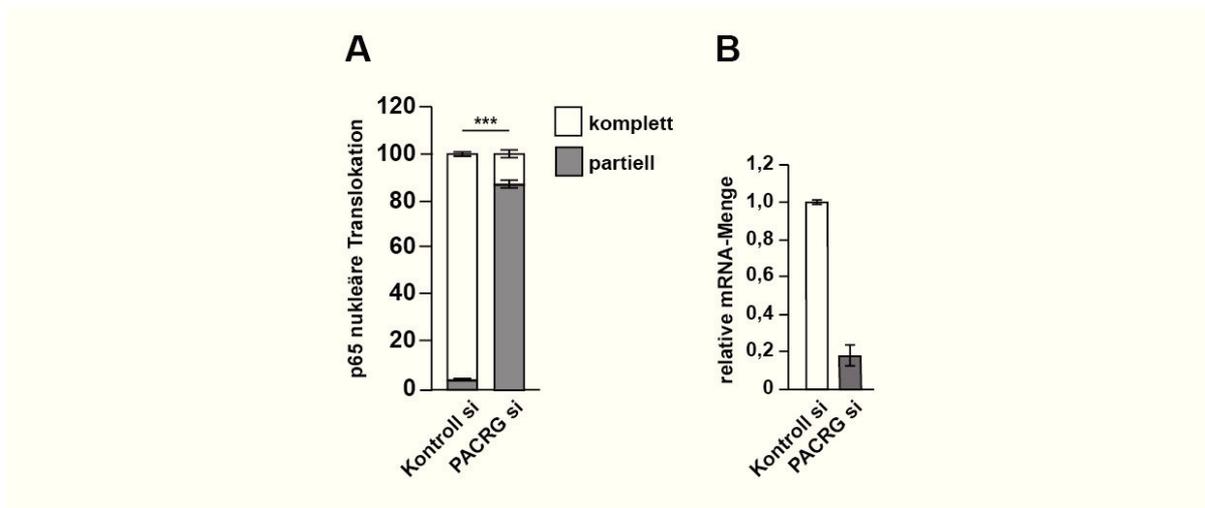


Abb. 2.16: PACRG-*Knockdown* hemmt die Translokation von p65 in den Nucleus nach TNF- α -Stimulation.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit PACRG-siRNA transfiziert. Nach Behandlung mit 15 ng/mL TNF- α für 10 min wurden die Zellen mit einem anti-p65 Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Kolokalisation von p65 mit dem Nucleus wurde mikroskopisch ausgewertet und quantifiziert. Die Zellen wurden in zwei Gruppen eingeteilt, in Zellen mit kompletter und in Zellen mit partieller p65-Kernlokalisation. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt. Es wurden pro Experiment > 300 Zellen quantifiziert **A**). **B**) zeigt die Mittelwerte der, mittels quantitativer *real-time*-PCR ermittelten, relativen mRNA-Expressions-Mengen der in **A**) quantifizierten Experimente. Die Daten repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ (durchgeführt von Dr. Anne Kathrin Müller-Rischart)

2.8. PACRG ist ein Teil des Assemblierungskomplexes für lineare Ubiquitin-Ketten (LUBAC = *Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*)

Es wurde in Kapitel 2.7.1 beschrieben, dass die protektive Aktivität von PACRG von der Funktion des kanonischen NF- κ B-Signalweges abhängig ist. Für diesen Versuch wurden Zellen verwendet, die aufgrund ihrer Defizienz für NEMO, das essentielle regulatorische Protein des NF- κ B-Signalweges, diesen nicht mehr aktivieren können. Durch Wiedereinbringung des WT-NEMO

Proteins konnte die protektive Wirkung von PACRG wiederhergestellt werden. Die Aktivität von NEMO wird stark durch dessen lineare Ubiquitinierung reguliert. Die Einbringung von NEMO-Mutanten, die nicht mehr linear ubiquitiniert werden können, konnte die protektive Wirkung von PACRG nicht wiederherstellen. Aus diesem Grund, und weil bereits auch für Parkin eine Funktion bei der linearen Ubiquitinierung von NEMO gezeigt werden konnte (Müller-Rischart et al., 2013), liegt die Vermutung nahe, dass auch PACRG für die lineare Ubiquitinierung von NEMO eine Rolle spielt. Diese Art der regulatorischen Ubiquitinierung wird vom LUBAC auf die Zielproteine übertragen. Der Komplex besteht aus den E3-Ligasen HOIP (RNF31) und HOIL-1L (RBCK1) und dem Adaptor-Protein Sharpin, wobei nur HOIP die Ubiquitin-Ketten direkt auf die Zielproteine überträgt und HOIL-1L und Sharpin für die Regulation der HOIP Aktivität zuständig sind (Kapitel 1.4.2.1), (Gerlach et al., 2011; Ikeda et al., 2011; Tokunaga et al., 2009).

2.8.1. PACRG interagiert mit HOIP, HOIL-1L und Sharpin

Um zu analysieren, ob PACRG ein Teil des LUBAC ist, wurde zunächst untersucht, ob es mit den einzelnen Komponenten des Komplexes HOIP, HOIL-1L und Sharpin interagieren kann. Hierfür wurden Ko-Immunopräzipitationen in HEK293T-Zellen nach Überexpression von PACRG zusammen mit den Komponenten durchgeführt. In Abb. 2.17 A wurden die mit einem HA-Tag versehenen Komponenten des LUBAC mit Hilfe eines anti-HA Antikörpers präzipitiert und die Präzipitate im Immunoblot auf eine mögliche Ko-Präzipitation von PACRG mit diesen Proteinen untersucht. Zur Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation dienten zum einen Zellen, die kein HA-getagtes Protein exprimierten, und zum anderen Zellen, die alle Komponenten exprimierten, bei deren Lysaten allerdings mit einem anti-Myc Antikörper immunpräzipitiert wurde. Nach der Präzipitation jeder einzelnen Komponente des LUBAC kann im Immunoblot PACRG detektiert werden, während in den Kontrollen keine oder nur eine vergleichsweise schwache Bande sichtbar ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Ko-Immunopräzipitation spezifisch ist und dass PACRG mit den einzelnen Komponenten des LUBAC, HOIP, HOIL-1L und Sharpin interagiert.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde in einer zweiten Ko-Immunopräzipitation, in HEK293T-Zellen, überexprimiertes HA-getagtes PACRG mit Hilfe eines anti-HA Antikörpers präzipitiert und das Präzipitat im Immunoblot auf die Ko-Präzipitation von ebenfalls überexprimiertem HOIP untersucht. Zum Vergleich wurde auf dem gleichen Weg die Ko-Immunopräzipitation von HA-getagtem Parkin mit überexprimiertem HOIP untersucht. Als Kontrollen für die Spezifität der Präzipitation dienten die gleichen Proben wie im vorherigen Versuch. Sowohl nach Präzipitation von PACRG als auch nach Präzipitation von Parkin kann HOIP im Immunoblot detektiert werden,

während die Kontrollen nur schwache Banden zeigen. Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung der Interaktion von PACRG und Parkin mit HOIP (Abb. 2.17 B).

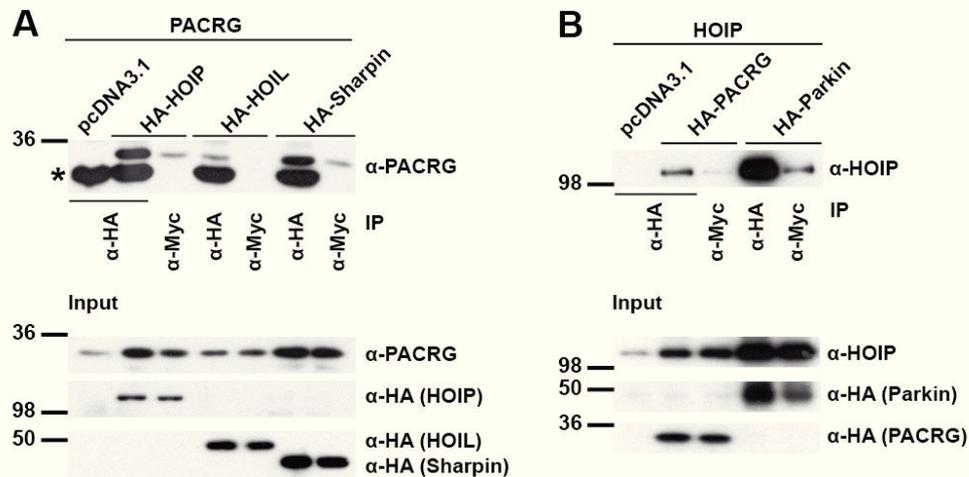


Abb. 2.17: PACRG interagiert mit den Komponenten des LUBAC, HOIP, HOIL-1L und Sharpin.

A) HEK293T-Zellen wurden mit PACRG und den HA-getagten Komponenten des LUBAC, HOIP, HOIL-1L oder Sharpin transfiziert. Die HA-getagten Proteine wurden mittels anti-HA-gekoppelten Agarose-Beads aus dem Zelllysate immunpräzipitiert. Die Ko-Immunopräzipitation von PACRG mit den HA-getagten Proteinen wurde mittels Immunoblot gegen PACRG untersucht. **B)** HEK293T-Zellen wurden mit HA-getagtem PACRG und Parkin sowie mit HOIP transfiziert. HA-PACRG und Parkin wurden mittels anti-HA-gekoppelten Agarose-Beads aus dem Zelllysate immunpräzipitiert. Die Ko-Immunopräzipitation von HOIP mit HA-getagtem PACRG und Parkin wurde mittels Immunoblot gegen HOIP untersucht. **A und B)** Als Kontrollen für die Spezifität der Immunpräzipitation wurden Zelllysate verwendet in denen kein HA-getagtes Protein enthalten war, sowie Zelllysate in denen mit einem anti-Myc Antikörper präzipitiert worden ist. Die leichten Ketten der für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper wurden im Immunoblot mit * markiert.

2.8.2. PACRG interagiert mit Parkin

Im nächsten Schritt wurde eine mögliche Interaktion von PACRG mit Parkin mittels Ko-Immunopräzipitation untersucht. In HEK293T-Zellen wurden HA-getagtes PACRG und ungetagtes Parkin überexprimiert. Die Immunpräzipitation wurde wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben, mit den gleichen Kontrollen durchgeführt. Im Immunoblot der Präzipitate wird nach Präzipitation von HA-getagtem PACRG Parkin detektiert, während in den Kontrollen kein Parkin-Signal sichtbar ist. Somit kann geschlussfolgert werden, dass PACRG auch mit Parkin interagiert (Abb. 2.18).

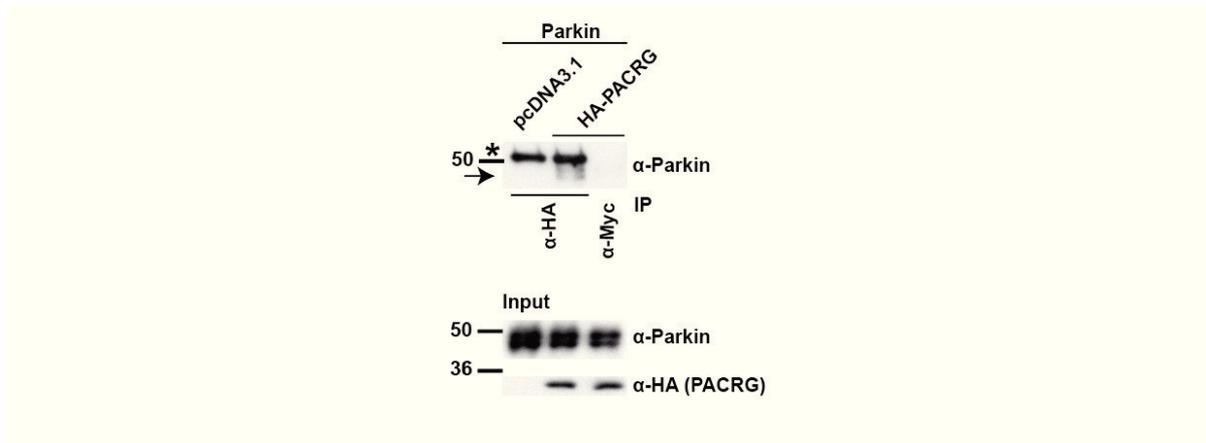


Abb. 2.18: PACRG interagiert mit Parkin.

HEK293T-Zellen wurden mit HA-getagtem PACRG und mit Parkin transfiziert. PACRG wurde mittels anti-HA-gekoppelten Agarose-*Beads* aus dem Zelllysate immunpräzipitiert. Die Ko-Immunopräzipitation von Parkin mit dem HA-getagten PACRG wurde im Präzipitat mittels Immunoblot gegen Parkin untersucht, welches als Doppelbande unterhalb der schweren IgG-Ketten des für die Präzipitation verwendeten Antikörpers erscheint. Als Kontrollen für die Spezifität der Immunpräzipitation wurden Zelllysate verwendet in denen kein HA-getagtes Protein enthalten war, sowie Zelllysate in denen mit einem anti-Myc Antikörper präzipitiert worden ist. Die schweren Ketten der für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper wurden im Immunoblot mit * markiert. Der Pfeil markiert die Laufhöhe der Parkin-Doppelbanden.

2.8.3. PACRG interagiert nicht mit NEMO

Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde die Interaktion zwischen PACRG und NEMO analysiert. In HEK293T-Zellen überexprimiertes HA-getagtes PACRG oder HA-getagtes Parkin wurde wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben präzipitiert und im Präzipitat überexprimiertes FLAG-getagtes NEMO mittels eines anti-FLAG Antikörpers im Immunoblot detektiert. Für die Immunpräzipitation von Parkin kann eine Ko-Präzipitation mit NEMO festgestellt werden, während nach PACRG-Präzipitation keine NEMO-Bande detektiert werden konnte. Die beiden Kontroll-Präzipitationen zeigen ebenfalls keine NEMO-Banden im Immunoblot. In diesem Experiment kann die bereits beschriebene Interaktion von Parkin mit NEMO (Müller-Rischart et al., 2013) bestätigt werden. Eine Interaktion zwischen PACRG und NEMO kann jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 2.19).

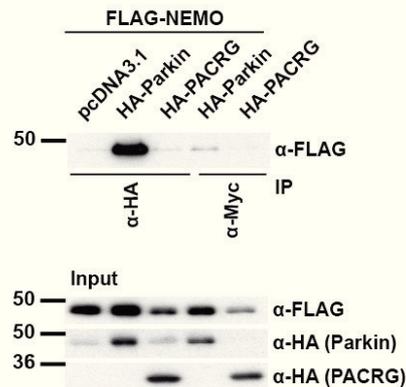


Abb. 2.19: PACRG interagiert nicht mit NEMO.

HEK293T-Zellen wurden mit HA-getagtem PACRG und FLAG-getagtem NEMO transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und PACRG mittels anti-HA-gekoppelten Agarose-Beads immunpräzipitiert. Die Ko-Immunopräzipitation von NEMO mit dem HA-getagten PACRG wurde im Präzipitat mittels Immunoblot gegen den FLAG-Tag untersucht. Als Kontrollen für die Spezifität der Immunpräzipitation wurden Zelllysate verwendet in denen kein HA-getagtes Protein enthalten war, sowie Zelllysate in denen mit einem anti-Myc Antikörper präzipitiert worden ist.

2.8.4. PACRG ist Teil des LUBAC

Es konnte also gezeigt werden, dass PACRG mit den einzelnen Komponenten des LUBAC interagieren kann. Im nächsten Schritt wurde nun analysiert, ob PACRG selbst ein Teil des Komplexes ist. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit PACRG transfiziert, nicht denaturierend in einem hypotonen Puffer lysiert und die Proteine des Lysats über eine Sephadex 200H Gelfiltrations-Säule mit Hilfe eines Äkta Chromatografie-Systems der Größe nach aufgetrennt. Es wurden vom Eluat Fraktionen gesammelt und mittels Immunoblot auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht. Zur Kalibrierung der Säule wurde im Vorhinein ein Gelfiltrations-Lauf mit Markerproteinen definierter Größe durchgeführt. Der LUBAC besitzt eine Größe von ca. 600 kDa. Da die Säule Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 600 kDa auftrennt wird der LUBAC direkt nach dem Todvolumen von der Säule eluiert. In den vier auf das Todvolumen folgenden Fraktionen sind die Proteine HOIP, Sharpin und PACRG zusammen nachweisbar. HOIL-1L ist aufgrund der niedrigen Antikörpersensitivität in diesem Experiment nicht detektierbar. Die ungebundenen Proteine HOIP, Sharpin und PACRG sind in späteren Fraktionen des Eluats detektierbar (Abb. 2.20). Da PACRG-Banden im Immunoblot in den selben Fraktionen erscheinen wie HOIP- und Sharpin-Banden, bei ca. 600 kDa, kann davon ausgegangen werden, dass PACRG selbst ein Teil des LUBAC ist.

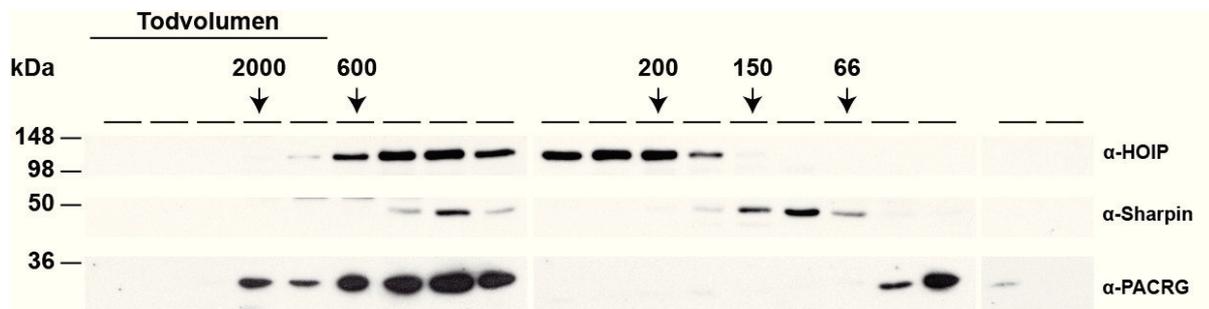


Abb. 2.20: PACRG ist Teil des LUBAC.

HEK293T-Zellen wurden mit PACRG transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine des Lysats mittels Gelfiltration der Größe nach in Fraktionen aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Immunoblot auf die Verteilung von HOIP, Sharpin und PACRG untersucht.

2.9. PACRG beeinflusst den NF- κ B-Signalweg über die Aktivierung von linearer Ubiquitinierung

Es wurde bisher gezeigt, dass PACRG in Abhängigkeit der Funktion des kanonischen NF- κ B-Signalweges Zellen gegenüber verschiedenen Stressbedingungen vor Apoptose schützen kann, dass diese Protektivität abhängig von der linearen Ubiquitinierung von NEMO ist und dass PACRG ein Teil des Komplexes ist, der diese lineare Ubiquitinierung vermittelt. Die nun noch zu klärende Frage ist, ob PACRG den NF- κ B-Signalweg über eine Funktion bei der linearen Ubiquitinierung von NEMO direkt aktivieren kann, oder ob der Effekt auf diesen Signalweg indirekter Natur ist.

2.9.1. Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges über den LUBAC wird durch PACRG zusätzlich verstärkt

Im Folgenden wurde analysiert, ob PACRG die Aktivität des LUBAC verstärken kann. Da der aktive LUBAC über lineare Ubiquitinierung von NEMO den NF- κ B-Signalweg aktiviert, wurde für diese Analyse erneut von dem in Kapitel 2.7.2 bereits beschriebenen NF- κ B-Reportergen-Assay Gebrauch gemacht. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit PACRG und den LUBAC-Komponenten sowie dem beschriebenen NF- κ B-Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfiziert. Die Auswertung erfolgte wie bereits in Kapitel 2.7.2 beschrieben. Die Expression von HOIP zusammen mit HOIL-1L bzw. von HOIP in Kombination mit Sharpin erhöht die Luciferase-Aktivität auf das 35- bis 40-fache im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontroll-Zellen. Durch Überexpression von PACRG mit den jeweiligen Kombinationen der LUBAC-Komponenten kann die Luciferase-Aktivität zusätzlich signifikant gesteigert werden (Abb. 2.21 A). PACRG erhöht also die Aktivität des

LUBAC, die in diesem Versuch über eine gesteigerte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges sichtbar gemacht wurde. Die Überexpression von PACRG beeinflusst die Aktivität, sowohl des aus HOIP und HOIL-1L, als auch des aus HOIP und Sharpin zusammengesetzten LUBAC. Das Protein wirkt also nicht spezifisch auf die Aktivität nur eines der beiden Komplexe.

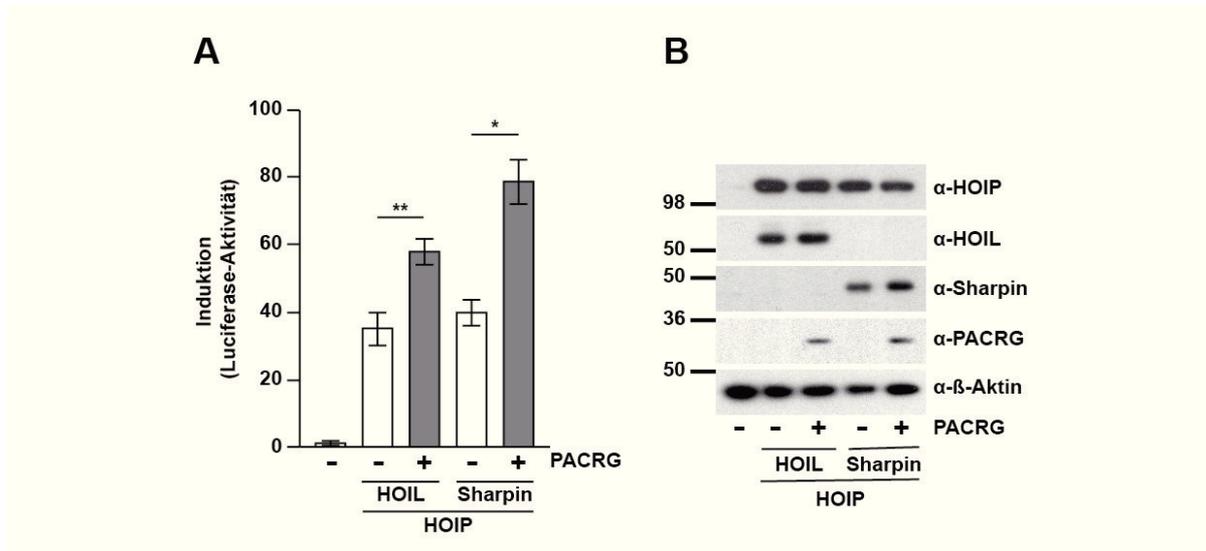


Abb. 2.21: PACRG-Überexpression erhöht die durch Überexpression der LUBAC-Komponenten ausgelöste Aktivierung des NF- κ B-Signalweges.

HEK293T-Zellen wurden mit PACRG und den Komponenten des LUBAC sowie dem NF- κ B-Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfiziert. **A)** Die Aktivität der Luciferase im Zelllysate wurde luminometrisch gemessen und auf die Aktivität in Kontroll-transfizierten Zellen normalisiert. Die Lumineszenz in Kontroll-transfizierten Zellen wurde auf eins gesetzt. Die Daten repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei bis fünf unabhängigen Experimenten. Die Messung erfolgte in Duplikaten. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. **B)** zeigt die repräsentativen Proteinexpressions-Mengen eines der in **A)** quantifizierten Experimente.

2.9.2. Weder PACRG noch Parkin können HOIL-1L oder Sharpin im LUBAC ersetzen

Wie bereits erwähnt ist HOIP die katalytische Untereinheit des LUBAC, welche die lineare Ubiquitinierung der Proteine vermittelt. Die Aktivierung von HOIP erfordert allerdings die Bindung von HOIL-1L oder Sharpin an das Protein. Da bereits gezeigt werden konnte, dass PACRG ebenfalls an HOIP binden kann und dass es die Aktivität des LUBAC erhöht, wurde nun mittels des NF- κ B-Luciferase-Reportergen-Assays überprüft, ob PACRG allein die beiden LUBAC Komponenten HOIL-1L und Sharpin im Komplex ersetzen kann und allein zur vollständigen Aktivierung von HOIP führt. Hierfür wurde in mit dem NF- κ B-Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfizierten HEK293T-Zellen PACRG ohne und zusammen mit HOIP und zum Vergleich auch Parkin mit und ohne HOIP überexprimiert. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.7.2

beschrieben. Die luminometrisch gemessene Luciferase-Aktivität ist wie in Abb. 2.14 bereits gezeigt durch Überexpression von PACRG oder Parkin ca. zweifach erhöht im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen. Die alleinige Expression von HOIP führt zu einer ähnlichen Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Die gemeinsame Expression von PACRG mit HOIP oder von Parkin mit HOIP kann die Aktivität der Luciferase nochmals steigern auf das ca. 3,5-fache der Kontroll-transfizierten Zellen (Abb. 2.22 A). Da allerdings in Abb. 2.21 gezeigt werden konnte, dass eine gemeinsame Überexpression von HOIL-1L zusammen mit HOIP oder Sharpin zusammen mit HOIP die Luciferase-Aktivität in den Zellen auf das 35 – 40-fache der Kontroll-transfizierten Zellen erhöht, können offensichtlich PACRG oder Parkin allein in Kombination mit HOIP nicht zur vollständigen Aktivierung von HOIP führen. Daraus kann geschlossen werden, dass weder PACRG noch Parkin in der Lage sind HOIL-1L oder Sharpin im LUBAC zu ersetzen.

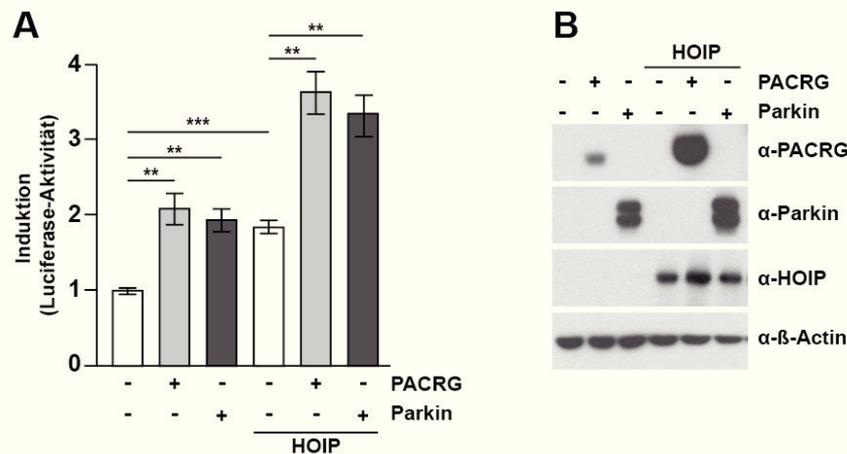


Abb. 2.22: PACRG- oder Parkin-Überexpression verstärken die Aktivität von HOIP.

HEK293T-Zellen wurden mit PACRG oder Parkin ohne und zusammen mit HOIP sowie dem NF-κB-Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfiziert. **A**) Die Aktivität der Luciferase im Zelllysate wurde luminometrisch gemessen und auf die Aktivität in Kontroll-transfizierten Zellen normalisiert. Die Lumineszenz in Kontroll-transfizierten Zellen wurde auf eins gesetzt. Die Daten repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. **B**) zeigt die repräsentativen Proteinexpressionsmengen eines der in **A**) quantifizierten Experimente.

2.9.3. PACRG-Überexpression induziert die lineare Ubiquitinierung von Proteinen

Der Einfluss von PACRG auf die Aktivität des LUBAC wurde über einen zweiten Versuchsansatz näher untersucht. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit PACRG transfiziert und zur Stimulation des NF-κB-Signalweges mit TNF-α (50 ng/μL; 15 min) behandelt. Die Zellen wurden anschließend

denaturierend lysiert und mit Hilfe einer rekombinanten UBAN-(*Ubiquitin binding in ABIN and NEMO*)-Domäne spezifisch linear ubiquitinierte Proteine präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels Immunoblot analysiert und der Gehalt an linear ubiquitinierten Proteinen mit Hilfe eines anti-Ubiquitin Antikörpers detektiert. Die Stärke der spezifischen linearen Ubiquitinierung von NEMO wurde nach der Präzipitation linear ubiquitiniertes Proteine im Immunoblot mittels eines anti-NEMO Antikörpers detektiert. In PACRG-transfizierten Zellen kann nach der Präzipitation ein stärkeres Ubiquitin-Signal im Allgemeinen, sowie ein stärkeres Signal für linear ubiquitiniertes NEMO im Speziellen detektiert werden (Abb. 2.23). Diese verstärkte lineare Ubiquitinierung lässt auf eine erhöhte Aktivität des LUBAC unter PACRG-Überexpression schließen.

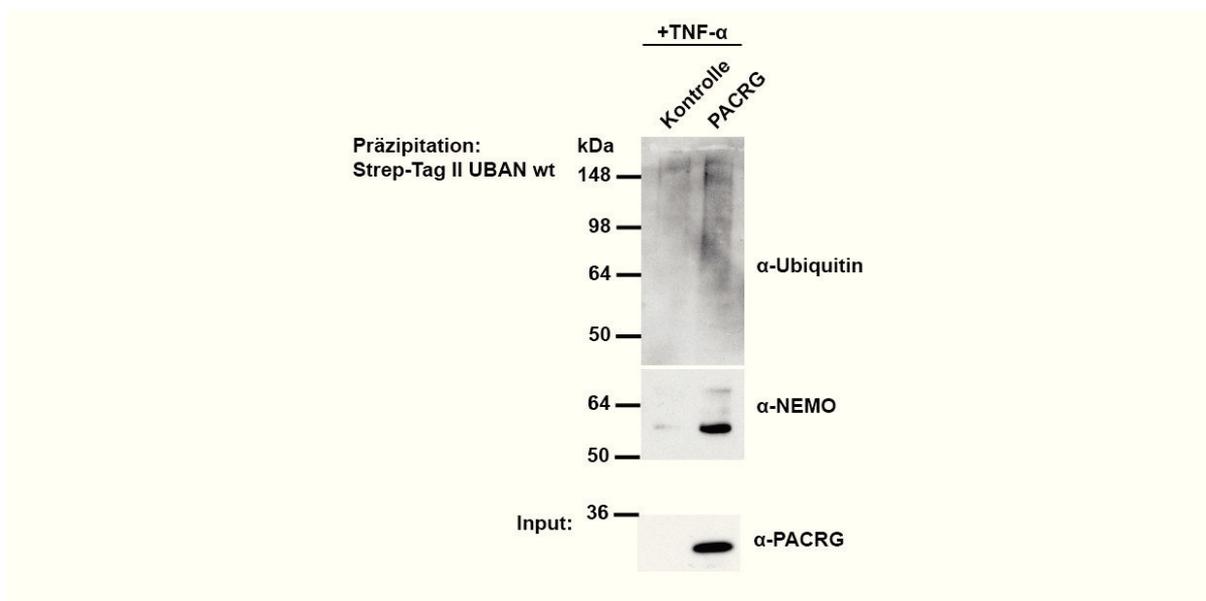


Abb. 2.23: Überexpression von PACRG verstärkt die durch TNF- α induzierte lineare Ubiquitinierung von Proteinen.

HEK293T-Zellen wurden mit PACRG transfiziert, zur Stimulation des NF- κ B-Signalweges für 15 min mit 50 ng/ μ L TNF- α behandelt und aus dem Zelllysate mit Hilfe der rekombinanten UBAN-Domäne spezifisch Proteine mit linearen Ubiquitin-Ketten präzipitiert. Die Gesamtheit der präzipitierten linear ubiquitinierten Proteine wurde im Immunoblot mit Hilfe eines anti-Ubiquitin Antikörpers detektiert. Die Stärke der linearen Ubiquitinierung von NEMO wurde nach der Präzipitation linear ubiquitiniertes Proteine im Immunoblot mit Hilfe eines anti-NEMO Antikörpers detektiert.

Um die Aktivität des LUBAC in seinen unterschiedlichen Zusammensetzungen näher zu untersuchen, wurden in HEK293T-Zellen die Komponenten des Komplexes mit und ohne PACRG überexprimiert und, wie zuvor beschrieben, nach Präzipitation linear ubiquitiniertes Proteine die Stärke der linearen Ubiquitinierung in den Zellen mittels Immunoblot der Präzipitate analysiert. Durch Überexpression von HOIP zusammen mit HOIL-1L sind linear ubiquitinierte Proteine im Immunoblot detektierbar. Diese Signale sind nach Koexpression der beiden LUBAC-Komponenten zusammen mit PACRG deutlich verstärkt. Unter Überexpression von HOIP zusammen mit Sharpin

ist ein ähnlicher Effekt der PACRG-Überexpression detektierbar (Abb. 2.24). PACRG verstärkt also, wie bereits mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Gen-Assays gezeigt (Abb. 2.21), die Aktivität des LUBAC und damit die Bildung linearer Ubiquitin-Ketten in der Zelle. Diese Funktion ist unabhängig davon, ob HOIP über die Bindung von HOIL-1L oder die Bindung von Sharpin aktiviert wird. Die Aktivierung des LUBAC bestehend aus HOIP und HOIL-1L durch PACRG-Überexpression erscheint allerdings in diesem Versuch deutlich stärker, als die Aktivierung des LUBAC bestehend aus HOIP und Sharpin. Im vorhergehenden Luciferase-Reporter-Gen-Assay unter ähnlichen Bedingungen konnte allerdings eher der gegenteilige Effekt detektiert werden (Abb. 2.21). Möglicherweise sind diese Unterschiede durch Schwankungen in der Expressionsstärke der jeweiligen Proteine zu begründen.

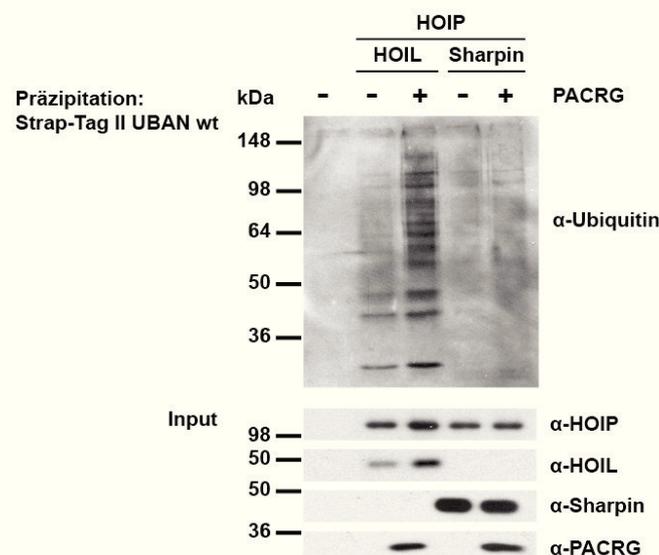


Abb. 2.24: PACRG-Überexpression verstärkt die durch den LUBAC vermittelte lineare Ubiquitinierung von Proteinen.

HEK293T-Zellen wurden mit PACRG und unterschiedlichen Kombinationen der LUBAC-Komponenten transfiziert. Aus dem Zelllysate wurden mit Hilfe der rekombinanten UBAN-Domäne spezifisch Proteine mit linearen Ubiquitin-Ketten präzipitiert. Die Gesamtheit der präzipitierten linear ubiquitinierten Proteine wurde im Immunoblot mit Hilfe eines anti-Ubiquitin Antikörpers detektiert.

2.10. Der Mechanismus der LUBAC-Aktivierung durch PACRG

Bisher konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass PACRG ein zytoprotektives Potential besitzt, welches über die Aktivierung des LUBAC und der daraus resultierenden Aktivierung des NF- κ B-Signalweges vermittelt wird. Es bleibt nun noch die Frage offen, durch welchen molekularen Mechanismus PACRG den LUBAC aktiviert. In Abb. 2.22 wurde nachgewiesen, dass

PACRG zwar die Aktivität von HOIP steigern kann, aber dass es nicht in der Lage ist, eine vollständige Aktivierung der HOIP-E3-Ligase-Aktivität auszulösen. Es kann also HOIL-1L oder Sharpin im LUBAC nicht ersetzen. Wie also beeinflusst PACRG den LUBAC?

2.10.1. PACRG-Überexpression verändert nicht die Menge und die Zusammensetzung des aus HOIP und Sharpin aufgebauten LUBAC

Es wäre denkbar, dass PACRG die Menge oder die Zusammensetzung des LUBAC verändert und eventuell die Interaktion von HOIP mit Sharpin oder HOIL-1L erhöht um so die Aktivität des Komplexes zu steigern. Um dies zu untersuchen wurden Gelfiltrations-Assays von Zelllysaten aus PACRG-überexprimierenden und Kontroll-transfizierten Zellen wie unter Kapitel 2.8.4 beschrieben durchgeführt. Die Fraktionen 20 – 23 der beiden Eluate wurden mittels Immunoblot analysiert und miteinander verglichen. Diese Fraktionen enthielten laut einem Kalibrations-Experiment Proteine und Protein-Komplexe mit einer molekularen Masse zwischen 600 und 400 kDA. In vorhergehenden Experimenten konnte der LUBAC immer in diesen Fraktionen detektiert werden. Auch in diesem Versuch sind sowohl HOIP als auch Sharpin in den Fraktionen nachweisbar. Im Eluat des Zelllysats aus PACRG-überexprimierenden Zellen konnte zusätzlich auch PACRG als Teil des LUBAC in diesen Fraktionen detektiert werden. Es konnte allerdings kein wesentlicher Unterschied in der Stärke der HOIP- und Sharpin-Banden zwischen Eluaten Kontroll-transfizierter Zellen und PACRG-transfizierter Zellen festgestellt werden (Abb. 2.25 A). Es erscheint also, dass die Überexpression von PACRG keinen Einfluss auf die Komplex-Menge oder die Zusammensetzung des aus HOIP und Sharpin aufgebauten LUBAC hat. In diesem Versuchsaufbau wurde allerdings der LUBAC nur zu einem spezifischen Zeitpunkt untersucht. Eine Aussage über die Kinetik der Komplexbildung kann hier nicht getroffen werden. Es wäre möglich, dass PACRG einen Einfluss auf diese Kinetik hat. Um dies festzustellen müsste ein anderer Versuchsaufbau gewählt werden und z.B. die Bildung und Zusammensetzung des Komplexes zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation des NF- κ B-Signalweges analysiert werden. Da endogenes HOIL-1L in diesem Versuch nicht detektiert werden kann, kann keine Aussage über die Zusammensetzung des aus HOIP und HOIL-1L gebildeten LUBAC gemacht werden.

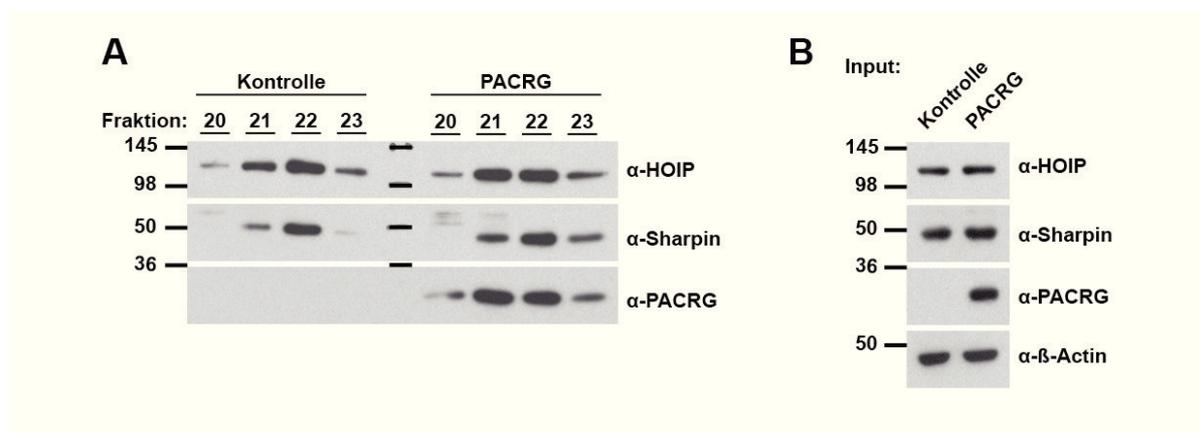


Abb. 2.25: PACRG-Überexpression beeinflusst nicht die Menge oder die Zusammensetzung des aus HOIP und Sharpin aufgebauten LUBAC.

HEK293T-Zellen wurden mit Leervektor oder mit PACRG transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine des Lysats mittels Gelfiltration der Größe nach in Fraktionen aufgetrennt. Die Fraktionen 20 – 23 der beiden Lysate wurden mittels Immunoblot auf die Verteilung von HOIP, Sharpin und PACRG untersucht **A**). **B**) zeigt die Input Proteinmengen der für die Gelfiltration eingesetzten Lysate.

2.10.2. PACRG-Überexpression beeinflusst nicht die Stabilität von überexprimiertem HOIP

Nachdem eine Beeinflussung der LUBAC-Menge durch PACRG im vorherigen Versuch nicht nachgewiesen werden konnte, wäre ein zweiter möglicher Mechanismus für die Aktivierung des LUBAC durch PACRG die Beeinflussung der Stabilität der LUBAC-Einzelkomponenten. In verschiedenen Experimenten der gesamten Arbeit konnte häufig beobachtet werden, dass in HOIP-überexprimierenden Zellen die Expression von transfiziertem PACRG deutlich verstärkt war im Vergleich zur alleinigen Überexpression von PACRG. Gleichzeitig wurde durch PACRG-Überexpression auch die Expression von transfiziertem HOIP deutlich verstärkt im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Es konnten allerdings keine veränderten Mengen von endogenem HOIP nach PACRG-Überexpression detektiert werden. Der Effekt auf die Expression von transfiziertem HOIP konnte durch Überexpression von Parkin nicht beobachtet werden (Abb. 2.26 A). Es wurde nun untersucht, ob sich PACRG und HOIP gegenseitig in ihrer Stabilität beeinflussen können und dadurch die beobachteten erhöhten Proteinmengen bedingt sind. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit HA-getagtem PACRG und HA-getagtem HOIP transfiziert und in einem sogenannten *Pulse/Chase*-Versuch neu synthetisierte Proteine durch Einbau von schweren Schwefel-Isotopen, radioaktiv markiert. Anschließend wurden die HA-getagten Proteine immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und das radioaktive Signal und damit die in der Zelle während den unterschiedlichen *Chase*-Zeiten, neu gebildeten HA-getagten Proteine durch Auflegen eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht. Je länger

2.10.3. PACRG beeinflusst die Auto-Inhibierung von HOIP

PACRG beeinflusst scheinbar weder die Stabilität des LUBAC als Komplex noch die Stabilität von HOIP. Neben der Beeinflussung der Kinetik der Komplexbildung, die bisher nicht untersucht wurde, ist ein dritter möglicher Mechanismus der Aktivierung des LUBAC durch PACRG die Beeinflussung der Auto-Inhibierung von HOIP. Die katalytische Einheit des LUBAC liegt unter basalen Bedingungen in einem auto-inhibierten Zustand vor, in dem seine E3-Ligase-Aktivität gering ist. Zur Aktivierung von HOIP ist die Bindung von HOIL-1L oder Sharpin an seinen N-Terminus notwendig. Die durch diese Bindung ausgelöste Konformationsänderung gibt die RING2- und die LDD-Domäne von HOIP frei, sodass die E3-Ligase aktiv werden kann um Proteine linear zu ubiquitinieren. Es wurde in Kapitel 2.8.1 gezeigt, dass PACRG an HOIP binden kann. Möglicherweise hat auch diese Bindung ebenso wie die Bindung von HOIL-1L oder Sharpin Einfluss auf die Konformation von HOIP und kann durch Aufhebung der Auto-Inhibierung die E3-Ligase-Aktivität von HOIP erhöhen. Um diesen möglichen Mechanismus zu untersuchen wurde ein Antikörper zu Hilfe genommen, der an die LDD-Domäne von HOIP bindet (Abb. 2.27 A). Unter basalen Bedingungen, wenn HOIP auto-inhibiert vorliegt, sollte diese Domäne für den Antikörper schlechter zugänglich sein, als unter aktivierenden Bedingungen. Mit diesem Antikörper wurde endogenes HOIP unter nicht denaturierenden Bedingungen immunpräzipitiert und die Präzipitate mittels Immunoblot analysiert. In verschiedenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PACRG gegenüber STS-induziertem Stress zytoprotektiv wirken kann und dass es unter TNF- α -Stimulation den NF- κ B-Signalweg aktiviert. Aus diesem Grund wurden für den hier durchgeführten Versuch diese beiden Stressoren für die Untersuchung des Einflusses von PACRG auf die Auto-Inhibierung von HOIP ausgewählt. PACRG-überexprimierende Zellen wurden 10 min mit 1 μ M STS oder mit 50 ng/mL TNF- α behandelt, lysiert und endogenes HOIP mit Hilfe des beschriebenen anti-HOIP Antikörpers immunpräzipitiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitation wurde zusätzlich in einem Zellysate mit einem anti-Myc Antikörper immunpräzipitiert. In Lysaten von PACRG-überexprimierenden Zellen konnte im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach STS-induziertem Stress oder TNF- α -Behandlung ein deutlich stärkeres HOIP Signal im Immunoblot detektiert werden (Abb. 2.27 B). Es kann daraus geschlossen werden, dass unter diesen Stressbedingungen unter PACRG-Überexpression mehr HOIP immunpräzipitiert werden kann als unter Basalbedingungen. Diese Schlussfolgerung passt zu der Annahme, dass die HOIP-Binderegion des für die Immunpräzipitation verwendete Antikörpers unter Stressbedingungen besser für den Antikörper zugänglich ist, als unter Basalbedingungen. Der Antikörper kann also für die Detektion der HOIP-Auto-Inhibierung durch Immunpräzipitation verwendet werden. Zusätzlich zu endogenem HOIP wurde nach der HOIP-Präzipitation auch PACRG im Präzipitat detektiert. Die Mengen an mit HOIP ko-präzipitierten PACRG korrelieren mit den Mengen an präzipitiertem HOIP (Abb. 2.27 B).

In einem weiteren Versuch wurde analysiert, ob die Überexpression von PACRG die Aufhebung der HOIP-Auto-Inhibierung unter Stressbedingungen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen positiv beeinflussen kann. Hierfür wurden Zellen mit PACRG oder dem Leervektor transfiziert. Nach Behandlung der Zellen mit STS (1 μ M; 10 min) wurden die Zellen lysiert und endogenes HOIP mittels des beschriebenen anti-HOIP Antikörpers immunpräzipitiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitation wurde auch hier in zwei Zelllysaten mit einem anti-Myc Antikörper präzipitiert. In PACRG-überexprimierenden Zellen kann wie bereits in Abb. 2.27 B gezeigt eine Verstärkung des HOIP Signals nach STS-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Diese Verstärkung ist in Leervektor-transfizierten Kontroll-Zellen durch die Behandlung mit STS nicht detektierbar (Abb. 2.27 C). Die Input-Proteinmengen von HOIP sind in allen Proben gleichmäßig und können so nicht die unterschiedlich starke Immunpräzipitation von HOIP erklären. Die Überexpression von PACRG verstärkt also die Immunpräzipitation von HOIP unter STS-Stress. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass PACRG in der Tat die Auto-Inhibierung von HOIP verringert und vermutlich darüber die Aktivität des LUBAC erhöht.

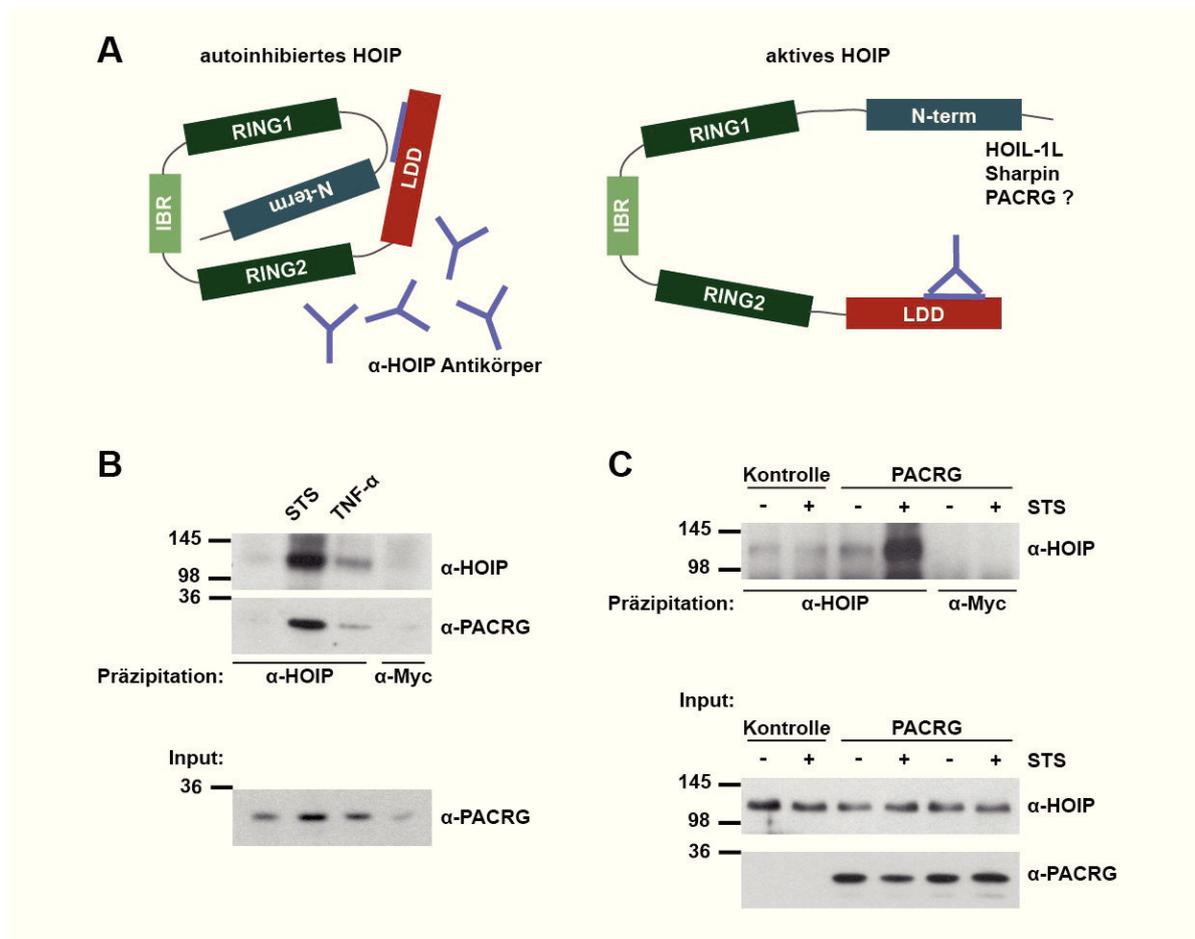


Abb. 2.27: Die PACRG-Überexpression verringert die Auto-Inhibierung von HOIP.

HEK293T-Zellen wurden transfiziert und nach der Behandlung mit verschiedenen Stressoren mit 1 % Triton X 100 lysiert. Endogenes HOIP wurde mittels eines an die HOIP-LDD-Domäne bindenden anti-HOIP Antikörpers immunpräzipitiert **A**). **B**) Die Zellen wurden mit PACRG transfiziert, mit 1 μ M STS oder mit 50 ng/mL TNF- α für 10 min behandelt, lysiert und HOIP mittels des beschriebenen Antikörpers immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde mit Hilfe eines anti-PACRG und eines anti-HOIP Antikörpers im Immunoblot analysiert. Die Input-Proteinmengen von PACRG zeigen eine gleichmäßige Expression von PACRG in allen Proben. **C**) Die Zellen wurden mit Leervektor oder PACRG transfiziert, mit 1 μ M STS für 10 min behandelt, lysiert und HOIP mittels des beschriebenen Antikörpers immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde mit Hilfe eines anti-HOIP Antikörpers im Immunoblot analysiert. Die Input-Proteinmengen von HOIP zeigen eine gleichmäßige Expression von HOIP in allen Proben.

3. DISKUSSION

3.1. Die Bedeutung der Koregulation von PACRG und Parkin

Im Jahr 2003 entdeckten West *et al.*, dass sich das Parkinsonismus-assoziierte Gen *PARK2* einen bidirektionalen Promotor mit einem bislang unbekanntem Transkript teilt, welches aufgrund dieser Koregulation *PACRG* (*Parkin koreguliertes Gen*) genannte wurde. Computer-basierte Analysen des humanen Genoms ergaben, dass mehr als 10 % der Gene „Kopf an Kopf“ auf entgegengesetzten DNA-Strängen liegen und über weniger als 1000 Bp voneinander getrennt sind (Adachi and Lieber, 2002; Trinklein et al., 2004). Der kurze Abstand zwischen den Transkriptions-Startpunkten dieser Gene deutet auf einen gemeinsamen Promotor und somit auf eine Koregulation der Gene hin.

Die Tatsache, dass PACRG und Parkin koreguliert sind, stellt für die funktionelle Charakterisierung von PACRG einen interessanten Ansatzpunkt dar. Bis heute ist über die Funktion des Proteins, bis auf einige Hinweise auf eine Funktion bei der Organisation und Stabilisierung von Mikrotubuli und Mikrotubuli-enthaltenden Strukturen (Bennett et al., 1971; Dawe et al., 2005; Lorenzetti et al., 2004; Wilson et al., 2010), nur wenig bekannt. Zwar wurde auch für Parkin ein funktioneller Zusammenhang mit der Stabilisierung von Mikrotubuli beschrieben (Ren et al., 2003; Yang et al., 2005), weitaus intensiver wurde allerdings die zytoprotektive Funktion von Parkin (Henn et al., 2007; Müller-Rischart et al., 2013; Shin et al., 2011) und seine Rolle bei der Regulation der mitochondrialen Morphologie (Lutz et al., 2009) und der Mitophagie (Narendra et al., 2008, 2010) untersucht. Es ist daher naheliegend, auch die Bedeutung von PACRG für diese zellulären Prozesse zu untersuchen und mit den bereits bekannten Funktionen von Parkin zu vergleichen. Die funktionelle Charakterisierung von PACRG kann so einen interessanten Beitrag zur Aufklärung der genauen molekularen Mechanismen liefern, die diesen Prozessen zugrunde liegen. Möglicherweise bietet dies auch weitere Einblicke in die mechanistischen Ursachen des Absterbens dopaminerger Neuronen bei der Parkinson-Erkrankung.

3.2. Charakterisierung von PACRG

Zur funktionellen Charakterisierung eines Proteins sind die Analyse der biochemischen Eigenschaften des Proteins sowie die Untersuchung seiner subzellulären Lokalisation essentiell. Das subzelluläre Kompartiment in dem das Protein aktiv ist grenzt bereits mögliche Funktionen und mögliche Interaktionspartner ein. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Brody et al., 2008) wurde in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass PACRG zytosolisch lokalisiert ist (Abb. 2.1). Die in der Immunfluoreszenz-Färbung detektierten PACRG Aggregate, sowie der Nachweis von

PACRG in der Detergenz-unlöslichen Fraktion des Löslichkeits-Assays (Abb. 2.2) legen die Vermutung nahe, dass das Protein aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften zur Aggregation neigt. Das Protein konnte in früheren Studien in Lewy Körperchen von Parkinson-Patienten und in glialen zytoplasmatischen Einschlüssen von Patienten mit Multipler Systematrophie und Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Imai et al., 2003; Taylor et al., 2007). Möglicherweise findet sich PACRG aufgrund seiner Neigung zur Aggregation in solchen pathologischen Einschlüssen.

3.3. Gemeinsame Eigenschaften von PACRG und Parkin

In der vorliegenden Arbeit konnten viele gemeinsame Eigenschaften und Funktionen von PACRG und Parkin nachgewiesen werden. Die Transkription beider Gene wird unter verschiedenen Stressbedingungen in ähnlichem Ausmaß zeit- und dosisabhängig hoch reguliert (Abb. 2.4). Die unter den hier untersuchten Stressbedingungen festgestellte gleichmäßige Regulation der Transkription von Parkin und PACRG ist bei der Regulation von Genen über einen gemeinsamen bidirektionalen Promotor zwar zu erwarten, aber doch nicht selbstverständlich. Gene mit bidirektionalem Promotor werden in den meisten Fällen koexprimiert. Sie können aber in wenigen Ausnahmen auch anti-reguliert sein, sodass immer nur eines der beiden Gene exprimiert werden kann (Trinklein et al., 2004). Die Koregulation von Genen ist eine sehr effektive Form der Genregulation, da hierdurch die Expression der beiden koregulierten Gene koordiniert erfolgen kann. Diese koordinierte Expression ist unter anderem aus folgenden Gründen äußerst sinnvoll. Über die Koregulation kann ein stöchiometrisches Verhältnis der Expression der Proteine erreicht werden, was z.B. für die Expression von Histonen eine wichtige Rolle spielt (Ahn and Gruen, 1999; Albig et al., 1997; Maxson et al., 1983). Außerdem kann über einen bidirektionalen Promotor die gleichzeitige Expression von Genen als Antwort auf einen Zellstimulus aktiviert werden, wie das z.B. für Hitzeschockproteine (Hansen et al., 2003) oder DNA-Reparatur Enzyme (Adachi and Lieber, 2002) der Fall ist. Die Koregulation von Genen spielt außerdem für Proteine, die im gleichen Signalweg agieren (Momota et al., 1998; Schmidt et al., 1993; Sugimoto et al., 1994) und für Gene, deren Expressions-Zeitpunkt streng reguliert werden muss eine wichtige Rolle. Dazu gehören z.B. Gene, die den Zellzyklus regulieren (Guarguaglini et al., 1997). Neben der ähnlichen Genregulation von *PACRG* und *Parkin* unter den hier untersuchten Bedingungen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch auf funktioneller Ebene Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen. So konnte hier gezeigt werden, dass PACRG, ebenso wie bereits für Parkin bekannt (Jiang et al., 2004; Müller-Rischart et al., 2013; Petrucelli et al., 2002; Staropoli et al., 2003), ein starkes zytoprotektives Potential besitzt. Die Überexpression von PACRG reduziert die Apoptose-Rate von Zellen unter verschiedenen Stressbedingungen (Abb. 2.5 und 2.6), während

der *Knockdown* die Zellen anfälliger gegenüber Stress werden lässt (Abb. 2.7). Um dem zugrundeliegenden molekularen Mechanismus dieser protektiven Funktion näher zu kommen, stellte sich zunächst die Frage, ob PACRG eigenständig protektiv wirken kann, oder ob es für die Vermittlung dieser Aktivität die Anwesenheit von Parkin benötigt. Da die Überexpression von PACRG auch in Parkin-defizienten Zellen die Apoptose-Rate nach Toxin-Behandlung reduziert (Abb. 2.8), kann davon ausgegangen werden, dass PACRG unabhängig von der Parkin-Aktivität protektiv wirken kann. Die Frage nach den zugrundeliegenden Signalwegen, die die Zytoprotektivität von PACRG vermittelt, und ob es sich hierbei um die selben Signalwege handelt, die auch die Protektivität von Parkin vermitteln, wird in Kapitel 3.6 und 3.7 genauer diskutiert. Eine weitere gemeinsame Eigenschaft von PACRG und Parkin ist die Beeinflussung der mitochondrialen Morphologie. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PACRG die Drp1-induzierte Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes reduziert (Abb. 2.9), während der *PACRG-Knockdown* selbst eine mitochondriale Fragmentierung induzieren kann (Abb. 2.10). Dieser Effekt wurde in früheren Studien bereits für Parkin beschrieben (Lutz et al., 2009) und konnte für die Parkin-Überexpression in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 2.9). Der Einfluss von PACRG und Parkin auf die Morphologie des mitochondrialen Netzwerkes steht möglicherweise in Zusammenhang mit der zytoprotektiven Aktivität der beiden Proteine. Die mitochondriale Dynamik spielt auch für die Regulation des programmierten Zelltods, der Apoptose, eine entscheidende Rolle. Die Drp1-abhängige Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes ist ein initialer Schritt in der Apoptose-Kaskade, der der Freisetzung von Cytochrom-c aus dem mitochondrialen Intermembranraum vorangeht (Fannjiang et al., 2004; Frank et al., 2001). Die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak interagieren mit Drp1 und Mitofusinen und tragen so vermutlich zur apoptotischen Fragmentierung der Mitochondrien bei (Brooks et al., 2007; Karbowski et al., 2002, 2006; Wasiak et al., 2007). Für Parkin konnte gezeigt werden, dass es durch seine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zur transkriptionellen Hoch-Regulation des mitochondrialen Fusionsproteins OPA1 führt (Müller-Rischart et al., 2013). Dies wirkt der Drp1-induzierten mitochondrialen Fragmentierung und damit auch dem Eintritt der Zelle in die Apoptose entgegen. Es ist somit nicht unwahrscheinlich, dass dieser Mechanismus, also die Beeinflussung der mitochondrialen Dynamik, auch der protektiven Aktivität von PACRG zugrunde liegt.

3.4. Unterschiedliche Funktionen von PACRG und Parkin

In dieser Arbeit wurden nicht nur zahlreiche gemeinsame Funktionen von Parkin und PACRG aufgedeckt und analysiert. Eine vor allem in den letzten Jahren intensiv untersuchte Funktion von Parkin konnte für PACRG nicht nachgewiesen werden: die Induktion von Mitophagie. PACRG kann unter den Standardbedingungen, unter denen Parkin üblicherweise Mitophagie induziert,

selbst keine Mitophagie induzieren und beeinflusst die Parkin-induzierte Mitophagie nicht (Kapitel 2.6).

Bis heute stellt sich die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der zytoprotektiven Funktion von Parkin und seiner Rolle für die Mitophagie. Es wäre zwar denkbar, dass der zytoprotektive Effekt von Parkin über die Funktion des Proteins beim Abbau defekter Mitochondrien zu erklären ist, es gibt allerdings einige Forschungsergebnisse, die gegen diese Hypothese sprechen. Ein erstes Indiz für die Unabhängigkeit der beiden Parkin-Funktionen voneinander ist die Tatsache, dass Parkin auch in Mitophagie-defizienten Zellen, wie p62- oder Atg5-*Knockout*-Zellen, protektiv gegen verschiedene Stressbedingungen wirkt (Müller-Rischart et al., 2013). Zusätzlich dazu wirkt es auch unter Stressbedingungen protektiv, die keine Mitophagie aktivieren, wie die Behandlung mit STS, MPP⁺ oder Paraquat (Müller-Rischart et al., 2013; Wang et al., 2005; Pilsl, 2012). Nach Behandlung von Zellen mit Toxinen, die das mitochondriale Membranpotential beeinflussen, wie CCCP und Valinomycin, wird Parkin an die Mitochondrien rekrutiert und induziert deren Degradation (Humbreeck et al., 2011; Narendra et al., 2008; Rakovic et al., 2013). Behandlung mit Toxinen, die zwar die mitochondriale Funktion beeinträchtigen, aber keinen Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential zeigen, lösen weder die Translokation von Parkin an die Mitochondrien, noch Mitophagie aus (Pilsl, 2012). Ein weiterer Hinweis, dass der protektive Effekt von Parkin nicht durch seine Rolle bei der Mitophagie erklärt werden kann, ist die Entdeckung, dass die für die E3-Ligase-Aktivität von Parkin wichtige UBL-Domäne zwar für die Vermittlung der protektiven Aktivität von Parkin essentiell ist (Müller-Rischart et al., 2013), aber für die Induktion der Mitophagie nicht benötigt wird (Pilsl, 2012). Die Ergebnisse, der hier vorliegenden Arbeit und die Beobachtung, dass PACRG ebenso wie Parkin einen protektiven Effekt hat, aber keine Rolle für die Mitophagie spielt, unterstützt die Annahme, dass der zytoprotektive Effekt von Parkin und seine Funktion bei der Induktion der Mitophagie unabhängig voneinander sind.

3.5. Das zytoprotektive Potential von PACRG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PACRG ein zytoprotektives Potential gegenüber verschiedenen Arten von zellulärem Stress besitzt. Die Überexpression des Proteins schützt unterschiedliche Zellen vor mitochondrialem Stress (induziert durch MPP⁺) und vor Stress induziert durch den Kinase-Inhibitor STS, während PACRG-defiziente Zellen anfälliger gegenüber Stress sind (Kapitel 2.4). Eine zytoprotektive Funktion von PACRG wurde bereits in einer früheren Studie beschrieben. Imai *et al* konnten zeigen, dass PACRG vor durch Akkumulation von ungefaltetem Pael-Rezeptor ausgelöstem zellulärem Stress schützen kann und dadurch die Apoptose-Rate der Zellen verringert (Imai et al., 2003). Eine protektive Funktion wurde auch für

Parkin unter verschiedenen Stressbedingungen, wie mitochondrialem Stress, Toxinen, die das endoplasmatische Retikulum beeinträchtigen, Exzitotoxizität usw., beschrieben (Jiang et al., 2004; Müller-Rischart et al., 2013; Petrucelli et al., 2002; Staropoli et al., 2003). Beide Proteine zeigen also ein breites protektives Potential, welches unabhängig von der spezifischen Art des zellulären Stresses aktiviert wird. Für den Signalweg, der der protektiven Aktivität von PACRG zugrunde liegt, wären verschiedene Szenarien möglich. Es ist denkbar, dass PACRG und Parkin im selben Signalweg aktiv sind und dass ihre protektive Funktion von der Funktion und Expression des jeweils anderen Proteins abhängt, wie das z.B. für die koregulierten mitochondrialen Chaperonine Hsp60 (Hsp, engl. *Heat shock protein*) und Hsp10 der Fall ist (Hansen et al., 2003). Manche koregulierten Proteine haben allerdings keine offensichtliche direkte funktionelle Beziehung zueinander, wie zum Beispiel die Serin Proteinkinase ATM, die als Sensor für DNA-Schäden fungiert (Tichý et al., 2010) und ihr koreguliertes Protein NPAT (Imai et al., 1996; Platzer et al., 1997), welches Einfluss auf die Zellzyklus-Progression hat (Zhao et al., 1998, 2000). Solche Gene sind möglicherweise nicht aufgrund funktioneller Abhängigkeiten voneinander, sondern aufgrund ihrer gleichzeitigen Aktivierung als Antwort auf einen gemeinsamen Stimulus koreguliert. Es ist denkbar, dass sich in diesem Fall die Wirkungen der beiden Proteine addieren können. Ein additiver Effekt von Parkin und PACRG konnte in keinem der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Apoptose-Assays nachgewiesen werden. Unter Behandlung der Zellen mit MPP⁺ konnte die Apoptose-Rate allerdings allein durch die Überexpression eines der beiden Proteine bereits auf basale Werte zurückgeführt werden, sodass hier keine Detektion eines additiven Effekts zu erwarten war (Abb. 2.5 B). Ein solcher Effekt konnte jedoch auch nach Behandlung mit STS, wo durch Überexpression von PACRG oder Parkin nicht die Apoptose-Rate un behandelter Zellen erreicht wurde, nicht detektiert werden (Abb. 2.5 A, 2.6, 2.8). Um zu überprüfen, ob die zytoprotektive Aktivität von PACRG funktionell abhängig ist von Parkin wurden Apoptose-Assays in Parkin-defizienten Zellen durchgeführt. Hierbei wurde gezeigt, dass PACRG auch ohne Parkin zytoprotektiv wirken kann (Kapitel 2.4.3). PACRG ist also nicht funktionell abhängig von Parkin. Es stellte sich nun die Frage, ob PACRG im gleichen Signalweg agiert wie Parkin, oder ob die Expression beider Gene nur durch einen gemeinsamen zellulären Stimulus aktiviert wird und beide Gene in unterschiedlichen Signalwegen aktiv sind. Für den der protektiven Aktivität von PACRG zugrundeliegenden Signalweg kämen verschiedene zelluläre Überlebens-Signalwege, wie der Akt/PKB-, der JNK- oder der NF-κB-Signalweg, in Frage. Für Parkin wurde gezeigt, dass seine protektive Aktivität über den NF-κB-Signalweg vermittelt wird (Henn et al., 2007; Müller-Rischart et al., 2013). Dieser Signalweg spielt neben der Regulation der Immunantwort auch für die Regulation von Zelltod und Überleben eine Rolle. Er wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch durch eine breite Palette zellulärer Stressbedingungen, wie z.B. UV-Strahlung oder freie Radikale aktiviert. Am Ende der Signalkaskade steht die Aktivierung des Transkriptionsfaktors

NF- κ B, der die Transkription unterschiedlichster Zielgene aktiviert, die über unterschiedliche Mechanismen die Zelle vor dem Eintritt in die Apoptose schützen (Gilmore, 2006). In Zellen, die nicht mehr in der Lage sind den kanonischen NF- κ B-Signalweg zu aktivieren, kann Parkin nicht mehr protektiv wirken (Müller-Rischart et al., 2013). Die selben Zellen wurden verwendet, um zu untersuchen, ob der NF- κ B-Signalweg, auch der protektiven Aktivität von PACRG zugrunde liegt. Ebenso wie Parkin konnte PACRG diese Zellen unter Stressbedingungen nicht vor dem Eintritt in die Apoptose schützen (Kapitel 2.7.1). Es scheint also dass die protektive Funktion von PACRG über den selben Signalweg vermittelt wird, wie die protektive Funktion von Parkin: über den NF- κ B-Signalweg.

Das für die Untersuchung der Funktion von PACRG herangezogene Maus-Modell, die *Quaking^{viable}*-Maus, zeigt eine Beeinträchtigung der Myelinisierung im zentralen Nervensystem resultierend aus dem Defekt im *Quaking*-Promotor (SIDMAN et al., 1964), sowie *Hydrocephalus* und männliche Sterilität bedingt durch den Verlust von PACRG (Lorenzetti et al., 2004; Wilson et al., 2010). Der Phänotyp der Tiere ist zudem gekennzeichnet durch tonische klonische Krämpfe und Tremor assoziiert mit willkürlichen Bewegungen (SIDMAN et al., 1964). Dieser Phänotyp wurde zunächst der beeinträchtigten Myelinisierung des zentralen Nervensystems zugesprochen. Mutationen im *Parkin*-Gen wurden mit autosomal rezessiv vererbtem jugendlichen Parkinsonismus in Verbindung gebracht (Kitada et al., 1998), einer Bewegungsstörung resultierend aus dem Verlust dopaminerger Neuronen in der *Substantia nigra*. Man könnte also spekulieren, dass auch der Verlust von Parkin und PACRG zur Entwicklung der Bewegungsstörungen in der *Quaking^{viable}*-Maus beiträgt. Es konnte zwar kein Verlust dopaminerger Neuronen in diesen Tieren detektiert werden, allerdings zeigen auch andere Parkin-defiziente Mausmodelle keine Neurodegeneration (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003). Die Tatsache, dass sich Neurodegeneration in diesen Mausmodellen nicht nachweisen lässt ist möglicherweise durch die kurze Lebenszeit von Mäusen im Vergleich zu Menschen bedingt. Subtile zelluläre Defekte benötigen einen gewissen Zeitraum um so stark zu akkumulieren, dass sie das Absterben der Zelle zur Folge haben. Vermutlich kann der Verlust von Parkin und PACRG vom Organismus bis zu einem gewissen Maß kompensiert werden, sodass die Zellen zunächst nur leicht beeinträchtigt sind. Diese leichte Beeinträchtigung in der Antwort auf verschiedene Stressbedingungen führt zur Akkumulation von Defekten über die Zeit. Aus diesem Grund sterben Zellen, die *per se* anfälliger gegenüber Stress sind, wie z.B. dopaminerge Neuronen, wenn ihnen zusätzlich protektive Proteine fehlen schneller ab im Vergleich zu Zellen mit einer voll funktionsfähigen Stress-Antwort. Die vermutliche Kompensation der fehlenden Parkin Funktion im Tiermodell ist eventuell auch der Grund dafür, dass die erhöhte Anfälligkeit von Zellen gegenüber Stress zwar nach akutem Verlust von Parkin im Zellkultur-Modell nachgewiesen werden kann (Henn et al., 2007; Müller-Rischart et al., 2013), im Tiermodell allerdings nicht detektierbar ist. Es ist also denkbar, dass der Verlust von Parkin und PACRG nicht

nur die durch Fehlorganisation von Mikrotubuli bedingten Phänotypen der Quaking^{viable}-Maus (Sterilität und *Hydrocephalus*) verursachen, sondern auch zu dem neurologischen Phänotyp dieses Tiermodells beiträgt.

3.6. Der Mechanismus der Zytoprotektivität von PACRG

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass das Parkin-koreguliertes Protein PACRG Zellen unter Stressbedingungen vor dem Eintritt in die Apoptose schützen kann, und dass dieser zytoprotektive Effekt über den NF- κ B-Überlebens-Signalweg vermittelt wird. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass PACRG diesen Signalweg direkt aktivieren kann (Kapitel 2.7.2). Unter PACRG-*Knockdown* Bedingungen hingegen ist die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges nach Stimulation durch TNF- α -Behandlung beeinträchtigt, was sich durch eine Beeinträchtigung der nukleären Translokation von p65 und durch eine geringere transkriptionelle Aktivität von NF- κ B im Reporter-Gen-Assay nachweisen lässt (Kapitel 2.7.3). In einer früheren Studie konnte diese Funktion wie bereits erwähnt auch für Parkin nachgewiesen werden. In dieser Publikation wurde gezeigt, dass Parkin mit dem LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*) interagiert und diesen aktiviert. Dadurch wird die Aktivität des Komplexes erhöht, die lineare Ubiquitinierung von Proteinen gesteigert und über die aktivierende lineare Ubiquitinierung von NEMO der NF- κ B-Signalweg aktiviert (Müller-Rischart et al., 2013). Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Funktion von PACRG nach einem ähnlichen Mechanismus für die Aktivierung von NF- κ B lieferte das Ergebnis des Apoptose-Assays in NEMO-defizienten Zellen. Hier konnte die protektive Aktivität von PACRG nach Einbringung von WT-NEMO wiederhergestellt werden, nicht aber nach Einbringung von NEMO Mutanten, die nicht mehr mit linearen Ubiquitin-Ketten modifiziert werden können (Kapitel 2.7.1). Später konnte nachgewiesen werden, dass PACRG mit den einzelnen Komponenten des LUBAC, HOIP, HOIL-1L und Sharpin, interagiert und Teil des Komplexes ist (Kapitel 2.8). Es wurde außerdem gezeigt, dass PACRG diesen Komplex aktiviert (Kapitel 2.9). Die Aktivität des LUBAC wurde über den Nachweis linear ubiquitinierten Proteins detektiert. PACRG erhöht die Menge an linear ubiquitinierten Proteinen in der Zelle und spezifisch die lineare Ubiquitinierung von NEMO, nach Stimulation des NF- κ B-Signalweges über TNF- α (Abb. 2.23). Der LUBAC ist aus den E3-Ligasen HOIP und HOIL-1L oder aus HOIP und dem Adaptor-Protein Sharpin zusammengesetzt (Ikeda et al., 2011; Tokunaga et al., 2009b, 2011). Die katalytisch aktive E3-Ligase, die die Anheftung der linearen Ubiquitin-Ketten an Zielproteine vermittelt ist HOIP (Smit et al., 2012; Stieglitz et al., 2012). Für die Aktivierung von HOIP ist es allerdings nötig, dessen auto-inhibierten Zustand aufzuheben. Hierfür ist die Aktivität der E3-Ligase HOIL-1L oder eine Interaktion mit Sharpin notwendig (Stieglitz et al., 2012). Diese Proteine binden an den N-Terminus von HOIP und lösen hierdurch eine Konformationsänderung

aus, die dafür sorgt, dass HOIP aktiv sein kann (Dove and Klevit, 2012; Smit et al., 2012; Stieglitz et al., 2013). Die Aktivität einer der beiden Kombinationen, HOIP/HOIL-1L oder HOIP/Sharpin, ist ausreichend um den NF- κ B-Signalweg zu aktivieren (Ikeda et al., 2011; Tokunaga et al., 2011). Es wäre denkbar, dass PACRG nur einen Einfluss auf die Aktivität eines spezifisch zusammengesetzten LUBAC besitzt, entweder auf den HOIP/HOIL-1L- oder auf den HOIP/Sharpin-Komplex. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass PACRG beide Komplexe aktivieren kann (Abb. 2.21 und 2.24). Das Protein agiert also nicht spezifisch für eine Kombination aus LUBAC Komponenten, was zu dem Ergebnis aus einem vorherigen Versuch passt, dass PACRG mit allen Komponenten interagieren kann. Die Interaktion mit HOIL-1L erschien allerdings in diesem Versuch schwächer, als die Interaktion mit HOIP und Sharpin (Abb. 2.17 A). Dies scheint jedoch keinen Einfluss auf die Stärke der Aktivierung des Komplexes zu haben.

Bei der Analyse von möglichen Interaktionspartnern von PACRG konnte neben den Komponenten des LUBAC auch Parkin als Interaktionspartner identifiziert werden (Kapitel 2.8.2). In Anbetracht der Tatsache, dass Parkin ebenfalls mit dem LUBAC interagieren kann ist eine Interaktion mit PACRG nicht verwunderlich. Es konnte allerdings keine Interaktion zwischen PACRG und NEMO detektiert werden (Kapitel 2.8.3), während Müller-Rischart *et al* zeigen konnten, dass Parkin mit NEMO interagiert (Müller-Rischart et al., 2013). Dieser Effekt könnte damit zusammenhängen, dass die Analyse der Interaktion zwischen PACRG und NEMO unter basalen Bedingungen durchgeführt wurde. Da die Interaktion des LUBAC mit NEMO und damit dessen lineare Ubiquitinierung unter verschiedenen zellulären Stressbedingungen oder nach TNF- α -Behandlung stimuliert wird, kann hierdurch möglicherweise erklärt werden, dass unter basalen Bedingungen keine Interaktion zwischen PACRG und NEMO nachweisbar ist. Parkin und PACRG agieren vermutlich nicht über exakt den gleichen Mechanismus in diesem Signalweg, sodass die Bedingungen für die Interaktion mit NEMO nicht zwangsläufig für beide Proteine gleich sein müssen.

3.7. Der Mechanismus der LUBAC-Aktivierung durch PACRG

Es bleibt nun also die Frage offen, über welchen molekularen Mechanismus PACRG den LUBAC aktivieren und damit den NF- κ B-Signalweg stimulieren kann. PACRG selbst besitzt keine bekannten funktionellen Domänen (West et al., 2003). Als einziges mögliches Strukturmotiv ist ein sogenannter *Armadillo type fold* vorhergesagt (www.ensembl.com). Dieses Strukturmotiv spielt wie bereits beschrieben für die Interaktion von Proteinen eine Rolle (Parmeggiani et al., 2008; Tewari et al., 2010). Allein aus der Betrachtung dieser strukturellen Eigenschaften von PACRG ist nicht zu erwarten, dass es eine direkte katalytische Aktivität besitzt mit der es die Aktivierung des LUBAC

vermitteln kann. Vielmehr ist denkbar, dass es sich bei PACRG um ein Adaptor-Protein handelt. Es wäre möglich, dass PACRG den LUBAC als Komplex stabilisiert oder durch die Interaktion mit den einzelnen Komponenten des Komplexes deren Stabilität erhöht, indem es z.B. deren proteasomale Degradation beeinflusst. Eine Beeinflussung der Menge an in der Zelle vorhandenem LUBAC durch PACRG-Überexpression wurde in Gelfiltrations-Experimenten untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied in der Menge an aus HOIP und Sharpin gebildetem Komplex zwischen Kontroll-Zellen und PACRG-überexprimierenden Zellen detektiert werden. Durch PACRG-Überexpression wurde also unter basalen Bedingungen die Menge an gebildetem LUBAC nicht beeinflusst werden. Es wäre interessant in zukünftigen Experimenten die Menge und die Zusammensetzung des Komplexes unter PACRG-*Knockdown* Bedingungen sowie unter zellulärem Stress zu untersuchen. Möglicherweise verändert PACRG die Kinetik der Komplex-Bildung. Dieser Aspekt konnte mit dem hier durchgeführten Gelfiltrations-Versuch nicht detektiert werden. Um die Kinetik der Komplex-Bildung zu untersuchen müssten Experimente zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach zellulärem Stress durchgeführt werden.

Da in einzelnen Versuchen im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit nach PACRG-Überexpression eine verstärkte Expression von HOIP beobachtet werden konnte (Abb. 2.26 A), wurde untersucht, ob PACRG die Stabilität von HOIP beeinflussen kann. In den durchgeführten *Pulse/Chase* Experimenten konnte eine solche Aktivität allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 2.26 B). Aus den hier vorliegenden Resultaten kann also nicht darauf geschlossen werden, dass PACRG die Menge an LUBAC in der Zelle oder die Stabilität von HOIP erhöht.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus der Aktivierung des LUBAC durch PACRG als Adaptor-Protein wäre ein Einfluss auf die Auto-Inhibition von HOIP. Wie bereits erwähnt liegt HOIP unter basalen Bedingungen in einem auto-inhibierten Zustand vor, der durch Bindung von HOIL-1L oder Sharpin an den HOIP-N-Terminus aufgehoben wird. Dadurch wird die C-terminale katalytische Domäne von HOIP frei für die Bindung eines E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzyms und kann die lineare Ubiquitinierung von Proteinen vermitteln (Dove and Kleivit, 2012; Smit et al., 2012; Stieglitz et al., 2013). Zum Nachweis der Auto-Inhibierung von HOIP wurde das Protein mit Hilfe eines Antikörpers präzipitiert, der an den C-Terminus des Proteins bindet. Diese Region ist vermutlich für die Bindung des Antikörpers besser zugänglich, wenn HOIP in seiner aktiven Konformation vorliegt (Abb. 2.27 A). Tatsächlich konnte hiermit nachgewiesen werden, dass PACRG unter STS-Stress die Präzipitation von HOIP mittels dieses Antikörpers verstärkt (Abb. 2.27 B und C). Dieses Resultat ist ein erster Hinweis darauf, dass PACRG tatsächlich die Auto-Inhibierung von HOIP verringern kann. Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhalts ist es notwendig, den Versuch unter verschiedenen Stressbedingungen zu wiederholen, sowie nach Überexpression von HOIL-1L und Sharpin, die bekannterweise auch die Auto-Inhibierung von

HOIP aufheben, und somit in dem hier durchgeführten Versuch einen ähnlichen Effekt zeigen sollten, wie wir ihn für PACRG beobachten konnten. Es konnte in vorherigen Experimenten bereits gezeigt werden, dass PACRG mit HOIP interagiert. Für diesen Aspekt wäre interessant genauer zu untersuchen, an welche HOIP-Protein-Domäne PACRG bindet. Aus den beschriebenen Experimenten unter der Voraussetzung, dass PACRG tatsächlich die Auto-Inhibierung von HOIP reduziert, ist es wahrscheinlich, dass PACRG ebenso wie HOIL-1L und Sharpin auch den N-Terminus des Proteins bindet. PACRG kann allerdings HOIL-1L oder Sharpin nicht im Komplex ersetzen und allein die vollständige Aktivierung von HOIP auslösen. Es ist vorstellbar, dass PACRG als Adapter für die Bindung von HOIL-1L und Sharpin an HOIP agiert und somit deren Aktivität verstärkt.

3.8. Zusammenarbeit von PACRG und Parkin

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit eine bisher wenig untersuchte Funktion von PACRG, nämlich die Protektion von Zellen gegenüber Stress-induziertem Zelltod, genauer beschrieben werden. Es wurde der Signalweg, der dieser protektiven Aktivität zugrunde liegt, aufgedeckt und ein erster Hinweis auf den genauen molekularen Mechanismus, über den PACRG protektiv agiert, gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass PACRG ebenso wie sein koreguliertes Protein Parkin die Aktivität des LUBAC erhöhen kann. Außerdem konnte eine Interaktion von PACRG und Parkin nachgewiesen werden. Neben der weiteren Aufklärung des genauen Mechanismus der PACRG-Aktivität bleibt die Frage offen ob und, wenn ja, wie die koregulierten Proteine PACRG und Parkin zusammenarbeiten oder ob beide Proteine nur im gleichen Signalweg aktiv sind. Die Tatsache, dass PACRG auch in Abwesenheit von Parkin protektiv gegenüber Stressbedingungen wirken kann deutet zwar eher darauf hin, dass die Proteine nicht direkt zusammenarbeiten, schließt einen funktionellen Zusammenhang aber nicht vollständig aus, zumal eine Interaktion beider Proteine miteinander gezeigt werden konnte. Diese Interaktion könnte allerdings auch indirekter Natur sein, über die gleichzeitige Bindung beider Proteine an den LUBAC. Die Betrachtung des Expressions-Musters von PACRG und Parkin in unterschiedlichen Zellen und Geweben kann Hinweise darauf geben, ob die Proteine zusammenarbeiten oder nicht. In dieser Arbeit konnte die PACRG-mRNA in kultivierten primären Neuronen in vergleichbarer Menge, wie die Parkin-mRNA, mittels quantitativer RT-PCR detektiert werden. Die zelluläre Lokalisation des PACRG-Proteins im zentralen Nervensystem wurde in vergangenen Studien kontrovers beschrieben. Während Brody *et al* PACRG überwiegend in Neuronen detektieren konnten (Brody *et al.*, 2008), konnten Taylor *et al* in Immunhistochemischen- und Immunfluoreszenz-Färbungen PACRG hauptsächlich in Gliazellen nachweisen, während die Immun-Reaktivität in Neuronen gering bis nicht detektierbar war (Taylor *et al.*, 2007). Für die Expression von Parkin ist hingegen eine vorwiegend neuronale Lokalisation

beschrieben worden. In Gliazellen war Parkin nur schwach detektierbar (Stichel et al., 2000; Zarate-Lagunes et al., 2001). Möglicherweise beeinflussen PACRG und Parkin den NF- κ B-Signalweg in unterschiedlichen Zelltypen. Während PACRG so eher Gliazellen vor Stress-induziertem Zelltod schützen kann, wirkt Parkin protektiv in neuronalen Zellen. Gliazellen sind durch unterschiedliche Funktionen maßgeblich am Schutz der Neuronen vor schädlichen Einflüssen und an der Aufrechterhaltung neuronaler Kreisläufe beteiligt (Allen and Barres, 2009). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Gliazellen eine große Rolle spielen für die Initiation und Progression verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. Parkinsonismus. Die Funktion dieser Zellen kann in diesen Prozessen sowohl vorteilhaft, als auch schädlich für das Überleben der Neuronen sein (Teismann et al., 2003). Somit trägt letztendlich auch die Beeinflussung von Überlebens-Signalwegen in Gliazellen zum Schutz von Neuronen vor Stressbedingungen und zum Überleben dieser Zellen bei. So würden beide Proteine, PACRG und Parkin, über ihre Aktivität im gleichen Signalweg, aber in unterschiedlichen Zellen vor Neurodegeneration schützen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass PACRG und Parkin in ähnlicher Weise in den gleichen Zellen Stress-abhängig hoch reguliert werden (Abb. 2.4), allerdings wurden diese Experimente in kultivierten Zellen durchgeführt. Die Regulation von Genen kann sich in kultivierten Zellen von der Regulation *in vivo* unterscheiden. Zudem wurden für dieses Experiment vergleichsweise harsche Stressbedingungen genutzt um den Effekt sichtbar zu machen. Die Stressbedingungen, denen die Zellen *in vivo* ausgesetzt sind, sind vermutlich deutlich weniger stark, wirken dafür aber über einen längeren Zeitraum auf die Zellen ein. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen also, dass PACRG ähnlich wie Parkin Stress-abhängig hoch reguliert werden kann, sie schließen aber nicht aus, dass die beiden Proteine in unterschiedlichen Zellen hoch reguliert werden und aktiv sind.

Müller-Rischart *et al* konnten zeigen, dass verschiedene Parkin-Mutanten keine zytoprotektive Aktivität besitzen und keine lineare Ubiquitinierung induzieren können, obwohl sie weiterhin mit HOIP interagieren (Müller-Rischart et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass die E3-Ligase-Aktivität von Parkin für die Aktivierung des LUBAC notwendig ist und spricht dagegen, dass Parkin ähnlich wie PACRG nur als Adaptor-Protein die Auto-Inhibierung von HOIP reduziert. Weder Parkin noch PACRG können HOIL-1L oder Sharpin ersetzen um die volle Aktivierung des LUBAC zu erreichen (Müller-Rischart et al., 2013), (Abb. 2.21 und 2.22). Der exakte molekulare Mechanismus, über den Parkin den LUBAC aktiviert ist nicht vollständig aufgeklärt. Da offenbar die E3-Ligase-Aktivität des Proteins für die Aktivierung notwendig ist, wäre interessant zu untersuchen, welches Substrat im LUBAC durch Parkin in welcher Weise ubiquitiniert wird und welche mechanistischen Folgen dies hat. Erst wenn die Funktionen von PACRG und Parkin in Zusammenhang mit der Aktivierung des LUBAC bis ins Detail aufgeklärt sind kann über eine Zusammenarbeit der beiden Proteine abschließend geschlossen werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth (Karlsruhe, Dtl.), Boehringer (Mannheim, Dtl.) Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.), Merck KGaA (Darmstadt, Dtl.) USB (Cleveland, USA).

4.1.2. Kits

Kit:	Hersteller :
Luciferase-Reportergen-Assay	Promega
RNeasy RNA-Extraktions Kit	Qiagen (Hilden, Dtl.)
RNase free DNase Kit	Qiagen (Hilden, Dtl.)
iScript cDNA-Synthese Kit	Biorad (München, Dtl.)
SYBRGreen PCR Master-Mix	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
ECL/ECL+	GE Healthcare, München (Dtl.)
Nucleospin Geextraktions Kit	Machery Nagel (Düren, Dtl.)
Nucleospin Plasmid Mini Kit	Machery Nagel (Düren, Dtl.)
DNA Midi Extraktionskit	Machery Nagel (Düren, Dtl.)
In-Fusion HD Cloning	Clontech (Mountain View, CA, USA)

4.1.3. Puffer, Reagenzien und Medien

Für die Herstellung sämtlicher Puffer und Lösungen wurde Wasser verwendet, dass durch die MilliQ Deionisierungs-Anlage der Firma Millipore (Eschborn, Dtl.) mit einem Widerstand von 18,2 MΩ/cm³ gefiltert wurde.

4.1.3.1. Puffer**Name:****Rezept:****Allgemeine Puffer:**

PBS 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O,
1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3

SDS-Gele und Western Blot:

APS (Ammoniumperoxodisulfat) 10 % in H₂O bidest.

Sammelgel-Puffer pH 6,8, 0,5 M TRIS, 0,4 % SDS

Trenngel-Puffer pH 8,8, 1,5 M TRIS, 0,4 % SDS

Laemmli-Probenpuffer 4x: 240 mM TRIS pH 6,8, 4 % SDS, 40 % Glycerol,
Bromphenolblau

SDS-Gel-Laufpuffer 25 mM TRIS, 0,189 M Glycine, 1 % SDS

Transfer-Puffer Western Blot 24,9 mM Tris, 0,192 mM Glycine

TBST 0,14 M NaCl, 0,02 M TRIS pH 7.6 , 0,1 % Tween 20

Stripping-Buffer für Western Blot 1 % Tween 20, 1 % SDS, 0.2 M Glycin ph 2.2

Immunfluoreszenz-Färbung:

PFA (Paraformaldehyd) 3,7 % Paraformaldehyd in PBS

Permeabilisierungs-Puffer 0,2 % Triton X 100 in PBS

Blocking-Puffer 5 % Ziegen Serum, 0,2 % Triton X 100 in PBS

Eindeckmedium Pro 20 mL: 6 g Glycerin, 2.4 g Mowiol, 0,12 M TRIS pH
8.5

Kalziumphosphat Transfektion:

CaCl₂-Transfektionlösung 2,5 mM CaCl₂ in H₂O

HeBs 50 mM HEPES pH 6,85, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄

Immunpräzipitation (IP):

Lysepuffer IP 1 % Triton X 100 in PBS

Ubiquitinierungs Assay:

Denaturierender Lysepuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 1 % SDS

Nicht-denaturierender Lysepuffer 1 % Triton X 100 in PBS

Name:	Rezept:
Agarosegel-Elektrophorese:	
TBE-Puffer	89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH 8.0
Agarosegel	1 % Agarose in TBE-Puffer
6x DNA-Probenpuffer	50 % TE, 50 % Glycerin, 0,02 % Xylencyanol, Bromphenolblau
Gelfiltration:	
Gelfiltration Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 , 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Gelfiltration Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl
Löslichkeits-Assay:	
Lysepuffer für Löslichkeits-Assay	0,5 % Triton in PBS, 0,5 % DOC (Deoxycholat)
Pulse/Chase Experiment:	
Lysepuffer:	0,5 % Triton X 100 in PBS

4.1.3.2. Reagenzien

Reagenz:	Hersteller:
Bradford	Biorad (München, Dtl.)
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Lipofectamine RNAiMax	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Lipofectamine	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Plus Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Ziegenserum	Cell signaling (Danvers, MA, USA)
BSA (bovines Serumalbumin)	USB (Cleveland, USA)

4.1.3.3. Medien

Medium:	Hersteller / Zusammensetzung:
DMEM GlutaMax	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)
DMEM F12	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)
DMEM GlutaMax ohne Methionin	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)

Medium:	Hersteller / Zusammensetzung:
OptiMEM	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)
HBSS	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)
Neurobasal	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)
LB-Medium/LB-Agar	Pro 1 l: 10 g Bacto Tryptone, 5 g Yeast Extract, 5 g NaCl, (15 g Bacto Agar)
FKS (FCS)	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)
Uridin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	GIBCO (Invitrogen) (Karlsruhe, Dtl.)
L-Glutamat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)

4.1.4. Enzyme und Proteine

Enzym:	Hersteller:
Proteinase K	Roche (Basel, Schweiz)
Trypsin-EDTA für die Zellkultur (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L EDTA)	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Papain	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
EcoRI	New England Biolabs (Schwalbach, Dtl.)
NotI	New England Biolabs (Schwalbach, Dtl.)
EcoRV	New England Biolabs (Schwalbach, Dtl.)
ApaI	New England Biolabs (Schwalbach, Dtl.)
DNase	Qiagen (Hilden, Dtl.)
T4-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Dtl.)
Shrimp-Alkaline Phosphatase	Roche (Mannheim, Dtl.)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
Taq-Polymerase	Roche (Mannheim, Dtl.)
Pwo-Polymerase	Roche (Mannheim, Dtl.)

4.1.5. Antibiotika

Antibiotikum:	Hersteller:
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Penicillin/Streptomycin für Zellkultur (100x; 5000 U/mL Penicillin G, 5 mg/mL)	GIBCO (Invitrogen), Dtl.

4.1.6. Toxine und Inhibitoren

Toxin:	Anwendung:	Hersteller:
MPP ⁺ Iodid	7,5 µM; 4 h 2 µM; 16 – 24 h	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Thapsigargin	10 µM; 16 – 24 h	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Staurosporin	10 nM; 1 – 5 h	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
CCCP	10 µM; 1 – 24 h	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
TNF- α	10 – 25 ng/mL; 5 min – 16 h	Biomol (Hamburg, Dtl.)
Bafilomycin	25 nM; 16 h	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Epoxomycin	0,1 µM; 16 h	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
MG-132	5 µM; 16 h	Merck (Darmstadt, Dtl.)

4.1.7. Farbstoffe und Marker

Farbstoff / Marker:	Hersteller:
SeaBlue Pre Stained Protein Ladder Plus2	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (Schwalbach, Dtl.)
DAPI	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)

4.1.8. Plasmide

Plasmid:	Restriktionsenzyme/ Methode:	Herkunft:
Leervektoren:		
pcDNA3.1 (+)		Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
pcDNA3.1 (-)		Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
cDNA-Konstrukte:		
PACRG pcDNA3.1	In-Fusion (EcoRI)	
HA-PACRG pcDNA3.1	ApaI/EcoRI	
HA-PACRG pCMV		Anita Schlierf
Parkin wt pcDNA3.1		Winklhofer et al 2003
HA-Parkin pcDNA3.1	HindIII/NotI	Julia Schlehe
Parkin Δ 1-79 (Δ UBL) pcDNA3.1	HindIII/NotI	Julia Schlehe
NEMO WT FLAG pEF		Daniel Krappmann
NEMO D311N FLAG pEF		Daniel Krappmann
NEMO K285/309R FLAG pEF		Daniel Krappmann
HA-HOIP pcDNA3.1	EcoRI/NotI	Kathrin Müller-Rischart
HOIL-1L-HA pcDNA3.1	HindIII/XhoI	Kathrin Müller-Rischart
HOIP pcDNA3.1	EcoRI/NotI	
HOIL-1L pcDNA3.1	HindIII/XhoI	Kathrin Müller-Rischart
Sharpin-HA pcDNA3.1	HindIII/XbaI	
Drp1 pEYFP-C1		Heidi McBride
HA-HHARI pCMV-HA	EcoRI/NotI	Julia Schlehe
EYFP		Clontech (Mountain View, CA, USA)
cGFP		Clontech (Mountain View, CA, USA)
NF- κ B-LUC pGL3-LUC		Daniel Krappmann
pGL3-LUC		Promega (Madison, WI, USA)

4.1.9. Primer und Oligonukleotide

4.1.9.1. Klonierungsprimer

Name:	Sequenz 5' - 3':
Inf_HOIP_pcDNA_for	TGGAATTCTGCAGATATGCCGGGGGAGGAAGAGGA
Inf_HOIP_pcDNA_rev	GCCACTGTGCTGGATCTACTTCCGCCTGCGGGGGA
Inf_PACRG_for	CAGTGTGGTGGAAATCCCACCATGGTGGCAGAAAAAGAGAC CCTG
Inf_PACRG_rev	GATATCTGCAGAATTCTTAGTTTAGCAAGCAAGACTCG
HA_for	GCAGAGCTCGTTTAGTGAACC
HA-fusion_rev	TTCTGCCACCAAAGAGCGTAATCTG
PACRG-fusion_for	CAGATTACGCTCTTTTGGTGGCAGAAAAAGAG
PACRG_EcoRI_rev	GCGAATTCTTAGTTTAGCAAGCAAGCAAG

4.1.9.2. RT-PCR Primer

Name:	Sequenz 5' - 3':
Human β -Actin_for	CCTGGCACCCAGCACAAT
Human β -Actin_rev	GGGCCGGACTCGTCATAC
Maus β -Actin_for	AGCCTTCCTTCTTGGGTATG
Maus β -Actin_rev	GGTCTTTACGGATGTCAACG
Human PACRG_for	GGTTTCTGAGGGTTTCACAGTC
Human PACRG_rev	GGGCTTGGTTGGTCTTTCTT
Maus PACRG_for	GAACACGGAGGGAACAAGAT
Maus PACRG_rev	CGAAGACACAACCAGATGCT
Human Park2_for	AGTGTTTGTGTCAGGTTCAACTCCAGC
Human Park2_rev	AACCCCTGTCGCTTAGCAAC
Maus Park2_for	AAACCGGATGAGTGGTGAGT
Maus Park2_rev	AGCTACCGACGTGTCCTTGT

4.1.9.3. siRNAs

Name:	Nummer/ Hersteller:	Sequenz:
Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Med GC Duplex #2	Invitrogen	
Human PACRG	HSS175097/ Invitrogen	AAUUGCCCUUGAGCAUGAUUCGAAA UUUCGAAUCAUGCUC AAGGGCAAU
ON-TARGET Plus Non-targeting Pool	Thermo	
SMART Pool: ON-TARGET Plus human PACRG	L-016948/Thermo	GAGCAUGAUUCGAAAGGAA GCAAGGAAUCCACGACAUG GAACUCCGGAGACGGCAU CGAGGUGACUCCCAAUUG

4.1.10. Antikörper und Beads

Bezeichnung:	Spezies:	Anwendung:	Verdünnung:	Herkunft:
Primärantikörper:				
PRK8	Maus	WB, IF	1:500 / 1:1000	Santa Cruz (Dallas, USA)
PACRG C8	Maus	WB	1:500	Santa Cruz (Dallas, USA)
Active Caspase-3	Kaninchen	WB, IF	1:500 / 1:1000	Cell signaling
Active Bax Clone 6A7	Maus	IF	1:500	eBioscience
Ubiquitin P4D1	Maus	WB	1:1000	Santa Cruz (Dallas, USA)
HOIP/RNF31	Kaninchen	WB, IP	1:1000	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Sharpin	Kaninchen	WB	1:1000	Cell signaling
TOM20	Kaninchen	IF	1:1000	Santa Cruz (Dallas, USA)
β-Actin	Maus	WB	1:1000	
HA 1.1	Maus	WB	1:1000	
FLAG HRP		WB	1:1000	

Bezeichnung:	Spezies:	Anwendung:	Verdünnung:	Herkunft:
c-Myc		IP	1:1000	
Sekundärantikörper:				
Ziege anti Maus Alexa 488	Ziege	IF	1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Ziege anti Kaninchen Alexa 488	Ziege	IF	1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Ziege anti Maus Alexa 555	Ziege	IF	1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Ziege anti Kaninchen Alexa 555	Ziege	IF	1:500	Invitrogen (Karlsruhe, Dtl.)
Ziege anti Maus HRP	Ziege	WB	1:10000	Promega (Mannheim, Dtl.)
Ziege anti Kaninchen HRP	Ziege	WB	1:10000	Promega (Mannheim, Dtl.)
Beads:				
Anti-c-Myc-Agarose Beads	Kaninchen	IP		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Monoclonal Anti-HA- Agarose Beads	Maus	IP		Sigma Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Protein-A-Sepahrose Beads		IP		GE-Healthcare (München, Dtl.)

4.1.11. Zellstämme

Zelllinie:	Herkunft:	Medium:	Referenz:
SH-SY5Y	Humane Neuroblastoma Zellen	DMEM-F12 + 10 % FKS + DSMZ-Nr. ACC 209 1x Pen/Strep	
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM Glutamax + 10 % FKS + 1x Pen/Strep	ATCC-Nr. CRL-1573
HeLa	Humane immortalisierte Zervixkarzinom Zellen	DMEM Glutamax + 10 % FKS + 1x Pen/Strep	DSMZ-Nr. ACC 57
WT (Wildtyp) MEFs	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM Glutamax + 10 % FKS + 1x Pen/Strep	Daniel Krappmann
NEMO KO MEFs	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM Glutamax + 10 % FKS + 1x Pen/Strep	Daniel Krappmann

Zelllinie:	Herkunft:	Medium:	Referenz:
WT (Wildtyp) MEFs (Parkin)	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM Glutamax + 10 % FKS + 1x Pen/Strep + 50 µg/mL Uridin	Edgar Kramer
Parkin KO MEFs	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM Glutamax + 10 % FKS + 1x Pen/Strep + 50 µg/mL Uridin	Edgar Kramer
Primäre kortikale Neuronen	Murine embryonale kortikale Neuronen	Neurobasal + 0,5 mM L-Glutamin + 1x B27 + 1x Pen/Strep	

4.1.12. Bakterien

Bakterien:	Hersteller:
DH-5α (<i>E. coli</i>)	Eigene Herstellung (Hanahan und Meselson, 1983)
Stellar kompetente Zellen (<i>E. coli</i>)	Clontech (Mountain View, CA, USA)

4.1.13. Tierstämme

Für die Präparation von primären murinen Zellen wurden Mäuse des Stammes C57Bl6/J (bezogen von Charles River, Sulzfeld, Dtl.) verwendet.

4.1.14. Geräte

Geräte:	Hersteller:
Zellkultur und Bakterien:	
Zellkulturflaschen und Schalen	Nuncbrand (Roskilde, Dänemark)
Inkubatoren für Zellkultur	Heraeus (Hanau, Dtl.)
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik (Friedrichsdorf, Dtl.)
Wasserbad MT	Roth (Karlsruhe, Dtl.)
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest (Egelsbach, Dtl.)
SDS-PAGE und Western Blot:	
SDS-PAGE und Western Blot Apparaturen (<i>Mini-PROTEAN 3</i>)	Biorad (München, Dtl.)

Geräte:	Hersteller:
Power Supplier	Biorad (München, Dtl.)
Filmentwickler	CaWo (Schrobenhausen, Dtl.)
Lumineszenz-Messung:	
Luminometer LB96V	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Dtl.)
real-time-PCR:	
MicroAmp RT-PCR Platten	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Gelfiltration:	
Äkta	GE Healthcare (Freiburg, Dtl.)
Säule Superdex 200 HR 10/30	GE Healthcare (Freiburg, Dtl.)
Mikroskope:	
Axiovert 25	Carl Zeiss (Jena, Dtl.)
Axiovert 200M mit Software Axiovision	Carl Zeiss (Jena, Dtl.)
PCR-Geräte:	
T3 Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Dtl.)
Mastercycler	Eppendorf (Hamburg, Dtl.)
Fast real-time System 7500	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Allgemeine Geräte:	
ELISA Plattenlesegerät <i>Power Wave XS</i>	BioTek (Winooski, VT, USA)
Ph-Meter	Thermo Fischer Scientific (Nidderau, Dtl.)
Zentrifugen	Heraeus (Hanau, Dtl.)
Kühlzentrifugen	Heraeus (Hanau, Dtl.); Eppendorf (Hamburg, Dtl.); Beckmann (Unterschleißheim, Dtl.)
Nano Photometer	Implen (München, Dtl.)
Thermoschüttler	Eppendorf (Hamburg, Dtl.)
Schüttler	Heidolph (Schwabach, Dtl.)
Reinstwasseranlage MilliQ	Millipore (Eschborn, Dtl.)
Vortexer	Bender & Hobein (Zürich, CH)

UV-Tisch	UVP (Cambridge, UK)
Laborwaage Mettler Toledo PB602	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Dtl.)
Analysenwaage Mettler Toledo AG285	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Dtl.)

4.1.15. Software

Software:	Anbieter:
Adobe Photoshop CS5	Adobe
Adobe Illustrator	Adobe
Microsoft Excel 2010	Microsoft
Axiovision	Carl Zeiss (Jena, Dtl.)

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkulturmethoden

4.2.1.1. Kultivieren, Passagieren und Ausplattieren von Zellen

Alle Zelllinien wurden als adhärenzte Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen, im oben angegebenen Medium (Kapitel 4.1.3.3), im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst einmal mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend in 1 mL Trypsin inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Platte wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellen mehrere Male resuspendiert. Anschließend konnte die Zellsuspension im geeigneten Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt werden. Die Zelllinien wurden alle 3 – 4 Tage passagiert.

Um Zellen für Versuche auszuplattieren wurde zunächst nach dem Trypsinisieren die genaue Zellzahl der Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro 3,5 cm-Schale wurden 7×10^5 HEK293T-Zellen, $3 - 5 \times 10^5$ SH-SY5Y-Zellen, 5×10^5 HeLa-Zellen und $3 - 8 \times 10^5$ embryonale Maus-Fibroblasten (engl. *Mouse Embryonic Fibroblasts* = MEF) ausplattiert. Pro 10 cm-Schale wurden für die Ca₃(PO₄)₂-Transfektion 1×10^6 HEK293T-Zellen ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden 3×10^5 SH-SY5Y-Zellen und 5×10^5 HeLa-Zellen auf sterilen Glasplättchen in 3,5 cm-Schalen ausplattiert.

4.2.1.2. Transiente Transfektion

4.2.1.2.1. Transiente Transfektion von Expressionskonstrukten mit Lipofectamin

Für die transiente Transfektion von Expressionskonstrukten mit Lipofectamine und Plus-Reagenz wurden die Zellen in 3,5 cm- oder 10 cm-Schalen ausplattiert und am Tag danach transfiziert. Hierfür wurden zunächst folgende zwei Transfektions-Mixe angesetzt.

	Für 3,5 cm-Schalen	Für 10 cm-Schalen
Mix A	Pro Schale: <ul style="list-style-type: none"> • - 100 µL OptiMEM • - Jeweils 0,2 – 0,5 µg Vektor • - 6 µL Plus Reagenz 	Pro Schale: <ul style="list-style-type: none"> • - 400 µL OptiMEM • - Jeweils 1 – 5 µg Vektor • - 25 µL Plus Reagenz
Mix B	Pro Schale: <ul style="list-style-type: none"> • - 100 µL OptiMEM • - 8 µL Lipofectamin 	Pro Schale: <ul style="list-style-type: none"> • - 400 µL OptiMEM • - 33 µL Lipofectamin

Beide Mixe wurden 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, anschließend gemischt und wiederum 15 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeiten wurden die Zellen einmal mit Medium ohne fötales Kälberserum (FKS / FCS) und Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) gewaschen und 800 µL (für 3,5 cm-Schalen) bzw. 5,2 mL (pro 10 cm-Schale) OptiMEM zugegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 200 µL Transfektions-Mix pro Zellkulturschale zugegeben und die Schale vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen 3 h im Brutschrank inkubiert und danach das Transfektions-Medium durch normales Zellkulturmedium mit FKS und Pen/Strep ausgetauscht. Die Ernte der Zellen erfolgte 24 h nach der Transfektion.

4.2.1.2.2. Transiente Tranfektion von Expressionskonstrukten mit Kalziumphosphat

CaCl₂-Transfektionlösung: 2,5 mM CaCl₂ in H₂O

HeBs: 50 mM HEPES pH 6,85, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄

Für die Transfektion von Expressionskonstrukten mit Kalziumphosphat (Ca₃(PO₄)₂) wurden 1x 10⁶ HEK293T-Zellen pro 10 cm-Schale ausplattiert. Am folgenden Tag wurde mindestens 1 h vor der Transfektion das Medium abgesaugt und 7 mL DMEM + 10 % FKS ohne Pen/Strep zugegeben. Der Transfektions-Mix wurde wie folgt hergestellt: In einem Polystyrol-Röhrchen wurde die DNA vorgelegt und pro zu transfizierender Schale 50 µL steriles Kalziumchlorid (CaCl₂) (2,5M) sowie 450 µL H₂O zugegeben. Anschließend wurden unter dauerndem Mischen 500 µL HeBs-Puffer tropfenweise zu pipettiert. Der Reaktions-Mix wurde 15 min bei RT inkubiert, bevor er ebenfalls tropfenweise unter dauerndem Schwenken der Zellkulturschalen auf die Zellen pipettiert werden konnte. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium auf den Zellen nochmals gewechselt und durch Medium mit FKS und Pen/Strep ersetzt. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion.

4.2.1.2.3. Transiente Transfektion mit siRNA

Die Transfektion mit siRNA erfolgte revers mit Lipofectamine RNAiMAX. Hierfür wurde zunächst folgender Transfektions-Mix hergestellt und für 15 min bei RT inkubiert:

Für 3,5 cm-Schalen:

- - 500 µL OptiMEM
- - 5 µL siRNA (Stammlösung 20 µM)
- - 5 µL Lipofectamin RNAiMAX

Für 10 cm-Schalen:

- - 2 mL Optimum
- - 20 µL siRNA (Stammlösung 20 µM)
- - 20 µL Lipofectamin RNAiMAX

Während der Inkubationszeit wurden die Zellen wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben trypsiniert und in OptiMEM aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt und bei 1000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren mit der gewünschten Zelldichte in OptiMEM wurde die Zellsuspension zusammen mit dem Transfektions-Mix auf die Zellkulturschalen verteilt und beides durch Schwenken miteinander vermischt. Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. 16 – 24 h nach der Transfektion wurde das OptiMEM von den Zellen abgenommen und durch normales Zellkulturmedium mit FKS und Pen/Strep ersetzt. Die Zellernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

4.2.1.3. Behandlung von Zellen mit Toxinen

Zur Behandlung von Zellen wurden die verwendeten Toxine und Inhibitoren im entsprechenden Zellkulturmedium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Die Zellen wurden nach einer Transfektion einmal mit Medium gewaschen, bevor das die Toxine enthaltende Medium zugegeben werden konnte. Auf 3,5 cm-Schalen wurde mindestens 1 mL Medium gegeben, für 10 cm-Schalen benötigt man mindestens 5 mL. Die entsprechenden Konzentrationen der Toxine und Inhibitoren finden sich im Kapitel 4.1.6.

4.2.1.4. Zellernte

Vor dem Ernten der Zellen wurden diese einmal mit 2 mL PBS (für 3,5 cm-Schalen) bzw. 8 mL PBS (für 10 cm-Schalen) gewaschen. Anschließend wurde 1 mL PBS in jede Schale gegeben und die Zellen mit einem Zell-Schaber von der Schale abgeschabt. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert, die Zellsuspension in ein 1,5 mL oder 2 mL Eppendorf-Gefäß überführt und bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

4.2.1.5. Indirekte Immunfluoreszenz-Färbungen

Fixierlösung:	3,7 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS
Permeabilisierungs-Puffer:	0,2 % Triton X100 in PBS
Blocking-Puffer:	5 % Ziegen Serum, 0,2 % Triton X100 in PBS
Eindeckmedium:	Pro 20 mL: 6 g Glycerin, 2.4 g Mowiol, 0,12M TRIS pH 8.5

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen auf sterilen Glasplättchen in 3,5 cm-Schalen ausplattiert. Zur Färbung der Zellen wurden die Glasplättchen in eine 12-Well-Platte überführt und jeweils einmal mit 1 mL PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen auf den Plättchen fixiert, indem sie 10 min in Fixierlösung bei RT inkubierten. Nach der Fixierung wurden die Plättchen erneut zweimal mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellen 1 mL Permeabilisierungs-Puffer zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit PBS wurden die Glasplättchen in eine feuchte Kammer überführt und mit jeweils 50 µL Blocking-Puffer 1 h bei RT inkubiert. Die Primärantikörper wurden 1:500 bis 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt und 50 µL dieser Lösung auf die Glasplättchen gegeben. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am kommenden Tag wurden die Plättchen dreimal mit PBS gewaschen, bevor 50 µL der Sekundärantikörper-Lösung (Alexa gekoppelte Antikörper 1:1000 in PBS verdünnt) zugegeben wurden. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 1 h bei RT, bevor die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit 0,1 % Tween 20 in PBS gewaschen wurden. Zuletzt wurden die Plättchen auf einem Objektträger mit Eindeckmedium eingedeckt. Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit dem Axiovert Epifluoreszenz Mikroskop der Firma Carl Zeiss ausgewertet und mit Hilfe der Axiovision Software Bilder aufgenommen.

4.2.1.5.1. Caspase Assay

Primärantikörper:	Kaninchen anti-aktive Caspase-3
Sekundärantikörper:	Ziege anti-Kaninchen Alexa 555

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde ein Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 verwendet. Die Zellen wurden hierfür auf Glasplättchen ausplattiert, mit verschiedenen Expressionskonstrukten und mit EYFP als Transfektionsmarker bzw. mit siRNA transfiziert und weitere 18 – 24 h später mit verschiedenen Stressoren behandelt, mit MPP⁺ (7,5 mM) für 4 h oder Staurosporin (1 µM) für 5 h. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen aktive Caspase-3 durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. Die Analyse der Färbungen erfolgte am

Epifluoreszenz Mikroskop der Carl Zeiss Jena. Die Zahl der apoptotischen Zellen wurde durch das Auszählen der aktiven-Caspase-3-positiven Zellen ermittelt. Pro Deckgläschen wurden mindestens 300 Zellen verblindet gezählt. Die Apoptose-Rate in % wurde als Quotient von aktive-Caspase-3-positiven Zellen durch die Gesamtanzahl an transfizierten Zellen angegeben.

4.2.1.5.2. Untersuchung der mitochondrialen Morphologie

Primärantikörper: Kaninchen anti-Tom20

Sekundärantikörper: Ziege anti-Kaninchen Alexa 555

Zur Untersuchung der mitochondrialen Morphologie wurde ein Antikörper gegen das mitochondriale Membranprotein Tom20 verwendet. Es wurden SH-SY5Y-Zellen auf Glasplättchen ausplattiert und mit verschiedenen Expressionskonstrukten zusammen mit dem mitochondrialen Fissionsprotein Drp1 oder mit PACRG-siRNA transfiziert. Die Überexpression von Drp1 führt in den Zellen zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes. Die transfizierten Zellen wurden durch gleichzeitige Transfektion von EYFP markiert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Mitochondrien mit einem anti-Tom20 Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. Die gefärbten Zellen wurde mit Hilfe des Epifluoreszenz Mikroskops der Firma Carl Zeiss Jena analysiert. Pro Deckgläschen wurden mindestens 300 Zellen verblindet ausgezählt und unterschiedlichen Kategorien zugeordnet. Erschien das mitochondriale Netzwerk tubulär und nicht fragmentiert, so wurden diese Zellen der Kategorie „tubulär“ zugeordnet. War eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes oder eine Kondensierung der Mitochondrien um den Zellkern herum erkennbar wurden die Zellen der Kategorie „nicht-tubulär“ zugeordnet. Die Rate an Zellen mit nicht-tubulärem mitochondrialen Netzwerk in % wurde als Quotient von Zellen mit nicht-tubulärem mitochondrialen Netzwerk durch die Gesamtanzahl an transfizierten Zellen angegeben.

4.2.1.5.3. Mitophagie Assay

Primärantikörper: Kaninchen anti-Tom20

Maus anti-Parkin

Maus anti-HA

Sekundärantikörper: Ziege anti-Kaninchen Alexa 555

Ziege anti-Maus Alexa 488

Zur Analyse von Mitophagie wurden HeLa- oder SH-SY5Y-Zellen auf Glasplättchen ausplattiert und 24 h später mit verschiedenen Expressionskonstrukten oder siRNA sowie mit Parkin transfiziert. 3 – 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 μ M CCCP für 1 h und für 24 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert. Die Mitochondrien wurden mit einem anti-Tom20 Antikörper, die transfizierten Zellen mit einem anti-Parkin bzw. anti-HA Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt. Die angefärbten Zellen wurden mit Hilfe des Epifluoreszenz Mikroskops der Firma Carl Zeiss Jena analysiert. Pro Deckgläschen wurden mindestens 300 Zellen verblindet ausgezählt. Es wurden ausschließlich transfizierte Zellen gezählt. Die Mitophagie-Rate in % wurde als Quotient von Zellen ohne Mitochondrien durch die Gesamtanzahl an transfizierten Zellen angegeben.

4.2.1.6. Luciferase-Reportergen-Assay

Um die Aktivierung eines NF- κ B-Bindestellen enthaltenden Promotors zu untersuchen wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Hierfür wurden HEK293T-Zellen in 12-Well-Platten ausplattiert und am Tag darauf mit einem Luciferase-Reportergen-Konstrukt sowie verschiedenen Expressionsvektoren oder siRNA transfiziert. 18 – 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, das Zellpellet in 200 μ L *Reporter Lysis Buffer* resuspendiert, gevortext und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mittels des Luciferase-Assay-Systems der Firma Promega am Luminometer. Hierfür wurden 20 μ L Zelllysat pro Well einer schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. 100 μ L Substrat für die Luciferase-Reaktion wurden im Luminometer automatisch direkt auf die Probe gegeben und die Luciferase-Aktivität direkt über einen Zeitraum von 5 sec vermessen. Die Luciferase-Aktivität der einzelnen Proben wurde auf eine interne Kontrolle normalisiert. Die Aktivität dieser Kontrolle wurde auf eins gesetzt.

4.2.2. Nukleinsäuremethoden

4.2.2.1. Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Kompetente *E. coli* (DH5 α ; Genotyp: *supE44*, *Δ lac169*, (*ϕ 80lacZ Δ M15*), *hsdR17*, *recA1*, *en-*
Bakterien: *dA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*; Herkunft: Hanahan und Meselson, 1983)

Stellar™ kompetente Bakterien (*E. coli*)

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde diese in kompetente Bakterien eingebracht, die Bakterien über Nacht kultiviert und anschließend die Plasmid-DNA aus diesen Bakterien aufgereinigt. 1 μ L Plasmid-DNA bzw. 10 μ L eines Ligationsansatzes wurden auf 30 μ L einer

Suspension chemokompetenter *E. coli* Bakterien gegeben und diese Suspension 20 min auf Eis inkubiert. Damit die DNA in die Zellen aufgenommen wird, wurden die Bakterien anschließend für 90 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen. Nach Zugabe von 500 µL LB-Medium (für DH5α) oder 500 µL SOC-Medium (für Stellar™ kompetente Bakterien) wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37 °C geschwenkt. Hiernach wurde die Suspension auf einer LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Inkubator inkubiert.

4.2.2.2. Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren wurde eine Übernacht-Flüssigkultur von transformierten *E. coli* Bakterien für 15 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Isolierung von DNA erfolgte anschließend mit Hilfe des Nucleospin Plasmid Mini Kits oder des DNA Midi Extraktionskits der Firma Machery und Nagel entsprechend den Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nano-Photometer ermittelt.

4.2.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction* = PCR). Hierfür wurden Primer entworfen, die an das 5' und das 3' Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments binden. Für die Reaktion wurde je nach verwendeter Polymerase folgender Mix angesetzt:

	Pwo Polymerase:	Q5 Polymerase:
DNA-Matrize:	100 ng	100 ng
Primer:	20 pmol	10 pmol
Reaktionspuffer:	5 µL	5 µL
<i>High GC Enhancer:</i>		5 µL
Polymerase:	5 U	0,5 µL
dNTPs:	0,5 mM	0,4 mM
Gesamtvolumen:	50 µL	50 µL

Die PCR-Reaktion erfolgte im Thermo-Cycler mit folgendem Programm:

Wiederholungen:	Reaktion:	Temperatur:	Zeit:
1x	Denaturierung	95 °C	2 min
28x	Denaturierung	95 °C	30 sec (Pwo) 10 sec (Q5)
	Primer Anlagerung	55 – 65 °C	30 sec
	Elongation	72 °C	1 – 4 min (Pwo) 30 sec – 2 min (Q5)
1x	End-Elongation	72 °C	10 min
	Kühlung	4 – 18 °C	∞

4.2.2.4. Restriktionsverdau

Zur Klonierung von Plasmiden wurden 50 µL einer PCR-Reaktion bzw. 5 µg Vektor in einem Volumen von 40 µL für den Restriktionsverdau eingesetzt. Für den Kontroll-Verdau einer Klonierung wurde ein Ansatzvolumen von 20 µL gewählt, welches 5 µL der DNA-Mini-Präparation des Ligationsansatzes enthielt. Der Verdau erfolgte mit Enzymen von New England Biolabs oder Fermentas in dem für das Enzym geeigneten Puffer nach Herstellerangaben bei 37 °C für 1 – 4 h.

4.2.2.5. Ligation

Für die Ligationen eines vorverdauten PCR-Produktes in einen ebenfalls vorverdauten Vektor wurde ein 20 µL Reaktionsansatz gewählt. Dieser Ansatz enthielt 2 µL 10x Ligationspuffer und 1 µL T4-DNA-Ligase (5 U/µL, Fermentas). Die Mengen an PCR-Produkt und Vektor wurden anhand eines Agarosegels im Vergleich zum Größenmarker abgeschätzt und so eingesetzt, dass ungefähr die fünffache Menge PCR-Produkt im Verhältnis zum Vektor verwendet wurde. Der Ligationsansatz wurde 16 h bei RT inkubiert.

4.2.2.6. In-Fusion Klonierung

Zur Klonierung mit Hilfe des In-Fusion Klonierungs-Kits der Firma Clontech wurde zunächst der Zielvektor mit Hilfe eines Restriktionsverdaus linearisiert. Für das *Insert* (in den Vektor einzusetzendes DNA-Fragment) wurden Gen-spezifische Primer mit 15 Bp Überhang

komplementär zum linearisierten Vektor geplant und das *Insert* mit diesen Primern mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden ca. 50 – 100 ng *Insert* und linearisierter Vektor mit 1 µL In-Fusion HD Enzym Premix gemischt, der Mix auf ein Gesamtvolumen von 5 µL mit deionisiertem Wasser aufgefüllt und 15 min bei 50 °C inkubiert. Nach der Ligation wurde 1 µL dieses Mixes direkt in Stellar™ kompetente Bakterien transformiert.

4.2.2.7. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

TBE-Puffer: 89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH 8.0

Agarosegel: 1 % Agarose in TBE-Puffer

6x DNA-Probenpuffer: 50 % TE, 50 % Glycerin, 0,02 % Xylencyanol, Bromphenolblau

Zur Analyse von Nukleinsäure-Proben wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit dem 1 kb DNA-Größenmarker auf 1 %ige Ethidiumbromid Agarosegele aufgetragen und unter einer Spannung von 100 V in TBE-Puffer der Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht (256 nm) sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde zuletzt mit Hilfe des Nucleospin Extract Kits nach Herstellerangaben aus dem Gel aufgereinigt und in deionisiertem Wasser eluiert.

4.2.2.8. Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren am Nano-Photometer

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde am Nano-Photometer bestimmt. Die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm wurde mit dem Faktor 50 für DNA und dem Faktor 40 für RNA vom Gerät in die Konzentration in µg/µL umgerechnet. Zur Abschätzung der Reinheit der Probe wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, dem Bereich des Lichtes, in dem aromatische Aminosäuren ihr Absorptions-Maximum haben. Hierdurch können eventuelle Verunreinigungen der Probe mit Proteinen erkannt werden. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte für DNA < 1,7 und für RNA < 2,0 sein.

4.2.2.9. Generierung von DNA-Expressionskonstrukten

4.2.2.9.1. HA-PACRG pcDNA3.1

PACRG mit HA-Tag wurde in den pcDNA3.1 Vektor umklontiert. Hierfür wurde PACRG mit den Primern PACRG-fusion_for und PACRG_EcoRI_rev und der HA-Tag mit den Primern HA_for sowie HA-fusion_rev aus dem HA-PACRG pCMV Vektor mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden beide PCR Produkte über eine weitere PCR mit den Primern HA_for und

PACRG_EcoRI_rev miteinander fusioniert. Das fusionierte PCR-Produkt und der Vektor pcDNA3.1/Zeo(-) wurden mit den Restriktionsenzymen ApaI und EcoRI geschnitten und anschließend miteinander ligiert.

4.2.2.9.2. PACRG pcDNA3.1

Zur Klonierung von ungetagtem PACRG wurde PACRG aus dem HA-PACRG pcDNA3.1 Vektor mit den Primern Inf_PACRG_for und Inf_PACRG_rev amplifiziert. Das PCR Produkt wurde in den mit EcoRI linearisierten pcDNA3.1/Zeo(+) Vektor mit Hilfe des In-Fusion Klonierungs-Kits (Clontech) nach Herstellerangaben ligiert.

4.2.2.9.3. HOIP pcDNA3.1

Zur Klonierung von ungetagtem HOIP wurde HOIP aus dem HA-HOIP pcDNA3.1 Vektor mit den Primern Inf_HOIP_pcDNA_for und Inf_HOIP_pcDNA_rev amplifiziert. Das PCR Produkt wurde in den mit EcoRV linearisierten pcDNA3.1/Zeo(+) Vektor mit Hilfe des In-Fusion Klonierungs-Kits (Clontech) nach Herstellerangaben ligiert.

4.2.2.10. **Isolierung von RNA**

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die RNA-Probe wurde noch auf der Säule für 15 min bei RT mit DNase (Qiagen) inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit dem Nano-Photometer durch Messung der Absorption bei 260 nm.

4.2.2.11. **Reverse Transkription**

Für die reverse Transkription wurden 0,5 µg RNA eingesetzt und mit dem iScript cDNA-Synthese Kit (Biorad) nach Herstellerangaben mit dem folgenden Reaktionsprotokoll in cDNA umgeschrieben.

Reaktion:	Zeit:	Temperatur:
Inkubation:	5 min	25 °C
cDNA-Synthese:	30 min	42 °C
RNA-Hydrolyse:	5 min	85 °C
Abkühlung:	∞	4 °C

4.2.2.12. Semiquantitative RT (*real-time*) - PCR

Für die semiquantitative *real-time*-PCR wurden die Primer so entworfen, dass sie ein PCR-Produkt von 100 - 250 Bp generieren, eine Schmelztemperatur von 58-62 °C besitzen und Exon flankierend für das jeweilige Gen sitzen. Dadurch kann ausschließlich die cDNA amplifiziert werden, nicht aber eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA. Als interne Kontrolle wurde die Quantifizierung der β -Actin-cDNA genutzt.

Die RT-PCR wurde für jedes Proben/Primer-Paar in Triplikaten durchgeführt. Zunächst wurden folgende Mixe angesetzt:

	Komponenten:	Volumen pro Probe:
Primer-Mix:	DEPC Wasser	7,5 μ L
	Primer for und rev (vorverdünnt aus 5 pmol)	1 μ L
cDNA-Mix:	SYBR Green	10 μ L
	cDNA	1,5 μ L
<i>No template</i> -Kontrolle (NTC):	DEPC Wasser	1,5 μ L
	SYBR Green Mix	10 μ L

Die Mixe wurden nach dem Ansetzen gevortext und abzentrifugiert. Anschließend wurden pro Well einer 96-Well *MicroAmp* Platte 8,5 μ L Primer-Mix und 11,5 μ L cDNA-Mix bzw. NTC-Mix zusammen pipettiert. Die Platte wurde für 1 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und mit dem *Fast real-time* System 7500 gemessen.

Die relative Quantität der jeweiligen cDNA im Vergleich zu β -Aktin und einer internen Kontrollprobe wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Die Qualität der verwendeten Primer wurde anhand einer am Ende der PCR gemessenen Schmelzkurve überprüft.

4.2.3. Proteinanalytische Methoden

4.2.3.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Lysepuffer: 1 % Triton X 100 in PBS

Zur Herstellung von Zellextrakten für weitere biochemische Analysen wurden die Zellen geerntet (4.2.1.4) und abzentrifugiert und anschließend je nach experimentellem Aufbau in unterschiedlichen Mengen Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend gevortext.

4.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinmenge von Zelllysaten wurde photometrisch nach Bradford bestimmt. Hierbei wurden 5 µL der Probe mit 200 µL Bradford-Reagenz in einer 96-Well ELISA-(*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)-Platte gemischt, 5 min bei RT inkubiert und im ELISA-Plattenlesegerät die Absorption bei 595 nm gemessen. Bei der Bradford-Reaktion reagiert der Farbstoff Triphenylmethan-Coomassie Brilliant Blue G-250 mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Aminosäuren und ändert sein Absorptionsmaximum von 470 auf 595 nm. Zur genauen Quantifizierung der Proteinmenge der Proben wurde eine BSA-Standardreihe mitgeführt.

4.2.3.3. SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese)

APS:	10 % in H ₂ O bidest.
Sammelgel-Puffer:	pH 6,8, 0,5 M TRIS, 0,4 % SDS
Trenngel-Puffer:	pH 8,8, 1,5 M TRIS, 0,4 % SDS
Laemmli-Probenpuffer:	4x: 240 mM TRIS pH 6,8, 4 % SDS, 40 % Glycerol, Bromphenolblau
SDS-Gel-Laufpuffer:	25 mM TRIS, 0,189 M Glycine, 1 % SDS

Die zu analysierenden Proteine wurden anhand ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingung mit SDS-(Sodium Dodecylsulfat)-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurde zunächst Laemmli-Puffer + 10 % β-Mercaptoethanol zu den Proteinproben gegeben und diese dann für 10 min bei 95 °C gekocht. 10 – 20 µg der vorbereiteten Proben wurden anschließend zusammen mit einem Größenmarker (*SeeBlue Pre-stained protein ladder*) auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, welches aus einem 10-12 %igen Trenngel und einem 4 %igen Sammelgel zusammengesetzt war. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer unter einer Stromstärke von 25 mA pro Gel durchgeführt.

Die verwendeten Gele setzten sich wie folgt zusammen:

	Sammelgel:	10 % Trenngel:	12 % Trenngel:
H ₂ O	3,3 mL	4 mL	3,6 mL
Puffer	1,25 mL	2 mL	2 mL
Acrylamid	0,5 mL	2 mL	2,4 mL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL
APS	15 µL	15 µL	15 µL

4.2.3.4. Western Blot / Immunoblot

Transfer-Puffer: 24,9 mM Tris, 0,192mM Glycine

Blockpuffer: 5 % Milchpulver in TBST

TBST: 0,14 M NaCl, 0,02 M TRIS pH 7.6 , 0,1 % Tween 20

Die durch die SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der Western Blot Methode, auch Immunoblot genannt, auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)- oder Nitrozellulose-Membran übertragen. Die PVDF-Membranen wurden zunächst kurz mit Ethanol aktiviert und mit Wasser gewaschen. Die Nitrozellulose-Membranen wurden in Transfer-Puffer equilibriert. Das Blotten der Proteine auf diese Membranen wurde in der Biorad Blot-Kammer in Transfer-Puffer unter einer Stromstärke von 400 mA über 1 h durchgeführt.

Nach Beendigung der Protein-Transfers wurden die Nitrocellulose-Membranen 10 min in PBS gekocht und anschließend zusammen mit den PVDF-Membranen in Blockpuffer 1 h bei RT geschwenkt.

Die Inkubation mit dem 1:1000 in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf den Rotationsschüttler.

Am folgenden Tag wurden die Membranen dreimal mit TBST gewaschen und anschließend mit dem Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper auf dem Schwenker 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in TBST konnten die Membranen mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) System entwickelt werden. Die Reaktion der Peroxidase mit dem ECL Substrat führte zur Emission von Licht, welches durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird.

4.2.3.5. Gelfiltration

Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 , 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl

Zur größenabhängigen Fraktionierung von Proteinen wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Hierfür wurden die aus 10 cm-Schalen gepoolten Zellen geerntet, in 1 mL Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde mit einer 1 mL Spritze 20x durch eine 20 G Kanüle (Braun) gezogen und anschließend für 15 min bei 4 °C und 15000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der Probe durch Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 4.2.3.2) ermittelt. Die Superdex 200 HR 10/30 Säule wurde in das Äkta XXX System eingebaut

und mit Elutionspuffer equilibriert. Es wurden 2 – 3 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 500 µL auf eine Superdex 200 HR 10/30 Säule gegeben und mit Elutionspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 mL/min eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 500 µL aufgefangen und für SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet.

4.2.3.6. Löslichkeits-Assay

Lysepuffer: 0,5 % Triton X 100 in PBS, 0,5 % DOC (Deoxycholat)

Um die Löslichkeit von Proteinen zu analysieren wurde ein Löslichkeits-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen einer 3,5 cm-Schale geerntet, in 180 µL Lysepuffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. 150 µL Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µL 4x Laemmli Puffer + 10 % β-Mercaptoethanol versetzt. Diese Probe wurde als Überstand-Fraktion (S = engl. *Supernatant*) bezeichnet. Der restliche Lysepuffer wurde vom Pellet abgenommen und verworfen und das Pellet mit 300 µL PBS gewaschen und anschließend in 200 µL 2x Laemmli Puffer + 10 % β-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Pellet-Proben wurden 30 min bei 50 °C und 600 rpm im Thermo-Schüttler inkubiert. Die Analyse der beiden Fraktionen (S = Überstand, P = Pellet) erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

4.2.3.7. Ko-Immunpräzipitation

Lysepuffer: 0,5 % Triton X 100 in PBS

Beads: Anti-c-Myc-Agarose *Beads*
Monoclonal Anti-HA-Agarose *Beads*

Um Interaktionen von Proteinen zu analysieren wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierfür wurden 1 µg Plasmid-DNA der zu untersuchenden Proteine pro 10 cm-Schale in HEK293T-Zellen mit Kalziumphosphat transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium auf den Zellen gewechselt und am Tag zwei nach der Transfektion die Zellen geerntet, in 1 mL Lysepuffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend sofort für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Als sogenannte Input-Kontrolle wurden 50 µL der Probe abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µL 2x Laemmli-Puffer + 10 % β-Mercaptoethanol versetzt und 10 min bei 95 °C gekocht.

Für die Immunpräzipitation wurden die Überstände mit Antikörper-gekoppelten *Beads* auf dem Schwenker inkubiert. Vor der Zugabe zu den Proben wurden die benötigten Antikörper-gekoppelten *Beads* zweimal mit PBS und zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Nach der Inkubation mit den *Beads* wurden die Suspensionen 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und 50 μ L des Überstandes als sogenannte Output-Kontrolle abgenommen und für SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet. Die *Beads* wurden zweimal mit Lysepuffer und zweimal mit PBS gewaschen, mit 2x Laemmli Puffer + 10 % β -Mercaptoethanol versetzt und für SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet.

4.2.3.8. Immunpräzipitation von endogenem HOIP

Nicht denaturierender Lysepuffer:	1 % Triton X 100 in PBS
Antikörper:	Kaninchen Anti-RNF31 (HOIP) Sigma SAB2102031 Kaninchen Anti-c-Myc
<i>Beads</i> :	Protein-A-Sepharose

Um die Auto-Inhibierung von HOIP zu untersuchen wurde endogenes Protein mit Hilfe eines anti-HOIP Antikörpers immunpräzipitiert, welcher an die HOIP-LDD-Domäne bindet. Hierfür wurden 1 μ g PACRG oder pCDNA3.1-Leervektor pro 10 cm-Schale in HEK293T-Zellen mit Kalziumphosphat transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium auf den Zellen gewechselt und am Tag zwei nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, in 1 mL Lysepuffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend sofort für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Als sogenannte Input-Kontrolle wurden 50 μ L der Probe abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 50 μ L 2x Laemmli-Puffer + 10 % β -Mercaptoethanol versetzt und 10 min bei 95 °C gekocht.

Für die Immunpräzipitation wurden die Überstände mit 1 μ L anti-HOIP Antikörper oder 1 μ L anti-Myc Antikörper (als Kontrolle) über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenker inkubiert. Am folgenden Tag wurden die benötigten Protein-A-Sepharose-*Beads* zweimal mit PBS und zweimal mit Lysepuffer gewaschen bevor sie zu den Proben gegeben wurden. Die Proben wurden anschließend mit den *Beads* für 4 h bei 4 °C auf dem Schwenker inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Suspensionen 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die *Beads* wurden zweimal mit Lysepuffer und zweimal mit PBS gewaschen, mit 2x Laemmli Puffer + 10 % β -Mercaptoethanol versetzt und für SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet.

4.2.3.9. Nachweis linearer Ubiquitin-Ketten mittels Immunpräzipitation

Lysepuffer 1: 1 % SDS in PBS

Lysepuffer 2: 1 % Triton X 100 in PBS

Zum Nachweis der linearen Ubiquitinierung von Proteinen wurden zunächst pro Probe 2 – 4 10 cm-Schalen mit 2×10^6 HEK293T Zellen ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Kalziumphosphat transfiziert und am Tag zwei nach der Transfektion behandelt und geerntet. Es wurden pro Probe die Zellen von zwei Schalen in einem Reaktionsgefäß gepoolt.

Das Zellpellet wurde in 1 mL 1 % SDS in PBS (Lysepuffer 1) resuspendiert, gevortext und 10 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben zum homogenisieren mit Hilfe einer 1 mL Spritze siebenmal durch eine G-20 Kanüle (Braun) gezogen und in ein 15 mL Falcon überführt. Nach der Zugabe von 9 mL kaltem 1 % Triton X 100 in PBS wurden die Proben 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt. Um die Expression der eingebrachten DNA zu überprüfen, wurden 50 µL Lysat als Input-Kontrolle entnommen, mit 50 µL 2x LSB + 10 % β -Mercaptoethanol vermischt und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Über Nacht wurde das Lysat mit 15 µg rekombinantem Protein (Strep-Tag II WT UBAN) bei 4 °C unter sanftem Schwenken inkubiert. Bei rekombinantem UBAN handelt es sich um die UBAN-Domäne von NEMO, die mit einem Strep-Tag II versehen ist und spezifisch lineare Ubiquitin-Ketten erkennt und bindet. Am Folgetag der Inkubation mit rekombinantem UBAN wurden pro Ansatz 20 µL Strep-Tactin *Beads* zweimal mit PBS und zweimal mit 1 % Triton X 100 in PBS gewaschen und zu den Proben gegeben um an die UBAN-Domäne gebundene Proteine mit linearen Ubiquitin-Ketten zu präzipitieren. Strep-Tactin *Beads* binden den Strep-Tag II der rekombinanten UBAN-Domäne. Die Inkubation mit den *Beads* erfolgte für 4 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Nach Ende der Inkubation wurden die Proben 5 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen, alle *Beads* der gleichen Proben gepoolt und erneut zweimal mit 1 % Triton X 100 in PBS und zweimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die *Beads* in 50 – 80 µL 2x Laemmli Puffer + 10 % β -Mercaptoethanol aufgenommen und 10 min bei 95 °C gekocht. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

4.2.3.10. Radioaktive Markierung von Proteinen – Pulse/Chase Experimente

Hunger-Medium:	DMEM -Met
Medium zur radioaktiven Markierung:	DMEM -Met + 300 $\mu\text{Ci/mL}$ ^{35}S -(Schwefel)-ProMix
Lysepuffer:	0,5 % Triton X 100 in PBS
Beads:	anti-HA Agarose- <i>Beads</i>

Zur Analyse der Stabilität von Proteinen bzw. der Geschwindigkeit des Abbaus spezifischer Proteine in der Zelle, wurden sogenannte Pulse/Chase Experimente durchgeführt. Hierfür wurden 7×10^5 HEK293T-Zellen pro 3,5 cm Schale ausplattiert und am Folgetag mit HA-PACRG oder HA-HOIP oder einer Kombination beider Proteine transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst zweimal mit Methionin-freiem Zellkulturmedium gewaschen und für 30 min bei 37 °C in diesem Medium inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt und pro Well 500 μL Medium zugegeben, welches 300 $\mu\text{Ci/mL}$ ^{35}S -(Schwefel)-ProMix enthielt. Die schweren Schwefel-Isotope werden in das Methionin der in den Zellen neu synthetisierten Proteine eingebaut und so diese Proteine radioaktiv markiert. Diese radioaktive Markierung wird auch *Pulse* genannt. Die Zellen wurden für 1 h in diesem Medium inkubiert und anschließend zweimal mit normalem Medium gewaschen. Für die weitere Dauer des Versuches wurden die Zellen in normalem Medium inkubiert. Die Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der radioaktiven Markierung (*Pulse*) geerntet. Die Zeitspanne zwischen dem *Pulse* und der Zellernte wird als *Chase* bezeichnet. Für den hier durchgeführten Versuch wurden als Chase-Zeiten 0 h, 30 min, 3 h und 8 h gewählt. Die Zellen wurden nach der Ernte in 500 μL Lysepuffer lysiert, 5 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die HA-getagten Proteine mit Hilfe von anti-HA-gekoppelten Agarose-*Beads* immunpräzipitiert. Hierfür wurden die Überstände über Nacht bei 4 °C unter dauerndem Schwenken mit den gewaschenen *Beads* inkubiert. Am Folgetag wurden die *Beads* für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C herunter zentrifugiert, der Überstand verworfen und die *Beads* zweimal mit Lysepuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden 50 μL 2x Lämmli-Probenpuffer zu den *Beads* gegeben und diese für 10 min bei 95 °C gekocht. Die Proteine der Proben wurden mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, die Gele getrocknet und die radioaktiv markierten immunpräzipitierten Proteine durch Exposition eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

4.2.4. Mausmethoden

4.2.4.1. Tierhaltung

Die Haltung der verwendeten Mauslinien erfolgte artgerecht gemäß dem Tierschutzgesetz (TSchG). Die Tiere waren einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus ausgesetzt mit Futter und Wasser *ad libitum*.

4.2.4.2. Präparation primärer kortikaler Neuronen

Poly-L-Lysin: 100 µg/mL Poly-L-Lysin in H₂O

HBSS + HEPES: HBSS + 10 µM HEPES

Papain-Medium: 200 U Papain, 0,01 g Cystein in 10 mL DMEM GlutaMax (ohne FCS und Pen/Strep)

Primäre kortikale Neuronen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Platten ausplattiert. Hierfür wurde eine 100 µg/mL Poly-L-Lysin Lösung hergestellt, diese anschließend durch einen 0,2 µm Polyethylenstyrol-(PES)-Filter sterilfiltriert und 1,5 mL dieser Lösung pro 3,5 cm-Schale pipettiert. Die Schalen wurden über Nacht bei RT mit dem Poly-L-Lysin inkubiert und am Folgetag dreimal mit deionisiertem autoklavierten Wasser gewaschen.

Die Isolierung primärer kortikaler Neuronen erfolgte aus 14,5 – 15,5 dpc (engl. *days post coitum*, Tage nach dem Geschlechtsverkehr) alten Embryonen. Die schwangere Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet, die Embryonen entnommen und in PBS überführt. Die Gehirne wurden präpariert, die Meningen entfernt und die Kortizes in HBSS + HEPES überführt. Zur Dissoziation der Zellen wurden die Kortizes in steril-filtriertem Papain-Medium 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, einmal mit Medium (DMEM GlutaMax + 10 % FCS) gewaschen und anschließend in 3 mL Medium 10 – 20x mit einer 2 mL serologischen Pipette tituiert. Nach dem Sedimentieren der nicht vereinzelt Gewebeteile wurde der Überstand abgenommen und 5 min bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, die Zellsuspension in der Neubauer Kammer gezählt und mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 3,5 cm-Schale ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C für 3 h im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium in 2 mL Neurobasal + 1x B27 + Pen/Strep gewechselt wurde.

Die primären Neuronen wurden 3 – 5 Tage in Kultur gehalten, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

4.2.5. Statistik

Die Daten werden als Mittelwert +/- SEM (engl. *Standard Error of the Mean* = Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von Anova (engl. *Analysis of Variance*) oder dem *Students T-TEST* erstellt. Die P-Werte werden folgendermaßen angegeben: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Akt/PKB	Engl. <i>Alternatively Protein Kinase B</i>
Apaf-1	Engl. <i>Apoptose Protease Activating Factor-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP13A2	ATPase type 13A2
Bak	Engl. <i>Bcl-2 antagonist or killer</i>
Bax	Engl. <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	Engl. <i>B-cell Lymphoma 2</i>
Bcl-xl	Engl. <i>BCL-extra large</i>
BDNF	Engl. <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor
BID	Engl. <i>BH3- Interacting Domain Death Agonist</i>
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CCCP	Carbonyl Cyanide <i>m</i> -chlorophenyl Hydrazon
cDNA	Engl. <i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cIAP	Engl. <i>Cellular Inhibitor of Apoptosis</i>
Da	Dalton (relative Masse)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Engl. <i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
DOC	Desoxycholol
dpc	Engl. <i>days post coitum</i>
Drp1	Engl. <i>Dynamin Related Protein 1</i>
E. coli	<i>Escherischia coli</i>

ECL	Engl. <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EYFP	Engl. <i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FADD	Engl. <i>Fas-associated Death Domain Protein</i>
FasL	Fas Ligand
FKS/FCS	fötale Kälberserum
FLIP	Engl. <i>FLICE-like inhibitory protein</i>
g	Gramm
GFP	Engl. <i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
HBSS	Engl. <i>Hanks` Balanced Salt Solution</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-Ethansulfonsäure
HHARI	Engl. <i>Human Homolog of Drosophila Ariadne-1</i>
HIF	Engl. <i>Hypoxia Induced Factor</i>
HOIL-1L	Engl. <i>RBCK1, RanBP-type and C3HC4-type Zinc Finger-containing Protein-1</i>
HOIP	Engl. <i>HOIL-1L Interactin Protein</i>
HRP	Engl. <i>Horse Radish Peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
Hsp	Hitzeschock Protein
IFN	Interferon
IKK	I κ B-Kinase Komplex
IL	Interleukin
IL-R	Interleukinrezeptor
I κ B	Engl. <i>Inhibitor of κB</i>
JAK	Januskinase

k	Kilo ($\times 10^3$)
KD	Engl. <i>Knockdown</i> , Herunterregulation der Genexpression
kDa	Kilo-Dalton
KO	Engl. <i>Knockout</i> , Ausschalten von Genen
l	Liter
LB	<i>Luria Broth</i>
LDD	Engl. <i>Linear Ubiquitin Chain Determining Domain</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRRK2	Leucinreicher-Repeat-Serin/Threoninkinase
LUBAC	Engl. <i>Linear Ubiquitin Assambly Complex</i>
Lys	Lysin
m	Milli ($\times 10^{-3}$)
M	Molar
Mda	Mega-Dalton
MEF	Engl. <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MEM	Engl. <i>Minimal Essential Medium</i>
Mfn	Mitofusin
min	Minute
MOMP	Engl. <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation</i> , Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran
MPP+	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine
mRNA	Engl. <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
mTOR	Engl. <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NEMO	Engl. <i>NF-κB Essential Modulator</i>
NF- κ B	Engl. <i>Nuclear Factor κB</i>
NGF	Engl. <i>Neuronal Growth Factor</i> , neuronaler Wachstumsfaktor
NZF	Engl. <i>Nuclear Protein Localisation 4 Type Zinc Finger</i>
OPA1	Engl. <i>Optic Atrophy 1</i>
PACRG	Engl. <i>Parkin Coregulated Gene</i> , Parkin koreguliertes Gen

PaeI-R	Engl. <i>Parkin Associated Endothelin-like Receptor</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PES	Polyethylenstyrol
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PINK-1	Engl. <i>PTEN-induced Putative Kinase 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBR	Engl. <i>RING in between RING Domain</i>
RHL	Engl. <i>Rel Homology Region</i>
RING	Engl. <i>Really Interesting New Gene</i>
RNA	Engl. <i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
RNS	Engl. <i>Reactive Nitrogen Species</i> , reaktive Stickstoffspezies
ROS	Engl. <i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Engl. <i>Rounds Per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCF ^{βTrCP}	Engl. <i>Skp-cullin-F-box-βTrCP</i>
SDS	Engl. Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
SEM	Engl. <i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
Sharpin	Engl. <i>SHANK-associated RH Domain Interacting Protein in Postsynaptic Density</i>
siRNA	Engl. <i>Small Interfering RNA</i>
SMAC	Engl. <i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspase</i>
SOD	Superoxiddismutase
STAT	Engl. <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STS	Staurosporin
TBE	Tris/Boratsäure/EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin

TG	Thapsigargin
TLR	Engl. <i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	Engl. <i>NFR-associated Factor</i>
TRAIL	Engl. <i>TNF-related Apoptosis-inducing Ligand</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
Ub	Ubiquitin
UBA	Engl. <i>Ubiquitin-associated Domain</i>
UBAN	Engl. <i>Ubiquitin Assembly in ABIN and NEMO</i>
UBD	Engl. <i>Ubiquitin binding domains</i> , Ubiquitin-Bindedomänen
UBL	Engl. <i>Ubiquitin Like Domain</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	wildtyp
XIAP	Engl. <i>X-linked Inhibitor of Apoptosis</i>
ZF	Zinkfinger
α	anti
μ	Mikro ($\times 10^{-6}$)

III. REFERENZEN

Adachi, N., and Lieber, M.R. (2002). Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell* *109*, 807–809.

Ahn, J., and Gruen, J.R. (1999). The genomic organization of the histone clusters on human 6p21.3. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* *10*, 768–770.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.

Albig, W., Kioschis, P., Poustka, A., Meergans, K., and Doenecke, D. (1997). Human histone gene organization: nonregular arrangement within a large cluster. *Genomics* *40*, 314–322.

Ali, S., Vollaard, A.M., Widjaja, S., Surjadi, C., van de Vosse, E., and van Dissel, J.T. (2006). PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever. *Clin. Exp. Immunol.* *144*, 425–431.

Allen, N.J., and Barres, B.A. (2009). Neuroscience: Glia — more than just brain glue. *Nature* *457*, 675–677.

Alter, A., Fava, V.M., Huong, N.T., Singh, M., Orlova, M., Van Thuc, N., Katoch, K., Thai, V.H., Ba, N.N., Abel, L., et al. (2013). Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. *Hum. Genet.* *132*, 107–116.

Amerik AYU, Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D., and Hochstrasser, M. (1997). In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.* *16*, 4826–4838.

Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* *281*, 1305–1308.

Babu, J.R., Geetha, T., and Wooten, M.W. (2005). Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J. Neurochem.* *94*, 192–203.

Bakija-Konsuo, A., Mulić, R., Boraska, V., Pehlic, M., Huffman, J.E., Hayward, C., Marlais, M., Zemunik, T., and Rudan, I. (2011). Leprosy epidemics during history increased protective allele frequency of PARK2/PACRG genes in the population of the Mljet Island, Croatia. *Eur. J. Med. Genet.* *54*, e548–552.

Baldwin, A.S., Jr (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 649–683.

Bellare, P., Small, E.C., Huang, X., Wohlschlegel, J.A., Staley, J.P., and Sontheimer, E.J. (2008). A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 444–451.

Bellizzi, D., Dato, S., Cavalcante, P., Covello, G., Di Cianni, F., Passarino, G., Rose, G., and De Benedictis, G. (2007). Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13. *Genomics* *89*, 143–150.

- Bennett, W.I., Gall, A.M., Southard, J.L., and Sidman, R.L. (1971). Abnormal spermiogenesis in quaking, a myelin-deficient mutant mouse. *Biol. Reprod.* *5*, 30–58.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* *122*, 1–63.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* *171*, 603–614.
- Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, A.K., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D., et al. (2011). Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* *18*, 769–782.
- Bremm, A., Freund, S.M.V., and Komander, D. (2010). Lys11-linked ubiquitin chains adopt compact conformations and are preferentially hydrolyzed by the deubiquitinase Cezanne. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 939–947.
- Brody, K.M., Taylor, J.M., Wilson, G.R., Delatycki, M.B., and Lockhart, P.J. (2008). Regional and cellular localisation of Parkin co-regulated gene in developing and adult mouse brain. *Brain Res.* *1201*, 177–186.
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.-J., and Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 11649–11654.
- Chan, P., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., and Di Monte, D. (1991). Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.* *57*, 348–351.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* *243*, 1576–1583.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* *141*, 280–289.
- Chen, Z.J., Parent, L., and Maniatis, T. (1996). Site-Specific Phosphorylation of I κ B α by a Novel Ubiquitination-Dependent Protein Kinase Activity. *Cell* *84*, 853–862.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15927–15932.
- Conze, D.B., Wu, C.-J., Thomas, J.A., Landstrom, A., and Ashwell, J.D. (2008). Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* *28*, 3538–3547.
- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., and

- Kopin, I.J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1, 249–254.
- Dawe, H.R., Farr, H., Portman, N., Shaw, M.K., and Gull, K. (2005). The Parkin co-regulated gene product, PACRG, is an evolutionarily conserved axonemal protein that functions in outer-doublet microtubule morphogenesis. *J. Cell Sci.* 118, 5421–5430.
- Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2010). The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 25, S32–S39.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and Negative Regulation of I κ B Kinase Activity Through IKK β Subunit Phosphorylation. *Science* 284, 309–313.
- Deng, H., Le, W.-D., Xie, W.-J., Pan, T.-H., Zhang, X., and Jankovic, J. (2005). Genetic analysis of parkin co-regulated gene (PACRG) in patients with early-onset parkinsonism. *Neurosci. Lett.* 382, 297–299.
- DeVay, R.M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L.L., Hoppins, S., Stahlberg, H., and Nunnari, J. (2009). Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J. Cell Biol.* 186, 793–803.
- Dickson, D.W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., and Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 388, 548–554.
- Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 659–671.
- Dove, K.K., and Klevit, R.E. (2012). RING-between-RINGs--keeping the safety on loaded guns. *EMBO J.* 31, 3792–3794.
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M.J., Soligo, S., Morsut, L., et al. (2009). FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGF β signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136, 123–135.
- Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., et al. (2010). c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* 29, 4198–4209.
- Ea, C.-K., Deng, L., Xia, Z.-P., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2006). Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell* 22, 245–257.
- Eddins, M.J., Varadan, R., Fushman, D., Pickart, C.M., and Wolberger, C. (2007). Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH. *J. Mol. Biol.* 367, 204–211.

- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.
- Eisenberg, E., and Levanon, E.Y. (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet.* 19, 362–365.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Eskelinen, E.-L., and Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 664–673.
- Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmström, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.-H., Gasser, T., et al. (2007a). Loss-of-Function of Human PINK1 Results in Mitochondrial Pathology and Can Be Rescued by Parkin. *J. Neurosci.* 27, 12413–12418.
- Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmström, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.-H., Gasser, T., et al. (2007b). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12413–12418.
- Exner, N., Lutz, A.K., Haass, C., and Winklhofer, K.F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J.* 31, 3038–3062.
- Fannjiang, Y., Cheng, W.-C., Lee, S.J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J.M., Hill, R.B., Basañez, G., and Hardwick, J.M. (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.* 18, 2785–2797.
- Finney, N., Walther, F., Mantel, P.-Y., Stauffer, D., Rovelli, G., and Dev, K.K. (2003). The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain. *J. Biol. Chem.* 278, 16054–16058.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515–525.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., and Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152, 683–692.
- Gautheron, J., and Courtois, G. (2010). “Without Ub I am nothing”: NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF-kappaB activation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 3101–3113.
- Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.-Y., Rojo, M., Schapira, A.H.V., and Taanman, J.-W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4861–4870.

- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* *12*, 119–131.
- Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W.-L., et al. (2011). Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* *471*, 591–596.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *16*, 225–260.
- Gilmore, T.D. (1990). NF-κB, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* *62*, 841–843.
- Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* *25*, 6680–6684.
- Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K., and Moore, D.J. (2011). Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J. Neurochem.* *118*, 636–645.
- Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacino, J.J., Cepeda, C., Lam, H.A., Bhatnagar, A., Meloni, E.G., Wu, N., Ackerson, L.C., Klapstein, G.J., et al. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* *278*, 43628–43635.
- Grabbe, C., Husnjak, K., and Dikic, I. (2011). The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 295–307.
- Guarguaglini, G., Battistoni, A., Pittoggi, C., Di Matteo, G., Di Fiore, B., and Lavia, P. (1997). Expression of the murine RanBP1 and Htf9-c genes is regulated from a shared bidirectional promoter during cell cycle progression. *Biochem. J.* *325 (Pt 1)*, 277–286.
- Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., et al. (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol. Cell* *36*, 831–844.
- Haber, M. (2004). Parkin interacts with the 26S proteasome via its UBL domain.
- Hadian, K., Griesbach, R.A., Dornauer, S., Wanger, T.M., Nagel, D., Metlitzky, M., Beisker, W., Schmidt-Supprian, M., and Krappmann, D. (2011). NF-κB Essential Modulator (NEMO) Interaction with Linear and Lys-63 Ubiquitin Chains Contributes to NF-κB Activation. *J. Biol. Chem.* *286*, 26107–26117.
- Haimo, L.T., and Rosenbaum, J.L. (1981). Cilia, flagella, and microtubules. *J. Cell Biol.* *91*, 125s–130s.
- Al-Hakim, A., Escribano-Diaz, C., Landry, M.-C., O'Donnell, L., Panier, S., Szilard, R.K., and Durocher, D. (2010). The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. *DNA Repair* *9*, 1229–1240.
- Hales, K.G., and Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* *90*, 121–129.

- Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., and Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 2059–2075.
- Hansen, J.J., Bross, P., Westergaard, M., Nielsen, M.N., Eiberg, H., Børglum, A.D., Mogensen, J., Kristiansen, K., Bolund, L., and Gregersen, N. (2003). Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Hum. Genet.* *112*, 71–77.
- Hardy, J. (2010). Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron* *68*, 201–206.
- Hebenstreit, D., Horejs-Hoeck, J., and Duschl, A. (2005). JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect.* *18*, 243–249.
- Henn, I.H., Bouman, L., Schlehe, J.S., Schlierf, A., Schramm, J.E., Wegener, E., Nakaso, K., Culmsee, C., Berninger, B., Krappmann, D., et al. (2007). Parkin Mediates Neuroprotection through Activation of I κ B Kinase/Nuclear Factor- κ B Signaling. *J. Neurosci.* *27*, 1868–1878.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* *143*, 359–373.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* *419*, 135–141.
- Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 751–780.
- Hospenthal, M.K., Freund, S.M.V., and Komander, D. (2013). Assembly, analysis and architecture of atypical ubiquitin chains. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 555–565.
- Humbecck, C.V., Cornelissen, T., Hofkens, H., Mandemakers, W., Gevaert, K., Strooper, B.D., and Vandenberghe, W. (2011). Parkin Interacts with Ambra1 to Induce Mitophagy. *J. Neurosci.* *31*, 10249–10261.
- Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skånland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J.L., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., et al. (2011). SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. *Nature* *471*, 637–641.
- Ikeda, K., Ikeda, T., Morikawa, K., and Kamiya, R. (2007). Axonemal localization of Chlamydomonas PACRG, a homologue of the human Parkin-coregulated gene product. *Cell Motil. Cytoskeleton* *64*, 814–821.
- Imai, T., Yamauchi, M., Seki, N., Sugawara, T., Saito, T., Matsuda, Y., Ito, H., Nagase, T., Nomura, N., and Hori, T. (1996). Identification and characterization of a new gene physically linked to the ATM gene. *Genome Res.* *6*, 439–447.
- Imai, Y., Soda, M., Murakami, T., Shoji, M., Abe, K., and Takahashi, R. (2003). A Product of the Human Gene Adjacent to parkin Is a Component of Lewy Bodies and Suppresses Pael Receptor-induced Cell Death. *J. Biol. Chem.* *278*, 51901–51910.

- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* *170*, 1021–1027.
- Israël, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000158.
- Itier, J.-M., Ibanez, P., Mena, M.A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G.A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L., et al. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 2277–2291.
- Iwai, K., and Tokunaga, F. (2009). Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep.* *10*, 706–713.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *79*, 368–376.
- Janssens, S., and Beyaert, R. (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell* *11*, 293–302.
- Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R., and Brand, M.D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* *47*, 53–67.
- Jiang, H., Ren, Y., Zhao, J., and Feng, J. (2004). Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1745–1754.
- Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. (2008). Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* *133*, 653–665.
- Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J. Cell Biol.* *191*, 933–942.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.-H., Deng, L., and Chen, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell* *15*, 535–548.
- Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.* *159*, 931–938.
- Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.-Y., and Youle, R.J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* *443*, 658–662.
- Keusekotten, K., Elliott, P.R., Glockner, L., Fiil, B.K., Damgaard, R.B., Kulathu, Y., Wauer, T., Hospenthal, M.K., Gyrd-Hansen, M., Krappmann, D., et al. (2013). OTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing Met1-linked polyubiquitin. *Cell* *153*, 1312–1326.
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. (2006). A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin

chains. *EMBO J.* 25, 4877–4887.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.

Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J.D.F., Odenwaelder, P., Wilkinson, K.D., and Barford, D. (2009). Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep.* 10, 466–473.

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., et al. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* 169, 425–434.

Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1166–1173.

Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858–862.

Krappmann, D., Patke, A., Heissmeyer, V., and Scheidereit, C. (2001). B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6640–6650.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331–342.

Kwak, Y.-T., Li, R., Becerra, C.R., Tripathy, D., Frenkel, E.P., and Verma, U.N. (2005). IkappaB kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 33945–33952.

Lamothe, B., Besse, A., Campos, A.D., Webster, W.K., Wu, H., and Darnay, B.G. (2007). Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J. Biol. Chem.* 282, 4102–4112.

Langston, J.W., and Ballard, P.A., Jr (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N. Engl. J. Med.* 309, 310.

Laplantine, E., Fontan, E., Chiaravalli, J., Lopez, T., Lakisic, G., Véron, M., Agou, F., and Israël, A. (2009). NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain. *EMBO J.* 28, 2885–2895.

De Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet*

Neurol. 5, 525–535.

LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Weihofen, A., Schlossmacher, M.G., and Selkoe, D.J. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat. Med.* 11, 1214–1221.

LaVoie, M.J., Cortese, G.P., Ostaszewski, B.L., and Schlossmacher, M.G. (2007). The effects of oxidative stress on parkin and other E3 ligases. *J. Neurochem.* 103, 2354–2368.

Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302, 1972–1975.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479–489.

Liou, H.C., Sha, W.C., Scott, M.L., and Baltimore, D. (1994). Sequential induction of NF-kappa B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5349–5359.

Lockhart, P.J., O’Farrell, C.A., and Farrer, M.J. (2004). It’s a double knock-out! The quaking mouse is a spontaneous deletion of parkin and parkin co-regulated gene (PACRG). *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 19, 101–104.

Lorenzetti, D., Bishop, C.E., and Justice, M.J. (2004). Deletion of the Parkin coregulated gene causes male sterility in the quaking(viable) mouse mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8402–8407.

Lou, P.-H., Hansen, B.S., Olsen, P.H., Tullin, S., Murphy, M.P., and Brand, M.D. (2007). Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. *Biochem. J.* 407, 129–140.

Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lämmermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., et al. (2009a). Loss of Parkin or PINK1 Function Increases Drp1-dependent Mitochondrial Fragmentation. *J. Biol. Chem.* 284, 22938–22951.

Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lämmermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., et al. (2009b). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* 284, 22938–22951.

Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 266, 17067–17071.

Martens, S., and McMahon, H.T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 543–556.

Martin, I., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2011). Recent advances in the genetics of Parkinson’s disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 301–325.

Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006). Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro.

J. Biol. Chem. *281*, 3204–3209.

Matsumoto, M.L., Wickliffe, K.E., Dong, K.C., Yu, C., Bosanac, I., Bustos, D., Phu, L., Kirkpatrick, D.S., Hymowitz, S.G., Rape, M., et al. (2010). K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol. Cell* *39*, 477–484.

Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 120–129.

Mattson, M.P., and Meffert, M.K. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* *13*, 852–860.

Maxson, R., Cohn, R., Kedes, L., and Mohun, T. (1983). Expression and Organization of Histone Genes. *Annu. Rev. Genet.* *17*, 239–277.

McNaught, K.S.P., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., and Olanow, C.W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* *179*, 38–46.

Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* *127*, 383–395.

Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H.B., Eloffson, M., Sin, N., and Crews, C.M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 10403–10408.

Mercurio, F., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Young, D.B., Li, J.W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M., et al. (1999). I kappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1526–1538.

Mira, M.T., Alcaïs, A., Nguyen, V.T., Moraes, M.O., Di Flumeri, C., Vu, H.T., Mai, C.P., Nguyen, T.H., Nguyen, N.B., Pham, X.K., et al. (2004). Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* *427*, 636–640.

Momota, R., Sugimoto, M., Oohashi, T., Kigasawa, K., Yoshioka, H., and Ninomiya, Y. (1998). Two genes, COL4A3 and COL4A4 coding for the human alpha3(IV) and alpha4(IV) collagen chains are arranged head-to-head on chromosome 2q36. *FEBS Lett.* *424*, 11–16.

Moore, D.J. (2006). Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 749–753.

Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., and Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* *151*, 367–380.

Müller, W.E., Eckert, A., Kurz, C., Eckert, G.P., and Leuner, K. (2010). Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease--therapeutic aspects. *Mol. Neurobiol.* *41*, 159–171.

Müller-Rischart, A.K., Pilsl, A., Beaudette, P., Patra, M., Hadian, K., Funke, M., Peis, R., Deinlein, A., Schweimer, C., Kuhn, P.-H., et al. (2013). The E3 ligase parkin maintains

- mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. *Mol. Cell* 49, 908–921.
- Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201–205.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I., and Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* 7, 934–940.
- Napetschnig, J., and Wu, H. (2013). Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu. Rev. Biophys.* 42, 443–468.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298.
- Nicklas, W.J., Vyas, I., and Heikkila, R.E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36, 2503–2508.
- Nicklas, W.J., Youngster, S.K., Kindt, M.V., and Heikkila, R.E. (1987). MPTP, MPP⁺ and mitochondrial function. *Life Sci.* 40, 721–729.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252–256.
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum. Mutat.* 31, 763–780.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K., and Hayashi, J.I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* 28, 272–275.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., and Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 143, 333–349.
- Ozkaynak, E., Finley, D., and Varshavsky, A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* 312, 663–666.
- Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., and Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279, 18614–18622.
- Palkowitsch, L., Leidner, J., Ghosh, S., and Marienfeld, R.B. (2008). Phosphorylation of serine 68 in the I κ B kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure

- of the IKK complex and tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B activity. *J. Biol. Chem.* 283, 76–86.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Park, K.-J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2005). Formation of an IKK α -dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol. Cell* 18, 71–82.
- Parmeggiani, F., Pellarin, R., Larsen, A.P., Varadamsetty, G., Stumpp, M.T., Zerbe, O., Caflisch, A., and Plückthun, A. (2008). Designed armadillo repeat proteins as general peptide-binding scaffolds: consensus design and computational optimization of the hydrophobic core. *J. Mol. Biol.* 376, 1282–1304.
- Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P.J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, M., Hardy, J., et al. (2002). Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 36, 1007–1019.
- Pils, A., and Winklhofer, K.F. (2012). Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 173–188.
- Platzer, M., Rotman, G., Bauer, D., Uziel, T., Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Shiloh, Y., and Rosenthal, A. (1997). Ataxia-telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire ATM gene. *Genome Res.* 7, 592–605.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Yu, S., Vincow, E.S., and Pallanck, L. (2010). The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* 5, e10054.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (1996). Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4565–4571.
- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., et al. (2009). Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF- κ B Activation. *Cell* 136, 1098–1109.
- Rakovic, A., Shurkewitsch, K., Seibler, P., Grünewald, A., Zanon, A., Hagenah, J., Krainc, D., and Klein, C. (2013). Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1)-dependent ubiquitination of endogenous Parkin attenuates mitophagy: study in human primary fibroblasts and induced pluripotent stem cell-derived neurons. *J. Biol. Chem.* 288, 2223–2237.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., and Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 20150–20155.

- Ren, Y., Zhao, J., and Feng, J. (2003). Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 3316–3324.
- Rieser, E., Cordier, S.M., and Walczak, H. (2013). Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 94–102.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* *395*, 297–300.
- Rüegg, U.T., and Burgess, G.M. (1989). Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* *10*, 218–220.
- Rugarli, E.I., and Langer, T. (2012). Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J.* *31*, 1336–1349.
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A., and Tanaka, K. (2009). Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J.* *28*, 359–371.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L.V., Gurb, M. van, Loo, G. van, and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* *23*, 2861–2874.
- Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* *114*, 867–874.
- Scarpulla, R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 1269–1278.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* *1*, 1269.
- Schlehe, J.S., Lutz, A.K., Pilsl, A., Lämmermann, K., Grgur, K., Henn, I.H., Tatzelt, J., and Winklhofer, K.F. (2008a). Aberrant folding of pathogenic Parkin mutants: aggregation versus degradation. *J. Biol. Chem.* *283*, 13771–13779.
- Schlehe, J.S., Lutz, A.K., Pilsl, A., Lämmermann, K., Grgur, K., Henn, I.H., Tatzelt, J., and Winklhofer, K.F. (2008b). Aberrant folding of pathogenic Parkin mutants: aggregation versus degradation. *J. Biol. Chem.* *283*, 13771–13779.
- Schmidt, C., Fischer, G., Kadner, H., Genersch, E., Kühn, K., and Pöschl, E. (1993). Differential effects of DNA-binding proteins on bidirectional transcription from the common promoter region of human collagen type IV genes COL4A1 and COL4A2. *Biochim. Biophys. Acta* *1174*, 1–10.
- Scorrano, L. (2013). Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur. J. Clin. Invest.* *43*, 886–893.
- Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R., and Wooten, M.W. (2004). Sequestosome 1/p62 Is a Polyubiquitin Chain Binding Protein Involved in Ubiquitin Proteasome Degradation. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8055–8068.

Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.-C., et al. (2001). Activation by IKK α of a Second, Evolutionary Conserved, NF- κ B Signaling Pathway. *Science* 293, 1495–1499.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Yamamura, Y., Shimizu, N., et al. (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann. Neurol.* 45, 668–672.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305.

Shin, J.-H., Ko, H.S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y.-I., Pletinkova, O., Troconso, J.C., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2011). PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 144, 689–702.

SIDMAN, R.L., DICKIE, M.M., and APPEL, S.H. (1964). MUTANT MICE (QUAKING AND JIMPY) WITH DEFICIENT MYELINATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Science* 144, 309–311.

Silke, J., and Brink, R. (2010). Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell Death Differ.* 17, 35–45.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.-G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., et al. (1999). Ordering the Cytochrome c–initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9–dependent Manner. *J. Cell Biol.* 144, 281–292.

Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320–7326.

Smale, S.T. (2012). Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- κ B family of transcription factors. *Immunol. Rev.* 246, 193–204.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 2245–2256.

Smit, J.J., Monteferrario, D., Noordermeer, S.M., van Dijk, W.J., van der Reijden, B.A., and Sixma, T.K. (2012). The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension. *EMBO J.* 31, 3833–3844.

Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 59–71.

Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., and Finley, D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67–76.

Sriram, S.R., Li, X., Ko, H.S., Chung, K.K.K., Wong, E., Lim, K.L., Dawson, V.L., and

- Dawson, T.M. (2005). Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2571–2586.
- Staropoli, J.F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., and Abeliovich, A. (2003). Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* *37*, 735–749.
- Stichel, C.C., Augustin, M., Kühn, K., Zhu, X.R., Engels, P., Ullmer, C., and Lübbert, H. (2000). Parkin expression in the adult mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 4181–4194.
- Stieglitz, B., Morris-Davies, A.C., Koliopoulos, M.G., Christodoulou, E., and Rittinger, K. (2012). LUBAC synthesizes linear ubiquitin chains via a thioester intermediate. *EMBO Rep.* *13*, 840–846.
- Stieglitz, B., Rana, R.R., Koliopoulos, M.G., Morris-Davies, A.C., Schaeffer, V., Christodoulou, E., Howell, S., Brown, N.R., Dikic, I., and Rittinger, K. (2013). Structural basis for ligase-specific conjugation of linear ubiquitin chains by HOIP. *Nature* *503*, 422–426.
- Sugimoto, M., Oohashi, T., and Ninomiya, Y. (1994). The genes COL4A5 and COL4A6, coding for basement membrane collagen chains alpha 5(IV) and alpha 6(IV), are located head-to-head in close proximity on human chromosome Xq22 and COL4A6 is transcribed from two alternative promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11679–11683.
- Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* *21*, 71–85.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 621–632.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *135*, 397–402.
- Tan, E.K., Puong, K.Y., Chan, D.K.Y., Yew, K., Fook-Chong, S., Shen, H., Ng, P.W., Woo, J., Yuen, Y., Pavanni, R., et al. (2005). Impaired transcriptional upregulation of Parkin promoter variant under oxidative stress and proteasomal inhibition: clinical association. *Hum. Genet.* *118*, 484–488.
- Tanaka, K., Kawakami, T., Tateishi, K., Yashiroda, H., and Chiba, T. (2001). Control of I κ B α proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochimie* *83*, 351–356.
- Tang, E.D., Wang, C.-Y., Xiong, Y., and Guan, K.-L. (2003). A Role for NF- κ B Essential Modifier/I κ B Kinase- γ (NEMO/IKK γ) Ubiquitination in the Activation of the I κ B Kinase Complex by Tumor Necrosis Factor- α . *J. Biol. Chem.* *278*, 37297–37305.
- Taylor, J.M., Song, Y.J.C., Huang, Y., Farrer, M.J., Delatycki, M.B., Halliday, G.M., and Lockhart, P.J. (2007). Parkin Co-regulated Gene (PACRG) is regulated by the ubiquitin-proteasomal system and is present in the pathological features of parkinsonian diseases. *Neurobiol. Dis.* *27*, 238–247.
- Teismann, P., Tieu, K., Cohen, O., Choi, D.-K., Wu, D.C., Marks, D., Vila, M., Jackson-

Lewis, V., and Przedborski, S. (2003). Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 18, 121–129.

Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E.H., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K., et al. (2004). Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 9, 865–875.

Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K.A., and Coates, J.C. (2010). Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* 20, 470–481.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316.

Thumberger, T., Hagenlocher, C., Tisler, M., Beyer, T., Tietze, N., Schweickert, A., Feistel, K., and Blum, M. (2012). Ciliary and non-ciliary expression and function of PACRG during vertebrate development. *Cilia* 1, 13.

Tichý, A., Vávrová, J., Pejchal, J., and Rezáčová, M. (2010). Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. *Acta Medica Hradec Král. Univ. Carol. Fac. Medica Hradec Král.* 53, 13–17.

Tokunaga, F. (2013). Linear ubiquitination-mediated NF- κ B regulation and its related disorders. *J. Biochem. (Tokyo)* 154, 313–323.

Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., et al. (2009a). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat. Cell Biol.* 11, 123–132.

Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., et al. (2009b). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat. Cell Biol.* 11, 123–132.

Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., and Iwai, K. (2011). SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* 471, 633–636.

Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., et al. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28, 1589–1600.

Trinklein, N.D., Aldred, S.F., Hartman, S.J., Schroeder, D.I., Otilar, R.P., and Myers, R.M. (2004). An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res.* 14, 62–66.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446.

Vadlamudi, R.K., Joung, I., Strominger, J.L., and Shin, J. (1996). p62, a Phosphotyrosine-independent Ligand of the SH2 Domain of p56lck, Belongs to a New Class of Ubiquitin-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 20235–20237.

- Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* *1*, E209–216.
- Varadan, R., Walker, O., Pickart, C., and Fushman, D. (2002). Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J. Mol. Biol.* *324*, 637–647.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., and Fushman, D. (2004). Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J. Biol. Chem.* *279*, 7055–7063.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* *412*, 346–351.
- Wang, C., Ko, H.S., Thomas, B., Tsang, F., Chew, K.C.M., Tay, S.-P., Ho, M.W.L., Lim, T.-M., Soong, T.-W., Pletnikova, O., et al. (2005). Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3885–3897.
- Wang, H., Imai, Y., Kataoka, A., and Takahashi, R. (2007). Cell Type-Specific Upregulation of Parkin in Response to ER Stress. *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 533–542.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev.* *10*, 2859–2869.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J. Cell Biol.* *177*, 439–450.
- Wenz, T. (2009). PGC-1alpha activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life* *61*, 1051–1062.
- Wenzel, D.M., and Klevit, R.E. (2012). Following Ariadne's thread: a new perspective on RBR ubiquitin ligases. *BMC Biol.* *10*, 24.
- Wenzel, D.M., Lissounov, A., Brzovic, P.S., and Klevit, R.E. (2011). UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* *474*, 105–108.
- Wertz, I.E., and Dixit, V.M. (2010). Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a003350.
- West, A.B., and Maidment, N.T. (2004). Genetics of parkin-linked disease. *Hum. Genet.* *114*, 327–336.
- West, A.B., Lockhart, P.J., O'Farrell, C., and Farrer, M.J. (2003). Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J. Mol. Biol.* *326*, 11–19.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 872–884.
- Whitworth, A.J., Lee, J.R., Ho, V.M.-W., Flick, R., Chowdhury, R., and McQuibban, G.A. (2008). Rhomboid-7 and HtrA2/Omi act in a common pathway with the Parkinson's disease

factors Pink1 and Parkin. *Dis. Model. Mech.* 1, 168–174; discussion 173.

Wilson, G.R., Tan, J.T., Brody, K.M., Taylor, J.M., Delatycki, M.B., and Lockhart, P.J. (2009a). Expression and localization of the Parkin co-regulated gene in mouse CNS suggests a role in ependymal cilia function. *Neurosci. Lett.* 460, 97–101.

Wilson, G.R., Tan, J.T., Brody, K.M., Taylor, J.M., Delatycki, M.B., and Lockhart, P.J. (2009b). Expression and localization of the Parkin co-regulated gene in mouse CNS suggests a role in ependymal cilia function. *Neurosci. Lett.* 460, 97–101.

Wilson, G.R., Wang, H.X., Egan, G.F., Robinson, P.J., Delatycki, M.B., O'Bryan, M.K., and Lockhart, P.J. (2010). Deletion of the Parkin co-regulated gene causes defects in ependymal ciliary motility and hydrocephalus in the quakingviable mutant mouse. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1593–1602.

Winklhofer, K.F. Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle. *Trends Cell Biol.*

Winklhofer, K.F., and Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 29–44.

Winklhofer, K.F., Henn, I.H., Kay-Jackson, P.C., Heller, U., and Tatzelt, J. (2003). Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 278, 47199–47208.

Wu, C.-J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., and Ashwell, J.D. (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat. Cell Biol.* 8, 398–406.

Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., and Israël, A. (1998). Complementation Cloning of NEMO, a Component of the IκB Kinase Complex Essential for NF-κB Activation. *Cell* 93, 1231–1240.

Yamazaki, K., Gohda, J., Kanayama, A., Miyamoto, Y., Sakurai, H., Yamamoto, M., Akira, S., Hayashi, H., Su, B., and Inoue, J. (2009). Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling. *Sci. Signal.* 2, ra66.

Yang, F., Jiang, Q., Zhao, J., Ren, Y., Sutton, M.D., and Feng, J. (2005). Parkin stabilizes microtubules through strong binding mediated by three independent domains. *J. Biol. Chem.* 280, 17154–17162.

Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B. (2001). The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat. Immunol.* 2, 620–624.

Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 755–764.

Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., and Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17707–17712.

Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062–1065.

Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14.

Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59.

Zarate-Lagunes, M., Gu, W.J., Blanchard, V., Francois, C., Muriel, M.P., Mouatt-Prigent, A., Bonici, B., Parent, A., Hartmann, A., Yelnik, J., et al. (2001). Parkin immunoreactivity in the brain of human and non-human primates: an immunohistochemical analysis in normal conditions and in Parkinsonian syndromes. *J. Comp. Neurol.* 432, 184–196.

Zhang, Y., and Chan, D.C. (2007). Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18526–18530.

Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T., and Harlow, E. (1998). Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev.* 12, 456–461.

Zhao, J., Kennedy, B.K., Lawrence, B.D., Barbie, D.A., Matera, A.G., Fletcher, J.A., and Harlow, E. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* 14, 2283–2297.

Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., and Dixit, V.M. (2004). Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 427, 167–171.

Ziviani, E., Tao, R.N., and Whitworth, A.J. (2010). *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5018–5023.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405–413.

Dissertation of Anna Pils - Ludwig-Maximilians-Universität, Chair of Metabolic Biochemistry - LMU Munich.