

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristjan Kivi

**Miro1 ning Beclin1 valgu koosmõju mitofaagias**

Magistritöö

Juhendajad

prof. Allen Kaasik, Dr (med)

prof. Margus Pooga, Ph.D.

Joanna Liiv, M.Sc.

TARTU 2015

# Sisukord

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>8</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>9</b>
1.1. Autofaagia .....	9
1.1.2. Makrofaagia valgukompleksid imetajas.....	9
1.1.2.1. mTORC1 kompleks .....	9
1.1.2.2. ULK kompleks .....	10
1.1.2.3. PtdIns3K kompleks.....	11
1.1.2.4. Atg9-Atg2-WIPI kompleks .....	13
1.1.2.5. Atg16L-Atg12-Atg5 kompleks .....	13
1.1.2.6. LC3 kompleks .....	14
1.1.3. Mitofaagia .....	18
1.2. Autofaagia ning haigused.....	21
1.3. Beclin1 .....	23
1.4. Parkin .....	29
1.5. Miro1 .....	30
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>33</b>
2.1. Töö eesmärgid.....	33
2.2. Materjal ja meetodika .....	34
2.2.1. Rakuliinid ja söötmed.....	34
2.2.2. Plasmiidid.....	34
2.2.3. Antikehad .....	34
2.2.4. Transfekteerimine.....	34
2.2.5. Mitofaagia aktiveerimine .....	35
2.2.6. Immunosadestamine.....	35
2.2.7. Western Blot.....	36
2.3. Tulemused .....	37
2.3.1. Mitofaagia aktiveerimine tugevdab Miro1 ja Beclin1 valgu vahelist interaktsiooni .....	37
2.3.2. Parkin valk vähendab Beclin1 ning Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni mitofaagia võimendumise korral.....	38

2.3.3. Parkin valk ning tema muteerunud vormid vähendavad Beclin1 ning Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni raku tavaolekus.....	39
2.3.4. Beclin1 ning Miro1 valkude vaheline interaktsioon väheneb Miro1 valgu GTPaasi domäänide mutatsioonide korral. ....	41
2.4. Arutelu .....	44
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>47</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>48</b>
<b>TÄNUSÕNAD.....</b>	<b>50</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU.....</b>	<b>51</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>71</b>

## Kasutatud lühendid

AMBRA1 - *activating molecule in Beclin1-regulated autophagy 1* (ingl k)

AMPK - *AMP-activated protein kinase* (ingl k)

Atg (*autophagy-related*) - autofaagiaga seotud valk (ingl k)

Bad - *BCL2-associated agonist of cell death* (ingl k)

BATS (*Barkor/Atg14L autophagosome targeting sequence*) - Barkor/Atg14L autofagosoom märklaudjärjestus (ingl k)

Bcl-2 - *B-cell lymphoma-2* (ingl k)

Bcl-XL (*BCL2-like 1*) - BCL2 sarnane valk 1 (ingl k)

Bif1 - *BAX-interacting factor 1* (ingl k)

BNIP3 - *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3* (ingl k)

CC - *coiled-coil domain* (ingl k)

DAPK - *death-associated protein kinase* (ingl k)

Deptor (*DEP domain containing MTOR-interacting protein*) - DEP domääni sisaldav MTOR-iga interakteeruv valk (ingl k)

DFCP1 - *double-FYVE domain containing protein 1* (ingl k)

DMEM/F12 - *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture F-12* (ingl k)

E2F - E2F transkriptiooni faktorid

ECD (*evolutionary conserved domain*) - evolutsiooniliselt konserveerunud domään (ingl k)

ERK - *extracellular signal-regulated kinase* (ingl k)

ERMES - *ER-mitochondria encounter structure* (ingl k)

FIP200 - *focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa* (ingl k)

GABARAP - *GABA(A) receptor-associated protein* (ingl k)

HEK293 - inimese embrüonaalsed neeru rakud 293

HMGB1 - *high mobility group box 1* (ingl k)

HOPS - *homotypic fusion and protein sorting* (ingl k)

IBR (*in-between RING*) - RING domäänide vahel asuv domään (ingl k)

IP<sub>3</sub>R - inositol 1,4,5-trifosfaat retseptorite kompleks

JNK1 - *c-Jun N-terminal protein kinase 1* (ingl k)

Khc (*kinesin heavy chain*) - kinesiini raske ahel (ingl k)

KIF5 - *kinesin family member 5* (ingl k)

LC3 - *microtubule-associated protein light chain 3* (ingl k)

LIR - LC3-interaktsiooni regioon

LRRK2 - *leucine-rich repeat kinase 2* (ingl k)

Miro (*mitochondrial Rho GTPase*) - mitokondriaalne Rho GTPaas (ingl k)

mLST8 - *mammalian lethal with SEC thirteen 8* (ingl k)

MPP - *mitochondrial processing peptidase-like protein* (ingl k)

mTor - *mechanistic target of rapamycin* (ingl k)

mTORC1 - *mechanistic target of rapamycin complex 1* (ingl k)

NBR1 - *neighbor of BRCA1 gene 1* (ingl k)

Nedd4 - *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4* (ingl k)

NES - *nuclear export sequence* (ingl k)

NF-κB - tuumafaktor κB

Opti-Mem I - *Minimum Essential Medium I* (ingl k)

PARK2 - *autosomal recessive juvenile parkinson disease-2* (ingl k)

PARL - *presenilin associated, rhomboid-like* (ingl k)

Pink1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) - (fosfataasi ja tensiini homoloog 10. kromosoomis)-indutseeritud oletatav kinaas 1 (ingl k)

PKD - *protein kinase D* (ingl k)

Pras40 - *silencing proline-rich Akt substrate of 40-kDa* (ingl k)

PtdIns3K kompleks - Klass III fosfatidüülinositoool-3-kinaasi kompleks

PtdIns3P - fosfatidüülinositoool-3-fosfaat

RAPTOR - *regulatory-associated protein of mTOR* (ingl k)

RBR (*RING-between-RING*) - kahe RING domääni vaheline domään (ingl k)

RING - *really interesting new gene* (ingl k)

Rubicon - *RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting protein* (ingl k)

SH3GLB1 - *SH3-domain GRB2-like endophilin B1* (ingl k)

SNARE - *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors* (ingl k)

SNCA ( *$\alpha$ -synuclein*) -  $\alpha$ -sünukleiin (ingl k)

Spautin-1 - *specific and potent autophagy inhibitor-1* (ingl k)

TFEB - transkriptsiooni faktor EB

TOM - *translocase of the outer membrane* (ingl k)

TOMM7 - *translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog* (ingl k)

TRAF6 - *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (ingl k)

TRAK - *trafficking kinesin protein* (ingl k)

Tti2 (*TELO2 interacting protein 2*) - TELO2 valguga interakteeruv valk 2 (ingl k)

UBA - ubikvitiini siduv domään

UCH-L1 - *ubiquitin C-terminal esterase L1* (ingl k)

ULK1 (*unc-51 like kinase 1*) - unc-51 sarnane kinaas 1 (ingl k)

UPS8 - *ubiquitin-specific protease 8* (ingl k)

USP 10 - *ubiquitin-specific peptidase 10* (ingl k)

USP15 - *ubiquitin-specific protease 15* (ingl k)

USP30 - *ubiquitin-specific protease 30* (ingl k)

UVRAG - *UV radiation resistance-associated* (ingl k)

VAMP7 - *vesicle-associated membrane protein 7* (ingl k)

VDAC - *voltage-dependent anion-selective channel protein* (ingl k)

VMP1 (*vacuole membrane protein 1*) - vakuooli membraani valk 1 (ingl k)

VTI1B - *vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B* (ingl k)

WIPI - *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides* (ingl k)

## Sissejuhatus

Antud töös uuriti autofaagilisi mehhanisme inimese rakus. Autofaagia on mehhanism, kus rakus sisalduv aine lagundatakse lüsoosoomides (Tian jt., 2015). Töös keskendutakse lähemalt mitokondritele suunatud autofaagiale ehk mitofaagiale. Häireid mitofaagilistes mehhanismides seostatakse mitmete neurodegeneratiivsete haigustega, ühena neist Parkinsoni tõvega (Trempe jt., 2013).

Vaatluse all on kolm valku: Beclin1, Parkin ning Miro1. Beclin1 valk mängib olulist rolli autofaagilise vesiikuli moodustamise käivitumises ning selle ühinemises lüsoosoomiga (Matsunaga jt., 2009). Parkin valk osaleb kahjustunud mitokondrite märkimisel lagundamiseks ning mutatsioonid Parkin valgus seostatakse päriliku juveniilse Parkinsoni tõve tekkega (Trempe jt., 2013). Miro1 valk on seotud mitokondrite dünaamikaga rakus (Birsa jt., 2014).

Arvatakse, et Miro1 aitab translokeerida mitofaagiaks märgitud kahjustunud mitokondri endoplasmaatilise retiikulumi lähedusse, kus Beclin1 valgu kaasabil alustatakse autofaagilise vesiikuli moodustamise ning muude autofaagiliste protsessidega (Hamasaki jt., 2013). Töö eesmärgiks oli leida täiendavaid tõendeid sellele, et Miro1 võib mängida olulist rolli mitofaagias.

Antud töö on koostatud Tartu Ülikooli Siirdemeditsiini Tippkeskuse neurofarmakoloogia laboris.

Märksõnad: Parkin, Beclin1, Miro1, mitofaagia

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Autofaagia

Autofaagia on protsess, kus rakule mittevajalikud komponendid lagundatakse kasutades lüsoosime. Autofaagia jaguneb makroautofaagiaks, mikroautofaagiaks ning tsäperon vahendatud autofaagiaks. Tegemist on ühe peamise eukarüootide degradatsiooni rajaga. Autofaagia funktsioonideks on kahjustunud organellide, toksiliste valkude ja invasiivsete mikroobide lagundamine ning rakumaterjali degradeerimine energeetilistel kaalutlustel nälgjast tingitud stressi korral. Autofaagia saab olla kas väga selektiivne, näiteks kindlate valgukogumite või kahjustunud organellide lagundamise puhul, või mitteselektiivne, näiteks vastusena nälgjast tingitud stressile. Autofaagia on hästi konserveerunud alates pärmist kuni imetaja rakkudeni (Peracchio jt., 2012, Delorme-Axford jt., 2015). Antud töös vaadeldakse lähemalt makrofaagiat ning täpsemalt selle alatüüpi mitofaagiat (mitokondritele suunatud autofaagia) imetaja rakkudes.

### 1.1.2. Makrofaagia valgukompleksid imetajas

Makrofaagia on autofaagia alatüüp, kus lagundatav substants ümbritsetakse tsütoplasmas topelt membraani omava struktuuriga, mida nimetatakse fagofooriks. Fagofoor sulgub ning moodustub ringikujuline vesiikul nimetusega autofagosoom. Autofagosoom liigub tsütoplasmas lüsoosimini ning sulandub temaga. Lagundatav substants vabaneb lüsoosimi sisemusse, kus see lagundatakse hüdrolaaside poolt (Seglen jt., 1990, Tian jt., 2015).

#### 1.1.2.1. mTORC1 kompleks

mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) on seriini/treoniini kinaasi kompleks, mis koosneb mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian lethal with SEC thirteen 8*), Pras40 (*silencing proline-rich Akt substrate of 40 kDa*), Deptor (*DEP domain containing MTOR-interacting protein*) ja Tti2 (*TELO2 interacting protein 2*) valkudest. Tähtsaimaks valguks selles kompleksis on mTOR: seriini/treoniini kinaas, mis on rapamütsiini märklauaks. mTORC1 funktsioonideks on mitmed raku kasvu ning arenguga seotud protsessid (Kim jt., 2011).

Antud töös käsitletakse mTORC1 olulisust lähemalt autofaagias. mTOR kinaas on aktiivses vormis, kui rakus on külluslikult aminohappeid, ATP-d ja AMP-d. Eelmainitud olukorras inhibeerib mTORC1 autofaagiat mõjutades järgmist autofaagias osalevat valgukompleksi, ULK (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*) kompleksi. mTOR fosforüeerib ULK1 valku Ser758 positsioonis ning inhibeerib selle kaudu tema interaktsiooni AMPK-ga (*AMP-activated protein kinase*) (Kim jt., 2011).

Lisaks fosforüeerib ning inhibeerib mTORC1 ka valku Atg13 (*autophagy related 13*), mis on ULK1 positiivne regulaator (Hosokawa jt., 2009, Ganley jt., 2009, Jung jt., 2009). Atg13 fosforüeerimissait ei ole teada. Peale selle inhibeerib mTORC1 autofaagiat ka otseselt fosforüeerides valku Atg14L (*autophagy related 14L*) positsioonides Ser3, Ser223, Thr233, Ser383 ja Ser440 (Yuan jt., 2013).

Tänu autofaagiale väheneb oluliselt toitainete puudus rakus, mille tulemusena mTORC1 taaskord aktiveerub ning termineerib autofaagia, näiteks inhibeerides lüsoosomi biogeneesiga seotud geenide transkriptsiooni fosforüeerides transkriptsiooni faktor EB (TFEB) Ser142 ja Ser211 aminohappejääke, tänu millele on pärsitud TFEB liikumine tsütoplasmast tuuma (Roczniak-Ferguson jt., 2012, Martina jt., 2012).

### **1.1.2.2. ULK kompleks**

Imetaja ULK kompleks koosneb ULK1/2 (*unc-51 like autophagy activating kinase 1/2*), Atg13, FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa*) ning Atg101 (*autophagy related 101*) valkudest, kus ULK1/2 on seotud Atg13 ja FIP200 valguga läbi C-terminaalse domääni. Atg13 ja Fip200 stabiliseerivad ULK1/2 valku ning aktiveerivad tema kinaasset aktiivsust. Imetaja rakkudes on ULK1/2-ATG13-FIP200 kompleksi võimalik aktiveerida nii glükoosi kui aminohapete vähesusega, kuid kompleks esineb tsütosoolis ka toitainete külluse korral (Hara jt., 2008, Kim jt., 2011). Olukorras, kus rakus on vähe glükoosi, pärsib AMPK mTORC1 kompleksi. AMPK fosforüeerib omakorda ULK1 valku Ser317 positsioonis ning aktiveerib seeläbi ULK1-e (Rusell jt., 2013). mTORC1 inhibeeriva toime lõppedes aktiveerivad ULK1 ja ULK2 ka Atg13 ja FIP200 valgud ning ULK kompleks liigub endoplasmaatilise retiikulumi lähedusse. Aktiveeritud ULK1 ühineb järgmise autofaagia kompleksiga, mis koosneb Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), p150, Beclin1 ja Atg14L valkudest (edaspidiselt nimetatud PtdIns3K kompleks ehk klass III fosfatidüülinositol-3-kinaasikompleks), kus ta fosforüeerib Beclin1 Ser15. See

fosforüleerimine aktiveerib Vps34 produtseerima fosfatidüülinositol-3-fosfaati (PtdIns3P), mis on vajalik autofagosoomi moodustumiseks (Russell jt., 2013). Skemaatilisel on makrofaagia aktivatsiooni rada kujutatud joonisel 1.

Ühtlasi fosforüleerivad ULK1 ja ULK2 peale Beclin1 ka AMBRA1-te (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy 1*), mis asub autofaagiat käivitavas PtdIns3K kompleksis. Vastavate modifikatsioonide tulemusena aktiveerub PtdIns3K kompleks ning liigub endoplasmaatilise retiikulumi välismembraani lähedusse (Bartolomeo jt., 2010, Russell jt., 2013).



**Joonis 1.** Makrofaagia aktivatsiooni rada. Näljast tingitud stress pärsib mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) kompleksi aktiivsust, mis omakorda tingib ULK (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*) kompleksi aktivatsiooni, mille tulemusena aktiveerub Beclin1, Atg14L (*autophagy related 14L*), Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*) ja p150 valgust koosnev kompleks nimetusega PtdIns3K (klass III fosfatidüülinositol-3-kinaasikompleks) kompleks. PtdIns3K kompleks on oluline fagofoori moodustumise protsessi käivitamiseks (Lamb jt., 2013, modifitseeritud).

### 1.1.2.3.PtdIns3K kompleks

Imetajatel on nii klass I fosfatidüülinositol-3-kinaasid kui klass II fosfatidüülinositol 3-kinaasid. Klass III fosfatidüülinositol-3-kinaasikompleks (PtdIns3K) koosneb valkudest Vps34, p150 ja Beclin1. Need kolm põhikomponenti on olemas kõigis PtdIns3K kompleksi alatüübis. Klass III lipiidkinaas Vps34 katalüüsib fosfatidüülinositooli muutmist fosfatidüülinositol-3-fosfaadiks. p150 on N-terminaalselt müristüleeritud ning kinnitab PtdIns3K kompleksi membraani külge (Matsunaga jt., 2009).

Esimeses PtdIns3K kompleksis on Vps34, p150 ja Beclin1 valgule lisandunud Atg14L ning Ambra1. See kompleks moodustub autofaagia varajases järgus fagofoori moodustumisel. Kompleks asub endoplasmaatilise retiikulumi välismembraani läheduses ning kutsub kohale teised valgud, kes hakkavad fagofoori membraani pikendama ning kõverdama. Nagu juba eelnevalt mainitud, aktiveerib Vps34 valgu fosforüleerimine (ULK kompleksi poolt) Vps34 produtseerima fosfatidüülinositol-3-fosfaati, mis on vajalik autofagosoomi moodustumiseks

(Hosokawa jt., 2009, Ganley jt., 2009, Jung jt., 2009). PtdIns3P kutsub kohale mitmed fagofoori moodustama hakkavad valkud, nagu näiteks DFCP1 (*double-FYVE domain containing protein 1*) ning WIPI2 (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides 2*) (Axe jt., 2008, Polson jt., 2010). Samuti on kompleksis oluline valk Atg14L, kuna tema N-terminuses paiknevad tsüsteiini rikkad kordusjärjestused aitavad kompleksil liikuda endoplasmaatilise retiikulumi membraanile (Matsunaga jt., 2010). Atg14L C-terminuses paikneb aga BATS domään (*Barkor/Atg14L autophagosome targeting sequence*), mis on samuti vajalik autofaagia protsessi alustamiseks. BATS domään interakteerub otseselt fosfatidüülinositooli rikaste membraani osadega. Arvatakse, et see aitab leida fosfatidüülinositooli rikkaid membraani osasid ning neid stabiliseerida (Fan jt., 2011). Ambra1 stabiliseerib ning võimendab PtdIns3K kompleksi toimet autofagosoomi moodustumises. Tavapärases rakulises seisundis on Ambra1 autofaagiline aktiivsus mTORC1 poolt inhibeeritud ning ta isoleerib Beclin1 ja Vps34 valgud düneiini motoorkompleksist. Autofaagia käivituses ULK1 fosforüleerib Ambra1 valku, mille tulemusena interaktsioonid Ambra1 ja düneiini kerge ahela vahel katkevad ning Ambra1 koos PtdIns3K kompleksiga liigub endoplasmaatilise retiikulumi välismembraanile (Strappazon jt., 2011, Bartolomeo jt., 2010). Ambra1 interakteerub samuti mitokondriaalse valguga Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*), mille ülesanne on tõenäoliselt takistada PtdIns3K kompleksil lokaliseeruda endoplasmaatilisele retiikulumile. Autofaagia käivitumise korral Ambra1 eraldub Bcl-2-st ning seondub tugevamalt Beclin 1-ga (Strappazon jt., 2011). Samuti on näidatud, et Ambra1 soodustab Lys63-seoselist ULK1-e ubiquitineerimist TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) poolt ning ULK1 aktivatsiooni (Nazio jt., 2013).

Teise PtdIns3K kompleksi alatüübi puhul on Atg14L ning Ambra1 asendunud UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene*) ning SH3GLB1 (*SH3-domain GRB2-like endophilin B1*) valguga. Antud kompleks on seotud hilisema autofaagia etapiga, kus see aitab moodustunud autofagosoomil kinnituda ning sulanduda lüsoosoomiga (Zhong jt., 2009, Yang jt., 2010). UVRAG seondub HOPS (*homotypic fusion and protein sorting*) kompleksiga, mille tulemusena aktiveerub Rab7 GTPaas, mis omakorda stimuleerib autofagosoomi ning lüsoosoomi sulandumist (Liang jt., 2008).

Kolmanda PtdIns3K kompleksi puhul on UVRAG valgu positiivne regulaator SH3GLB1 asendanud Rubicon (*RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting protein*) valguga, mis inhibeerib autofaagiat, pärssides UVRAG-i aktiivsust (Yang jt., 2010). Lisaks eraldab Rubicon UVRAG-i HOPS kompleksist ning seeläbi inhibeerib Rab7 aktiveerimist (Sun jt., 2010).

#### 1.1.2.4. Atg9-Atg2-WIPI kompleks

Atg9 (*autophagy related 9*) on ainus teadaolev membraani transportiv autofaagias osalev valk 37-e Atg valgu seas. Tal on kuus konserveerunud transmembraanset domääni (Weerasekara jt., 2014). Atg9 moodustab kompleksi Atg2 (*autophagy related 2*), WIPI1/2 ja VMP1 (*vacuole membrane protein 1*) valkudega (Kishi-Itakura jt., 2014). Atg9 puudulikkuse tulemusena väheneb oluliselt fagofooride arv rakus (Orsi jt., 2012). Toitainete rikkuse korral asub Atg9 imetajal trans-Golgi võrgustikus (TGN), samuti hilistes endosoomides (Longatti jt., 2012). Aminohapete nälja korral lokaliseerub Atg9 pigem endosoomides kui TGN-s. Atg9 lokaliseerumist reguleerib ULK kompleks (Young jt., 2006). TGN-s asuv Atg9 populatsioon vabastatakse vesikulaarsetesse kompartmentidesse, kui neid aktiveerib Bif1 (*BAX-interacting factor 1*). Seejärel tekivad Atg9 kompartmentid, mis interakteeruvad kasvava fagofoori membraaniga (Yamamoto jt., 2012). Kuigi Atg9-l tundub olevat oluline roll fagofoori membraani moodustumisel ja selle pikenemisel, on tema täpsemad funktsioonid imetaja rakkudes teadmata. On näidatud, et Atg9 vesiikulid liiguvad Golgi kompleksi, endosoomide ning autofaagiliste struktuuride vahel ning kasvava fagofoori juurde, kuid pole täheldatud sellest tulevnevat membraani pikenemist (Orsi jt., 2012). See-eest pärmi rakkudes on näidatud, et Atg9 vesiikulid pikendavad kasvavat fagofoori (Young jt., 2006, Yamamoto jt., 2012). Atg9 liikumine on sõltuv ULK1 ja Vps34 kinaasidest ning WIPI2-st (Puri jt., 2013).

#### 1.1.2.5. Atg16L-Atg12-Atg5 kompleks

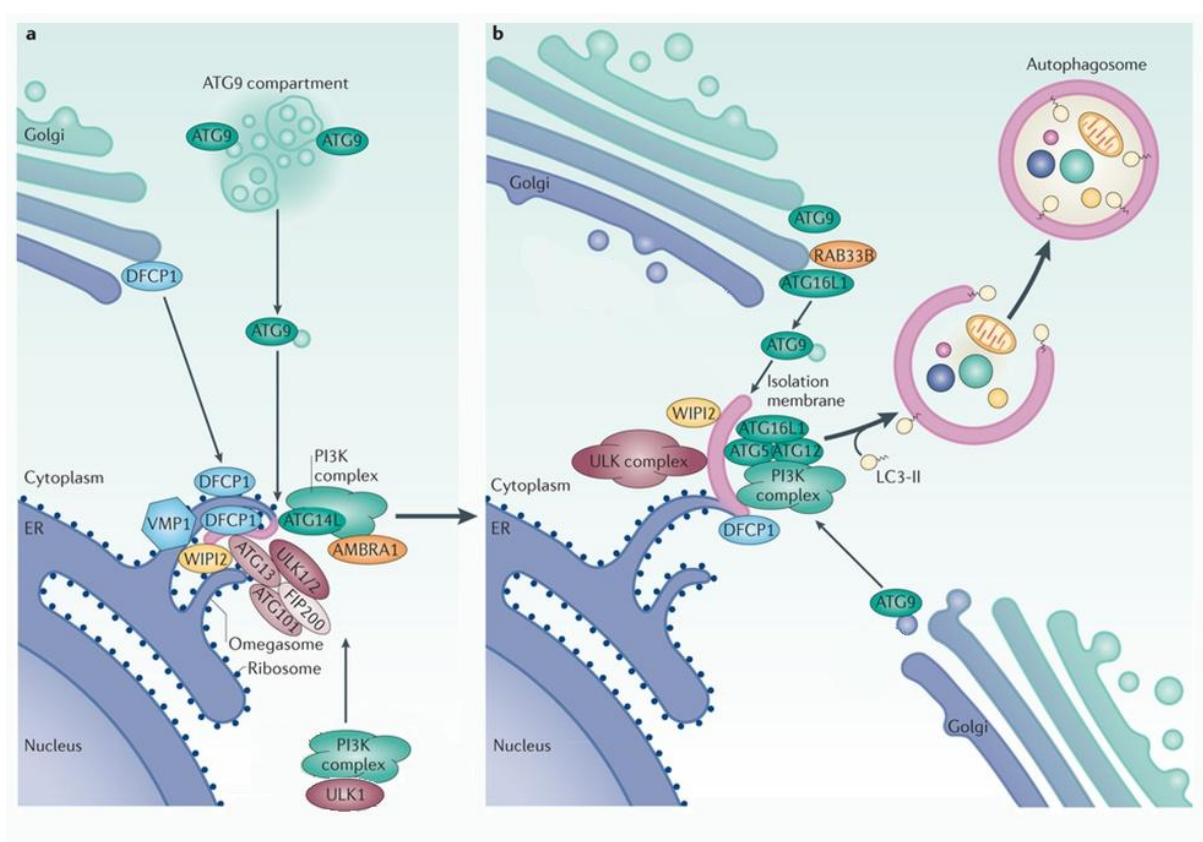
Fagofoori pikenemine ning sulgumine sõltub kahest ubikvitiin-sarnasest konjugatsiooni kompleksist: Atg16L-Atg12-Atg5 kompleksist ning LC3-II (*microtubule-associated protein 1 light chain 3- II*) kompleksist (Fujioka jt., 2010, Rogov jt., 2013). Atg16L (*autophagy related 16L*) koosneb N-terminaalsest regioonist, milles asub Atg5-te (*autophagy related 5*) seondav domään ning CC domäänist (*coiled-coil domain*) (Fujioka jt., 2010). Imetaja Atg16L omab seitset WD kordust C-terminaalses regioonis, seda motiivi ei ole pärmi Atg16-l. Arvatakse, et WD kordused on vajalikud bateriaalselt tekitatud autofaagia läbi viimiseks (Mizushima jt., 2003). Atg16L-Atg12-Atg5 kompleksi tekkimiseks seondatakse Atg12 (*autophagy related 12*) valku E1-tüüpi ubikvitiini ligaasi sarnase ensüümi Atg7-e (*autophagy related 7*) ning E2-tüüpi ubikvitiini ligaaside sarnaste ensüümide Atg10 (*autophagy related 10*) ja Atg3-ga (*autophagy related 3*) (Tanida jt., 2002). Algselt on Atg12 kovalentselt seotud Atg5-ga ning Atg10-ga. Seejärel Atg10 vabaneb ning Atg12-Atg5 kompleks seondub Atg16L N-

terminaalse regiooniga, tekib 800 kDa suurune kompleks. Atg16L-Atg12-Atg5 kompleks on seotud pre-fagofoorsete struktuuride ning fagofooriga, kuid seondub lahti, kui on moodustunud autofagosoom (Mizushima jt., 2003, Fujioka jt., 2010). Atg16L-Atg12-Atg5 kompleks seondub teise samasuguse kompleksiga CC domääni kaudu ning tekib dimeer, kus Atg12-Atg5 jäävad dimeeri välistele külgedele. Selle tulemusena saab Atg5 seonduda fagofooriga. Atg5-ga seonduvad omakorda Atg3 ja LC3-II, mis on aktiveeritud Atg7 poolt ja mille tulemusena hakatakse fagofoori pikendama (Romanov jt., 2012, Otomo jt., 2013). Aminohapete nälja korral aktiveerib Atg16L kompleksi ULK kompleksis asuv FIP200 valk (Nishimura jt., 2013). Peale FIP200 seondub Atg16L valgu CC domääniga ka Rab33B, mis on väike GTPaas, mis on seotud Golgi kompleksi ja endoplasmaatilise retiikulumi vahelise transpordiga. Arvatakse, et Rab33B lokaliseerib Atg16L kompleksi Golgi kompleksist endoplasmaatilise retiikulumi lähedusse (Fujioka jt., 2010). Atg16L kompleks moodustab fagofoori eellasmembraane, mis omavahel ühendatakse ning mille tulemusena tuleb lähedusse LC3-II, mis aitab fagofoori eellasmembraanidel fagofooriga seonduda. Atg16L seondumist fagofoori eellasmembraanidega seostatakse ka SNARE (*N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) valkudega, täpsemalt VAMP7 (*vesicle-associated membrane protein 7*), Syntaxin7, Syntaxin8 ja VTI1B-ga (*vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B*). On leitud, et eelmainitud SNARE valgud asetuvad Atg16L valgu eellasmolekulidele ning fagofoorile. Samuti on leitud, et nende puuduse korral tõuseb Atg16L valgu eellasmolekulide arv, samas väheneb nende suurus, LC3-II lokaliseerumine koos Atg16L kompleksiga ning samuti väheneb moodustunud autofagosoomide arv (Moreau jt., 2011). On leitud, et Atg16L ning ka Atg5 defitsiitsed hiired surevad keskmiselt päev pärast sündi (Saitoh jt., 2008). Polümorfismi Atg16L1 geeni WD domäänis seostatakse ka Crohni tõvega (Fujita jt., 2009).

#### **1.1.2.6. LC3 kompleks**

Nagu juba eelnevalt mainitud, sõltub fagofoori pikenemine peale Atg16L kompleksi ka LC3-II kompleksist. Erinevalt Atg16L kompleksist vastutab LC3-II kompleks ka fagofoori sulgumise eest. LC3 valgu homoloog pärmis on ATG8 (*autophagy related 8*), imetajas on LC3-le sarnased valgud LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP (*GABA(A) receptor-associated protein*), GABARAP-L1 ning GABARAP-L2 (Rogov jt., 2013). LC3 sünteesitakse perkursorina, mida lõikab redokstundlik tsüsteiini proteaas Atg4 (*autophagy related 4*), tekib LC3-I (Filomeni jt., 2010). LC3-I on LC3-e inaktiivne vorm, mis esineb tsütosoolis. Kui Atg7

ning Atg3 seovad LC3-I-e fosfatidüületanoolamiiniga, moodustub aktiivne LC3-e vorm nimetusega LC3-II. LC3-II liigub fagofoori membraanile ning püsib seal kogu autofagosoomi arenemise jooksul kuni autofaagia protsessi lõpuni (Ravikumar jt., 2010). LC3-el tundub olevat vähemalt kaks funktsiooni. Esmalt aitab LC3 ehitada fagofoorile fosfolipiidseid struktuure. Teiseks, LC3 seondub retseptorvalkudega, nagu näiteks p62. Need autofaagilised retseptorvalgud tunnevad ära K63-ubikvitineeritud valke, mis on signaaliks erinevate struktuuride autofaagiliseks lagundamiseks. p62-l on LC3-e ära tundmiseks väike lineaarne LC3-interaktsiooni regioon (LIR) ning autofaagia märkimiseks C-terminaalne ubikvitiin-seoseline (UBA) domään. Tänu sellele mehhanismile on võimalik fagofoori tuua ka suuremaid struktuure nagu näiteks mitokondreid (Rogov jt., 2013).



**Joonis 2.** Fagofoori moodustumine ning küpsemine autofagosoomiks. Joonise a osas on käivitunud fagofoori moodustumine ULK (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*) kompleksi ning PtdIns3K (klass III fosfatidüülinoositol-3-kinaasikompleks) kompleksi poolt. ULK kompleksi valk ULK1 fosforüleerib PtdIns3K kompleksiga liitunud Ambra1 (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy 1*) valku, mis aitab PtdIns3K kompleksil liikuda endoplasmaatilise retiikulumi lähedusse ning Atg14L (*autophagy related 14L*) valku, mis aitab PtdIns3K kompleksil lokaliseeruda omegasoomile ehk fagofoori eellasmembraanile. ULK kompleksi valk ULK1 fosforüleerib PtdIns3K kompleksis asuvat Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*) valku, mille tulemusena hakkab Vps34 produtseerima fosfatidüülinoositol-3-fosfaati (PtdIns3P), mis on vajalik fagofoori moodustamiseks,

kuna kutsub esile mitmete fagofoori moodustama hakkavate valkude, nagu näiteks DFCP1 (*double-FYVE domain containing protein 1*), WIPI2 (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides 2*) ning VMP1 (*vacuole membrane protein 1*) valgu liikumise omegasoomi lähedusse. Atg9 (*autophagy related 9*) on ainus teadaolev membraani transportiv autofaagias osalev valk. Toitainete rikkuse korral asub Atg9 imetajal trans-Golgi võrgustikus, kuid näljast tingitud stressi korral vabastatakse Atg9 ning moodustuvad Atg9 vesikulaarsed kompartmentid, mis interakteeruvad kasvava fagofoori membraaniga. Atg9 liikumine on sõltuv ULK1 ja Vps34 kinaasidest ning WIPI2 valgust. Joonise b osas leiab aset fagofoori pikenemine ning sulgumine, mille tulemusena moodustub autofagosoom. Rab GTPaas (Rab33B) aitab Atg16L (*autophagy related 16L*) valgul liikuda fagofoori lähedusse. Atg16L seondub Atg12 (*autophagy related 12*) ja Atg5 (*autophagy related 5*) valguga ning moodustub Atg16L-Atg12-Atg5 kompleks, mis aitab LC3-II (*microtubule-associated protein 1 light chain 3- II*) kompleksil seonduda fagofooriga. LC3-II kompleks aitab ehitada fagofoorile fosolipiidseid struktuure ning sulgeda fagofoori. Moodustub autofagosoom. Autofagosoomi sisse jäänud LC3-II kompleksi valgud lagundatakse (Lamb jt., 2013, modifitseeritud).

Pärast fagofoori membraani piisavat pikenemist ning sulgemist LC3-e poolt, on moodustunud autofagosoom. Autofagosoomid või autofaagilised vesiikulid kasvavad teekonna jooksul mööda mikrotuubuleid algsest asukohast lüsoosoomide kogumike juurde rakus, kuna sulanduvad tee peal tihti endosoomidega. Näljast tingitud stressi korral ei ole stimuleeritud mitte ainult autofagosoomide moodustumine, vaid on ka tõusnud rakusisene pH, mis soodustab lüsoosoomide ümber paiknemist rakus ning aitab kaasa autofagosoomide ühinemisele lüsoosoomidega. Selles protsessis on üheks osaliseks PtdIns3K kompleks koos UVRAG valguga, samuti SNARE valgud VAMP7, Syntaxin7, Syntaxin8 ja VTI1B. Autofagosoomi välismembraanil asuva LC3-II valgu küljest eemaldatakse lipiid fosfatidüületanolamiin ning moodustub LC3-I. Lipiidi eemaldamisega arvatakse olevat seotud ka Atg4. Autofagosoomi sisse jäänud LC3-II valgud ning muu autofagosoomi sisse jäänud aines degradeeritakse lüsoosoomis asuvate happeliste hüdrolaaside poolt (Scherz-Shouval jt., 2007, Lubke jt., 2009, Ravikumar jt., 2010, Korolchuk jt., 2011). Autofagosoomi moodustumine on kujutatud joonisel 2 ning makrofaagiaga seotud olulisemad valgud ning valgukompleksid on välja toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Makrofaagiaga seotud olulisimad valgukompleksid, valgud ning nende põhifunktsioonid.

Kompleksi nimetus	Valgu nimetus	Valgu põhifunktsioon
mTORC1	mTOR	Inhibeerib ULK1-te.
-	AMPK	Inhibeerib nälja stressi korral mTOR-i, aktiveerib ULK1-e.
ULK kompleks	ULK1/2	Aktiveerib autofaagiat

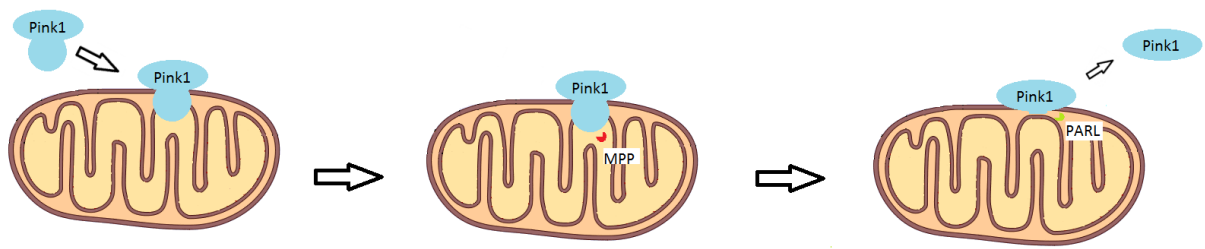
		initsieerivaid valke.
ULK kompleks	Atg13	ULK1/2 ning FIP200 siduja.
ULK kompleks	FIP200	Toestab ULK1/2-te ja ATG13-t. Mõjutab ULK kompleksi aktiivsust.
PtdIns3K kompleks	Vps34	Katalüütiline PtdIns 3-kinaas.
PtdIns3K kompleks	p150	Aitab PtdIns3K kompleksil translokaliseeruda membraanile.
PtdIns3K kompleks	Beclin1	PtdIns3K kompleksi ning mitmete teiste valkude omavaheline seondaja.
PtdIns3K kompleks	Atg14L	PtdIns3K I kompleksi komponent. Aitab PtdIns3K kompleksil lokaliseeruda omegasoomile ehk fagofoori eellasmembraanile.
Atg9 kompleks	Atg9	Vajalik fagofoori pikenemiseks, tõenäoliselt kordineerib membraani liikumist fagofoorile.
Atg9 kompleks	WIPI 1/2	Seob PtdIns3P fagofooriga.
Atg16L kompleks	Atg16L, Atg5, Atg12	Aitavad LC3-el seonduda fagofooriga.
LC3 kompleks	LC3-II	Aitab fagofoori pikendada, sulgeda ning seondada fagofooriga K63-ubikvitineeritudvalke.
-	Atg3	Seob LC3-efosfatidüületanolamiiniga.
-	Atg4	Lõikab LC3-e prekursorit ning töötleb LC3-e pärast autofaagia lõppu.
-	Atg7	Aktiveerib Atg12 ja LC3 valgud.
PtdIns3K(UVRAG) kompleks	Vps34, p150, Beclin1	Funktsionaalsused eelnevalt nimetatud.

PtdIns3K(UVRAG) kompleks	UVRAG	Aktiveerib Rab7 valgu, vajalik autofagosoomi ja lüüsoomi omavaheliseks seondumiseks.
--------------------------	-------	--

### 1.1.3. Mitofaagia

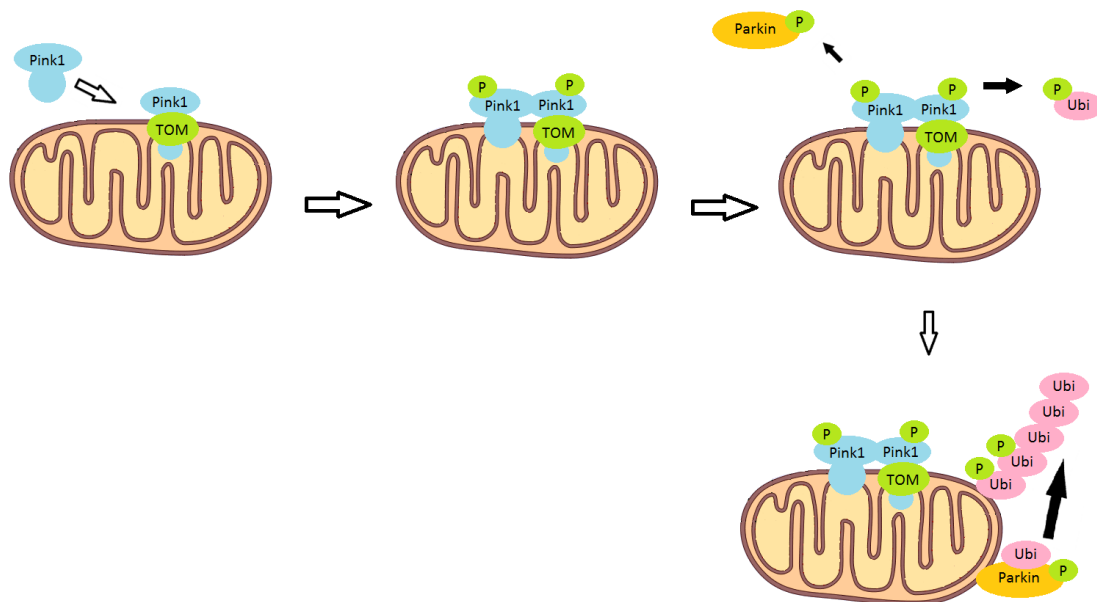
Rakul on kahjustunud mitokondrite haldamiseks mitmeid mehhanisme. Nende alla kuuluvad ka degradeerivad mehhanismid nagu ubikvitiin-proteosoomi süsteem mitokondri välismembraanil paiknevate valkude lagundamiseks ning autofaagia. Mitokondrite lagundamist autofaagia teel nimetatakse mitofaagiaks. Imetaja rakkudes märgivad kahjustunud mitokondrid lagundamiseks ära seriini/treoniini kinaas Pink1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) ning E3 ubikvitiini ligaas Parkin (Narendra jt., 2008, Vives-Bauza jt., 2010).

Pink1 valgul on N-terminaalne mitokondri sihtmärkjärjestus, transmembraanne segment ning seriini/treoniini kinaasi domään. Tavatingimustes ulatub Pink1-e mitokondri sihtmärkjärjestus läbi mitokondri sise- ja välismembraani ning seda lõikab maatriksis paiknev mitokondriaalne peptidaas MPP (*mitochondrial processing peptidase-like protein*). Pärast seda lõikab sisemembraanil Pink1-e transmembraanset segmenti seriini proteaas PARL (*presenilin associated, rhomboid-like*). Seejärel Pink1-e kahekordselt lõigatud vorm lahkub mitokondrilt ning ta lagundatakse tsütosoolis ubikvitiin-proteosoomi süsteemi poolt (joonis 3). Kuna Pink1 on lahkunud mitokondrist, on ka Parkin inaktiivsena tsütosoolis ning mitofaagia on inaktiivne (Greene jt., 2012, Okatsu jt., 2013). Mitokondri membraanipotentsiaal on vajalik, et Pink1-e N-terminaalne mitokondri sihtmärkjärjestus saaks minna läbi mitokondri sisemembraani. Membraanipotentsiaali puudumise korral jääb Pink1 MPP ja PARL-i poolt protsessimata ning selle asemel seondub TOM valguga (*translocase of the outer membrane*) (Lazarou jt., 2012). Selleks, et TOM saaks Pink1-ga seonduda on vajalik TOMM7 (*translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog*) (Hasson jt., 2013). Tekib 850 kDa kompleks, kus Pink1 homodimeriseerub ning autofosforüleerib ennast positsioonides Ser228 ja Ser402, et muutuda aktiivseks ning põhjustada Parkini translokatsiooni tsütosoolist mitokondri välismembraanile (Aerts jt., 2015).



**Joonis 3.** Pink1 valgu regulatsioon tavapärase mitokondri membraanipotentsiaali korral. Pink1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) läbib mitokondri välis- ja sisemembraani, mille tulemusena lõikavad teda MPP (*mitochondrial processing peptidase-like protein*) valk maatriksis ning PARL (*presenilin associated, rhomboid-like*) valk sisemembraani pinnal. Pink1 vabaneb mitokondrist tsütosooli ning lagundatakse.

Parkin koosneb N-terminaalsest UBL domäänist (*ubiquitin like domain*), kolmest RING domäänist (*really interesting new gene*) RING0, RING1 ja RING2 ning IBR domäänist (*in-between RING*), mis asub RING1 ja RING2 vahel. RING1-IBR-RING2 ala kutsutakse RBR (*RING-between-RING*). RBR-tüüpi E3 liigaaside perekond moodustab ubikvitiin-tioester sidemeid tsüsteiini aktiivsaitidega ning tänu sellele seob ubikvitiini substraadiga (Wenzel jt., 2011). Parkini puhul on näidatud, et ta autoubikvitineerib ennast positsioonis Cys431. Samuti on näidatud, et vastava ubikvitiin-tioester sideme tekkimine sõltub Pink1-st ning tema autofosforülatsioonist (Iguchi jt., 2013). Arvatakse, et Parkin püsib tsütosoolis inaktiivsena tänu tema N-terminuses asuvale UBL domäänile, mis negatiivselt autoreguleerib tema E3 liigaaset aktiivsust (Chaugle jt., 2011). On leitud, et Pink1 fosforüleerib Parkinit positsioonis Ser65, mis asub UBL domäänis, siiski aktiveerib vastav fosforüleerimine Parkini ainult osaliselt (Iguchi jt., 2013). Parkini täielikuks aktiveerimiseks on vajalik ka Ser65 ubikvitiini fosforüleerimine Pink1-e poolt. Arvatakse, et fosforüleeritud ubikvitiin positsioonis Ser65 seondub Parkini RING0 domääniga, mis avab katalüütilise tsüsteiini, mida saab kasutada substraadi ubikvitineerimiseks. Samuti arvatakse, et ubikvitiini fosforüleerimine Pink1-e poolt on vajalik Parkini translokatsiooniks tsütosoolist mitokondri välismembraanile (Kazlauskaitė jt., 2014b, Koyano jt., 2014). Arvatakse, et Pink1 fosforüleerib mitokondri välismembraanis asuvate valkude küljes olevaid ubikvitiini ahelaid, mis toimivad Parkinile retseptoritena mitokondri välismembraanile translokaliseerumiseks (Okatsu jt., 2015). Pink1-Parkin rada on kujutatud joonisel 4.



**Joonis 4.** Pink1-Parkin rada. Häirunud mitokondri membraanipotensiaali korral jääb Pink1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) mitokondri välis- ja sisemembraanile, seondudes TOM (*translocase of the outer membrane*) valguga. Pink1 autofosforüleerib ja dimeriseerib ennast ning fosforüleerib seejärel Parkini ning ubikvitiini, mille tulemusena Parkin liigub mitokondri välismembraanile. Sellele järgnevalt ubikvitineerib Parkin mitokondri välismembraanil paiknevaid valke.

Samuti on leitud, et UPS8 (*ubiquitin-specific protease 8*) nimeline deubikvitinaas võib mängida olulist rolli Pink1/Parkini vahendatud mitofaagias. UPS8 eemaldab selektiivselt K6-seoselise ubikvitiini Parkini küljest. K6-seoseline ubikvitiin aitab aga Parkinil traslokaliseeruda depolariseerunud mitokondrile. Arvatakse, et K6-seoseline ubikvitiin takistab RING0 domääni seostumist mitokondriaalsete ubikvitiini ahelatega (Durcan jt., 2014). Samuti on leitud, et ka deubikvitinaasid USP15 (*ubiquitin-specific protease 15*) ning USP30 (*ubiquitin-specific protease 30*) mõjuvad antagonistlikult Parkini ja Pink1 poolt vahendatud mitofaagiale. Nimelt eemaldavad vastavad deubikvitinaasid ubikvitiini ahelad mitokondriaalsete valkude küljest. On leitud, et USP15 ning USP30 defitsiidi korral suureneb depolariseerunud mitokondrite degradatsioon nii metsiktüüpi Parkini korral kui ka patogeensete Parkini mutantide korral (Bingol jt., 2014, Cornelissen jt., 2014).

Kui kahjustunud mitokondrite välismembraanis asuvad valgud on Parkini poolt ubikvitineeritud, lokaliseeritakse nad perinukleaarsesse regiooni (Itakura jt., 2012). On leitud, et kahjustunud mitokondritega tegelevad edasi LC3 valgud ning ubikvitiin-seoselised valgud nagu näiteks p62 (Rogov jt., 2014). Ubikvitiin-seoselistel valkudel p62, NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene 1*) ja optineuriin on ubikvitiini siduv domään ning ka LC3-ga interakteeruv regioon LIR, kuid kuidas nad kahjustunud mitokondriga seonduvad ei ole teada. On uurimusi,

mis näitavad p62 vajalikkust mitofaagias (Ding jt., 2010, Geisler jt., 2010) kui ka tema mittevajalikkust (Huang jt., 2011, Narendra jt., 2011). Siiski, lõpptulemusena LC3 seob mitokondri fagofooriga (mille moodustamise on käivitanud ULK kompleks ning PtdIns3K) ning toimub fagofoori kasvamine, sulgumine ning sulandumine lüsoosoomiga moel, mida täpsemalt kirjeldati eelmises peatükis (ref. Yoshii ja Mizushima, 2015).

## **1.2. Autofaagia ning haigused**

Autofaagia häirimisega seostatakse mitmeid neurodegeneratiivseid haigusi nagu näiteks Parkinsoni, Huntingtoni ning Alzheimeri tõbe (Imarisio jt., 2008). Samuti on autofaagia mehhanismid seotud vähi, II tüüpi diabeedi, pankreatiidi ning müopaatia tekkes (Tiwari jt., 2015, Kosacka jt., 2015, Diakopoulos jt., 2015, Mercier jt., 2015). Insuldi puhul on leitud, et *Atg7* defitsiitsed vastsündinud hiired säilitasid peaaegu täieliku neuraalse elulemuse pärast iseemilist kahjustust. Iseemiaks loetakse insuldi puhul olukorda, kus neuraalse koe viimasest verrega varustamisest on möödas alla 24 tunni (Koike jt., 2008, Zheng jt., 2009). Samuti leiti, et ka autofaagilised inhibiitorid (näiteks 3-metüüladeniin) vähendavad neuraalseid kahjustusi, isegi kui neid on manustatud rohkem kui 4 tundi hiljem. Teadmine, et autofaagilised inhibiitorid võivad toimida protektiivselt insuldi puhul tekkiva rakkude suremuse vastu, võib anda lootust uute insuldile mõeldud ravimite välja töötamiseks (Puyal jt., 2009).

Huntingtoni tõbi on päritav neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustab muteerunud huntingtiini valk. Haiguse tulemusena väheneb neuronite hulk kesknärvisüsteemis, prominentset juttkehas ning ajukoos. Haigus muutub vältimatuks kui nimetatud valku kodeerivas HTT geeni 1. eksonis esineb rohkem kui 40 CAG kordust. Selle tulemusena häiruvad liigselt pika glutamiini jääkidega muteerunud huntingtiini valgu funktsionaalsed omadused. Samuti moodustab mutantne huntingtiini valk rakkudes inkulsioonkehasid, mille hulga kasvades suureneb ka toksilisus. On leitud, et autofaagiat võimendades vähenes ka vastavate mutantse huntingtiini kogumike hulk ning toksilisus rakkudele vähenes (Bates jt., 2002, Williams jt., 2008, Karachitos jt., 2010, Barbaro jt., 2015). Samuti on leitud, et metsiktüüpi valk ei olnud niivõrd autofaagia võimendumisele tundlik. See loob võimaluse ravimite välja töötamiseks, mis võimaldavad, autofaagiat võimendades, eemaldada mutantseid valke, kuid vähem mõjutada metsiktüüpi ning korrektselt funktsioneerivaid ekvivalente (Sarkar jt., 2007).

Autofaagia võimendamine võib omada protektiivset efekti ka Alzheimeri tõve korral. Kuigi mitmed Alzheimeri tõve tekitavad geneetilised ning keskkondlikud faktorid on veel teadmata, peetakse oluliseks tau ning amüloid beeta valkude agregeerumist neuronites. Mitmed uurijad on leidnud, et autofaagia protsess on võimendunud haiguse varajases faasis. Seda on tõestanud LC3-II ja LC3-I kõrgem tase võrreldes kontrolliga. Samuti on täheldatud autofaagiliste vesiikulite kõrgemat taset kontrolliga võrreldes (Nixon jt., 2000, Yu jt., 2004, Yu jt., 2005).

On leitud, et Alzheimeri tõve progresseerudes on autofaagia inhibeerunud. Selle võimalikuks põhjuseks võib olla amüloid beeta peptiidide akumulatsioon lüsoosoomides (Boland jt., 2008). Antud valgu akumulatsioon inhibeerib veel omakorda lüsoosoomides aset leidvaid lagundamisprotsesse. Selle tulemusena koguneb aja jooksul liigselt palju lüsoosoomiga mittesulandunud autofagosoomide ning autofaagised mehhanismid pidurdavad. See omakorda aitab kaasa neurodegeneratsioonile. Ei ole selge, kas autofagosoomide akumulatsioon on põhjustatud autofaagia liigsest võimendamisest haiguse algusfaasis, lüsoosoomide võimetusest degradeerida autofagosoomide või nende kahe mõju kombinatsioonist. Hoolimata nendest tendentsidest on leitud, et autofaagia võimendamisel võib olla protektiivne roll Alzheimeri tõvele. On leitud, et Beclin1 mRNA ning valgu tase on madalam Alzheimeri tõve põdevatel inimestel ning hiirudelitel. Samuti on leitud, et vanuse kasvades ning haiguse progresseerudes on Beclin1 valgu ning mRNA tase langenud. Beclin1 üleekspressioon Alzheimeri tõve hiirudelitel vähendas amüloid beeta rakusisest ning ekstratsellulaarsete amüloidnaastude akumulatsioonist. Beclin1 ekspressiooni vähendades täheldati aga suuremat amüloid beeta akumulatsioonist ning suurenenud neurodegeneratsiooni. Vastavad tulemused tõestavad võimaluse, et autofaagia võimendamisega on võimalik vähendada akumulatsioonist amüloid beeta hulka (Pickford jt., 2008).

Parkinsoni tõbi on progresseeruv neurodegeneratiivne haigus, millele on iseloomulik basaalganglionide kahjustus, täpsemalt dopamiinergiliste neuronite hävimine mustaine kompaktses osas. Olles ühenduses juttkehaga, langeb omakorda selle dorsaalosa dopamiinergiline stimulatsioon. Domineerima pääseb juhttee, mis soodustab seesmise kahkjaskahe ning mustaine retikulaarpiirkonna GABAergilist ehk sihtrakke inhibeerivat mõju. Alastimulatsiooni saavad peamiselt ajukoore motoorsed piirkonnad ning häirub ka põhimiktuumade eri osade omavaheline koostöö. Seetõttu on tüüpilisteks kliinilisteks sümptomiteks puhkeoleku treemor, rigiidsus (lihaskõvus), bradükineesia (liigutuste aeglus), hüpokineesia (liigutuste amplituudi langus), kehatüve ebastabiilsus, raskused liigutuste algatamisega ning automaatsete liigutuste häirimine. Dopamiinergiliste neuronite arvu langus

toimub elu jooksul kõigil, kuid sümptomid avalduvad alles siis, kui 40-60% dopamiinergilistest neuronitest on hävinud ja juttkeha denervatsioon jõudnud 80%-ni. Parkinsoni tõbi algab tavaliselt 50-70. eluaasta vahel. Haigestumise tõenäosus suureneb vanuse tõustes, hõlmates rohkem mehi kui naisi. Maailmas diagnoositakse Parkinsoni tõbe keskmiselt 160 juhtu 100000 elaniku kohta (ref. Groenwegen 2003, Chackravathy jt., 2010). Eestis on esinemissagedus maailma keskmisega sama, keskmiselt 178 juhtu 100 000 elaniku kohta ehk umbes 2500 haigestunut (Taba jt., 2007).

Parkinsoni tõve tekkepõhjused on teadmata. Parkinsoni tõve puhul on tähendatud mitokondrite ja lüsoosoomide funktsionaalset häirumist, valesti kokkupakitud valkude puudulikkude eemaldamist proteosoomide poolt ning oluliselt suurenenud oksüdatiivset stressi. Parkinsoni tõve jaotatakse tinglikult neljaks alatüübiks, millest üks on pärilik Parkinsoni tõbi, mis hõlmab ligikaudu 5-10% juhtudest. Antud Parkinsoni tõve alaliigi puhul on tähendatud seoseid muteerunud geeni järjestuste ning haiguse vahel. Päriliku Parkinsoni tõve mehhanismide uurimine võib aidata paremini mõista ka teadmata tekkepõhjusega Parkinsoni tõve mehhanisme, kuna nii kliiniliste kui neuropatoloogiliste tunnuste osas mõlemad haigused sarnanevad. Päriliku Parkinsoni tõvega seostatakse järgnevaid geene: Parkin, Pink1, DJ-1, UCH-L1 (*ubiquitin C-terminal esterase L1*), LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*), SNCA ( *$\alpha$ -synuclein*) (ref. Davie, 2008, ref. Obeso jt., 2010). Arvatakse, et mutatsioonid Parkini geenis on vastutavad umbes poolte päriliku Parkinsoni tõve juhtude eest. Mutatsioone Pink1 geenis peetakse sageduselt teiseks päriliku Parkinsoni tõve tekkepõhjuseks. Kuna Parkin ning Pink1 mängivad olulist rolli mitofaagia reguleerimises, saab seostada päriliku Parkinsoni tõbe ning seeläbi kaudsel ka primaarset Parkinsoni tõbe, mitofaagiga (Matsuda jt., 2010, ref. Byrd ja Weismann, 2013).

### **1.3. Beclin1**

Nagu juba eelnevalt mainitud on Beclin1 valk oluline PtdIns3K kompleksi osa, koos Vps34 ja p150-ga. Beclin1 mängib võtmerolli autofaagias ning on seotud fagofoori moodustamise initsiatsiooniga (Matsunaga jt., 2009). Beclin1 null tüüpi hiirudelites on embrüo tõsisemate tüsistustega kui teiste autofaagiaga seotud valkude defitsiidi puhul. Embrüo hukub varajases arengujärgus (E7.5 või varem) (Yue jt., 2003). Beclin1 on ekspresseerunud mitmetes inimese kudedes ning on lokaliseerunud põhiliselt tsitoplasmaatiliste struktuuride lähedusse nagu endoplasmaatiline retiikulum, mitokondrid ning perinukleaarne membraan (Li jt., 2009).

Beclin1 valgu defitsiit inhibeerib autofaagiat ning ajurakkudes viib neurodegeneratsioonini (Qu jt., 2003). Beclin1 osaleb amüloid beeta eemaldamises Alzheimeri tõve korral, mutantse huntingtiini eemaldamises Huntingtoni tõve puhul ning mutantse ataksiin 3 eemaldamises Machado-Josephi tõve korral. Alzheimeri, Huntingtoni ning Machado-Josephi tõve puhul on tähendatud Beclin1-e taseme langust (Pickford jt., 2008, Shibata jt., 2006, Nascimento-Ferreira jt., 2011). Beclin1-e üleekspressioon seevastu aktiveerib autofaagiat ning on protektiivne mitmetes neurodegeneratiivsete haiguste mudelites *in vivo*. On leitud, et Beclin1 vähendab rakkude vahelisi ning rakusiseseid amüloid beeta kogumeid transgeensetes hiirmudelites (Pickford jt., 2008). Uurimistulemused on näidanud, et Beclin1-e üleekspressioon eemaldab mutantset ataksiin 3 ning vähendab Machado-Josephi tõve sümptomeid (Nascimento-Ferreira jt., 2011). Samuti aitab Beclin1-e valgu üleekspressioon vältida neurodegeneratsiooni Parkinsoni tõve hiirmudelites (Spencer jt., 2009).

Beclin1 koosneb kolmest domäänist: BH3 domään (aminohapped 114-123) N-terminuses, keskel asub CC domään (*coiled-coil domain*; aminohapped 144-269) ja evolutsiooniliselt konserveerunud domään ECD (*evolutionary conserved domain*; aminohapped 244-337). Samuti omab Beclin1 lühikest leutsiini rikast aminohapete järjestust nimetusega NES (*nuclear export sequence*), mis on vastutav tema tuumast eksportimise eest. Mutatsioonid Beclin1-e NES järjestuses inhibeerivad Beclin1-e võimet initsieerida autofaagiat. Autofaagiat negatiivselt reguleeriv Bcl-2 valk interakteerub Beclin1 valguga läbi BH3 domääni. Autofaagiat positiivselt reguleerivad valgud Ambra1 ning UVRAG seostuvad Beclin1 CC domääniga ning Vps34 interakteerub Beclin1-ga läbi ECD domääni ning CC domääni (Liang jt., 2001). Beclin1-e BH3 domääni mutatsiooni korral või BH3 retseptordomääni mutatsiooni korral Bcl-2 või Bcl-XL (*BCL2-like 1*) valgus on autofaagilised protsessid pidevalt aktiivsed (Ciechomska jt., 2009). Beclin1 on võimeline seonduma ka iseendaga CC domääni kaudu. Beclin1-e dimeriseerumine ei ole sõltuv aminohapete näljast, rapamütsiiniga töötlemisest, Vps34, Bcl-XL või UVRAG valgu üleekspressioonist (Noble jt., 2008).

Arvatakse, et Beclin1-e ekspressiooni reguleerimisega on seotud NF- $\kappa$ B (tuumafaktor  $\kappa$ B), E2F transkriptsiooni faktorid (E2F) ja mikroRNA-d (miRNA-d). p65, üks NF- $\kappa$ B raja komponent, seondub Beclin1-e promootoriga ning võimendab tema mRNA ning valgu taseme ning seeläbi ka autofaagia tõusu T-rakkudes (Copetti jt., 2009). NF- $\kappa$ B roll autofaagia reguleerimisel on vastuoluline, on leitud tema inhibeerivat mõju autofaagiale (Djavaheri-Mergny jt., 2006) kui ka aktiveerivat toimet (Criollo jt., 2010). On leitud, et E2F1 seostub ULK1, LC3, ULK2, Atg4, Atg7, GABARAP-L2, Atg9, Atg10, Atg12 promootoritega ning suurendab mainitud valkude ekspressiooni, seeläbi positiivselt reguleerides autofaagiat.

Uurimistulemused on näidanud, et E2F1 reguleerib positiivselt Beclin1-e ekspressiooni (Polager jt., 2008, Wang jt., 2010).

miRNA-d on postranskriptsioonilised regulaatorid, mis tavapäraselt seonduvad mRNA 3'UTR regiooniga ning mõjutavad mRNA ekspressiooni. Beclin1 mRNA 3'UTR-ga seondub miR-30a. On leitud, et miR-30a ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakkudes vähenes Beclin1-e mRNA ning valgu ekspressioon, samas kui miR-30a antisense (miR-30a antagomir) ekspresseerudes Beclin1-e tase rakus tõusis. Samuti tähendati HeLa rakkude töötlemisel miR-30a-ga autofaagilise aktiivsuse langust (Zhu jt., 2009).

Autofaagia intsiatsioon ja arengus võivad olulist rolli mängida ka Beclin1-e ning temaga seonduvad valkude posttranslatsiooniline modifitseerimine (fosforüleerimine ja ubikvitineerimine). Beclin1 kujutab endast valku, kes vahendab väga mitmete erinevate valkude interaktsioone PtdIns3K kompleksiga (Tabel 2), mis kas negatiivselt või positiivselt reguleerivad autofaagiat. Positiivselt reguleerivad autofaagiat näiteks Atg14 ja UVRAG (Itakura jt., 2008, Takahashi jt., 2009), negatiivselt aga näiteks Spautin-1 (*specific and potent autophagy inhibitor-1*) (Liu jt., 2011, Abrahamsen jt., 2012). Samuti on valke, mis vähendavad Beclin1-e interaktsiooni PtdIns3K kompleksiga nagu näiteks Bcl-2 (Abrahamsen jt., 2012).

Tavapärastel tingimustel on Bcl-2 Beclin1-ga seonduv ja inhibeerib seeläbi autofaagiat. Nälja stressi tulemusena JNK1 (*c-Jun N-terminal protein kinase 1*) fosforüleerib Bcl-2 valku positsioonides Thr69, Ser70 ja Ser87 ning Beclin1 vabaneb, moodustub PtdIns3K kompleks ning autofaagia aktiveerub (Wei jt., 2008). Bcl-2-e ning Beclin1-e dissotsiatsiooni võib stimuleerida ka madal hapniku tase rakus. Hüüpoksia korral BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*) seostub Bcl-2 BH3 domääniga ning põhjustab Beclin1 eraldumist (Bellot jt., 2009). Üheks Beclin1-e fosforüleerijaks on HMGB1 (*high mobility group box 1*), kes võimendab Bcl-2 fosforüleerimist ERK poolt (*extracellular signal-regulated kinase*) ning seeläbi Beclin1 ning Bcl-2 valgu omavahelist vabanemist (Tang jt., 2010).

Beclin1-te fosforüleerib ka DAPK (*death-associated protein kinase*) (Zalckvar jt., 2009). Beclin1-e BH3 domääni fosforüleerimise tulemusena vabaneb Beclin1 Bcl-2 valgu küljest ning asub initsieerima autofaagiat. Samuti aktiveerib DAPK oksüdatiivse stressi korral PKD (*protein kinase D*), mis fosforüleerib ning aktiveerib valku Vps34, mis omakorda käivitab oksüdatiivse stressi vastase autofagosoomi moodustumise (Eisenberg-Lerner ja Kimchi, 2011). Veel üks võimalus Beclin1-e ja Bcl-2-e omavahelise sideme katkemiseks on Lys63-

seoseline ubikvitineerimine Beclin1 valgu BH3 domäänis asuvas positsioonis Lys117. Seda viib näiteks läbi E3 ubikvitiini ligaas Traf6. Samas jällegi Bcl-2-e monoubikvitineerimine E3 ubikvitiini ligaasi Parkini poolt raku tavapärasel olekus stabiliseerib Beclin1-e ja Bcl-2-e omavahelist sidet ning surub maha autofaagiat (Shi ja Kehrl, 2010, Chen jt., 2008). Üks autofaagia aktiivsuse näitaja on ka Beclin1-e kogus rakus. Nedd4 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4*) on E3 ubikvitiini ligaas, mis poliubikvitineerib Beclin1-te proteosomaalseks degradeerimiseks läbi Lys11-seoselise ubikvitineerimise, vähendades Beclin1-e hulka rakus (Platta jt., 2011). Lisaks ülaltoodule seostuvad Beclin1 ja Bcl-2 valgud lahti ka kui Beclin1-e BH3 domääniga seondub mõni teine Bcl-2 valguperekonna valk, näiteks Bad (*BCL2-associated agonist of cell death*) või BNIP3 (Maiuri jt., 2007, Bellot jt., 2009).

Lisaks, autofaagia inhibiitor Spautin-1 (*specific and potent autophagy inhibitor-1*) vastutab ühe mehhanismi eest, mis reguleerib PtdIns3K kompleksi stabiilsust. Spautin-1 blokeerib USP10 (*ubiquitin specific peptidase 10*) ning USP13 (*ubiquitin specific peptidase 13*) aktiivsust. Tegemist on kahe ubikvitiini spetsiifilise peptidaasiga, mis deubikvitineerivad PtdIns3K kompleksiga seondunud Beclin1-te ning seeläbi stabiliseerivad teda. Kuna PtdIns3K kompleksi stabiilsus sõltub eelkõige Beclin1-st, siis Spautin-1 töötlus vähendas nii Vps34, p150, Atg14L, UVRAG hulka kui ka PI3P produktsiooni ning lõppkokkuvõttes autofaagiat (Liu jt., 2011, Abrahamsen jt., 2012).

Rubicon on samuti üks autofaagiat negatiivselt mõjutav valk, mis interakteerub Beclin1-ga. Rubicon-il on RUN domään, asparagiini rikas regioon, CC domään ning tsüsteiini rikas regioon (Matsunaga jt., 2009, Zhong jt., 2009). Rubicon lokaliseerub hilistes endosoomides ning lüsoosoomides, kuid mitte autofagosoomil. Rubicon reguleerib autofaagiat negatiivselt inhibeerides autofagosoomi arengut. Tema üleekspressioon vähendab märgatavalt PtdIns3K kompleksi aktiivsust (Matsunaga jt., 2009).

IP<sub>3</sub>R (inositool 1,4,5-trifosfaat retseptor kompleks) on membraanil asuv glükoproteiinide kompleks, mis toimib Ca<sup>2+</sup> kanalina. IP<sub>3</sub>R reguleerib autofaagiat negatiivselt, inhibeerides seda. IP<sub>3</sub>R antagonistid aga seevastu indutseerivad autofaagiat, pärssides IP<sub>3</sub>R ning Beclin1-e omavahelist sidet (Vicencio jt., 2009).

Lisaks autofaagia inhibiitoritele interakteerub Beclin1 ka mitmete autofaagiat positiivselt reguleerivate valkudega. Atg14-1 on kaks CC domääni, mis seonduvad Beclin1 ja Vps34 CC domäänidega (Matsunaga jt., 2009). Atg14 ei mõjuta Beclin1 ja Vps34 interaktsioone, küll aga mõjutab Beclin1-e defitsiit Atg14 taset rakus (Sun jt., 2008, Itakura jt., 2008).

UVRAG soodustab autofagosoomi sulandumist endosoomide ning lüsoosoomiga hilises autofaagia järgus (Liang jt., 2008). On leitud, et UVRAG ekspressiooni inhibeerimine ei mõjutanud autofagosoomide moodustamist (Itakura jt., 2008, Knaevelsrud jt., 2010). UVRAG seondub Beclin1 valguga läbi CC domääni (Liang jt., 2006). UVRAG on võimeline segama Bcl-2-e ja Beclin1-e omavahelist seondumist, moodustades ise heterodimeeri Beclin1-ga (Noble jt., 2008). Beclin1 valgu defitsiit vähendab UVRAG valgu taset toitainete puuduse korral rakus (Itakura jt., 2008).

Bif1 asub tsütosoolis ning reguleerib organellide membraani dünaamikat (näiteks Golgi kompleksil ja mitokondril). Autofaagia puhul interakteerub Bif-1 Beclin1-ga läbi UVRAG-i ning mõjutab autofaagiat positiivselt. Bif-1 defitsiit inhibeerib tugevalt PtdIns3K kompleksi aktivatsiooni ning autofagosoomide moodustumist (Takahashi jt., 2007).

Ambra1 defitsiidi korral on täheldatud rapamütsiini ning toitainete puudusest tekkiva autofaagia olulist vähenemist. Samas Ambra1-e üleekspressiooni korral on täheldatud autofaagia võimendumist. Ambra1 on vajalik Beclin1 valgu translokatsiooniks endoplasmaatilisse retiikulumi (Fimia jt., 2007, Bartolomeo jt., 2010). Ambra1-e rolliks peetakse ka Beclin1 valgu ning PtdIns3K kompleksi translokaliseerumist tsütosooli ning endoplasmaatilise retiikulumi vahel (Luo jt., 2012).

VMP1 on endoplasmaatilise retiikulumi valk, tema tase rakus tõuseb toitainete puuduse korral. Samuti tõstab tema üleekspressioon LC3-I konversiooni LC3-II-ks ning autofagosoomide moodustumist (Ropolo jt., 2007, Vaccaro jt., 2008). VMP1 hüdrofoobne C-terminaalne regioon (Atg domään) seondub Beclin1 valguga ning aitab kaasa autofaagia initsiatsioonile. Mutantse Atg domääniga VMP1 ekspressiooni puhul LC3-e suurenenud konversiooni ning Beclin1-ga seondumist ei täheldatud (Nowak jt., 2009).

Samuti on näidatud Pink1-e lõikamata isovormi interaktsiooni Beclin1 valguga, kus Pink1 positiivselt reguleerib autofaagiat (Michiorri jt., 2010).

Beclin1-te peetakse oluliseks eelkõige seoses fagofoori initsiatsiooni protsessiga (Matsunaga jt., 2009), kuid on näidatud ka tema võimet otseselt intisieerida mitofaagiat. Uurimistulemused näitavad, et Beclin1 interakteerub Parkiniga tsütosoolis. Beclin1 valgu defitsiit inhibeerib Parkini translokatsiooni mitokondri välismembraanile ning inhibeerib Parkini võimet ubikvitineerida ühte mitokondri välismembraani valku, Mitofusiin 2, mis on Parkinile substraadiks. Vastavatest tulemustest lähtub, et Beclin1 ei ole oluline mitte ainult

fagofoori moodustumiseks, vaid ka mitofaagia üleüldiseks initsiatsiooniks (Choubey jt., 2014).

**Tabel 2.** Olulisemad Beclin1-ga seonduvad valgud.

Positiivselt autofaagiat mõjutavad valgud	Interaktsiooni olemus
Vps34	Moodustab Beclin1 valguga PtdIns3K kompleksi. Katalüütiline PtdIns 3-kinaas.
p150	PtdIns3K kompleksi valk. Aitab PtdIns3K kompleksil translokaliseeruda membraanile.
Ambra1	PtdIns3K kompleksi liikumine tsütosooli ning endoplasmaatilise retiikulumi vahel.
Atg14	Aitab PtdIns3K kompleksil lokaliseeruda omegasoomile.
Bif-1	Võimendab UVRAG-i seostumist PtdIns3K kompleksiga.
UVRAG	Stimuleerib autofagosoomi ja lüsoosoomi sulandumist.
VMP1	Aitab Beclin1 valgul seonduda endoplasmaatilise retiikulumiga.
Pink1	Lõikamata isovorm interakteerub Beclin1-ga mõjutades autofaagiat positiivselt. Täpsem interaktsiooni olemus teadmata.
JNK1	Seostab lahti Beclin1 ja Bcl-2 valgud. Beclin1 saab tänu sellele ühineda PtdIns3K kompleksiga.
HMGB1	Seostab lahti Beclin1 ja Bcl-2 valgud.
Traf6	Seostab lahti Beclin1 ja Bcl-2 valgud.
Negatiivselt autofaagiat mõjutavad valgud	
Bcl-2	Seondub Beclin1 valguga ning inhibeerib PtdIns3K kompleksi teket.
Bcl-XL	Seondub Beclin1 valguga ning inhibeerib PtdIns3K kompleksi teket.
IP <sub>3</sub> R	Seondub Beclin1 valguga ning inhibeerib PtdIns3K kompleksi teket.
Spautin-1	Blokeerib USP10 ja USP13 aktiivsust, mis stabiliseerivad PtdIns3K kompleksis asuvat Beclin1-te.
Rubicon	Inhibeerib UVRAG valku omava PtdIns3K

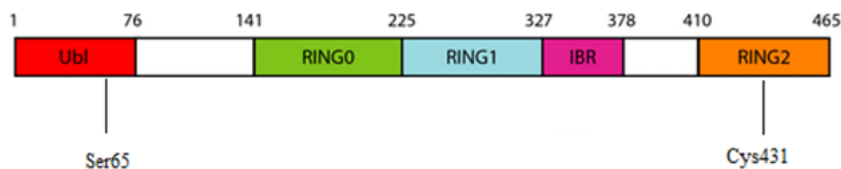
	kompleksi aktiivsust.
Nedd4	Polüubikvitineerib Beclin1-te proteosomaalseks lagundamiseks.

## 1.4. Parkin

Parkin valku kodeerib 1380 kb pikk geen PARK2 (*autosomal recessive juvenile parkinson disease-2*). Vastav geen asub inimesel 6q25.2-q27 ning ta koosneb 12 eksonist ning 7 intronist (Matsumine jt., 1997, Kitada jt., 1998, Asakawa jt., 2001).

Peale 50% autosomaalse retsessiivse juveniilse Parkinsoni tõve põhjustamise, on leitud, et mutantset Parkini valku võib pidada vastutavaks ka 15% varajase algusjärgu (sümptomid on ilmnunud alla 45. eluaastat) idiopaatilise Parkinsoni tõve tekke eest (ref. Bonifati, 2013). Parkin on neuroprotektiivne 52 kDa RING klassi kuuluv E3 ubikvitiin ligaas, tema põhiülesandeks on kahjustunud mitokondrite märkimine lagundamiseks (van Humbeeck jt., 2008, Trempe jt., 2013, Berndsen ja Wolberger, 2014). Vastavat protsessi on täpsemalt kajastatud peatükis "Mitofaagia". Lisaks olulisele rollile mitofaagias, on leitud, et Parkin seostub mitokondriaalse DNA-ga ning mõjutab positiivselt viimase replikatsiooni, transkriptsiooni ning osaleb reaktiivse hapniku tekitatud kahjustuste parandamisel (Rothfuss jt., 2009). Parkin on laialdaselt ekspresseeritud neuronites ning astrotsüütides (Huang jt., 2008, Song jt., 2009). Parkini defitsiitsetel hiirtel on täheldatud gliia rakkude düsfunktsioone (Solano jt., 2008). Parkin suudab katalüüsida nii monoubikvitineerimist kui ka Lys48-seoselist ning Lys63-seoselist polüubikvitineerimist (Matsuda jt., 2006, Hebron jt., 2013). Parkin on 465 aminohappe pikkune pooleks voltunud valk, mis koosneb UBL domäänist, millele järgneb neli RING tüüpi domääni, mis on kõik omavahel seotud kahe Zn aatomiga (Riley jt., 2013). RING0 domääni N-terminuses on *zinc-finger* domään. RING1-IBR domäänid asuvad ruumiliselt RING2 vastas (Wauer ja Komander, 2013). Parkinil on unikaalne RING0:RING2 (C-terminaalne) side, mis toimib aktiivsaidina - katalüütiline tsüsteiin 431 (Cys431) (Trempe jt., 2013) (joonis 5). Teiseks oluliseks seondumiskohaks on RING1-IBR E2-seondumissait (Riley jt., 2013). On leitud, et mutatsioonid Cys431 aktiivsaidis põhjustavad Parkini poolset mitokondrite degradatsiooni võimekuse langust. Samuti on leitud, et RING0 domääni deletsioon suurendab Cys431 reaktiivsust ning Parkini autoubikviteerimist (Riley jt., 2013). UBL domääni deleteerimisel on väheldane efekt Parkini aktiivsusele (Trempe jt., 2013).

Parkini põhilisteks substraatideks mitokondri välismembraanil on Mitofusiin 1 ja 2 ning Miro 1 ja 2 (*mitochondrial Rho GTPase*) (Glauser jt., 2011, Wang jt., 2011, Liu jt., 2012). Samuti ubikvitineerib Parkin mitokondri välismembraanil asuvaid poriini valke VDAC 1, 2 ja 3 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein*) (Geisler jt., 2010, Sun jt., 2012).



**Joonis 5.** Parkin valgu struktuur. Parkin koosneb UBL (*ubiquitin like domain*) domäänist, millele jägneb 4 RING (*really interesting new gene*) tüüpi domääni: RING0, RING1, RING2 ning IBR (*in-between RING*). Kõik domäänid on omavahel ühendatud kahe Zn aatomiga. Joonisele on märgitud seriin 65, mida Pink1 fosforüleerib ning tsüsteiin 431, mis asub Parkin valgu katalüütilises aktiivsaidis, kus toimub ubikvitiini sidumine substraadile (Riley jt., 2013 põhjal).

## 1.5. Miro1

Mitokondriaalsed Rho GTPaasid 1 ja 2 (vastavalt Miro1 ja Miro1) on valgud, mida seostatakse mitokondriaalse dünaamikaga (Birsa jt., 2014). Valke kodeerib RHOT1/2 geen, mis asub inimese 17q11.2. Miro valgud koosnevad 618 aminohappest ning nende molekulmass on 70 kDa. Miro1 ja Miro2 valgu aminohappeline kattuvus on 60%. Miro valgud on ekspresseerunud kõikides kudedes, enim südames ning skeletilihastes (Fransson jt., 2003). Miro valgud on evolutsiooniliselt väga tugevalt konserveerunud, neid kodeerivate geenide ortolooge on leitud laialdaselt eukarüootides, näiteks pagaripärmis, müürloogis ja äädikakärbses (Guo jt., 2005). Antud töös ning katsetes keskendutakse Miro1 valgule.

Miro1 on mitokondri välismembraani valk, millel on kaks GTPaasi domääni (üks N-terminaalne GTPaas on Rho tüüpi GTPaas ning üks Rho GTPaasidele ebatüüpiline GTPaas), kaks  $\text{Ca}^{2+}$  seostumis domääni, mida kutsutakse EF "käteks" ning transmembranane domään (Fransson jt., 2003). Miro1 valgu üheks funktsiooniks on Miro-Trak-KIF5 (*mitochondrial Rho GTPase - trafficking kinesin protein - kinesin family member 5*) kompleksis osalemine,

antud kompleks tegeleb mitokondrite transpordiga neuronites (Fransson jt., 2003, Fransson jt., 2006).

Neuronites mitokondrid mitte ainult ei varusta rakku energiaga, vaid mängivad olulist rolli ka sünapside võimes puhverdada  $\text{Ca}^{2+}$  sissevoolu ning edendada sünapside differentseerumist ning plastilisust. Seetõttu on neuronites olulised dünaamilised süsteemid, mis aitavad mitokondritel liikuda vastavatesse subtsellulaarsetesse aladesse (Saxton ja Hollenbeck, 2012, Shen ja Cai, 2013, Tomasi jt., 2013).

Äädikakärbses nimetatakse Miro-Trak-KIF5 kompleksi Miro-Milton-Khc kompleksiks. Äädikakärbsega tehtud katsetes oli etüülmetaansulfonaadiga Miro muteerimisel täheldatud mitokondrite akumulereerumist neuronite rakukehasse. Miro1-e üleekspressioon põhjustas aga liigse mitokondrite akumulereerumise sünapsitesse (Stowers jt., 2002, Guo jt., 2005). Samasid tulemusi andis ka Milton valgu mutant, Trak (*trafficking kinesin protein*) homoloog äädikakärbses. Biokeemiliselt on leitud, et Milton seondub mitokondriga ning kinesiini raske ahelaga (Khc), mis viitab, et Milton on oluline kinesiinide poolt vahendatud mitokondrite transpordiks (Stowers jt., 2002, Guo jt., 2005). Imetaja homoloogid Milton valgule on Trak1 ja Trak2. Trak1 seondub nii kinesiini kui düneiiniga ning asub peamiselt aksonites. Trak2 interakteerub pigem düneiiniga ning asub dendriitides (van Spronsen jt., 2013). Mõlemal valgud interakteeruvad Miro valkudega. Miro1 interakteerub Trak valkudega tõenäoliselt oma esimese GTPaasi domääni kaudu. (Brickley jt., 2005, Smith jt., 2006, MacAskill jt., 2009). Peale Miro1-e ning Khc-ga interakteerumise interakteeruvad Trak1/2 ka o-GlcNAc transferaasiga, mis on post-translatsioonilist O-glükosüleerimist katalüüsiv ensüüm (Brickley jt., 2011). Arvatakse, et O-GlcNAc modifitseerib Trak1/2 valke ning seob mitokondrite dünaamika toiteainete küllusega rakus (Trinidad jt., 2012, Pekkurnaz jt., 2014). On leitud, et mitokondrite liikumine sõltub ka  $\text{Ca}^{2+}$  tasemest rakus. Kui  $\text{Ca}^{2+}$  liigub neuronisse sisse (sünapsi aktiveerumine), akumulereeruvad ka mitokondrid nendes alades (Wang ja Schwarz, 2009). Ühe mudeli kohasel viib  $\text{Ca}^{2+}$  taseme tõus KIF5 (*kinesin family member 5*) valgu dissotsieerumiseni mikrotuubulite küljest, mistõttu peatub mitokondrite liikumine (Wang ja Schwarz, 2009). Teise mudeli järgi  $\text{Ca}^{2+}$  taseme tõus inhibeerib Miro ja KIF5 interaktsiooni, mis dissotsieerib Miro ja mitokondrid mikrotuubulite mootorsüsteemist (MacAskill jt., 2009b). On leitud, et Miro1 EF mutandid, mille EF käd ei suuda  $\text{Ca}^{2+}$  siduda, ei põhjusta mitokondrite seiskumist  $\text{Ca}^{2+}$  taseme tõusu korral. Metsiktüüpi Miro1-e puhul tekitab  $\text{Ca}^{2+}$  taseme tõus mitokondrite seiskumise (Saotome jt., 2008, Wang ja Schwarz, 2009).

Peale mitokondriaalse transpordi reguleerib Miro1 ka mitokondrite morfoloogiat (Fransson jt., 2003, Frederick jt., 2004, Russo jt., 2009). *Arabidopsis thaliana* puhul on täheldatud, et Miro1-te kodeerivas RHOT1 geenis tekkinud mutatsioonide tulemusena tekivad kõrvalekalded mitokondrite suuruses ja kujus (mitokondrid on toru kujulised ning suurenenud) (Yamaoka ja Leaver, 2008). Imetajas seostatakse Miro valke mitokondrite fusiooni ja fissiooniga, näiteks interakteerub Miro1 fusiooni positiivselt reguleerivate valkude Mitofusiin 1 ja 2-ga (Misko jt., 2010).

Miro1 osaleb ka mitokondri ning endoplasmaatilise retiikulumi vaheliste kontaktide loomises. Pärmis on mitokondrid endoplasmaatilise retiikulumiga ühendatud ERMES (*ER-mitochondria encounter structure*) struktuuri kaudu. ERMES-e üks funktsioone on fosfolipiidide vahetamine kahe vastava organelli vahel. Lisaks on leitud, et ta kordineerib mitokondriaalsete valkude importi, mitokondriaalse DNA replikatsiooni ja mitokondrite dünaamikat (Kornmann jt., 2011).

Häireid Miro1 funktsionaalsuses seostatakse Parkinsoni tõve, amüotroofse lateraalskleroosi ning skisofreeniaga (Liu jt., 2012, Morotz jt., 2012, Ogawa jt., 2014). On teada, et Pink1 ja Parkin rada reguleerib Miro1-e stabiilsust, kuid ei ole täpselt teada, kas Pink1 fosforüleerib Miro1-te otseselt või läbi mõne kolmanda valgu. Uurimistulemused on näidanud, et Miro1-e defitsiidi tulemusena on häirinud ka mitofaagia. Samuti on leitud, et Miro1 võib stabiliseerida fosfo-mutantset Parkin valgu vormi mitokondri välismembraanil (Wang jt., 2011, Liu jt., 2012, Birsa jt., 2014).

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1. Töö eesmärgid

Antud uurimistöö keskseteks valkudeks olid Beclin1, Parkin ning Miro1. Beclin1 valku peetakse oluliseks fagofoori moodustamise initsiatsioonis, Parkinit, aga mitofaagias. Miro1 on seotud mitokondrite liikumisega rakus. Meie uurimisgrupp oli eelnevalt näidanud interaktsiooni Beclin1 ning Parkin valkude vahel ning selle kompleksi olulisust mitofaagia käivitamises. Teiselt poolt oleme nii meie kui teised leidnud, et Parkin interakteerub Miro1 valguga, kuid Miro1 valgu võimalikku funktsiooni mitofaagias pole täpsemalt uuritud. Seetõttu oli antud uurimistöö peamiseks eesmärgiks leida täiendavaid tõendeid, et Miro1 mängib rolli mitofaagias.

Antud magistr töö eesmärkideks oli:

1. Selgitada, kas Miro1 võiks interakteeruda autofaagias olulist rolli mängiva valgu Beclin1-ga.
2. Selgitada, kuidas mitokondrite depolariseerimine ja mitofaagia esile kutsumine mõjutavad Miro1 ja Beclin1 vahelist interaktsiooni.
3. Selgitada, kuidas Parkin ja tema Parkinsoni tõvega seotud mutatsioonid mõjutavad Miro1 ja Beclin1 vahelist interaktsiooni.
4. Täpsustada Miro1 ning Beclin1 valgu interaktsiooni olemust kasutades selleks muteeritud Miro1 valke.

## **2.2. Materjal ja meetodika**

### **2.2.1. Rakuliinid ja söötmed**

Katsetes kasutati inimese embrüonaalseid neerurakke 293 (HEK293) imetaja rakuliinina. Rakkude söötteks oli DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture F-12*, GIBCO), millele oli lisatud 10% veise loote seerumit. HEK293 rakke inkubeeriti 5% CO<sub>2</sub> ja 95% õhuniiskuse juures temperatuuril 37° C.

### **2.2.2. Plasmiidid**

Katsetes transfekteeriti rakkudesse järgnevaid plasmide: flag-Beclin (Addgene), myc-Miro1, myc-Miro1 EF, myc-Miro1 NN, myc-Miro1 VV, myc-Miro1 N18 (Dr. P. Aspenstörn), YFP-Parkin, YFP-Parkin-K161N, YFP-Parkin-T240R, YFP-Parkin-C431N (Dr. R. Youle).

### **2.2.3. Antikehad**

Katsetes kasutati primaarsete antikehadena rabbit-anti-flag, mouse-anti-myc, rabbit-anti beeta actin ning rabbit-anti-yfp antikehasid (Abcam) ning sekundaarsete antikehadena anti-mouse (800) ning anti-rabbit (680) (Thermo Scientific).

### **2.2.4. Transfekteerimine**

Rakud külvati vastavalt katsele kas 35 mm või 92 mm polü-L-lüsiiniga kaetud tassidele 48 tundi pärast rakkude jagamist. Tassidelt eemaldati sööde ning lisati transfektsioonisegu, mis koosnes vastavalt 600 µl Opti-Mem I (*Minimum Essential Medium*, Invitrogen) sööttest, 3 µg plasmiididest ning 6 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagentist 35 mm tassi kohta ning 3,2 ml Opti-Mem I sööttest, 6 µg plasmiididest ning 32 µl Lipofectamine 2000 reagentist 92 mm tassi kohta. Transfektsioonisegu inkubeeriti enne rakkudele lisamist toatemperatuuril 30 minutit. 3-4 tunni jooksul pärast transfektsioonisegu rakkudele peale kandmist lisati igale 35 mm tassile 2 ml ning 92 mm tassile 9 ml DMEM/F12 söödet.

## 2.2.5. Mitofaagia aktiveerimine

Selleks, et uurida mitofaagia mõju valkude interaktsioonile, mõjutati rakke enne immunosadestamist farmakoloogiliselt. Mitofaagia esilekutsumiseks lisati rakusöötmesse 1  $\mu\text{M}$  antimütsiini ja 1  $\mu\text{M}$  oligomütsiini segu, mida hoiti rakkude peal 3 tundi. Selleks, et pärssida valkude lagundamist, lisati rakusöötmesse 25  $\mu\text{M}$  proteosoomi inhibiitorit MG132, mida hoiti rakkude peal samuti 3 tundi.

## 2.2.6. Immunosadestamine

24 tundi peale transfekdeerimist rakud lüüsiiti. Tassidelt eemaldati sööde ning rakke pesti kaks korda PBS-ga ja seejärel koguti rakud jahutatud tuubidesse. Järgnevalt rakud koguti tsentrifuugides 5 min  $1000\times g$   $4^{\circ}\text{C}$  juures. Vedelik aspireeriti ning rakkudele lisati 100  $\mu\text{l}$  jääkülma lüüsipuhvrit 35 mm tassidelt kogutud rakkude puhul või 500  $\mu\text{l}$  lüüsipuhvrit 92 mm tassidelt kogutud rakkude puhul (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glütserool, pH 7,4), millesse oli lisatud cOmplete 5% proteaasi inhibiitorite segu (Roche). Rakkude efektiivsemaks lüüsimiseks purustati rakke 26G süstla nõela abil 1 ml insuliini süstlaga pipeteerides (Braun). Seejärel pandi rakud 30 minutiks jääle loksutades lüüsuma. Seejärel tsentrifuugiti lüüsisegu 15 min  $5600\times g$   $4^{\circ}\text{C}$  juures ning supernatant kanti uutesse tuubidesse. Proovide valgukonsentratsioonide määramiseks kasutati Bio-Rad RC DC valgukonsentratsiooni määramise komplekti. Optilise tiheduse referentsiks kasutati veise albumiini seerumit (Sigma-Aldrich), mida lahjendati lahusega 1 : 5 lüüsipuhvrit ja PBS-i. Valmistati 2  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,125  $\mu\text{g}$  ja 0  $\mu\text{g}$  vastavad lahjendused. Proove lahjendati viiekordselt PBS-ga. Seejärel kanti veise albumiini seerumi lahjendused ühes ja proovid kolmes korduses standardsele 96 süvikuga mikrotiiterplaadile. Igasse süvikusse lisati 24,5  $\mu\text{l}$  Reagent A, 0,5  $\mu\text{l}$  Reagent S ja 200  $\mu\text{l}$  Reagent B (Bio-Rad). Optilise tiheduse määramiseks kasutati seadet Sunrise<sup>TM</sup> (Tecan) ning tarkvara Magellan 6 (Tecan). Valgukonsentratsioonid arvutati välja kasutades Graph Pad Prism 5.0 tarkvara (GraphPad Software). Saadud lüüsiidid lahjendati valgukonsentratsiooni põhiselt võrdseks, kasutades lüüsipuhvrit ning 5% proteaasi inhibiitorite segu. Immunosadestamiseks kasutati Protein G-Sepharose 4B (Invitrogen) graanulite 50% suspensiooni lüüsipuhvris, millele oli lisatud 5% proteaasi inhibiitorite segu. Proovidele lisati 1-2  $\mu\text{g}$  immunosadestavat antikeha ning inkubeeriti üle öö  $4^{\circ}\text{C}$  juures

pöörleval loksutil. Järgneval päeval pesti proove kaks korda jääkülma lüüsi puhvriga ning kaks korda jääkülma PBS-ga.

### **2.2.7. Western Blot**

Saadud proovid lahutati SDS polüakrüülamiid geelelektroforeesi (SDS-PAGE) meetodil 10% polüakrüülamiidgeelis ja 1x SDS foreesipuhvris (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS, pH 8,3). Enne geelile kandmist lisati proovidele nende mahuga võrdne kogus 2,5x Lane Marker Reducing Sample puhvrit (0,3 M TrisHCl, 5% SDS, 50% glütserool, 100 mM ditiotreitool; Thermo Scientific) ning proove kuumutati 10 minutit 99°C juures. Seejärel kanti valgud geelist 0,2 µm PVDF membraanile (Millipore), kasutades selleks Trans-Blot Turbo Transfer System seadet (Bio-Rad). Enne valkude ülekande käivitamist leotati mõlemat Ion Reservoir Stack padjakest (Bio-Rad) 1x ülekandepuhvris (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 10% metanool, pH 8,3). Samuti märjati eelnevalt membraan metanoolis 30 sekundit. Ülekanne kestis 7 minutit voolutugevuse 1,3 A ning pinget 25 V juures. Seejärel hoiti membraani 5% blokeerimislahuses, mis koosnes 1x TBS-T (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4) ja 5% lõssipulbrist, tund aega 4°C juures. Sellele järgnes primaarsete antikehadega üleöö inkubeerimine 4°C juures. Vastavad antikehad lahjendati blokeerimislahuses järgnevalt: 1:1000 flag antikeha (Abcam), 1:5000 myc antikeha (Abcam) ja 1:800 yfp antikeha (Abcam). Järgmisel päeval pesti membraane 4x 15 minutit TBS-T puhvris, seejärel lisati sekundaarsed antikehad, mis olid lahjendatud blokeerimispuhvris 1:10000 (Thermo Scientific) ning membraani pesti taaskord 4x 15 minutit TBS-T puhvris. Pärast pesu kasutati signaali tuvastamiseks Odyssey CLx skännerit (Li-Cor). Piltide tarkvaraliseks vaatlemiseks, talletamiseks ning signaalitugevuse välja arvutamiseks kasutati Image Studio 4.0 (Li-Cor) tarkvara. Signaalitugevuste võrdlemiseks erinevate katsegruppide vahel mõõdeti immunosadestatud Beclin1 bändide, immunosadestatud Miro1 bändide ning Beclin1 kogu raku lüsaatide bändide signaalitugevusi. Algselt saadi suhtarv, kus katsegrupis olevad immunosadestatud Beclin1 bändide signaalitugevusi jagati immunosadestatud Miro1 bändide signaalitugevustega ning kogu raku lüsaadi Beclin1 bändide signaalitugevustega. Seejärel võrdsustati Beclin1 metsiktüüp + Miro1 metsiktüüp katsegrupp saja protsendiga ning võrreldi nimetatud katsegrupi signaalitugevuste suhtarvu teiste katsegruppide signaalitugevuste suhtarvuga.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Mitofaagia aktiveerimine tugevdab Miro1 ja Beclin1 valgu vahelist interaktsiooni

Uurimistöö esmaseks eesmärgiks oli selgitada, kas Miro1 interakteerub Beclin1-ga ning millisel moel mitofaagia aktiveerimine mõjutab nende interaktsiooni. HEK293 rakke transfekteeriti Miro1 valku ekspresseeriva plasmiidiga, mis sisaldas endas myc märgist, ning Beclin1 valku kodeeriva plasmiidiga, mis sisaldas endas flag märgist. Immunosadestamised viidi läbi flag-antikehaga. Et mitofaagilisi mehhanisme rakus käivitada, töötlesime rakke 1  $\mu\text{M}$  antimütsiini ning 1  $\mu\text{M}$  oligomütsiini seguga, mida hoiti rakkude peal 3 tundi. Antimütsiin puhul on tegemist hingamisahela III kompleksi inhibiitoriga ning oligomütsiini puhul mitokondriaalse ATPaasi inhibiitoriga. Antimütsiin ning oligomütsiin depolariseerivad mitokondri membraani, mille tulemusena Pink1 kuhjub mitokondri membraanile, põhjustades seeläbi Parkini translokatsiooni mitokondri välismembraanile ning käivitub mitofaagia (Vives-Bauza jt., 2010). Tulemused saadi Western Blot meetodikaga, kasutades flag ning myc antikehasid. Saadud tulemused näitavad, et üle ekspresseeritud Miro1 ja Beclin1 valgud interakteeruvad omavahel ning mitofaagia aktiveerumisel see interaktsioon suureneb (joonis 6).



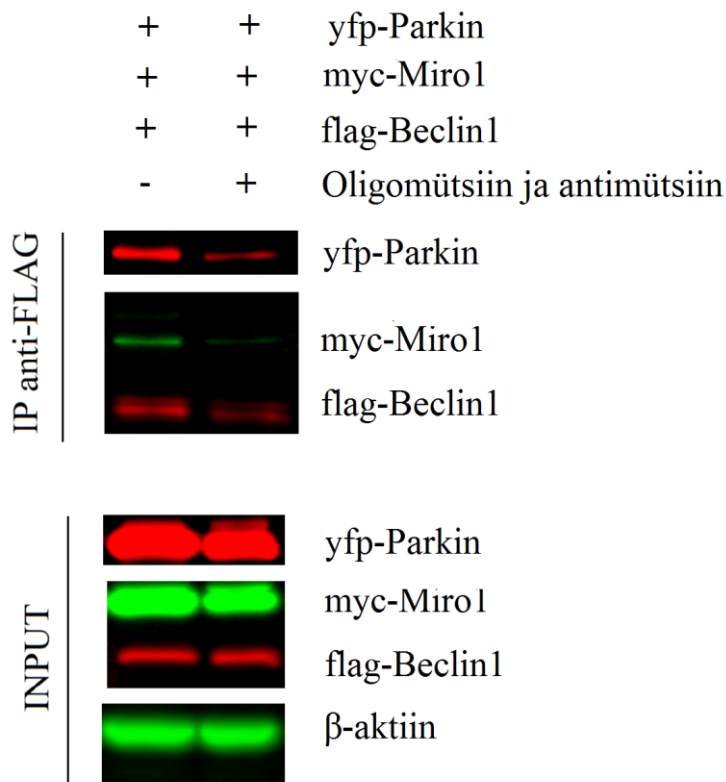
**Joonis 6.** Mitofaagia indutseerimine suurendab Miro1 ja Beclin1 valkude vahelist interaktsiooni. HEK293 rakke transfekteeriti myc-Miro1 ning flag-Beclin1 plasmiididega. Rakke töödeldi 3 tundi 1  $\mu\text{M}$  oligomütsiin ning 1  $\mu\text{M}$  antimütsiin seguga, mis kutsub esile mitofaagia võimendumise.

Immunosadestamine viidi läbi flag antikehaga. *Input*-i ja immunosadestamise lüsaate analüüsiti Western Blot meetodil kasutades flag ning myc vastaseid antikehasid.

### **2.3.2. Parkin valk vähendab Beclin1 ning Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni mitofaagia võimendumise korral.**

Kuna meie uurimisgrupp oli eelnevalt leidnud, et Parkin interakteerub Beclin1 valguga tsütosoolis (Choubey jt., 2014) ning oli tõestust leidnud ka Miro1 valgu ning Parkini omavaheline interaktsioon (Kazlauskaite jt., 2014a), soovisime teada, kuidas võiks Parkin valk mõjutada Beclin1 ning Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni. HEK293 rakke transfekteeriti eelmaintud Miro1 ning Beclin1 plasmiididega ning Parkini plasmiidiga, mis sisaldas yfp märgist. Immunosadestamine viidi läbi flag antikehaga. Mitokondri membraani depolariseerimiseks ning seeläbi mitofaagia võimendamiseks kasutati samuti 1  $\mu$ M oligomütsiini ning 1  $\mu$ M antimütsiini. Proove töödeldi myc, flag ning yfp antikehadega.

Western Blot meetodil saadud tulemused näitasid, et metsiktüüpi Parkin valk vähendab Miro1 ning Beclin1 valkude vahelist interaktsiooni 3 tunnisel töötlusel 1  $\mu$ M antimütsiini ning 1  $\mu$ M oligomütsiini seguga, mis võimendab mitofaagiat (joonis 7).



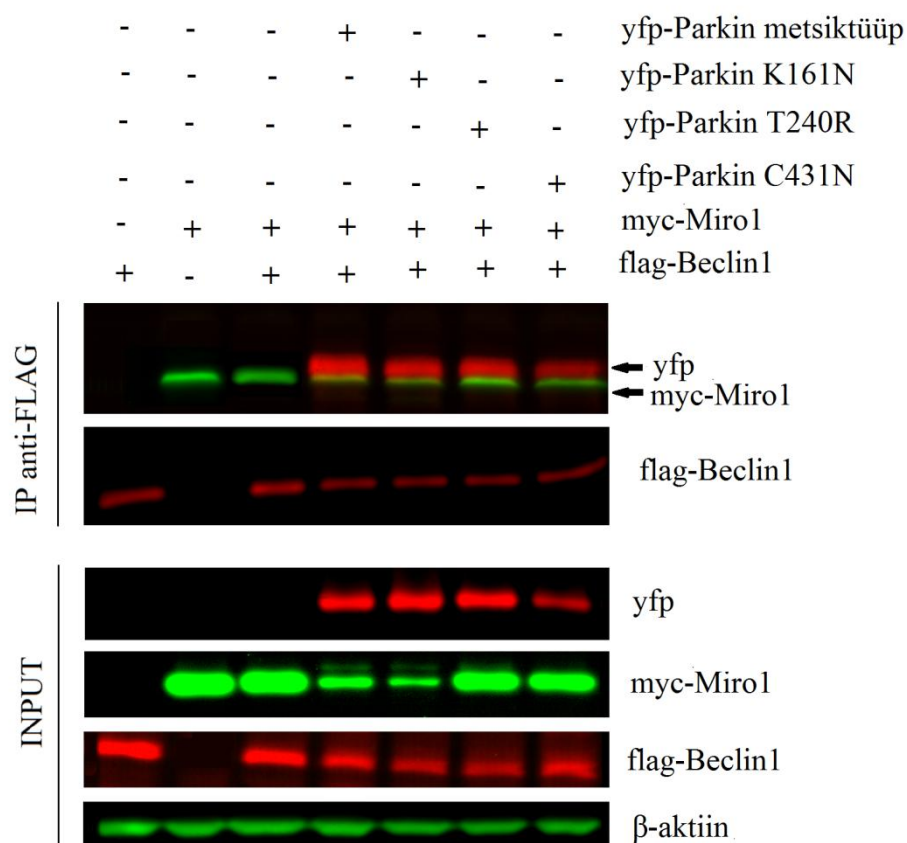
**Joonis 7.** Parkin vähendab Beclin1 ning Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni mitofaagia võimendudes. HEK293 rakke transfekteriti yfp-Parkin, myc-Miro1 ning flag-Beclin1 plasmiididega. Enne lüüsimist töödeldi rakke 3 tundi 1  $\mu$ M oligomütsiini ning 1  $\mu$ M antimütsiini seguga. Immunosadestamine viidi läbi flag antikehaga. Proove analüüsiti Western Blot meetodil kasutades myc, flag ning yfp vastaseid antikehasid.

### 2.3.3. Parkin valk ning tema muteerunud vormid vähendavad Beclin1 ning Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni raku tavaolekus.

Et täpsustada Parkin valgu mõju Miro1 ning Beclin1 valgu interaktsioonile, kasutasime erinevaid Parkin valgu mutante, mida seostatakse Parkinsoni tõvega. Antud Parkini mutantidest olid uurimistöös kasutusel Parkin K161N, T240R ning C431N. Parkin K161N kujutab endast Parkin valgu mutanti, kus Parkini RING0 domääni on loodud mutatsioon, mille tulemusena Parkini ligeerimisaktiivsus oluliselt väheneb (Kazlauskaite jt., 2014a). Parkin T240R mutandi puhul on muteerunud RING1 domääni esimene Zn sidumissait IBR domääniga (Hristova jt., 2009). Parkin C431N puhul on eemaldatud Parkini tsüsteiini aktiivsait RING2 domäänis, mida kasutades ligeerib Parkin ubikvitiini substraadi külge (Iguchi jt., 2013). Parkini muteeritud versioonide puhul on leitud, et nendes toimunud

mutatsioonide tulemusena ei ole muteerunud Parkin valk võimeline mitokondri välismembraanile translokeeruma (Okatsu jt., 2010, Matsuda jt., 2010, Lazarou jt., 2013), välja arvatud Parkin K161N puhul, kelle kohta käivad andmed on vastuolulised. Geisler jt. leidsid, et Parkin K161N on võimeline liikuma mitokondri välismembraanile, kuid sellest hoolimata võimetu käivitama mitofaagiat (Geisler jt., 2010). Okatsu jt. seevastu leidsid, et Parkin K161N ei translokeeru tsütosoolist mitokondri välismembraanile (Okatsu jt., 2010).

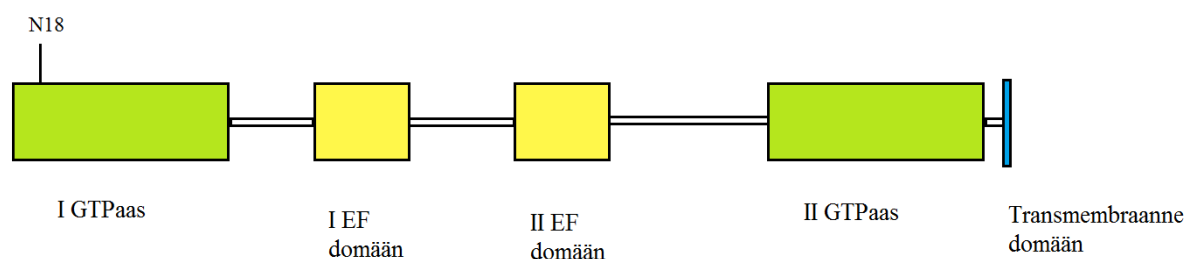
HEK293 rakke transfecteeriti myc-Miro1, flag-Beclin1 ning Parkini plasmiididega, kus kõik Parkin valgu vormid sisaldasid yfp märgist. Immunosadestamiseks kasutati flag antikeha. Proovide analüüsimisel Western Blot meetodiga selgus, et Miro1 ning Beclin1 valgu interaktsioon vähenes proovides, kuhu oli transfecteeritud Parkin valgu metsiktüüp ning tema muteeritud vormid: K161N, T240R ning C431N (joonis 8).



**Joonis 8.** Parkin valk ning tema muteeritud vormid vähendavad Beclin1 ning Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni raku tavaolekus. HEK293 rakke transfecteeriti yfp-Parkin metsiktüüp, yfp-Parkin K161N, yfp-Parkin T240R, yfp-Parkin C341N, myc-Miro1 ning flag-Beclin1 plasmiididega. Immunosadestamiseks kasutati flag antikeha. Proovide analüüsimiseks kasutati Western Blot meetodit ning myc, flag ja yfp vastaseid antikehasid.

### 2.3.4. Beclin1 ning Miro1 valkude vaheline interaktsioon väheneb Miro1 valgu GTPaasi domäänide mutatsioonide korral.

Kuna soovisime paremini iseloomustada Beclin1 ja Miro1 valkude omavahelist interaktsiooni, võtsime kasutusele muteeritud Miro1 valgud. Miro1 mutantidest olid kasutusel Miro1 EF, VV, NN ning N18. Miro1 EF kujutab endast Miro1 valgu mutanti, kus mõlemad  $\text{Ca}^{2+}$  seostumise domäänid on muteeritud. Miro1 NN mutandi puhul on tegemist Miro1 valgu versiooniga, kus valk on inaktiivne, kuna mõlemad GTPaasi domäänid on modifitseeritud nii, et nad on pidevas GDP molekule siduvas konformatsioonis. Miro1 VV puhul on, vastupidiselt, mõlemad GTPaasi domäänid pidevas GTP molekule siduvas konformatsioonis, muutes seeläbi Miro1 VV konstitutiivselt aktiivseks valguks. Miro1 N18 puhul oli muteeritud Miro1 valgu I GTPaasi domään, mille tulemusena on I GTPaasi domään pidevas GDP molekule siduvas konformatsioonis (Fransson jt., 2003, Fransson jt., 2006). Miro1 valgu domäänide skeem on kujutatud joonisel 9.



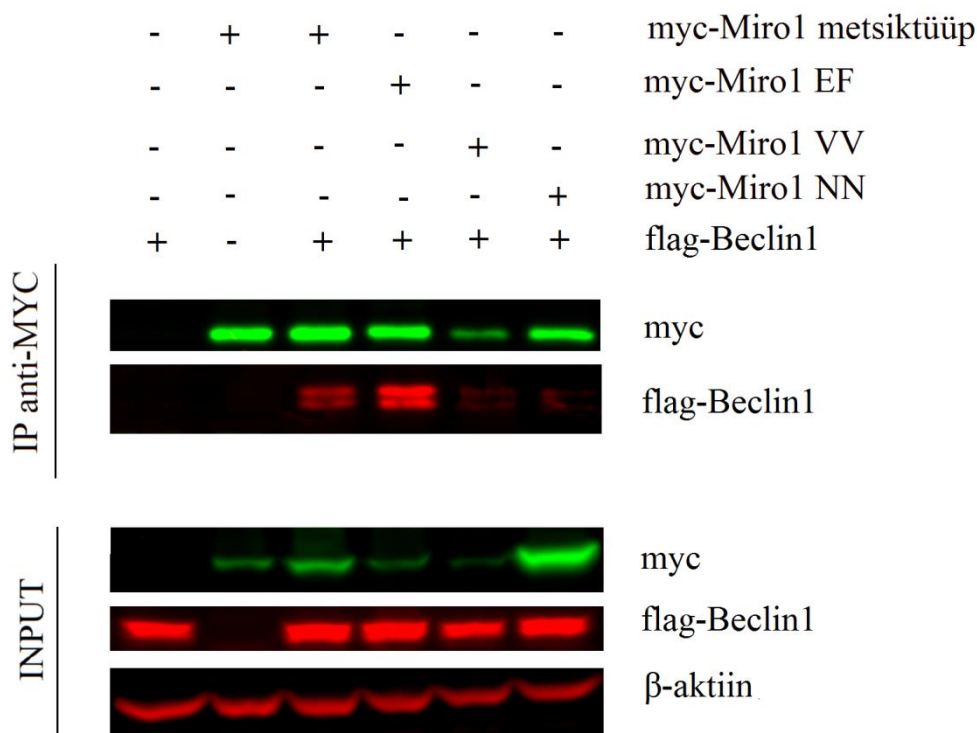
**Joonis 9.** Miro1 valgu domäänide skeem. Miro1 valk sisaldab kahte GTPaasi domääni, kahte  $\text{Ca}^{2+}$  seostumise domääni, nimetusega EF, ning transmembraanset domääni. Joonisel on lisaks ära näidatud Miro1 valgu N18 muteerimissait (Fransson jt., 2003).

Katsed viidi läbi kasutades HEK293 rakuliini, rakke transfekteriti kasutades myc märgisega Miro1 valke ning flag märgisega Beclin1 valku. Immunosadestamisel kasutati myc antikeha. Tulemused saadi Western Blot metoodil kasutades myc ning flag antikehasid.

Saadud tulemused viitasid, et mõlema  $\text{Ca}^{2+}$  seostumise domääni muteerimine ei vähenda Beclin1 ning Miro1 valkude vahelist interaktsiooni. Eelnimetatud tulemusele vastupidiselt vähenes Beclin1 ning Miro1 interaktsioon mutatsioonide korral Miro1 valgu GTPaasi domäänides konstitutiivselt aktiivse ning inaktiivse Miro1 muteerunud valkude korral (joonis 10).

Beclin1 ja Miro1 metsiktüüpi valkude signaali tugevusi võrreldi rühmade puhul, mida oli transfekteritud Miro1 VV ning Miro1 NN plasmiididega. Võrrelduna metsiktüüpi Beclin1

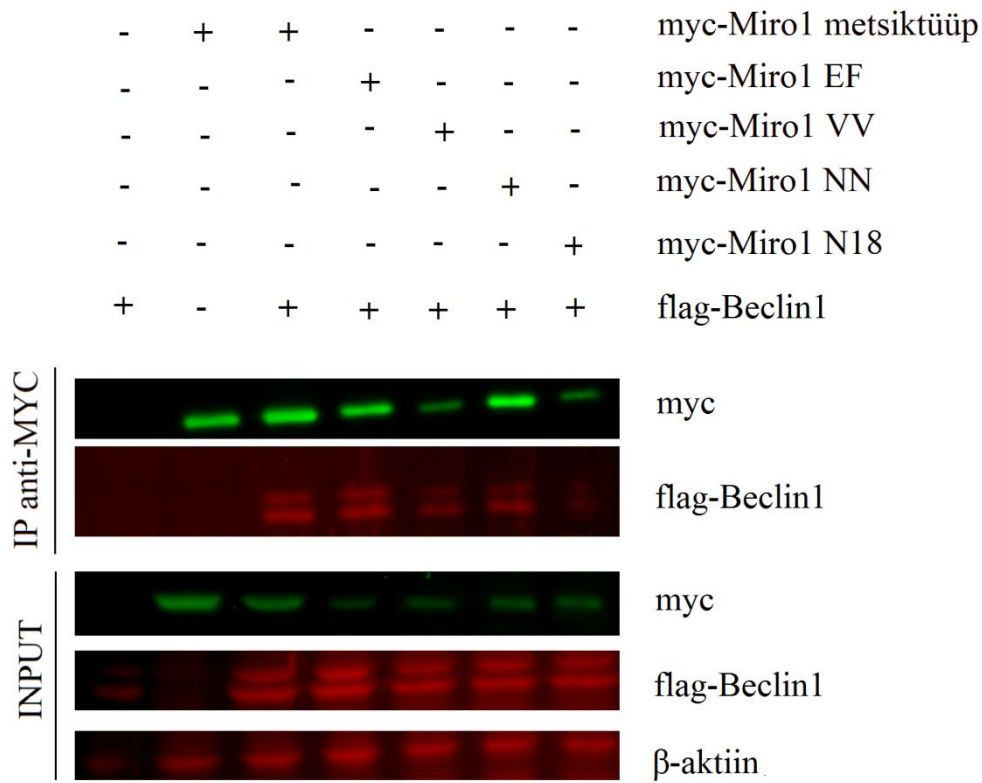
ning Miro1 valkude vahelise interaktsiooniga oli Miro1 VV ning Beclin1 valkude vaheline interaktsioon vähenenud 36% ning Miro1 NN ning Beclin1 valkude korral 67% võrra. Vastavate proovide signaalide tugevusi analüüsiti kasutades Image Studio 4.0 (Li-Cor).



**Joonis 10.** Miro1 valgu GTPaasi domäänide mutatsioonide korral vähenes Beclin1 ning Miro1 valkude omavaheline interaktsioon. HEK293 rakuliini rakke transfekeeriti myc-Miro1, myc-Miro1 EF, myc-Miro1 VV, myc-Miro1 NN ning flag-Beclin1 plasmiididega. Immunosadestamine viidi läbi myc antikehaga. Proovide analüüsimiseks kasutati Western Blot meetodit ning proove analüüsiti kasutades myc ja flag vastaseid antikehasid.

Soovides täpsustada Miro1 mutantsete valkude mõju Miro1 ja Beclin1 valgu interaktsioonile, viidi läbi korduskatse, kuhu oli lisaks kaasatud Miro1 N18, mille puhul on muteerunud esimene GTPaasi domään. Antud katsest ilmnesevad sarnased tulemused eelnevale katsele, kus  $\text{Ca}^{2+}$  seostumise domääni muteerimine Beclin1 ning Miro1 valkude interaktsiooni ei vähendanud, kuid GTPaasi domäänide muteerumine pärssis Beclin1-Miro1 interaktsiooni (joonis 11).

Võrrelduna metsiktüüpi Beclin1 ning Miro1 valkudega oli Miro1 VV ning Beclin1 metsiktüübi korral interaktsioon vähenenud 40% ning Miro1 NN ning Beclin1 metsiktüüpi valgu korral 54%, Miro1 N18 interaktsioon Beclin1 metsiktüüpi valguga oli vastavalt vähenenud 95%.



**Joonis 11.** GTPaasi domäänide mutatsioon Miro1 valgus vähendab Beclin1 ning Miro1 valkude interaktsiooni. Rakke transfekteeriti myc-Miro1, myc-Miro1 EF, myc-Miro1 VV, myc-Miro1 NN, myc-Miro1 N18 ning flag-Beclin1 plasmiididega. Immunosadestamiseks kasutati myc antikeha. Proovide analüüsimiseks kasutati Western Blot metoodikat ning myc ja flag vastaseid antikehasid.

## 2.4. Arutelu

Uurimistöö keskseks eesmärgiks oli Miro1 valgu interaktsiooni tuvastamine ja iseloomustamine autofaagias olulist rolli mängiva Beclin1 valguga. Eelnevalt on näidatud interaktsiooni mitofaagia initsiatsiooniga seotud valgu Parkin ning fagofoori moodustamise initsiatsiooniga seotud Beclin1 valgu vahel (Khandelwal jt., 2011, Choubey jt., 2014). Samuti on näidatud Parkin ning Miro1 valkude interaktsiooni (Wang jt., 2011, Liu jt., 2012, Kazlauskaite jt., 2014a, Birsa jt., 2014). Veel hiljuti ei olnud imetaja rakus teada asukoht, kus võiks toimuda fagofoori moodustumine ning pikenemine. Kuna Hamasaki jt. leidsid tõendeid, et fagofoori moodustumine leiab aset endoplasmaatilise retiikulumi ning mitokondri kontaktalades (Hamasaki jt., 2013), hakkas meie uurimisgrupile pakkuma huvi Miro1 valk, kuna on teada, et Miro1, mis on seotud mitokondrite dünaamikaga, osaleb pärmis ERMES (*ER-mitochondria encounter structure*) kompleksis ning tema defitsiidi tulemusena häirub mitofaagia (Kornmann jt., 2011, Birsa jt., 2014). Samuti eksisteeris võimalus, et Miro1 võib olla seotud enamaga kui mitokondri liigutamine endoplasmaatilise retiikulumi ning mitokondri kontaktalale. Näiteks on leitud, et Miro1 võib stabiliseerida fosfo-mutantset Parkin valgu vormi mitokondri välismembraanil (Liu jt., 2012, Birsa jt., 2014).

Esimeseks uurimistöö eesmärgiks oli tuvastada, kas Miro1 ning Beclin1 valgud interakteeruvad omavahel. Katsed üleekspresseeritud valkudega tõestasid vastavat oletust. Seejärel võeti katsetes kasutusele oligomütsiin ning antimütsiin, mis kutsuvad rakkudes esile mitofaagia võimendumise (Vives-Bauza jt., 2010). Tulemustest lähtus, et mitofaagia võimendamise tulemusena tugevnes ka Miro1 ning Beclin1 valkude vaheline interaktsioon. Saadud tulemus viitab Miro1 ning Beclin1 valkude omavahelisele seosele mitofaagiaga. Läbiviidud katsete tulemused ei tõesta, et Miro1-Beclin1 interaktsioon on otsene. Eksisteerib võimalus, et seda vahendab mõni kolmas valk. Uurimistulemused on leidnud, et Pink1 ja Parkin rada reguleerib Miro1 valgu stabiilsust, kus Pink1 fosforüleerib Miro1 valku otseselt või kaudselt (Liu jt., 2012, Birsa jt., 2014). Samuti on leitud, et Pink1 interakteerub Beclin1 valguga (Michiorri jt., 2010), mistõttu võib ta vahendada Miro1 valgu ning Beclin1 valgu omavahelisi interaktsioone.

Kuna on teada, et Miro1 ning Parkin intrakteeruvad (Wang jt., 2011, Liu jt., 2012, Kazlauskaite jt., 2014a, Birsa jt., 2014), viidi läbi katse, kus Miro1 ning Beclin1 valkudega koos ekspresseeriti üle ka Parkin valku. Huvitava tulemusena vähendas Parkini üleekspressioon Beclin1-Miro1 interaktsiooni. Interaktsioon nõrgenes ka Parkin-Beclin1-Miro1 üleekspresseeritud valkude töötlusel oligomütsiini ja antimütsiiniga ning samuti kui

Parkin metsiktüüpi valgu asemel ekspresseeriti Parkini muteeritud vorme K161N, T240R ning C431N, mis ei ole võimelised mitokondri välismembraanile translokeeruma (Okatsu jt., 2010, Matsuda jt., 2010, Lazarou jt., 2013). On teada, et metsiktüüpi Parkin ning tema muteeritud versioonid interakteeruvad Beclin1 valguga tsütosoolis (Choubey jt., 2014). Võimalik, et vastav interaktsioon võib Parkini üleekspressiooni korral siduda Beclin1 valgu Parkiniga ning seeläbi limiteerida Miro1 ning Beclin1 valkude omavahelist interaktsiooni. Vastaval juhul on Parkin-Beclin1 ja Miro1-Beclin1 interaktsioon teineteist välistavad. On võimalik, et Parkin-Beclin1 interaktsioon on varasem Miro1-Beclin1 interaktsioonist. Meie uurimisgrupi tulemuste järgi on Beclin1 vajalik Parkin valgu translokeerumiseks ning aktiveerumiseks mitokondri välismembraanil (Choubey jt., 2014). On hüpoteetiliselt võimalik, et Beclin1-Parkin interaktsioon katkeb pärast vastavat protsessi ning leiab aset Beclin1-Miro1 interaktsioon. Meie uurimisgrupp tuvastas immunosadestamise meetodikat kasutades ka Ambra1 ning Parkin valgu omavahelise interaktsiooni (Choubey jt., 2014). Kuna Ambra1 on PtdIns3K kompleksi liige, siis on võimalik, et Beclin1-Parkin interaktsioon toob PtdIns3K kompleksi mitokondri membraanile mitofaagia varajases etapis. Hilisemas etapis võib Beclin1 interakteeruda Miro1 valguga, mis võiks aset leida endoplasmaatilise retiikulumi ning mitokondrite ühenduskohtades, mille kohta on leitud tõendeid, et seal võiks toimuda fagofoori moodustumine imetaja rakkudes (Hamasaki jt., 2013) ning kus Miro1 osaleb mitokondrite ja endoplasmaatilise retiikulumi vaheliste ühenduskohtades loomises (Kornmann jt., 2011). Hüpoteetiliselt on võimalik, et lisaks teadaolevatele PtdIns3K kompleksidele on olemas veel eraldi kompleks, mis seondub mitokondrite membraanile, mõjudes mitofaagiale positiivselt, ning mis oma valgulises koostises erineb endoplasmaatilise retiikulumi membraanile seonduvast PtdIns3K kompleksist. On võimalik, et mitokondrite ja endoplasmaatilise retiikulumi ühenduskohtades võib hüpoteetiline mitokondriaalne PtdIns3K kompleks dimeriseeruda endoplasmaatilise Beclin1 valguga, kuna on näidatud, et Beclin1 on võimeline iseendaga dimeriseeruma (Noble jt., 2008). Vastava protsessi tulemusena võib aktiveeruda fagofoori moodustumine mitokondrite ümber ning ei saa välistada võimalust, et fagofoori kasvatamiseks kasutatakse lagundatava mitokondri membraani.

Katsete tulemused viitasid, et Beclin1-Miro1 interaktsioon nõrgeneb Miro1 muteerunud vormide korral, kus mutatsioonid paiknevad ühes või mõlemas Miro1 valgu GTPaasi domäänis.  $Ca^{2+}$  seondavas domäänis paiknev mutatsioon Beclin1 ja Miro1 valgu omavahelist interaktsiooni ei vähendanud. Funktsionaalselt on keeruline tuua välja põhjust, miks mutatsioon Miro1 valgu GTPaasi domäänis või domäänides mõjutab Beclin1-Miro1 interaktsiooni pärssivalt. Tõenäoliselt põhjustab seda Miro1 molekuli struktuuriline muutus.

On võimalik, et GTP või GDP molekulidega seostumine annab Miro1 valgule vastava struktuuri, mis raskendab Beclin1 valgul ning Miro1 valgul omavahel, või Miro1-l ja mõnel kolmandal valgul, mis vahendab Beclin1-Miro1 interaktsiooni, seostuda.

Kokkuvõttes on antud uurimistöö tulemused esimeseks viiteks Miro1 valgu ja Beclin1 valgu omavahelisele interaktsioonile ning selle seotusele mitofaagiaga. Beclin1-Miro1 interaktsiooni täpne olemus ning erinevate mitofaagia käivitumisega seotud valkude, näiteks Parkin ning Pink1, mõju Beclin1-Miro1 interaktsioonile vajab täiendavat uurimistööd. Samuti, kuna katsed on tehtud üleekspressiooni tingimustes, tuleb saadud tulemused üle kontrollida endogeensete valkudega.

## Kokkuvõte

Viimaste aastate jooksul on avaldatud mitmeid artikleid, mis on avardanud meie teadmisi mitofaagia eripäradest. Kuigi mitokondrite lagundamise alustusprotsesse uuritakse praegusel ajal intensiivselt, on tunduvalt vähem uuritud mitokondrite dünaamikaga seonduvat mitofaagias. Antud uurimistöö keskendus valkudele Miro1, Beclin1 ning Parkin. Beclin1 valku seostatakse autofaagilise vesiikuli moodustamise initsiatsiooniga, Parkin valku mitofaagia käivitumisega ning Miro1 valku mitokondrite dünaamikaga. Antud uurimistöö keskseks eesmärgiks oli leida täiendavaid tõendeid, et Miro1 mängib rolli mitofaagias. Selleks uurisime me Miro1 interaktsiooni Beclin1 valguga.

Immunosadestamise tulemused näitasid, et Miro1 ning Beclin1 valk interakteeruvad omavahel, mis viitab, et Miro1 on seotud mitofaagia mehhanismidega. Samuti ilmnes, et mitofaagia võimendamine tugevdab nimetatud valkude omavahelist interaktsiooni. Vastav tulemus viitab Miro1 ning Beclin1 valkude omavahelisele seosele mitofaagiaga. Katsete tulemused ei tõesta, et Miro1-Beclin1 interaktsioon on otsene, vaid eksisteerib ka võimalus, et interaktsiooni vahendab mõni kolmas valk.

Uurides Parkin valgu mõju Miro1 ja Beclin1 omavahelisele interaktsioonile, leiti, et Parkin vähendab Miro1-Beclin1 interaktsiooni raku tavaolekus ning ka mitofaagia võimendumise korral. Samuti vähendas Miro1 ning Beclin1 valkude omavahelist interaktsiooni Parkini muteeritud vormid K161N, T240R ning C431N, mis ei ole võimelised mitokondri välismembraanile translokeeruma. Meie uurimisgrupp on leidnud eelnevalt, et Parkin ning Beclin1 interakteeruvad omavahel tsütosoolis. Seetõttu on võimalik, et Parkin-Beclin1 ja Miro1-Beclin1 interaktsioonid on teineteist välistavad.

Miro1 ning Beclin1 valkude omavahelise interaktsiooni olemuse täpsustamiseks viidi läbi katsed Miro1 muteeritud vormidega. Uurimistöö tulemused näitasid, et Beclin1 ning Miro1 valkude vaheline interaktsioon väheneb Miro1 valgu GTPaasi domäänide mutatsiooni korral, kus mõlemad GTPaasi domäänid on seotud GTP või GDP molekulidega. Tõenäoliselt mõjub Beclin1-Miro1 interaktsioonile pärssivalt Miro1 valgu struktuuri muutus, mis raskendab Beclin1 valgul ning Miro1 valgul omavahel, või läbi tundmatu kolmanda valgu, seostuda.

# **Miro1-Beclin1 interaction in mitophagy**

Kristjan Kivi

## **Summary**

Autophagy is an intracellular degradation process that is essential for the survival of eukaryotic cells and mammals. Mitochondria related autophagy is called mitophagy. Since dysfunctions in mitophagy are related to a number of neurodegenerative diseases, the aim of these thesis was to investigate the involvement of mitochondrial protein Miro1 in mitophagy. Thesis was focused on three of the following proteins: Beclin1, Parkin and Miro1. Beclin1 plays a key role in the initiation step of an autophagy vesicle named as the phagophore formation. Parkin acts as an E3 ubiquitin ligase, that ubiquitinates target proteins on mitochondrial outer membrane and subsequently regulates mitophagy. Mutations of Parkin are associated with the occurrence of autosomal recessive familial Parkinson's disease. Miro1 is related to transportation of mitochondria. It is suggested that Miro1 may act in a system that translocates damaged mitochondria to endoplasmatic reticulum, where Beclin1 initiates formation of the phagophore. The following experiments were conducted to clarify the involvement of Miro1 in mitophagy by its interaction with Beclin1.

Our immunoprecipitation results show that Miro1 interacts with Beclin1. When mitophagy was activated by oligomycin and antimycin treatment, the interaction between Miro1 and Beclin1 increased. These results indicate that Miro1-Beclin1 interaction is related to mitophagy. Our experiments don't reveal whether the interaction between Miro1 and Beclin1 is direct, and it is possible that the interaction may be mediated by an unknown protein.

Thereafter we conducted experiments to study the influence of Parkin overexpression on Miro1-Beclin1 interaction. The results show that Parkin decreases Miro1-Beclin1 interaction in both, normal state of the cell as well as after the induction of mitophagy by treatment with oligomycin and antimycin. Moreover, Miro1-Beclin1 interaction was also decreased by overexpression of Parkin mutants K161N, T240R and C431N which are incapable of translocating to mitochondrial outer membrane. Our research group has recently discovered, that Parkin interacts with Beclin1 in cytosol. It is hypothetically possible that Parkin-Beclin1 interaction precludes Miro1-Beclin1 interaction.

To clarify the nature of Miro1-Beclin1 interaction, experiments with Miro1 mutants were conducted. Results indicate that mutations in Miro1 GTPase domains decrease Miro1-Beclin1 interaction. It is possible that this is caused by changes in Miro1 protein structure which prevents Beclin1, or an unknown protein which mediates Miro1-Beclin1 interaction, to bind with Miro1.

To conclude, the following thesis indicates unpublished interaction between Miro1 and Beclin1 protein as well as Miro1-Beclin1 relation to mitophagy. Miro1-Beclin1 interaction's precise nature in mitophagy needs further study. Moreover, since the experiments were conducted with overexpression of the mentioned proteins the results need to be confirmed with endogenous proteins.

## **Tänuõnad**

Soovin tänada oma juhendajaid prof. Allen Kaasikut ja prof. Margus Poogat ning samuti Joanna Liiva ja Dzhamilja Safiulinat väärtuslike nõuannete eest.

Samuti kõiki teisi, kes aitasid antud tööl valmida.

## **Kirjanduse loetelu**

### **A) Ajakiri**

Abrahamsen, H., Stenmark, H., Platta, H. W. (2012). Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression. *FEBS Lett.*586: 1584–1591.

Aerts, L., Craessaerts, K., De Strooper, B., Morais, V. A. (2015). PINK1 Catalytic Activity is Regulated by Phosphorylation on Serines 228 and 402. *J Biol Chem.*290: 2798–2811.

Asakawa, S., Tsunematsu, K., Takayanagi, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Shintani, A., Kawasaki, K., Mungall, A. J., Beck, S., Minoshima, S., Shimizu, N. (2001). The genomic structure and promoter region of the human Parkin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*286: 863-868.

Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.*182: 685–701.

Barbaro, B. A., Lukacsovich, T., Agrawal, N., Burke, J., Bornemann, D. J., Purcell, J. M., Worthge, S. A., Caricasole, A., Weiss, A., Song, W., Morozova, O. A., Colby, D. W., Marsh, J. L. (2015). Comparative study of naturally occurring huntingtin fragments in *Drosophila* points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 24(4): 913-25.

Berndsen, C. E., Wolberger, C. (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol.* 21(4): 301–710.

Bingol, B., Tea, J. S., Phu, L., Reichelt, M., Bakalarski, C. E., Song, Q., Foreman, O., Kirkpatrick, D. S., Sheng, M. (2014). The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes Parkin-mediated mitophagy. *Nature.* 510: 370–375.

Birsa, N., Norkett, R., Wauer, T., Mevissen, T. E., Wu, H. C., Foltynie, T., Bhatia, K., Hirst, W. D., Komander, D., Plun-Favreau, H., Kittler, J. T. (2014). Lysine 27 ubiquitination of the mitochondrial transport protein Miro is dependent on serine 65 of the Parkin ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 289: 14569–14582.

- Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F. M., Wegiel, J., Yu, W. H., Nixon, R. A. (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 28: 6926–6937.
- Bonifati, V. (2014). Genetics of Parkinson's disease - state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord.* 20 Suppl 1:S23-8.
- Brickley, K., Pozo, K., Stephenson, F. A. (2011). N-acetylglucosamine transferase is an integral component of a kinesin-directed mitochondrial trafficking complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813: 269–281.
- Brickley, K., Stephenson, F. A. (2011). Trafficking kinesin protein (TRAK)-mediated transport of mitochondria in axons of hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 286: 18079–18092.
- Byrd, R. A., Weissman, A. M. (2013). Compact Parkin only: insights into the structure of an autoinhibited ubiquitin ligase. *The EMBO Journal.*32(15): 2087-2089.
- Chackravathy, V. S., Joseph, D., Bapi, R. S. (2010). What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biological Cybernetics.*103: 237-253.
- Chan, E. Y. W., Kir, S., Tooze, S. A. (2007). SiRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J. Biol. Chem.*, 282: 25464–25474.
- Chaugule, V. K., Burchell, L., Barber K. R., Sidhu, A., Leslie, S. J., Shaw, G. S., Walden, H.(2011). Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain *EMBO J.* 30: 2853–2867.
- Chen, D., Gao, F., Li, B., Wang, H., Xu, Y., Zhu, C., Wang, G. (2010). Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *J Biol Chem.* 285: 38214–38223.
- Choubey, V., Caglinec, M., Liiv, J., Safiulina, D., Hickey, M. A., Kuum, M., Liiv, M., Anwar, T., Eskelinen, E. L., Kaasik, A. (2014). BECN1 is involved in the initiation of mitophagy: it facilitates PARK2 translocation to mitochondria. *Autophagy.* 10(6): 1105-19.
- Ciechomska, I. A., Goemans, G. C., Skepper, J. N., Tolkovsky, A. M. (2009). Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene.* 28: 2128–2141.
- Copetti, T., Bertoli, C., Dalla, E., Demarchi, F., Schneider, C. (2009). p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol Cell Biol.* 29: 2594–2608.

Cornelissen, T., Haddad, D., Wauters, F., Van Humbeeck, C., Mandemakers, W., Koentjoro, B., Sue, C. Gevaert, K., De Strooper, B., Verstreken, P., Vandenberghe W. (2014). The deubiquitinase USP15 antagonizes Parkin-mediated mitochondrial Ubiquitination and mitophagy. *Hum Mol Genet.*23: 5227–5242.

Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M. C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasmir, E., Galluzzi, L., Shen, S., Tailler, M., Delahaye, N., Tesniere, A., De Stefano, D., Younes, A. B., Harper, F., Pierron, G., Lavandro, S., Zitvogel, L., Israel, A., Baud, V., Kroemer, G. (2010). The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *Embo J.* 29: 619–631.

Davie, C. A. (2008). A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull.* 86:109-27.

Delorme-Axford, E., Guimaraes, R. S., Reggiori, F., Klionsky, D. J. (2015). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An overview of methods to study autophagy progression. *Methods.* 75: 3-12.

Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., D'Amelio, M., Nardacci, R., Romagnoli, A., Piacentini, M., Cecconi, F., Fimia, G.M. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol.*191: 155–168.

Diakopoulos, K. N., Lesina, M., Wörmann, S., Song, L., Aichler, M., Schild, L., Artati, A., Römisch-Margl, W., Wartmann, T., Fischer, R., Kabiri, Y., Zischka, H., Halangk, W., Demir, I. E., Pilsak, C., Walch, A., Mantzoros, C. S., Steiner, J. M., Erkan, M., Schmid, R. M., Witt, H., Adamski, J., Algül, H. (2015). Impaired autophagy induces chronic atrophic pancreatitis in mice via sex- and nutrition-dependent processes. *Gastroenterology.* 148(3): 626-638.

Ding, W. X., Ni, H. M., Li, M., Liao, Y., Chen, X., Stolz, D. B., Dorn 2nd, G. W., Yin, X. M. (2010). Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J. Biol. Chem.* 285: 27879–27890.

Djavaheri-Mergny, M., Amelotti, M., Mathieu, J., Besançon, F., Bauvy, C., Souquère, S., Pierron, G., Codogno, P. (2006). NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem.* 281: 30373–30382.

Durcan, T. M., Tang, M. Y., Perusse J. R., Dashti, E. A., Aguilera, M. A., McLelland, G. L., Gros, P., Shaler, T. A., Faubert, D., Coulombe, B., Fon, E. A. (2014). USP8 regulates

mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from Parkin. *EMBO J.* 33: 2473–2491.

Eisenberg-Lerner, A., Kimchi, A. (2011). PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death Differ.* 19: 788–797.

Fan, W., Nassiri, A., Zhong, Q. (2011). Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 7769–7774.

Filomeni, G., Desideri, E., Cardaci, S., Rotilio, G., Ciriolo, M. R. (2010). Under the ROS: thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy.* 6: 999–1005.

Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.* 447: 1121–1125.

Fransson, A., Ruusala, A., Aspenström P. (2003). Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 6495–6502.

Fransson, S., Ruusala, A., Aspenström, P. (2006). The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344: 500–510.

Frederick, R. L., McCaffery, J. M., Cunningham, K. W., Okamoto, K., Shaw, J. M. (2004). Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J. Cell Biol.* 167: 87–98.

Fujioka, Y., Noda, N. N., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Inagaki, F. (2010). Dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and its functional significance in autophagy. *J. Biol. Chem.* 285: 1508–1515.

Fujita, N., Saitoh, T., Kageyama, S., Akira, S., Noda, T., Yoshimori, T. (2009). Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 284: 32602–32609.

Ganley, I. G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., Jiang, X. (2009). ULK1, ATG13, FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 284: 12297–12305.

- Geisler, S., Holmstrom, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* 12: 119–131.
- Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K., Moore, D. J. (2011). Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J. Neurochem.* 118: 636–645.
- Greene, A. W., Grenier, K., Aguilera, M. A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M. E., McBride, H. M., Park, D. S., Fon, E. A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep.* 13: 378–385.
- Groenewegen, H. J. (2003). The Basal Ganglia and Motor Control. *Neural Plasticity.* 10: 107-120.
- Guo, X., Macleod, G. T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M. P., Atwood, H. L., Zinsmaier, K. E. (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron.* 47: 379–393.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., Yoshimori, T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 495(7441): 389-93.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J. L., Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol.* 181: 497–510.
- Hasson, S. A., Kane, L. A., Yamano, K., Huang, C. H., Sliter, D. A., Buehler, E., Wang, C., Heman-Ackah, S. M., Hessa, T., Guha, R., Martin, S. E., Youle, R. J. (2013). High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of Parkin upstream of mitophagy. *Nature.* 504: 291–295.
- Hebron, M. L., Lonskaya, I., Sharpe, K., Weerasinghe, P. P., Algarzae, N. K., Shekoyan, A R., Moussa, C. E. (2013). Parkin ubiquitinates Tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6. *J Biol Chem.* 288(6): 4103-15.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J. L., Oshiro, N., Mizushima, N. (2009).

Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 20: 1981–1991.

Hristova, V. A., Beasley, S. A., Rylett, R. J., Shaw, G. S. (2009). Identification of a novel Zn<sup>2+</sup>-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem.* May 29;284(22):14978-86.

Huang, C., Andres, A. M., Ratliff, E. P., Hernandez, G., Lee, P., Gottlieb, R. A. (2011). Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1. *PLoS ONE.* 6 (6).

Huang, Y., Song, Y. J., Murphy, K., Holton, J. L., Lashley, T., Revesz, T., Gai, W. P., Halliday, G. M. (2008). LRRK2 and parkin immunoreactivity in multiple system atrophy inclusions. *Acta Neuropathol.* 116: 639–646.

Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., Koyano, F., Kosako, H., Kimura, M., Suzuki, N., Uchiyama, S., Tanaka, K., Matsuda, N. (2013). Parkin-catalyzed ubiquitin–ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 288: 22019–22032.

Imarisio, S., Carmichael, J., Korolchuk, V., Chen, C. W., Saiki, S., Rose, C., Krishna, G., Davies, J. E., Tofsi, E., Underwood, B. R., Rubinsztein, D. C. (2008). Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem J.* 412: 191–209.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Inoue, K., Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell.* 19: 5360 – 72.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Mizushima, N. Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. (2012). *J. Cell Sci.* 125: 1488–1499.

Jung, C.H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., Kim, D. H. (2009). ULK–Atg13–FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell.* 20: 1992–2003.

Karachitos, A., Gałgańska, H., Kmita, H. (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *Postepy. Biochem.* 56: 174-81.

Kazlauskaitė, A., Kelly, V., Johnson, C., Baillie, C., Hastie, C. J., Peggie, M., Macartney, T., Woodroof, H. I., Alessi, D. R., Pedrioli, P. G., Muqit, M. M. (2014a). Phosphorylation of

Parkin at Serine65 is essential for activation: elaboration of a Miro1 substrate-based assay of Parkin E3 ligase activity. *Open Biol.* 4:130213.

Kazlauskaitė, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D. G., Ritorto, M. S., Hofmann, K., Alessi, D. R., Knebel, A., Trost, M., Muqit, M. M. (2014b). Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J.* 460: 127–139.

Khandelwal, P. J., Herman, A. M., Hoe, H.-S., Rebeck, G. W., Moussa, C. E.-H. (2011). Parkin mediates beclin-dependent autophagic clearance of defective mitochondria and ubiquitinated A $\beta$  in AD models. *Human Molecular Genetics*, 20(11), 2091–2102.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biol.* 13: 132–141.

Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E., Mizushima, N. (2014). Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J. Cell Sci.* 127: 4089–4102.

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

Knævelsrud, H., Ahlquist, T., Merok, M. A., Nesbakken, A., Stenmark, H., Lothe, R. A., Simonsen, A. (2010). UVRAG mutations associated with microsatellite unstable colon cancer do not affect autophagy. *Autophagy.* 6: 863–870.

Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., Tanaka, K., Uchiyama, Y. (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol.* 172: 454–469.

Kornmann, B., Osman, C., Walter, P. (2011). The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108: 14151–14156.

Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F. M., O’Kane, C. J., Deretic, V., Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat. Cell Biol.* 13: 453–460.

- Kosacka, J., Kern, M., Klötting, N., Paeschke, S., Rudich, A., Haim, Y., Gericke, M., Serke, H., Stumvoll, M., Bechmann, I., Nowicki, M., Blüher, M. (2015). Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 409:21-32.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J. F., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate Parkin. *Nature.* 510: 162–166.
- Lamb C. A., Yoshimori T., Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 14: 759–774.
- Lazarou, M., Jin, S. M., Kane, L. A., Youle, R. J. (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell.* 22: 320–333.
- Lazarou, M., Narendra, D. P., Jin, S. M., Tekle, E., Banerjee, S., Youle, R. J. (2013). PINK1 drives Parkin self-association and HECT-like E3 activity upstream of mitochondrial binding. *J Cell Biol.* Jan 21;200(2):163-72.
- Li, B. X., Li, C. Y., Peng, R. Q., Wu, X. J., Wang, H. Y., Wan, D. S., Zhu, X. F., Zhang, X. S. (2009). The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy.* 5: 303–306.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H., Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin 1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.* 8: 688–699.
- Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., Jung, J. U. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol.* 10: 776–787.
- Liang, X. H., Yu, J., Brown, K., Levine, B. (2001). Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res.* 61: 3443–3449.
- Liu, J., Xia, H., Kim, M., Xu, L., Li, Y., Zhang, L., Cai, Y., Norberg, H. V., Zhang, T., Furuya, T., Jin, M., Zhu, Z., Wang, H., Yu, J., Li, Y., Hao, Y., Choi, A., Ke, H., Ma, D.,

- Yuan, J. (2011). Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*. 147: 223–234.
- Liu, S., Sawada, T., Lee, S., Yu, W., Silverio, G., Alapatt, P., Millan, I., Shen, A., Saxton, W., Kanao, T., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y., Lu, B. (2012). Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet*. 8(3): e1002537.
- Longatti, A., Lamb, C. A., Razi, M., Yoshimura, S., Barr, F. A., Tooze, S. A. (2012). TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11 and recycling endosomes. *J. Cell Biol*. 197: 659–675.
- Lübke, T., Lobel, P., Sleat, D. E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta*. 1793: 625–635.
- Luo, S., Garcia-Arencibia, M., Zhao, R., Puri, C., Toh, P. P., Sadiq, O., Rubinsztein, D. C. (2012). Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules. *Mol Cell*. 47: 359-70.
- MacAskill, A. F., Brickley, K., Stephenson, F. A., Kittler, J. T. (2009). GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci*. 40: 301–312.
- Macaskill, A. F., Rinholm, J. E., Twelvetrees, A. E., Arancibia-Carcamo, I. L., Muir, J., Fransson, A., Aspenstrom, P., Attwell, D., Kittler, J. T. (2009). Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron*. 61: 541–555.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O., Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*. 26(10): 2527-39.
- Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M., Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* 8: 903–914.
- Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., 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.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., Sou, Y. S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., Tanaka, K. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol.* 189: 211–221.

Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., Tanaka, H., Ishikawa, A., Nakagawa-Hattori, Y., Yokochi, M., Kobayashi, T., Igarashi, S., Takano, H., Sanpei, K., Koike, R., Mori, H., Kondo, T., Mizutani, Y., Schaffer, A. A., Yamamura, Y., Nakamura, S., Kuzuhara, S., Tsuji, S., Mizuno, Y. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 588-596.

Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Izumi, T., Noda, T., Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol.* 190: 511–521.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., Yoshimori, T. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol.* 11: 385–396.

Mercier, S., Magot, A., Caillon, F., Isidor, B., David, A., Ferrer, X., Vital, A., Coquet, M., Penttilä, S., Udd, B., Mussini, J. M., Péréon, Y. (2015). Muscle MRI abnormalities in X-linked myopathy with excessive autophagy. *Muscle Nerve.* In press.

Michiorri, S., Gelmetti, V., Giarda, E., Lombardi, F., Romano, F., Marongiu, R., Nerini-Molteni, S., Sale, P., Vago, R., Arena, G. (2010). The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ.* 17: 962-74.

Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J., Baloh, R. H. (2010). Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J. Neurosci.* 30: 4232–4240.

Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12–Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116: 1679–1688.

Moreau K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., Rubinsztein, D. C. (2011). Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell.* 146: 303–317.

- Mórotz, G. M., De Vos, K. J., Vagnoni, A., Ackerley, S., Shaw, C. E., Miller, C. C. (2012). Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56S perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 21: 1979–1988.
- Narendra, D., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M., Youle, R. J. (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy.* 6: 1090–1106.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 183: 795–803.
- Nascimento-Ferreira, I., Santos-Ferreira, T., Sousa-Ferreira, L., Auregan, G., Onofre, I., Alves, S., Dufour, N., Colomer Gould, V. F., Koeppen, A., Déglon, N. (2011). Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain.* 134: 1400-15.
- Nazio, F., Strappazzon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Piacentini, M., Fimia, G. M., Cecconi, F. (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol.* 15(4): 406-16.
- Nishimura, T., Kaizuka, T., Cadwell, K., Sahani, M. H., Saitoh, T., Akira, S., Virgin, H. W., Mizushima, N. (2013). FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Rep.* 14: 284–291.
- Nixon, R. A., Cataldo, A. M., Mathews, P. M. (2000). The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res.* 25: 1161–1172.
- Noble, C. G., Dong, J. M., Manser, E., Song, H. (2008). Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin 1. *J Biol Chem.* 283: 26274–26282.
- Nowak, J., Archange, C., Tardivel-Lacombe, J., Pontarotti, P., Pébusque, M. J., Vaccaro, M. I., Velasco, G., Dagorn, J. C., Iovanna, J. L. (2009). The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 20: 870–881.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H., Halliday, G. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med.* 16(6): 653-61.

- Ogawa, F., Malavasi, E. L., Crummie, D. K., Eykelenboom, J. E., Soares, D. C., Mackie, S., Porteous, D. J., Millar, J. K. (2014). DISC1 complexes with TRAK1 and Miro1 to modulate anterograde axonal mitochondrial trafficking. *Hum. Mol. Genet.* 23: 906–919.
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N. (2015). Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *J Cell Biol.* In press.
- Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y. S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Matsuda, N. (2010). p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells.* Aug;15(8):887-900.
- Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., Matsuda N. (2013). A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J Biol Chem.* 288: 36372–36384.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H. C., Robinson, D., Weston, A. E., Collinson, L. M., Tooze S. A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 23: 1860–1873.
- Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G., Otomo T. (2013). Structure of the human ATG12–ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 59–66.
- Pekkurnaz, G., Trinidad, J. C., Wang, X., Kong, D., Schwarz, T. L. (2014). Glucose regulates mitochondrial motility via milton modification by O-GlcNAc transferase. *Cell.* 158: 54–68.
- Peracchio, C., Alabiso, O., Valente, G., Isidoro, C. (2012). Involvement of autophagy in ovarian cancer: a working hypothesis. *J Ovarian Res.* 5(1): 22.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest.* 118: 2190–2199.
- Platta, H. W., Abrahamsen, H., Thoresen, S. B., Stenmark H. (2012). Nedd4-dependent lysine-11-linked polyubiquitination of the tumour suppressor Beclin 1. *Biochem J.* 441: 399–406.
- Polager, S., Ofir, M., Ginsberg, D. (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene.* 27: 4860–4864.

- Polson, H. E., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbe, S., Clague, M. J., Tooze, S. A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*. 6(4):506-22.
- Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K., Rubinsztein, D. C. (2013). Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*. 154: 1285–1299.
- Puyal, J., Vaslin, A., Mottier, V., Clarke, P. G. (2009). Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol*. 66: 378–389.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*. 112: 1809 – 20.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R., Rubinsztein D. C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev*. 90: 1383–1435.
- Riley, B. E., Loughheed, J. C., Callaway, K., Velasquez, M., Brecht, E., Nguyen, L., Shaler, T., Walker, D., Yang, Y., Regnstrom, K., Diep, L., Zhang, Z., Chiou, S., Bova, M., Artis, D. R., Yao, N., Baker, J., Yednock, T., Johnston, J. A. (2013). Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat Commun*. 4: 1982.
- Roczniak-Ferguson, A., Petit, C. S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T. C., Ferguson, S. M. (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal*. 5(228): ra42.
- Rogov, V., Dotsch, V., Johansen, T., Kirkin V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell*. 53: 167–178.
- Ropolo, A., Grasso, D., Pardo, R., Sacchetti, M. L., Archange, C., Lo Re, A., Seux, M., Nowak, J., Gonzalez, C. D., Iovanna, J. L., Vaccaro, M. I. (2007). The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *J Biol Chem*. 282: 37124–37133.

- Rothfuss, O., Fischer, H., Hasegawa, T., Maisel, M., Leitner, P., Miesel, F., Sharma, M., Bornemann, A., Berg, D., Gasser, T., Patenge, N. (2009). Parkin promotes mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum. Molec. Genet.* 18: 3832-3850.
- Rubinsztein, D. C., Codogno, P., Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11: 709–730.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., Guan, K. L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature Cell Biol.* 15: 741–750.
- Russo, G. J., Louie, K., Wellington, A., Macleod, G. T., Hu, F., Panchumarthi, S., Zinsmaier, K. E. (2009). *Drosophila* Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J. Neurosci.* 29: 5443–5455.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M. H., Uematsu, S., Yang, B. G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., Akira, S. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature.* 456: 264–268.
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, A., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., Hajnóczky, G. (2008). Bidirectional Ca<sup>2+</sup>-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105: 20728–20733.
- Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., Rubinsztein, D. C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 282: 5641–5652.
- Saxton, W. M., Hollenbeck, P. J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 125: 2095–2104.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 26: 1749–1760.
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., Holen, I. (1990). Non-selective autophagy. *Semin Cell Biol.* 1: 441–448.

- Sheng, Z. H., Cai, Q. (2012). Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 77–93.
- Shi, C. S., Kehrl, J. H. (2010). TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal.* 3(123): ra42.
- Shibata, M., Lu, T., Furuya, T., Degtarev, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., MacDonald, M., Yankner, B., Yuan, J. (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem.* 281: 14474 – 85.
- Smith, M. J., Pozo, K., Brickley, K., Stephenson, F. A. (2006). Mapping the GRIF-1 binding domain of the kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in the anterograde trafficking of cargoes. *J. Biol. Chem.* 281: 27216–27228.
- Solano, R. M., Casarejos, M. J., Menendez-Cuervo, J., Rodriguez-Navarro, J. A., Garcia de Yebenes, J., Mena, M. A. (2008). Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging. *J. Neurosci.* 28: 598–611.
- Song, Y. J., Halliday, G. M., Holton. J. L., Lashley, T., O'Sullivan, S. S., McCann, H., Lees, A. J., Ozawa, T., Williams, D. R., Lockhart, P. J., Revesz, T. R. (2009). Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68:1073–1083.
- Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci.* 29: 13578 – 88.
- Stowers, R. S., Megeath, L. J., Górska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I. A., Schwarz, T. L. (2002). Axonal transport of mitochondria to synapses depends on milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron.* 36: 1063–1077.
- Strappazzon, F., Vietri-Rudan, M., Campello, S., Nazio, F., Florenzano, F., Fimia, G. M., Piacentini, M., Levine, B., Cecconi, F. (2011). Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J.* 30: 1195–1208.
- Sun, Q., Fan, W., Chen, K., Ding, X., Chen, S., Zhong, Q. (2008). Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 19211–19216.

- Sun, Q., Westphal, W., Wong, K. N., Tan, I., Zhong, Q. (2010). Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 19338–19343.
- Sun, Y., Vashisht, A. A., Tchieu, J., Wohlschlegel, J. A., Dreier, L. (2012). VDACs recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy. *J. Biol. Chem.* 287: 40652–40660.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuaing, H. D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J. U., Cheng, J. Q., Mulé, J. J., Pledger, W. J., Wang, H. G. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 9: 1142–1151.
- Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Wang, H. G. (2009). Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy. *Cell Death Differ.* 16: 947 – 55.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Cheh, C. W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M. E., Tracey, K. J., Zeh, H. J. 3rd., Lotze, M. T. (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol.* 190: 881–892.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., Kominami, E. (2002). Human Apg3p/Aut1p Homologue Is an Authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J. Biol. Chem.* 277: 13739–13744.
- Tian, X., Gala, U., Zhang, Y., Shang, W., Nagarkar Jaiswal, S., di Ronza, A., Jaiswal, M., Yamamoto, S., Sandoval, H., Duraine, L., Sardiello, M., Sillitoe, R. V., Venkatachalam, K., Fan, H., Bellen, H. J., Tong, C. (2015). A voltage-gated calcium channel regulates lysosomal fusion with endosomes and autophagosomes and is required for neuronal homeostasis. *PLoS Biol.* 13(3): e1002103.
- Tiwari, R. V., Parajuli, P., Sylvester, P. W. (2015).  $\gamma$ -Tocotrienol-induced endoplasmic reticulum stress and autophagy act concurrently to promote breast cancer cell death. *Biochem Cell Biol.* 12: 1-15.
- Tomasi, D., Wang, G. J., Volkow, N. D. (2013). Energetic cost of brain functional connectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110: 13642–13647.

- Trempe, J. F., Sauvé, V., Grenier, K., Seirafi, M., Tang, M. Y., Ménade, M., Al-Abdul-Wahid, S., Krett, J., Wong, K., Kozlov, G., Nagar, B., Fon, E. A., Gehring, K. (2013). Structure of Parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science*. 340: 1451–5.
- Trinidad, J. C., Barkan, D. T., Gullledge, B. F., Thalhammer, A., Sali, A., Schoepfer, R., Burlingame, A. L. (2012). Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol. Cell. Proteomics* 11: 215–229.
- Vaccaro, M. I., Ropolo, A., Grasso, D., Iovanna, J. L. (2008). A novel mammalian trans-membrane protein reveals an alternative initiation pathway for autophagy. *Autophagy*. 4: 388–390.
- Van Humbeeck, C., Waelkens, E., Corti, O., Brice, A., Vandenberghe, W. (2008). Parkin occurs in a stable, non-covalent, approximately 110-kDa complex in brain. *Eur J Neurosci*. 27(2): 284-93.
- Van Spronsen, M., Mikhaylova, M., Lipka, J., Schlager, M. A., van den Heuvel, D. J., Kuijpers, M., Wulf, P. S., Keijzer, N., Demmers, J., Kapitein, L. C., Jaarsma, D., Gerritsen, H. C., Akhmanova, A., Hoogenraad, C. C. (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron*. 77: 485–502.
- Vicencio, J. M., Ortiz, C., Criollo, A., Jones, A. W., Kepp, O., Galluzzi, L., Joza, N., Vitale, I., Morselli, E., Tailler, M., Castedo, M., Maiuri, M. C., Molgó, J., Szabadkai, G., Lavandro, S., Kroemer, G. (2009). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ*. 16: 1006–1017.
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R. L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M. A., Liu, W., Ko, H. S., Magrané, J., Moore, D. J., Dawson, V. L., Grailhe, R., Dawson, T. M., Li, C., Tieu, K., Przedborski, S. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 378–383.
- Wang, B., Ling, S., Lin, W. C. (2010). 14-3-3Tau regulates Beclin 1 and is required for autophagy. *PLoS ONE*. 5: e10409.
- Wang, X., Schwarz, T. L. (2009). The mechanism of Ca<sup>2+</sup> -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell*. 136: 163–174.

- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M. J., Schwarz, T. L. (2011). PINK1 and Parkin Target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*. 147: 893–906.
- Wauer, T., Komander, D. (2013). Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *EMBO J*. 32(15): 2099–112.
- Weerasekara, V. K., Panek, D. J., Broadbent, D. G., Mortenson, J. B., Mathis, A. D., Logan, G. N., Prince, J. T., Thomson, D. M., Thompson, J. W., Andersen, J. L. (2014). Metabolic-stress-induced rearrangement of the 14-3-3 $\zeta$  interactome promotes autophagy via a ULK1- and AMPK-regulated 14-3-3 $\zeta$  interaction with phosphorylated Atg9. *Mol Cell Biol*. 34(24): 4379-88.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., Levine B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell*. 30:. 678–688.
- Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. A., Klevit, R. E. (2011). UBC7 reactivity profile reveals Parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*. 474: 105–108.
- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E. K., Saiki, S., Siddiqi, F. H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., O'Kane, C. J., Floto, R. A., Rubinsztein, D. C. (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol*. 4: 295–305.
- Yamaoka, S., Leaver, C. J. (2008). EMB2473/MIRO1, an Arabidopsis Miro GTPase, is required for embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen. *Plant Cell*. 20: 589–601.
- Yang, Z., Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 22: 124–131.
- Yoshii, S. R., Mizushima, N. (2015). Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. *Biochim Biophys Acta*. pii: S0167-4889(15)00022-1.
- Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci*. 119: 3888–3900.
- Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D. W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E. H., Lenardo, M. J.

(2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 465: 942–946.

Yu, W. H., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Jiang, Y., Duff, K., Uchiyama, Y., Naslund, J., Mathews, P. M., Cataldo, A. M., Nixon, R. A. (2005). Macroautophagy—a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 171: 87–98.

Yu, W. H., Kumar, A., Peterhoff, C., Shapiro Kulnane, L., Uchiyama, Y., Lamb, B. T., Cuervo, A. M., Nixon, R. A. (2004). Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 2531–2540.

Yuan, H. X., Russell, R. C., Guan, K. L. (2013). Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*. 9: 1983–1995.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 15077–15082.

Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachi, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep*. 10: 285–292.

Zheng, Y.Q., Liu, J. X., Li, X. Z., Xu, L., Xu, Y. G. (2009). RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 30: 919–927.

Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1–phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol*. 11: 468–476.

Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Li, B., Chen, Y., Ren, X., Liu, C. G., Yang, J. M. (2009). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*. 5: 816–823.

## **B) Raamat**

Bates, G., Harper, P., Jones, L. 2002. Clinical neurology of Huntington's disease, lk. 28–53. B. Kremer (ed.), Huntington's Disease, 3. trükk. Oxford University Press, Oxford, Suurbritannia.

Taba, P., Asser, T., Krikmann, Ü., Paju, T., Olt, E., Kanarik, E., Ankru, K., Kivil, H., Taurafeldt, E., Aasa, M. 2007. Parkinsoni tõbi. Raamat haigetele ja nende peredele III, lk. 7, 3. trükk, Eesti Parkinsoniliit, L. Puusepa nimeline Eesti Neuroloogide ja Neurokirurgide Selts, Tartu Ülikooli närvikliinik, Tartu.

# **Lihtlitsents lõputöö produtseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kristjan Kivi (sünnikuupäev 10.03.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Miro1 ning Beclin1 valgu koosmõju mitofaagias, mille juhendajateks on prof. Allen Kaasik, Dr (med), prof. Margus Pooga, Ph.D ning Joanna Liiv, M.Sc.

1.1 reprodutseerimiseks, säilitamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivustähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-i kaudu, kuni autoriõiguse kehtivustähtaja lõppemiseni;

2. Olen teadlik, et punktis üks nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikuintellektuaalomandi ega isikuandme kaitse seadusest tulenevaid õiguseid.

Tartus, 26.05.2015