

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

FARMAKOLOOGIA OSAKOND

CISD2 roll PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias

Bakalaureusetöö

12 EAP

Carmen Lilleorg

Juhendajad:

Dr. med. Allen Kaasik

PhD Annika Vaarmann

PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2026

INFOLEHT

CISD2 roll PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias

Parkinsoni tõbi (PD) on neurodegeneratiivne haigus, mille kliinilisi sümptomeid põhjustab neuronite hävimine erinevates ajupiirkondades. Neuronite hävimine on tingitud erinevate stressifaktorite mõjust neuronite elulemusele. Üheks stressifaktoriks on mitokondrite kahjustumine. Need eemaldatakse mitofaagia teel, mille üks uuritumaid mehhanisme on PINK1/Parkini rada. CISD2 on multifunktsionaalne valk, mille seost PINK1/Parkini vahendatud mitofaagiaga on varasemalt näidatud. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida CISD2 rolli PINK1/Parkini mitofaagias ning selle võimet mõjutada vastavat mitofaagia rada, kasutades erinevaid CISD2 plasmiidkonstrukte.

Märksõnad: Parkinsoni tõbi, mitofaagia, Parkin, PINK1, CISD2.

CERCS kood: B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia.

CISD2 role in PINK1/Parkin mediated mitophagy

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder defined by clinical symptoms caused by neuronal death in different regions of the brain. The death of neurons is caused by a variety of stress factors, including mitochondrial damage. Damaged mitochondria is removed through mitophagy, in which the PINK1/Parkin mediated pathway is one of the most researched mechanisms. CISD2 is a multifunctional protein that has been shown to have a link with PINK1/Parkin mitophagy. The aim of this bachelor's thesis was to investigate the role of CISD2 regarding the PINK1/Parkin mitophagy pathway and its ability to affect PINK1/Parkin mediated mitophagy by using different CISD2 plasmid constructs.

Keywords: Parkinson's disease, mitophagy, Parkin, PINK1, CISD2.

CERCS code: B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology.

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Parkinsoni tõbi.....	7
1.1.1. Parkinsoni tõve sümptomaatika ja patofüsioloogia	7
1.1.2. Parkinsoni tõve ravimeetodid	7
1.2. Neuronite hävinemist põhjustavad faktorid PD-s.....	8
1.2.1. Neuronite hävimist põhjustavad stressifaktorid	8
1.2.2. Parkinsoni tõve geneetiline taust	9
1.3. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rada.....	10
1.3.1. Mitofaagia kui autofaagia alaliik ning selle roll PD-s	10
1.3.2. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rajas osalevad valgud	10
1.3.3. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia mehhanism	12
1.4. CISD2 valk	13
1.4.1. CISD2 valk ning selle struktuur	13
1.4.2. CISD2 funktsioon rakkudes ning selle seos mitofaagiaga	14
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1. Töö eesmärgid	16
2.2. Materjal ja metoodika.....	16
2.2.1. Rakukultuuri valmistamine.....	16
2.2.2. Kultiveerimistasside ette valmistamine transfektsiooniks.....	16
2.2.3. Rakkude transfekteeimine	17
2.2.4. Rakkude jäädvustamine ja loendamine	19
2.2.5. Statistiline analüüs	20
2.2.6. Parkini translokatsiooni uurimismeetodi ümber töötamine.....	20
2.3. Tulemused	22

2.3.1.	PINK1 konstrukti valimine Parkini translokatsiooni uurimiseks	22
2.3.2.	CISD2 ja selle domeenide mõju Parkini translokatsioonile	22
2.4.	Arutelu	25
KOKKUVÕTE		27
RESÜMEE		28
KIRJANDUSE ÜLEVAADE		29
LIHTLITSENTS.....		35

KASUTATUD LÜHENDID

FBS – veise loote seerum, ingl *fetal bovine serum*

HS – hobuse seerum, ingl *horse serum*

MAM – mitokondriga seostatud membraanid, ingl *mitochondrial associated membranes*

MAO-B – monoamiinoksüdaas-B

mtDNA – mitokondriaalne DNA

MTS – mitokondri sihtmärkjärjestus, ingl *mitochondrial targeting sequence*

OMM – mitokondri välismembraan, ingl *outer mitochondrial membrane*

PARL – ingl *presenilin-associated rhomboid-like protein*

PC-6 – feokromotsütoomi rakuliin nr 6

PD – Parkinsoni tõbi, ingl *Parkinson's disease*

PINK1 – PTEN-indutseeritud kinaas 1, ingl *PTEN-induced kinase 1*

pUb – fosfoubikvitiin

RBR – ingl *RING in between RING*

RING – ingl *really interesting new gene*

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid, ingl *reactive oxygen species*

RPMI – ingl *Roswell Park Memorial Institute*

SNpc – mustaine, ld *substantia nigra pars compacta*

TIM – mitokondri sisemembraani translokaas, ingl *translocase of the inner membrane*

TMS – transmembraanne järjestus, ingl *transmembrane sequence*

TOM – mitokondri välismembraani translokaas, ingl *translocase of the outer membrane*

SISSEJUHATUS

Parkinsoni tõbi (PD) on neurodegeneratiivne haigus, mida iseloomustavad nii motoorsed kui ka mittemotoorsed sümptomid. Haigust põhjustab neuronite hävimine erinevates ajupiirkondades. Sellel patoloogilisel protsessil pole kindlat mustrit, seega varieerub haiguse kliiniline kulg patsientide vahel. Kuna neuronite kadu ei osata veel pidurdada, on praegused ravimeetodid sümptomaatilised. Sümptomite leevendamine ei ole kõige efektiivsem: haiguse progresseerudes suureneb mittemotoorsete vaevuste osakaal ning mootorsetes sümptomites esineb ägenemisi. Parkinsoni tõve haiguse kulgu peatava ravimi puudumise tõttu on vajalik uurida PD erinevaid patofüsioloogilisi mehhanisme.

Parkinsoni tõve esinemise tõenäosus suureneb vanusega, kuid esineb ka geneetilisi PD vorme. Neuronite hävimine on tingitud erinevatest stressifaktoritest, nagu oksüdatiivne stress ja mitokondrite kahjustumine. Mitokondriaalsete kahjustuste ning nende düsfunktsionaalsuse puhul eemaldatakse mitokondreid rakust mitofaagia teel. PINK1/Parkini vahendatud rada on üks enim uuritud mitofaagia mehhanisme PD kontekstis. PINK1/Parkini rada algab PINK1 seondumisega kahjustunud mitokondrile tänu membraanipotentsiaali langusele. PINK1 kaasab Parkini, mille abil suunatakse mitokondrid proteasoomsele lagundamisele. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia aitab hoida rakkude homöostaasi ning seeläbi vältida rakusurma.

CISD2 on valk, mida on seostatud vananemise protsesside aeglustamisega. Varasemad uuringud on näidanud, et CISD2 osaleb mitofaagia regulatsioonis, mõjutades seeläbi neurodegeneratiivsete haiguste väljakujunemist. CISD2 mitmekesise roll teeb sellest huvitava uurimisobjekti, mille funktsioonide välja selgitamine võiks anda uut informatsiooni raku regulatsioonimehhanismide kohta. Samuti võiks selle valguga varasemalt kirjeldatud seos PINK1/Parkini vahendatud mitofaagiaga täiendada olemasolevaid teadmisi antud mehhanismi toimimisest.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on välja selgitada CISD2 roll PINK1/Parkin vahendatud mitofaagias. Kasutades erinevaid CISD2 plasmiidkonstrukte, on töö alameesmärgiks määrata kindlaks CISD2 domeenid, mis mõjutavad PINK1/Parkini rada.

Töö eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi farmakoloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Parkinsoni tõbi

1.1.1. Parkinsoni tõve sümptomaatika ja patofüsioloogia

Parkinsoni tõbi (ingl *Parkinson's disease*, PD) on neurodegeneratiivne haigus, mille puhul toimub neuronite hävimine erinevates ajupiirkondades (Dauer ja Przedborski, 2003). PD sümptomid ilmnevad keskmiselt 60. eluaasta paiku, üle 80-aastaste elanikkonna seast põeb seda haigust kuni 4% populatsioonist (Dexter ja Jenner, 2013). Eestis elas 2016. aasta seisuga 3078 Parkinsoni tõve põdevat inimest (Dorsey *et al.*, 2018).

Parkinsoni tõve iseloomustavad nii motoorsed kui ka mittemotoorsed sümptomid. Põhilised motoorsed sümptomid on bradükineesia ehk liigutuste aeglustumine ja käteväärin puhkeolekus (Matsumine *et al.*, 1997; Thomas ja Beal, 2007; Corti *et al.*, 2011; Coppédè, 2012; Dexter ja Jenner, 2013). Peale nende esinevad haiguse progresseerudes ka käte- ja näolihaste jäikus, tasakaaluhäired ning neelamis- ja rääkimisprobleemid (Thomas ja Beal, 2007; Dexter ja Jenner, 2013). Mittemotoorseteks sümptomiteks on väsimus, kõhukinnisus, depressioon, ärevus, dementsus, psühhoos ning muud neuropsühhiaatilised häired (Jankovic ja Stacy, 2007; Muzerengi *et al.*, 2007; Sveinbjornsdottir, 2016). Mittemotoorsed sümptomid avalduvad sageli enne motoorseid sümptomeid ning haiguse edasi arenedes nende esinemissagedus suureneb (Muzerengi *et al.*, 2007). Mittemotoorsed sümptomid pole PD spetsiifilised, seetõttu ei suudeta tihti PD-d diagnoosida enne motoorsete sümptomite esinemist (Dexter ja Jenner, 2013; Muzerengi *et al.*, 2007).

Parkinsoni tõve puhul üks enim kahjustunud ajupiirkondi on *substantia nigra pars compacta* (SNpc) ehk mustaine, mille dopaminergiliste neuronite hävimise tagajärjel tekivad Parkinsoni tõvele iseloomulikud motoorsed sümptomid (Schapira, 2009; Hardy, 2010; Armstrong ja Okun, 2020). Tänapäeval teatakse Parkinsoni tõve kompleksse haigusena, mis hõlmab ka muid ajupiirkondi, nagu Raphe tuum, *locus coeruleus* ja Meynert'i basaalne tuum (Dauer ja Przedborski, 2003; Corti *et al.*, 2011). Neuronite hävimist pole võimalik peatada, seega progresseerub haigus elu lõpuni (Levy *et al.*, 2009).

1.1.2. Parkinsoni tõve ravimeetodid

Parkinsoni tõvel puuduvad haigust pidurdavad ravimid, seega on praegused ravimeetodid sümptomaatilised. Ravimite manustamine käib vastavalt sümptomite ilmnemisele ja intensiivsusele (Armstrong ja Okun, 2020).

SNpc-s paiknevate dopaminergiliste neuronite hävimise tõttu väheneb dopamiini vabanemine (Sveinbjornsdottir, 2016). Sellest tingitud motoorseid sümptomeid leevendatakse tavaliselt dopamiini asendusravi, dopamiini retseptori agonistide või monoamiinoksüdaas-B (MAO-B) inhibiitoritega.

Levodopa on dopamiini prekursor, mis läbib hematoentsefaalbarjääri ning muudetakse neuronites dopamiiniks, leevendades striataalset dopamiinipuudust (Armstrong ja Okun, 2020; Jankovic ja Stacy, 2007). Levodopa pikemaajalisel kasutamisel ilmnevad 40-50% patsientidest 5-6 aasta jooksul motoorsed kõrvaltoimed: on-off fluktuatsioonid, düskineesiad ja düstooniad (Schrag ja Quinn, 2000). Mittemotoorseid sümptomeid ravitakse vastavalt sümptomite esinemisele ning nende eripärale, näiteks depressiooni ja ärevuse puhul kasutatakse antidepressante ning kognitiivset käitumisteraapiat, unehäirete puhul melatoniini (Armstrong ja Okun, 2020).

Parkinsoni tõve erinevaid ravimeetodeid on palju uuritud, kuid tänaseni pole leitud haiguse kulgu peatava toimega ravi. Seega on vajalik uurida Parkinsoni tõve põhjustavaid patogeneesi mehhanisme.

1.2. Neuronite hävinemist põhjustavad faktorid PD-s

1.2.1. Neuronite hävimist põhjustavad stressifaktorid

Parkinsoni tõvele iseloomulikku neuronaalset hävingut põhjustavad mitmed erinevad faktorid. Neid faktoreid üldiselt seostatakse vananemisega, kuid kindlad mehhanismid võivad põhjustada ka varajase algusega PD-d. Peamisteks stressifaktoriteks on patoloogiline valkude kogunemine rakkudes, mitokondrite kahjustumine, oksüdatiivne stress ning muud erinevad stressi põhjustavad tegurid (Levy *et al.*, 2009; Singh ja Ganley, 2021).

Suurem osa Parkinsoni tõve vormide puhul esinevad rakkudes valgu inklusioonid nimega Lewy kehad, mis peamiselt koosnevad α -sünnukleiinist (Spillantini *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 2009). Tavatingimustes esineb α -sünnukleiin rakus monomeerina või α -helikaalse tetrameerina, kuid selle patoloogilisel voltumisel ja kuhjumisel moodustuvad valgu agregaatidest Lewy kehad (Burré *et al.*, 2015). Tavatingimustes osaleb α -sünnukleiin neurotransmitterite regulatsioonis (Du *et al.*, 2020). Stressitingimustes on α -sünnukleiin tsütotoksilise toimega, indutseerides mitokondrite düsfunktsionaalsust, stressi endoplasmaatilisele retiikulumile ning seeläbi ka rakusurma (Colla *et al.*, 2012; Ludtmann *et al.*, 2018). Arvatakse, et Lewy kehade moodustumine kaitseb rakke α -sünnukleiinist tingitud kahjustuste eest (Levy *et al.*, 2009).

Oksüdatiivne stress on neuronite hävimisele panustav mehhanism (Dexter ja Jenner, 2013). Inimestel, kellel on PD, on täheldatud oksüdatiivsest stressist tingitud DNA kahjustusi, valkude oksüdatsiooni ja lipiidide peroksüdatsiooni (Schapira ja Jenner, 2011; Dexter ja Jenner, 2013). Oksüdatiivse stressi puhul toimub reaktiivsete hapnikuühendite ehk ROS-ide ületootmine, mis omakorda indutseerib rakusurma (Dexter ja Jenner, 2013).

Üks neuronite hävimist põhjustav ning omakorda ka oksüdatiivset stressi indutseeriv faktor on mitokondrite kahjustumine (Schapira ja Jenner, 2011). Mitokondrid on metaboolselt aktiivsed organellid ning toodavad hingamisahela teel ATP-d (Levy *et al.*, 2009). Mitokondrite kahjustumine ja düsfunktsionaalsus põhjustavad ATP tootmise langust ning ROS-ide ületootmist, tekitades rakkudes omakorda energiavaegust ja oksüdatiivset stressi (Levy *et al.*, 2009). Mitokondrid võivad kahjustuda mitmel erinevatel põhjustel, näiteks teistest rakulistest protsessidest tingitud oksüdatiivsest stressist ning geneetilistest mutatsioonidest nii mitokondriaalses DNA-s (mtDNA) kui ka genoomis (Schapira, 2008; Schapira ja Jenner, 2011).

1.2.2. Parkinsoni tõve geneetiline taust

Suurem osa Parkinsoni tõve juhtudest on seotud vananemisprotsessidega, kuid siiski esineb ka PD geneetilisi vorme. PD-d põhjustavaid mutatsioone on leitud mitmetes erinevates geenides ja lookustes (Coppedè, 2012). Kuigi geneetilise päritoluga PD-de osakaal on kogu PD-d põdevas populatsioonis väike, on siiski tänu nendele haigusjuhtumitele saadud rohkem teada Parkinsoni tõve molekulaarsetest mehhanismidest (Thomas ja Beal, 2007; Corti *et al.*, 2011).

Parkinsoni tõve põhjustavaid mutatsioone on leitud α -sünnukleiini kodeerivas geenis *SNCA*, mis asub 4. kromosoomis PARK1/PARK4 lookuses (Levy *et al.*, 2009). Mutatsioonide esinemine nendes lookustes põhjustab autosomaal-dominantset Parkinsoni tõve (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Nende geenide muteerumise poolt põhjustatud PD on haruldane, aga avastatud mutatsioonid viitavad Lewy kehade patofüsioloogilisele kuuluvusele PD patogeneesis (Corti *et al.*, 2011).

Autosoom-retsessiivse varajase algusega PD puhul esineb kõige sagedamini mutatsioone *PARK* ja *PINK1* geenides (Corti *et al.*, 2011; Scarffe *et al.*, 2014). *PARK* asub 6. kromosoomis ning kodeerib Parkini valku (Corti *et al.*, 2011). Inimestes, kellel esineb mutatsioone *PARK2* geenis, avaldub autosoom-retsessiivne juveniilne parkinsonism (Kitada *et al.*, 1998). *PINK1* asub 1. kromosoomis ning kodeerib PINK1 ehk PTEN indutseeritud kinaas 1 valku (Unoki ja Nakamura, 2001; Coppedè, 2012). Mutatsioonid *PINK1* geenis põhjustavad varajaselt avalduvat autosoom-retsessiivset PD-d (Schapira ja Jenner, 2011). Nii PINK1 kui ka Parkin

osalevad mitokondrite kvaliteedikontrollis, mõjutades mitokondrite jagunemist ning kahjustunud mitokondrite lagundamist rakus (Schapira ja Jenner, 2011; Scarffe *et al.*, 2014).

1.3. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rada

1.3.1. Mitofaagia kui autofaagia alaliik ning selle roll PD-s

Autofaagia on protsess, mis eemaldab rakkudest ebavajalikke või kahjustunud rakukomponente, hoides rakke funktsionaalsena (Scarffe *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016). Kuna neuronid on postmitootilised rakud, siis vajavad nad autofaagiat erinevate toksiliste jääkproduktide ja düsfunktsionaalsete organellide eemaldamiseks (Yin *et al.*, 2016). Kuigi autofaagia stimuleerimine kahjustunud rakkudes on potentsiaalne terapeutiline sihtmärk neurodegeneratiivsete haiguste ravis, on selle rakendamine piiratud, kuna puuduvad teadmised liigse autofaagia indutseerimise mõjust raku elulemusele (Yin *et al.*, 2016).

Mitofaagia on autofaagia rada, mille funktsiooniks on kahjustunud või düsfunktsionaalsete mitokondrite selektiivne eemaldamine rakust (Alberts, *et al.*, 2015). Mitofaagia puhul ümbritsetakse kahjustunud mitokondri autofagosoomiga ning transporditakse lüsoosüümi, kus mitokondri ensümaatilisel lagundatakse (Alberts, *et al.*, 2015). Saadud laguproduktid, näiteks amino- ja rasvhapped, suunatakse tagasi raku üldisesse ringlusesse, kus neid taaskasutatakse teistes rakulistes protsessides (Alberts, *et al.*, 2015).

Mitofaagia on eriti oluline postmitootilistes rakkudes, näiteks neuronites, kuna mtDNA mutatsioonide ja reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) poolt tekitatud mitokondrilised kahjustused võivad kuhjuda eluaja jooksul (Narendra *et al.*, 2010). Mitokondrite eemaldamiseks on rakul palju erinevaid mehhanisme, aga Parkinsoni tõve väljaarenemise puhul on üks enim uuritud radu PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia.

1.3.2. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rajas osalevad valgud

PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rada on üks peamisi mitokondrite kvaliteedikontrolli mehhanisme, mille abil rakk identifitseerib ja eemaldab kahjustunud mitokondreid (Youle ja Narendra, 2011). Seda protsessi viivad peamiselt läbi kinaas PINK1 ja E3 übikvitiini ligaas Parkin (Unoki ja Nakamura, 2001; Zheng ja Hunter, 2013).

PINK1 ehk PTEN-indutseeritud kinaas 1 on 581-aminohappe pikkune valk (Corti *et al.*, 2011; Scarffe *et al.*, 2014). See koosneb N-terminaalsest mitokondri seondumise domeenist ja seriin/treoniin kinaasidega homoloogsest domeenist (joonis 1) (Gandhi, 2006; Corti *et al.*, 2011). PINK1 N-terminaalses domeenis asuvad mitokondri sihtmärkjärjestus (ingl *mitochondrial targeting sequence*, MTS) ja transmembraanne järjestus (ingl *transmembrane*

sequence, TMS) (Okatsu *et al.*, 2015). Kuigi PINK1 valku on PD puhul uuritud enim SNpc neuronite hävimise kontekstis, on seda leitud mitmetest teistest ajupiirkondadest. Näiteks, hiirte *PINK1* homoloogi mRNA-d on leitud kõigist kudetest, millest kõige kõrgem on ekspressioonitase südame- ja skeletilihastes ning testistes, viidates PINK1 universaalsele ja olulisele rollile organismi rakkudes (Unoki ja Nakamura, 2001; Gandhi, 2006).



Joonis 1. PINK1 valguline struktuur. PINK1 koosneb N-terminaalsest mitokondriga seonduvast domeenist (sisaldab mitokondri sihtmärkjärjestust ehk MTS ja transmembraanset järjestust ehk TMS, joonisel märgitud sinisega) ning seriin-treoniin kinaas domeenist (ingl *kinase domain*). (Corti *et al.*, 2011, kohandatud)

PINK1 funktsionaalne roll rakus oleneb selle kontsentratsioonist ning paiknemisest mitokondris (Lazarou *et al.*, 2012). Tavatingimustes liigub ~63 kDa suurune PINK1 TOM-i (mitokondri välismembraani translokaas, ingl *translocase of the outer membrane*) ja TIM17/TIM23 (mitokondri sisemembraani translokaas, ingl *translocase of the inner membrane*) vahendusel mitokondri sisemembraani, kus PINK1 lõigatakse N-terminusest ~51-52 kDa suuruseks valguks PARL (ingl *presenilin-associated rhomboid-like protein*) vahendatud proteolüüsi teel (Gandhi, 2006; Jin *et al.*, 2010). Lõikamise tulemusena tekib N-terminaalne fenüülalaniin, mida erinevad ubikvitiini ligaasid ära tunnevad (Narendra ja Youle, 2024). Lõigatud PINK1 suunatakse tagasi tsütosooli retrotranslokatsiooni teel, kus valk suunatakse ubikvitiinide vahendusel proteasoomsele lagundamisele (Jin *et al.*, 2010; Meissner *et al.*, 2011). Stressitingimustes lokaliseerub PINK1 mitokondrite välismembraanile, algatades PINK1/Parkin vahendatud mitofaagia (Martinez *et al.*, 2024).

Parkin on 465 aminohappeline valk (Corti *et al.*, 2011). Parkinil on N-terminaalne ubikvitiinilaadne domeen (UBL – *ubiquitin-like*) ja C-terminaalne RBR (ingl *RING in between RING*) domeen (joonis 2). RBR domeen koosneb RING1 ja RING2 alast, mille vahel asub IBR ehk RING-ide vaheline domeen (ingl *In Between RING*) (Corti *et al.*, 2011). Parkin seondub RBR domeeni kaudu ubikvitiini konjugeeriva ensüümi külge, luues reaktsiooni käigus tioestersideme (Kitada *et al.*, 1998; Wenzel *et al.*, 2011).

Tavatingimustes on Parkin aktiveerimata kujul tsütosoolis (Narendra *et al.*, 2008; Scarffe *et al.*, 2014). Parkin on inaktiveeritud autoinhibitsiooni teel, blokeerides nii ensüümi siduvat domeeni kui ka aktiivtsentrit (Narendra ja Youle, 2024). Blokeerimine toimub steeriliselt ning selles osalevad RING0 ja UBL domeen (Narendra ja Youle, 2024). Stressitingimustes suudab Parkin translokeeruda mitokondrite või endoplasmaatilise retiikulumi membraanile, olenevalt stressi põhjustavast faktorist (Kitada *et al.*, 1998; Narendra *et al.*, 2008; Scarffe *et al.*, 2014).



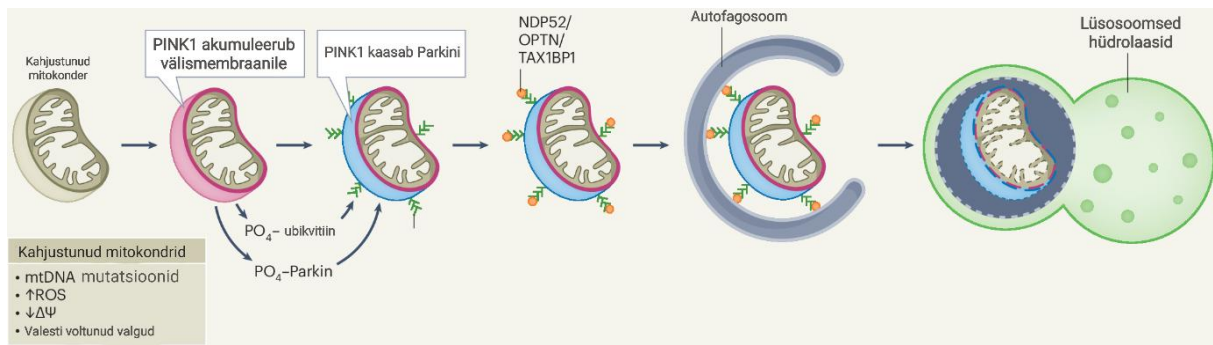
Joonis 2. Parkini struktuur. Parkin koosneb N-terminaalsest ubikvitiinilaadsest domeenist (UBL) ja RBR domeenist, mida ühendab RING0 domeen. RBR domeenis asuvad RING1 ja RING2 domeen, mille vahel asub RING-ide vaheline (IBR) domeen. (Corti *et al.*, 2011, kohandatud)

1.3.3. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia mehhanism

PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia algab PINK1 seondumisega mitokondri välismembraanile (Martinez *et al.*, 2024). See on võimalik membraanipotentsiaali languse tõttu, mis takistab PINK1 sisenemise mitokondrisse (Jin *et al.*, 2010; Narendra *et al.*, 2010; Kondapalli *et al.*, 2012). Välismembraanile seondub PINK1 enda N-terminaalse otsaga, liikudes läbi TOM ja TIM23 translokaaside ning seondudes TIM17-le (Fielden *et al.*, 2023). Pärast TOM ja TIM17/TIM23-ga kompleksi moodustumist PINK1 autofosforüleerub, aktiveerides PINK1 (Rasool *et al.*, 2022).

PINK1 aktiveerumise ja Parkini fosforüülimise vahel on pikk ajavahemik, mis arvatavalt annab mitokondritele võimaluse taastada terve hingamisahel, vältides seeläbi mitofaagiat (Narendra *et al.*, 2008; Narendra ja Youle, 2024). Kui ei ole võimalik taastada hingamisahela tavapärasest funktsioneerumist, siis aktiveerib PINK1 Parkini (Narendra ja Youle, 2024). Parkini täielikuks aktiveerimiseks on eelnevalt vaja Parkini seondumist PINK1 poolt fosforüülitud ubikvitiinidega (Kondapalli *et al.*, 2012). See seondumine vabastab UBL domeeni ning seeläbi on PINK1-l võimalik fosforüülda Parkinit, peatades valgu autoinhibitsiooni ning aktiveerides selle (Narendra ja Youle, 2024).

Aktiveeritud Parkin ligeerib fosfoubikvitiine (pUb) mitokondri välismembraani (ingl *outer mitochondrial membrane*, OMM) valkudega, millega seondunud pUb ahelad võimendavad signaali ja kaasavad mitofaagia adaptereid (Kondapalli *et al.*, 2012). Mitofaagia adapterid, nagu NDP52, OPTN ja TAX1BP1 indutseerivad autofagosoomi moodustumist (Narendra ja Youle, 2024). Autofagosoomiga ümbritsetud mitokondri suunatakse lüsoosoomi edasiseks lagundamiseks (Martinez *et al.*, 2024). Lihtsustatud skeem PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia mehhanismist on näidatud joonisel 3.



Joonis 3. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia raja mehhanism. PINK1/Parkini mitofaagia toimub mitokondrite kahjustuste puhul, mida tekitavad ROS-id, mutatsioonid mtDNA-s ja valesti voltunud valgud. PINK1/Parkini translokatsiooni alustamiseks seondub PINK1 depolariseerunud mitokondri välismembraanile läbi TOM-TIM17/TIM23 kompleksi. PINK1 seejärel kaasab Parkini, fosforüleerides ubikvitiini ja Parkini. Aktiveeritud Parkin fosfoubikvitineerib OMM valke, mille pUb ahelad kaasavad mitofaagia adaptereid, nagu NDP52, OPTN ja TAX1BP1. Mitofaagia adapterid omakorda indutseerivad autofagosoomi moodustumise. Autofagosoom liigub edasi lüsoosoomi, kus kahjustunud mitokondrid lõplikult lagundatakse. (Narendra ja Youle, 2024, kohandatud)

PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rada on tänapäevaks palju uuritud ning selle mehhanismi on kirjeldatud mitmetes erinevates artiklites (Matsuda *et al.*, 2010; Narendra *et al.*, 2010; Scarffe *et al.*, 2014; Narendra ja Youle, 2024). Seda arvestades on siiski palju teadmata selle mitofaagia raja kohta. Üheks uurimisvaldkonnaks on erinevate rakuliste faktorite uurimine, mis võiksid mõjutada PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rada. Üheks potentsiaalseks huvipakkuvaks uurimisobjektiks on Cisd2 valk, mille täpne roll PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rajas ning üldises raku elutegevuses on seni veel ebaselge.

1.4. Cisd2 valk

1.4.1. Cisd2 valk ning selle struktuur

Cisd2 kuulub NEET valkude perekonda koos Cisd1 ja Cisd3-ga. Cisd (ingl *CDGSH iron-sulphur domain*) valkudel on unikaalne Cys-Asp-Gly-Ser-His motiiv, mis suudab seonduda 2Fe-2S klastriga (Liao *et al.*, 2021). Cisd valgud reguleerivad erinevaid redoks- ja oksüdatsioonireaktsioone, osalevad raua metabolismis, oksüdatiivses fosforülatsioonis ja seeläbi ka ROS-ide tootmise regulatsioonis (Nechushtai *et al.*, 2020).

Cisd2 on kodeeritud *Cisd2* poolt, mis asub 4. kromosoomis (Chen *et al.*, 2010). Cisd2 koosneb 135 aminohappest ning sellel on N-terminaalne transmembraanne domeen ja C-terminaalne CDGSH-domeen (Chen *et al.*, 2010). Cisd2 on homodimeer, mille CDGSH domeen suudab seonduda redoksaktiivse 2Fe-2S klastriga (Paddock *et al.*, 2007; Conlan *et al.*, 2009). Cisd2 paikneb ER-is, mitokondrite välismembraanil ning neid organelle ühendavates

piirkondades (ingl *mitochondrial-associated membranes*, MAM) (Chen *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2021).

1.4.2. CISD2 funktsioon rakkudes ning selle seos mitofaagiaga

CISD2-l on rakus mitmeid erinevaid funktsioone, mida aastate jooksul on lähemalt uuritud. Nendeks on näiteks Ca^{2+} -ioonide ER-ist vabastamise reguleerimine, raua ja ROS-ide homöostaasi säilitamine ning autofaagia inhibeerimine (Chang *et al.*, 2010; Wiley *et al.*, 2013). CISD2 valk võib ka omada fenotüübilist efekti erinevates organismides.

CISD2 geen paikneb alas, millel on vananemise aeglustamises oluline roll (Puca *et al.*, 2001). Varasemalt on tehtud CISD2 nokaut hiirtega katseid, kellel esinesid varajase vananemise tunnused, nagu karvkatte pigmendi vähenemine, luude hõrenemine ja nägemisprobleemid (Chen *et al.*, 2009). Erinevate neurodegeneratiivsete haiguste, kaasa arvatud PD puhul on vanus suur riskifaktor haiguse välja kujunemises. CISD2 võime mõjutada vananemise kiirust viitab ka valgu osalusele neurodegeneratiivsete haiguste väljaarenemises.

Wolframi sündroom (WS) on autsoomretsessiivne neurodegeneratiivne haigus, millel on kaks tüüpi. 1. tüüpi Wolframi sündroomi põhjustavad mutatsioonid *WFS1* geenis, 2. tüüpi Wolframi sündroomi põhjustavad mutatsioonid *CISD2*-s (Amr *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2021). Varasemalt mainitud CISD2 nokaut hiirtega läbi viidud katses esinesid nendel nurgelised lihaskiud, mis viitavad neurogeensele lihasatroofiale (Chen *et al.*, 2009). Samuti on sellistel hiirtel metsiktüüpi hiirtest rohkem degenereerinud mitokondreid ning autofagosoomi, viidates suurenenud mitofaagia tasemele (Chen *et al.*, 2009).

Varasemates uuringutes on näidatud CISD2 raku homöostaasi hoidvat toimet, vähendades erinevatest stressifaktoritest tingitud muutusi rakus. Sellegipoolest võib CISD valkudel ka vastupidine efekt olla. *Drosophila* mudelitega tehtud katsetega on näidatud, et äädikakärbestes Cisd-i akumulatsioon neuronites vähendab mitofaagia taset, põhjustades liikumishäireid ning lühemat eluiga äädikakärbestes (Martinez *et al.*, 2024). Samuti on näidatud ka CISD2 võimet vähendada raua ja ROS-ide taset rakkudes, mis tavatingimustes on raku homöostaasi säilitamise jaoks kasulik, kuid kasvajakudades põhjustab rakkude proliferatsiooni tõusu (Shen *et al.*, 2021).

CISD2 roll vananemises ning sellega seotud mehhanismides rõhutab CISD2 valgu tähtsust Parkinsoni tõve kontekstis. PD-d põhjustavad üldisel juhul vanadusest tulenevad muutused rakufunktsioonide regulatsioonis, nagu oksüdatiivne stress ning mitokondrite kahjustuste akumulatsioon rakus. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia on üks enim uuritud faktoreid

PD väljakujunemises. CISD2 rolli uurimine PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rajas võiks tuua rohkem selgust PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia regulatsioonile rakus.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärgiks on uurida CISD2 valgu funktsiooni PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rajas. Kuigi eelnevates uuringutes on näidatud CISD2 seost mitofaagiaga, on selle täpne roll PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias seni ebaselge (Chen *et al.*, 2009). Samuti on töö eesmärgiks selgitada erinevate CISD2 domeenide olulisust antud protsessis, mis loob vajaliku aluse edasisteks uuringuteks.

Käesoleva bakalaureusetöö uurimisküsimused on järgmised:

1. Kuidas mõjutab CISD2 valg PINK1/Parkini vahendatud mitofaagiat?
2. Milline roll on CISD2 domeenidel PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias?

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Rakukultuuri valmistamine

Rakukultuuri kasvatati RPMI (ingl *Roswell Park Memorial Institute*) 1640 söötmes (Thermo Fisher Scientific), mis sisaldas fenoolpunast. Söötmele oli eelnevalt lisatud 10% hobuse seerumit (HS – ingl *horse serum*) ja 5% veise loote seerumit (FBS – ingl *fetal bovine serum*). Söötmele seerumite lisamist viidi läbi etanooliga desinfitseeritud töövahenditega eelnevalt UV-steriliseeritud laminaarkapis (Thermo Scientific MSC-AdvantageTM või Jouan, MSC.12 G3 2XE).

Katseteks kasutati roti feokromotsütoomist ehk neerulealiste säsi kasvaja pärit ja sagedasti neuronaalse rakumudelina kasutatavat rakuliini PC-6. Rakke säilitati -80°C juures söötmes, mille koostiseks oli 90% FBS ja 10% DMSO. Rakukultuuri kasvatamiseks sulatati rakud ühe minuti jooksul 37°C veevannis (Grant GD100). 1 ml rakke viidi üle 100 mm läbimõõduga Petri tassi, kuhu lisati 9 ml eelnevalt valmistatud RPMI söödet (edaspidi RPMI sööde). Kultiveerimistassile märgiti rakuliini nimetus, kuupäev ja passaažinumber. Tass paigutati inkubaatorisse, kus rakke kasvatati 37°C juures 5% CO₂ inkubaatoris (New Brunswick Galaxy 170R). Kasutatava rakukultuuri passaažinumber jäi 36-39 vahele, edaspidistel harvendamistel kasutati peamise rakukultuuri kasvatamiseks 60 mm läbimõõduga Petri tassi. Kogu protsess viidi läbi steriilses laminaarkapis eelnevalt desinfitseeritud vahenditega.

2.2.2. Kultiveerimistasside ette valmistamine transfektsiooniks

Transfektsiooniks kasutati 35 mm läbimõõduga ja Ø15 mm klaasist keskosaga Petri tasse. Rakkude parema kinnitumise tagamiseks kaeti kultiveerimistassid kollageen IV-ga. Selleks

kanti tassi klaasosale 200 µl kollageen IV ning tassid inkubeeriti rakukultuuriga samadel tingimustel (37°C 5% CO₂). Järgmisel päeval eemaldati kollageen IV Petri tassidelt, pesti kaks korda destilleeritud veega üleliigse kollageeni eemaldamiseks ning jäeti kuivama. Kõik sammud viidi läbi steriilsetes tingimustes eelnevalt UV-steriliseeritud laminaarkapis.

Enne rakukultuuri kasutamist hinnati visuaalselt rakukultuuri konfluentsust valgusmikroskoobis. Rakukultuuri kasutati katsetes ainult siis, kui konfluentsus oli 70-90%. Rakukultuurilt eemaldati sööde ning lisati 2 ml eelnevalt 37°C veevannis (Grant GD100) soojendatud RPMI söödet. Rakud pesti 60 mm Petri tassi küljest lahti ning lisati 3 ml RPMI söödet juurde. Rakukultuuri suspendeeriti ning lisati iga 35 mm Petri tassi Ø15 mm klaasist keskosale 150-200 µl rakkude suspensiooni, olenevalt algse rakukultuuri konfluentsusest. Uus rakukultuur valmistati ülejäänud rakkususpensioonist. Rakkude kogus jäi 200-1000 µl vahele olenevalt rakukultuuri kasvukiirusest ja piisavalt kõrge konfluentsusega rakukultuuri vajadusest. Rakkususpensioon pipeteeriti 60 mm läbimõõduga Petri tassi, kuhu lisati eelnevalt soojendatud RPMI söödet piisavalt, et saada 5 ml rakukultuur. 35 mm läbimõõduga Petri tassid ja uus rakukultuur asetati tagasi inkubaatorisse (New Brunswick Galaxy 170R, 37°C 5% CO₂). Pärast tund aega inkubeerimist lisati igale 35 mm läbimõõduga Petri tassile 2 ml eelnevalt veevannis soojendatud RPMI söödet ning tassid pandi tagasi inkubaatorisse. Protsess viidi läbi UV-steriliseeritud laminaarkapis steriilsete töövahenditega.

2.2.3. Rakkude transfekteeimine

Transfekteeimist viidi läbi päev pärast rakkude külvamist 35 mm läbimõõduga Petri tassidele. Transfektsioon toimus UV-steriliseeritud laminaarkapis eelnevalt etanooliga desinfitseeritud töövahenditega. DNA rakku viimiseks kasutati LipofectamineTMi (Thermo Fisher Scientific), Lipofectamine'i ja DNA lahjendusteks kasutati Opti-MEMTM *Reduced Serum Medium*'it (Thermo Fisher Scientific).

Iga transfektsioonigrupi jaoks valmistati ette kaks 1,5 ml Eppendorfi tuubi. Ühte tuubi lisati vastavad plasmiidid DNA-d, mida lahjendati Opti-MEM'iga. Teise tuubi valmistati Lipofectamine'i lahjendus Opti-MEM'iga. Teise tuubi segu lisati esimesse tuubi, et valmistada põhisegu (ingl *Master-Mix*). Põhisekul lasti seista 15 min toatemperatuuril, et Lipofectamine-DNA kompleks saaks moodustuda.

Kasutatud plasmiidid on välja toodud tabelis 1. Plasmiidide, Lipofectamine'i ja Opti-MEM-i kogus olenes eelnevalt optimeeritud transfektsiooniskeemist.

Tabel 1. PC-6 rakkude transfekkeerimisel kasutatud plasmiidid

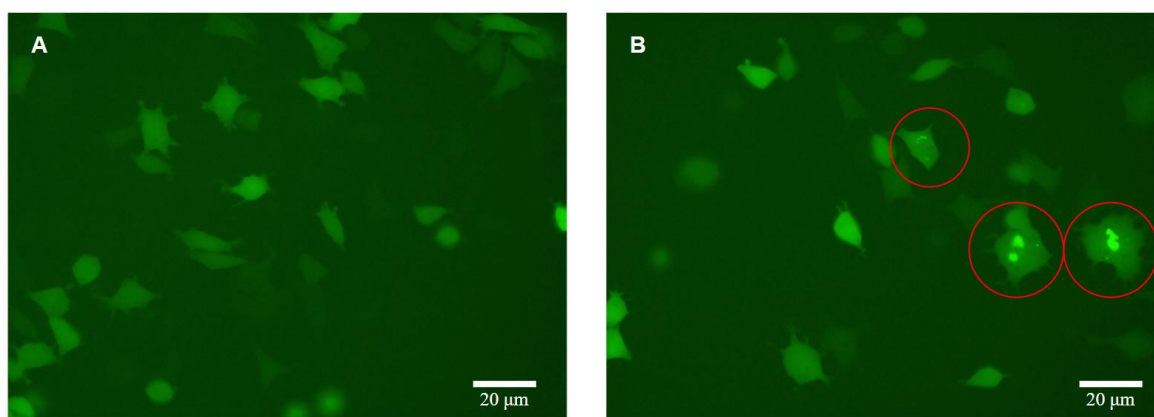
Plasmiid	Kirjeldus	Päritolu, viide
Parkin-YFP	Parkin, mille C-terminuses on YFP (ingl <i>yellow fluorescent protein</i>)	Kingitus Dr. R. Youle'ilt
PINK1-WT	Metsiktüüpi (WT – ingl <i>wild-type</i>) PINK1	Kingitus Dr. E. Deas'ilt
PINK1-V5	PINK1, mille C-terminaalses otsas on V5-märgis	Addgene
CISD2-flag-WT	Metsiktüüpi CISD2, mille C-terminuses on <i>flag</i> -märgis	Mutagenex 2147-74
CISD2-flag-4M	CISD2 C-terminuses on <i>flag</i> -märgis ning aminohapetes esinevad mutatsioonid C99S+C101S+C110S+H114Q	GenScript
CISD2-3xmyc-98-116	CISD2-1 on 3x myc-märgis, millele järgnevad WT aminohapped 98-116	GenScript
CISD2-3xmyc-98-116-4M	CISD2-1 on 3x myc-märgis, millele järgnevad WT aminohapped 98-116, kus mutatsioonid esinevad aminohapetes C99S+C101S+C110S+H114Q	GenScript
CISD2-flag-1-58	1-58 WT aminohapetele järgneb <i>flag</i> -märgis	Thermo
CISD2-3xmyc-61-131	3x myc-märgis, millele järgnevad aminohapped 61-131	Thermo

Pärast põhiseгу inkubeerimist võeti 35 mm läbimõõduga ja Ø15 mm klaasist keskosaga Petri tassid inkubaatorist, aspireeriti Petri tassidel olev RPMI sööde ning lisati 100 µl transfektsiooniseгу Ø15 mm klaasist keskosal olevatele rakkudele. Seda tehti eksperimentaalgrupi kaupa, et rakud ei oleks ebaoptimaalsetes tingimustes liiga kaua. Iga eksperimentaalgrupi kohta oli 2-4 kultuuritassi. Tassid märgistati vastavalt transfektsioonigruppidele ja pandi taas inkubeerima (37°C 5% CO₂). Enne 4 h möödumist inkubeerimise algusest lisati igale 35 mm läbimõõduga Petri tassile 2 ml RPMI söödelt ning asetati tagasi inkubaatorisse 1-2 päevaks.

2.2.4. Rakkude jäädvustamine ja loendamine

PC-6 rakke vaadeldi 1-2 päeva pärast transfekkeerimist. Kõikide eksperimentaalgruppide puhul, kaasa arvatud kontrollgrupp, oli rakkudesse viidud kollase fluorestseeruva valguga (YFP – ingl *yellow fluorescent protein*) märgistatud Parkin (tabel 1). Parkin paiknes kõigis rakkudes tsütosoolis (joonis 4A), tänu millele fluorestseerusid ka rakud, kus ei toimunud Parkini translokatsiooni (edaspidi PT^- rakud). Rakkudes, kus oli toimunud Parkini translokatsioon (edaspidi PT^+ rakud), oli Parkin liikunud lagundatavate mitokondrite juurde, fluorestseerudes erksamalt raku sees (joonis 4B). Vaadeldi ainult elusrakke ehk selge rakupiiriga fluorestseeruvaid rakke. Terved PC-6 rakud on jätketega, surnud rakud on tavaliselt ümmargused ja fragmenteerunud.

Rakke vaadeldi fluorestsentsmikroskoobiga (Olympus IX70). Algselt otsiti fookus $20\times$ objektiiviga, seejärel vaadeldi rakke $40\times$ objektiiviga. Vaatlemiseks kasutati YFP fluorestsentsfiltrit ning vesiimmersiooniobjektiivi.



Joonis 4. Parkini translokatsioon PC-6 rakkudes. (A) Fluorestsentsmikroskoobiga tehtud pilt, kus on näha rakud, milles pole toimunud Parkini translokatsiooni. YFP ehk kollase fluorestseeruva valguga märgistatud Parkin asub tsütosoolis. (B) Rakukultuur, kus osades rakkudes on toimunud Parkini translokatsioon (punase ringiga märgistatud). Rakkudes on näha, kuidas Parkin on translokeerunud mitokondrite juurde, moodustades erksamalt fluorestseeruvaid laike. Mõõtlõik: 20 µm.

PC-6 rakkudest tehti $40\times$ objektiiviga 20 pilti, kasutades Olympus IX70 mikroskoopi ja Olympus DP75 kaamerat. Pilte tehti erinevatest kohtadest, liikudes Petri tassi Ø15 mm klaasist keskosa piires. Pildistamist alustati klaasosa ülemisest servast ja liiguti ridade kaupa allapoole, vältides vaateväljade kordumist ja spetsiifilist valimist. 35 mm läbimõõduga Petri tassid võeti inkubaatorist välja ükshaaval, et rakud ei viibiks ebaoptimaalsetes tingimustes liiga kaua.

Kvantitatiivne analüüs viidi läbi ImageJ tarkvara abil. Piltidelt loendati manuaalselt PT^+ rakud ja PT^- rakud, vältides rakkude loendamist, mis ei olnud täielikult vaateväljas. Mõlema grupi rakkude arv summeeriti 20 pildi peale ning arvutati PT^+ rakkude osakaal kõikide rakkude suhtes.

2.2.5. Statistiline analüüs

Statistiline analüüs viidi läbi GraphPad Prism 11 tarkvaraga. Eelnevalt arvutatud rakkude suhted (ümardatud nelja komakohani) kanti eksperimentaalgruppide kaupa tabelisse, iga rakutassi tulemust käsitleti eraldi andmepunktina.

Parkini translokatsiooni analüüsimiseks viidi läbi neli sõltumatut katseseeriat. Seda tehti täpsemate tulemuste saamiseks, kuna PINK1 ekspressioonitase on muutlik. Kõigis katseseeriates oli kaheksa eksperimentaalgruppi, millest kontrollgrupis oli kaks, ülejäänud gruppides 3-4 koekultuuritassi (kokku 24 tassi). Kõik katseseeriad koondati ühte tabelisse, et saada selgem ülevaade katsetulemustest. Analüüsimiseks kasutati ühefaktorilist ANOVA dispersioonanalüüsi, olulisuse nivooks valiti $\alpha = 0,05$. Tulemuste põhjal viidi läbi gruppide võrdlus.

2.2.6. Parkini translokatsiooni uurimismeetodi ümber töötamine

Eelnevate katsetulemuste põhjal seati eesmärgiks optimeerida katseprotokolli, et suurendada protsessi efektiivsust ning vältida valikupõhist kallutatust. Selleks kasutati Operetta CLSTM kõrgläbilaskevõimega pildianalüüsisüsteemi, mis võimaldab rakkude visualiseerimist, pildistamist ja ka analüüsi HarmonyTM tarkvara abil. Valikupõhise kallutatuse vältimiseks määrati pildistatavad vaateväljad kindlaks enne jäädvustamise alustamist. Samuti on võimalik Operetta CLS-is ka masinasest temperatuuri ja CO₂ taset muuta, võimaldades rakukultuuri optimaalsete tingimuste säilitamine pildistamise ja analüüsimise ajal.

Operetta CLSTM kõrgläbilaskevõimega pildianalüüsisüsteem toimib mikrotiiterplaate kasutades, seega valiti katse läbiviimiseks 96-ne mikrotiiterplaat (Corning®, viite number 3603). Katset viidi läbi nagu eelnevalt kirjeldatud peatükkides 2.2.1-2.2.3, kuid muutused tehti erinevate komponentide kogustes seoses ruumala ja kasvupindala erinevusega võrreldes eelnevalt kasutatud 35 mm läbimõõduga Ø15 mm klaasist keskosaga Petri tassidega (96-se mikrotiiterplaadi ühe kaevu Ø6,4 mm).

Operetta CLSTM masina HarmonyTM tarkvara kasutamine analüüsimiseks osutus aga suureks takistuseks. HarmonyTM tarkvara kasutab tuuma lokaliseerumist, et arvutada ülejäänud rakukomponentide, näiteks rakumembraani ja tsütoplasma asukohta. Seetõttu oli rakkude

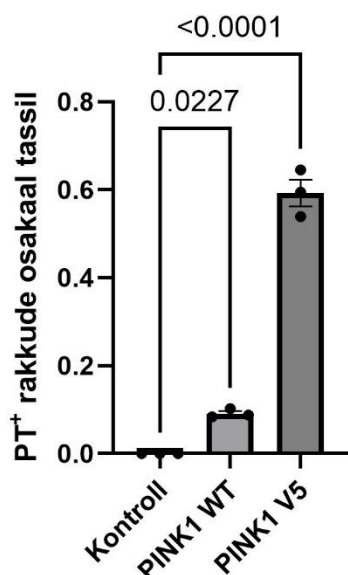
analüüsimiseks vajalik rakutuumade märgistamine, milleks kasutati algselt värvi Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Kuna Hoechst värvib kõikide rakkude tuumad, kuid HarmonyTM tarkvaraga sooviti analüüsida vaid edukalt plasmiidse DNA-ga transfecteeritud rakke, võeti kasutusele tuumamarkerite plasmiidkonstruktid.

Katsetatud konstruktideks olid sinist fluorestseeruvat valku ekspresseerivad plasmiidid pEBFP2-Nuc7 (Addgene #14893) ja pVITRO1-BFP-NLS (Addgene #184458). Nende fluorestsentssignaal osutus liiga nõrgaks: tuumad polnud nähtavad kõigis rakkudes, kus oli transfectsioon toimunud. Lisaks tekitas probleeme markerite lekkimine tuumast tsütoplasmasse. Lekkimise vältimiseks valiti punases spektris fluorestseeruv tuumamarker pH2B-Scarlet3 (GenScript), milles fluorestseeruv valk on seondunud kromatiinivalguga H2B. Seda tuumamarkerit katsetas teine laborant ning tuumamarker fluorestseerub piisavalt hästi edaspidisteks analüüsideks. PC-6 rakkudega pole veel pH2B-Scarlet3 konstrukti katsetatud. HarmonyTM tarkvaraga pole ka teiste rakkude puhul võimalik olnud analüüsi läbi viia.

2.3. Tulemused

2.3.1. PINK1 konstrukti valimine Parkini translokatsiooni uurimiseks

Parkini translokatsiooni uurimiseks oli vaja valida sobiv PINK1 konstrukti. Optimaalse andmeanalüüsi tagamiseks seati kriteeriumiks, et PINK1 peab indutseerima Parkini translokatsiooni 15-30%-l rakkudest. Selleks saavutamiseks uuriti metsiktüüpi PINK1 (WT) ja V5-märgisega PINK1 indutseeritud Parkini translokatsiooni PC-6 rakkudes (joonis 5). Varem on näidatud, et PINK1 V5 on rakkudes stabiilsem kui WT (avaldamata tulemused samast laborist). Kuna PINK1 V5 põhjustas Parkini translokatsiooni enam kui pooltes rakkudes (joonis 5) ja PINK1 WT indutseeris seda ligikaudu 10% rakkudest (joonis 5), otsustati edaspidistes katsetes kasutada PINK1 WT.



Joonis 5. PINK1 V5 indutseerib Parkini translokatsiooni intensiivsemalt kui PINK1 WT. PC-6 rakke transfecteeriti PINK1 WT või PINK1 V5 kodeerivate plasmiididega ning analüüsiti PT⁺ rakkude osakaalu kõikide rakkude suhtes. Iga koekultuuritassi kohta arvutati kahekümne vaatevälja summaarne PT⁺ rakkude ja kõikide rakkude arv, mille abil arvutati suhe PT⁺ rakkude ja kõikide rakkude vahel. Iga punkt graafikul tähistab PT⁺ rakkude suhtarvu ühe individuaalse koekultuuri tassi kohta, kõik väärtused on esitatud kujul PT⁺ rakkude osakaal ± SEM. Analüüsiks kasutati ühefaktorilist ANOVA dispersioonanalüüsi ning gruppide võrdlust. Tulemused on statistiliselt olulised (P = 0,0227 PINK1 WT ja P < 0,0001 PINK1 V5). Kasutatud meetodid on kirjeldatud alapeatükis 2.2.5.

2.3.2. CISD2 ja selle domeenide mõju Parkini translokatsioonile

CISD2 valgu funktsiooni uurimiseks PINK1/Parkini vahendatud mitofaagia rajas tehti neli sõltumatut katseseeriat, kus vaadeldi erinevate CISD2 konstruktide mõju Parkini

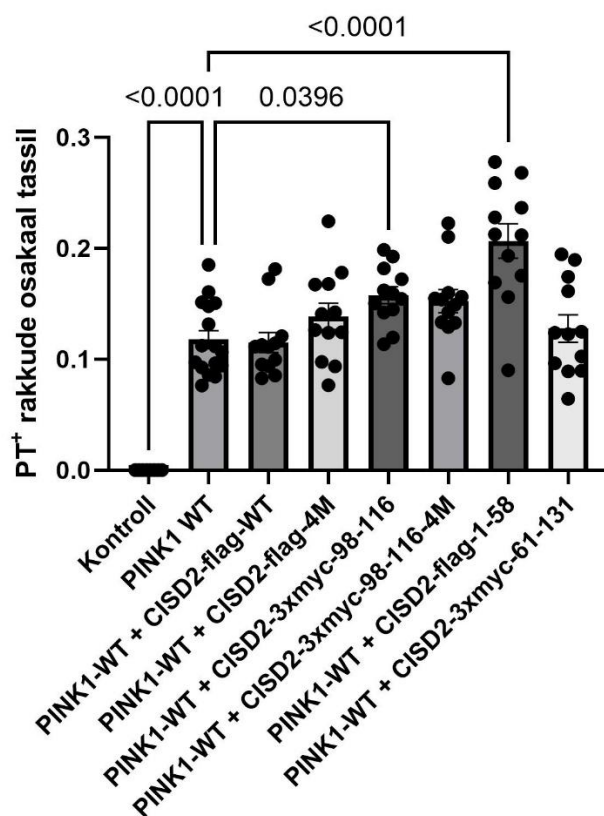
translokatsioonile. Kõik neli katseseeriat analüüsiti ühise andmestikuna ning visualiseeriti ühel graafikul.

Kontrollgrupiks kasutati rakukultuuri, mida transfekteeriti ainult YFP-ga märgistatud Parkini plasmiidiga. Gruppide võrdluseks kasutati CISD2 konstruktide võrdluseks PINK1 WT eksperimentaalgruppi. Igas katseseerias oli eksperimentaalgrupi kohta 2-4 kultuuritassi: kontrollgrupis kaks kultuuritassi (kokku nelja katseseeria peale $N = 8$), PINK1 WT puhul neli ($N = 16$) ja erinevate CISD2 konstruktide puhul kolm kultuuritassi ($N = 12$).

CISD2 mõju hindamiseks katsetati kuute erinevat CISD2 konstrukti:

- CISD2-flag-WT – metsiktüüpi CISD2, mille C-terminuses on *flag*-märgis;
- CISD2-flag-4M – CISD2 C-terminuses on *flag*-märgis ning neljas aminohappes esinevad mutatsioonid C99S+C101S+C110S+H114Q;
- CISD2-3xmyc-98-116 – CISD2-l on 3x myc-märgis, millele järgneb CDGSH domeen;
- CISD2-3xmyc-98-116-4M – CISD2 C-terminuses on *flag*-märgis ning 4. aminohappes esinevad mutatsioonid C99S+C101S+C110S+H114Q;
- CISD2-flag-1-58 – *flag*-märgisele järgneb ER-i lumeni ja transmembraanne domeen;
- CISD2-3xmyc-61-131 – 3x myc-märgise järel on tsütosoolis paiknev CISD2 osa.

Gruppide võrdluseks osutusid nendest statistiliselt olulisteks ($P < 0,05$) CISD2-3xmyc-98-116 ja CISD2-flag-1-58 (joonis 6).



Joonis 6. CISD2-flag-98-116 ja CISD2-flag-1-58 suurendavad Parkini translokatsiooni esinemist rakukultuuris. PC-6 rakke transfecteeriti PINK1 WT plasmidi ja erinevate CISD2 konstruktidega ning analüüsiti Parkini translokatsiooni. Iga koekultuuritassi kohta arvutati kahekümne vaatevälja summaarne PT⁺ rakkude ja kõigi rakkude arv, mille abil arvutati suhe PT⁺ rakkude ja kõikide rakkude vahel. Iga punkt graafikul tähistab PT⁺ rakkude suhtarvu ühe individuaalse koekultuuri tassi kohta, kõik väärtused on esitatud kujul PT⁺ rakkude osakaal ± SEM. Graafikul on esitatud nelja sõltumatu katseseeria tulemused. Tulemusi analüüsiti ühefaktorilise ANOVA dispersioonanalüüsiga, mille puhul võrreldi PINK1 WT eksperimentaalrühma väärtusi CISD2 konstruktid väärtustega. Graafikul on näidatud ainult statistiliselt olulised P-väärtused ($P < 0,05$). Kasutatud meetodid on kirjeldatud alapeatükis 2.2.5.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida CISD2 valgu rolli PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias. Selleks kasutati erinevaid CISD2 konstrukte, et vaadelda Parkini translokatsiooni rakukultuuris.

CISD2 geen paikneb alas, millel on vananemise aeglustamises oluline roll (Puca *et al.*, 2001). Varasemalt on tehtud CISD2 nokaut hiirtega katseid, kellel esinesid varajase vananemise tunnused, nagu karvkatte pigmendi vähenemine, luude hõrenemine ja nägemisprobleemid (Chen *et al.*, 2009). Samuti esinesid nendel metsiktüüpi hiirtest rohkem degenerereerunud mitokondreid ning autofagosoom, viidates suurenenud mitofaagia tasemele (Chen *et al.*, 2009).

Käesolevas töös suurendasid CISD2 konstruktid CISD2-3xmyc-98-116 (CDGSH domeen) ja CISD2-flag-1-58 (luumeni/transmembraanne domeen) Parkini translokatsiooni esinemist rakukultuuris ($P < 0,05$). See näitab, et nii CDGSH kui ka luumeni/transmembraanne domeen on mitofaagias olulised.

CISD2-3xmyc-98-116-4M, mille puhul oli nelja aminohappeline mutatsioon viidud sisse Fe-S seostuvasse domeeni, Parkini translokatsiooni ei mõjutanud. See viitab veelkord funktsionaalse CDGSH domeeni olulisusele mitofaagias.

Huvitaval moel ei osutunud statistiliselt oluliseks ($P > 0,05$) CISD2-flag-WT ja CISD2-3xmyc-61-131. See võis olla tingitud PINK1 WT efekti ebastabiilsusest eri katseseeriade puhul, mis vähendab statistilist võimsust. Tulemuste ebausaldusväärsuse tõttu pole nende konstruktide osas võimalik kindlat järeldust teha ja oleks vaja korrata katseid, et välistada nende mõju Parkini translokatsiooni toimumisele.

Saadud tulemusi võis mõjutada ka rakukultuuri passaažinumber, mis oli erinev eri katseseeriade läbiviimise ajal. Rakukultuuri pikaajalise kasutusega võib kaasneda muutusi rakkudes ning saastusest tingitud kõrvalekaldeid (Weiskirchen *et al.*, 2023). Kuigi rakukultuuriga töötades ei täheldatud saastust, oleks soovitatav katseid korrata ühe, suurema valimiga katseseeriana.

Antud töös kasutatud PC-6 rakud on feokromotsütoomist ehk neerupealiste säsi kasvajast pärit ja sagedasti neuronaaalse rakumudelina kasutatav rakuliin. Sarnaseid katseid võiks seega läbi teha ka roti neuronite rakukultuuriga, mida samas laboris ka praeguselt kasutatakse teiste katsete jaoks. CISD2-3xmyc-98-116 ja CISD2-flag-1-58 edaspidine uurimine neuronites võiks tuua rohkem selgust nende olulisusele primaarsetes neuronites.

Töö mahukuse ja ajakulu vähendamiseks oleks kasulik rakkude vaatlemine ja statistiline analüüs üle viia osaliselt automatiseeritud süsteemile. Selleks oleks võimalik kasutada Operetta

CLSTM kõrgläbilaskevõimega pildianalüüsisüsteemi, mille abil on võimalik rakke hoida optimaalsetes kasvutingimustes rakkude jäädvustamise ajal, pildistada selektsioonivabalt ja analüüsida saadud andmeid samas programmis HarmonyTM tarkvaraga. Algsed sammud rakukultuuri kasvatamise, transfekterimise ja jäädvustamise osas on tehtud (alapeatükk 2.2.6.), aga analüüsimiseni pole veel jõutud. Vastava protokollide moodustamine teeks erinevate konstruktid läbi katsetamise tõhusamaks ning võimaldaks kiiremini selekteerida vastavalt saadud tulemustele CISD2 konstrukte, mida edasi uurida.

Käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et CISD2 võib mõjutada mitofaagiat läbi Parkini translokatsiooni. CISD2-3xmyc-98-116 ja CISD2-flag-1-58 konstruktid avaldasid statistiliselt olulist mõju PC-6 rakkudes, näidates CDGSH ja luumeni/transmembraanse domeeni rolli PINK1/Parkini mitofaagias.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida CISD2 valgu rolli PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias. Lisaks sooviti teada saada ka erinevate CISD2 domeenide olulisust vastavas mitofaagia rajas. Selleks analüüsiti erinevate CISD2 plasmiidkonstruktide mõju Parkini translokatsioonile. CISD2 mõju hindamiseks transfecteeriti rakke PINK1 WT ja CISD2 konstruktidega, analüüsides Parkini translokatsiooni rakkudes.

Parkini translokatsiooni analüüsist selgus, et CISD2-3xmyc-98-116 ja CISD2-flag-1-58 konstruktid suurendasid Parkini translokatsiooni PC-6 rakkudes. Need tulemused viitavad CISD2 CDGSH ja luumeni/transmembraanse domeeni olulisusele mitofaagias. Parkini translokatsioonile ei avaldanud mõju CISD2-3xmyc-98-116-4M, mille puhul oli nelja aminohappeline mutatsioon viidud sisse Fe-S seostuvasse domeeni. See omakorda kinnitab CDGSH domeeni olulisust PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias.

Töö tulemused näitasid, et CISD2 valk avaldab mõju PINK1/Parkini vahendatud mitofaagiale. Selles olulist rolli mängivad CDGSH ja luumeni/transmembraanne domeen. Tulemuste ebaselguse tõttu ei saa lõplikku järeldust teha. Saadud tulemuste kinnitamiseks tuleks antud katseid korrata, soovitatavalt ühe katseseeria. Seeläbi oleks võimalik vältida rakukultuuri vananemisest tingitud muutusi.

Samuti oleks hea sarnaseid katseid läbi viia neuronite rakukultuuris. CISD2-3xmyc-98-116 ja CISD2-flag-1-58 edaspidised uuringud võimaldaksid tuvastada CDGSH ja luumeni/transmembraanse domeeni rolli PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias ning nende olulisust primaarsetes neuronites.

Käesolev bakalaureusetöö näitab CISD2 võimet suurendada Parkini translokatsiooni rakkudes. PINK1/Parkini vahendatud mitofaagiat mõjutavad CISD2 CDGSH domeen ja luumeni/transmembraanne domeen.

CISD2 role in PINK1/Parkin mediated mitophagy

Carmen Lilleorg

Summary

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that causes motor and nonmotor dysfunctions. It is caused by neuronal loss in different regions of the brain, mainly the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Dauer & Przedborski, 2003). There are different stress factors that contribute to the loss of neurons, including oxidative stress and mitochondrial dysfunction (Levy *et al.*, 2009; Singh & Ganley, 2021). The PINK1/Parkin mediated mitophagy is responsible for targeting damaged mitochondria for further degradation (Youle & Narendra, 2011). The CISD2 protein is believed to play a role in regulating the PINK1/Parkin mitophagy, the specific mechanisms are still unclear.

The aim of this bachelor's thesis was to analyse CISD2 protein's role in the PINK1/Parkin mitophagy pathway and to discover certain CISD2 domains that might participate in regulating PINK1/Parkin mitophagy. To achieve this, PC-6 cells were transfected with six different CISD2 plasmid constructs and the occurrence of PINK1/Parkin mitophagy was analysed using fluorescence microscopy. PINK1/Parkin mitophagy was confirmed in the cells by Parkin translocation.

Analysis of Parkin translocation showed that CISD2-3xmyc-98-116 and CISD2-flag-1-58 constructs increased Parkin translocation in PC-6 cells. These results show that the CDGSH domain and the lumen/transmembrane domain of CISD2 play a role in PINK1/Parkin mediated mitophagy. CISD2-3xmyc-98-116-4M inability to alter Parkin translocation supports that finding.

In conclusion, this study provides evidence that CISD2 plays a part in regulating PINK1/Parkin mediated mitophagy. This study also shows that the CDGSH and the lumen/transmembrane domain of CISD2 are important in mitophagy regulation. For definitive results it is recommended to repeat these experiments to confirm this study's findings. Ultimately, these results contribute to further experiments that could be done using CISD2-3xmyc-98-116 and CISD2-flag-1-58 to also see their effect in primary neurons.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

- Amr, S., Heisey, C., Zhang, M., Xia, X.-J., Shows, K. H., Ajlouni, K., Pandya, A., Satin, L. S., El-Shanti, H., and Shiang, R. (2007). A Homozygous Mutation in a Novel Zinc-Finger Protein, ERIS, Is Responsible for Wolfram Syndrome 2. *The American Journal of Human Genetics*, 81(4), 673–683. <https://doi.org/10.1086/520961>
- Armstrong, M. J., and Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *JAMA*, 323(6), 548. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Bian, C., Marchetti, A., Hammel, P., and Cosson, P. (2021). Intracellular targeting of Cisd2/Miner1 to the endoplasmic reticulum. *BMC Molecular and Cell Biology*, 22(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12860-021-00387-1>
- Burré, J., Sharma, M., and Südhof, T. C. (2015). Definition of a Molecular Pathway Mediating α -Synuclein Neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 35(13), 5221–5232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4650-14.2015>
- Chang, N. C., Nguyen, M., Germain, M., and Shore, G. C. (2010). Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *The EMBO Journal*, 29(3), 606–618. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.369>
- Chen, Y., Wu, C., Kirby, R., Kao, C., and Tsai, T. (2010). A role for the CISD2 gene in lifespan control and human disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05619.x>
- Chen, Y.-F., Kao, C.-H., Chen, Y.-T., ... Tsai, T.-F. (2009). Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. *Genes & Development*, 23(10), 1183–1194. <https://doi.org/10.1101/gad.1779509>
- Colla, E., Jensen, P. H., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Glabe, C., and Lee, M. K. (2012). Accumulation of Toxic α -Synuclein Oligomer within Endoplasmic Reticulum Occurs in α -Synucleinopathy *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 32(10), 3301–3305. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012>
- Conlan, A. R., Axelrod, H. L., Cohen, A. E., Abresch, E. C., Zuris, J., Yee, D., Nechushtai, R., Jennings, P. A., and Paddock, M. L. (2009). Crystal Structure of Miner1: The Redox-active 2Fe-2S Protein Causative in Wolfram Syndrome 2. *Journal of Molecular Biology*, 392(1), 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.079>

- Coppedè, F. (2012). Genetics and Epigenetics of Parkinson's Disease. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1100/2012/489830>
- Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiological Reviews*, 91(4), 1161–1218. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2010>
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease. *Neuron*, 39(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
- Dexter, D. T., and Jenner, P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>
- Dorsey, E. R., Elbaz, A., Nichols, E., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 17(11), 939–953. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30295-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30295-3)
- Du, X., Xie, X., and Liu, R. (2020). The Role of α -Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8645. <https://doi.org/10.3390/ijms21228645>
- Fielden, L. F., Busch, J. D., Merkt, ... Wiedemann, N. (2023). Central role of Tim17 in mitochondrial presequence protein translocation. *Nature*, 621(7979), 627–634. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06477-8>
- Gandhi, S. (2006). PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain*, 129(7), 1720–1731. <https://doi.org/10.1093/brain/awl114>
- Hardy, J. (2010). Genetic Analysis of Pathways to Parkinson Disease. *Neuron*, 68(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.014>
- Jankovic, J., and Stacy, M. (2007). Medical Management of Levodopa-Associated Motor Complications in Patients with Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, 21(8), 677–692. <https://doi.org/10.2165/00023210-200721080-00005>
- Jin, S. M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L. A., Narendra, D. P., and Youle, R. J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *Journal of Cell Biology*, 191(5), 933–942. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008084>

- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., ... Muqit, M. M. K. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biology*, 2(5). <https://doi.org/10.1098/rsob.120080>
- Lazarou, M., Jin, S. M., Kane, L. A., and 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. *Developmental Cell*, 22(2), 320–333. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.014>
- Levy, O. A., Malagelada, C., and Greene, L. A. (2009). Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*, 14(4), 478–500. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0309-3>
- Liao, H.-Y., Liao, B., and Zhang, H.-H. (2021). C1SD2 plays a role in age-related diseases and cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, 111472. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111472>
- Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Horrocks, ... Gandhi, S. (2018). α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. *Nature Communications*, 9(1), 2293. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04422-2>
- Martinez, A., Sanchez-Martinez, A., Pickering, J. T., Twynning, M. J., Terriente-Felix, A., Chen, P.-L., Chen, C.-H., and Whitworth, A. J. (2024). Mitochondrial C1SD1/C1sd accumulation blocks mitophagy and genetic or pharmacological inhibition rescues neurodegenerative phenotypes in Pink1/parkin models. *Molecular Neurodegeneration*, 19(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13024-024-00701-3>
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., ... Tanaka, K. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 211–221. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910140>

- Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., ... Mizuno, Y. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *American journal of human genetics*, 60(3), 588–596.
- Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D. J., and Lemberg, M. K. (2011). The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *Journal of Neurochemistry*, 117(5), 856–867. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07253.x>
- Muzerengi, S., Contrafatto, D., and Chaudhuri, K. R. (2007). Non-motor symptoms: Identification and management. *Parkinsonism & Related Disorders*, 13, S450–S456. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(08\)70048-8](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(08)70048-8)
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R., and Youle, R. J. (2010). PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLoS Biology*, 8(1), e1000298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>
- Narendra, D. P., and Youle, R. J. (2024). The role of PINK1–Parkin in mitochondrial quality control. *Nature Cell Biology*, 26(10), 1639–1651. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01513-9>
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>
- Nechushtai, R., Karmi, O., Zuo, K., Marjault, H.-B., Darash-Yahana, M., Sohn, Y.-S., King, S. D., Zandalinas, S. I., Carloni, P., and Mittler, R. (2020). The balancing act of NEET proteins: Iron, ROS, calcium and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(11), 118805. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118805>
- Okatsu, K., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015). Unconventional PINK1 localization mechanism to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.161000>
- Paddock, M. L., Wiley, S. E., Axelrod, H. L., ... Jennings, P. A. (2007). MitoNEET is a uniquely folded 2Fe–2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by

- pioglitazone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14342–14347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707189104>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., ... Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Puca, A. A., Daly, M. J., Brewster, S. J., ... Perls, T. (2001). A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10505–10508. <https://doi.org/10.1073/pnas.181337598>
- Rasool, S., Veyron, S., Soya, N., Eldeeb, M. A., Lukacs, G. L., Fon, E. A., and Trempe, J.-F. (2022). Mechanism of PINK1 activation by autophosphorylation and insights into assembly on the TOM complex. *Molecular Cell*, 82(1), 44-59.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.012>
- Scarffe, L. A., Stevens, D. A., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2014). Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends in Neurosciences*, 37(6), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.004>
- Schapira, A. H. (2008). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 7(1), 97–109. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70327-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70327-7)
- Schapira, A. H., and Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(6), 1049–1055. <https://doi.org/10.1002/mds.23732>
- Schapira, A. H. V. (2009). Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.10.005>
- Schrag, A., and Quinn, N. (2000). Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Brain*, 123(11), 2297–2305. <https://doi.org/10.1093/brain/123.11.2297>
- Shen, Z.-Q., Huang, Y.-L., Teng, Y.-C., Wang, T.-W., Kao, C.-H., Yeh, C.-H., and Tsai, T.-F. (2021). CISD2 maintains cellular homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(4), 118954. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118954>

- Singh, F., and Ganley, I. G. (2021). Parkinson's disease and mitophagy: an emerging role for LRRK2. *Biochemical Society Transactions*, 49(2), 551–562. <https://doi.org/10.1042/BST20190236>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139(S1), 318–324. <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>
- Zheng, X., and Hunter, T. (2013). Parkin mitochondrial translocation is achieved through a novel catalytic activity coupled mechanism. *Cell Research*, 23(7), 886–897. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.66>
- Thomas, B., and Beal, M. F. (2007). Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 16(R2), R183–R194. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm159>
- Unoki, M., and Nakamura, Y. (2001). Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*, 20(33), 4457–4465. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204608>
- Weiskirchen, S., Schröder, S. K., Buhl, E. M., and Weiskirchen, R. (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*, 12(5), 682. <https://doi.org/10.3390/cells12050682>
- Wenzel, D. M., Lissounov, A., Brzovic, P. S., and Klevit, R. E. (2011). UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*, 474(7349), 105–108. <https://doi.org/10.1038/nature09966>
- Wiley, S. E., Andreyev, A. Y., Divakaruni, A. S., ... Murphy, A. N. (2013). Wolfram Syndrome protein, Miner1, regulates sulphhydryl redox status, the unfolded protein response, and Ca²⁺ homeostasis. *EMBO Molecular Medicine*, 5(6), 904–918. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201429>
- Yin, Z., Pascual, C., and Klionsky, D. J. (2016). Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell*, 3(12), 588–596. <https://doi.org/10.15698/mic2016.12.546>
- Youle, R. J., and Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>

LIHTLITSENTS

Mina, Carmen Lilleorg,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „CISD2 roll PINK1/Parkini vahendatud mitofaagias“, mille juhendajad on Allen Kaasik, Annika Vaarmann ja Tambet Tõnissoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonda, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Carmen Lilleorg

25.05.2026