

PRDX1-dependent H₂O₂ scavenging is the dominant determinant of mitochondrial H₂O₂ levels

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Lianne Jacobs

aus Stein, Niederlande

angenommen im Jahr 2025

Zusammenfassung

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist ein unvermeidbares Nebenprodukt wichtiger zellulärer Prozesse, das zunehmend als Signalmolekül in redox-regulierten Signalwegen verschiedener Zellkompartimente an Bedeutung gewinnt. Obwohl in letzter Zeit mehrere Regulatoren identifiziert wurden, ist über die molekularen Mechanismen der Regulation und Signaltransduktion von H_2O_2 noch wenig bekannt. In dieser Studie haben wir den Beitrag von 2-Cys Peroxiredoxinen (PRDXs), wichtigen proximalen H_2O_2 -abfangenden Enzymen, zur kompartiment-spezifischen Redoxkontrolle und zellulären Widerstandsfähigkeit unter oxidativem Stress untersucht.

Hierzu haben wir mit dem ultrasensitiven, genetisch kodierten Sensor HyPer7 H_2O_2 -Dynamiken sowohl im Zytosol und in der mitochondrialen Matrix in Echtzeit gemessen. Basierend auf Daten aus HEK293 WT- und mittels CRISPR/Cas9 generierten Knockout-Zelllinien identifizierten wir zytosolisches PRDX1 als zentralen Regulator der zellulären H_2O_2 Entgiftung, dessen Abwesenheit auch die mitochondriale Redoxdynamik signifikant beeinflusste. Im Gegensatz dazu zeigte der Verlust mitochondrialer PRDXs (z.B., PRDX3 und PRDX5) keinen wesentlichen Einfluss auf die mitochondriale H_2O_2 -Beseitigung. Diese Ergebnisse bestätigten sich sowohl bei geringer exogener H_2O_2 -Exposition als auch bei mitochondrialer H_2O_2 -Generierung mittels eines chemogenetischen D-Aminosäureoxidase (DAO)-tools.

Zur Identifikation adaptiver Mechanismen, die die zelluläre Redoxhomöostase stützen, wurde ein angepasster CRISPR/Cas9-Drop-out-Screen in Zellen ohne zytosolische PRDXs (z. B. PRDX1 und PRDX2) durchgeführt. Dabei ergaben sich stressspezifische Abhängigkeiten von bestimmten Genen, darunter TBC1D5, einem Gen mit Bezug zur Mitophagie. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen zytosolischer H_2O_2 -Pufferung und mitochondrialer Qualitätskontrolle hin. Obwohl die Verbindung zwischen Mitophagie und TBC1D5 in dieser Arbeit nicht im Detail untersucht wurde, legen die Daten nahe, dass eine reduzierte zytosolische H_2O_2 -Entgiftung kompensatorische Mitophagie-Reaktionen auslösen kann, um die Organellenintegrität zu erhalten.

Zusammenfassend hebt diese Studie die zentrale Rolle von zytosolischem PRDX1 bei der Aufrechterhaltung der zellulären Redoxhomöostase hervor, dessen Aktivität über das Zytosol hinaus maßgeblich die mitochondriale Redoxdynamik prägt. Die Ergebnisse unterstreichen die Dominanz der zytosolischen gegenüber mitochondrialer Pufferung bei der Gestaltung der zellulären Redoxumgebung. Die Identifizierung von TBC1D5 zeigt zudem, dass die gestörte zytosolische Pufferung unter anderem die mitochondriale Qualitätskontrolle zur Sicherung der Zellfunktion unter oxidativem Stress auslösen kann.

Abstract

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is an unavoidable byproduct of essential cellular processes and is increasingly recognized as a signaling molecule that modulates redox-sensitive pathways across cellular compartments. Although several regulatory factors have been identified recently, the molecular systems governing H_2O_2 regulation and signaling remain poorly understood. In this study, we systematically investigated the contribution of 2-Cys peroxiredoxins (PRDXs), key proximal H_2O_2 scavenging enzymes, to compartment-specific redox control and cellular resilience under oxidative stress.

Using CRISPR/Cas9-engineered HEK293 knockout cell lines and the ultrasensitive, genetically encoded sensor HyPer7, we monitored real-time H_2O_2 dynamics in both the cytosol and the mitochondrial matrix. We demonstrate that cytosolic PRDX1 acts as the dominant regulator of cellular H_2O_2 detoxification, with its loss significantly influencing the mitochondrial redox dynamics. In contrast, loss of mitochondrial PRDXs (e.g., PRDX3 and PRDX5) did not substantially impair mitochondrial H_2O_2 clearance. These findings were consistent across conditions of low exogenous H_2O_2 exposure and mitochondrial-targeted H_2O_2 generation using a chemogenetic D-Amino Acid Oxidase (DAO) tool.

To identify adaptive mechanisms that support cellular redox homeostasis, a mitochondrial-focused CRISPR/Cas9 drop-out screen was performed in cells lacking two cytosolic PRDXs (PRDX1 and PRDX2). This approach revealed oxidative stress-specific dependencies on specific genes, including TBC1D5, a gene related to mitophagy, suggesting a potential link between cytosolic buffering and mitochondrial quality control. Although the connection to TBC1D5 was not directly studied here, the elevated mitophagic flux in PRDX1/2 DKO cells supports the hypothesis that impaired cytosolic H_2O_2 detoxification may trigger compensatory mitophagy responses to maintain organelle integrity.

In summary, this study highlighted the central role of cytosolic PRDX1 in maintaining cellular redox homeostasis. Its activity extends beyond the cytosol, significantly impacting mitochondrial redox dynamics, despite the presence of mitochondrial-localized PRDXs. These findings emphasize the dominance of cytosolic, over mitochondrial, buffering in shaping the cellular redox environment. Moreover, the identification of TBC1D5, a mitophagy-related gene, suggests that impaired cytosolic buffering may initiate broader cellular responses, such as mitochondrial quality control, to preserve cellular function under oxidative stress.