

**Mutationsanalyse und funktionelle  
Charakterisierung des  
*Omi/HtrA2*-Gens  
in der Pathogenese  
der Parkinson-Krankheit**

**Dissertation**

**der Fakultät für Biologie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt von  
Karsten Matthias Strauß  
aus Titisee-Neustadt**

**2005**

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2005

Dekan: Prof. Dr. Friedrich Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Rieß
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schwarz

Ein Optimist ist ein Mensch, der ein Dutzend Austern bestellt, in der Hoffnung, sie mit der Perle, die er darin findet, bezahlen zu können.

nach Theodor Fontane

*Meinen Eltern gewidmet*

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Dr. R. Krüger für die Überlassung des interessanten Themas, seiner kontinuierlichen Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der gesamten Arbeit sowie der Möglichkeit am Neuroscience Meeting 2004 teilzunehmen.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. O. Rieß für seine Betreuung, die sehr gute Kooperation und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Prof. Dr. J.B. Schulz danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe zu Beginn der Arbeit sowie für die interessanten Diskussionen während der gemeinsamen Zeit.

Herrn Prof. M. Schwarz danke ich herzlich für die freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Bei Frau S. Kautzmann möchte ich mich für die vielfältige Unterstützung im Laboralltag bedanken.

Prof. H. Wolburg und Dr. D. Berg, sowie Dr. L.M. Martins möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Weiterhin danke ich Dr. P. Bauer, Herrn T. Franck und Dr. R. Hering für die Unterstützung in den Labors der Medizinischen Genetik.

Mein Dank gilt insbesondere auch meinen Freunden und Kollegen im Institut sowie im privaten Umfeld für die seelische und moralische Unterstützung während dieser Arbeit.

Den größten Dank verdienen meine Eltern und meine Großmutter die mich immer unterstützt haben und stets Vertrauen in mich hatten.

## Abkürzungen

---

ACN	Acetonitril
AFU	<i>Arbitrary Fluorescence Units</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
ca.	zirka
cm	Zentimeter
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CDS	<i>Coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
CEPH	<i>Centre Etude Polymorphism Humain</i>
CMV	Cytomegalo-Virus
CoIP	Ko-Immunpräzipitation
DA	Dopamin
dHPLC	Denaturierende-Hochdurchsatz-Flüssigkeits-Chromatografie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EM	Elektronen-Mikroskop
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>

FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fwd	<i>Forward</i> (Vorwärts)
g	Gramm
h	<i>Hour</i> (Stunde)
HEX	6-Carboxy-2",4,4",5",7,7"- hexachlorofluorescein
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LK	Lewy Körper ( <i>Lewy body</i> )
Lsg.	Lösung
m	Milli
M	Mol
min	Minute(n)
MMP	mitochondriales Membranpotential
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
$\mu$	Mikro
NEB	New England Biolabs
n	Nano
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
OD	<i>Optical density</i> (Optische Dichte)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PD	<i>Parkinson's Disease</i>
PEG	Polyethylen Glykol
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PI	Propidiumiodid
PK	Parkinson-Krankheit
PKC	<i>Protein kinase C</i>
polyQ	<i>Proteins with expanded polyglutamine repeats</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
Rev	<i>Reverse</i> (Rückwärts)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec.	<i>Seconds</i> (Sekunden)
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
U	<i>Unit(s)</i>
ÜA	Übersichtsartikel ( <i>Review</i> )
üN	über Nacht
UK	<i>United kingdom</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
UV	Ultraviolett



V	Volt
v/v	<i>Volume by volume</i> (Volumen zu Volumen)
vgl.	vergleiche
VNTR	<i>Variable number of tandem repeat</i> (Minisatellitenmarker)
Vol.	Volumen
WB	Western-Blot
Wt	Wildtyp
w/v	<i>Weight by volume</i> (Gewicht zu Volumen)



# Inhaltsverzeichnis:

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Morbus Parkinson</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie und klinische Symptome der Parkinson-Krankheit	1
1.1.2 Diagnose der Parkinson-Krankheit	2
1.1.3 Pathogenese der Parkinson-Krankheit	3
1.1.4 Ätiologie des Morbus Parkinson	5
<b>1.2 Mechanismen des Zelltods</b>	<b>20</b>
1.2.1 Apoptose	20
1.2.2 Nekrose	23
1.2.3 Weitere Möglichkeiten des Zelltods	23
<b>1.3 Omi/HtrA2</b>	<b>25</b>
1.3.1 Biochemische Eigenschaften von Omi/HtrA2	25
1.3.2 Die Rolle von Omi/HtrA2 beim Zelltod	26
1.3.3 Omi/HtrA2 als Parkinson Kandidaten-Gen	27
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>31</b>
2.1.1 Reagenzien	31
2.1.2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	35
2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien	37
2.1.4 Enzyme, Kits und Reagenziensysteme	41
2.1.5 Puffer und Lösungen	43
2.1.6 Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien	45
2.1.7 Plasmide	46
2.1.8 Primer	49
2.1.9 Patienten- und Kontrollkollektive	52
<b>2.2 Methoden</b>	<b>53</b>
2.2.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	53
2.2.2 Agarosegelelektrophorese	57
2.2.3 Denaturierende-Hochdurchsatz-Flüssigkeits-Chromatografie	57
2.2.4 Zyklische Sequenzierung	61
2.2.5 Pyrosequencing	63
2.2.6 Restriktionsanalyse	65
2.2.7 Haplotypisierung genomischer DNA-Abschnitte	66
2.2.8 Klonierung	68
2.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	70

2.2.10 Präparation von DNA aus Bakterien	71
2.2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA	72
2.2.12 In-vitro Mutagenese	72
2.2.13 Herstellen chemisch kompetenter Bakterien	74
2.2.14 Herstellen von Bakterien-Glycerin-Stocks	74
2.2.15 Zellkultur	75
2.2.16 Transfektion	76
2.2.17 Generierung von stabil exprimierenden Zelllinien	77
2.2.18 Herstellung von Proteinlysaten	78
2.2.19 Bestimmung der Proteinkonzentration	79
2.2.20 SDS-Gelelektrophorese	79
2.2.21 Western-Blot	81
2.2.22 Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper	81
2.2.23 "Strippen" von Nitrozellulose-Membranen	83
2.2.24 Immunpräzipitation	83
2.2.25 Ko-Immunopräzipitation (CoIP)	84
2.2.26 Mikroskopie	84
2.2.27 Vitalitäts- und Zelltod-Tests	86
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>90</b>
<b>3.1 Mutationsanalyse der Omi/HtrA2 Exons mittels dHPLC</b>	<b>90</b>
3.1.1 dHPLC <i>Screening</i>	90
3.1.2 Sequenzierung der auffälligen dHPLC Ergebnisse	93
3.1.3 <i>Pyrosequencing</i> der G421T-Substitution bei Kontrollen	95
3.1.4 RFLP-Analyse der G1195A Substitution	96
3.1.5 Zusammenfassung des Mutationscreenings	97
<b>3.2 Generierung potentieller Haplotypen in der 2p13- Region bei Trägern der G399S-Mutation im Omi/HtrA2-Gen</b>	<b>99</b>
3.2.1 Untersuchung der PARK3-Familien	101
<b>3.3 Auswirkungen der Mutationen auf die Genexpression</b>	<b>103</b>
3.3.1 Überexpression bei transienter Transfektion	103
3.3.2 Überexpression bei stabil exprimierenden Zelllinien	104
3.3.3 Zusammenfassung	105
<b>3.4 Auswirkungen der Omi/HtrA2-Mutationen auf die Interaktion mit XIAP</b>	<b>105</b>
<b>3.5 Auswirkungen der Omi/HtrA2-Mutationen auf Interaktionen mit PK-assozierten Proteinen</b>	<b>107</b>
3.5.1 Ko-Immunpräzipitation mit krankheitsassoziierten Proteinen des Ubiquitin-Proteasomen <i>Pathways</i>	107

3.5.2 Ko-Immunpräzipitation mit DJ-1	108
3.5.3 Zusammenfassung	109
<b>3.6 Auswirkungen der Mutationen auf die Ubiquitinierung</b>	<b>109</b>
<b>3.7 Auswirkungen der Mutationen auf die Funktionalität</b>	<b>112</b>
3.7.1 Effekte von mutiertem Omi/HtrA2 auf die Serin-Proteaseaktivität	112
3.7.2 Effekte von mutiertem Omi/HtrA2 auf die Homotrimerisierung	115
<b>3.8 Mikroskopie</b>	<b>117</b>
3.8.1 Subzelluläre Lokalisation von Omi/HtrA2	117
3.8.2 Morphologie stabil Omi/HtrA2 überexprimierender Zellen	119
3.8.3 Ultrastrukturelle Untersuchungen (EM)	121
3.8.4 Koloalisation von Lysosomen und Mitochondrien	123
3.8.5 Immunhistochemie in Hirnschnitten von PK-Patienten	127
3.8.6 Zusammenfassung	129
<b>3.9 Viability und Apoptose Assays</b>	<b>130</b>
3.9.1 LDH-Assays	130
3.9.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials	132
3.9.3 Zusammenfassung	135
<b>3.10 Charakterisierung der E64D-Mutation im DJ-1-Protein</b>	<b>136</b>
3.10.1 Mikroskopische Untersuchungen von DJ-1	136
3.10.2 Untersuchungen der Proteinstabilität von DJ-1	138
<b>4 Diskussion</b>	<b>139</b>
<b>4.1 Mutationsscreening im Omi/HtrA2-Gen</b>	<b>139</b>
<b>4.2 Charakterisierung der Omi/HtrA2-Mutationen</b>	<b>143</b>
<b>4.3 Charakterisierung der E64D-Mutation im DJ-1-Protein</b>	<b>152</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>154</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>155</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Parkinson

Die Symptomatik der Parkinson-Krankheit (Morbus Parkinson) oder auch des idiopathischen Parkinson-Syndroms (IPS) wurde erstmals 1817 von dem Arzt James Parkinson beschrieben, nachdem dieses Syndrom benannt ist. In seinem Monograph *'An essay on the shaking palsy'* beschrieb er eine neurologische Erkrankung, welche sich durch einen Ruhetremor und eine progressive motorische Unbeweglichkeit auszeichnet. Das IPS ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer.

### 1.1.1 Epidemiologie und klinische Symptome der Parkinson-Krankheit

Die Prävalenz der Parkinson-Krankheit (PK) beträgt in den industrialisierten Staaten etwa 0,3% der Gesamtbevölkerung. In der älteren Generation besteht bei den über 60-Jährigen eine etwa 2%ige Wahrscheinlichkeit, an der PK zu erkranken, wobei eine familiäre Prädisposition die Wahrscheinlichkeit verdoppelt. Es sind dabei alle ethnischen Gruppen betroffen, wobei Männer eine leicht höhere Prävalenz aufweisen als Frauen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in den frühen 60'ern, bei Patienten mit frühem Krankheitsbeginn treten die Initialsymptome vor dem 50. Lebensjahr auf. Dabei zeigen etwa 5-10% der Parkinson-Patienten einen frühen Krankheitsbeginn (ÜA: Fahn, 2003; Samii, 2004).

Die Kardinalsymptome der Erkrankung sind Ruhetremor (Zittern), Rigidität (Steifheit) und die Bradykinese (Verlangsamung der Bewegungsabläufe). Der Ruhetremor ist bei etwa 50% der Erkrankten als primär auftretendes Symptom erkennbar, zeigt bei PK-Patienten eine Frequenz von 3-5 Hz und ist bei Erkrankungsbeginn typischerweise asymmetrisch. Allerdings gibt es auch Fälle, in denen die Bradykinese ein erster Hinweis auf die Erkrankung ist, weiterhin gibt es Krankheitsverläufe, bei denen es zu keiner Ausprägung eines Ruhetremors kommt. Beim Ruhetremor der PK sind normalerweise die Hände und Füße betroffen, in seltenen Fällen kann es auch zu einem Tremor von Zunge und Kiefer kommen. Die Muskelsteifheit (Rigor) spiegelt sich durch eine Spannungserhöhung in den antagonistischen Muskeln der Gliedmaßen wider und ist für die Patienten als Steifheit der Arme und Beine spürbar. Die Bradykinese manifestiert

sich zumeist in Schwierigkeiten bei Bewegungsabläufen der Feinmotorik, wie z.B. dem Schreiben. Weiterhin kommt es zu einem verminderten Mitschwingen der Arme beim Gehen. Der Beginn der Bradykinese ist meistens auf eine Körperhälfte festgelegt und bleibt auf diese auch im weiteren Krankheitsverlauf sehr lange beschränkt. Als weitere Symptomatik der Bradykinese sind eine verminderte Mimik und Gestik, ein Leiserwerden der Stimme, ein Gang mit kleinen Schritten und im späten Verlauf auch Haltungs- und Gleichgewichtsstörungen zu nennen (ÜA: Fahn, 2003; Samii, 2004).

Viele Parkinson-Patienten weisen weitere Symptome auf, welche als nicht-motorisch bezeichnet werden. Hierzu zählen Schlafstörungen, Motivationsverlust, sexuelle Dysfunktion, Blasenschwäche, Müdigkeit, sensorische Schmerzsymptome und Depression. Im späteren Verlaufsstadium der PK kommt es bei etwa 40% der Patienten zur Demenz (ÜA: Fahn, 2003).

### **1.1.2 Diagnose der Parkinson-Krankheit**

Die Diagnose der PK beruht auf dem Erkennen der Krankheitssymptome, eine abschließende, sichere Diagnose kann jedoch erst nach dem Tod durch pathologische Untersuchungen des Gehirns gestellt werden.

Die Diagnose sollte durch einen Neurologen erfolgen, da es ähnliche Symptome gibt, die zusammenfassend als Parkinsonismus bezeichnet werden und in drei Gruppen eingeteilt werden. Als primären Parkinsonismus bezeichnet man den Morbus Parkinson, der sich in das sporadische, idiopathische Parkinson-Syndrom und Erkrankungsverläufe durch bekannte genetische Ursachen der Parkinson-Krankheit aufteilt. Durch die Erkenntnisse der vergangenen Jahre wird der Begriff des IPS zwischenzeitlich generell für den Morbus Parkinson verwendet (ÜA: Fahn, 2003).

Als sekundärer Parkinsonismus werden Parkinson-Syndrome bezeichnet, welche durch die Intoxikation mit Medikamenten oder Umweltgiften ausgelöst werden. Parkinson-Plus-Syndrome stellen die dritte Gruppe dar, zu denen etwa MSA (*Multiple system atrophy*) und DLBD (*Diffuse lewy body disease*) gehören.

Die Diagnose der PK kann gestellt werden, wenn mindestens zwei der Hauptsymptome des Parkinsonismus vorliegen (siehe Tabelle 1.1) und folgende drei Kriterien zutreffen: (1) ein asymmetrisches Auftreten der Symptome, (2) das Vorliegen eines Ruhetremors (wobei es auch PK Fälle gibt, bei denen es zu keiner



Ausprägung eines Ruhetremors kommt), (3) Ansprechen auf eine Levodopa-Therapie.

**Tabelle 1.1:** Die sechs Hauptsymptome des Parkinsonismus (Quelle: Fahn, 2003)

Hauptsymptome des Parkinsonismus	
Ruhetremor	Gebeugte Haltung von Nacken, Rumpf und Gliedmaßen
Rigidität	
Bradykinese	<i>Freezing</i> -Phänomen
Verlust von posturalen Reflexen	

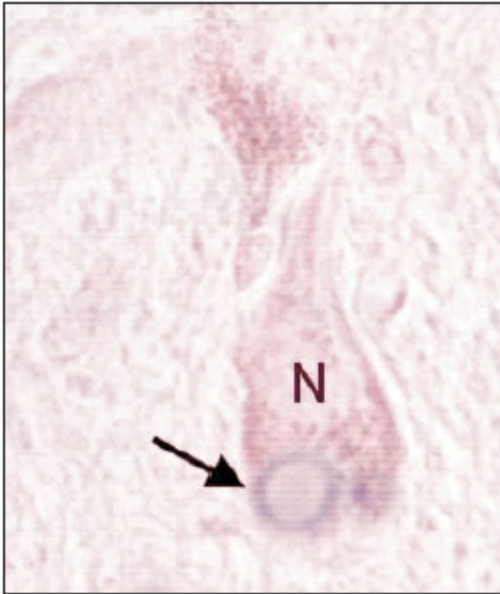
Zur normalen klinischen Diagnostik kann man bei atypischen, fraglichen Fällen noch das Hilfsmittel des Neuroimagings hinzuziehen. Hierbei wird die Funktion des nigrostriatalen dopaminergen Stoffwechsels untersucht. Dabei ist bei der PK charakteristischerweise ein Rückgang der striatalen 6-[<sup>18</sup>F]-fluoro-L-dopa-Aufnahme durch PET-Untersuchungen nachweisbar.

### 1.1.3 Pathogenese der Parkinson-Krankheit

Das pathologische Bild der PK zeichnet sich durch den Verlust der nigrostriatalen dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) aus. Durch den Verlust der dopaminergen Neurone werden die dopaminergen Projektionen der SNpc zum *Nucleus caudatus* und zum *Striatum* gestört. Durch den progressiven Verlust der dopaminergen Neurone kommt es zu einem Verlust an Dopamin in der *Substantia nigra* und im *Striatum*, wodurch letztendlich die Symptomatik der Erkrankung hervorgerufen wird. Durch kompensatorische Effekte der Dopaminrezeptoren kommt es jedoch erst ab einem etwa 80%igen Rückgang an Dopamin - was zirka einem 50-60%igen Verlust der nigrostriatalen Neurone entspricht - zu den ersten Symptomen. Durch den fortschreitenden Verlust an Neuronen und dem daraus resultierenden weiteren Rückgang an Dopamin prägen sich die Symptome weiter aus.

Weiterhin kommt es zum Auftreten von intrazytoplasmatischen, neuronalen Proteineinschlüssen, sogenannten Lewy-Körpern, welche nach ihrem Erstbeschreiber Friedrich Lewy benannt sind. Sie treten bei der PK in vielen Regionen des Nervensystems auf, neben der *Substantia nigra* auch im *Locus coeruleus*, *Nucleus basalis*, in limbischen Regionen, dem *Hypothalamus*, dem zerebralen

Kortex, kranialen Motorneuronen und peripheren Anteilen des autonomen Nervensystems (ÜA: von Bohlen und Halbach, 2004; Riess, 1999). Die Neurodegeneration weiterer Gehirnareale, wie z.B. die Strukturen des Hippocampus, erklären auch die nicht-dopaminerge Pathologie und die nicht-motorischen Krankheitssymptome im fortgeschrittenen Erkrankungsverlauf (ÜA: Schulz, 2004).



**Abbildung 1.1.1:** Abbildung eines Lewy-Körpers nach Färbung für  $\alpha$ -Synuklein (blauschwarze immunzytochemische Markierung), die den Hof stark anfärbt (Pfeil). Der Zellkern des Neurons (N) wurde rot gegengefärbt (Riess et al, 1999).

Als Hauptbestandteil der Lewy-Körper wurde das Protein  $\alpha$ -Synuklein identifiziert, als weitere Bestandteile konnten Neurofilament, Lipide, Synphilin-1, Ubiquitin und mit dem UPS verbundene Proteine identifiziert werden.

### **1.1.4 Ätiologie des Morbus Parkinson**

Die Ursachen der PK sind bislang nicht geklärt. Der Großteil der Parkinson-Patienten wird sporadischen Ursachen zugeteilt, genetische Faktoren haben an Bedeutung gewonnen, wurden bis jetzt jedoch nur einem Bruchteil der Patienten zugeordnet.

Durch genetische, epidemiologische und neuropathologische Studien und die Entwicklung experimenteller Tiermodelle konnten molekulare Zusammenhänge und Wege der Pathogenese von sporadischen wie familiären Formen der PK gefunden werden.

Hierzu zählen oxidativer Stress, Stress durch Nitrosamine, die Akkumulation fehlgefalteter oder mutierter Proteine, Dysfunktionen des Ubiquitin-Proteasomen-Weges und Störungen der mitochondrialen Funktion. Im Folgenden sollen die familiären Faktoren, wie auch die möglichen Gründe für die sporadischen Fälle der PK, näher erläutert werden.

#### **1.1.4.1 Familiäre und genetische Ursachen der Parkinson-Krankheit**

Lange Zeit galt die PK als eine typische nicht-genetisch bedingte sporadische Erkrankung. Es fiel zwar auf, dass Verwandte Betroffener häufiger ein Parkinson-Syndrom entwickelten, die Untersuchungen an Zwillingen zeigten jedoch keine eindeutigen Resultate (ÜA: Moore, 2005). Durch die spätere Identifikation von Genorten (Loci), bei denen durch Kopplungsanalysen in Familien mit PK eine Segregation der Erkrankung festgestellt wurde, machte die Identifikation von Genen möglich, die für familiäre Formen der PK verantwortlich waren. Zwischenzeitlich sind 11 dieser Loci gefunden worden und es konnten sechs Gene identifiziert werden, die mit der PK assoziiert sind (vgl. Tabelle 1.2).

**Tabelle 1.2:** Loci und Gene der familiären Formen der Parkinson-Krankheit

Locus	Lokalisation	Gen	Vererbung	Referenz
PARK1	4q21-q23	<i>α-Synuklein</i>	AD	Polymeropolous, 1997
PARK2	6q25-q27	<i>Parkin</i>	AR	Kitada, 1998
PARK3	2p13	unbekannt	AD <sup>1</sup>	Gasser, 1998
PARK4	4p15	<i>α-Synuklein</i> (Triplikation)	AD	Singleton, 2003
PARK5	4p14	<i>UCH-L1</i>	?	Leroy, 1998
PARK6	1p35-p36	<i>PINK1</i>	AR	Valente, 2004
PARK7	1p36	<i>DJ-1</i>	AR	Bonifati, 2003
PARK8	12p11.2- q13.1	<i>LRRK2</i>	AD	Zimprich, 2004
PARK9	1p36	unbekannt	AR	Hampshire, 2001
PARK10	1q32	unbekannt	?	Hicks, 2002
PARK11	2q36-q37	unbekannt	?	Pankratz, 2003

AD: Autosomal dominant, AR: Autosomal rezessiv; <sup>1</sup> Vererbungsmuster mit unvollständiger Penetranz

#### 1.1.4.1.1 *α*-Synuklein (PARK1, PARK4)

Die erste identifizierte genetische Ursache für die PK war eine A53T-Mutation im *α-Synuklein*-Gen. Die pathogenetische Bedeutung dieser Mutation wurde durch die spätere Identifikation von *α-Synuklein* (SNCA) als Hauptbestandteil der Lewy-Körper (Spillantini, 1998) und das Auffinden einer A30P-Mutation im *α-Synuklein*-Gen bei einer deutschen Familie mit familiärem Parkinson-Syndrom (Krüger, 1998) deutlich. Zwischenzeitlich wurde noch eine weitere E46K-Mutation in einer spanischen Familie gefunden (Zarranz, 2004). Neuere Untersuchungen ergaben, dass eine genomische Triplikation des Bereiches um das *α-Synuklein*-Gen für den PARK4 Locus verantwortlich ist (Singleton, 2003).

Die physiologische Rolle von *α-Synuklein* ist noch unklar. *α-Synuklein* wird beim Menschen im ganzen Nervensystem exprimiert und dabei hauptsächlich in den präsynaptischen Nervenendigungen gefunden, wo es mit membran- und vesikulären Strukturen assoziiert ist (Kahle, 2000). Als mögliche physiologische Funktionen gelten Modifikation des vesikulären Transports, Regulation der

synaptischen Vesikelgröße und vesikuläres Recycling mit einer Verbindung zur Dopaminspeicherung und Dopamintransport (Abeliovich, 2000).

$\alpha$ -Synuklein ist ein 140 AS großes Protein, welches aus einer N-terminalen amphipatischen  $\alpha$ -helikalen Region besteht, die aus sechs imperfekten KTKEGV-Wiederholungen besteht, welche in eine hydrophobe Region übergeht, in der die NAC-Domäne lokalisiert ist. Die C-terminale Region besteht aus einer sauren Domäne mit Chaperone-Aktivität (Kim, 2002). Als pathogener Mechanismus von  $\alpha$ -Synuklein wird die Eigenschaft, mit sich selbst zu aggregieren, diskutiert. So sind die P30-, K46- und T53- $\alpha$ -Synuklein-Mutanten in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, Fibrillen zu bilden und tendieren zur Bildung von oligomeren Strukturen (Conway, 1998 & 2000). Hierbei werden aus den Monomeren des Proteins durch Aggregation  $\beta$ -Faltblatt-reiche Oligomere gebildet, die sich zu sogenannten Protofibrillen zusammenschließen. Durch zunehmende Aggregation kommt es zur Bildung von Fibrillen, die sich zu Amyloid-ähnlichen Strukturen zusammenlagern und schließlich zur Bildung von Lewy-Körpern führen. Dabei wird diskutiert, dass die Bildung der Fibrillen und Lewy-Körper keine toxischen Effekte zeigt, sondern dass die Protofibrillen das eigentliche toxische Agens sind. Der genaue toxische Effekt bleibt jedoch weiterhin unklar. Die pathogenetische Bedeutung der Triplikation, welche zu einer Verdopplung der  $\alpha$ -Synuklein Proteinmenge in der Zelle führt, kann in der Zunahme an Protofibrillen oder auch Fibrillen bestehen. Hierbei ist zu bemerken, dass mit zunehmendem Lebensalter die Konzentration an  $\alpha$ -Synuklein in der SNpc steigt (Li, 2004).

Mitochondriale Inhibition des Komplex I durch Rotenone oder z.B. Paraquat führt zu einem Anstieg der Aggregation und Akkumulation von  $\alpha$ -Synuklein, was auch bei anderen Formen von oxidativem Stress gezeigt werden konnte. Die protofibrillären Strukturen von  $\alpha$ -Synuklein haben die Eigenschaft, schlecht über das Proteasom abgebaut zu werden. So nimmt man an, dass eine negative Beeinflussung des Proteasom zu zellulärem Stress durch Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen führen kann (ÜA: Moore, 2005).

Bei transgener Überexpression von Wt- und mutiertem  $\alpha$ -Synuklein in Mäusen und Drosophila konnten in unterschiedlichem Maße pathologische Charakteristika der PK, wie proteinhaltige Einschlüsse und motorische Dysfunktionen beobachtet werden. Die der humanen Pathologie am ähnlichsten entsprechenden Beobachtungen wurden durch Überexpression von  $\alpha$ -Synuklein in Drosophila gemacht.

Bei diesem Organismus kam es zu altersabhängigen Verlusten an dopaminergen Neuronen, der Bildung von fibrillären intraneuronalen Inklusionen und motorischen Auffälligkeiten (Feany, 2000). Es konnte jedoch in keinem der transgenen Mausmodelle eine Pathologie der SNpc beobachtet werden.  $\alpha$ -Synuklein *knock-out* Mäuse zeigen keine Entwicklungsdefekte und keine motorischen Defekte, was für einen *toxic gain of function* bei den Mutationen des Proteins spricht. Im Rattenmodell mit transgenen  $\alpha$ -Synuklein überexprimierenden Tieren, konnten Motordysfunktionen beobachtet werden und es kam auch zur Generierung von proteinhaltigen Inklusionen, die aber in der SNpc nicht am stärksten ausgebildet waren (ÜA: Lim, 2003).

### 1.1.4.1.2 Parkin (PARK2)

Untersuchungen in japanischen Familien wiesen eine sehr seltene, juvenile Form der PK auf. Es zeigte sich, dass eine Deletion im *Parkin*-Gen für die Pathogenese der PK bei diesen Personen verantwortlich war (Kitada, 1998). In der Folge konnte gezeigt werden, dass auch bei Europäern 40% der Patienten mit familiären, früh beginnenden Formen der PK, Mutationen im *Parkin*-Gen aufweisen (Lücking, 1998). Die auftretenden Mutationen im *Parkin*-Gen umfassen dabei das komplette mögliche Spektrum an Mutationen, Punktmutationen, Deletionen und Insertionen, welche zu einem *loss of function*-Phänotyp führen (Imai, 2000; ÜA: Mata, 2004). Zwischenzeitlich wird für bestimmte Punktmutationen die Rolle einer *toxic gain of function*-Mutation im Parkin-Protein diskutiert. Hierbei wurde eine R275W-Mutation des Parkins charakterisiert, die eine Fehllokalisation und verstärkte Aggregation des Proteins bewirkt (Cookson, 2003).

Das *Parkin*-Gen hat 12 Exons und kodiert für ein 465 AS großes Protein, welches aus einer N-terminalen Ubiquitin-ähnlichen Domäne (UBL), einer zentralen Linker-Domäne und zwei C-terminalen RING-Finger-Domänen besteht, die durch eine *In-between-Ring*-Domäne (IBR) getrennt sind. Parkin hat die Funktion einer E3-Ubiquitin-Ligase und stellt damit einen wichtigen Teil des Ubiquitin-Proteasomen-Systems dar. Hierbei vermitteln die RING-Finger-Domänen die Interaktionen zwischen E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen und den Substraten von Parkin, die UBL-Domäne bewirkt eine Interaktion von Parkin mit der 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms (ÜA: Kahle, 2004). Zu den bekannten Substraten von Parkin gehören dabei eine Reihe von Proteinen (vgl. Tabelle 1.3).

Diese Substrate werden von Parkin polyubiquitiniert und über das 26S-Proteasom abgebaut.

**Tabelle 1.3:** Bekannte spezifische Substrate der E3-Ligase Parkin

Substrat	Referenz
CDCrel1	Zhang, 2000
Pael-R	Imai, 2001
Synphilin-1	Chung, 2001
$\alpha$ -glykosyliertes $\alpha$ -Synuklein	Shimura, 2001
Synaptotagmin XI	Huynh, 2003
Cyclin E	Staropoli, 2003
$\alpha$ - und $\beta$ -Tubulin	Ren, 2003
polyQ	Tsai, 2003
p38 aa-tRNA Synthetase	Corti, 2003

Durch *loss of function*-Mutationen wird die Substraterkennung, die Ubiquitinerung oder die komplette Funktion von Parkin gestört, wodurch es zu einer Akkumulation der Proteine in der Zelle kommt. Für CDCrel1 und Pael-R konnte gezeigt werden, dass eine Akkumulation bzw. Überexpression zum Zelltod in dopaminergen Neuronen führt (Dong, 2003; Imai, 2001).

Bei der Pathologie der *loss of function*-Mutationen konnte zuerst das Auftreten von Lewy-Körpern ausgeschlossen werden. Zwischenzeitlich hat man beobachtet, dass Parkin-Mutationen eine variable LK-Pathologie zeigen. Zum ersten Mal konnte bei Parkinson-Patienten mit Parkin-Mutationen eine Lewy-Körper-Pathologie im Gehirn eines betroffenen Trägers der R275W-Parkin-Mutation beobachtet werden (Farrer, 2001).

#### 1.1.4.1.3 UCH-L1 (PARK5)

In einem Kandidaten-Gen-Screening von 72 Familien mit PK wurde eine heterozygote I93M-Mutation in einer deutschen Familie im *UCH-L1*-Gen gefunden. In dieser Familie zeigte sich eine dominante Vererbung der Mutation mit inkompletter Penetranz (Leroy, 1998). Weiterhin fand man einen S18Y-Polymorphismus im *UCH-L1*-Gen, der als protektive Variante des Gens beschrieben wurde (Maraganore, 2004).

Ubiquitin-carboxyl-terminale Hydrolasen sind Proteine, die Polyubiquitin-Ketten nach der Degradation von polyubiquitinierten Proteinen wieder in einzelne Ubiquitin-Proteine aufspalten und somit das Ubiquitin nach dem Degradationsprozess wiederverwerten. Die Ubiquitin-carboxyl-terminale Hydrolase 1 (UCH-L1) ist dabei eine Neuronen-spezifische Hydrolase. Dies suggeriert eine mögliche Rolle von UCH-L1 in der Pathogenese der PK, da UCH-L1 eine direkte Auswirkung auf die Funktion des UPS haben könnte, sofern es durch einen Mangel an freiem, wiederverwerteten Ubiquitin zu einer verminderten Degradation über das 26S-Proteasom kommt.

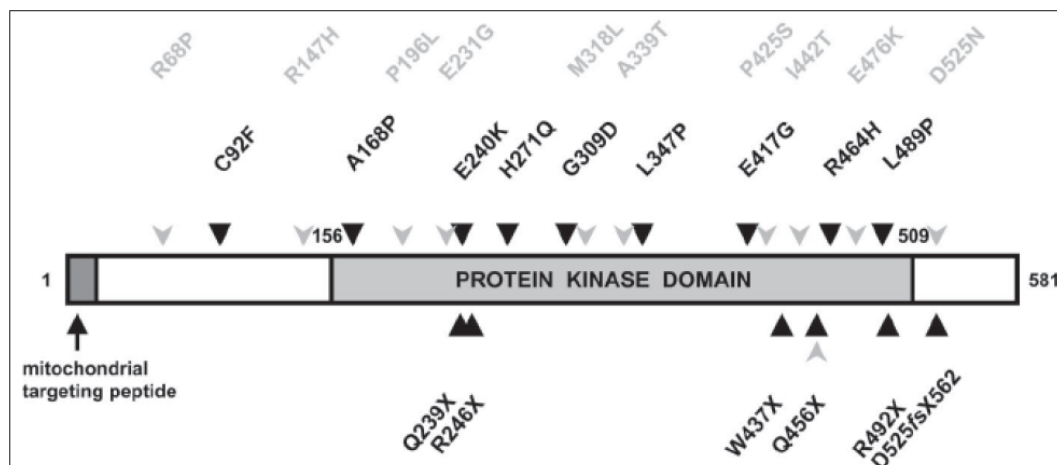
Die funktionelle Untersuchung der I93M-Mutation zeigte eine verminderte hydrolytische Aktivität, was einer *loss of function*-Mutation entspricht (Leroy, 1998). In einem Mausmodell mit einer Deletion des Maus-Homologs konnte ein neurodegenerativer Phänotyp beobachtet werden, die Mäuse zeigten Nervenzelluntergang und ein Auftreten ubiquitiniertes Proteinablagerungen (Saigoh, 1999). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass UCH-L1 auch eine Ubiquitin-Ligase-Funktion hat. Diese Ligase-Funktion scheint bei der S18Y-Variante des Proteins eine verminderte Aktivität zu haben, wodurch sich der neuroprotektive Effekt dieses Polymorphismus erklären könnte (Liu, 2002). Für die I93M-Mutation wurde gezeigt, dass sie über eine gesteigerte Ligase-Aktivität verfügt, wodurch es zu einer gesteigerten  $\alpha$ -Synuklein Akkumulation kommt (Liu, 2002). Die genauen Zusammenhänge zwischen Mutationen im *UCH-L1*-Gen und der PK müssen noch untersucht werden.



#### 1.1.4.1.4 PINK1 (PARK6)

Durch ein genomweites *Screening* in einer großen sizilianischen Familie mit vier betroffenen Patienten, die eine *early-onset*-Form des Parkinson-Syndroms zeigten und weitere Kopplungsstudien, konnte eine 12,5 cM große Region auf Chromosom 1p35-1p36 eingegrenzt werden, in der sich das *PINK1*-Gen befindet. Im *PINK1*-Gen konnten eine G309D- und eine W437OPA-Mutation gefunden werden, welche jedoch bei Parkinson-Patienten mit *early-onset*-Form nur sehr selten auftreten (Rogaeva, 2004). Zwischenzeitlich wurden 13 neue homozygot oder *compound* heterozygot auftretende Mutationen gefunden sowie 10 Mutationen, die bei betroffenen PK-Patienten als heterozygote Mutationen im *PINK1*-Gen nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 1.1.2).

PINK1 ist ein 581 AS großes Protein mit einer mitochondrialen Translokationssequenz am N-Terminus und kodiert für eine hoch konservierte Proteinkinase, ähnlich der Kinasen der Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Familie (Valente, 2004).



**Abbildung 1.1.2:** Schema des PINK1-Proteins und die Mutationen, die bisher bei PK-Patienten im PINK1-Protein beschrieben wurden (aus Bonifati, 2005). Homozygote und *compound* heterozygote PINK1-Mutationen, die bei PK-Patienten gefunden wurden, sind mit schwarzen Pfeilen, heterozygot aufgetretene Mutationen mit grauen Pfeilen dargestellt.

Die Untersuchungen des PINK1-Proteins weisen auf *loss of function*-Mutationen hin, da die identifizierten Mutationen im *PINK1*-Gen vorwiegend in der vorhergesagten Kinase-Domäne liegen (siehe Abbildung 1.1.2; Bonifati, 2005; Valente, 2004; Hatano, 2004).

Möglicherweise phosphoryliert PINK1 mitochondriale Proteine unter zellulärem Stress, um vor mitochondrialer Dysfunktion zu schützen (Valente, 2004). Für die G309D-Mutation wurde eine Verminderung der Kinaseaktivität nachgewiesen, die zu mitochondrialer Dysfunktion unter proteasomalem Stress führt (Bossy-

Wetzel, 2004; Valente, 2004). Durch Mutationen im *PINK1*-Gen konnte somit erstmals eine direkte Verbindung zwischen mitochondrialer Funktion und Homöostase und der PK gezeigt werden. Dies unterstützt frühere Beobachtungen, dass sporadische Formen der PK durch einen Funktionsverlust der Mitochondrien mitverursacht sein können.

### 1.1.4.1.5 DJ-1 (PARK7)

Mutationen im *DJ-1*-Gen konnten in zwei Stammbäumen mit rezessiver Vererbung der PK nachgewiesen werden (Bonifati, 2003). In einer niederländischen Familie wurde eine homozygote Deletion nachgewiesen, welche die Funktion des Proteins aufhebt, in einer italienischen Familie wurde eine homozygote L166P-Mutation identifiziert. Zwischenzeitlich wurden noch weitere Mutationen im *DJ-1*-Gen gefunden, homozygote M26I- und E64D-Mutationen und heterozygote A104T-, bzw. D149A-Mutationen (Hering, 2004; ÜA: Moore, 2005).

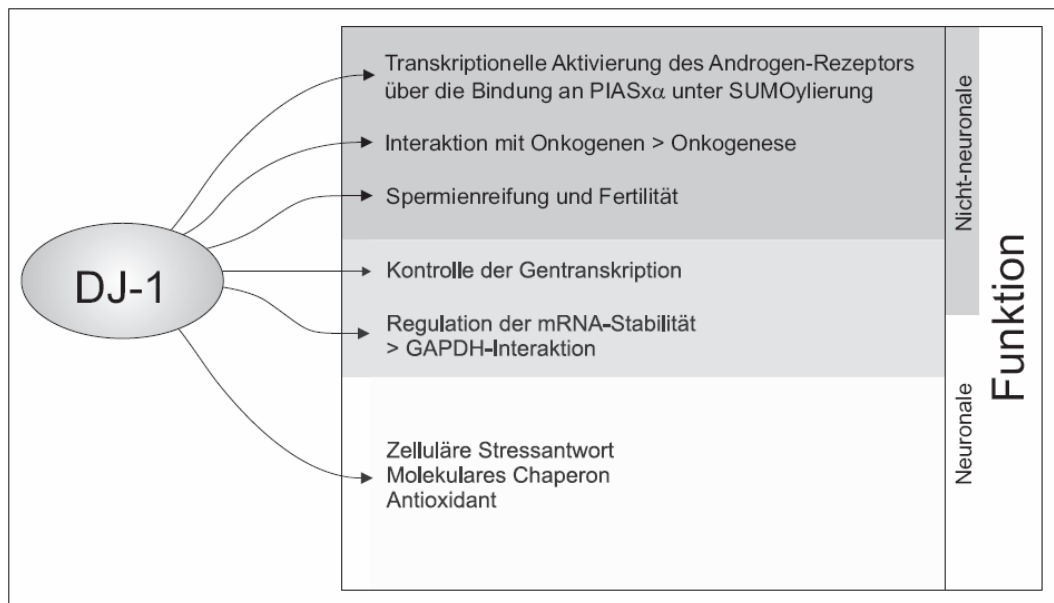
Das *DJ-1*-Gen kodiert für ein hochkonserviertes Protein, das aus 189 Aminosäuren aufgebaut ist und der DJ-1-/ThiJ-/PfpI-Superfamilie zugeordnet wird. DJ-1 wird ubiquitär exprimiert.

Funktionelle Assoziationen mit DJ-1 wurden in verschiedenen Zusammenhängen beschrieben. So gilt DJ-1 als mögliches Onkogen, da es mit dem Onkogen *c-myc* und wahrscheinlich mit dem Onkogen *ras* interagiert (Nagakubo, 1997). Weiterhin wurde DJ-1 als positiver Regulator des Androgen-Rezeptors und als Regulator der mRNA Stabilität über Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) beschrieben (Takahashi, 2001; Hod, 1999) sowie ein Zusammenhang zwischen DJ-1 und Infertilität bei Ratten gefunden (Wagenfeld, 1998). Interessanterweise wurde in nigralen Neuronen von PK-Patienten eine Translokation von GAPDH in den Nukleus beschrieben, weiterhin wurde GAPDH in Lewy-Körpern nachgewiesen (Tatton, 2000).

Die genaue pathophysiologische Funktion von DJ-1 bei der PK ist unklar. Als mögliche Funktion von DJ-1 gelten eine Chaperon-Funktion und eine mögliche Funktion als Modulator der Genexpression auf zellulären Stress. Ebenfalls wird eine Funktion von DJ-1 als Redoxsensor bei oxidativem Stress vermutet, da sich bei oxidativem Stress der isoelektrische Punkt (pI) von DJ-1 ins Saure verlagert und eine Überexpression von DJ-1 zu einer protektiven Wirkung bei oxidativem Stress führt. Bei oxidativem Stress transloziert DJ-1 ins Mitochondrium. Ein *knockdown* von physiologischen DJ-1 über siRNA führt zum Viabilitätsverlust

von SH-SY5Y-Zellen unter  $H_2O_2$ -Behandlung, wogegen die Überexpression von Wt-DJ-1 die Zellen schützt. DJ-1 wird als Radikalfänger, der reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inaktiviert, gesehen. Dabei kann es über eine Oxidation des Cysteinrestes an AS-Position 106 zur Cysteinsulfinsäure Hydrogenperoxid binden (Taira, 2004; Canet-Aviles, 2004; Mitsumoto, 2001).

Die physiologischen Funktionen von DJ-1 scheinen explizit an die Form als Homodimer des Proteins gebunden zu sein. Die L166P-Mutation von DJ-1 weist eine gestörte Homodimerisierung auf. Dies scheint zu einer schnellen proteasomalen Degradation der L166P-Monomere zu führen, was sich in einer verminderten Stabilität der L166P-Form in der Zelle ausdrückt. So fehlt der L166P-Form von DJ-1 die Fähigkeit,  $H_2O_2$ -Radikale abzubauen, wie auch die weiteren mutierten Formen von DJ-1 die Zelle anfälliger für  $H_2O_2$ -Stress machen. Die Veränderung des pI von 6.3 auf 5.3 konnte nur für Wt-DJ-1 gezeigt werden, mutierte Formen weisen keine Veränderung des pI auf (Taira, 2004).



**Abbildung 1.1.3:** Die unterschiedlichen Funktionen von DJ-1 und die mögliche Beteiligung an neuronalen Funktionen, welche sich auf die Pathogenese der PK auswirken können (siehe Text).

Interessanterweise konnte eine Interaktion mit einem bereits identifizierten Parkinson-Gen, Parkin, gezeigt werden. Parkin stabilisiert die mutierten Formen von DJ-1 in der Zelle, so dass diese nicht mehr über das Proteasom abgebaut werden können und als unlösliche Fraktionen in der Zelle vorliegen (Moore, 2005). Die M26I-Mutation sowie die heterozygoten Mutationen weisen eine verminderte Homodimerisierung auf (Moore, 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass unter oxidativem Stress eine Interaktion von Parkin und Wt-DJ-1 besteht.

Wt-DJ-1, respektive die mutierten Formen von DJ-1, werden von Parkin jedoch nicht polyubiquitiniert, trotzdem führt die Hemmung des Proteasoms mit MG132 zu einer Akkumulation von DJ-1 (Moore, 2005).

### 1.1.4.1.6 LRRK2 (PARK8)

Das *LRRK2*-Gen (*leucine-rich repeat kinase 2*) stellt das aktuellste Gen dar, welches bei erblichen Formen der PK identifiziert wurde. Durch Gen-Kartierung in mehreren Familien konnte der ursprüngliche durch Kopplungsanalysen definierte Genort von PARK8 weiter eingegrenzt werden (Funayama, 2002; Zimprich, 2004). Durch Sequenzierungen von Kandidatengen wurden Mutationen im *LRRK2*-Gen gefunden, die die PK verursachen. Es wurden vier *Missense*-Mutationen (Y1699C, R1441C, I1122V, I2020T) und ein Basenaustausch nahe einem Exon/Intron-Übergang (L1114L, 3342 A>G) gefunden (Zimprich, 2004). Weitere Untersuchungen weisen auf die Bedeutung von Mutationen im *LRRK2*-Gen, sowohl bei familiären als auch sporadischen Parkinson-Patienten hin (Toft, 2005). Funktion und Lokalisation von LRRK2 sind noch unbekannt. LRRK2 liegt genomisch als 144 kb großes Gen mit 51 Exons vor und kodiert für ein 2527 AS großes Protein, das zur ROCO-Genfamilie zählt.

### 1.1.4.2 Suszeptibilitätsgene der Parkinson-Krankheit

Suszeptibilitätsgene sind Gene, bei denen Mutationen in der DNA von PK-Patienten gefunden wurden und die vermutlich eine Rolle als genetische Ursache der Erkrankung spielen können. Dabei konnten diese Gene nicht durch die Untersuchung von großen Familien, sondern durch die Untersuchung von großen Gruppen definiert werden. Eine Beteiligung in der Pathogenese der PK wurde jedoch durch Mutationsanalysen und funktionelle Charakterisierung bestätigt. Hier sollen zwei Beispiele angeführt werden:

#### 1.1.4.2.1 Synphilin-1

Bei der Suche nach Interaktionspartnern von  $\alpha$ -Synuklein wurde Synphilin-1 identifiziert (Engelender, 1999). Synphilin-1 ist ein 919 AS großes Protein mit sechs Ankyrin-ähnlichen Domänen, einer *coiled-coil*-Domäne und einem ATP/GTP-Binde-Motiv. Ankyrin-ähnliche Domänen und *coiled-coil*-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, was einen Hinweis auf die Bedeutung von Synphilin-1 im Zellmetabolismus geben kann. Synphilin-1 zeigt eine sehr hohe Homologie in diesen Domänen. Zwischenzeitlich konnten Interaktionen von Synphilin-1 mit Parkin, SIAH-1, SIAH-2 und Dorfín gezeigt werden. Dabei wird

Synphilin-1 von den Ubiquitin-E3-Ligasen Parkin, SIAH-1, SIAH-2 und Dorfin ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut (ÜA: Krüger, 2004). Die Interaktion von Synphilin-1 und  $\alpha$ -Synuklein kann zu zytosolischen Inklusionen führen, welche von Parkin ubiquitiniert werden (ÜA: von Bohlen und Halbach, 2004). Diese Interaktionen mit Proteinen des UPS weisen auf eine mögliche Rolle von Synphilin-1 in der Pathogenese der PK hin. Ein weiterer Hinweis liegt in der Lokalisation des *Synphilin-1*-Gens, welches beim Menschen auf Chromosom 5q23.1-23.3 lokalisiert ist. Durch Kopplungsanalysen konnte eine Verbindung dieses Genabschnittes mit dem Parkinson-Syndrom gezeigt werden (ÜA: Krüger, 2004). Als erste Bestätigung von Synphilin-1 als Parkinson-Suszeptibilitätsgen kann eine R621C-Mutation im Synphilin-1-Protein gelten (Marx, 2003). So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von R621C-Synphilin-1 Zellen anfälliger für zellulären Stress macht als Wt-Synphilin-1 (Marx, 2003). Weiterhin weisen Zellen, die R621C-Synphilin-1 überexprimieren einen geringeren Anteil an Aggresomen-ähnlichen Einschlüssen auf, als solche die den Wt überexprimieren. Dabei wird angenommen, dass die Bildung von Aggresomen die Zelle schützt und die Vorläuferstrukturen (Protofibrillen) die Zelle schädigen (Marx, 2003; ÜA: Krüger, 2004).

#### **1.1.4.2.2 Nurr1**

Nurr1, oder auch NR4A2, ist ein Transkriptionsfaktor der *nuclear receptor*-Familie. Im *Nurr1*-Gen, welches auf Chromosom 2q22-23 lokalisiert ist, wurden in einer Studie zwei Mutationen in Exon 1, einem nicht-kodierenden Exon, nachgewiesen. Die beiden Mutationen (-291Tdel und -245T→G) konnten bei 10 Personen mit familiärem Parkinson, nicht jedoch bei sporadischen Fällen oder Kontrollen nachgewiesen werden und wirken sich negativ auf die Expression von Nurr1 aus (Le, 2003).

Nurr1 wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert und spielt in der embryonalen Entwicklung, bei der Differenzierung der dopaminergen Neurone, wie auch im adulten Metabolismus eine wichtige Rolle. So sterben Nurr1 *knock-out* Mäuse kurz nach der Geburt, was sich auf Funktionsverluste des respiratorischen Apparates zurückführen lässt. Weiterhin stellt Nurr1 einen wichtigen Faktor in der Entwicklung dopaminergener Neurone dar, da in Nurr1 *knock-out* Mäusen keine neuronalen DA-Marker nachweisbar sind (Perlmann, 2004). Die Dopamin-synthetisierenden Proteine TH (*tyrosine hydroxylase*) und

AADC (*aromatic amino acid decarboxylase*) werden durch Nurr1 reguliert. So hat eine altersbedingte Abnahme an Nurr1 auch einen Rückgang an TH in der SNpc zur Folge (Perlmann, 2004). Weitere Hinweise auf eine Bedeutung von Nurr-1 in adulten Neuronen zeigen heterozygote Nurr1 Mäuse, welche verstärkt auf die Komplex I-Inhibition von MPTP ansprechen (Perlmann, 2004).

### **1.1.4.3 Umwelt und Stressfaktoren**

Neben der Identifikation von Genen, welche durch Mutationen zu familiären Formen der PK führen können, ist für die Mehrzahl der sporadischen Patienten noch nicht klar, welche Faktoren zur Degeneration der dopamingeren Neurone in der SNpc beitragen. Durch Tiermodelle und die Rückschlüsse auf die Funktionen der bekannten Gene sind jedoch mehrere Modelle, die zur Degeneration der Neurone in der SNpc führen, in Diskussion.

#### **1.1.4.3.1 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress**

Oxidativer Stress kann durch mitochondriale Dysfunktion und erhöhten Dopaminmetabolismus in dopaminergen Neuronen entstehen. Dabei kommt es zur Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und anderen ROS (*reactive oxygen species*), die durch ihre Hydroxylradikale mit Stickoxiden zur Bildung von Peroxynitrit führen können. ROS und Peroxynitrite sind toxische Moleküle für die Zelle, da sie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide durch ihre Reaktivität schädigen können. Durch ROS kann der Gehalt an fehlgefalteten Proteinen in der Zelle stark zunehmen, wodurch das UPS vermehrt Proteine degradieren muss und die Bildung von Proteinaggregaten zunehmen kann. Ein toxischer Marker für oxidativen Stress konnte in der SNpc von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (ÜA: Dauer, 2003). Nahezu 95% des molekularen Sauerstoffs werden von der Atmungskette in der dopaminergen Zelle verbraucht, wodurch in den Mitochondrien ein hoher Anteil an ROS entsteht (Tritschler, 1994). Bei Schädigung oder Inhibition des Komplex I der Atmungskette kommt es zu einem Anstieg von Superoxidradikalen. Bislang konnte bei Parkinson-Patienten noch kein krankheitsrelevantes Gen gefunden werden, das für ein Protein der Atmungskette kodiert. Die selektive Beeinflussung der Atmungskette durch Toxine wie Paraquat (vgl. 1.1.4.1.1) zeigt jedoch die stark erhöhte Anfälligkeit dopaminerger Neurone in der SNpc für Komplex I-Dysfunktionen. So konnte auch gezeigt werden, dass in zytoplasmatischen Hybridzellen – Zellen, die den Zellkern von gesunden Personen tragen und das Zytoplasma und die Mitochondrien von Parkinson-Patienten enthalten – die mitochondriale Funktion und

der Energiemetabolismus der Atmungskette erniedrigt sind (Swerdlow, 1996; Swerdlow, 1998).

Für dopaminerge Neurone gilt weiterhin, dass der Dopamin-Metabolismus Hydrogenperoxid und Superoxidradikale erzeugt und die Autooxidation von Dopamin zu Dopamin-Quinone positiv beeinflusst. Dopamin-Quinone ist ein Molekül, welches Cysteinreste von Proteinen schädigt. Energiedefizite in den Mitochondrien können die vesikuläre Speicherung von Dopamin negativ beeinflussen, da diese ATP-abhängig ist. Dies wiederum führt zu einem Anstieg von freiem Dopamin im Zytosol, was zu einer erhöhten Schädigung der Zelle durch autooxidierte Dopamin-Derivate führen kann. Hieraus wird ersichtlich, wie wichtig ein Gleichgewicht bezüglich der mitochondrialen Funktion und dem Abbau von ROS in der Zelle ist, da eine leichte Beeinflussung zu einer sich aufschaukelnden Bildung von ROS führen kann, welche die Zelle schädigen kann. Durch Energieverlust in der Zelle, welcher über mitochondriale Dysfunktion ausgelöst wird, wird auch das UPS negativ beeinflusst, da der Proteinabbau über das Proteasom ATP-abhängig ist.

#### **1.1.4.3.2 Einflüsse des Ubiquitin-Proteasomen-Systems**

Die Erkenntnisse durch genetische Ursachen der PK, Mutationen in  $\alpha$ -Synuklein, Parkin, Synphilin-1 und UCH-L1, weisen auf eine zentrale Stellung des UPS in der Pathogenese der PK hin. Inwieweit dies auch bei sporadischen Fällen der Parkinson-Erkrankung zutrifft, ist nicht geklärt. Durch die Aggregation fehlgefalteter Proteine kann die Ursache bereits vor der Degradation von Proteinen über das UPS entstehen, nämlich in der Entstehung von Proteinaggregaten, die nicht mehr über das Proteasom abgebaut werden können. So etwa durch eine erniedrigte Chaperon-Aktivität, die zu einer Zunahme von zellulärem Stress durch fehlgefaltete Proteine führt. In Untersuchungen führte die Überexpression von Chaperonen zu einer Abnahme an pathologischen Merkmalen der Neurodegeneration. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TorsinA – ein Protein mit Chaperon-Aktivität – zur Verminderung von  $\alpha$ -Synuklein-Aggregaten in der Zellkultur führt (McLean, 2002). Andererseits führt die Inhibition des UPS im Tiermodell zu einer Zunahme der Neurodegeneration des nigrostriatalen Systems und zur Bildung LK-ähnlicher Inklusionen, welche  $\alpha$ -Synuklein und Ubiquitin enthalten (McNaught, 2004). So konnte auch gezeigt werden, dass in der SNpc von sporadischen PK-Patienten die Alpha-Untereinheiten des 26S/20S-

Proteasoms in dopaminergen Neuronen fehlen und somit die enzymatische Aktivität des Proteasoms gestört ist (McNaught, 2003).

Die enge Verzahnung von den inhibitorischen Effekten auf das UPS mit der Bildung von proteolytischem Stress und mitochondrialer Dysfunktion zeigt auch das Schema in Abbildung 1.1.4, in dem die genetischen und die möglichen Faktoren durch Umwelteinflüsse dargestellt sind.

### 1.1.4.3.3 Umwelteinflüsse und Gifteinwirkungen

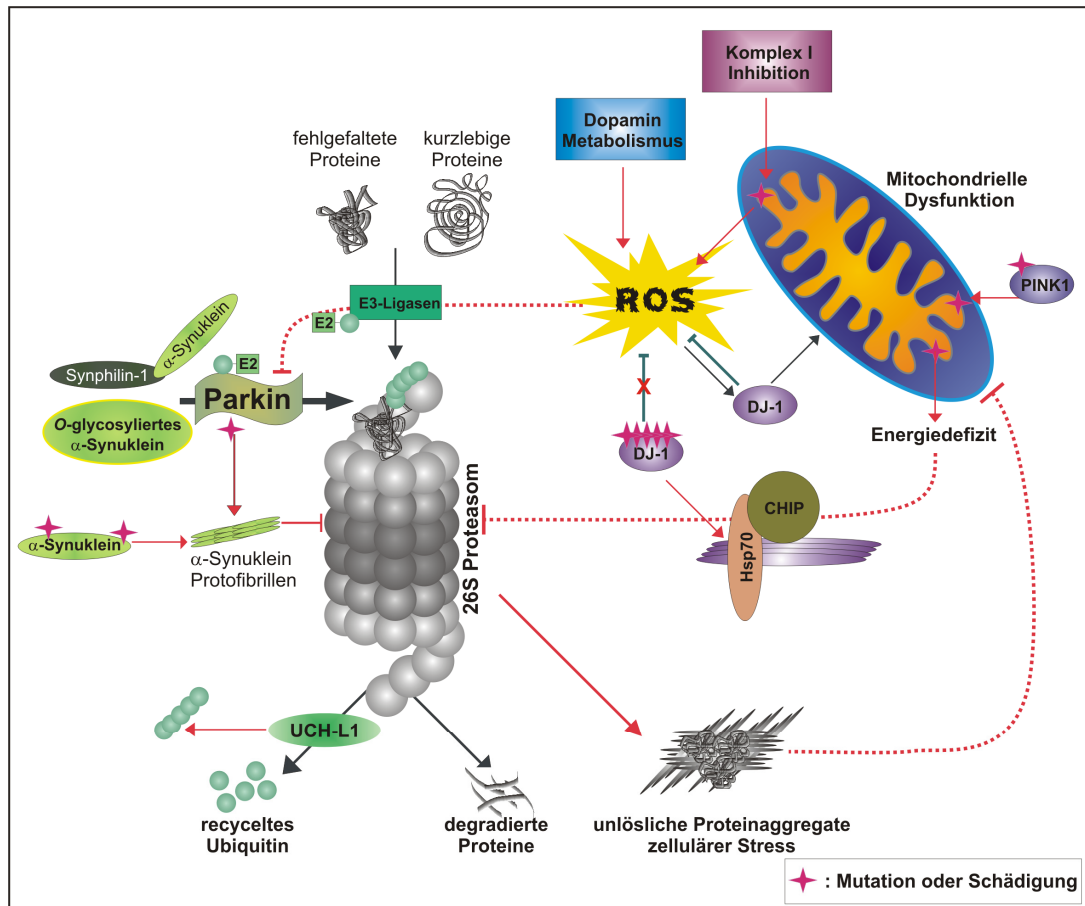
Einen weiteren Zusammenhang von UPS- und mitochondrialer Dysfunktion mit dem Untergang der dopaminergen Neurone in der SNpc ergibt sich aus Untersuchungen von Toxinen im Tiermodell. Diese Toxine inhibieren die mitochondrialen Komplexe der Atmungskette, wobei die Komplex I-Inhibition durch Toxine wie 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), Rotenone, Paraquat und 6-Hydroxy-Dopamine (6-OHDA) die häufigsten Modelle darstellen. Der Komplex II kann durch 3-Nitropropionsäure und Komplex III durch das Dithiocarbamat „*maneb*“ inhibiert werden. Hier soll auf die Komplex I-Inhibitoren eingegangen werden.

Da Rotenon und Paraquat als Insektizid bzw. Herbizid eingesetzt wurden, ist eine Beteiligung dieser Substanzen in einigen sporadischen Fällen der PK als Umweltfaktor durchaus denkbar. Als ein experimentelles Modell gilt das MPTP-Modell in Mäusen, Ratten und Primaten, da MPTP nach Intoxikation eine Parkinson-ähnliche Symptomatik hervorruft. In den frühen 80er Jahren kam es in den USA zum Auftreten Parkinson-ähnlicher Symptome bei jungen Drogenabhängigen. Hierbei stellte sich heraus, dass die eigentliche Droge mit MPTP verunreinigt war (Langston, 1983). Bei diesen Patienten, wie auch im MPTP-Primatenmodell, zeigt sich ein Ansprechen auf die Therapie mit Levodopa und Parallelen zum Morbus Parkinson.

MPTP kann die Blut-Hirnschranke passieren und wird durch Monoaminoxidase B in Glia-Zellen zu MPDP umgesetzt. Durch einen noch nicht bekannten Mechanismus wird das MPDP zu einem 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion ( $MPP^+$ ) umgewandelt und in den Extrazellulärraum freigesetzt. Von dort wird das  $MPP^+$  über den Dopamin-Transporter selektiv in dopaminerge Neurone aufgenommen und angereichert. In den dopaminergen Neuronen kann  $MPP^+$  in Vesikeln, im Zytosol und in den Mitochondrien angereichert werden. Die vesikuläre Anreicherung schädigt die Zelle dabei nicht. Im Zytosol kann  $MPP^+$  mit zytosolischen Proteinen



interagieren, den Haupteffekt zeigt  $MPP^+$  jedoch in den Mitochondrien. In den Mitochondrien beeinträchtigt das  $MPP^+$  die oxidative Phosphorylierung durch Inhibition des Komplex I, was zum einen zu einem Energieverlust in der Zelle führt, zum anderen zu Bildung von ROS und oxidativem Stress führt. Die selektive Wirkung auf dopaminerge Neurone erklärt sich durch den notwendigen Transport von  $MPP^+$  durch den Dopamin-Transporter (DAT), da in DAT *knock-out* Mäusen eine MPTP-Resistenz gezeigt wurde (Bezard, 1999).



**Abbildung 1.1.4:** Schematische Übersicht über mögliche Mechanismen der Neurodegeneration bei der PK. Die nach neuen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse eines Zusammenspiels zwischen UPS und mitochondrialer Dysfunktion sind dargestellt. Welche Rolle Mutationen im *LRRK2*-Gen spielen, ist noch ungeklärt.

Zusammenfassend zeigen dopaminerge Neurone der SNpc eine erhöhte Vulnerabilität für oxidativen und proteasomalen Stress. Durch Toxin-Modelle ist eine gute Möglichkeit zur Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen gegeben. Bis heute ist jedoch noch nicht klar, auf welchem Wege es zur eigentlichen Degeneration der Neurone kommt.

## **1.2 Mechanismen des Zelltods**

Es existieren unterschiedliche Mechanismen des Zelltodes, die alle einen möglichen Einfluss auf den Untergang der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* haben können. Hierbei werden Formen des programmierten Zelltods (*programmed cell death*, PCD) sowie Nekrose und Autophagie diskutiert. Der programmierte Zelltod (PCD) wird dabei in den Caspase-abhängigen (Apoptose) und den Caspase-unabhängigen Weg unterteilt.

Es konnte gezeigt werden, dass Neurone der SNpc von PK-Patienten Zeichen der Apoptose und der autophagischen Degeneration aufweisen, weiterhin wurden Neurone beobachtet, die nur apoptotische Merkmale aufwiesen (ÜA: von Bohlen und Halbach, 2004). Im Folgenden werden die verschiedenen Mechanismen, die zur Degeneration der Neurone führen können, vorgestellt.

### **1.2.1 Apoptose**

Die Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus in der Entwicklung und in der Homöostase von Organismen. Störungen der apoptotischen Funktion führen bei Formen der geschwächten Apoptose zu Krebs und Autoimmunkrankheiten, bei erhöhter apoptotischer Wirkung z.B. zu neurodegenerativen Erkrankungen.

Die Apoptose ist eine energieabhängige Form des Zelltods und zeigt morphologische Eigenschaften, die sie von der Nekrose unterscheidet. Typische apoptotische Merkmale sind das Verkleinern und Abrunden der Zelle, eine Bläschenbildung der Zellmembran (*blebbing*), eine Kondensation des Chromatins und das Auftreten von *apoptotic bodies*. Die *apoptotic bodies* werden von Makrophagen aufgenommen und abgebaut, ohne dass es zu einer entzündlichen Reaktion im benachbarten Gewebe kommt.

Die Einleitung in die Apoptose kann dabei durch extrazelluläre Signalwege (extrinsischer Weg) oder durch intrazelluläre Signale (intrinsischer Weg) geschehen.

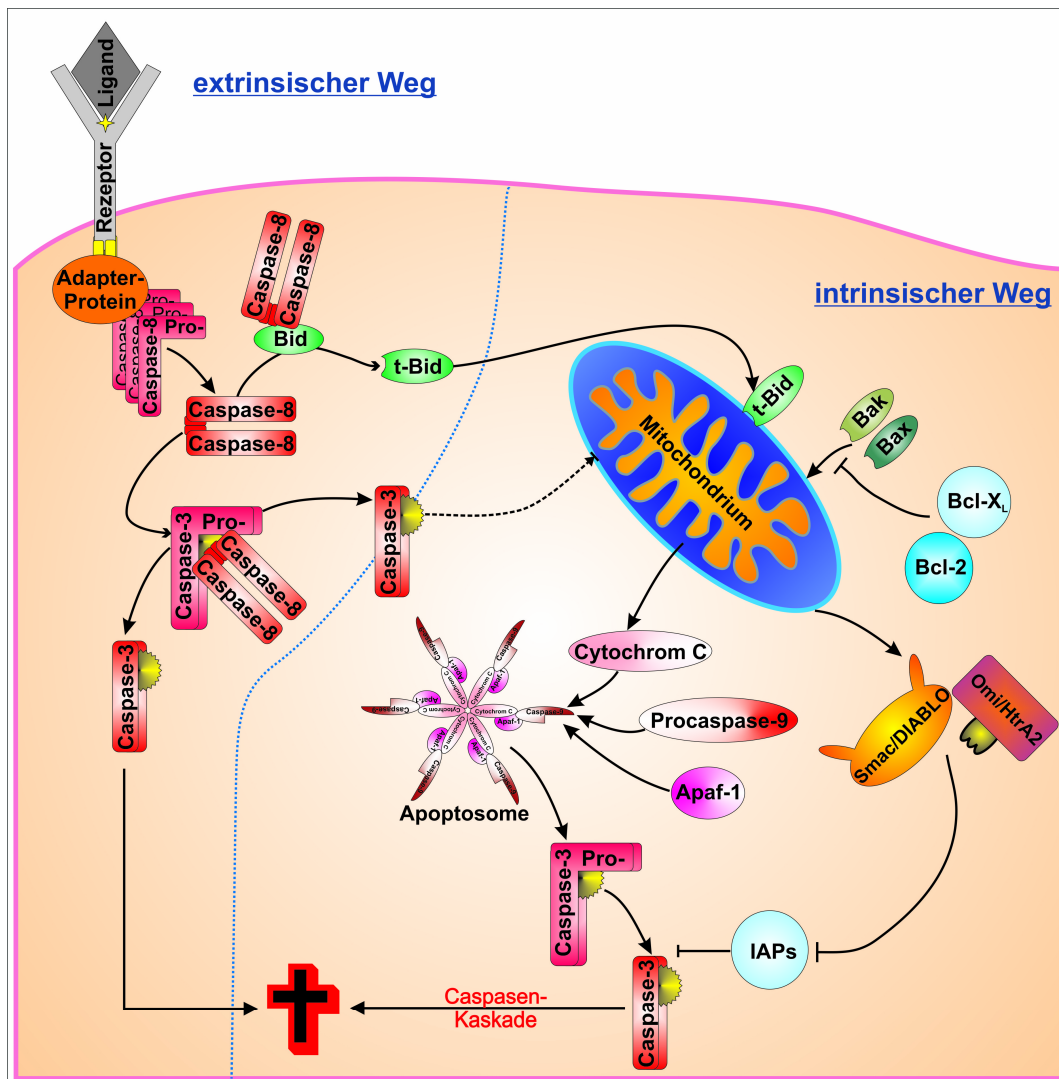
Beim extrinsischen Weg wird über die Ligandenbindung an einen Rezeptor (*death receptor*) die Apoptose eingeleitet. Dies geschieht dabei hauptsächlich und geregelt in der Entwicklung, um überflüssige Zellen abzubauen. Hierbei bildet sich nach der Ligandenbindung ein *DISC* (*death-inducing signaling complex*), der aus dem Rezeptor, einem Adapter-Protein und einer Procaspase (Procaspase-8 oder -10) besteht. In diesem Komplex kommt es zur Akkumulation von

Procaspase-8 oder -10, wodurch die Aktivierung zur Caspase vollzogen wird. Aktivierte Caspase-8/-10 kann direkt zur Aktivierung der Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3) führen. Caspase-8 spaltet auch das proapoptotische Signalprotein Bid zu tBid, was zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges führt. Eine alternative Aktivierung mitochondrialen Apoptoseweges ist durch Caspase-3 möglich.

Beim intrinsischen Weg kommt es durch intrazelluläre Signale zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Hierdurch werden mitochondrial lokalisierte pro-apoptotische Faktoren freigesetzt, die eine Signal- und Aktivierungskaskade auslösen. Das mitochondriale Protein Cytochrom C interagiert mit Apaf-1 und Procaspase-9, um einen hochmolekularen Komplex, das Apoptosom, zu bilden. Durch die somit aktivierte Caspase-9 werden die Effektorcaspasen aktiviert, welche die zellulären Kompartimente abbauen.

Um die Mechanismen der apoptotischen Aktivierung zu steuern, existieren zelluläre Regelkreise, die eine 'versehentliche' Aktivierung verhindern. Hierzu zählen die anti-apoptotischen IAP-Proteine, welche die Caspasen durch Bindung blockieren können. Die IAP-Proteine wiederum können durch die mitochondrialen Proteine Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 inaktiviert werden. Weiterhin sind die Signalwege des intrinsischen Weges durch die Bcl-Protein-Familie reguliert, die pro- sowie anti-apoptotische Proteine beinhaltet, welche sich durch ihre BH-Domänen regulieren. Störungen dieser Proteine können zu verstärkter oder verminderter Apoptose in Zellen führen. Eine vereinfachte Übersicht über die beiden Apoptose-Wege ist in Abbildung 1.2.1 gegeben.

Als intrinsische Signale zur Aktivierung der Apoptose zählen intrazelluläre Stresssignale, mitochondriale Schädigungen und DNA-Schädigungen, welche durch ionisierende Strahlung, Umweltgifte oder Ähnliches ausgelöst werden.



**Abbildung 1.2.1:** Vereinfachtes Schema der Apoptose mit extrinsischem Weg, über die Aktivierung eines Liganden mit Caspase-8 als Initiator-Caspase, welche Caspase-3 aktiviert. Weiterhin kann Caspase-8 über die Trunkierung von Bid zu t-Bid oder auch durch Caspase-3, die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran bewirken, was den intrinsischen Apoptose-Weg aktiviert. Hierbei werden aus dem Mitochondrium Cytochrom C und andere pro-apoptotische Proteine freigesetzt. Durch Cytochrom C kommt es zur Assemblierung des Apoptosoms und zur Aktivierung von Effektorcaspasen (hier schematisch Caspase-3). Durch die Freisetzung von Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 werden die IAPs inhibiert, wodurch die Caspase-Aktivierung verstärkt wird (abgewandelt nach Hengartner, 2000 und Boatright, 2003).

### **1.2.2 Nekrose**

Die Nekrose von Zellen kann durch außergewöhnliche Umstände ihrer physiologischen Umgebung, direkte Verletzungen, Temperaturwechsel und Energie-depletion auftreten. Dabei zeigt die Nekrose keine Abfolge bestimmter Ereignisse und wird auch nicht als programmierter Zelltod angesehen.

Nekrotische Zellen unterscheiden sich morphologisch von apoptotischen Zellen und zeigen unter anderem eine starke Schwellung der Zelle, das Auftreten von Vakuolen und eine Freisetzung der intrazellulären Bestandteile in die Umgebung der Zelle durch massive Brüche der Plasmamembran. Durch den Austritt der zellulären Bestandteile in die Umgebung der Zelle kommt es zu einer Immunreaktion im benachbarten Gewebe der nekrotischen Zelle und damit zu einer entzündlichen Reaktion, welche für die Nekrose charakteristisch ist.

### **1.2.3 Weitere Möglichkeiten des Zelltods**

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass es weitere Formen des Zelltods gibt. Hierbei wird angenommen, dass es sich dabei um eine Form des geregelten, also des programmierten Zelltods, handelt, welcher sich von der Apoptose unterscheidet.

So konnte gezeigt werden, dass in Gliomazellen die Behandlung mit Arsenitrioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) zu einem Proliferationsstopp führt, der bei Verabreichung von Caspase-Inhibitoren nicht verhindert wird. Auf ultrastruktureller Ebene zeigen diese Zellen Eigenschaften der Autophagie. Der Autophagie-Inhibitor Bafilomycin A1 inhibiert den toxischen Effekt von  $\text{As}_2\text{O}_3$  auf diese Zellen (ÜA: Assunção Guimarães, 2004). In Endothelzellen kommt es durch Endostatin zum Auftreten autophagischer Merkmale und zum Zelltod, welcher sich nicht durch Caspase-Inhibitoren und Antioxidazien inhibieren lässt. Der Zelltod dieser Zellen kann jedoch durch den Autophagie-Inhibitor 3-Methyladenine inhibiert werden (ÜA: Assunção Guimarães, 2004). Weitere Hinweise in diesem Übersichtsartikel sprechen für die Existenz eines programmierten Zelltods, welcher sich von der Apoptose unterscheidet und durch Merkmale der Autophagie bestimmt ist.

Durch Autophagie werden normalerweise Bestandteile des Zytoplasmas und Zellorganellen während des normalen Zellzyklus einer Zelle abgebaut. Einen kompletten Abbau der Zelle durch Autophagie zeigt sich durch ein verstärktes Auftreten von Autophagosomen und Lysosomen, welche durch Fusion zum

Autophagolysosom werden, in dem die eingeschlossenen Bestandteile abgebaut werden. Dabei wird beim autophagischen Zelltod die Zellmembran erst sehr spät abgebaut, ohne dass es zur Schädigung benachbarter Zellen kommt. Die ATP-Synthese der Mitochondrien scheint soweit aufrechterhalten zu werden, bis das Energielevel ausreichend ist, um den autophagischen Tod und die Degradation der Zelle komplett abzuschließen (Bursch, 2001).

Morphologisch zeichnet sich der autophagische Zelltod vor allem durch das Auftreten von kleinen Vakuolen aus, welche später zu größeren Vakuolen fusionieren können. Die Mitochondrien sind erweitert, das endoplasmatische Retikulum kann vergrößert sein und es kann zur Bläschenbildung der Plasmamembran kommen, was mehr ein Zeichen der Apoptose ist.

Ultrastrukturell zeigt der Zelltod durch Autophagie, vor allem durch den Wegfall vieler zytoplasmatischer Komponenten, einen Rückgang der Elektronendichte, wodurch die Zellen im EM weniger kontrastreich erscheinen.

Darüberhinaus ist auch ein Caspase-unabhängiger Zelltod mit Nekrose-ähnlicher Morphologie beschrieben, welcher durch unterschiedliche Rezeptoren und regulierende Proteine der Apoptose ausgelöst werden kann (ÜA: Assunção Guimarães, 2004).

Weiterhin ist bekannt, dass durch Proteine der Bcl-2-Familie eine Caspase-unabhängige Form des Zelltods durch mitochondriale Faktoren ausgelöst werden kann. Hierzu zählen die Freisetzung von AIF, EndoG und Omi/HtrA2 aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Dabei wird die Mitochondrienmembran durch porenformende BH3-only-Proteine, bzw. die Proteine Bax und Bak, für diese Faktoren permeabel, ohne dass es zu diesem Zeitpunkt zur Freisetzung von Cytochrom C und der Aktivierung der Caspasen-Kaskade kommt. Omi/HtrA2 kann durch die Serin-Proteasefunktion Substrate spalten, ohne dass dabei eine erhöhte Caspase-Aktivität in den Zellen vorliegt (vgl. 1.3.2). Nach Freisetzung von AIF (*apoptosis inducing factor*) und EndoG gelangen diese Proteine in den Zellkern und führen zu einer Fragmentation der DNA (Lindholm, 2004; van Loo, 2002).

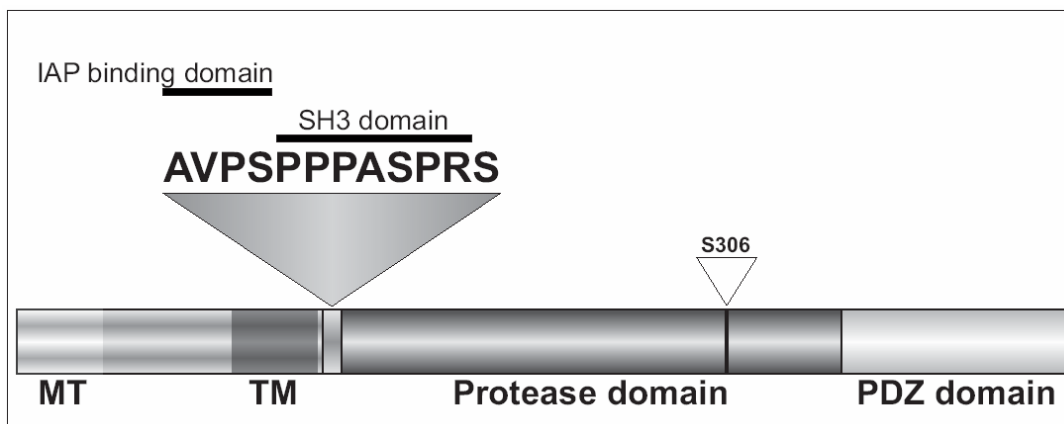
## 1.3 Omi/HtrA2

### 1.3.1 Biochemische Eigenschaften von Omi/HtrA2

Omi/HtrA2 wurde erstmals als Presenilin-1- und Mxi2-interagierendes Protein in *Yeast-two-Hybrid Screens* beschrieben (Gray, 2000; Faccio, 2000). Das Gen für Omi/HtrA2 ist auf Chromosom 2p13 lokalisiert und besitzt acht Exons, die für ein 458 Aminosäuren großes Protein kodieren, welches ubiquitär exprimiert wird (Gray, 2000). Es besitzt eine Sequenzhomologie zu bakteriellem HtrA (*high temperature requirement protein A*), welches ein Hitzeschockprotein mit Chaperon- und Proteasefunktion ist, wobei die jeweilige Funktion bei HtrA temperaturabhängig ist. Von den Erstbeschreibern wurde eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (Faccio, 2000) und im Zellkern (Gray, 2000) beschrieben. Die primäre Lokalisation von Omi/HtrA2 wurde letztlich in den Mitochondrien beschrieben, wobei das Protein nach proapoptischen Stimuli aus den Mitochondrien in das Zytoplasma entlassen wird (Suzuki, 2001). Die Lokalisation in den Mitochondrien wird im Intermembranraum gesehen (Hedge, 2002). In den Mitochondrien wird der N-terminale Teil des Proteins autoproteolytisch prozessiert, wobei vom Gesamtprotein (*precursor-Form*) die ersten 133 AS abgespalten werden und das aktive Omi/HtrA2 (*mature-Form*) resultiert. In den ersten 133 AS finden sich die mitochondriale Translokationssequenz und die Transmembran-Domäne. Das prozessierte, aktive Protein beginnt mit einer AVPS-Sequenz, die durch das sogenannte RGH-Motif der IAP-Binde-Proteine wie Reaper, Grim oder Hid aus *Drosophila melanogaster* bekannt ist (Verhagen, 2002). Auf die IAP-Binde-Domäne folgt eine SH3-Domäne. Die aktive Domäne ist die Protease-Domäne, die an Aminosäureposition 306 ein Serin mit katalytischer Aktivität besitzt. Dieser aktiven Domäne folgt eine PDZ-Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen von Omi/HtrA2 ermöglicht (Übersicht in Abbildung 1.3.1).

Nach der Freisetzung aus den Mitochondrien kann Omi/HtrA2 über seine IAP-Binde-Domäne an die BIR2- und BIR3-Domänen von IAP-Proteinen binden und somit die Aktivierung der Caspase-Kaskade und speziell der Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) beschleunigen. Dabei besitzt Omi/HtrA2 eine höhere Spezifität zu BIR2-Domänen als zu BIR3-Domänen (Verhagen, 2002).

Omi/HtrA2 konkurriert über die IAP-Domäne mit den BIR-Domänen der IAP-Proteine, welche normalerweise an Caspasen binden, um sie zu inhibieren. Die Eigenschaft von Omi/HtrA2 eine katalytisch aktive Proteasedomäne zu besitzen führt bei der Interaktion mit IAPs nicht nur zur Konkurrenz um die BIR-Domänen und damit zur Freisetzung der Caspasen, sondern kann auch die Spaltung der Substrate bewirken (Yang, 2003). Damit stellt Omi/HtrA2 den zweiten bekannten Antagonisten der IAPs bei Säugern dar, wobei die IAP-Inhibition von Omi/HtrA2 im Gegensatz zu Smac/Diablo nicht reversibel sein muß.



**Abbildung 1.3.1:** Aufbau des Omi/HtrA2-Proteins. Die ersten 133 Aminosäuren prägen die *precursor*-Form, welche in den Mitochondrien prozessiert wird und aus der die *mature*-Form hervorgeht. In der *precursor*-Form befinden sich eine mitochondriale Translokationssequenz und eine Transmembran-Domäne (AS 105-121). Die aktive Form des Proteins beginnt mit einer IAP-Binde-Domäne, an die sich eine SH3-Domäne anschließt. Hierauf folgt eine Protease-Domäne (AS 182-330), die ihre katalytische Stelle an S306 besitzt und der eine PDZ-Domäne (AS 390-445) angeschlossen ist (Faccio, 2000).

Das proteolytisch aktive Protein liegt dabei als Homotrimer vor, wobei die aktive Proteasestelle durch einen pyramidalen Aufbau der drei Homotrimere abgeschirmt ist. Bei Substratbindung an die IAP-Binde-Domäne oder die PDZ-Domäne wird die Protease-Domäne freigelegt und somit aktiv.

### 1.3.2 Die Rolle von Omi/HtrA2 beim Zelltod

Während der Apoptose wird Omi/HtrA2 wie Smac/Diablo aus dem Inter-membranraum der Mitochondrien in das Zytosol entlassen. Die aktive Form des Proteins bindet dann an die BIR-Domänen der IAP-Proteine und spaltet diese, zumindest teilweise irreversibel, von den Caspasen ab. Die hauptsächlichen Substrate von Omi/HtrA2 sind dabei IAPs mit BIR2-Domänen, wobei cIAP1 das Hauptsubstrat von Omi/HtrA2 ist (Yang, 2003). Dabei werden über die AVPS-



Sequenz nur BIR-Domänen beinhaltende Proteine von Omi/HtrA2 als Substrate akzeptiert (Yang, 2003). Durch die Interaktion und zumindest für die für cIAP1 gezeigte Degradation kann Omi/HtrA2 durch IAP-inhibierte Caspasen freisetzen und die Zelle damit in die Apoptose führen bzw. die Apoptose beschleunigen. Durch diesen Mechanismus spielt Omi/HtrA2 im Caspase-abhängigen Zelltod eine entscheidende Rolle. Zellen mit mutierten Formen von Omi/HtrA2, bei denen die IAP-Binde-Domäne oder S306 verändert wurden, zeigten eine verminderte Apoptoserate auf zellulären Stress (Verhagen, 2002).

Interessanterweise konnte noch eine weitere Wirkung von Omi/HtrA2 auf den Zelltod gezeigt werden. So kommt es bei Überexpression von aktivem Omi/HtrA2 im Zytosol zu einem atypischen Zelltod, welcher keine erhöhte Caspase-Aktivierung zeigt (Suzuki, 2001). Hierbei runden sich die Zellen ab und verkleinern sich, zeigen aber keine Bildung von *apoptotic bodies* und keine morphologischen Veränderungen des Zellkerns (Suzuki, 2001). Eine Inhibition der Caspasen durch den generellen Caspase-Inhibitor zVAD-FMK zeigt dabei keinen protektiven Effekt (Suzuki, 2001; Hedge, 2002). Die katalytisch inaktive Form S306A weist keine Zelltod-induzierende Kapazität auf, so dass man davon ausgehen kann, dass Omi/HtrA2 einen Caspase-unabhängigen Zelltod durch seine Serin-Protease-Funktion auslösen kann und somit zwei unterschiedliche Arten des Zelltods auslösen bzw. verstärken kann.

### **1.3.3 Omi/HtrA2 als Parkinson Kandidaten-Gen**

Ein erster Hinweis auf eine Rolle von Omi/HtrA2 bei neurodegenerativen Erkrankungen ist die Tatsache, dass Omi/HtrA2 mit Presenilin-1 im *Yeast-two-Hybrid* System interagiert (Gray, 2000). Dies konnte in Zellkultur reproduziert werden und zeigt eine Affinität von Omi/HtrA2 zu Presenilin-1 (Gupta, 2004). Darüber hinaus konnte eine Interaktion von Omi/HtrA2 mit Amyloid  $\beta$  gezeigt werden (Park, 2004).

Eine direkte Verbindung zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und Omi/HtrA2 zeigen Mäuse, die einen Defekt im *mnd2*-Gen (*motoneuron disease 2*) haben. Bei *mnd2*-Mäusen treten postnatal nach etwa 20 Tagen motorische Störungen auf und die Tiere versterben nach etwa 35 Tagen. Das Auftreten der motorischen Störungen nach erst 20 Tagen ist ein Hinweis auf eine degenerative Erkrankung, die mit zunehmendem Alter zunimmt und im Falle der Maus nach

etwa 35-40 Tagen zum Tod führt. Dabei ist der *mnd2*-Lokus des Maus-Genoms der homologe Lokus zum humanen *Omi/HtrA2*-Gen. Der *mnd2*-Lokus liegt auf dem Maus-Chromosom 6, *Omi/HtrA2* liegt auf dem humanen Chromosom 2p13, wohin auch der *PARK3* Lokus kartiert (vgl. Tabelle 1.2). Histopathologisch und morphologisch zeigen die *mnd2*-Mäuse einen Verlust der striatalen Neurone, wobei die Zellen eine nukleare Pyknose, Chromatinkondensation und desintegrierte Organellen zeigen (Rathke-Hartlieb, 2002). Als genetische Ursache dieses Phänotyps stellte sich eine homozygote Basensubstitution heraus, welche zu einem Aminosäureaustausch S276C im *Omi/HtrA2*-Gen führt (Jones, 2003). Die Mutation liegt in der Protease-Domäne von *Omi/HtrA2*, die physiologische Auswirkung der Mutation scheint eine Veränderung der Substratspezifität zu sein, die über die PDZ-Domäne vermittelt wird und zu einem Funktionsverlust des Proteins führt. Ein kompletter Aktivitätsverlust der Proteasedomäne konnte ausgeschlossen werden, da die Deletion der PDZ-Domäne die Proteasefunktion des Proteins teilweise wieder herstellt (Jones, 2003). Weiterhin konnte eine Auswirkung der Mutation auf die Lokalisation, Proteingröße, Maturierung und die Expressionsspiegel ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass die IAP-Bindung nicht beeinflusst wird, jedoch die gebundenen IAP-Proteine nicht mehr degradiert werden (Jones, 2003). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Protease-Domäne von *Omi/HtrA2* über die PDZ-Domäne reguliert wird und eine stringente Substratspezifität dieser Domäne vorliegt. Der Verlust der Substratspezifität bei den *mnd2*-Mäusen scheint zu einem Funktionsverlust von *Omi/HtrA2* in den Mitochondrien zu führen. In den Mitochondrien scheint *Omi/HtrA2* dabei über seine Proteasefunktion eine Rolle in der Homeostase der Mitochondrien zu haben und die Mitochondrien gegenüber fehlgefalteten Proteinen zu schützen (Jones, 2003).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Funktionsverluste im Omi/HtrA2-Protein können Neurodegeneration auslösen. Dies wurde bei *mnd2*-Mäusen (Rathke-Hartlieb, 2002) gezeigt, die eine neurodegenerative Pathologie mit einem Verlust der striatalen Neurone aufweisen, wobei der Verlust der Neurone nicht auf das Striatum beschränkt ist (Jones, 2003). Da Omi/HtrA2 in den Mitochondrien lokalisiert ist und eine Beteiligung der Mitochondrien, unter Stressbedingungen, bei der PK schon lange postuliert wird (Dauer, 2003; van Bohlen, 2004), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Parkinson-Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen existieren, welche für die Parkinson-Erkrankung prädisponieren.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es noch keinen Hinweis auf eine genetische Beteiligung mitochondrial lokalisierter Proteine als Ursache des Morbus Parkinson. Dass die Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Degeneration der dopaminergen Neurone darstellen, konnte im MPTP-Modell gezeigt werden (ÜA: Dauer, 2003). Durch die Inhibition des Komplex I der Atmungskette werden ROS induziert, welche zu zellulärem Stress führen und die Neurone in den Zelltod führen. Die genaue Ursache der Degeneration striataler Neurone bei *mnd2*-Mäusen ist noch nicht aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass Omi/HtrA2 eine Chaperon-Funktion im Intermembranraum der Mitochondrien besitzt und fehlgefaltete Proteine degradiert. So kommt es bei Omi/HtrA2-Fehlfunktionen zu einer Akkumulation der fehlgefalteten Proteine, was in mitochondrialem Stress resultiert und zur Degeneration der Zelle führt (Jones, 2003).

Da mitochondriale Defekte in den dopaminergen Neuronen einen Faktor zur Generierung von oxidativem Stress darstellen, könnten *loss of function*-Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen eine genetische Ursache des Parkinsonismus sein.

Die genomische Lokalisation von Omi/HtrA2 auf dem PARK3-Lokus ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieser Serin-Protease bei der Parkinson-Krankheit (Rathke-Hartlieb, 2002).

Durch Kopplungsanalysen bei Parkinson-Patienten wurden sowohl krankheitsauslösende (Gasser, 1998) als auch das Erkrankungsalter modulierende Risikofaktoren auf den PARK3 Lokus kartiert (DeStefano 2002).

In dieser Arbeit soll für die Mutationssuche im *Omi/HtrA2*-Gen eine DNA-Bank, welche die DNA von einem Parkinson-Patientenkollektiv mit 518 DNAs enthält, untersucht werden.

Um eine möglichst schnelle und genaue Analyse der genomischen DNA durchführen zu können, wurde die Methode der denaturierenden Hochdurchsatz-Flüssigkeits-Chromatografie (dHPLC) gewählt. Hierbei sind zunächst von allen Exons des Kandidatengens PCR-Amplifikate zu generieren, welche dann mittels der dHPLC auf Mutationen untersucht werden.

Die mittels der dHPLC gefundenen Sequenzvariationen sollten dann bei Veränderungen der Aminosäureabfolge im Protein funktionell charakterisiert werden. Die Sequenzvariationen wurden zunächst gegen eine Kontrollpopulation abgeglichen, um Polymorphismen auszuschliessen und die Mutationen zu bestätigen. Mutationen und Risikoallele sollten dann auf ihre physiologischen Merkmale hin untersucht und mit dem Wildtyp-Protein verglichen werden. Hierzu sollten die Lokalisation, die Proteinstabilität und die bekannten Funktionen des Wildtyps im Vergleich mit den Mutationen charakterisiert werden. Weiterhin sollte eine mögliche Interaktion mit Proteinen des Ubiquitin-Proteasomen-Systems überprüft werden, die bei der PK eine klinisch-physiologische Relevanz haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien

Art	Name	Hersteller	Ort
Chemikalien	$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka	Neu-Ulm
	Acetonitril	Transgenomic	USA
	Acrylamid 2K - Lösung (30%) - Mix 37,5 : 1	Applichem	Darmstadt
	Acrylamid/Bis 30% (29:1)	Bio-Rad	München
	Ammoniumsulfat	Sigma	Taufkirchen
	Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma	Taufkirchen
	Ampicillin, D(-)- $\alpha$ -Amino- benzylpenicillin sodium salt	Sigma	Taufkirchen
	Borsäure	Merck	Darmstadt
	Brilliant Blau R250	Sigma	Taufkirchen
	Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
	BSA	Sigma	Taufkirchen
	di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
	DMSO	Sigma	Taufkirchen
	EDTA, Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma	Taufkirchen
	EDTA-Lösung (0,5 M)	BioWhittaker	USA
	Eisessig	Merck	Darmstadt
	Ethanol	Merck	Darmstadt
	Ethidiumbromid	Sigma	Taufkirchen
	Geneticin, G 418 Sulfate	Calbiochem, Gibco	Schwalbach Eggenstein
	Glucose	Merck	Darmstadt
	Glutaraldehyd	Sigma	Taufkirchen
	Glyzerin	Merck	Darmstadt
	Glyzin	Applichem	Darmstadt

Kaliumacetat	Fluka	Taufkirchen
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe
Kalziumchlorid	Merck	Darmstadt
Kanamycin Sulfat	Fluka	Taufkirchen
LB-Agar	Invitrogen	Karlsruhe
LB Broth, powder	Sigma	Taufkirchen
Magnesiumacetat	Riedel- de Haën	Seelze
Manganchlorid	Sigma	Taufkirchen
Methanol zur Analyse	Merck	Darmstadt
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)	Sigma	Taufkirchen
MOPS	AppliChem	Darmstadt
MPP <sup>+</sup> iodide	Sigma	Taufkirchen
Mowiol	Sigma	Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt
Orange G	Merck	Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Riedel- deHaën	Seelze
Poly-L-lysine hydrobromide	Sigma	Taufkirchen
Ponceau S	Sigma	Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma	Taufkirchen
Rotiphorese Gel 40	Roth	Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Riedel- de Haën	Seelze
SDS (10% Lsg.)	Accugene	Belgien
Staurosporine	Sigma	Taufkirchen
Sulfosalicylsäure	Sigma	Taufkirchen
TEAA	Transgenomic	USA
Trichloressigsäure	Merck	Darmstadt

	Tris	AppliChem	Darmstadt
	Trizma base	Sigma	Taufkirchen
	Triton X-100	Sigma	Taufkirchen
	Tween <sup>®</sup> 20	Roth	Karlsruhe
	Xylencyanol	Fluka	Neu-Ulm
	PIPES	Sigma	Taufkirchen
Zellkultur	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Contains 4,500 mg\L glucose and L-glutamine	Invitrogen	Karlsruhe
	OPTI-MEM <sup>®</sup> I Reduced Serum Medium	Invitrogen	Karlsruhe
	PBS (DPBS)	Cambrex	Belgien
		Invitrogen	Karlsruhe
	Trypsin EDTA	Invitrogen	Karlsruhe
	Penicillin	Bio Whittaker	Belgien
	Streptomycin	Bio Whittaker	Belgien
	Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech	Aidenbach
dNTP	100 mM dNTP Set	Invitrogen	Karlsruhe
DNA Standards	GeneRuler <sup>™</sup> Ladder Mix	Fermentas	St. Leon-Roth
	GeneRuler <sup>™</sup> 1kb DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Roth
	GeneRuler <sup>™</sup> 100bp DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Roth
Agarose	Roti <sup>®</sup> garose, MEE0	Roth	Karlsruhe
	peqGOLD Universal Agarose	Peqlab	Erlangen
Dynabeads	M-280 Steptavidin	Dynal AS	Norway
Protease Inhibitor	Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche	Mannheim
	Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche	Mannheim

Western-Blot

Standards	Prestained SDS-PAGE Standards	Bio-Rad	München
	BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen	Karlsruhe
Western-Blot			
Detektionsreagenz	ECL™ Western-Blotting Detection Reagents	Amersham	Freiburg
Western-Blotfilme	Hyperfilm™ ECL™	Amersham	Freiburg
Magermilchpulver	Naturaflor	Töpfer	Dietmannsried
Nitrozellulose			
Transfer Membran	PROTRAN®	Schleicher und Schuell	Dassel
	LC2000	Invitrogen	Karlsruhe
Gel Blotting Paper	Typ GB003	Schleicher und Schuell	Dassel
Transfektions-			
reagenzien	Lipofectamine™ 2000	Invitrogen	Karlsruhe
	FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche	Mannheim
	METAFACTENE™	Biontex	München
	Effectene	Qiagen	Hilden



### 2.1.2 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Art	Name	Hersteller	Ort/Land
Primäre Antikörper	Anti-6x-Histidine Tag Antibody (host clone mouse)	Exalphi	USA
	Anti-XIAP (human)	Biocarta	USA
	Anti-V5 Antibody	Invitrogen	Karlsruhe
	Anti-FLAG <sup>®</sup> M2 Antibody	Stratagene	Niederlande
	ANTI-FLAG <sup>®</sup> Polyclonal Antibody rabbit	Sigma	Taufkirchen
	pAb to HtrA2 Antibody	Apotech	Schweiz
	Rabbit-anti-FLAG Ak	Sigma	Taufkirchen
	$\alpha$ -c-myc-Antikörper	Santa Cruz	USA
	Rabbit-anti-XIAP Ak (human, cross reactivity to mouse and rat)	Peter Liston	Gift from P. Liston
	$\alpha$ -LAMP-1-Antikörper	Minoru Fukuda	Referenz: # 147, S.168
	Agarose-gekoppelte Antikörper	ANTI-FLAG <sup>®</sup> M2 Affinitäts-Gel	Sigma
c-myc Monoclonal Antibody-Agarose <i>Beads</i>		BD Clontech	USA
Anti-V5 Agarose Affinity Gel		Sigma	Taufkirchen
Sekundärantikörper		Anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz
	ECL Rabbit IgG, HRP- Linked Whole Antibody (from donkey)	Amersham	Freiburg
	ECL mouse IgG, HRP- Linked Whole Antibody (from sheep)	Amersham	Freiburg

	Anti-Rabbit IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat	Sigma	Taufkirchen
Fluoreszenzmarkierte			
Sekundärantikörper	Goat-anti mouse Cy3, IgG, Gesamtmolekül, polyklonal	Dianova	Hamburg
	Goat-anti rabbit Cy3, IgG, Gesamtmolekül, polyklonal	Dianova	Hamburg
	Goat-anti rabbit FITC, IgG, Gesamtmolekül, polyklonal	Dianova	Hamburg
	Goat-anti rabbit Cy2, IgG, (H+L), polyklonal	Dianova	Hamburg
	Goat-anti mouse FITC IgG, F(ab') <sub>2</sub> -Fragment, polyklonal	Dianova	Hamburg
Fluoreszenzfarbstoffe			
	Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate	Molecular Probes	USA
	Hoechst 33258, pentahydrate (bis-benzimide)	Molecular Probes	USA
	JC-1	Molecular Probes	USA
	MitoTracker <sup>®</sup> Green FM	Molecular Probes	USA
	MitoTracker <sup>®</sup> Red CMXRos	Molecular Probes	USA
	Lysotracker <sup>®</sup> Red	Molecular Probes	USA
	TO-PRO <sup>®</sup> -3 iodide	Molecular Probes	USA

### 2.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätekategorie	Name	Hersteller	Ort/Land
Agarosegelkammern	Mini Sub Cell GT	Bio-Rad	München
	PerfectBlue	Peqlab	Erlangen
	Minigelssystem S		
	PerfectBlue	Peqlab	Erlangen
	Minigelssystem L		
Autoklav	Dampfsterilisator	Sauter	Schweiz
Bakterienschüttel- inkubator	Multitron®	Infors	Einsbach
Brutschränke	Function Line, Typ BB16	Heraeus	Hanau
	B6420	Heraeus	Hanau
	MCO-18 AIC(UV)	Sanyo	München
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson	Heidelberg
	CyAn™	Dako Cytomation	Hamburg
Elektrophorese Power Supplies	E835	Consort	England
	Powerpac 300	Bio-Rad	München
	PowerPac Basic	Bio-Rad	München
	Powerpack 3000	Bio-Rad	München
	PS 3002	Life Techn.	USA
ELISA-Reader	MRX	Dynatech Laboratories	USA
	Multiscan EX	Thermo	Dreieich
Entwicklermaschine	X-OMAT M35	Kodak	Stuttgart
	FPM 800A	Fujifilm	Düsseldorf
Fragmentanalyse System	Gel-Scan 2000	Corbett Research	Australia

## Material und Methoden

---

Geldokumentation	Kaiser RS1	Kaiser	Buchen
	bioview	Biostep	Jahnsdorf
	Bio-Print	Vilber	Frankreich
		Lourmat	
Heizblöcke	Heizblock HTM 130	HLC	Bovenden
	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
Kamerasysteme	ECL-Kamera LAS-100	Fujifilm	USA
	FluorChem 8900	Alpha	USA
		Innotech	
	CCD300ETRCX	Dage-MIT	USA
	Axiocam Mr	Zeiss	Göttingen
	Sensicam	PCO	Kelheim
Magnetrührer	MR3000	Heidolph	Schwabach
Mikroskope	Axioplan2	Zeiss	Göttingen
	LSM 510	Zeiss	Göttingen
	Leica DMIRBE	Leica	Bensheim
	Wilowert A	Hund	Wetzlar
	TS100	Nikon	Düsseldorf
PAA-Gelkammer	Modell SA	Life Techn.	USA
PCR-Cycler	MultiCycler PTC 200	MJ Research	Biozym, Deutschland
	MultiCycler PTC Dyad 220	MJ Research	Biozym, Deutschland
	GeneAmp <sup>®</sup>	Applied	USA
	PCR System 9700	Biosystems	
Photometer	Ultrospec 3000	Amersham	Freiburg
	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Sequenziergeräte	CEQ 8000	Beckman	Krefeld
	PSQ 96	Pyro- sequencing	Schweden
Pipetten	Gilson Pipetman	Gilson	USA
	Eppendorf Reference	Eppendorf	Hamburg

Pipettoren	accu-jet <sup>®</sup>	Brand	Wertheim
	pipetus <sup>®</sup> -akku	Hirschmann <sup>®</sup>	Eberstadt
Schüttler	Rollentaumelmischer RM5	Hecht	Sondheim/ Rhön
	KS250 basic	Kika Labor- technik	Staufen
SDS Elektrophorese- und Blotting-System	Mini-PROTEAN <sup>®</sup> II- Elektrophorese-System	Bio-Rad	München
Sterilbank	Tecnoflow 3F120-II GS	Integra	Schweiz
	HeraSafe HSP18	Heraeus	Hanau
Waagen	MC1 Laboratory LC420	Sartorius	Göttingen
	Micro, Typ M5P	Sartorius	Göttingen
UV-Tisch	Precisa XT 6200C-FR	Pesa	Bisingen
	Standardmodell ohne besondere Kennzeichnung	MWG Biotech	Ebersberg
Zell-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Hecht	Sondheim/ Rhön
		Assistent	Rhön
Zentrifugen	Biofuge fresco (Rotor 3325)	Heraeus	Hanau
	Biofuge pico (Rotor 3324)	Heraeus	Hanau
	Centrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg
	Centrifuge 5417C	Eppendorf	Hamburg
	Centrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg
	Centrifuge 5804	Eppendorf	Hamburg
	Megafuge 1.0R (Rotor 2252)	Heraeus	Hanau
	Multifuge 3S-R (Rotor 75006445)	Heraeus	Hanau
	Sorvall RC 5C Plus (Rotor SLA-3000) (Rotor SLA-600TC)	Kendro	Langenselbold

## Material und Methoden

---

Zellkulturgefäße	6-/24-/96-well- Zellkulturplatten	BD Falcon	Heidelberg
	60x15 mm- Zellkulturschalen	BD Falcon	Heidelberg
	Costar® Zellkulturflaschen, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Corning	USA
	Nunclon® Zellkulturflaschen, 175 cm <sup>2</sup>	NUNC	Wiesbaden
Mikroskopiematerial	Deckgläser 12 mm, 16mm	Langenbrinck,	Emmendingen
	Deckgläser 12 mm	Hecht Assistent	Sondheim
	Objektträger	Langenbrinck	Emmendingen
	<i>Chambered Coverglass</i> (Objektträgerkammern)	NUNC	Wiesbaden
	<i>Horse Serum</i>	Biochrom	Berlin

### 2.1.4 Enzyme, Kits und Reagenziensysteme

Funktion	Name	Hersteller	Ort/Land
Miniprep	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Hilden
	FastPlasmid™ Mini	Eppendorf	Hamburg
Midiprep	QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen	Hilden
	GeneElute Midiprep Kit	Sigma	Taufkirchen
Maxiprep	QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Hilden
Agarose Gel Extraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
	Perfectprep Gel Cleanup Kit	Eppendorf	Hamburg
PCR Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	Hilden
Mutagenese-Kit	QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Niederlande
<i>Taq</i> DNA Polymerase	BioTherm™ DNA Polymerase	Genecraft	Lüdinghausen
	<i>Taq</i> DNA Polymerase, Recombinant	Invitrogen	Karlsruhe
	AmpliTaq® DNA Polymerase	Applied Biosystems	USA
	<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas	St. Leon-Roth
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	<i>Pfu</i> DNA Polymerase (native)	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>Pfu</i> Turbo® DNA Polymerase	Stratagene	Niederlande
	AccuTherm™ DNA Polymerase	Genecraft	Lüdinghausen
<i>Pwo</i> DNA Polymerase	SAWADY <i>Pwo</i> -DNA- Polymerase	Peqlab	Erlangen

## Material und Methoden

---

Ligase	T4 DNA Ligase	Fermentas	St. Leon-Roth
Phosphatase	SAP	Fermentas	St. Leon-Roth
Restriktionsenzyme	<i>Age I</i>	NEB	Frankfurt a.M.
	<i>ApaI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>AvaII</i>	NEB	Frankfurt a.M.
	<i>BamHI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>BglI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>BglIII</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>DpnI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>Eco32I (EcoRV)</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>HhaI</i>	NEB	Frankfurt a.M.
	<i>MvaI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>NcoI</i>	NEB	Frankfurt a.M.
	<i>NotI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>SalI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
	<i>XbaI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth
<i>XhoI</i>	Fermentas	St. Leon-Roth	
Weitere Kits	Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche	Mannheim



## 2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffername	Bestandteile
10x PCR Puffer	750mM Tris-HCl (pH 8,8), 200mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.1% Tween 20
50x TAE	2 M Tris 57,1 ml/l Eisessig 0,05 M EDTA (pH 8,0)
10x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH 8,0)
10x TBS	100 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl pH 7,2
TBS-T	1x TBS mit 0,05% Tween 20
CoIP- bzw. Lysepuffer	1x PBS, 0,1% Triton X-100, plus Complete <sup>®</sup> Protease Inhibitor
10X PBS	80 g/l NaCl, 2,0 g/l KCl, 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
5x-SDS-Laufpuffer	124 mM Tris 960 mM Glyzin 0,005% SDS
WB-Transferpuffer	2,5 mM Tris, 19,2 mM Glyzin, 20% Methanol
5x-Laemmli-Puffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% β-Mercaptomethanol, 2% SDS, 10% Glyzin, 0,05% Bromphenolblau
Ponceau S	0,2% Ponceau S, 3% TCA, 3% Sulfosalicylsäure
Blockierlösung	5% Magermilchpulver (w/v) in TBS

## Material und Methoden

---

“Stripping”-Puffer	0,2 M Gylcin 0,5 M NaCl pH 2,8
1000X Ampicillin	100 mg/ml Ampicillin in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , sterilfiltriert
4000X Kanamycin	100 mg/ml Kanamycin in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , sterilfiltriert
TfbI	30 mM Kalium Acetat, 15% (v/v) Glyzerol 50 mM Mangan Chlorid, 100 mM Rubidium Chlorid, 10 mM Kalzium Chlorid, pH 5,8
TfbII	10 mM MOPS, 75 mM Kalzium Chlorid, 10 mM Rubidium Chlorid 15% (v/v) Glyzerol pH 6,5
Puffer L1	9 g Glucose, 3,72 EDTA, 3,03 g Tris ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , steril filtriert
Puffer L2	20 ml 2N NaOH, 20 ml 20%ige SDS-Lsg. ad 200 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Puffer L3	120 ml 5 M Kac (pH 4,8 – 5,2) 23 ml Eisessig 57 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
10X <i>Gel-Loading</i> <i>Buffer</i> (10X GLB)	60% Glycerol , 10 mM EDTA, 0,4% Orange G, 0,4% Xylene Cyanol
Ethidiumbromid- stocklösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
dHPLC Puffer A	0,1 M TEAA
dHPLC Puffer B	0,1 M TEAA, 25% (v/v) Acetonitril
Stop-Lösung	1,5 M NaOAc, pH 5,2 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0
<i>Pyrosequencing</i> 2x <i>Binding</i> Puffer	10 mM Tris, 2M NaCl, 1mM EDTA, 0,1% Tween

*Pyrosequencing*

1x Annealing Puffer 20 mM Tris-Acetate,  
5mM MgAc<sub>2</sub>

*Pyrosequencing*

Denaturierungslösung 0,5 M NaOH  
Einfriermedium I 40% FCS  
60% DMEM  
Einfriermedium II 20% DMSO  
80% DMEM  
100X Poly-L-Lysin 0,5 mg/ml Poly-L-Lysin

**2.1.6 Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien**

**2.1.6.1 Bakterienstämme**

Stamm	Art	Anbieter
DH5 $\alpha$	Subcloning Efficiency™ DH5 $\alpha$ ™ Competent Cells	Invitrogen
TOP10	One Shot® TOP 10	Invitrogen

**2.1.6.2 Humane Zelllinien**

Zelllinie	Art	Medium	Referenz
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie	DMEM, 10% FCS, 5% Penicillin/Streptomycin	Microbix, Kanada
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomazelllinie	DMEM, 15% FCS, 5% Penicillin/Streptomycin	DSMZ, Deutschland: ACC 209

## 2.1.7 Plasmide

### 2.1.7.1 Kommerzielle Plasmide zur Klonierung:

Name	Hersteller	Epitop	Resistenz	Promotor
pCMV-Tag4A	Stratagene	FLAG	Kan <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	CMV
pcDNA3.1 <sup>TM</sup> /myc-His	Invitrogen	myc, His	Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	CMV
pcDNA3.1 <sup>TM</sup> /V5-His TOPO <sup>®</sup> TA	Invitrogen	V5, His	Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	CMV
pcDNA3 <sup>TM</sup>	Invitrogen	-	Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	CMV

### 2.1.7.2 Verwendete Plasmide mit *Inserts*

#### pCMV-Tag4A-Wt-Omi/HtrA2:

Dieses Konstrukt wurde mittels einer cDNA, welche der genomischen Omi/HtrA2 Sequenz (NCBI accession number AC005041) entspricht kloniert. Das *Insert* wurde aus einem anderen Vektor mit der cDNA, durch PCR mit denen in Abschnitt 2.1.8 beschriebenen Primern, mit den Sequenzen Fwd-CTGATA-TCAAGGCGGAGCTGATGGCT und Rev-ATCCTCGAGTTCTGTGACCTCAGGGGTCA, amplifiziert. Als Schnittstellen dienten *Eco32I* und *XhoI*. Der Vektor exprimiert das *Insert* unter der Kontrolle des CMV-Promotors und fügt an das Protein ein C-terminales FLAG-Epitop an.

#### pCMV-Tag4A-S141-Omi/HtrA2:

Dieses Konstrukt wurde aus dem pCMV-Tag4A-Wt-Omi/HtrA2 Vektor durch Mutagenese mit dem QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit hergestellt und exprimiert die S141-Form von Omi/HtrA2.

#### pCMV-Tag4A-S399-Omi/HtrA2:

Dieses Konstrukt wurde aus dem pCMV-Tag4A-Wt-Omi/HtrA2 Vektor durch Mutagenese mit dem QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit hergestellt und exprimiert die S399-Form von Omi/HtrA2.

**pcDNA3-Ub-Δ133-Wt-Omi/HtrA2:**

Dieses Konstrukt wurde von L.M. Martins (Leicester, UK) kloniert. Es beinhaltet die kodierende Sequenz der reifen Form des Omi/HtrA2-Proteins, mit einem davor befindlichen Ubiquitinrest. Dieses Ubiquitin wird im Zytosol abgespalten und ermöglicht die korrekte Prozessierung des Proteins. Omi/HtrA2 wird nur cytosolisch exprimiert, da die MTS-Sequenz fehlt und es zu keinem Transport in die Mitochondrien kommt. Das *Insert* wurde mittels *KpnI* und *XhoI* in den pcDNA3 Vektor kloniert und exprimiert auch einen FLAG-Epitop.

**pcDNA3-Ub-Δ133-S141-Omi/HtrA2:**

Dieses Konstrukt wurde aus dem pcDNA3-Ub-Wt-Omi/HtrA2-Konstrukt durch Mutagenese hergestellt und exprimiert die S141-mutierte Form von Omi/HtrA2.

**pcDNA3-Ub-Δ133-S399-Omi/HtrA2:**

Dieses Konstrukt wurde aus dem pcDNA3-Ub-Wt-Omi/HtrA2-Konstrukt durch Mutagenese hergestellt und exprimiert die S399-mutierte Form von Omi/HtrA2.

**pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA-Wt-DJ-1:**

Dieses Konstrukt wurde von Peter Heutink (Amsterdam, NL) zur Verfügung gestellt. Es enthält das durch TOPO TA Klonierung eingefügte Wt-DJ-1. Das *Insert* besitzt kein Stop-Codon und geht in die kodierende Tag-Sequenz für ein V5- und 6x-His Epitop über, auf welche ein Stop-Codon folgt. Exprimiert wird unter der Kontrolle eines CMV Promotors, das Resistenzgen codiert für eine Ampicillin-Resistenz.

**pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA-P166-DJ-1:**

Dieser Vektor wurde durch Mutagenese aus dem pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA-Wt-DJ-1 Vektor generiert und uns von Peter Heutink zur Verfügung gestellt.

**pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA-D64-DJ-1:**

Dieser Vektor wurde durch Mutagenese mit dem QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit aus dem pcDNA3.1/V5-His-TOPO TA-Wt-DJ-1 Vektor hergestellt und exprimiert D64-mutiertes DJ-1.

**pcDNA3.1/myc<sub>6</sub>-XIAP:**

Dieser Vektor exprimiert myc-markiertes Wt-XIAP unter der Kontrolle des CMV Promotors und wurde von Ulrike Naumann (Hertie-Institut, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

**pcDNA3.1/myc<sub>6</sub>-Wt- $\alpha$ -Synuklein:**

Dieser Vektor enthält als *Insert* die komplette cDNA des Wt- $\alpha$ -Synukleins, und wurde in den pcDNA3.1 Vektor mit N-terminalem 6-fach myc-Tag einkloniert ist. Daher besitzt das *Insert* kein Startcodon und wird unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Quelle: Olaf Eberhardt, Marc Gleichmann (Hertie-Institut, Tübingen)

**pEGFP-N1-Synphilin-1:**

Dieser Vektor enthält als *Insert* die cDNA des Wt-Synphilins, welches in einen pEGFP-N1 Vektor mit C-terminalem EGFP-Tag einkloniert ist. Das *Insert* wird unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Quelle: M. Cookson (Baltimore, USA)

**pcDNA3.1/myc<sub>6</sub>-Parkin:**

Dieser Vektor enthält als *Insert* die cDNA des Wt-Parkins, welches in einen pcDNA3.1 Vektor mit N-terminalem 6-fach myc-Tag einkloniert ist. Das *Insert* besitzt kein Startcodon und wird unter Kontrolle eines CMV Promotors exprimiert. Quelle: Olaf Eberhardt, Marc Gleichmann (Hertie-Institut, Tübingen)

**pMT123-HA<sub>8</sub>-Ubiquitin:**

Dieser Vektor wurde von der Arbeitsgruppe von Dirk Bohmann (Rochester, USA) kloniert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er exprimiert unter der Kontrolle des CMV-Promotors ein achtfaches, C-terminal HA-markiertes Ubiquitin, welches mittels der Restriktionsendonukleasen *NotI* und *EcoRI* in einen BSSK<sup>-</sup>-Vektor kloniert wurde.

### 2.1.8 Primer

Name	Primerfunktion	Primersequenz	Lieferant
Omi:			
EcoRV_ATG	Klonierungsprimer	CTGATATCAAGGCGGAGCTGAT GGCT	MWG
Omi:			
XhoI_STOP	Klonierungsprimer	ATCCTCGAGTTCTGTGACCTCA GGGGTCA	MWG
Omi FL-Fwd	PCR Primer forward	ATGGCTGCGCCGAGGGCGGG	Metabion
Omi FL-Rev	PCR Primer reverse	GGTCAGTGTTTCTCGTCCCCG	Metabion
OMI_Ex1_F	PCR Primer forward	TGCCGCCTCTGAGTAGGG	Euro Gentech
OMI E1-177F	PCR Primer forward	CCGGTTGTCTGTTGGGGTCA	Metabion
OMI_Ex1_R	PCR Primer reverse	CGGTCTACCCCCACCATT	Euro Gentech
OMI_Ex2_F	PCR Primer forward	TCTGTGCTTTCCCTCCATTT	MWG Biotech
OMI_Ex2_R	PCR Primer reverse	TCATCTGAAGATGCGAGCAA	MWG
OMI_Ex3_F	PCR Primer forward	GGTTGGAGCTGCTTATTTGC	MWG
OMI_Ex3_R	PCR Primer reverse	TCCCCATCATTGTCATTT	MWG
OMI_Ex4_F	PCR Primer forward	CCCAGACTTAGAATCCCCAGA	MWG
OMI_Ex4_R	PCR Primer reverse	GGGATTCTTGGAAGGAAGGA	MWG
OMI_Ex5_F	PCR Primer forward	TAGGGAAGTGGGGGCTGTAT	MWG
OMI_Ex5_R	PCR Primer reverse	CCACATTAAAGGAACCCGTTT	MWG
OMI_Ex6_F	PCR Primer forward	GGCTCATTTGTCCCTCTGTC	MWG
OMI_Ex6_R	PCR Primer reverse	CCCCCTCTGATTACACTGGT	MWG
OMI_Ex7_F	PCR Primer forward	GGGTTTGGCTAATAGGGTGA	MWG
OMI_Ex7_R	PCR Primer reverse	CCATATCACACTGCAGCCTCT	MWG
OMI_Ex8_F	PCR Primer forward	TGTGTCCTTGAAGTGGCTTTG	MWG
OMI_Ex8_R	PCR Primer reverse	GGAGCCTCATACTCTTGGTGA	MWG
E1-177F_biot	PCR Primer biotinyliert	CCGGTTGTCTGTTGGGGTCA	Metabion

Mut_seq423-	<i>Pyrosequencing</i>		
436rev	Sequenzierprimer	GACTCCGGGGAGAA	MWG
T7-Primer	Sequenzierprimer	TAATACGACTCACTATAGG	MWG
Omi_S:391-			
408 fwd	Sequenzierprimer	GTCCTCGCCGCCGTCCCT	MWG
Omi_S:241-			
260 fwd	Sequenzierprimer	GCACAAGTACTGCGGTGAC	MWG
Omi_1694 R	Sequenzierprimer	TCCAGCTGTGACCTTCATGG	MWG
E1-mut421-	Mutageneseprimer		
fwd	Exon1 G421→T	CTAGCCCGCCGCCCTCTTCTCC CCGGAG	MWG
E1-mut421-	Mutageneseprimer		
rev	Exon1 G421→T	CTCCGGGGAGAAGAGGGCGGC GGGCTAG	MWG
+Mut E7: G-A	Mutageneseprimer		
fwd	Exon7 G1195→A	TCCATAAAGTCATCCTGAGCTC CCCTGCACACC	Metabion
+Mut E7: G-A	Mutageneseprimer		
rev	Exon7 G1195→A	CCGGTGTGCAGGGGAGCTCAG GATGACTTT	Metabion
rs4853031_F	SNP-Primer	CTCAGGCTGGAGTGCAGTG	Metabion
rs4853031_R	SNP-Primer	TGGTGGCTCACACCTGTAAT	Metabion
rs6707302_F	SNP-Primer	ACAGTGATGCCTTGCTCTCC	Metabion
rs6707302_R	SNP-Primer	GCATTACCACAGCATGGACA	Metabion
rs6709863_F	SNP-Primer	TCAAGGACTCCTCCTGCCTA	Metabion
rs6709863_R	SNP-Primer	AGTTCCTGACATCCCTCCT	Metabion
rs715407_F	SNP-Primer	GGATCAGTGTTCCCAAATCAA	Metabion
rs715407_R	SNP-Primer	AAGCTTCCCACTTCGAGTTC	Metabion
rs4853030_F	SNP-Primer	AAGATCAAAGCTTGCCCATC	Metabion
rs4853030_R	SNP-Primer	CAAGGTCTCAGCCCGACA	Metabion
rs2286924_F	SNP-Primer	GGCACTGCAGGACCAAAC	Metabion
rs2286924_R	SNP-Primer	TGGAGAGGGACTGACATGCT	Metabion
rs2231250_F	SNP-Primer	TACCACCTGTAGCACCGTGA	Metabion



rs2231250_R	SNP-Primer	GCAAGAAGAAAAATATTGAGGA AAA	Metabion
rs1306918_F	SNP-Primer	TGTGCCGTGTATCTCTCACC	Metabion
rs1306918_R	SNP-Primer	AAACGTTTCATCAGGAGTTGGA	Metabion
rs6546909_F	SNP-Primer	GGCAGTTGTCTTTGGATATGG	Metabion
rs6546909_R	SNP-Primer	GCCTGCCTCTTCCCTTTTAT	Metabion
rs7569292_F	SNP-Primer	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA	Metabion
rs7569292_R	SNP-Primer	GAGCTAGGTGTCTCCGCAAC	Metabion
rs3835033_F	SNP-Primer	TGGGAACCAGGAGAAGAGAA	Metabion
rs3835033_R	SNP-Primer	GTTCCGCATGGAGGATACTG	Metabion
rs_7562200F	SNP-Primer	TGCTGTAAACCCAGTGGCGG	Metabion
rs_7562200R	SNP-Primer	CCTTCTCCTCAAATGTTCTGC	Metabion
rs7569292F	SNP-Primer	CAAGCATGTGCCACCATACCTG	Metabion
rs7569292R	SNP-Primer	GGGAAAGTCATGAAGAGTCACA AGG	Metabion
D2S145 fwd	SNP-Primer	AGCTTATGGCAAGATTGTCC	Metabion
D2S145 rev	SNP-Primer	GGGCATTGTTGAAATGGA	Metabion
D2S286 rev	SNP-Primer	TGGTGGTTTATCTTACCAGTC	Metabion
D2S286 fwd	SNP-Primer	TTAAAATTGTTTCTATGACATGA TG	Metabion
D2S2110 fwd	SNP-Primer	AAGGGTAGTATGTCACTCCATT	Metabion
D2S2110 rev	SNP-Primer	GCTTACCATATGATCAGGGG	Metabion
D2S2111 fwd	SNP-Primer	CAGGAATGCTAGTGCATACACT C	Metabion
D2S2111 rev	SNP-Primer	ACCCTCATGCTGGTCGTAAT	Metabion
DJ-Mut	Mutageneseprimer	GATGCAAAAAAAGACGGACCAT	Metabion
G192C fwd	DJ-1 E64D Fwd	ATGATGTGGTGG	
DJ-1 Mut	Mutageneseprimer	CCACCACATCATATGGTCCGTC	Metabion
G192C rev	DJ-1 E64D Rev	TTTTTTTGCATC	

### **2.1.9 Patienten- und Kontrollkollektive**

Als Patientenkollektiv diente eine DNA Sammlung, in der isolierte genomische DNA von 518 Parkinson-Patienten vorhanden war. Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten betrug  $55,3 \pm 12,0$  Jahre, der durchschnittliche Anteil an Männern betrug 55,4%, der Anteil an Frauen 44,6%. Der Anteil an Patienten mit positiver familiärer Krankheitsgeschichte betrug 12,5%. Die DNA's der Patienten stammten alle aus Deutschland, alle Patienten wurden neurologisch begutachtet. Die Diagnose, idiopathisches Parkinson-Syndrom, wurde auf der Grundlage der *UK brain bank* gestellt.

Weiterhin stand uns im Rahmen dieser Arbeit Patienten-DNA einiger Personen der Indexfamilien B und C zur Verfügung, mit denen die Kartierung des PARK3 Locus durchgeführt wurde (Gasser, 1998).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist es möglich, einen definierten DNA-Abschnitt eines heterogenen DNA-Gemisches aus einem Ausgangsmaterial schnell und in großem Umfang zu vervielfältigen.

Die Ausgangs-DNA (*Template*) wird durch Erhitzung denaturiert. An die nun vorliegenden DNA-Einzelstränge hybridisieren synthetische Primer, die die zu amplifizierende Region flankieren (*Annealing*). An die hybridisierten Primer synthetisieren die DNA-Polymerasen dNTPs in 5' → 3'-Richtung an (Elongation) und führen den Einzelstrang in einen Doppelstrang über. Durch eine zyklische Abfolge dieser drei Schritte, wird der ursprüngliche DNA-Abschnitt millionenfach kopiert.

Bei der PCR werden thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt, welche die hohen Temperaturen der Denaturierungsschritte ohne nennenswerten Aktivitätsverlust überstehen und somit für die automatische Durchführung der drei PCR-Schritte in mehreren Zyklen geeignet sind. Für die Standard-PCR hat sich die *Taq*-Polymerase etabliert, welche eine hohe Syntheseleistung zeigt und relativ unkompliziert einzusetzen ist, aber über keine 3' → 5' Exonukleaseaktivität verfügt. '*Proof-Reading*'-Polymerasen besitzen eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität über die sie fehlgepaarte Nukleotide erkennen. Hierdurch wird die Mutationsrate bei der PCR stark verringert und die Spezifität der PCR-Produkte gesteigert. Eine Übersicht über die unterschiedlichen, in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Polymerasen findet sich in Tabelle 2.1:

**Tabelle 2.1:** Übersicht über die eingesetzten DNA-Polymerasen

DNA-Polymerase	Herkunft	Mutationsrate *	Verwendungszweck
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i>	$2.2 \times 10^{-5}$	Standard-PCR
<i>Pfu</i> -Polymerase	<i>Pyrococcus furiosus</i>	$2.6 \times 10^{-6}$	Klonierung Mutagenese
<i>Pwo</i> -Polymerase	<i>Pyrococcus woesei</i>	$7.4 \times 10^{-7}$	Klonierung

\* Fehler pro Nukleotid pro Zyklus

Zur Steigerung der Spezifität der Primerhybridisierung wurde der PCR teilweise DMSO zugesetzt.

### 2.2.1.1 Durchführung der PCR für die Mutationsanalyse

Der kodierende Bereich des *Omi/HtrA2*-Gen erstreckt sich über 8 Exons. Für die Mutationsanalyse wurden die acht Exons des *Omi/HtrA2*-Gens mit intronischen Primern amplifiziert. Somit wurde sichergestellt, dass der komplette Bereich der Exons und die Splice-Stellen an den Übergängen zwischen Intron und Exon untersucht wurden.

Die Etablierung der PCR erfolgte auf möglichst gleiche oder ähnliche Bedingungen, für jedes Primerpaar zwischen den acht Exons. Dabei sollte vor allem das Programm des Thermocyclers für alle Exons gleich sein. Somit konnte man gewährleisten, dass in einem PCR-Cycler mehrere DNAs unterschiedlicher Exons amplifiziert werden können.

Hierzu wurde eine Gradienten-PCR für jedes Exon durchgeführt, in welcher unterschiedliche Magnesium-Chlorid-Konzentrationen bei unterschiedlichen Temperaturen verglichen werden sollten. Dabei durften die Amplifikate im Gel möglichst keine Schatten- oder Doppelbanden aufweisen und sich, sofern möglich, in einer klaren Bande auf dem Agarosegel abzeichnen. Mittels scharfer Einzelbanden konnte man die Amplifikate direkt, ohne weitere Aufreinigung, in der dHPLC einsetzen. Als günstigste Bedingung erwies sich dabei eine *Annealing*-Temperatur von 58°C, ein DMSO Anteil von 5% und ein Magnesiumgehalt von 1 mM, der für alle Exons gewählt wurde.

Die angewendeten PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Patienten- und Kontroll-DNAs stellten sich nach der Etablierung folgendermaßen zusammen:

Pipettierschema:

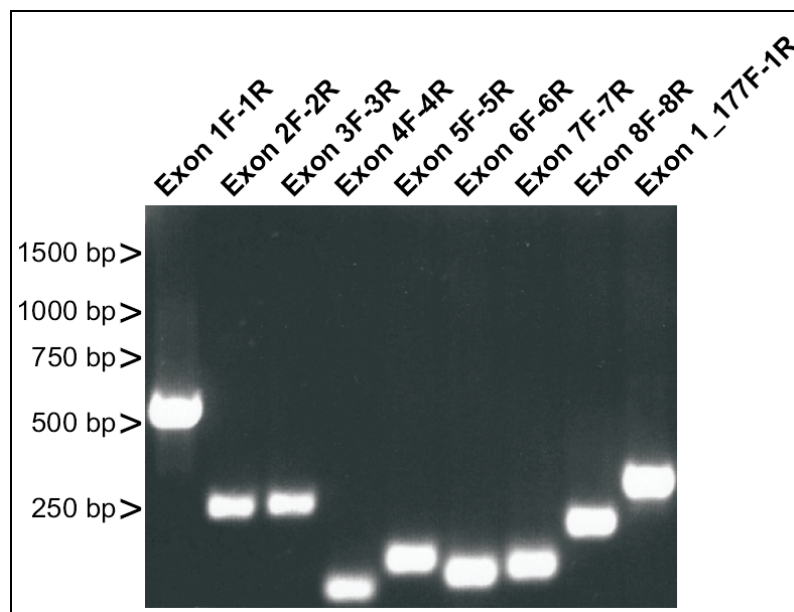
Reagenz/Komponente	Endkonzentration
10X Reaktionspuffer	1 x
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 0,2 mM
5'-Primer	0,25 µM
3'-Primer	0,25 µM
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM
DNA- <i>Template</i>	≥ 500 ng
DNA-Polymerase	1-2,5 U

---

Thermocycler Programm:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94,0°C	1:30	
Zyklische Denaturierung	94,0°C	1:00	} 40 x
<i>Annealing</i>	58,0°C	1:00	
Elongation	72,0°C	1:00	
Finale Elongation	72,0°C	3:00	
Aufbewahrung	4,0°C	∞	

Durch die gewählten Bedingungen wurde eine hohe Qualität der Amplifikate erzielt.



**Abbildung 2.2.1:** Amplifikate von Exon 1-Exon 8 und des Exon 1\* Fragmentes 177 Fwd-Exon 1 Reverse mit den etablierten PCR Bedingungen, visualisiert durch EtBr.

Für die Analyse in der dHPLC wurde die PCR in einem Mastermix für 100 PCRs pro 96-well-Platte angesetzt, wobei in ein *well* eine Negativkontrolle pipettiert wurde, in dem sich  $H_2O_{bidest}$  anstelle von *DNA-Template* befand, um Kontaminationen durch Fremd-DNA auszuschließen.

Im Anschluss an die PCR wurden die Negativkontrolle, welche aus dem PCR Mastermix und Wasser anstelle von *DNA-Template* bestand, und eine Positivkontrolle, mit qualitativ hochwertiger Ausgangs-DNA, auf einem Agarosegel untersucht. Stellten sich beide Kontrollen als korrekt heraus, wurde die komplette PCR Platte für die Mutationsanalyse verwendet.

### 2.2.1.2 Durchführung der PCR zur Klonierung

Sollen PCR-Fragmente in ein Plasmid eingefügt (kloniert) werden, so müssen an das PCR-Produkt Überhänge in Form von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen angefügt werden. Durch die Erweiterung der Primersequenz um diese Erkennungssequenzen am 5'-Ende des Primers, wird die Hybridisierungstemperatur des Primers in der PCR herabgesetzt und die Bindungsspezifität verschlechtert. Die Sequenz und die Länge dieses Überhangs ist vom jeweiligen Enzym abhängig. Die eigentliche PCR wurde dann mit Polymerasen durchgeführt, welche eine 'Proof-Reading'-Eigenschaft besitzen, um Mutationen in der CDS des einzufügenden Gens möglichst auszuschließen. Für die folgenden PCR-Reaktionen wurden ausschließlich *Pfu*- und *Pwo*-Polymerase verwendet und die Elongationstemperatur von 72°C auf 68°C herabgesetzt. Bei niedrigerer Temperatur arbeiten diese Polymerasen langsamer und die Fehlerrate nimmt ab.

Pipettierschema:

Reagenz/Komponente	Endkonzentration
10X Reaktionspuffer	1 x
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 0,2 mM
5'-Primer	0,25 µM
3'-Primer	0,25 µM
MgCl <sub>2</sub> bzw. MgSO <sub>4</sub>	1,0-2,5 mM
DNA- <i>Template</i>	200-750 ng
DNA-Polymerase	1-2,5 U

*Thermocycler*-Programm:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94,0°C	1:30	
Zyklische Denaturierung	94,0°C	1:00	} 35 x
<i>Annealing</i>	58,0°C	1:00	
Elongation	68,0°C	x	
Finale Elongation	68,0°C	3:00	
Aufbewahrung	4,0°C	∞	

x: Je 1 kb Vektorgröße, eine Minute Synthesezeit

### **2.2.2 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophoresen wurden alle in horizontalen Gelkammern mit Tris-Borat-Puffer (TBE) oder Tris-Acetat-Puffer (TAE) durchgeführt. Die Wahl der Agarosekonzentration wurde an die Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst und lag zwischen 0,8 und 3,0 Prozent. Zur Visualisierung in einem Geldokumentationssystem wurde der Agarose nach dem Aufkochen Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert besonders in doppelsträngige DNA, wobei der organische Farbstoff auch an einzelsträngige DNA und RNA interkaliert. Durch Bindung an DNA wird die Fluoreszenz des Farbstoffs wesentlich verstärkt. Die zu untersuchende DNA wurde mit einem Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die angelegte Spannung betrug zwischen 3 und 7,5 V/cm und differierte nach dem verwendeten Puffersystem und der Agarosekonzentration. Die Fragmentgrößen wurden im Anschluss mittels eines DNA-Größenstandards auf einem Geldokumentationssystem bestimmt.

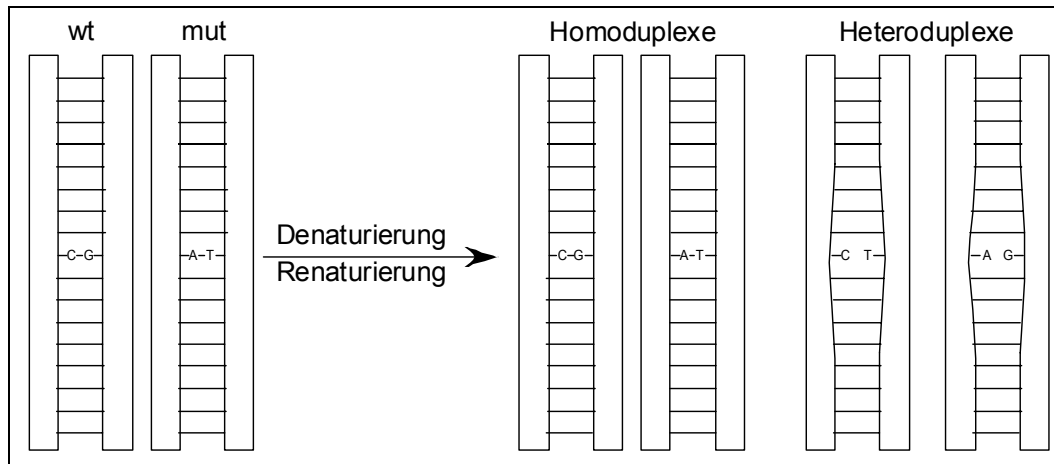
### **2.2.3 Denaturierende-Hochdurchsatz-Flüssigkeits-Chromatografie**

Die Mutationsanalyse wurde auf einem Denaturierenden-Hochdurchsatz-Flüssigkeits-Chromatografen (dHPLC) der Firma Transgenomic (Wave System 3500HT) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von DNA-Heteroduplexen und DNA-Homoduplexen.

Die DNA wird mittels eines Trägermaterials, Triethylammonium Acetat (TEAA), an eine Säulenmatrix gebunden und löst sich je nach Konformation und Länge, welche das Schmelzverhalten festlegen, bei steigender Acetonitrilkonzentration von der Säule ab. Dabei muss die Säule eine für die jeweilige DNA festzulegende Temperatur haben, welche die partielle Denaturierung bewirkt.

Um eine Unterscheidung von nicht mutierten und mutierten DNA-Strängen zu erreichen, müssen die PCR-Produkte zunächst denaturiert werden. Im Anschluss daran kühlt man die Einzelstränge sehr langsam wieder ab. Dabei bilden sich renaturierte DNA-Doppelstränge, bei denen es zur Formation von mutierten mit nicht mutierten DNA-Strängen kommt, welche man als Heteroduplex bezeichnet. Bei Heteroduplexen kommt es zu einer Fehlpaarung zweier oder mehrerer nicht komplementärer Basen, durch welche die Schmelztemperatur des DNA-Doppel-

strangs erniedrigt wird. Die Homoduplexe bilden sich dabei aus jeweils zwei mutierten oder zwei nicht-mutierten DNA-Einzelsträngen.



**Abbildung 2.2.2:** Bildung von Homo- und Heteroduplexen nach Denaturierung und anschließender langsamer Renaturierung.

Die renaturierten Homo- und Heteroduplexe werden dann aus einem Probengefäß automatisch in das System aufgenommen und mit einem Acetonitrilpuffer versetzt. Dieser Puffer besitzt eine niedrige Acetonitrilkonzentration und ist mit TEAA versetzt, welches durch positive Ladungen mit den negativ geladenen Phosphatresten der DNA interagiert, wodurch es zur Bildung eines ungeladenen Ionenpaars kommt. Das TEAA bindet nun mit der DNA mittels seines hydrophoben Teils an die hydrophobe Säulenmatrix. Nach der Bindung der durch die erhöhte Temperatur teilweise schon denaturierten DNA wird die Acetonitrilkonzentration langsam linear erhöht. Dabei löst sich die DNA zu einem definierten Zeitpunkt, da das unpolare Acetonitril um die Bindungsstellen an der hydrophoben Säule mit dem TEAA konkurriert und damit die Interaktion zwischen DNA und Säulenmatrix verhindert. Hierbei lösen sich Heteroduplexe bedeutend früher von der Säule als Homoduplexe. Der durch die Säule fließende Puffer wird an einem UV-Detektor vorbeigeführt, der die Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm erfasst. Die Daten des Detektors werden an eine Software weitergeleitet, welche die gemessene DNA-Menge zu jedem Zeitpunkt der Analyse protokolliert (Abbildung 2.2.3).

Die hier untersuchten Patientenproben wurden pro Exon einzeln amplifiziert. Im Anschluss wurden zwei Patientenamplifikate in einer 96-well-Platte gemischt, wodurch die Detektion homozygoter Mutationsträger ermöglicht wird. Heterozygote Träger eines mutierten Allels werden über die Bildung von Hetero-



duplexen detektiert. Durch das Mischen zweier Patienten-DNAs wird die Bildung von Heteroduplexen für Proben mit homozygotem Basenaustausch ermöglicht. Die Kombination von zwei Patienten-DNAs sollte jedoch nur durchgeführt werden, wenn man annehmen kann, dass nicht zwei Patienten von der gleichen Mutation betroffen sein könnten. Dies ist bei der Parkinson-Krankheit unwahrscheinlich, da von seltenen Mutationen ausgegangen wird. Sollte man mit vielen Mutationen in einem Gen rechnen, so muss man das Amplifikat einer gesunden Person mit dem eines Patienten zusammenbringen. Abweichungen des Schmelzverhaltens in der dHPLC zeigen Sequenzveränderungen in einem Gen auf. Da die dHPLC als *Screening*-Methode keine direkten Analysen auf der Nukleotidebene ermöglicht, wurden auffällige Proben im Folgenden mittels Sequenzierung untersucht.

Für die dHPLC wurden pro Patienten-DNA 10 µl PCR-Amplifikat und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in ein *well* überführt, um ein Endvolumen von 40 µl zu erreichen. Die Probe mit den zwei Patienten-DNAs pro *well* wurde denaturiert und langsam renaturiert. Pro Analyse wurden 5 µl dieser DNA-Probe in einem dHPLC-Lauf eingesetzt.

### **Etablierung der dHPLC**

Für das Mutationscreening mit der dHPLC mussten die einzelnen Exons zunächst etabliert werden. Hierzu wurde die Temperatur des Ofens mit den Einstellungen des Wavemaker-Programms auf eine hohe Bindungskapazität der DNA an die Säule eingestellt. Somit sollte möglichst viel DNA zur gewünschten Elutionszeit von der Säule gelöst und im Detektor als Ausschlag (*Peak*) messbar sein. Der Zeitpunkt der Elution wurde dabei mit der Anfangs- und Endkonzentration des Acetonitrilgradienten eingestellt.

Der Elutionskurve sollte dabei möglichst als scharfe und steile Spitze nach 1½ bis 2 Minuten im Chromatogramm sichtbar sein. Als Verlauf des Gradienten wurde zunächst, wie vom Hersteller angegeben, ein Konzentrationsanstieg zwischen Puffer A zu Puffer B, von 10% gewählt. War aufgrund der Schmelzkurve der DNA im Wavemaker-Programm kein einheitlicher Schmelzpunkt bestimmbar, wurden diese Exons mit zwei unterschiedlichen Einstellungen gemessen.

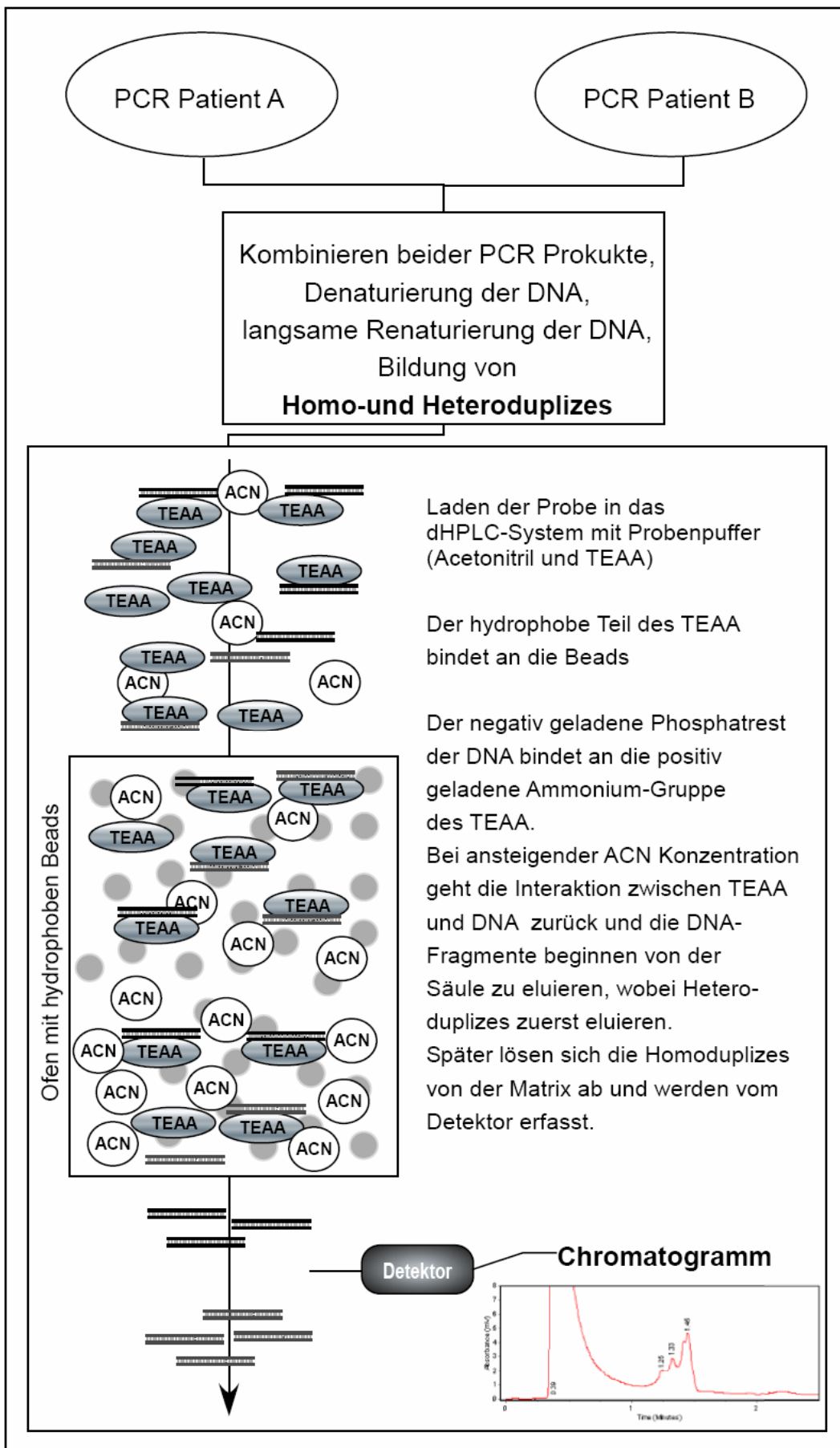


Abbildung 2.2.3: Schematischer Ablauf der dHPLC für das WAVE System.

**Tabelle 2.2:** Einstellungen der dHPLC-Läufe bezogen auf die einzelnen Exons.

Exon	Primer (Exon)	Produktlänge (bp)	Säulentemperatur (°C)	Gradient in % (Puffer A⇒B)
1	1 Fwd - 1 Rev	573	64.2	60-72
1*	177 Fwd - 1 Rev	350	64.2	59-71
2	2 Fwd - 2 Rev	289	61.2 59.8	57-73 57-67
3	3 Fwd - 3 Rev	298	61.5 58.0	55-65 58-68
4	4 Fwd - 4 Rev	116	60.0	46-60
5	5 Fwd - 5 Rev	174	61.0	51-63
6	6 Fwd - 6 Rev	147	60.8 61.0	50-63 51-61
7	7 Fwd - 7 Rev	159	59.5	51-61 50-66
8	8 Fwd - 8 Rev	251	60.5	56-66

Bei einer weiteren Etablierung wurde der Verlauf des Gradienten noch weiter angepasst, um den Verlauf der DNA-Elution zu verbessern. Dies wurde für Exon 2 und Exon 7 durchgeführt. Da es für das *Omi/Htra2*-Gen keine Positivkontrollen mit bekannten Mutationen für alle bzw. einzelne Exons gab, konnten die dHPLC-Einstellungen nur auf eine möglichst hohe Bindungskapazität der DNA optimiert werden (Tabelle 2.2).

### 2.2.4 Zyklische Sequenzierung

Die zyklische DNA-Sequenzierung beruht auf der Methode nach Sanger (Sanger, 1977). Bei ihr wird ein DNA-Strang in 5' → 3' Richtung synthetisiert. Neben den zur Synthese der DNA notwendigen vier Desoxyribonukleotiden werden der Sequenzierreaktion auch die entsprechenden Didesoxyribonukleotide (ddNTP) beigefügt. Sie verfügen am 3'-Kohlenstoffatom nicht über eine Hydroxylgruppe, sondern über ein Wasserstoffatom, ferner fehlt ihnen das 2'-Kohlenstoffatom. Durch diese Modifikation des Nukleotids kann nach dem Einbau in den DNA-Strang kein weiteres Nukleotid eingebaut werden, da dem Didesoxyribonucleotid durch die fehlende OH-Gruppe die Möglichkeit fehlt, mit dem nächsten Nukleotid eine Phosphodiesterbindung auszubilden. Somit kommt es nach dem Einbau eines

ddNTPs zu einem Strangabbruch. Durch das richtige Verhältnis von dNTP und ddNTP Molekülen kommt es bei der zyklischen Sequenzierung an jeder Synthesestelle mehrere Male in der Sequenzierreaktion zu einem Abbruch des Stranges durch ddNTP Moleküle. Durch die Wahl eines komplementären Primers wird der zu sequenzierende Abschnitt der DNA festgelegt. Die DNA-Synthese in 5'→3'-Richtung erfolgt bei der Sequenzierreaktion im Gegensatz zur PCR auf einem DNA-Strang. Die ddNTP Moleküle sind über Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch markiert und können nach der Sequenzierreaktion und einer Aufreinigung in einem Sequenzierautomaten analysiert werden. Die synthetisierte DNA wird im Sequenzierautomaten denaturiert und über ein denaturierendes Gel in einer Kapillare nach ihrer Größe aufgetrennt. Die über die ddNTPs endmarkierten Einzelstränge werden nun durch die zeitliche Detektion der Fluoreszenzmarkierung zugeordnet, wodurch sich Base für Base die entsprechende Sequenz ergibt. Für die Sequenzierung wurde das CEQ8000 System von Beckmann Coulter eingesetzt. Die entsprechenden Sequenzierreaktionen wurden in einem 20 µl Ansatz pipettiert und setzen sich wie folgt zusammen:

Reagenz/Komponente	Endkonzentration
Aufgereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid DNA	200-500 ng
Sequenzierprimer	0,25 µM
DTCS <i>Quick Start Mastermix</i>	4 µl

Das durchgeführte *Cycler*-Programm umfasste die folgenden Schritte:

<i>Cycle-Sequencing</i> -Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95,0°C	1:00	
Zyklische Denaturierung	95,0°C	0:20	} 30x
<i>Annealing</i>	52,0°C	1:00	
Strangsynthese	60,0°C	4:00	
Aufbewahrung	4,0°C	∞	

Nach der Sequenzierreaktion wurde die weitere Polymeraseaktivität durch Zugabe von Stop-Lösung gehemmt und die Reaktion im Anschluss durch eine Ethanol-fällung aufgereinigt. Das DNA-Pellet wurde in einem denaturierenden Puffer (SLS – *Sample loading solution*) der Firma Beckmann gelöst und zur Sequenzierung in den Sequenzierautomaten geladen.

### 2.2.5 Pyrosequencing

Das *Pyrosequencing* ist eine direkte Sequenzierung, die durch die Detektion von Pyrophosphat (PPi) während der Strangsynthese durchgeführt wird. Das Pyrophosphat wird dabei als Lichtemission von einem Detektor nach einer enzymatischen Reaktion quantitativ erfasst.

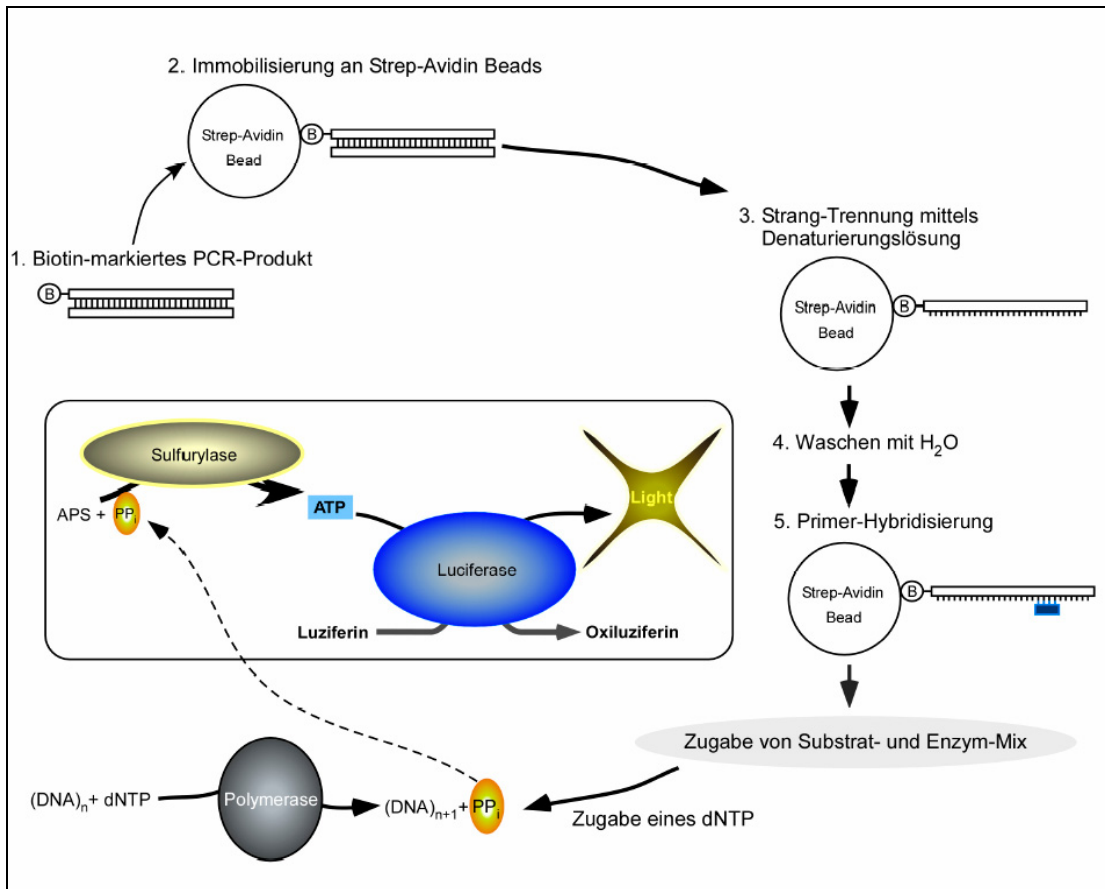
In einer Probenvorbereitung wird ein PCR-Produkt, welches mit einem Biotin-markierten Primer amplifiziert wurde, an Streptavidin-gekoppelte magnetische Kügelchen immobilisiert. Die Immobilisierung an die magnetischen Kugeln dient der Bindung des zu untersuchenden DNA-Strangs bei der weiteren Probenvorbereitung.

Die gebundenen PCR-Amplifikate werden zuerst mit 0,5 M NaOH denaturiert, so dass nur noch der Biotin-markierte DNA-Strang an den Kugeln haftet und der komplementäre Strang verworfen werden kann. Im Anschluss wird ein, dem Biotin-markierten Strang komplementärer Primer, bei 80°C hybridisiert, welcher kurz vor der zu untersuchenden Stelle auf der immobilisierten DNA spezifisch bindet.

Im *Pyrosequencer* werden der Probe in einem nächsten Schritt die zur Reaktion notwendigen Substrate und Enzyme beigelegt:

1. Durch Zugabe eines passenden dNTP wird durch die katalytische Reaktion der Polymerase, ein Pyrophosphat freigesetzt. Die freigesetzte Menge an Pyrophosphat ist äquivalent zur eingefügten Menge an dNTPs in den Strang.
2. Das freie Pyrophosphat wird durch das Enzym *Sulfurylase* in Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat zu ATP umgesetzt.
3. Luziferin wird dann durch das Enzym *Luziferase* mittels des ATP zu Oxiluziferin katalysiert. Hierdurch kommt es zu einer Lichtemission, die der Menge an freiem ATP äquivalent ist und die durch eine CCD-Kamera protokolliert wird. Die Stärke des gemessenen Lichtsignals ist der Menge an synthetisierten dNTPs gleichzusetzen.
4. Durch das Enzym *Apyrase* werden verbleibende Nukleotide und verbleibendes ATP abgebaut, so dass das nächste dNTP zur Reaktion gegeben werden kann. Da dATP ebenfalls als Substrat für die *Luziferase* dienen kann, wird zur Strangsynthese in der *Pyrosequencing*-Reaktion

dATP $\alpha$ S verwendet. Dieses Nukleotid wird von der Polymerase erkannt, dient der *Luciferase* jedoch nicht als Substrat (Abbildung 2.2.4).



**Abbildung 2.2.4:** Schematischer Ablauf des *Pyrosequencings*. Im 1. zum 2. Schritt wird das PCR-Produkt immobilisiert und in Schritt 3 werden der nicht-markierte Strang und der immobilisierte Strang getrennt. Schritt 5 zeigt die Hybridisierung des Primers. Danach kommt es zur eigentlichen Sequenzierreaktion, die im Text näher erläutert ist.

Die PCR zum *Pyrosequencing* des Kontrollkollektives der G421T Basensubstitution wurde mit einem Biotin-markierten Vorwärtsprimer (<sup>Biotin</sup>-5'-CCGGT TGTCTGTTGGGGTCA-3') amplifiziert. Bei der Sequenzierung kam ein reverser Primer (5'-GACTCCGGGGAGAA-3') zum Einsatz, der mit Hilfe des Online-Tools der *Pyrosequencing*-Webseite (<http://www.pyrosequencing.com>) ausgewählt wurde. Die einzelnen Schritte wurden nach den Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.6 Restriktionsanalyse

Typ II - Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen spalten. Sie erkennen ihre spezifische Schnittstelle durch eine für jedes Enzym spezifische Basenabfolge in einem DNA-Strang. Es gibt dabei Enzyme, welche die DNA ohne Überhang eines Stranges abschneiden (*blunt-end*) und solche, die einen komplementären Strangübergang pro geschnittener Hälfte zurücklassen (*sticky-end*).

Restriktionsendonukleasen wurden im Rahmen der Arbeit für Klonierungen (vgl. 2.2.8) und zur PCR-Restriktionsanalyse verwendet.

Eine Restriktionsanalyse wird möglich, wenn durch das Auftreten einer Mutation in der DNA eine vorhandene Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym zerstört wird und es den DNA-Strang nicht mehr spalten kann oder im umgekehrten Fall eine neue Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease durch eine Mutation erzeugt wird. In beiden Fällen kann man somit ein Wt-PCR-Produkt von einem mutierten PCR-Produkt aufgrund der Fragmentlänge des DNA-Strangs unterscheiden.

Restriktionsendonukleasen benötigen für ihre Aktivität bestimmte Pufferbedingungen und Temperaturen, die jedem Enzym spezifisch zuzuordnen sind. Für die Restriktionsanalyse wurde beim Einsatz einer Restriktionsendonuklease folgender Restriktionsansatz verwendet:

Reagenz/Komponente	Endkonzentration
10x Puffer	1 X
DNA	250-2000 ng
Restriktionsendonuklease	0,5-3 U

Je nach Anbieter der Enzyme musste der Reaktion noch BSA zugesetzt werden. Die Reaktion erfolgte nach der für das Enzym entsprechenden Temperatur für 8-16 Stunden.

Die Methode wurde zum *Screening* des Kontrollkollektives für die G1195A Basensubstitution in Exon 7 angewendet. Als Restriktionsenzym wurde *MvaI* verwendet, welches das Wt-Amplifikat von Exon 7 schneidet.

### **2.2.7 Haplotypisierung genomischer DNA-Abschnitte**

Mittels der Haplotypisierung lässt sich feststellen, ob auch unter nicht-offensichtlich verwandten Personen ein genetischer Zusammenhang bezüglich eines krankheitsauslösenden Allels bestehen könnte. Hierzu muss gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Mutation auf chromosomaler Ebene und flankierenden polymorphen Markern bei den Betroffenen besteht. In dieser Arbeit wurden als Marker UniSTS Marker (Mikrosatellitenmarker) und SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) verwendet. Bei den Mikrosatellitenmarkern handelt es sich um *sequence-tagged sites*, welche ihre polymorphe Eigenschaft durch eine unterschiedliche Anzahl an Di-, Tri- oder Tetranukleotid-Wiederholungen bzw. VNTRs erlangen. Bei den SNPs handelt es sich um einzelne Basenaustausche. Die Genotypen dieser Marker kann man im Falle der STS-Marker über denaturierende Gele bestimmen, die auch kleinste Größenveränderungen eines kurzen DNA-Fragments zeigen. Die SNP-Marker können über Restriktionslängen-Polymorphismen oder durch Sequenzierung bestimmt werden.

#### **2.2.7.1 Untersuchung von Mikrosatellitenmarkern**

Die Mikrosatellitenmarker für die HEX-markierte Primer vorlagen wurden auf einem Gel-Scan 2000 untersucht, andernfalls durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Silbernitratfärbung detektiert.

##### **Untersuchung von Mikrosatellitenmarkern mittels Gel-Scan**

Bei einem *real-time* Fragmentanalyse-System wie dem Gel-Scan 2000 muss einer der beiden Primer durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Beim Lauf des Gels wird eine Stelle am Ende der Laufstrecke von einem Laser angestrahlt und die auftretenden Signale mittels eines Detektors über die Laufzeit visualisiert. Das Gel wird dann über eine Software ausgewertet, worauf man die Banden an einem Computer analysieren kann.

Da bei kurzen DNA-Fragmenten eine korrekte Bestimmung der Fragmentlängen nur über Einzelstränge möglich ist, wurden denaturierende Polyacrylamidgele eingesetzt, die sich wie folgt zusammensetzen:



Reagenz/Komponente	Endkonzentration
Acrylamid	4,5 %
Harnstoff	8 M
10x TBE Puffer	6,2 %
TEMED	0,005 %
APS	0,1 %

Als Ladepuffer diente deionisiertes Formamid mit 0,1% Bromphenolblau. Die Proben wurden mit dem Ladepuffer für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die DNA zu denaturieren und im Anschluß auf das Gel geladen. Die Laufzeit betrug bei einer konstanten Spannung von 880 V 120 Minuten.

#### **Visualisierung von PAA-DNA-Gelen mittels Silberfärbung**

Will man die DNA in denaturierenden PAA-Gelen ohne markierte Primer auswerten, muss man die DNA im Gel visualisieren. Eine DNA-Visualisierung wird hierbei durch eine Silberfärbung nach Budowle und Allen (1990) erreicht.

Das Gel hatte folgende Komposition:

Reagenz/Komponente	Endkonzentration
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40 (29:1)	4,5 %
Urea	8 M
10x TBE Puffer	1 x
TEMED	0,005 %
APS	0,1 %

Als Ladepuffer wurde 1x TBE-Puffer mit 8% Ficoll (Typ 400) und 0,01% Bromphenolblau verwendet. Für den Lauf des Gels wurde eine konstante Spannung von 250 Volt für 1,5 Stunden angelegt, als Laufpuffer diente 1x TBE. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt (Allen, 1989).

#### **2.2.7.2 Untersuchung von SNP Markern**

Bei *single nucleotide polymorphisms* handelt es sich um Stellen in der genomischen DNA, an denen unterschiedliche Basen vorkommen können und es somit zu hochpolymorphen Allelen kommt. Da es sich hierbei normalerweise um Basensubstitutionen handelt, welche keine Veränderung der genomischen DNA in

ihrer Länge nach sich ziehen, können SNPs schlecht über Gele visualisiert werden. Durch die Veränderung der Nukleotidsequenz können jedoch Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen verändert werden. In diesem Fall macht man sich die Unterschiede der Fragmentlängen nach einer Restriktion zunutze, um auf die jeweiligen Allele zu schließen. Bei vielen SNPs können jedoch Restriktionsenzyme nicht eingesetzt werden, da es zu keiner veränderten Erkennungssequenz kommt. In diesen Fällen muss man die entsprechenden Sequenzabschnitte sequenzieren oder mittels Sonden nachweisen.

Hier wurden die Allele der SNP-Marker entweder durch Restriktionsenzyme nachgewiesen oder beim Fehlen einer Erkennungssequenz direkt mittels zyklischer Sequenzierung untersucht.

### **2.2.8 Klonierung**

In dieser Arbeit wurden ausschließlich eukaryotische Expressionsplasmide verwendet, bei denen unterschiedliche Peptid-Erkennungssequenzen (*Epitop-Tags*) zu einer besseren Detektion an die eingefügte kodierende Sequenz eines Gens angebunden werden. Protein-spezifische Antikörper sind nicht für jedes Protein erhältlich. Aus diesem Grund bedient man sich der *Epitop-Tags*, die eine kurze Peptid-Erkennungssequenz an das eigentliche Zielprotein anfügen. Durch diese Fusion des Zielproteins mit dem Epitop ist es nun möglich, Epitop-spezifische Antikörper zu verwenden, um das Zielprotein zu markieren.

Bei der Klonierung wird ein Leervektor und der einzufügende kodierende DNA-Abschnitt (*Insert*) zunächst mittels einer oder zweier Restriktionsendonukleasen gespalten. Nach einer Aufreinigung wird der DNA-Abschnitt dann durch das Enzym DNA-Ligase mit den gespaltenen Enden des Vektors verbunden.

#### **Plasmide**

Plasmide bestehen aus einem zirkulären DNA-Doppelstrang und besitzen neben prokaryotischen Merkmalen zur Propagierung des Plasmids in Bakterien, eine multiple Klonierungsstelle mit mehreren Schnittstellen für Restriktionsenzyme und eine Antibiotika-Resistenz zur Selektion. Die hier eingesetzten Plasmide verfügen ferner über einen viralen CMV Promotor, der die einklonierte kodierende Sequenz in eukaryotischen Zellen zur Expression bringt. Einige Plasmide verfügen über einen Selektionsmarker für eukaryotische Zellen.

Folgende Plasmide wurden für Klonierungen verwendet:

- pCMV-Tag4A
- pcDNA3.1<sup>TM</sup>/myc-His B
- pcDNA3.1<sup>TM</sup>/V5-His TOPO<sup>®</sup> TA

### **Klonierung des Omi/HtrA2-pCMV-Tag4A-Vektors**

Zur Expression der kodierenden Sequenz des *Omi/HtrA2*-Gens wurde eine cDNA des *Omi/HtrA2*-Gens amplifiziert. Hierzu wurden Primer verwendet, die Restriktionsschnittstellen trugen, welche zur Klonierung in den pCMV-Tag4A Vektor dienten. Es wurden am 5'-Terminus der cDNA Erkennungssequenzen von *Eco32I* und am 3'-Terminus von *XhoI* als Restriktionsschnittstellen verwendet. Die PCR Primer (vgl. 2.1.8) trugen am 5'-Ende noch einen kurzen Überhang, um die Erkennung durch die Restriktionsenzyme zu gewährleisten. Die eingefügte Sequenz wurde laut der *NCBI accession number AC005041* verifiziert.

### **Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten**

Für die Klonierung wurden immer zwei Restriktionsendonukleasen verwendet, die über eine unterschiedliche Erkennungssequenz verfügen. Dies stellt bei der anschließenden Ligation sicher, dass der eingefügte DNA-Abschnitt mit der korrekten Orientierung in das Plasmid eingefügt wird und verhindert gleichermaßen, dass der geschnittene Vektor mit sich selbst religiert. War ein paralleler Verdau nicht möglich, wurde zuerst mit einem Enzym restringiert und im Anschluss nach einer Gelaufreinigung (vgl. 2.2.9) mit dem zweiten Enzym geschnitten.

Um die kurzen von Plasmid und *Insert* abgespaltenen DNA-Fragmente zu entfernen, folgte im Anschluss eine Aufreinigung mittels des Qiagen PCR-Purification Kits, welches DNA-Fragmente unter 50 Basenpaaren ausschließt. Um jegliche Möglichkeit einer Religation zu vermeiden, wurde der geschnittene Vektor noch an seinen 5'-Enden dephosphoryliert.

#### **2.2.8.1 Desphosphorylierung von Vektor-DNA**

Um ein Religieren von partiell geschnittener Vektor-DNA zu unterbinden, kann man die restringierten Vektoren an ihren 5'-Enden dephosphorylieren. Hierzu wurde das Enzym *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) verwendet. Für den Ansatz wurde ein Volumen von 20 µl gewählt und nach Zugabe des hersteller-spezifischen Puffers etwa 2 µg Vektor-DNA und 1 µl SAP verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei

65°C für 15 Minuten, um die Vektor-DNA ohne weitere Aufreinigungsschritte weiterverwenden zu können.

### **2.2.8.2 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Ligation von restringierten DNA-Fragmenten wird das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet. Die T4 Ligase katalysiert die Formation von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Terminus in doppelsträngiger DNA, womit die *Insert*-DNA mit der Vektor-DNA verbunden wird. Für die Reaktion wurde die DNA in einem *Insert*:Vektor-Verhältnis von 4:1 zugegeben, 2 µl des 10X Reaktionspuffers und 1 U Ligase verwendet. Der Reaktionsansatz wurde auf 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

### **2.2.8.3 Hitze-Schock-Transformation**

Für die Transformation der ligierten Plasmide wurden chemisch kompetente Bakterien des Stammes DH5α verwendet. Kompetenz bedeutet in diesem Falle die Fähigkeit der Bakterien, Plasmide durch die Zellmembran aufzunehmen. Die Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Für jeden Ansatz wurde 1-10 µl Ligationsansatz verwendet und für fünf Minuten auf Eis gestellt; pro Transformationsansatz 100 µl kompetente Bakterien zugegeben, vorsichtig mit der DNA vermischt und für 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 90 Sekunden, worauf eine 30 Sekunden lange Abkühlung auf Eis erfolgte. Im Anschluss wurde jeweils 500 µl LB-Medium auf die Bakterien gegeben und für 60 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei kommt es bei den Bakterien zur Teilung und dem Aufbau einer intakten Membran. Im Anschluss plattierte man die Bakterien auf antibiotikahaltigen LB-Platten aus und selektierte über Nacht bei 37°C auf positive Transformanten.

### **2.2.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe aus einem Pool verschiedener Fragmentgrößen zu isolieren, kann man die DNA nach ihrer Größe in einem Agarosegel auftrennen und das gesuchte Fragment aus dem Gel mittels eines Skalpell oder Messers ausschneiden. Um die DNA aus dem Trägermaterial zu isolieren, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet.

Das Prinzip der Qiagen Aufreinigungsmethode beruht auf dem Bindungsverhalten der DNA an eine Silicia-Gel-Membran unter dem Einfluss eines Puffers mit hoher

Konzentration an chaotrophen Salzen. Die DNA bindet an die Membran, wobei sehr kurze DNA-Fragmente, wie z.B. Primer, und Verunreinigungen durch die Säule passieren. Nach dem Bindungs- und einem Waschschrift kann man die gereinigte DNA mittels Tris-Puffer oder Wasser wieder von der Säule eluieren. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Um die gereinigte DNA zu eluieren, wurde 35 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert.

### **2.2.10 Präparation von DNA aus Bakterien**

Bei der Präparation der Plasmid-DNA kann man zwischen unterschiedlichen Maßstäben unterscheiden.

#### **Minipräparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Format impft man eine Übernachtskultur eines Bakterienklons in LB Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker an. Die Bakterien werden nach der Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 6.000 rpm für 5 Minuten pelletiert und in 150 µl Puffer L1 resuspendiert. Die Membran der Bakterien wird mittels alkalischer Lyse durch Zugabe von 300 µl Puffer L2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert, wodurch die Plasmide aus den Zellen austreten. Um die Lyse abzustoppen, gibt man 225 µl Puffer L3 zu und inkubiert nochmals für 5 Minuten, wobei die Membranpartikel der Bakterien nun als flockige, weiße Partikel zu sehen sind. Angeschlossen wird ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 5 Minuten, nach dem man den klaren Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol versetzt. Um die DNA durch das Isopropanol zu fällen, schließt man eine Inkubation von 5 Minuten an und zentrifugiert dann für 10 Minuten bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur, gefolgt von einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol. Nachdem man den Ethanol mit einer Pipette abgezogen hat, lässt man das DNA-Pellet bei RT für etwa 30-60 Minuten trocknen und resuspendiert dann mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest+RNase</sub>. Die so aufgereinigte DNA kann nun mittels eines Photometers auf ihre Konzentration bestimmt werden. Der Reinheitsgrad der durch alkalische Lyse und Isopropanolfällung gewonnenen DNA ist zur weiteren Verwendung bei Sequenzierung, Restriktionsverdau, PCR usw. ausreichend, sollte aufgrund etwaiger Verunreinigungen jedoch nicht zur Transfektion von Zellkulturen verwendet werden.

### **Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA mittels QIAGEN-Kit**

Die Isolation der Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgt durch die Aufreinigung an einer Säule. Bei den Midi- und Maxi-Aufreinigungssäulen handelt es sich um Anion-Austauschersäulen, bei denen die DNA unter niedrigen Salz- und pH-Bedingungen gebunden wird. RNA, Proteine und Verunreinigungen werden durch Waschen mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration abgeschieden, worauf im Anschluss eine DNA-Elution durch hohe Salzkonzentrationen folgt. Das Eluat wird dann mittels Isopropanol präzipitiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und im Anschluss getrocknet. Das DNA-Pellet wird durch  $H_2O_{bidest}$  oder einen Tris-Puffer wieder in Lösung gebracht. Die so gewonnene DNA ist hochrein und kann für jegliche Weiterverwendung benutzt werden.

#### **2.2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Basen der Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht, wodurch man die Konzentration der Nukleinsäuren in einer Lösung messen kann. Eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht dabei 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde in einem Spektralphotometer mit einer Quarzküvette gemessen. Das Küvettenvolumen betrug 100  $\mu\text{l}$ , wobei die DNA in einer 1:100 Verdünnung mit Wasser gemessen wurde. Durch Messung der Lösung bei 280 nm wurde anhand des Verhältnisses der  $OD_{260\text{nm}}$  und  $OD_{280\text{nm}}$  auch die Reinheit der DNA überprüft. Die resultierende DNA-Konzentration wurde anhand der Formel  $c[\text{DNA}] = 50 \times A_{260} \times 100$  berechnet.

#### **2.2.12 In-vitro Mutagenese**

Um in klonierten Plasmiden Mutationen zu erzeugen, wurde das QuikChange<sup>™</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Mit Hilfe dieser Methode kann man sequenzspezifische Mutationen, wie Substitutionen, Deletionen oder Insertionen von ein bis zwei Basen in Plasmide einfügen, um die Funktion bestimmter, z.B. bei Patienten gefundener Mutationen, auf Proteinebene zu untersuchen.

Bei diesem Verfahren wird ein sich nahezu überlappendes Primerpaar, welches jeweils zu den gegenüberliegenden DNA-Strängen des Vektors komplementär ist, synthetisiert. Dieses Primerpaar enthält die gewünschte Mutation in der Mitte. Mit Hilfe dieser Primer wird eine PCR mit *Pfu*-Polymerase durchgeführt, so dass

nachher Stränge des Ausgangsplasmids und neu synthetisierte Stränge mit der Mutation vorliegen. Durch Zugabe von *DpnI*, einer Restriktionsendonuklease, welche ausschließlich methylierte und hemimethylierte DNA spaltet, wird nun das Ausgangsplasmid zerstört, um das synthetisierte Plasmid mit der Mutation zu selektieren. Die so selektionierte Plasmid-DNA wurde in hochkompetente Bakterien transformiert und durch das Ausplattieren auf antibiotikahaltige LB-Agaroseplatten auf erfolgreiche Transformanten selektiert. Für jede Mutagenese wurden etwa 10 Klone auf eine erfolgreiche Mutagenese ansequenziert und ein Klon mit der mutagenisierten Sequenz nochmals auf der kompletten Länge der kodierenden Sequenz des *Inserts* via zyklischer Sequenzierung kontrolliert.

**Durchführung der *in vitro* Mutagenese:**

PCR

Für die PCR wurde jeweils ein 50 µl Ansatz in einem 200 µl PCR Gefäß angesetzt.

Reagenz/Komponente	Endkonzentration
10X Reaktionspuffer	1 x
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 1,0 mM
5'-Primer	1,25 µM
3'-Primer	1,25 µM
Ursprungsplasmid	50 ng
DNA-Polymerase	2,5 U

Thermocycler Programm

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95,0°C	0:30	
Zyklische Denaturierung	95,0°C	0:30	} 16 x
<i>Annealing</i>	55,0°C	1:00	
Elongation	72,0°C	x	
Abkühlung	8,0°C	∞	

x: Je 1 kb Vektorgröße, eine Minute Synthesezeit

### Selektion synthetisierter DNA

Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  *DpnI* zur PCR Reaktion und Inkubation bei 37°C für 1 h.

### Transformation

Es wurden 1-5  $\mu\text{l}$  des selektionierten Mutagenese-Ansatzes in ein Reaktionsgefäß mit hochkompetenten Bakterien gegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 Sekunden, danach inkubierte man die Zellen für 30 Sekunden auf Eis. Im Anschluss folgte die Inkubation für 60 Minuten bei 37°C in 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium unter geringem Schütteln. Nach der Inkubation wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agaroseplatten mittels Antibiotikum über Nacht bei 37°C selektioniert.

## **2.2.13 Herstellen chemisch kompetenter Bakterien**

Für die Hitzeschock-Transformation kann man mittels der RbCl-Methode (Sambrook et al., 1989) kompetente Bakterien selbst herstellen. Hierzu impft man eine Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes in LB-Medium an. Von dieser Übernachtskultur werden am folgenden Tag drei Milliliter in 400 ml LB Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von  $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,6$  stoppt man den Wachstumsprozess, indem man die Bakterien auf Eis für 5-10 Minuten abkühlt. Im Anschluss pelletiert man die Bakterien mittels Zentrifugation bei 3.000 g für 10 Minuten bei 4°C und verwirft das Kulturmedium. Das Pellet wird dann in einem 2/5 Volumen TfbI-Puffer resuspendiert, fünf Minuten auf Eis inkubiert und wieder bei 3.000 g für 10 Minuten pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 1/25 Volumen des Startvolumens mit TfbII-Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit kann man Aliquots in gewünschten Volumina abfüllen und in flüssigem Stickstoff oder Ethanol-Trockeneis einfrieren. Die so hergestellten chemisch kompetenten Zellen sind für 1-2 Jahre bei -70°C lagerfähig.

## **2.2.14 Herstellen von Bakterien-Glycerin-Stocks**

Für die Generierung von Bakterienstocks zur Langzeitaufbewahrung wurden 700  $\mu\text{l}$  einer  $\bar{u}\text{N}$ -Kultur des jeweiligen Bakterienklons in ein Kryoröhrchen überführt und mit 500  $\mu\text{l}$  einer 50%igen (v/v) Glycerinlösung vermischt. Diese Suspension wurde schnellstmöglich bei -80°C tiefgefroren.



### 2.2.15 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien, welche in Abschnitt 2.1.6.2 dargestellt sind, wurden in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bei 37°C in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden jeweils bei Erreichen eines konfluenten Stadiums in neue Zellkulturflaschen verbracht. Nach Absaugen des Mediums wurde hierzu zuerst ein Waschschriff mit PBS durchgeführt, um das Serum des Mediums von den Zellen zu entfernen, da Serum die Wirkung von Trypsin hemmt. Nach Entfernen des PBS wurde jeweils 1 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und für 2-3 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml frischem Kulturmedium wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt und die Zellen mit Hilfe der Pipette mehrere Male resuspendiert, um aneinanderhängende Zellverklumpungen zu trennen. Zur fortlaufenden Kultivierung wurden etwa 2 Millionen Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und mit 10 ml Medium aufgefüllt.

Zum Aussäen der Zellen für spezifische Experimente oder zur Mikroskopie wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierzu zählt man vier Quadrate in der Zählkammer aus und bildet aus dem Ergebnis den Mittelwert. Den berechneten Mittelwert setzt man dann in folgende Formel ein:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl}_{\text{Neubauer-Zählkammer}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Die Zellen wurden dann entsprechend der gewünschten Zellzahl ausgesät.

#### 2.2.15.1 Einfrieren von Zellen

Zellen, die zur Langzeitlagerung eingefroren werden sollten, wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen anwachsen gelassen, bis sie eine 80%ige - 90%ige Konfluenz aufwiesen. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mittels Trypsin aus der Kulturflasche abgelöst und mit 10 ml frischem Medium in ein steriles Kunststoffröhrchen überführt, in dem sie für 5 Minuten bei 1.200 rpm abzentrifugiert wurden. Nach Absaugen des Überstandes resuspendierte man die Zellen in 1,5 ml Einfriermedium I, verteilte je 500 µl der Zellsuspension auf 3 Kryoröhrchen und inkubierte für 10 Minuten auf Eis. Nach der Inkubation tropfte man 500 µl Einfriermedium II unter leichtem Schütteln in jedes Röhrchen. Die Zellen wurden dann schnellstmöglich in einem isolierten Behälter bei -80°C eingefroren, um eine langsame Abkühlung zu gewährleisten. Nach 24-48 Stunden wurden die Zellen dann in einer -150°C Gefriertruhe gelagert.

## 2.2.16 Transfektion

Mittels der Transfektion ist es möglich, fremde Nukleinsäuren oder Proteine in eine Zelle einzuschleusen. Bei Nukleinsäuren kann es sich um DNA sowie RNA-Konstrukte handeln, die dann in der Zelle exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden liposomale und Lipid-Komplex-Transfektionsreagenzien eingesetzt.

### 2.2.16.1 Transfektion mit FuGENE 6

FuGENE 6 ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, welches mit der DNA einen Lipid-DNA-Komplex bildet, der bei der Transfektion in die Zellen transportiert wird.

Bei der FuGENE 6-Transfektion muss man die Zellen einen Tag vor der Transfektion aussäen, so dass sie am folgenden Tag eine 50-80%ige Konfluenz aufweisen. Hierzu wurden für ein 35mm-*well* einer 6-*well*-Platte entweder 700.000 HEK293 oder 1 Mio. SH-SY5Y Zellen ausgesät und mit dem normalen Kulturmedium über Nacht anwachsen gelassen. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml frischem Medium versorgt, bevor die Transfektion durchgeführt wurde. Die DNA wurde in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit Optimem verdünnt und mit dem Vortexer vorsichtig gemischt. Für jede Transfektion wurde eine DNA-Konzentration zwischen 1 und 2  $\mu$ g DNA gewählt. Die Menge an FuGENE 6 wurde in einem Verhältnis FuGENE 6:DNA von 2:1 berechnet, in einem Volumen von 50  $\mu$ l Optimem verdünnt, gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden 50  $\mu$ l der FuGENE 6-Verdünnung zur DNA-Verdünnung gegeben und gemischt. Um die DNA-Lipid-Komplexe zu bilden, wurde das Gemisch nun für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 100  $\mu$ l der Lösung auf ein *well* getropft und durch leichtes Schwenken der 6-*well*-Platte im Kulturmedium des *wells* verteilt. Bei der Verwendung von 24-*well*-Platten wurde maximal 1  $\mu$ g/*well* DNA verwendet, die Gesamtmenge an Optimem auf 50  $\mu$ l/*well* reduziert.

### 2.2.16.2 Transfektion mit Metafectene

Metafectene ist ein polykationisches liposomales Transfektionsreagenz, welches beim Aufeinandertreffen mit DNA einen DNA-Lipid-Komplex ('Lipoplex') bildet. Dieser wird von den Zellen durch Endozytose der äußeren Zellmembran aufgenommen und bildet ein Lipoplex beinhaltendes Endosom, in welches nun

H<sup>+</sup>-Ionen aufgenommen werden. Durch die säurepuffernde Wirkung des kationischen Lipid-Komplexes kommt es zu keinem Anstieg des Säuregrades im Lumen der Endosomen, von welchen nun die Membranen aufgrund des osmotischen Drucks aufreißen und den DNA-Lipid-Komplex in das Zytosol freisetzen.

Bei der Transfektion mit Metafectene kann man die Zellen am gleichen Tag aussäen und transfizieren. Hierzu wurden die Zellen in 2 ml Medium ausgesät, für 1-2 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend ohne einen weiteren Medienwechsel transfiziert. Die eigentliche Transfektion mit Metafectene wird ähnlich wie die FuGENE 6 Transfektion durchgeführt. Hierzu legt man 25 µl Optimem in einem Reaktionsgefäß vor und gibt die berechnete Menge an Metafectene hinzu und resuspendiert mit der Pipette. Die DNA mischt man mit Optimem in einem weiteren Reaktionsgefäß, wobei das Verhältnis zwischen Metafectene und DNA bei SH-SY5Y Zellen bei 3:1 liegt, für HEK293 bei 2:1. Die Metafectene-Optimem Lösung wird für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die DNA-Verdünnung gegeben, mittels dem Vortexer gemischt, kurz abzentrifugiert und für 10-15 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit, während der sich die Lipid-DNA-Komplexe gebildet haben, wird die Lösung auf die Zellen gegeben.

### **2.2.17 Generierung von stabil exprimierenden Zelllinien**

Im Rahmen dieser Arbeit dienten stabil exprimierende Zellen der Mikroskopie und Apoptose-*Assays*. Bei den Testsystemen wäre durch transiente Transfektion keine Aussage über die Transfektionseffizienz möglich. Dadurch hätte die Messung von nicht-transfizierten Zellen die Ergebnisse verfälscht.

Für die Generierung von stabilen Zellen, welche das pCMV-Tag4A-Omi/HtrA2 dauerhaft exprimieren, konnte die Neomycin-Resistenz des pCMV-Tag4A Vektors verwendet werden. Hierzu wurden HEK293 und SH-SY5Y Zellen transfiziert und für 12 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf zwei Kulturschalen aufgeteilt und über Nacht anwachsen gelassen; am nächsten Tag das Kulturmedium gegen Selektionsmedium ersetzt. Beim Selektionsmedium handelte es sich stets um das Kulturmedium für die jeweilige Zelllinie, welches mit sterilem G418 versetzt wurde. Für HEK293 wurde dabei eine Konzentration von 0,7 mg/ml G418 und für SH-SY5Y eine Konzentration

von 1,0 mg/ml gewählt. Als Kontrolle für eine positive Selektion der exprimierenden Zellen wurden jeweils zwei *wells* der Kulturplatten, welche untransfizierte Zellen enthielten, mit dem Selektionsmedium versetzt. Waren hier alle Zellen durch das G418 abgetötet, war die Selektion positiv und die Expressionslevel der Omi/HtrA2 - FLAG Konstrukte wurden in einem Western-blot verglichen. Für die folgenden Experimente kamen nur Zellen mit nahezu gleichen Expressionsleveln zur Verwendung. Bei den so generierten, stabil exprimierenden Zellen, handelte es sich immer um polyklonale stabile Zelllinien.

### **2.2.18 Herstellung von Proteinlysaten**

Um Proteine aus Zellen einer Zellkultur zu isolieren, müssen die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. Eine schonende Methode ist dabei die Zerstörung der Zellmembran durch nicht-ionische Detergenzien wie Triton X-100. Dieses Detergenz löst dabei sowohl die Zellmembran als auch die Membran von Zellorganellen auf und solubisiert teilweise membrangebundene Proteine. Mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine und einen Teil membrangebundener Proteine kann man allein mit diesen Detergenzien jedoch nicht in Lösung bringen. Die in dieser Arbeit zu isolierenden Proteine konnten alle mittels Triton X-100-Aufschluss lysiert werden.

Um eine Degradation der Proteine durch Proteasen zu verhindern, wurde dem Lyse-Puffer der Protease-Inhibitor Complete der Firma Roche zugefügt. Er setzt sich aus einem Cocktail unterschiedlicher Protease-Inhibitoren zusammen. Complete schützt dabei vor Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen, wogegen das EDTA-freie Complete nicht gegen Aspartatproteasen schützt.

Zum schonenden Aufschluss der Zellen wurden die Proteinlysate auf Eis hergestellt:

Das Medium der Zellen wurde abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 100 µl Trypsin aus der Zellkulturschale gelöst. Nach dem Überführen der Zellen wurden die Zellen bei 1.200 g für 4 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 300 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Membranreste durch Zentrifugation bei 15.000 g für 30 Minuten pelletiert und der Überstand als Zelllysat weiterverwendet.

### 2.2.19 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus Proteinlysaten wurde mit dem Bradford-*Assay* (Bradford, 1976) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine colorimetrische Methode, durch die mittels Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm auftritt. Die Farbintensität wird hierbei hauptsächlich durch die Menge an kationischen und unpolaren, hydrophoben Aminosäurenresten der Proteine verursacht, an die der Farbstoff bindet. Mit der Methode können schon sehr geringe Mengen an Protein nachgewiesen werden. Um die eigentliche Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, muss man durch die Messung eines Referenzproteins mit vorgegebenen Konzentrationen eine Eichkurve der Absorptionsmaxima bei 595 nm erstellen, auf der man dann die Konzentration der Probe bestimmen kann. Die exakte Bestimmung durch die Berechnung der Eichkurven wurde dabei von programmierbaren Photometern durchgeführt. Die Eichgerade wurde durch Konzentrationen von 0 bis 12 µg Protein gebildet, von den Lysaten wurde eine 1:50 Verdünnung in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zur Bestimmung hergestellt. Jeder Referenzwert und jede Probe wurde in einer 96-*well*-Platte als Dreifachbestimmung gemessen.

### 2.2.20 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in denaturierter Form. Hierzu wird durch die Anlagerung des Natriumsalzes der Dodecansulfonsäure (SDS) die Eigenladung der Proteine überdeckt, wodurch alle Proteine eine pro Masseneinheit konstante, negative Nettoladung erhalten. Durch ihre gleiche Nettoladung werden die Proteine in der Trägermatrix rein nach ihrer Größe aufgetrennt. Große Proteine bewegen sich dabei langsamer durch die Poren der Trägermatrix als kleine Proteine. Als Trägermatrix dient bei der SDS-PAGE Polyacrylamid, welches durch die Quervernetzung von Acrylamidmonomeren durch N, N'-Methylenbisacrylamid entsteht. Die Polymerisation wird dabei durch Ammoniumperoxydisulfat (APS) initiiert, wobei N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator dient.

Zur Fokussierung der Proteine in der Trägermatrix dient zunächst ein Sammelgel, welches eine niedrige Konzentration an Acrylamid besitzt. Vom Sammelgel wandern die fokussierten Proteine dann in das Trenngel, welches eine höhere Acrylamidkonzentration aufweist. Hier trennen sich die Proteine dann aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen Wanderungsgeschwindigkeit durch die Poren der Trägermatrix auf. Als System dienten Minigelsysteme der Firma Bio-Rad. Pro Geltasche wurden 30 µg Protein aufgetragen. Hierzu wurde die entsprechende Proteinmenge mit 5x-Laemmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Zur Fokussierung der Proben im Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 150 V angelegt, nach Übergang der Markerbanden in das Trenngel wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Der Lauf wurde mit dem Erreichen der Bromphenolblau-Laufbande am unteren Gelende gestoppt.

Als Sammelgel diente immer ein 4%iges Polyacrylamidgel:

Komponente	Menge
Aqua bidest	1,15 ml
30% Acrylamid	0,33 ml
0,5 M Tris	0,5 ml
10% SDS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml
10% APS	0,02 ml

Die verwendeten Trenngele wurden folgendermaßen hergestellt:

Trenngel (%)	7,5	8	10	12	15
30% Acrylamid	2,5 ml	1,3 ml	1,7 ml	2 ml	2,5 ml
1,5 M Tris	2,5 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	0,10 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml
H <sub>2</sub> O	4,85 ml	2,3 ml	2 ml	1,7 ml	1,2 ml

### **2.2.21 Western-Blot**

Durch das 1979 von Renart und Towbin vorgestellte Verfahren des elektrophoretischen Transfers von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blotting), wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine immobilisiert. Hierzu werden die negativ geladenen Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Polyacrylamid auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der sie dann immobilisiert vorliegen. Auf dieser Membran lassen sich die Proteine dann über Antikörper direkt oder indirekt nachweisen.

Für den Western-Blot wurden die Nitrozellulosemembran, die Filterpapiere und die Schwämme der Transferkammer in 1x Transferpuffer gelegt, um sie zu befeuchten. Das Polyacrylamidgel wurde ohne Sammelgel aus der Laufkammer genommen und luftblasenfrei auf die Nitrozellulosemembran gelegt, dann zwischen Filterpapieren und Schwämmen in die Transferkammer eingespannt. Das Transfersystem der Fa. Bio-Rad wurde mit 1x Transferpuffer befüllt und zur Hitzereduktion mit einem Kühlblock aus Eis versehen. Das Blotten wurde bei einer konstanten Spannung von 100V für 1 Stunde durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran in  $H_2O_{bidest}$  kurz gewaschen und mit dem kolloidalen Farbstoff Ponceau S gefärbt. Durch diese reversible Färbung der Proteine kann man schon kurz nach dem Blotten, ohne den Einsatz von Antikörpern erkennen, ob die Proteine auf die Nitrozellulosemembran transferiert wurden. Nach der Ponceau S Färbung kann man den Farbstoff leicht wieder durch einige Waschschriffe mit  $H_2O_{bidest}$  oder TBS entfernen und mit dem Antikörpernachweis fortfahren.

### **2.2.22 Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper**

In dieser Arbeit wurde die Detektion der Proteine über Antikörper immer indirekt durchgeführt. Hierzu wurde ein primärer Antikörper gegen das Epitop-*Tag* oder das gesuchte Protein verwendet, zur Detektion im Western-Blot wurde dieser primäre Antikörper durch einen zweiten Antikörper nachgewiesen, welcher mit Meerrettich-Peroxidase verknüpft ist. Die indirekte Detektion ist sensitiver, da sich mehrere sekundäre Antikörper am primären Antikörper anlagern können. Dadurch kann der Primärantikörper bei einer Lagerung von 4°C mehrere Male wiederverwendet werden, der Sekundärantikörper kann nur einmal verwendet

werden. Ein Nachteil ist die niedrigere Spezifität, da sich der Zweitantikörper auch unspezifisch an andere Proteine oder Membranbestandteile anlagern kann.

Da Nitrozellulosemembranen eine hohe Bindekapazität für Proteine aufweisen, werden Antikörper auch unspezifisch an die Membran gebunden. Deshalb ist es notwendig, diese Bindungsstellen zu sättigen. Zum weiteren Gebrauch wurde, die nach der Ponceau S Färbung gewaschene Membran hierzu für mindestens 30 Minuten in 5% Magermilch bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach dem Blocken wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4°C auf einem Taumel-Rollenmischer in einem 50 ml-Falcon inkubiert. Der Inkubation folgten zwei Waschschriffe mit TBS-T und ein Waschschriff mit TBS, bevor die Membran mit dem Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Zweitantikörper wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Anti- mouse 1: 5000

Anti- rabbit 1:10000

Anti- goat 1:3000

Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgen nochmals drei Waschschriffe – einmal mit TBS-T und zweimal mit TBS.

Die gewaschene Membran überschichtete man mit je 1 ml der Lösungen des ECL Western Blotting Detection Reagents von Amersham Biosciences und inkubierte die Membran für 1-3 Minuten in der Lösung. Die dabei stattfindende Reaktion beruht auf der Oxidation von Peracid durch die Meerrettich-Peroxidase und den dabei entstehenden Sauerstoffradikalen. Die Sauerstoffradikale reagieren im alkalischen Medium der Lösung mit Luminol und bringen dieses in einen angeregten Zustand. Beim Zurückfallen in den Grundzustand emittiert das Luminol Licht, welches den Film an den Stellen belichtet, an denen der Sekundärantikörper die Chemilumineszenzreaktion katalysiert.

Die Entwicklungszeit der Filme wurde an die Signalstärke angepasst und betrug zwischen 10 Sekunden und 2 Stunden. Nach dem Entwickeln der Filme wurde der Größenstandard noch in der Filmkassette auf dem Film eingezeichnet und der Blot ausgewertet.

Alternativ und zur quantitativen Auswertung unterschiedlicher Proteine kann man die Detektion auch unter einem ECL-Detektionssystem nachweisen. Hierbei handelt es sich um digitale Aufnahmen hochsensitiver gekühlter CCD-Kameras,



welche man nach der Aufnahme genau auswerten kann, indem die zugehörige Software die Signalintensität der zu vergleichenden Proben misst.

### **2.2.23 "Strippen" von Nitrozellulose-Membranen**

Um nach Detektion eines Proteins in einem Western-Blot ein weiteres Protein mit einem spezifischen Antikörper nachzuweisen, muss der primäre und sekundäre Antikörper des ersten Nachweises von der Membran entfernt werden. Zur Entfernung der Antikörper von der Nitrozellulose-Membran, müssen die Antikörper denaturiert werden, ohne dabei die Membran und die in der Membran gebundenen Antigene zu zerstören. In diesem Falle wurden die Antikörper mittels eines stark sauren Puffers denaturiert und somit von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran für fünf Minuten mit „Stripping“-Puffer bei RT inkubiert und danach der pH-Wert des Puffers mittels NaOH auf einen neutralen pH-Wert von pH 7.0 eingestellt. Zur erneuten Detektion eines Proteins mit neuen Antikörpern wurde die Membran weiterbehandelt, wie nach der Ponceau S-Färbung (siehe Abschnitt 2.2.22) beschrieben.

### **2.2.24 Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation ist eine Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Hier steht der Begriff dafür, bestimmte Proteine (Antigene) durch Agarose-Antikörper-Verbindungen aus einem heterogenen Gemisch vieler Proteine (Antigene) zu isolieren. Die Antikörperbindung an die Sepharose beruht auf der spezifischen Bindung von IgG an Protein A oder Protein G, welche an die Sepharose gekoppelt sind. Für viele spezifische Epitop-*Tags* gibt es kommerziell erhältliche, Antikörper-gekoppelte Agarose- oder Sepharose-*Beads*, die gegen die Epitop-*Tags* gerichtet sind. In dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerzielle Produkte verwendet.

Zur Immunpräzipitation stellt man Proteinlysate, wie oben beschrieben, her und gibt dann die nach Hersteller angegebene Menge an Agarose- bzw. Sepharose-*Beads* zum Lysat hinzu. Von jedem Lysat wird eine kleine Menge als Kontrolle zurückgehalten, die als *Input*-Kontrolle für die IP dient. Somit kann man kontrollieren, dass nach einer Transfektion das gesuchte Protein auch exprimiert wurde. Das Lysat mit den *Beads* wird dann bei 4°C über Nacht unter ständiger Bewegung und Durchmischung der Lösung inkubiert.

Nach der Inkubation zentrifugiert man die *Beads* bei 4°C für 3 Minuten bei 13.000 rpm und wäscht sie dreimal im entsprechenden Lysepuffer. Nach der vierten Zentrifugation nimmt man die *Beads* dann in 5x-Laemmlipuffer auf und kocht sie für fünf Minuten bei 95°C um die Antigen-Antikörperbindung zu zerstören. Die an die Antikörper gebundenen Proteine wandern nach der Denaturierung ohne die Agarose-Kügelchen in das Trenngel ein und können im Western-Blot oder über Proteinfärbungen nachgewiesen werden.

### **2.2.25 Ko-Immunopräzipitation (CoIP)**

Die Ko-Immunpräzipitation beruht auf der Methode der Immunpräzipitation im Falle des Isolierens eines Zielproteins bzw. eines Antigens aus einer Lösung. Interagiert dieses Zielprotein in der Lösung mit einem zweiten Protein, so kann dieses unter den nativen Bedingungen der Interaktion mittels des Zielproteins aus der Lösung isoliert und in einem Gel nachgewiesen werden.

Die Zellen zur Ko-Immunopräzipitation wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät und am darauffolgenden Tag mit jeweils 1 µg der DNA des Zielproteins und 1 µg DNA des möglichen Interaktionspartners mit FuGENE 6 transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurde die DNA des möglichen Interaktionspartners mit dem Leervektor des Zielproteins transfiziert, um eine unspezifische Bindung an die Agarose auszuschließen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und wie bei der Immunpräzipitation beschrieben, mit den *Beads* inkubiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Input-Kontrolle zeigt einem, ob beide Proteine in ausreichendem Maße exprimiert wurden, um sie nach den CoIP auch wieder nachweisen zu können. Die Western-Blots wurden zuerst mit dem entsprechenden Antikörper des möglichen Interaktionspartners durchgeführt, dann 'gestrippt' und mit dem Zielprotein detektiert, um die Menge an gezogenem Zielprotein zu überprüfen.

### **2.2.26 Mikroskopie**

Mittels der Phasenkontrast-Mikroskopie kann man Aussagen über die Zellmorphologie machen. Will man die Lokalisation von bestimmten Kompartimenten oder Proteinen in der Zelle visualisieren, bedient man sich der Fluoreszenz-Mikroskopie.

Hierbei werden Proteine durch Antikörper oder bestimmte spezifische Farbstoffe markiert, die dann unter Anregung eines Lichtsignals einer definierten

Wellenlänge ein fluoreszentes Licht emittieren. Mittels spezifischer Farbstoffe können auch komplette Zellkompartimente, wie z.B. Mitochondrien oder Lysosomen, in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzmikroskopie kann man mit fixierten und auch mit lebenden Zellen durchführen.

#### **2.2.26.1 Visualisierung von fixierten Zellen**

Zur Mikroskopie fixierter Zellen wurden Deckgläschen in 100% Ethanol gewaschen und abgeflammt, je ein Deckgläschen in ein *well* einer 24-*well*-Platte gelegt und in 0,01% PLL-Lösung für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Es folgte einem Waschschrift mit PBS nach dem 70.000 Zellen pro *well* auf das entsprechende Coverslip im *well* ausgesät wurden. Sollten die Zellen transfiziert werden, folgte am nächsten Tag die Transfektion mit FuGENE 6 und Inkubation für 48 Stunden. Bei Verwendung von Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRos wurden die Zellen für 45 Minuten mit 200 nM Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRos im Standardmedium bei 37°C inkubiert. Um eine Hintergrundfärbung durch den Farbstoff auszuschließen, wurde das Kulturmedium gewechselt und nochmals für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Färbung mit Mitotracker<sup>®</sup> folgte die Fixierung der Zellen in 400 µl kaltem 4% PFA / PBS<sup>pH7.4</sup> nach einem abgewandelten Protokoll von Brock et al. (1999). Der Fixierschritt wurde 5 Minuten auf Eis und im Anschluss für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit zwei folgenden Waschschriften in PBS durchgeführt. Die Permeabilisierung erfolgte mit -20°C kaltem Methanol bei -20°C für 7 Minuten, wonach ein sofortiger Waschschrift mit kaltem PBS folgte. Ein weiterer Waschschrift mit PBS für 5 Minuten bei RT entfernte das verbleibende Methanol. Zum Blocken wurden die Zellen in 10% Horse Serum/PBS für 30 Minuten bei RT inkubiert, worauf die Inkubation mit dem Erstantikörper folgte. Dieser wurde in 5% Horseserum/PBS entsprechend der Herstellerangaben verdünnt und über Nacht bei 4°C in einem Volumen von 250 µl/*well* inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift mit PBS wurde der Sekundäantikörper in 10% Horseserum/PBS für eine Stunde bei RT inkubiert. Für die Kernfärbung wurde dem Zweitantikörper in den letzten 10 Minuten der Inkubationszeit noch Hoechst 33258 bzw. Hoechst 33342 in einer Endverdünnung von 1:5000 zugegeben oder TO-PRO<sup>®</sup>-3 iodide in einer Endverdünnung von 1:1000. Nach der Detektion mit dem Sekundäantikörper wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, dann mit Mowiol auf einem Objektträger einge-

deckelt und mindestens für 12 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert, bevor sie unter dem Mikroskop begutachtet wurden. Sollten die Präparate für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden, folgte auf die Waschschriffe vor der Eindeckelung noch eine Inkubation in 4% PFA für 10 Minuten, um die Sekundärantikörper zu fixieren, gefolgt von zwei Waschschriffen in PBS.

### **2.2.26.2 Visualisierung von lebenden Zellen**

Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurden 9.000 – 12.000 Zellen in Objektträgerkammern ausgesät und über Nacht in normalem Kulturmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen etwa 40 Minuten vor Mikroskopiebeginn mit 200 µM Mitotracker® Green FM und 50 nM LysoTracker® Red inkubiert. Nach der 30 Minuten Inkubationszeit folgte ein Waschschriff mit 37°C warmem Kulturmedium, um eine weitere intensivere Färbung durch die Farbstoffe zu umgehen. Darauf folgte die sofortige Untersuchung mit dem Mikroskop für maximal 30 Minuten.

Im konfokalen Mikroskop wurden einzelne Zellen gesucht und von diesen mit einem kleinen *Pinhole* (*airy*=1) Z-Stapel aufgenommen, um eine sichere Kolokalisation zu detektieren.

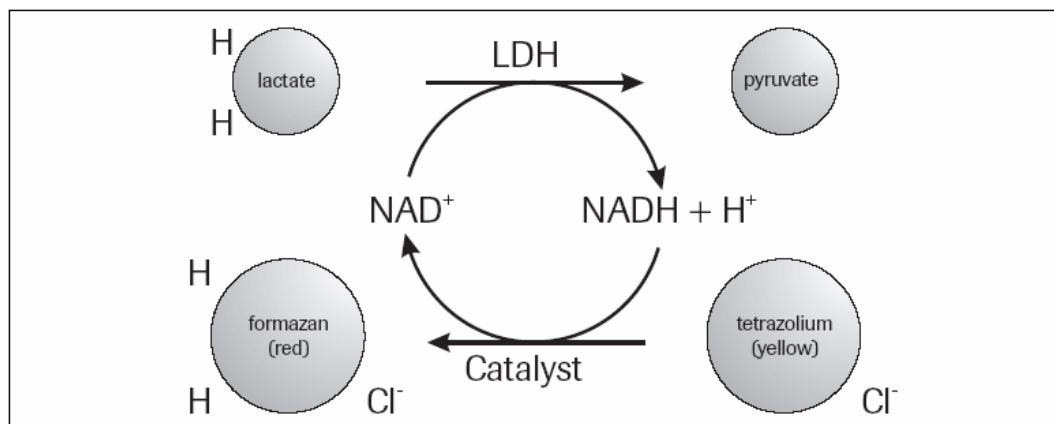
### **2.2.27 Vitalitäts- und Zelltod-Tests**

#### **2.2.27.1 LDH-Assay**

Der *Lactat-Dehydrogenase-release-Assay* ist eine biochemische Methode zur Bestimmung des Zellüberlebens. Er beruht auf der Tatsache, dass tote Zellen Lactat-Dehydrogenase (LDH) nach der Permeabilisierung der Zellmembran in das Kulturmedium entlassen. Die LDH zeigt keinen Aktivitätsverlust, wird ubiquitär exprimiert und nicht durch Proteasen während des Zelltods abgebaut, wodurch sie sich für einen Nachweis des Zelltods oder der Zytotoxizität sehr gut eignet. In vivo katalysiert die LDH die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, wobei NAD<sup>+</sup> zu NADH + H<sup>+</sup> reduziert wird. Die Reaktion lässt sich dann mittels einer Sekundärreaktion visualisieren und messen, wobei die Messung die quantitative Menge an freigesetztem LDH detektiert. Der LDH-Assay wurde mittels des *Cytotoxicity Detection Kits* der Fa. Roche nach folgendem Muster durchgeführt:

In ein *well* einer 24-*well*-Platte wurden 100.000 – 125.000 Zellen ausgesät und für 24 Stunden anwachsen gelassen. Im Anschluss wurde das normale Kulturmedium gegen ein LDH-Kulturmedium mit Zelltodinduktoren gewechselt, als Negativ-

kontrolle diente das LDH-Kulturmedium mit dem Diluent der entsprechenden Substanz. Beim LDH-*Assay* muss darauf geachtet werden, dass die Endkonzentration an FCS nicht über 1% liegt. FCS beeinträchtigt die Reaktion positiv, da tierische Seren einen gewissen Eigenanteil an LDH besitzen. Aus diesem Grund wurde das Kulturmedium mit nur 1% FCS verwendet und wird hier als LDH-Kulturmedium deklariert.



**Abbildung 2.2.5:** Prinzip des LDH-*Assays* mit dem visualisierenden Endprodukt Formazan.

Alle Ansätze wurden pro Test als Dreifach-Bestimmung angesetzt. Nach der Inkubation mit den Toxinen wurden jeweils 150  $\mu\text{l}$  Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Medium in diesem abzentrifugiert (2.000 rpm, 2'), um abgeschwommene Zellen vom Überstand zu trennen. Aus dem Überstand wurden 100  $\mu\text{l}$  in ein *well* einer 96-*well*-Platte überführt und die restlichen 50  $\mu\text{l}$  in das entsprechende *well* der 24-*well*-Platte zurückpipettiert. In die 24-*well*-Platte wurden dann je 50  $\mu\text{l}$  einer 10%igen Triton X-100 Lösung zugegeben, um die Zellen zu lysieren und den kompletten LDH-Gehalt der Zellen zu ermitteln. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurden 150  $\mu\text{l}$  des Überstandes abzentrifugiert (2.000 rpm, 2') und 100  $\mu\text{l}$  des Überstandes in ein neues *well* der 96-*well*-Platte überführt.

Zu jedem *well* der 96-*well*-Platte wurden dann 100  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung gegeben und für 20 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden nach der Inkubation noch 50  $\mu\text{l}$  einer 2N HCl-Lsg. zugegeben. Den Farbumsatz des Tetrazoliumsalses bestimmte man im Anschluß in einem ELISA-Reader. Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen, wobei ein Referenzabgleich bei 650 nm pro *well* erfolgte. Als interne Referenz diente das LDH-Kulturmedium, welches ab dem Zeitraum der Vergiftung in einem leeren *well* die gleichen Protokollschritte absolvierte, wie die *wells* mit den Zellen. Den

mit Triton X-100 lysierten Zellen wurde dabei eine Kontrolle mit Triton X-100 gegenübergestellt.

### **2.2.27.2 Durchflusszytometrie**

Mittels der Durchflusszytometrie ist es möglich, einzelne Zellen in ihrer Größe und Granularität sowie auf unterschiedliche Fluoreszenzen zu untersuchen. Somit kann man mit dieser Methode sehr einfach eine große Zellpopulation untersuchen, wobei der Zeit- und Kostenaufwand gering ist. Für die Aussagen über die Apoptose und Viabilität von Zellen ist eine große Anzahl an kommerziellen Testsystemen erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Ansätze zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials als Hinweis auf die zelluläre Energieversorgung getestet, die im Folgenden beschrieben werden.

#### *Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit JC-1*

JC-1 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials eingesetzt wird. Er besitzt die Eigenschaft, durch zelluläre Membranen zu diffundieren und liegt dabei als Monomer vor, welches grün fluoresziert. In intakten Mitochondrien kommt es durch das mitochondriale Membranpotential zu einer Akkumulation des Farbstoffes, wobei sich JC-1 Aggregate bilden. Die Aggregate emittieren das Anregungslicht in einer rot fluoreszierenden Wellenlänge zurück und sind damit sowohl im Mikroskop als auch im Durchflusszytometer von den grün fluoreszierenden Monomeren deutlich zu unterscheiden. Somit kann man mit JC-1 das mitochondriale Membranpotential sehr gut messen und indirekt Aussagen über einen möglichen Apoptosebeginn von Zellen machen, da das mitochondriale Membranpotential zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Apoptose zusammenbricht, der Verlust jedoch auch wieder reversibel sein kann.

Für den JC-1 *Assay* wurden Zellen 24 Stunden vor der Behandlung mit Toxinen in 6-well-Platten ausgesät (HEK293: 700.000, SH-SY5Y: 1.000.000 Zellen/well) und für 24 Stunden adhärent anwachsen gelassen. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit den entsprechenden Toxinen in normalem Zellkulturmedium weiterkultiviert und nach den angegebenen Inkubationszeiten für die Analyse weiterverwendet. Die Zellen wurden dann mit Trypsin aus der Zellkulturschale abgelöst, abzentrifugiert (1.200 rpm, 4 Minuten) und einmal in PBS gewaschen; nach dem Waschen erneut zentrifugiert und dann in 500 µl einer 5 µg/ml konzentrierten JC-1/PBS-Lösung resuspendiert. Die Inkubation mit JC-1 erfolgte

für 30 Minuten bei 37°C. Auf den Inkubationsschritt folgten drei Waschschriffe mit PBS, worauf sofort die Analyse im Durchflusszytometer folgte.

Um bei der Analyse der Fluoreszenzen zwischen grüner und roter Fluoreszenz abzugrenzen und die Einstellung im Durchflusszytometer anzupassen, wurden Zellen ohne JC-1, mit JC-1 und mit CCCP behandelte Zellen mit JC-1 verwendet. CCCP ist eine Protonophore, welche das mitochondriale Membranpotential reversibel aufhebt. Durch Behandlung mit CCCP wurde nur die grüne Fluoreszenz der JC-1 Monomere angeregt.

*Messung des mitochondrialen Membranpotentials mit Mitotracker®*

Als Alternative zu JC-1 kann man das mitochondriale Membranpotential auch durch eine Doppelfärbung mit Mitotracker® Red CMXRos und Mitotracker® Green FM darstellen. Da Mitotracker® Green FM alle Mitochondrien unabhängig ihres Membranpotentials anfärbt und Mitotracker® Red CMXRos nur Mitochondrien mit intaktem Membranpotential färbt, beruht die Messung auf dem gleichen Prinzip wie bei JC-1. Als Unterschied gilt, dass JC-1 als Monomer die komplette Zelle färbt und nur in den Mitochondrien rote Aggregate bilden kann, wogegen die Färbung mit Mitotracker® nur Mitochondrien anfärbt. In der Auswertung der Assays sind mittels der doppelten Mitotracker® Färbung die Unterschiede der Membranpotentiale einfacher voneinander trennen. Zu beachten ist bei beiden Färbungen, dass die grüne Fluoreszenz immer vorhanden ist. Bei JC-1 kann eine grüne Fluoreszenz immer durch das in der Zelle vorliegende JC-1 Monomer detektiert werden, bei der doppelten Mitotracker® Färbung ist Mitotracker® Green FM immer nachweisbar. Somit kann in beiden Systemen nur die Abnahme der roten Fluoreszenz gemessen werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Mutationsanalyse der Omi/HtrA2 Exons mittels dHPLC

#### 3.1.1 dHPLC Screening

Im dHPLC-Screening wurden in den Exons 2 und 4 keine auffälligen Kurvenverläufe beobachtet. In den Exons 3, 5, 6 und 8 wurden in der dHPLC-Analyse keine Messergebnisse beobachtet, die einer guten Auftrennung von Heteroduplex-DNA entsprechen. Es gab jedoch Proben, in denen Abweichungen zu den normalen Kurvenverläufen auffällig waren. Bei der Sequenzierung zeigte sich in diesen Patienten-Proben trotz des auffälligen dHPLC-Kurvenverlaufes keine Abweichung in der Nukleotidsequenz. Eine Übersicht der untersuchten Omi/HtrA2 Exons bei den PK-Patienten-DNAs in der dHPLC-Analyse zeigt Tabelle 3.1:

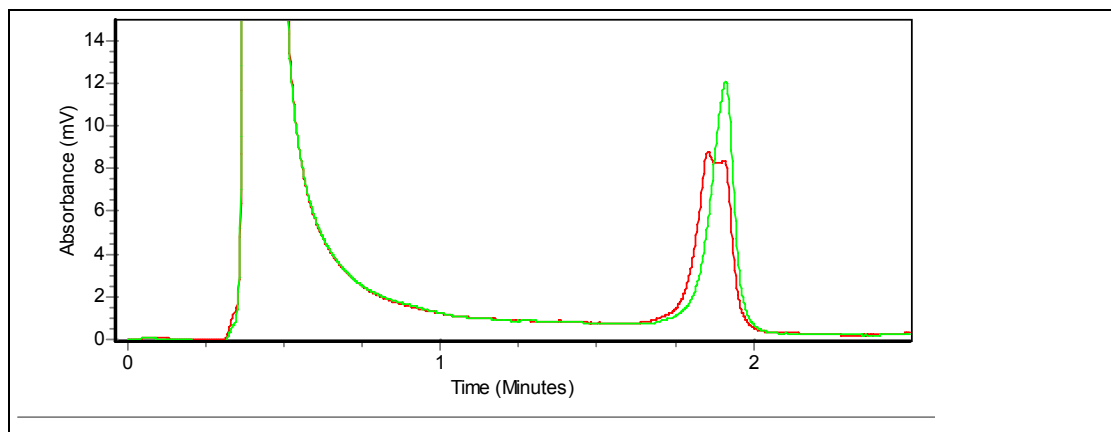
**Tabelle 3.1:** Übersicht der untersuchten Exons mit der dHPLC und der dabei beobachteten Auffälligkeiten bei der Mutationsanalyse.

Exon	Auffällige Kurvenverläufe	Anzahl an auffälligen Patienten-Amplifikaten
1	2	43
2	0	-
3	2	12
4	0	-
5	2	4
6	5	24
7	2	4
8	2	9

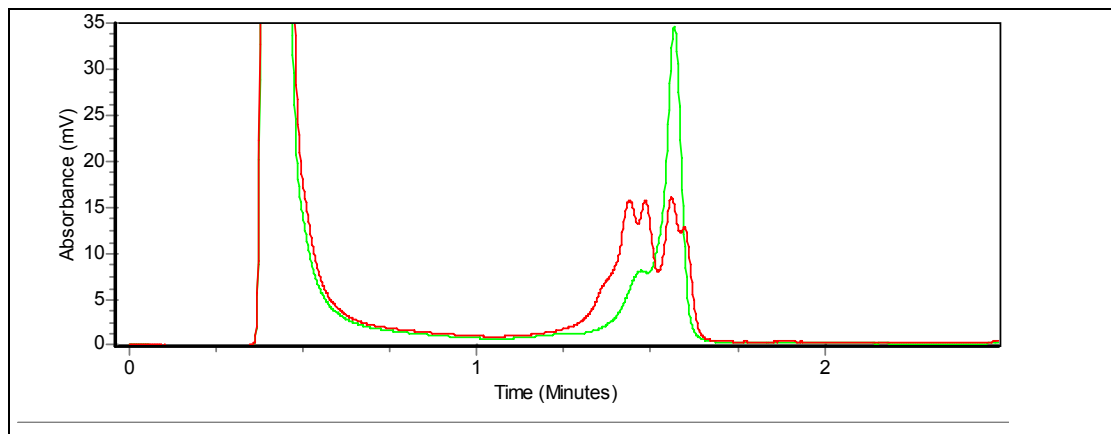


### Ergebnisse für Exon 1

In Exon 1 wurden bei 44 Patientenproben Heteroduplexe detektiert. Anhand der ersten auffälligen Messergebnisse wurden die Einstellungen optimiert, um eine genauere Detektion zu gewährleisten. So erkennt man mit den optimierten Einstellungen 'Exon 1\*' (Tabelle 2.2) insgesamt vier Spitzen (*Peaks*) im Chromatogramm, mit den nicht-optimierten Einstellungen 'Exon 1' ist die Unterscheidung der Heteroduplex- zur Homoduplex-DNA ungenauer (Abbildung 3.1.1 und Abbildung 3.1.2).



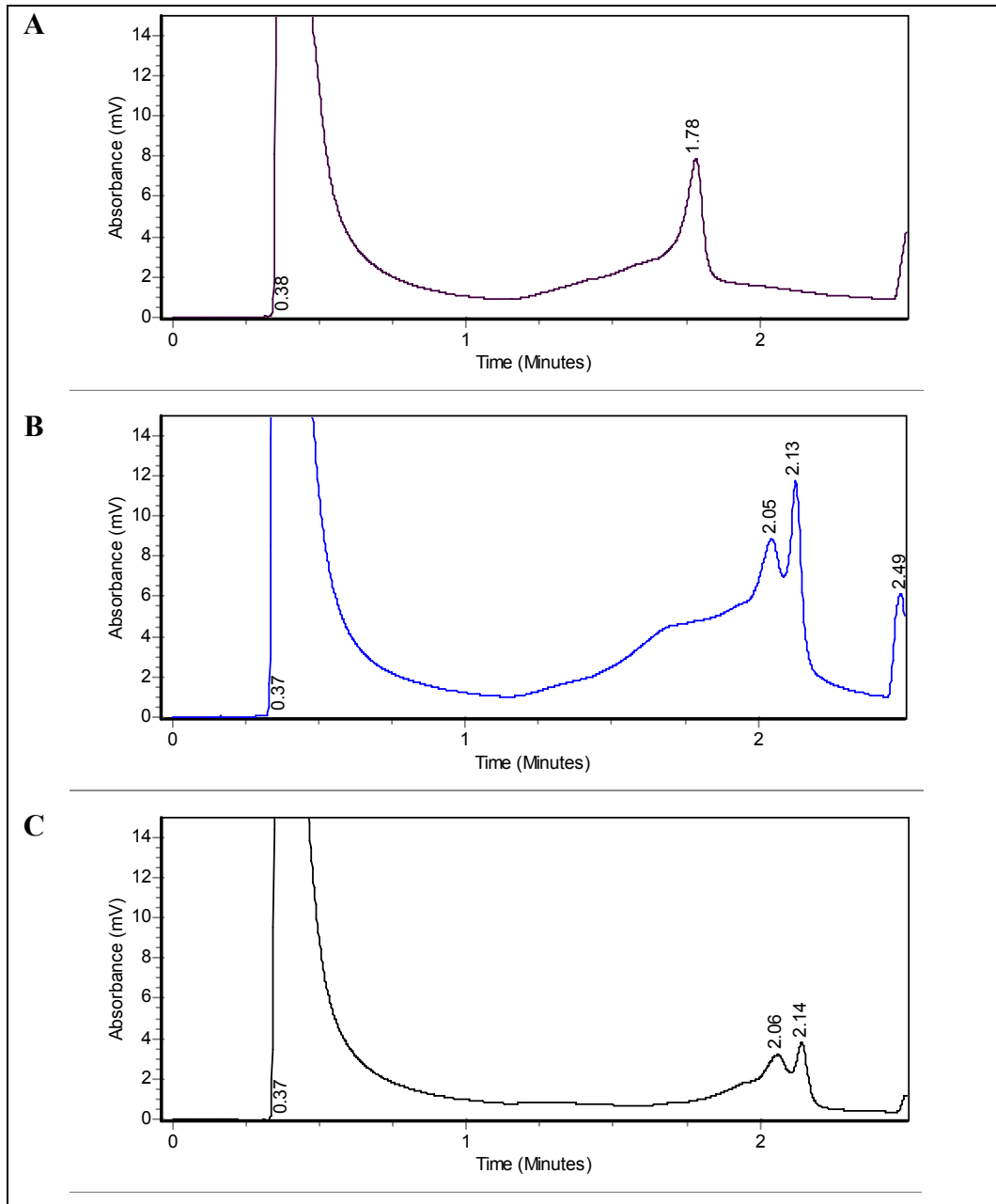
**Abbildung 3.1.1:** dHPLC für Exon 1 mit den Einstellungen 'Exon 1' aus Tabelle 2.2. Überlagerung des Kurvenverlaufes einer Probe mit Homoduplex (grün) und Heteroduplex (rot). Die Heteroduplex-DNA zeigt nur eine geringe Auftrennung in unterschiedliche Amplituden.



**Abbildung 3.1.2:** dHPLC für Exon 1 mit den Settings 'Exon 1\*' aus Tabelle 2.2. Überlagerung des Kurvenverlaufes einer Probe mit Homoduplex (grün) und Heteroduplex (rot). Mit den optimierten Einstellungen zeigen Proben mit Heteroduplex-DNA deutlich unterscheidbare *Peaks*.

**Ergebnisse des Screenings für Exon 7**

In Exon 7 wurde ein Auftreten von Heteroduplexen bei vier Patientenproben beobachtet. Die Einstellungen der dHPLC wurden in einem zweiten *Screen* dieses Exons auf die kurze Fragmentlänge optimiert (Abbildung 3.1.3 A und B).

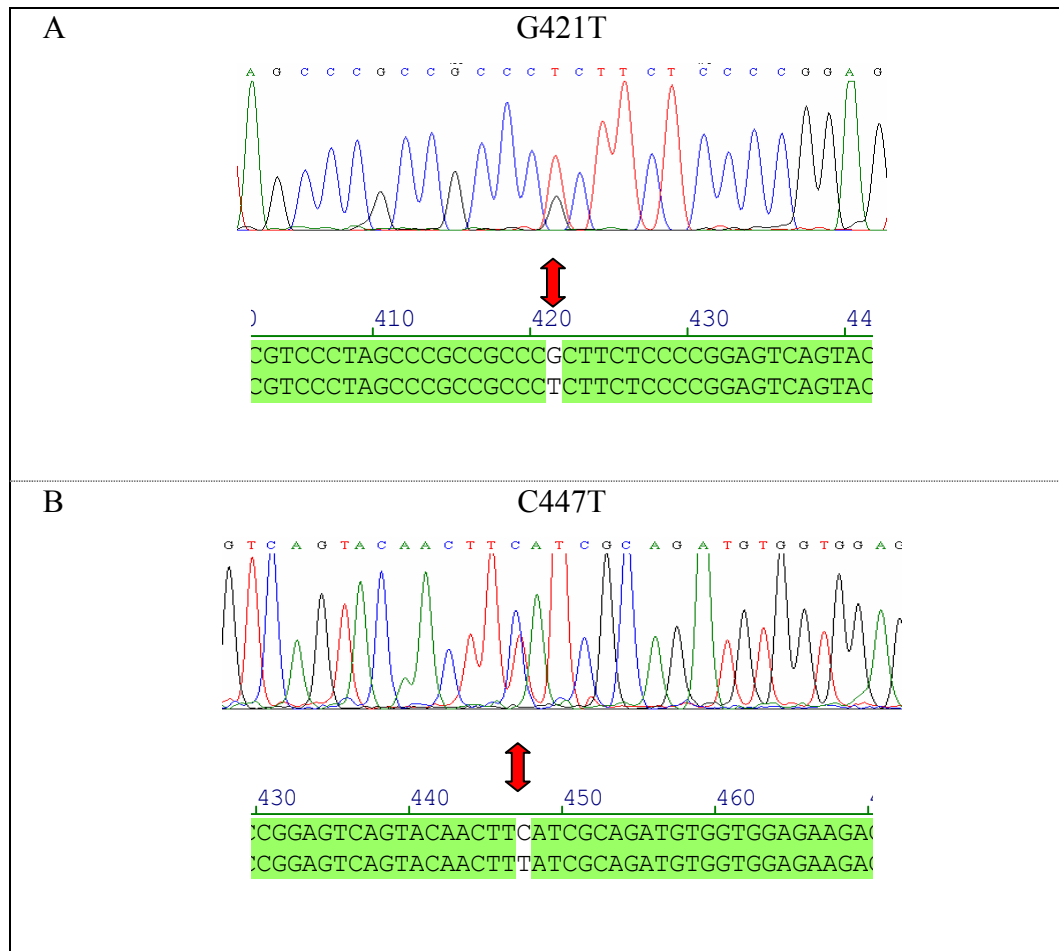


**Abbildung 3.1.3:** dHPLC-Screening von Exon 7. Ein Nachweis von Heteroduplexen war erst nach Optimierung der dHPLC-Einstellungen möglich. A: Verlauf der Elutionskurve mit einem Anstieg des Gradienten von 51-61% Acetonitril und einer Säulentemperatur von 59.5°C. B: Die identische Probe mit der gleichen Säulentemperatur und einem Verlauf des Puffer A⇒B-Gradienten von 50-66%. Hierbei ist eine deutliche Doppelamplitude zu erkennen. C: Elutionsprofil einer Probe mit Doppelamplitude und sehr geringem DNA-Gehalt.

### 3.1.2 Sequenzierung der auffälligen dHPLC Ergebnisse

Traten beim Mutationsscreening mittels der dHPLC auffällige Elutionskurven auf, wurde das betreffende Exon von beiden Patienten der gepoolten dHPLC-Probe sequenziert. Bei der Sequenzierung der auffälligen Proben aus der dHPLC konnten folgende Basen-Substitutionen in der Sequenzierung nachgewiesen werden:

#### Exon 1



**Abbildung 3.1.4:** Sequenzierungen der auffälligen Exon 1-Patientenproben mittels des PCR Reverse-Primers (Darstellung: Revers-komplementär).

A: Heterozygote Transversion einer Purinbase zu einer Pyrimidinbase G421T.

B: Heterozygote Transition zwischen zwei Pyrimidinbasen C447T.

Durch die Basensubstitution von Guanin zu Thymin an Basenposition 421 auf der kodierenden Sequenz kommt es zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz auf Proteinebene. Anstelle der Aminosäure Alanin in Aminosäureposition 141 wird ein Serin in das Peptid eingebaut.

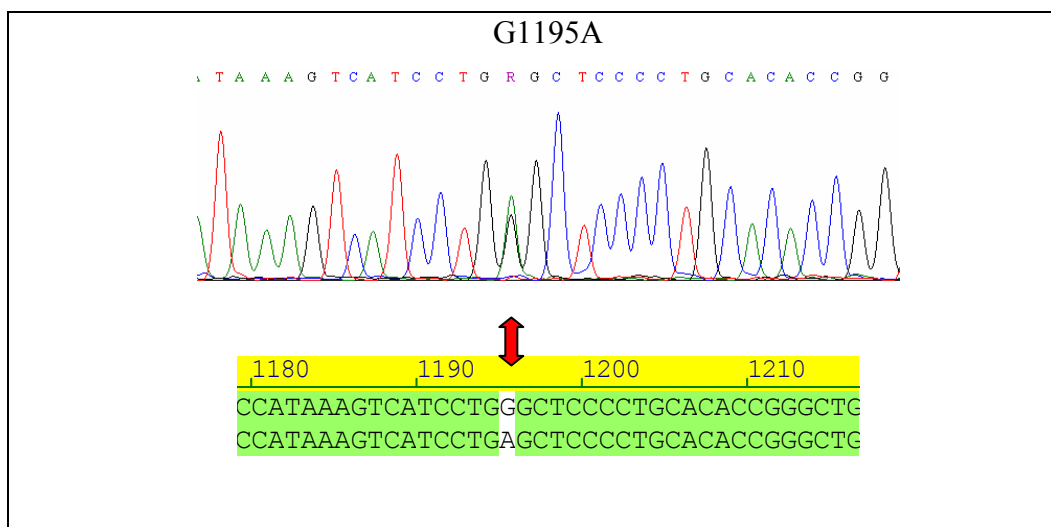
Eine weitere Basensubstitution von Cytosin zu Thymin an Basenposition 447 führt zu keinem Aminosäureaustausch einer Aminosäure und ist somit eine stille Mutation. Die Häufigkeit der Exon 1-Basensubstitutionen bei den Patienten ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Beide Substitutionen wurden nur in heterozygoter Form detektiert, es konnte kein homozygoter Träger nachgewiesen werden.

**Tabelle 3.2:** Übersicht über die Patientenzahl und die nachgewiesenen Substitutionsträger.

Geprüfte Patienten (dHPLC)	Patienten mit Substitution G421T	Patienten mit Substitution C447T
<b>414</b>	<b>27</b>	<b>20</b>

### Exon 7

Bei der in Exon 7 detektierten Basensubstitution eines Guanins zu einem Adenin in Position 1195 der kodierenden Nukleotidsequenz kommt es zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz von Glyzin zu Serin an Aminosäureposition 399. Dieser heterozygote Basenaustausch konnte bei vier Patienten nachgewiesen werden (Abbildung 3.1.5).



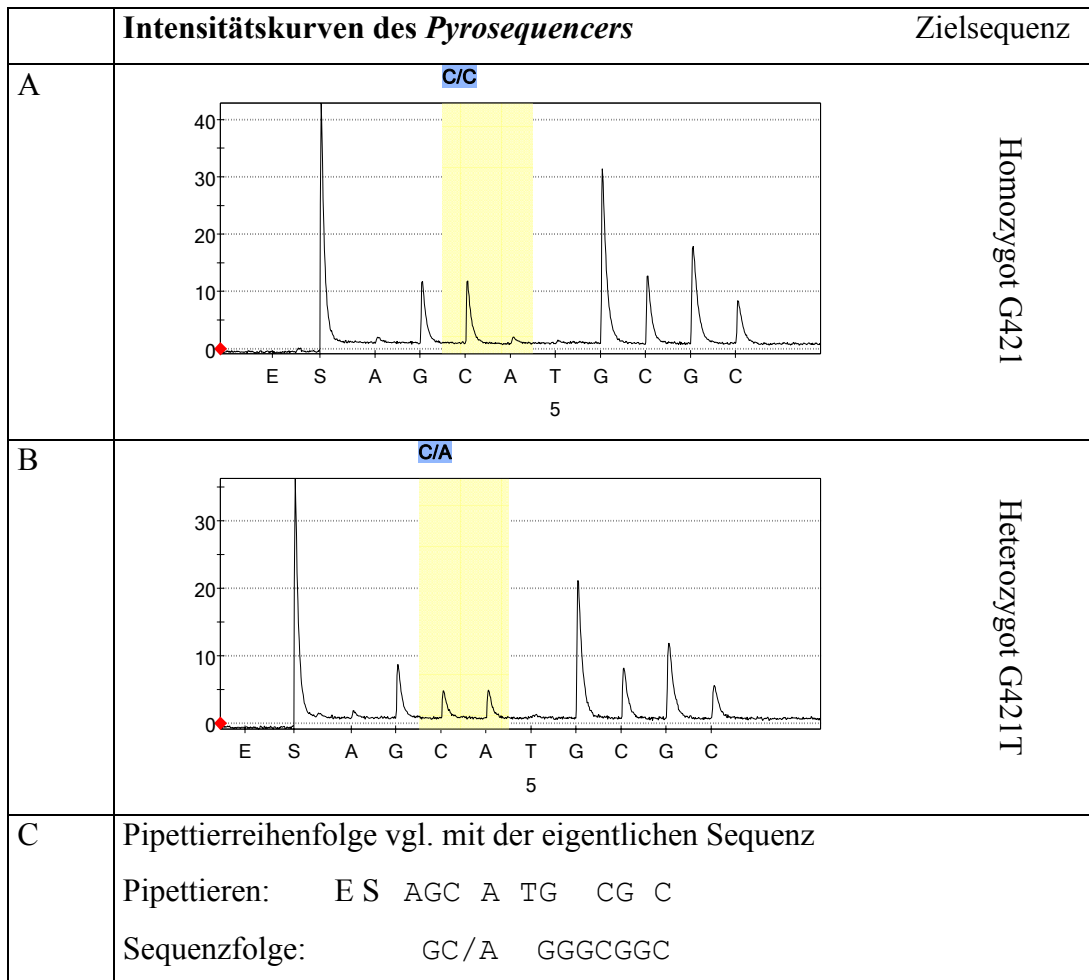
**Abbildung 3.1.5:** Sequenzierung der auffälligen Exon 7 Heteroduplex-Proben. Es kommt zu einer heterozygoten Transition zweier Purinbasen G1195A.

Bei den anderen Exons konnten trotz auffälliger Kurvenverläufe in der dHPLC keine weiteren Variationen der Nukleotidsequenz gefunden werden.

Um die Ergebnisse der Sequenzierung unabhängig zu bestätigen und das Kontrollkollektiv (*Old People*) auf die gefundenen Basensubstitutionen zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet.

### 3.1.3 Pyrosequencing der G421T-Substitution bei Kontrollen

Mittels des *Pyrosequencing* konnten alle Träger der Basensubstitution, die in der Sequenzierung einen heterozygoten G421T-Austausch aufwiesen, bestätigt werden. Die Abbildung 3.1.6 zeigt die Intensitätskurven der Auswertung eines *Pyrosequencing*-Laufes.



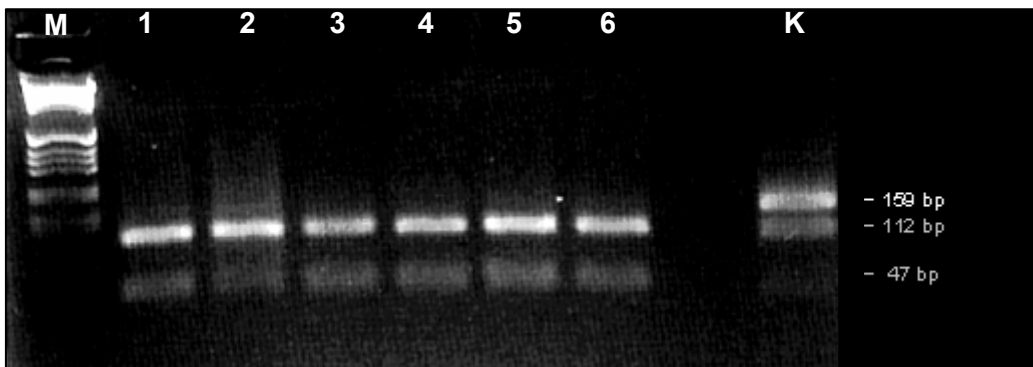
**Abbildung 3.1.6:** *Pyrosequencing* der Kontrollen für die G421T-Substitution in Exon 1. Die Sequenz zeigt den reversen DNA-Strang. A: Beispiel für eine homozygote G421-Sequenz B: Heterozygoter Träger der G421T-Substitution. Die X-Achse zeigt die zupipettierten Reagenzien an. E steht für die Enzymlösung, S ist der Substratpeak, folgend von einem A an Position 1 für das erste zugegebene dNTP. Das folgende dATP ist die Initialbase, die in der Sequenz an dieser Stelle nach dem Primer nicht vorkommt und daher keinen Peak geben darf.

Beim *Screening* des Kontrollkollektives zeigte sich auch hier ein Auftreten der Basensubstitution G421T. Sie konnte in 10 von 331 Kontrollproben mit Hilfe des *Pyrosequencings* nachgewiesen werden. Damit ist für die G421T-Basensubstitution die Definition eines Polymorphismus erfüllt, da dieser Basenaustausch bei mehr als 1% der untersuchten Patientenproben nachgewiesen werden konnte.

### 3.1.4 RFLP-Analyse der G1195A Substitution

Bei der Basensubstitution in Exon 7 konnte man das Auftreten der Transition G1195A im Exon 7-Amplifikat mittels einer Restriktionsanalyse nachweisen.

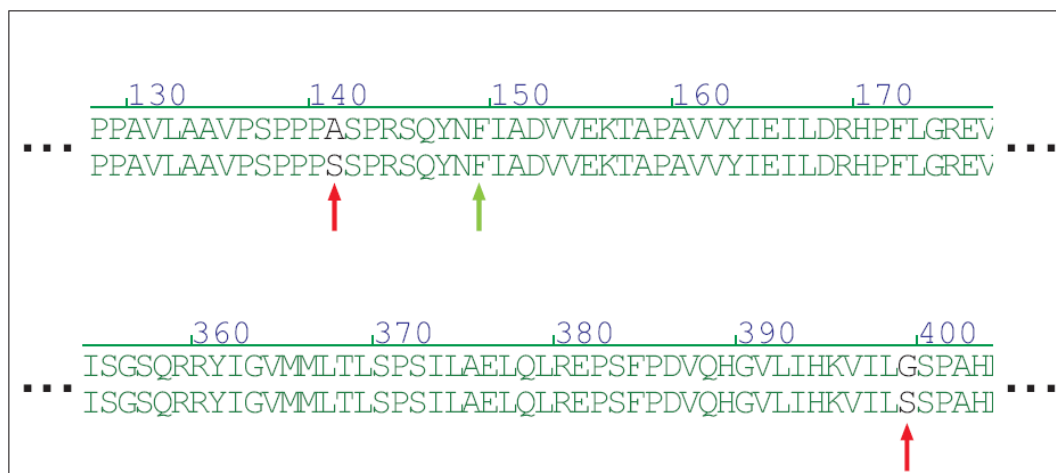
Die vier Patienten mit dem G1195A Basenaustausch, welche in der Sequenzierung nachgewiesen werden konnten, zeigten auch in der Restriktionsanalyse ein heterozygotes Auftreten eines ungeschnittenen Fragmentes und konnten damit eindeutig bestätigt werden. Bei der Untersuchung der Kontrollen konnte diese Basensubstitution nicht nachgewiesen werden. Abbildung 3.1.7 zeigt die Dokumentation eines analytischen Agarosegels mit PCR-Fragmenten der Kontrollen (1-6) und eines in der Sequenzierung heterozygoten Patienten (K). Auch bei diesem Austausch konnte kein homozygoter Träger des neu gefundenen Allels entdeckt werden, das Auftreten der Transition wurde nur heterozygot nachgewiesen.



**Abbildung 3.1.7:** Restriktionsanalyse der Basensubstitution G1195A mittels des Restriktionsenzym *MvaI* auf einem 1% Agarosegel (TAE). Die PCR-Fragmente der Kontrollgruppe zeigen eine komplette Restriktion in ein 112 bp und ein 47 bp Fragment. Die interne Kontrolle zeigt einen partiellen Verdau des 159 bp Fragments, was der heterozygoten G1195A Substitution entspricht. (M: Marker, 1-6: Kontrollpatienten, K: betroffener Parkinson-Patient als Restriktionskontrolle.)

### 3.1.5 Zusammenfassung des Mutationsscreenings

Mittels der dHPLC konnten bei dem Mutationsscreening des *Omi/HtrA2*-Gens einer großen DNA-Bank von Parkinson-Patienten drei Basensubstitutionen in der kodierenden Sequenz gefunden werden. Eine der Substitutionen erwies sich als stiller Austausch, der keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz hat, die beiden anderen detektierten Substitutionen erwiesen sich als Austausch, bezogen auf die Aminosäuresequenz. Bei der in Exon 1 gefundenen Substitution G421T konnte im Kontrollkollektiv der Basenaustausch ebenfalls nachgewiesen werden. Der G421T-Polymorphismus zeigte sich bei den Patienten jedoch signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (Chi-Quadrat-Test,  $p(a) = 0,03929$ , Tabelle 3.3 siehe A und B). Bei der in Exon 7 lokalisierten Substitution G1195A konnte im Kontrollkollektiv ein Auftreten ausgeschlossen werden. In Abbildung 3.1.8 sind die Lokalisationen der drei Basenaustausche mit den Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz dargestellt.



**Abbildung 3.1.8:** Aminosäuresequenz der Wt-Sequenz von Omi/HtrA2 (obere Sequenz) mit den Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz (untere Sequenz). Die roten Pfeile weisen auf die Basensubstitutionen hin, welche eine Veränderung einer Aminosäure verursachen, der grüne Pfeil zeigt die unveränderte Aminosäuresequenz an Position 149 des stillen C447T-Basenaustausches.

Tabelle 3.3 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Basensubstitutionen und die Allelfrequenzen.

**Tabelle 3.3:** Häufigkeitsverteilung der Mutationen und Signifikanzberechnung der G421T-Substitution (PA: Parkinson-Patienten; OP: *Old People* – Kontrollen).

A	Basen- substitution	Häufigkeits- Verteilung	Allelfrequenz
	G421T	PA : 27	$G = \frac{801}{828} = 0,9674$ , $T = \frac{27}{828} = 0,0326$
		OP: 10	$G = \frac{652}{662} = 0,9849$ , $T = \frac{10}{662} = 0,0151$
	C447T	PA : 20	$C = \frac{808}{828} = 0,9758$ , $T = \frac{20}{828} = 0,0242$
		OP: *	
	G1195A	PA: 4	$G = \frac{1024}{1028} = 0,9961$ , $A = \frac{4}{1028} = 0,0004$
		OP: 0	$G = 1$
<b>B</b>	<b>Signifikanzberechnung G421T</b>		
	$\chi^2 = 4,248$		$p(a) = 0,03929$

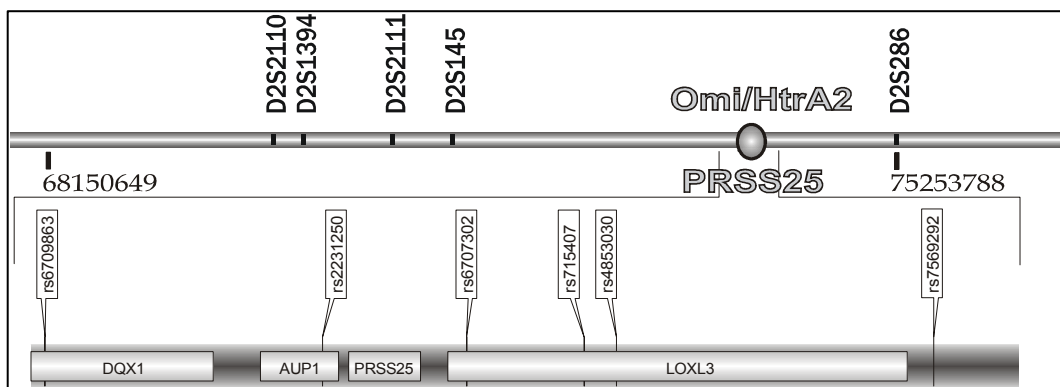
(\*: Kein OP-Screening durchgeführt.)



### 3.2 Generierung potentieller Haplotypen in der 2p13-Region bei Trägern der G399S-Mutation im *Omi/HtrA2*-Gen

Für die Haplotypisierung der Region um *Omi/HtrA2* bei Patienten mit der in Exon 7 lokalisierten Basensubstitution, wurden SNP- und STS-Mikrosatellitenmarker gesucht, welche die Region umschließen (Abbildung 3.2.1).

Da nicht für alle Marker publizierte Allelfrequenzen vorlagen, wurden jeweils vier CEPH DNAs mitgeführt, um die Häufigkeit eines Allels einzuschätzen.



**Abbildung 3.2.1:** Untersuchte Marker der G1195A-Haplotypisierung

Es fällt auf, dass Patienten mit der G399S-Mutation für alle SNPs identische Allele aufweisen, was als Hinweis auf einen gemeinsamen Haplotypen gelten kann. Im Gegensatz hierzu zeigen die vier CEPH-DNAs bei mindestens einer Probe einen Allel-Unterschied, ausgenommen beim SNP-Marker rs4853030. Bei den Mikrosatellitenmarkern wurde nur für den Marker D2S286 das Allel 3 bei allen vier Patienten nachgewiesen. Die Marker D2S2111 und D2S1394 wurden bei den CEPH-DNAs nicht überprüft, da die Patienten bei diesen Markern keinen potentiellen gemeinsamen Haplotyp aufweisen (Tabelle 3.4).

Für die vier Patienten konnte ein potentieller gemeinsamer Haplotyp zwischen den Markern rs6709863 und rs7569292 um das *Omi/HtrA2*-Gen auf Chromosom 2 eingegrenzt werden, der 32,3 Kilobasenpaare umfasst. Durch das gemeinsame Allel bei Marker D2S286 dehnt sich dieser Bereich auf 59,3 Kilobasen aus.

**Tabelle 3.4:** Übersicht über die Haplotypen der Patienten mit Exon 7-Substitution und der CEPH-Vergleichsgruppe.

	DNA	PA 040	PA 134	PA 294	PA 545	CEPH 4501	CPH 10201	CEPH 13402	CEPH 141802	Verifizierung
Marker										
D2S 2110		1/3	2/2	1/2	1/4	2/3	2/4	2/3	1/2	Gelscan
D2S 1394		1/2	1/3	2/4	1/3	-	-	-	-	PAA-Gelelekt.
D2S 2111		1/4	2/3	0/1	1/2	-	-	-	-	Gelscan
D2S 145		1/2	2/4	3/4	1/4	2/4	2/4	1/4	3/5	Gelscan
rs 6709863		C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	C/C	C/T	Restriktion (Bgl II)
rs 2231250		C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	C/G	Restriktion (Nco I)
rs 6707302		T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	Restriktion (Ava II)
rs715407		C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	C/C	Restriktion (Bam HI)
rs 4853030		A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	Cycle Sequencing
rs 7569292		G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	Restriktion (Hha I)
D2S 286		3/3	1/3	3/3	3/3	1/2	1/3	1/3	1/2	Gelscan

### 3.2.1 Untersuchung der PARK3-Familien

Um zu untersuchen, ob bei Indexpatienten aus den PARK3-Familien Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen vorliegen, wurde aus den Familien B und C jeweils eine Patienten-DNA auf Mutationen in der kodierenden Sequenz untersucht. In der DNA des untersuchten Patienten aus Familie B wurde die G421T-Mutation nachgewiesen, weitere Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen wurden nicht detektiert. In Familie C konnte keine Auffälligkeit in der genomischen DNA des Patienten gefunden werden. Um die eine Segregation der G421T-Mutation in Familie B zu untersuchen, wurden alle zur Verfügung stehenden DNAs mit Hilfe des *Pyrosequencings* auf die G421T-Mutation sequenziert.

Die G421T-Mutation wurde bei 17 von 21 untersuchten Personen detektiert, alle Familienmitglieder mit PK-Phänotyp, bis auf einen untersuchten Erkrankten, waren Träger des G421T-Risikoallels. Aufgrund des erkrankten Familienmitglieds (Abbildung 3.2.2, Index-Nr. 412, G/G unterstrichen), das keine Sequenzauffälligkeit aufweist, kosegregiert die G421T-Basensubstitution nicht mit der Erkrankung. Von den weiteren heterozygoten Familienmitgliedern waren leider keine weiteren Informationen bezüglich des Auftretens erster Symptome der Parkinson-Krankheit oder des Erkrankungsalters zugänglich.

**Abbildung 3.2.2:** Stammbaum der PARK3-Indexfamilie B. Die Allele an Nukleotid-Position 421 des *Omi/HtrA2*-Gens der zur Untersuchung vorliegenden Familienmitglieder sind unterhalb der Stammbaumnummer dargestellt. Dabei weisen 17 Familienmitglieder das G421T-Allel auf, von denen vier einen positiven PK-Phänotyp aufzeigen. Interessanterweise zeigt ein Patient an Stammbaumnummer 412 (unterstrichenes G/G-Allel) trotz eines homozygoten Wt-Allels einen positiven PK-Phänotyp. Damit zeigt sich keine Kosegregation des G421T-Allels in Indexfamilie B.

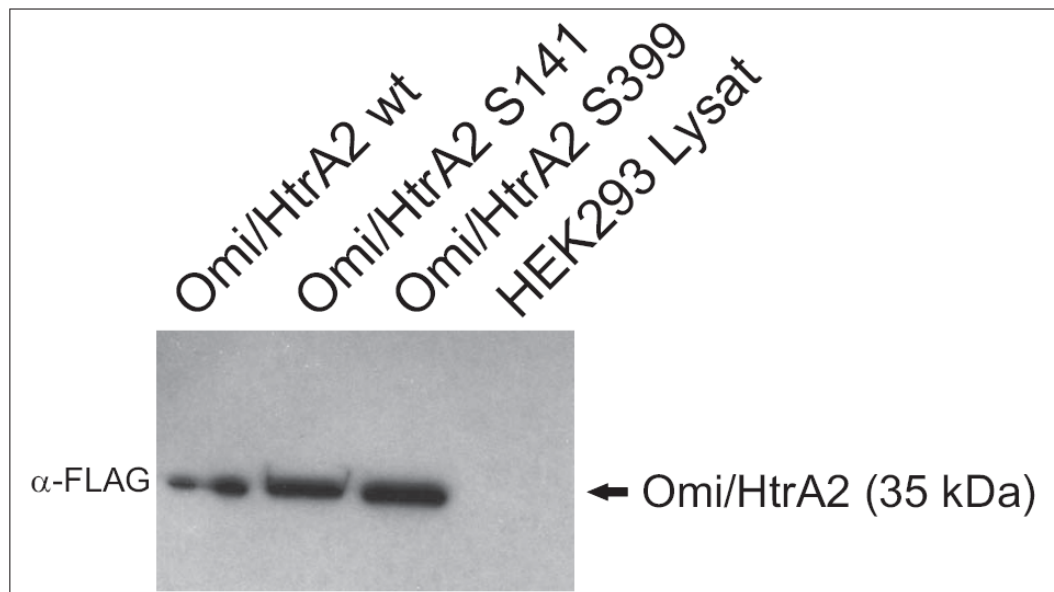
Abbildung auf der nächsten Seite →



### 3.3 Auswirkungen der Mutationen auf die Genexpression

#### 3.3.1 Überexpression bei transienter Transfektion

Über Veränderungen der Aminosäuresequenz können Proteine durch Konformationsänderungen in ihrer räumlichen Struktur und in ihren biochemischen Eigenschaften modifiziert werden. Hierbei kann es zu einem vermehrten Abbau durch Proteasen kommen, die fehlgefaltete Proteine spalten oder auch zu einem stabileren Protein, welches von der Zelle nur schlecht degradiert werden kann. Ebenfalls ist eine Veränderung der Proteingröße denkbar, falls das veränderte Molekül teilweise abgebaut wird. Da bei Omi/HtrA2 die MTS-Sequenz autoproteolytisch gespalten wird, wäre für eine mutierte Aminosäuresequenz denkbar, dass nur das Vorläuferprotein vorliegt, während das aktive, prozessierte Protein nur in einem kleinen Anteil oder gar nicht in den Mitochondrien vorkommt.

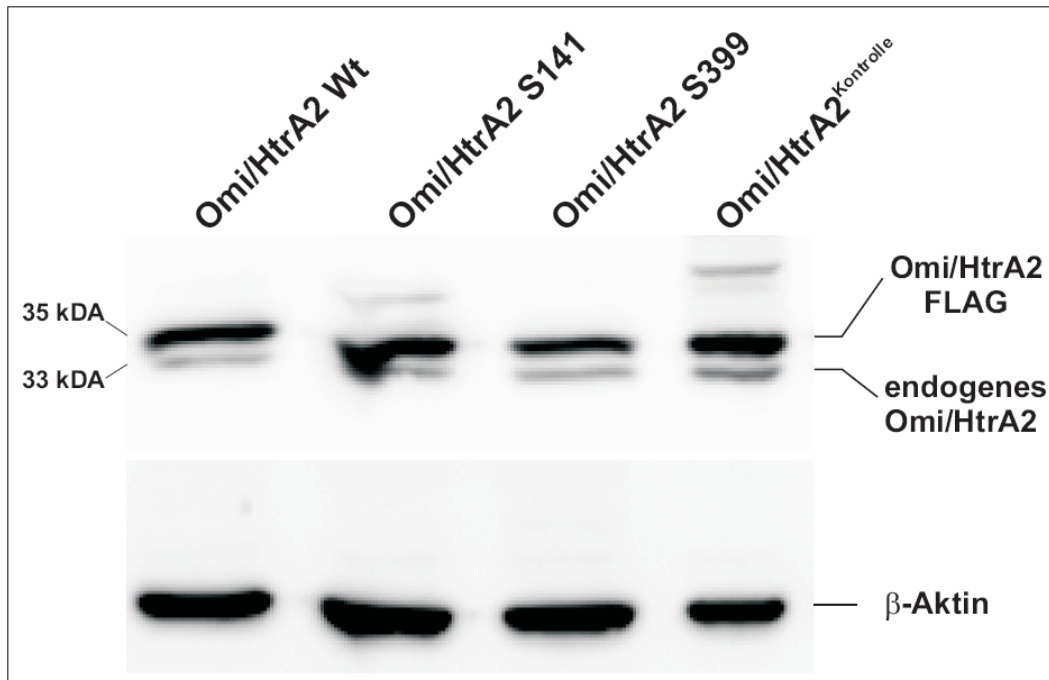


**Abbildung 3.3.1:** Proteinlysate aus pCMV-Tag4A Omi/HtrA2 Wt-, S141- oder S399-transfizierten HEK293 Zellen. Überexprimiertes Omi/HtrA2 wurde über einen  $\alpha$ -FLAG-Antikörper nachgewiesen, als Kontrolle diente Proteinlysate von untransfizierten HEK293 Zellen.

In einer Expressionsanalyse sollten hierzu die Eigenschaften der durch *in vitro* Mutagenese eingebrachten Mutationen in die kodierende Sequenz von Omi/HtrA2 untersucht werden. Wie in Abbildung 3.3.1 dargestellt, zeigen die durch einen  $\alpha$ -FLAG-Antikörper nachgewiesenen Proteinbanden der Omi/HtrA2-FLAG-Konstrukte keine wesentlichen Unterschiede, bezogen auf die Proteingröße und die Expressionsstärke der Konstrukte.

### 3.3.2 Überexpression bei stabil exprimierenden Zelllinien

Bei der Überexpression der pCMV-Tag4A-Omi/HtrA2 Wt-, S141- und S399-Konstrukte konnten weder in HEK293 noch in SH-SY5Y Zellen Unterschiede hinsichtlich der Größe, der Prozessierung oder der Stabilität des Omi/HtrA2-Proteins festgestellt werden.



**Abbildung 3.3.2:** Stabile Überexpression von Omi/HtrA2 in SH-SY5Y Zellen. Die Expression des pCMV-Tag4A-Omi/HtrA2-Konstruktes wurde durch einen polyklonalen Omi/HtrA2-Antikörper nachgewiesen. Man erkennt endogenes Omi/HtrA2 mit einer Größe von 33 kDa und eine stärkere Detektion der Omi/HtrA2-FLAG Konstrukte mit einer Größe von 35 kDa. Der Größenunterschied zwischen endogenem Omi/HtrA2 und den überexprimierten Formen ist durch das fusionierte FLAG-Epitop bedingt. Der Nachweis von  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle für die Menge an Gesamtprotein.

Alle drei Omi/HtrA2-Formen konnten im Westernblot mit ähnlichen Expressionsspiegeln nachgewiesen werden. Abbildung 3.3.2 zeigt einen Westernblot mit Lysaten aus stabil überexprimierenden SH-SY5Y Zellen und einer transient überexprimierenden HEK293 Kontrolle. Der Vergleich der stabil überexprimierenden SH-SY5Y Zellen mit den transient überexprimierenden HEK293 Zellen (Kontrolle in Abbildung 3.3.2) zeigt einen hohen Expressionsspiegel der polyklonalen SH-SY5Y Zellen. Man sieht, dass die stabile Überexpression der Omi-FLAG-Konstrukte im Vergleich zu endogenem Omi/HtrA2 zu deutlich höheren Expressionsspiegeln führt und dass eine vollständige Prozessierung aller drei Formen vorliegt.

### 3.3.3 Zusammenfassung

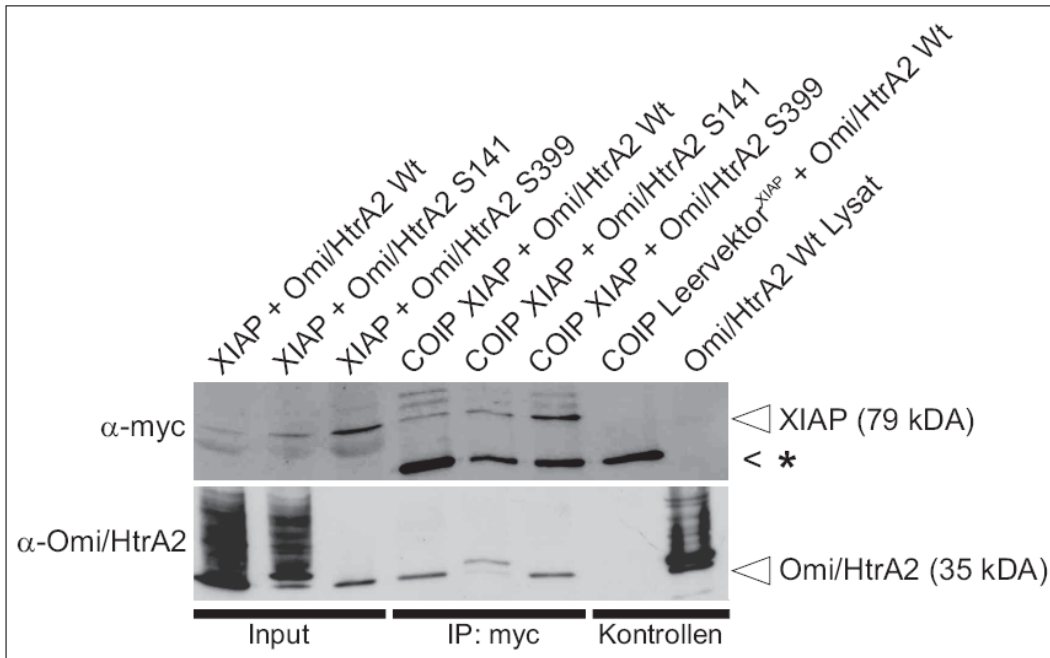
Durch den Nachweis der drei Omi/HtrA2-Formen bei transienter und stabiler Expression in HEK293 und SH-SY5Y Zellen konnte keine Veränderung einer der mutierten Formen zum Wt-Protein beobachtet werden. Weder konnte bei einer der Mutationen eine Veränderung der Proteingröße noch eine Destabilisierung des Proteins nachgewiesen werden, was bei einer erhöhten oder verminderten Form der Degradation von fehlgefalteten Proteinen möglich gewesen wäre.

### 3.4 Auswirkungen der Omi/HtrA2-Mutationen auf die Interaktion mit XIAP

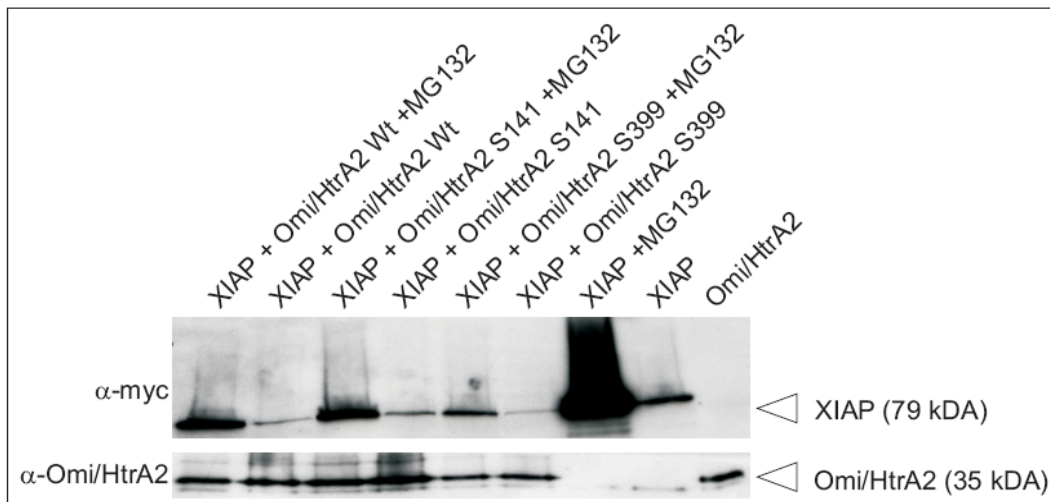
Mittels Ko-Immunpräzipitation sollte herausgefunden werden, ob die bekannte Interaktion von Omi/HtrA2 mit XIAP, welche unter Freisetzung von Omi/HtrA2 aus den Mitochondrien zu einer Inhibition und nachfolgender Degradation von XIAP führt, bei einer der mutierten Formen des Proteins beeinträchtigt ist. Hierzu wurden Wt-, S141- und S399-Ub-Omi/HtrA2-Konstrukte, welche die CDS für ein prozessiertes Omi/HtrA2 in pcDNA3<sup>TM</sup> enthielten, zusammen mit XIAP-myc<sub>6</sub>-Konstrukten in HEK293 Zellen ko-exprimiert.

Das N-terminale Ubiquitin des pcDNA3<sup>TM</sup>-Ub-Omi/HtrA2-Vektors ist notwendig, um eine korrekt prozessierte Form des Proteins nach Expression zu erhalten. Die bereits bekannte Interaktion zwischen XIAP und Omi/HtrA2 konnte für alle Omi/HtrA2-Konstrukte bestätigt (Abbildung 3.4.1) und somit ein Einfluss der mutierten Omi/HtrA2-Proteine auf die direkte Interaktion mit XIAP ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob der Einfluss von mutiertem Omi/HtrA2 eine differentielle Auswirkung auf die XIAP *Steady-State-Level* zeigt. Hierzu wurden pCMV-Tag4A-Konstrukte von Omi/HtrA2 mit pcDNA3.1<sup>TM</sup>/myc<sub>6</sub>-His-Konstrukten von XIAP ko-exprimiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die transfizierten HEK293 Zellen entweder mit oder ohne Zusatz von 10 µM MG132 für 16 Stunden weiter inkubiert. MG132 blockiert als proteasomaler Inhibitor die Degradation von XIAP über das Ubiquitin-Proteasomen-System (Abbildung 3.4.2).



**Abbildung 3.4.1:** Ko-Expression von pcDNA3<sup>TM</sup>-Ub-Omi/HtrA2 und pcDNA3.1<sup>TM</sup>/myc-His-XIAP in HEK293 Zellen mit anschließender IP durch c-myc-Agarose *Beads*. Für die Westernblots wurde ein polyklonaler  $\alpha$ -myc und ein polyklonaler  $\alpha$ -Omi/HtrA2-Antikörper verwendet. Es konnte für alle Formen des prozessierten Omi/HtrA2-Proteins eine Interaktion mit XIAP bestätigt werden. Die Größe von 79 kDa für XIAP (normal 56,7 kDa) ist durch den myc<sub>6</sub>-Tag des pcDNA3.1<sup>TM</sup> Vektors bedingt. Die unspezifische Bande der myc-Agarose-Ak ist gekennzeichnet (\*).



**Abbildung 3.4.2:** *Steady-State-Level* von XIAP bei Ko-Expression von Wt- und mutierten Formen von Omi/HtrA2. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied der XIAP-Spiegel nach Ko-Transfektion mit verschiedenen Omi/HtrA2-Formen. Man erkennt unterhalb der Proteinbanden der transfizierten Omi/HtrA2-Konstrukte schwache Proteinbanden von endogenem Omi/HtrA2, die in Laufbanden der XIAP Transfektionen ohne Omi/HtrA2-Konstrukte auch zu beobachten sind.



### **3.5 Auswirkungen der Omi/HtrA2-Mutationen auf Interaktionen mit PK-assoziierten Proteinen**

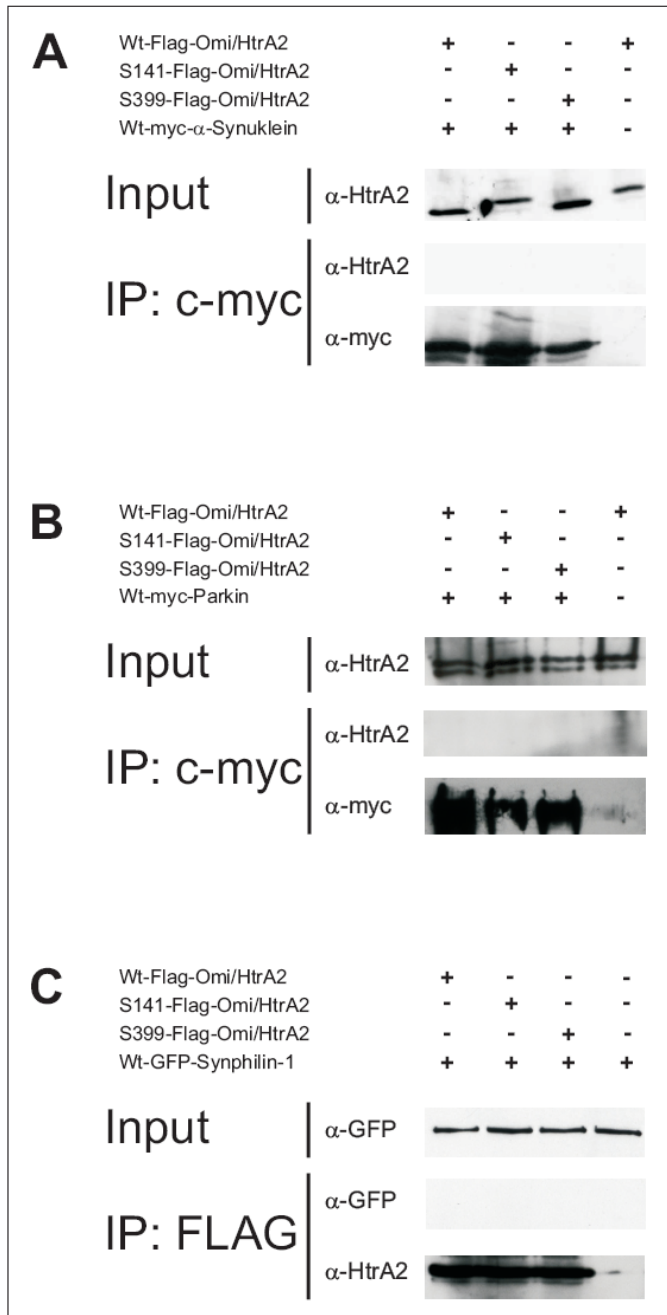
Bei der Parkinson-Krankheit sind bis heute sechs Proteine bekannt, welche für den genetischen Hintergrund der Erkrankung verantwortlich gemacht werden. Durch Ko-Immunpräzipitation sollte herausgefunden werden, ob das Wt-Omi/HtrA2-Protein oder eine der mutierten Formen (S141- oder S399-Omi/HtrA2) mit assoziierten Proteinen der PK differentiell interagiert.

#### **3.5.1 Ko-Immunpräzipitation mit krankheitsassoziierten Proteinen des Ubiquitin-Proteasomen Pathways**

Wie in Abschnitt 1.1.4 erläutert, spielen Mutationen in Genen des Ubiquitin-Proteasomen-Systems bei den erblichen Formen der PK eine entscheidende Rolle. Mittels Ko-Expression und anschließender CoIP sollte herausgefunden werden, ob bekannte krankheitsassoziierte Proteine dieses Proteindegradationsweges mit Omi/HtrA2 interagieren und eine krankheitsauslösende oder modifizierende Rolle durch die mutierten Formen des Omi/HtrA2-Proteins bestehen könnte.

Dazu wurden Wt- oder mutierte Formen von Omi/HtrA2 mittels des pCMV-Tag4A Vektors mit Parkin-, Synphilin-1- und  $\alpha$ -Synuklein-Vektoren ko-transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden Zelllysate hergestellt und eine Immunpräzipitation mit myc-Agarose oder FLAG-Agarose durchgeführt. In einem Westernblot wurde mittels eines  $\alpha$ -Omi/HtrA2-Antikörpers überprüft, ob das Omi/HtrA2-Protein mit einem der ko-exprimierten Proteine interagiert.

Hierbei konnte in keinem Fall eine Interaktion von Wt-, S141- oder S399-Omi/HtrA2 mit Proteinen des Ubiquitin-Proteasomen-Weges nachgewiesen werden. Abbildung 3.5.1 zeigt die Westernblots der durchgeführten IPs und die zugehörigen Expressionskontrollen (*Input*).



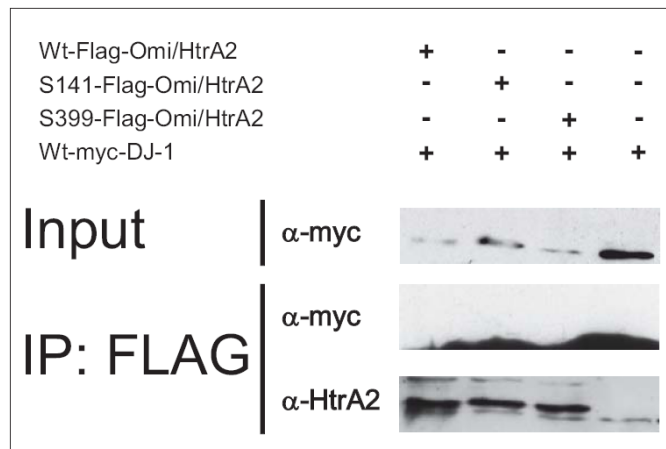
**Abbildung 3.5.1:**

Ko-Immünpräzipitation nach Ko-Expression der drei Formen von Omi/HtrA2 mit Proteinen des Ubiquitin-Proteasomen-Systems. Es wurden die drei entsprechenden pCMV-Tag4A-Konstrukte der unterschiedlichen Omi/HtrA2 Formen mit Vektorkonstrukten, codierend für SNCA (A), Parkin (B) und Synphilin (C), in HEK293 Zellen ko-exprimiert. Im Anschluss erfolgte eine IP mittels c-myc-Agarose oder FLAG-Agarose und einer anschließenden Auftrennung im Westernblot. Als spezifischer Antikörper diente ein polyklonaler  $\alpha$ -Omi/HtrA2-Antikörper. Es konnte in keinem Fall eine Interaktion zwischen Proteinen des UPS mit Wt- bzw. mutierten Formen von Omi/HtrA2 nachgewiesen werden.

### 3.5.2 Ko-Immünpräzipitation mit DJ-1

Durch den Nachweis von Mutationen im *DJ-1*-Gen konnte ein Gen identifiziert werden, welches keine direkte Rolle im UPS spielt und vermutlich in einem weiteren pathogenen Mechanismus der PK krankheitsauslösend ist. Durch die Translokation von DJ-1 bei oxidativem Stress in die Mitochondrien stellt DJ-1 einen möglichen Kandidaten für Interaktionen mit Omi/HtrA2 dar. Um eine physiologische Relevanz der beiden Proteine *in vivo* zu testen, wurden HEK293 Zellen mit Wt-myc-DJ-1 und den drei Formen von Omi/HtrA2 transfiziert und nach 48 Stunden Lysate hergestellt. Dabei wurde Omi/HtrA2 durch FLAG-

Agarose immobilisiert, um mögliche DJ-1-Interaktionen im Westernblot nachzuweisen.



**Abbildung 3.5.2:** Ko-Immunpräzipitation von Omi/HtrA2-FLAG-Konstrukten und Wt-myc-DJ-1. Es konnte keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden. Die dicke Bande der c-myc-detektierten IP entsteht durch die Antikörper der Agarose-Beads. DJ-1 wäre über dieser Bande detektierbar.

Unter normalen physiologischen Bedingungen konnte keine Interaktion zwischen DJ-1 und Omi/HtrA2 identifiziert werden. Somit kann eine proteolytische Spaltung durch überexprimiertes Omi/HtrA2 ausgeschlossen werden.

### 3.5.3 Zusammenfassung

Die hier untersuchten Proteine, welche nachweislich bei Mutationen zur Ausprägung der PK führen, zeigten bei Interaktionsstudien mit Wt-Omi/HtrA2 sowie den S141- und S399-Mutationen keine erkennbaren Verbindungen auf funktioneller Ebene.

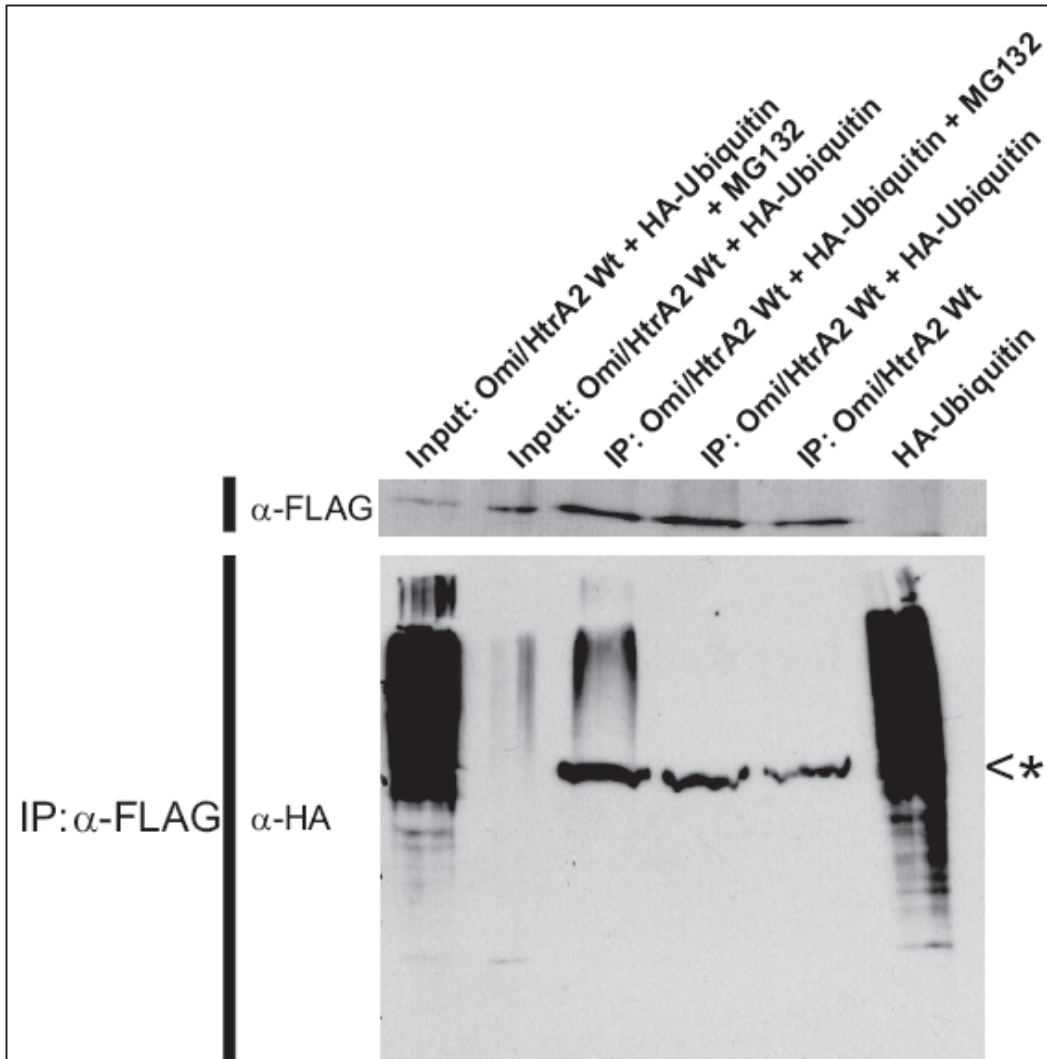
## 3.6 Auswirkungen der Mutationen auf die Ubiquitinierung

Die Ubiquitinierung von Proteinen ist für den Zellstoffwechsel von großer Bedeutung. Zum einen können Proteine durch Mono-Ubiquitinierung modifiziert werden, um sie an bestimmte Zellkompartimente weiterzuleiten, auf der anderen Seite werden polyubiquitinierte Proteine für den proteasomalen Abbau markiert.

Durch eine Veränderung der Ubiquitinierung der S141- oder S399-Omi/HtrA2-Proteine könnte es somit, im Vergleich zum Wildtyp-Protein, zu einem fehlenden Abbau-Signal für den proteasomalen Degradationsweg kommen und damit zu einer Akkumulation der Proteine im Mitochondrium oder im Zytosol.

In einer ersten Untersuchung wurde überprüft, ob Wt-Omi/HtrA2 ubiquitiniert wird. Hierzu wurde das pCMV-Tag4A-Omi/HtrA2-Wt-Konstrukt mit pMT123-HA<sub>8</sub>-Ubiquitin ko-exprimiert, mittels FLAG-Agarose immunpräzipitiert und auf einem Westernblot durch einen HA-Antikörper visualisiert. Um eine proteasomale Degradation von Wt-Omi/HtrA2 durch die Anreicherung von ubiquiti-

niertem Omi/HtrA2 zu untersuchen, wurden Zellen mit 10  $\mu$ M MG132 für 16 h behandelt.

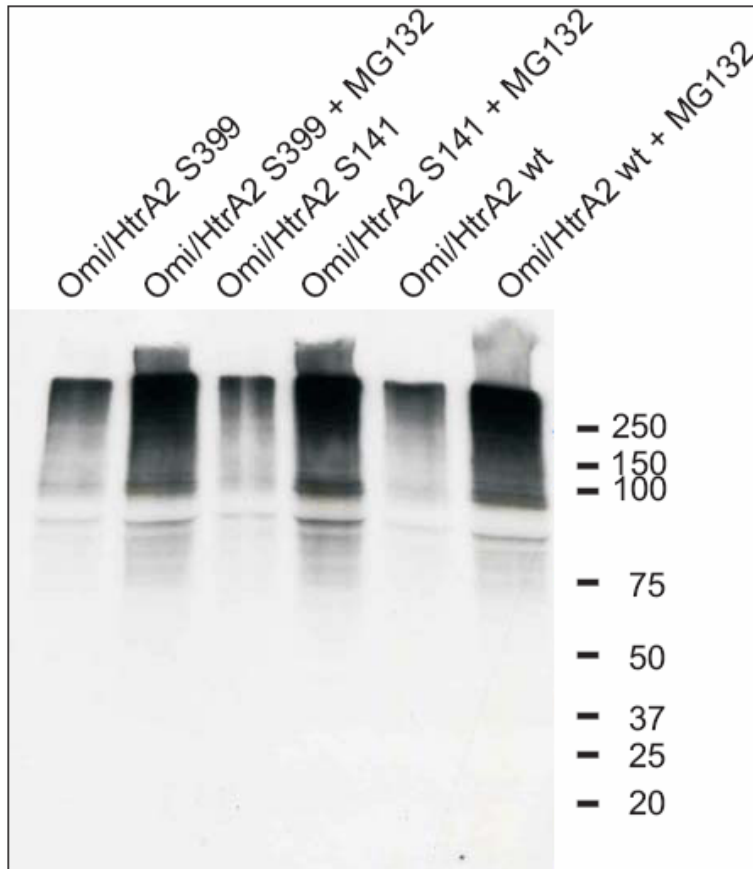


**Abbildung 3.6.1:** Ubiquitinierung von Wt-Omi/HtrA2-FLAG und Anreicherung polyubiquitinerter Omi/HtrA2-FLAG-Formen nach proteosomaler Hemmung durch MG132. Bei normaler proteosomaler Funktion zeigt der HA-Antikörper wenig Signal für ubiquitiniertes Omi/HtrA2 nach der IP. Durch proteosomale Hemmung wird ein hochmolekularer Schmier polyubiquitinerter Omi/HtrA2-Formen erkennbar. Die breite Bande (\*) in den Spuren mit immunpräzipitierten Zelllysaten ist auf eine unspezifische Bande der FLAG-Agarose zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass Wt-Omi/HtrA2 ubiquitiniert wird. Durch proteosomale Hemmung konnten vermehrt ubiquitinierte Formen von Wt-Omi/HtrA2 präzipitiert und mittels des HA-Antiköpers nachgewiesen werden (Abbildung 3.6.1).

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob die mutierten Formen von Omi/HtrA2 Unterschiede bezüglich ihrer Ubiquitinierung aufweisen. Hierzu wurden die pCMV-Tag4A-Omi/HtrA2-Wt-, S141- und S399-Konstrukte mit

pMT123-HA<sub>8</sub>-Ubiquitin ko-exprimiert, mittels FLAG-Agarose immunpräzipitiert und auf einem Westernblot durch einen HA-Antikörper visualisiert.



**Abbildung 3.6.2:** Nachweis der Ubiquitinierung von Omi/HtrA2 durch 8x HA-Ubiquitin nach IP mit FLAG-Agarose von pCMV-Tag4A-Omi/HtrA2 mittels Detektion mit HA-Antikörper. Die Banden des Größenstandards sind in kDa angegeben.

Für alle drei Omi/HtrA2-Formen konnte eine Ubiquitinierung nachgewiesen werden. Für Wt-, S141- und S399-Omi/HtrA2 erkennt man deutlich die hochmolekularen polyubiquitinierten Produkte, welche durch den  $\alpha$ -HA-Ak detektiert werden. Dass alle drei Formen in gleichem Maße über den UPS-Weg abgebaut werden, wird durch die Akkumulation der polyubiquitinierten Proteine nach 16 h Hemmung des UPS mit 10  $\mu$ M MG132 deutlich.

### **3.7 Auswirkungen der Mutationen auf die Funktionalität**

Durch eine Kooperation mit Dr. Louis Miguel Martins der MRC Toxicology Unit in Leicester (UK) waren weiterführende Experimente auf biochemischer und funktioneller Ebene möglich. Mittels aufgereinigtem, rekombinantem Wt-, S141- und S399-Omi/HtrA2, kloniert in pET-20b zur rekombinanten Synthese von C-terminal 6x His markiertem Omi/HtrA2, wurden funktionelle Unterschiede von Wt- zu mutiertem Omi/HtrA2 untersucht.

Da die beiden Mutationen nahe bei (S141) oder in funktionellen Domänen (S399) liegen, welche die Proteaseaktivität beeinflussen (Martins et al., 2003), sollten die möglichen Auswirkungen der Mutationen auf die Aktivierung der Proteasefunktion gemessen werden.

Weiterhin ist bekannt, dass natives Omi/HtrA2 als Homotrimer vorliegt und nur in dieser Konformation eine Proteaseaktivität besitzt. Eine Konformationsänderung durch mutiertes Omi/HtrA2 könnte damit die Homotrimerisierung beeinflussen und zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Dies sollte in einem Interaktions-*Assay* der Omi/HtrA2 Monomere untersucht werden.

#### **3.7.1 Effekte von mutiertem Omi/HtrA2 auf die Serin-Proteaseaktivität**

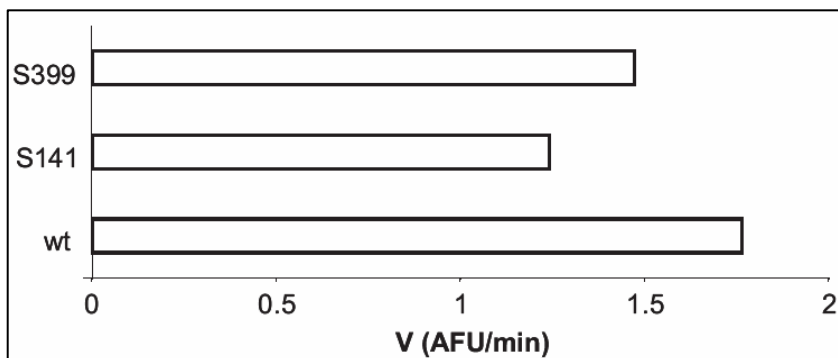
Um die proteolytische Aktivität von Omi/HtrA2 zu bestimmen, wurde ein Fluoreszenz-Peptid-*Assay* mit aktivem, rekombinantem Protein (Wt, S141 und S399) und entsprechenden Substraten nach Literaturangaben durchgeführt (Martins et al., 2003). Die BIR2-Domäne von XIAP (AS 159-256) wurde hierzu in einen pGEX-3X Vektor mittels PCR kloniert. Das nach Induktion mit IPTG synthetisierte BIR2-Protein wurde mittels Glutathione-Sepharose-*Beads* aufgereinigt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das PDZ-Opt Peptid (biotin-GQYYFV-COOH) wurde an der 'Tufts University Core Facility' hergestellt.

GST-BIR2 und PDZ-Opt dienten dabei als aktivierende Substrate für die IAP-Bindedomäne, respektive PDZ-Bindedomäne. Die proteolytische Aktivität von rekombinantem Wildtyp oder mutiertem Omi/HtrA2 wurde durch Inkubation von 100 nM Omi/HtrA2 mit GST, GST-BIR2 oder PDZ-Opt Peptid nach Vorinkubation oder ohne Vorinkubation gemessen.

Hierzu wurde die Spaltung des Fluoreszenzsubstrates (H2-Opt *fluorescent substrate* (MCA-IRRVSYSF(DNP)KK)) auf einem Cytofluor Serie 4000 Plattenlesegerät gemessen und ist im Folgenden in Arbitrary Fluoreszenz Units angegeben. Die Reaktionen wurden bei 30°C in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0,5 mM EDTA, 1mM DTT durchgeführt.

Die Reaktionsraten wurden über eine lineare Regressionsanalyse, über die Datenpunkte, welche das Maximum der Reaktion der jeweiligen Versuchskonditionen widerspiegelt, bestimmt. Jeder Versuch wurde in drei unabhängigen Triplikaten repliziert.

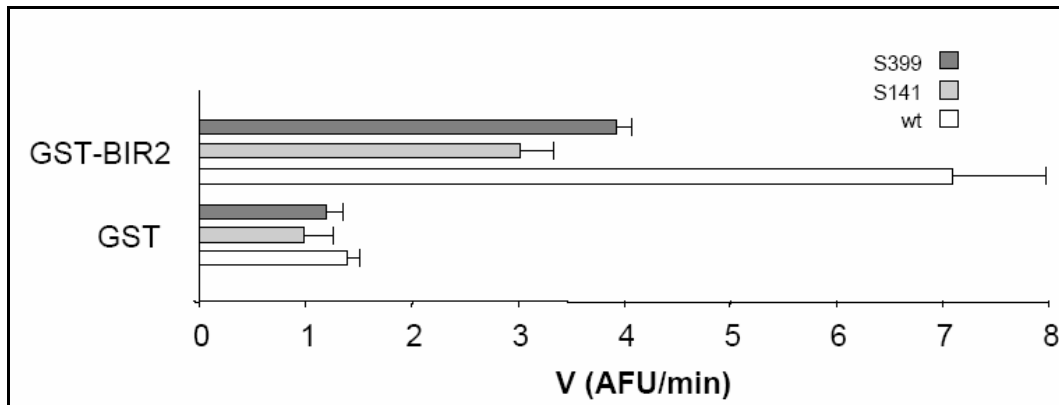
Die Grundaktivität wurde dabei durch Zugabe des H2-Opt Fluoreszenzsubstrates (MCA-IRRVSYSF(DNP)KK) gemessen. Hierbei war nur eine basale Aktivität zu messen, wobei die Unterschiede zwischen Wt- und mutiertem Omi/HtrA2 als Messschwankungen zu deuten sind (Abbildung 3.7.1). Eine durch Konformationsänderung ausgelöste teilweise Selbstaktivierung von mutiertem Omi/HtrA2 konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr wurde nur eine geringe Verminderung der Basalaktivität bei den mutierten Formen von Omi/HtrA2 beobachtet.



**Abbildung 3.7.1:** Messung der Grundaktivität von rekombinantem Wt- oder mutiertem Omi/HtrA2 mittels des H2-Opt Fluoreszenzsubstrates (MCA-IRRVSYSF(DNP)KK). Zu messen war nur eine basale Grundaktivität, keine der Mutationen zeigte eine erhöhte Aktivität oder Selbstaktivierung, sondern einen Rückgang der Basalaktivität (AFU, Arbitrary Fluoreszenz Units).

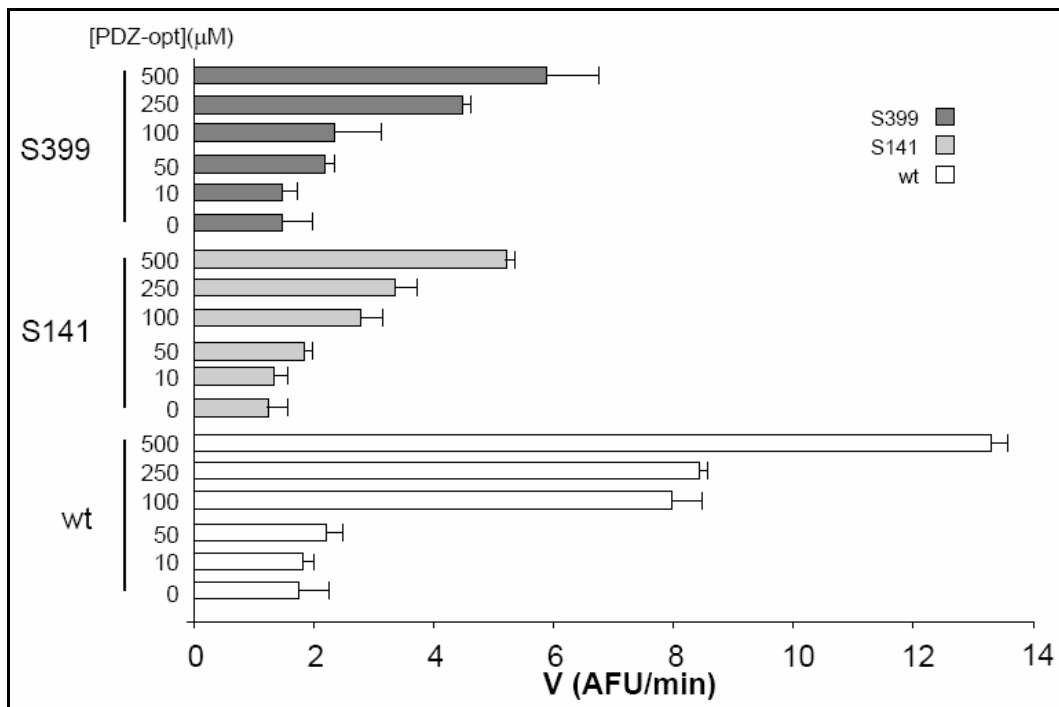
Um die proteolytische Aktivität unter spezifischen Substraten zu messen, wurden GST-BIR2 und PDZ-Opt und das H2-Opt Fluoreszenzsubstrates (MCA-IRRVSYSF(DNP)KK) verwendet. Abbildung 3.7.2 zeigt die proteolytische Aktivität von Omi/HtrA2 durch die Aktivierung der IAP-Bindedomäne. Als Kontrolle zur BIR2-Domäne diente das GST-Kontrollprotein. Es zeigt sich ein deutlicher Abfall der Proteaseaktivität der mutierten Formen, verglichen zum Wildtyp-Protein. Die Zugabe von GST-Kontrollprotein zeigt keinen Einfluss auf

die Aktivierung durch die IAP-Bindedomäne und bleibt auf dem Niveau der Grundaktivität (vgl. Abbildung 3.7.1).



**Abbildung 3.7.2:** Aktivierung von rekombinantem Wt- und mutiertem Omi/HtrA2-Protein durch die BIR2-Domäne von XIAP an der IAP Bindedomäne von Omi/HtrA2. Mutiertes S141- und S399-Omi/HtrA2 weist einen deutlichen Verlust der proteolytischen Aktivität im Vergleich zum Wt auf.

Die Beobachtung, dass die mutierten Formen von Omi/HtrA2 eine deutlich geringere Proteaseaktivität zeigten als das Wt-Protein konnte auch nach Aktivierung über die PDZ-Domäne beobachtet werden (siehe Abbildung 3.7.3).



**Abbildung 3.7.3:** Aktivierung von rekombinantem Wt- und mutiertem Omi/HtrA2-Protein durch die PDZ-Domäne von Omi/HtrA2. Mutiertes S141- und S399-Omi/HtrA2 zeigt einen deutlichen Verlust der proteolytischen Aktivität im Vergleich zum Wt ab einer Konzentration von 100 μM.



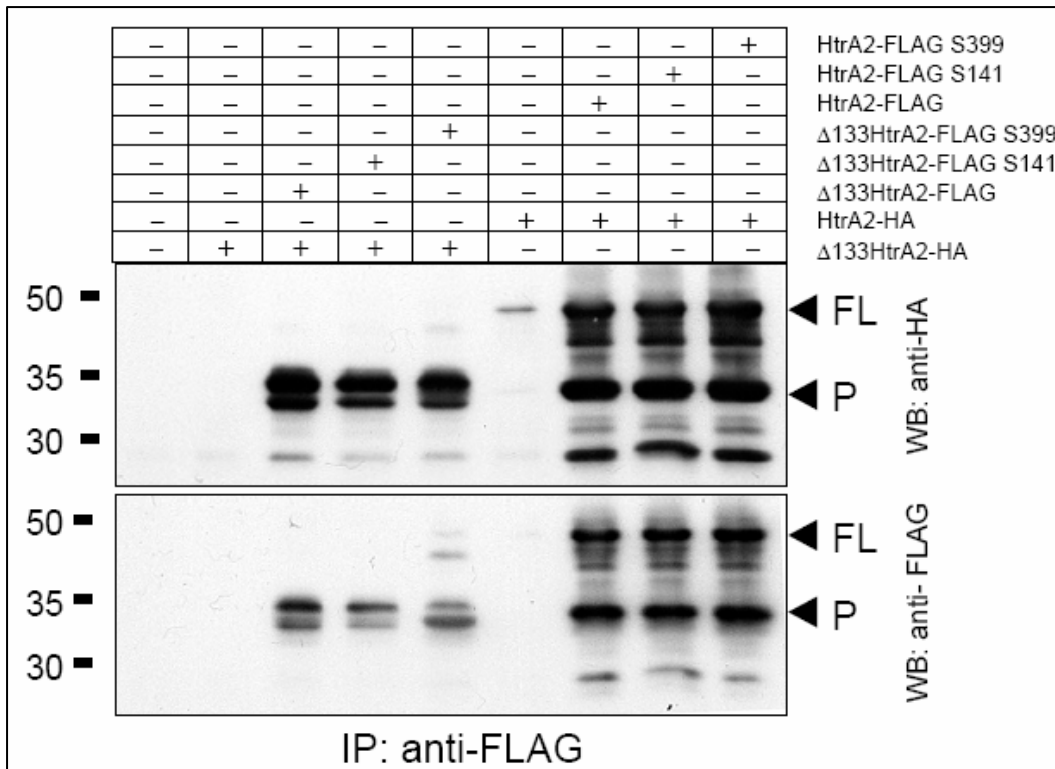
### **3.7.2 Effekte von mutiertem Omi/HtrA2 auf die Homotrimerisierung**

Für die Untersuchung, ob die mutierten Formen von Omi/HtrA2 die Fähigkeit besitzen miteinander, sowie mit dem Wt, zu trimerisieren, wurden HEK293 Zellen mit Konstrukten ko-transfiziert die entweder für C-terminal HA-markiertes Wt- oder C-terminal FLAG-markierte Omi/HtrA2 Varianten (Wt, S141 oder S399) codieren. Von allen Konstrukten wurden die Vorläuferform und die prozessierte Form ( $\Delta 133$ ) transfiziert.

48 Stunden nach Transfektion (Effectene, Qiagen) wurden die Zellen lysiert und durch einen FLAG-spezifischen Antikörper (Sigma) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden auf einem Westernblot mittels FLAG- oder HA-Biotin konjugierten Antikörper (Sigma) analysiert.

Beide Mutationen zeigten keinen Einfluss auf die Interaktion mit Wt-Protein und damit keinen Hinweis für eine Störung der Trimerisierung. Dies konnte für das Vorläuferprotein wie auch für die prozessierte Form von Omi/HtrA2 nachgewiesen werden.

Abbildung 3.7.4 zeigt, dass das S141- bzw. S399-mutierte Protein auch keinen Einfluss auf die autoproteolytische Spaltung des Vorläuferproteins zum prozessierten Protein aufweist. Beide Formen können nach Immunpräzipitation mit transfizierten Konstrukten, welche die komplette CDS von Omi/HtrA2 beinhalten, nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der Expressions-Analysen in Abschnitt 3.3.



**Abbildung 3.7.4:** Westernblot der ko-exprimierten HA- und FLAG-getaggtten Formen von Omi/HtrA2 nach Immunpräzipitation mit FLAG-Antikörpern. Man erkennt, dass sowohl die Vorläuferform als auch die prozessierte Form von Wt-Omi/HtrA2 mit allen FLAG-getaggtten Formen (Wt, S141 und S399) von Omi/HtrA2 Komplexe bildet und über einen HA-Antikörper nach IP im Westernblot erkannt werden. Bei der Ko-Transfektion der Vorläuferform von Omi/HtrA2 und anschließender Detektion über HA-Antikörper kann man erkennen, dass die autoproteolytische Aktivität von Wt- und mutierten Formen nicht gestört ist, da sowohl das Vorläuferprotein (FL= *Full length*) als auch die prozessierte Form (P) von Omi/HtrA2 nachgewiesen werden kann.

## **3.8 Mikroskopie**

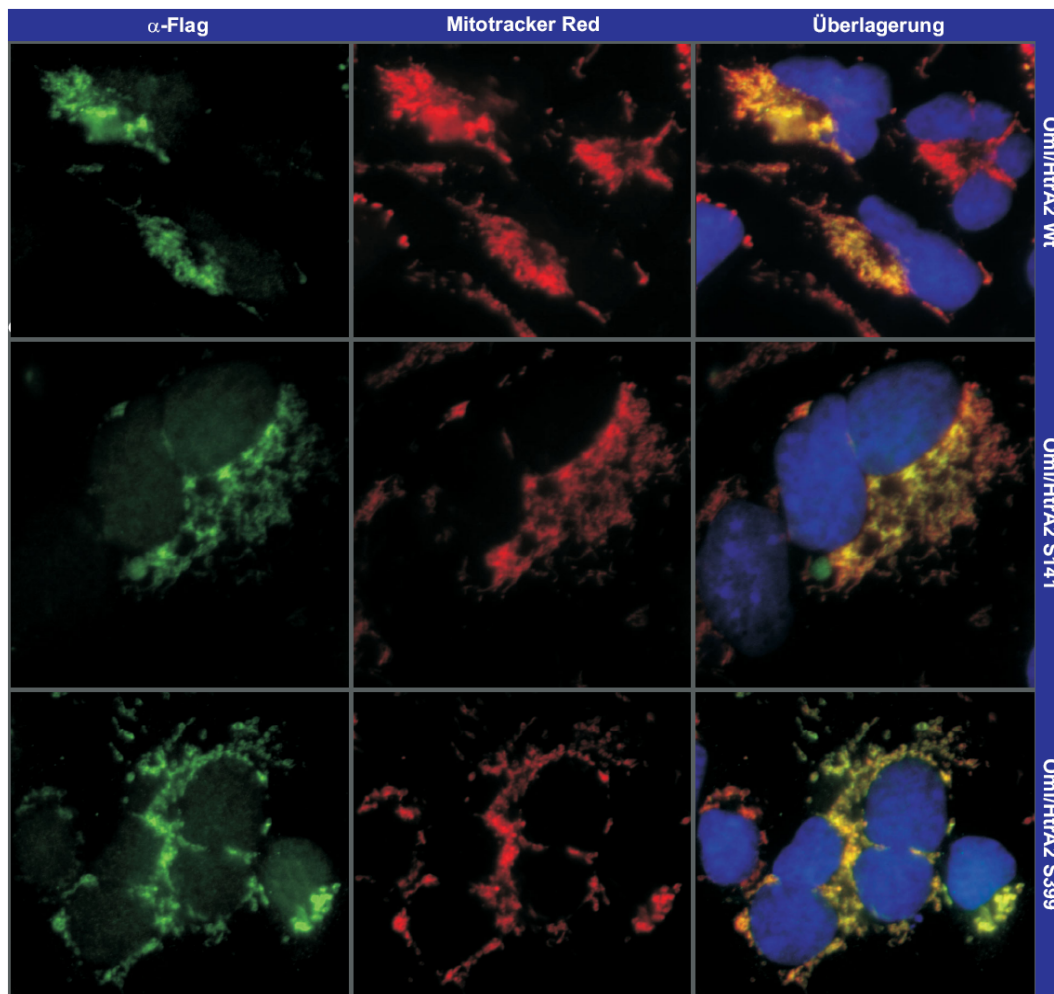
### **3.8.1 Subzelluläre Lokalisation von Omi/HtrA2**

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation wurden HEK293 und SH-SY5Y Zellen mit pCMV-Tag4A-Wt-, pCMV-Tag4A-S141- und pCMV-Tag4A-S399-Omi/HtrA2 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert.

Die jeweiligen Omi/HtrA2-Konstrukte wurden über den FLAG-Tag des pCMV-Tag4A-Vektors mit einem primären Antikörper detektiert, der durch einen Cy2-markierten Sekundärantikörper visualisiert wurde. Als mitochondrialer Marker diente Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRosamine. Weiterhin wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 durchgeführt, welche in Abbildung 3.8.1 jedoch nur in der Überlagerung gezeigt wird.

Sollte durch eine der Basensubstitutionen eine veränderte subzelluläre Lokalisation des Omi/HtrA2-Proteins hervorgerufen werden, so müsste diese in einer transfizierten Zelle zu beobachten sein.

Eine unterschiedliche Lokalisation der S141- und S399-Omi/HtrA2-Proteine konnte jedoch ausgeschlossen werden. Alle drei transfizierten Vektorkonstrukte zeigten eine deutliche Kolo­kalisation von Omi/HtrA2 mit den durch Mitotracker<sup>®</sup> visualisierten Mitochondrien. Eine Lokalisation von Omi/HtrA2 in weiteren Zellkompartimenten wurde mittels der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen. Die leichte Färbung des Kerns mit dem Cy2-Sekundärantikörper ist als unspezifisch zu werten, weil diese in der Negativkontrolle ebenfalls beobachtet wurde.



**Abbildung 3.8.1:** Transiente Überexpression mit pCMV-Tag4A Omi/HtrA2 (Wt, S141 und S399) in HEK293-Zellen. Als mitochondrialer Marker diente Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRos. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit einem  $\alpha$ -FLAG-Antikörper und Cy2-markiertem Sekundärantikörper visualisiert. Als Kernfärbung diente Hoechst 33258. Man erkennt eine deutliche Lokalisation von Omi/HtrA2 (Wt, S141 und S399) in den Mitochondrien, weitere Lokalisationen konnten nicht beobachtet werden.

### 3.8.2 Morphologie stabil Omi/HtrA2 überexprimierender Zellen

Zur weiteren Charakterisierung wurden in den mikroskopischen Untersuchungen auch stabil überexprimierende HEK293 und SH-SY5Y Zelllinien betrachtet, welche den pCMV-Tag4A-Vektor mit den drei Omi/HtrA2 (Wt, S141 und S399) Konstrukten unter Selektionsdruck exprimierten.

Da man durch die Verwendung der stabil überexprimierenden Zelllinien nicht mehr darauf angewiesen war, untransfizierte von transfizierten Zellen im Mikroskop zu unterscheiden, konnte ein  $\alpha$ -Omi/HtrA2-Antikörper verwendet werden. Dieser Antikörper markiert das überexprimierte FLAG-Omi/HtrA2 sowie endogenes Omi/HtrA2.

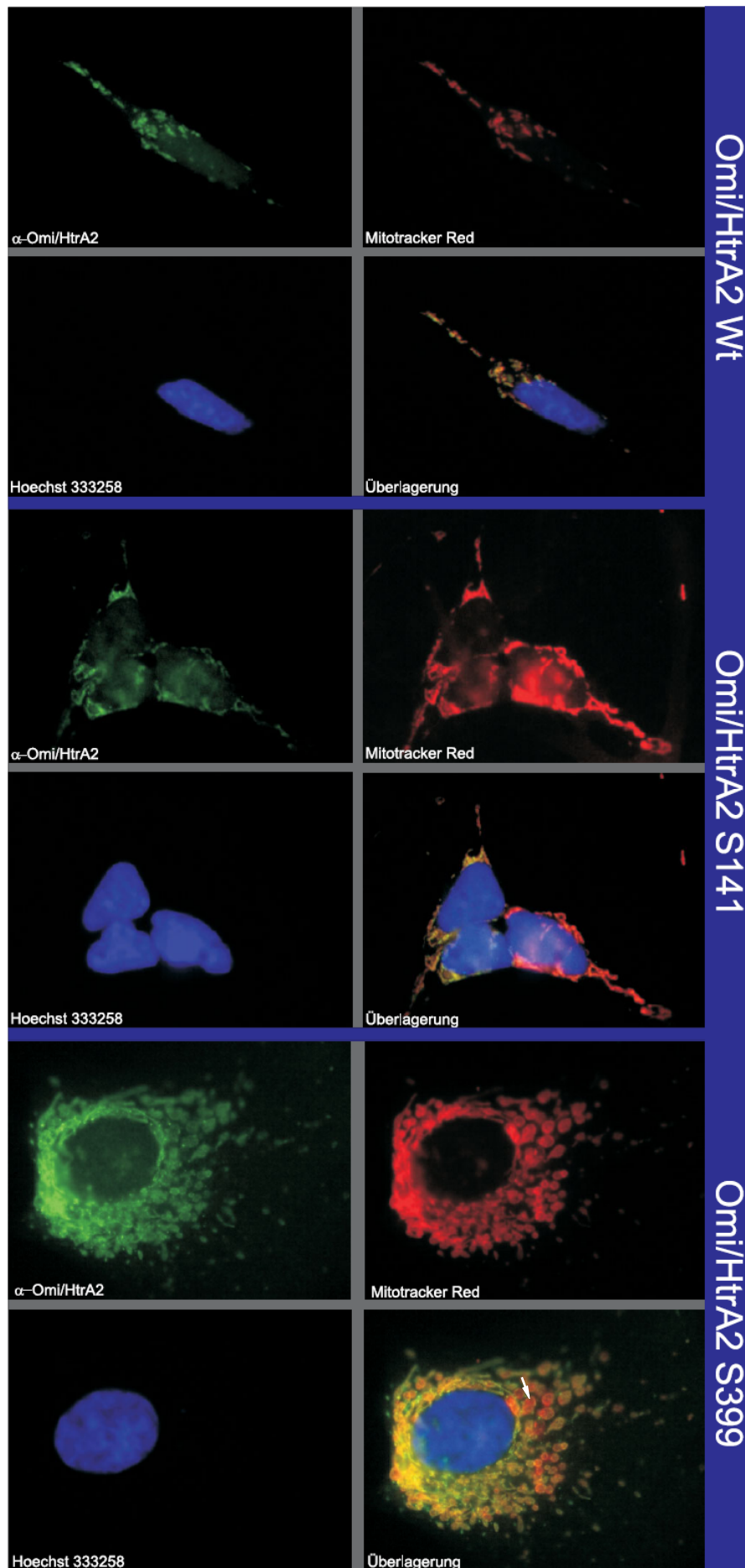
Bei den weiteren mikroskopischen Untersuchungen fiel auf, dass die dauerhafte Expression von S141- und S399-Omi/HtrA2 zu auffälligen morphologischen Veränderungen der Mitochondrien führt (Abbildung 3.8.2, unten).

Die veränderten Mitochondrien wurden bei der S399 exprimierenden Zelllinie zu etwa 40 Prozent beobachtet, gefolgt von der S141 exprimierenden Zelllinie mit etwa 10 Prozent. Bei der Zelllinie mit Überexpression des Wt-Omi/HtrA2-Proteins konnten nur vereinzelt (< 1%) leichtgradig veränderte Mitochondrien festgestellt werden.

Die Morphologie der Mitochondrien der S399-Omi/HtrA2 überexprimierenden Zellen zeigte oft stark vergrößerte und aufgebläht erscheinende mitochondriale Strukturen (Abbildung 3.8.2, Pfeil), die auch bei der Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRos-Färbung angefärbt waren. Diese abnorme Morphologie wird als mitochondriale Schwellung bezeichnet. Diese Beobachtung wurde bei stabil exprimierenden HEK293 sowie dopaminergen SH-SY5Y Zellen gemacht.

**Abbildung 3.8.2:** Morphologie stabil überexprimierender HEK293 Zellen. Als mitochondrialer Marker diente Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRos. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit einem  $\alpha$ -Omi/HtrA2-Ak und FITC-markiertem Sekundärantikörper visualisiert. Als Kernfärbung diente Hoechst 33342. Man erkennt bei Omi/HtrA2 Wt und S141 überexprimierenden Zellen keine auffälligen Strukturen. Bei S399-Omi/HtrA2 überexprimierenden Zellen sind deutlich vergrößerte mitochondriale Strukturen zu beobachten (Pfeil), die sich über die ganze Zelle verteilen.

Abbildung auf der nächsten Seite →



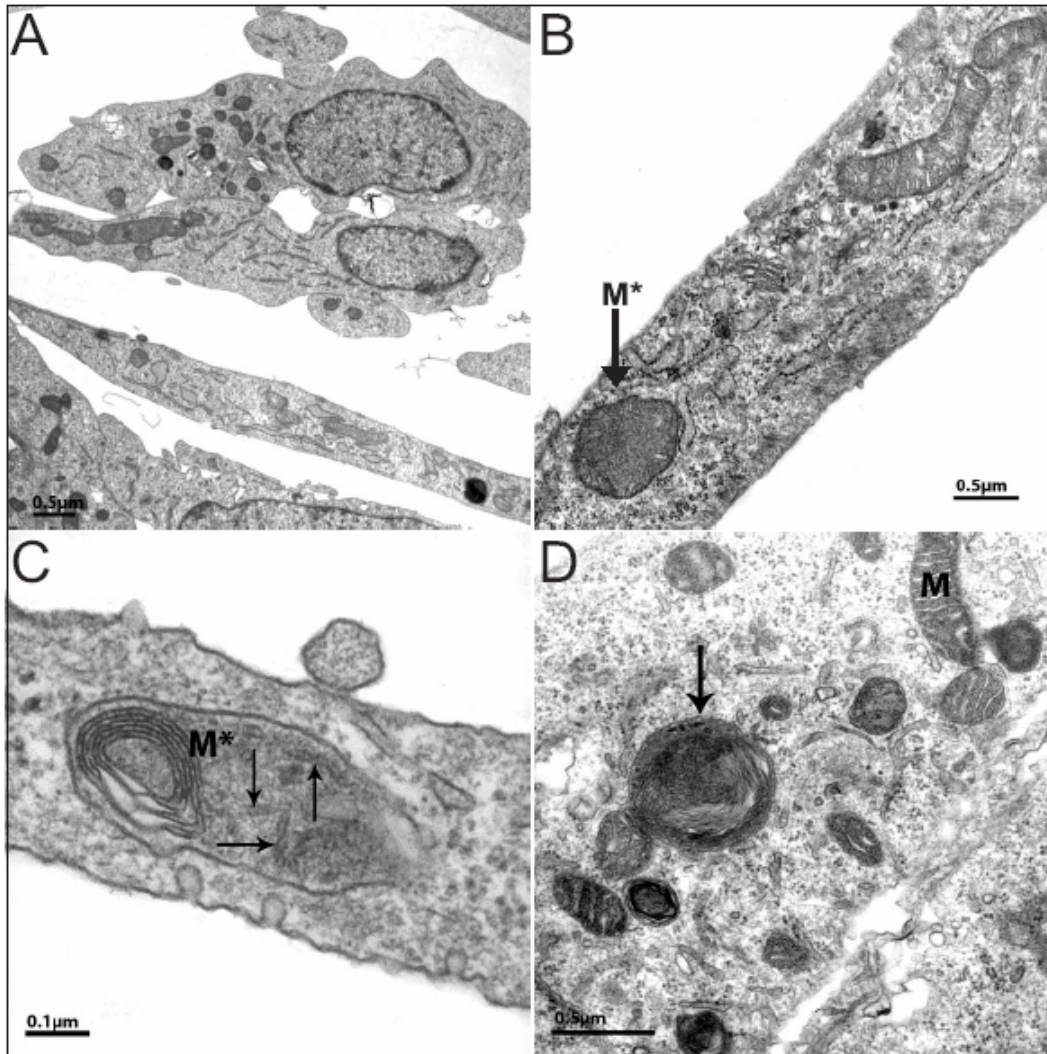
### 3.8.3 Ultrastrukturelle Untersuchungen (EM)

Wegen der morphologischen Auffälligkeiten der Mitochondrien in S141 und vor allem S399 überexprimierenden HEK293 und SH-SY5Y Zellen sollten die stabil überexprimierenden HEK293 Zellen genauer auf ihre morphologischen Strukturen untersucht werden.

Hierzu wurden Wt-, S141- und S399-Omi/HtrA2 HEK293 Zellen mittels Glutaraldehyd (2,5%) fixiert. Diese Zellen wurden im Institut für Pathologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wolburg für die Elektronenmikroskopie präpariert und ultrastrukturell im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) untersucht.

Hierbei wurden die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen im Epifluoreszenzmikroskop bestätigt. Verglichen mit Wt-Omi/HtrA2 exprimierenden Zellen zeigten S141 und speziell S399 exprimierende Zellen eine stark erhöhte Anzahl an charakteristischen Veränderungen der mitochondrialen Morphologie. Abbildung 3.8.3 zeigt beispielhaft die beobachteten Veränderungen der S399-Omi/HtrA2 verglichen mit den Wt überexprimierenden HEK293 Zellen.

Man sieht bei S399 stabil überexprimierenden Zellen veränderte Mitochondrien (Bild B & C), bei denen sich die Cristae disorganisieren. In Abbildung 3.8.3 D scheint ein membranumschlossener Vesikel mitochondriale Bestandteile zu beinhalten (Pfeil). Die membranumschlossenen Vesikel erinnern dabei an lysosomale Vesikel, in denen zelluläre Organellen abgebaut werden (ÜA: Larsen, 2002; Stefanis, 2001).



**Abbildung 3.8.3:** Ultrastrukturelle Untersuchung der Wt- und S399-Omi/HtrA2 stabil überexprimierenden HEK293 Zellen. Verglichen mit Wt-Omi/HtrA2 (A) zeigen Zellen, welche das mutierte S399-Omi/HtrA2 exprimieren (B-D), oft vergrößerte und veränderte Mitochondrien (M\*) mit disorganisierten Cristae (Pfeile, C). Bei einigen Zellen werden zurückgebildete Mitochondrien mit verdichteten, lamellären Strukturen beobachtet, die membranumschlossenen Vesikeln gleichen (Pfeil, D).



### 3.8.4 Kolokalisation von Lysosomen und Mitochondrien

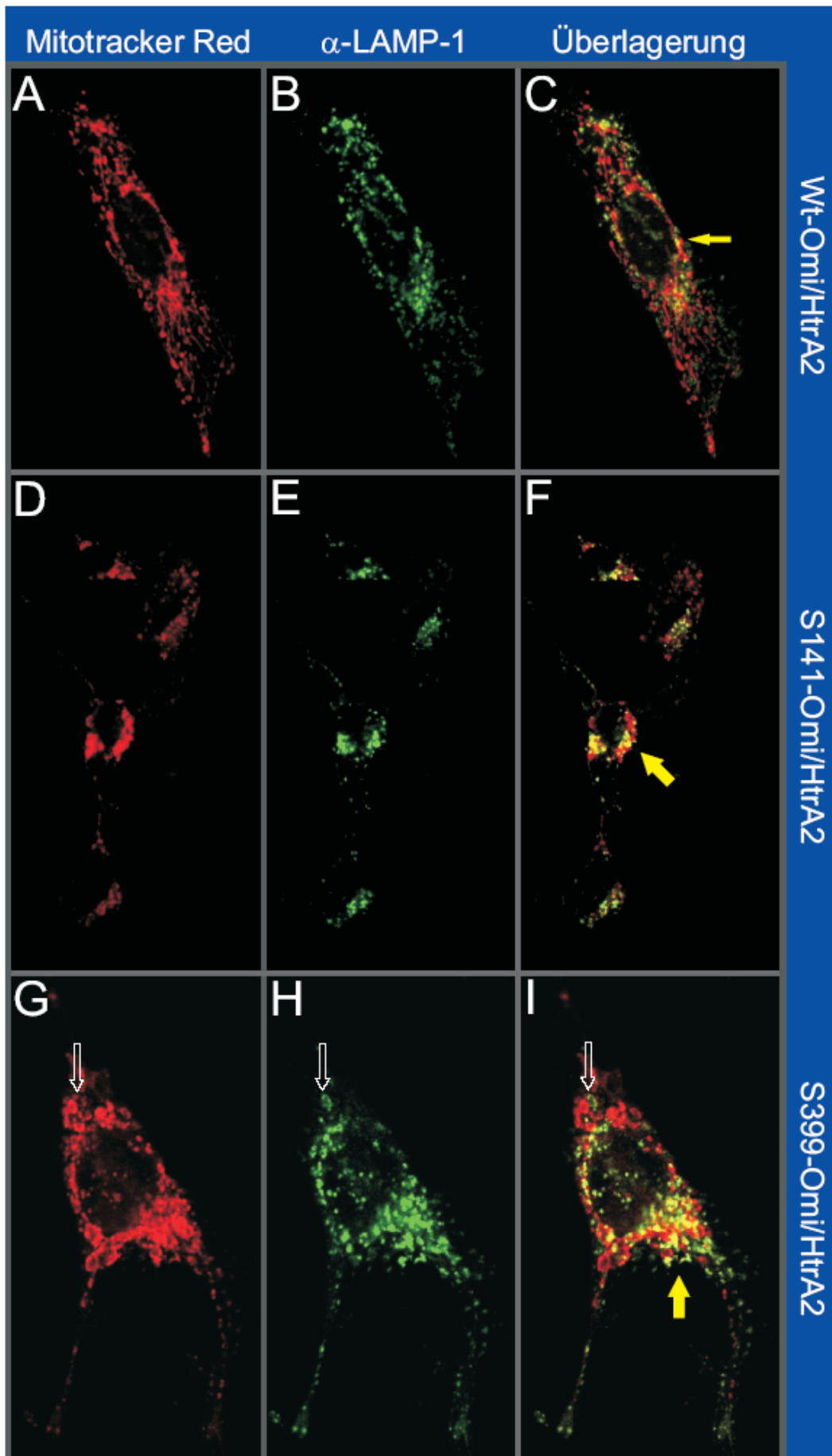
Wegen der ultrastrukturellen Untersuchungen am TEM und der Beobachtung, dass mitochondriale Überreste in Strukturen lokalisiert waren, die auf lysosomale Bestandteile schließen lassen, wurden fixierte und lebende Zellen, welche die Omi/HtrA2-Konstrukte stabil exprimierten, auf eine Kolokalisation zwischen Mitochondrien und Lysosomen hin untersucht.

Zur Untersuchung von fixierten Zellen wurden stabil überexprimierende HEK293 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Coverslips ausgesät und für 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen adhärent anwachsen gelassen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit 100  $\mu$ M Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRos wurden die Zellen fixiert und eine Immunfärbung mit  $\alpha$ -LAMP-1-Antikörper durchgeführt, welcher Lysosomen spezifisch detektiert.

Zur Untersuchung vitaler Zellen wurden stabil überexprimierende Omi/HtrA2 Zellen in Objektträgern mit Kulturkammern ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden adhärent anwachsen gelassen und 30 Minuten vor Beginn der Untersuchung gefärbt. Als lysosomaler Marker diente dabei LysoTracker<sup>®</sup> Red, Mitochondrien wurden mit Mitotracker<sup>®</sup> Green FM visualisiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt und sofort mikroskopisch untersucht.

**Abbildung 3.8.4:** Laserscanning-Mikroskopie der fixierten stabil überexprimierenden Omi/HtrA2-HEK293 Zellen (Wt, S141 und S399). Als mitochondrialer Marker diente Mitotracker<sup>®</sup> Red CMXRos, Lysosomen wurden mittels Immunfärbung durch einen  $\alpha$ -LAMP-1-Antikörper visualisiert. Man erkennt in allen Omi/HtrA2 überexprimierenden Zellen eine Kolokalisation zwischen lysosomal und mitochondrial markierten Strukturen (gelbe Pfeile - Bild C, F, I). Es kommt jedoch nur bei S141- und S399-Omi/HtrA2 zur vermehrten Kolokalisation und einer Akkumulation der gelb überlagerten Strukturen (Bild F, I - dicke Pfeile), die auf eine erhöhte lysosomale Aktivität schließen lassen. Bei S399-Omi/HtrA2 scheint eine lysosomal gefärbte Struktur noch schwach Mitotracker<sup>®</sup> Red gefärbt zu sein, welche auch in der Morphologie eher einer mitochondrialen als einer lysosomalen Struktur ähnelt (weiße Pfeile - Bild G-I).

Abbildung auf der nächsten Seite →



Das Ziel war festzustellen, ob bei Omi/HtrA2 überexprimierenden Zellen Mitochondrien durch Lysosomen abgebaut werden, was für eine Beteiligung von Autophagie sprechen würde. Mittels Laserscanning-Mikroskopie wurden Kollokalisierungen zwischen Lysosomen und Mitochondrien für alle drei Omi/HtrA2 stabil exprimierenden HEK293 Zellen nachgewiesen (Abbildung 3.8.4; Bild F, I – gelbe Pfeile).

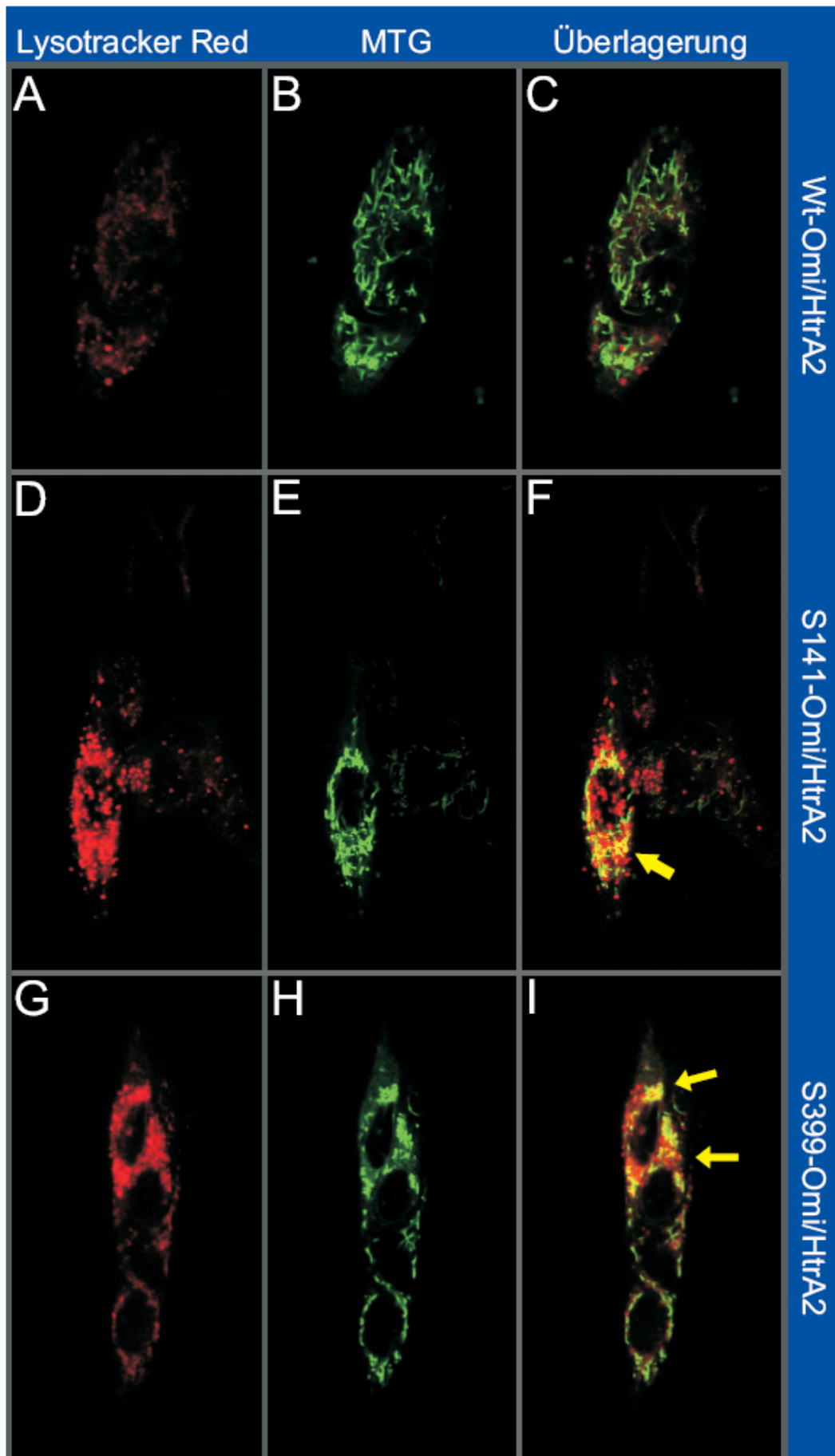
Zusätzlich zur Kollokalisierung wurden Phänomene beobachtet, die ebenfalls auf einen Abbau mitochondrialer Strukturen schließen lassen. So konnten lysosomal gefärbte Strukturen beobachtet werden, welche nur noch schwach mitochondrial angefärbt sind, jedoch gerade in der lysosomalen Färbung deutliche morphologische Merkmale der Mitochondrien aufweisen (Abbildung 3.8.4; Bild G-I – weiße Pfeile).

Die Bestätigung dieser Beobachtungen wurde in lebenden HEK293 und SH-SY5Y Zellen durchgeführt (Abbildung 3.8.5; Pfeile). Für beide Zelltypen konnten für S141- und S399-Omi/HtrA2 vermehrte Kollokalisierungen von Mitochondrien und lysosomalen Strukturen gezeigt werden.

Die Färbungen mit Lysotracker<sup>®</sup> Red zeigen im Gegensatz zu den Strukturen, die mit  $\alpha$ -LAMP-1-Antikörpern markiert sind, eine stärkere Anfärbung. Dies liegt daran, dass Lysotracker<sup>®</sup> Red ein Farbstoff ist, welcher jegliche sauren Organellen bzw. Vakuolen anfärbt.

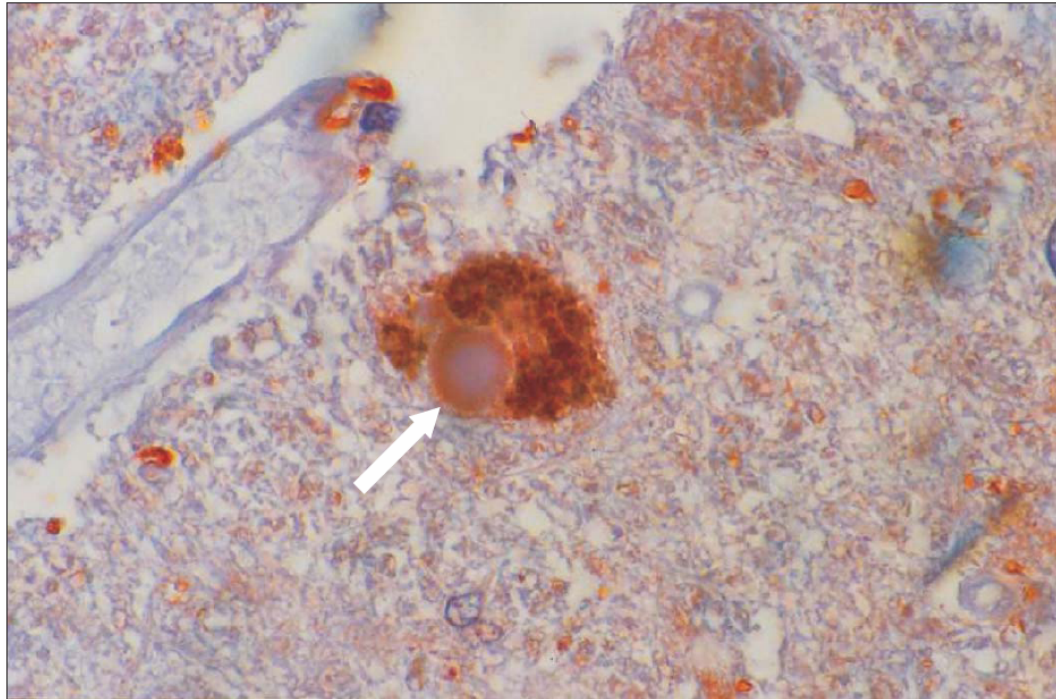
**Abbildung 3.8.5:** Laserscanning-Mikroskopie von nicht-fixierten stabil überexprimierenden Omi/HtrA2 HEK293 Zellen. Als mitochondrialer Marker diente Mitotracker<sup>®</sup> Green FM, lysosomale Kompartimente wurden über Lysotracker<sup>®</sup> Red visualisiert. Man erkennt für S141- und S399-Omi/HtrA2 eine stark erhöhte Kollokalisierung von Lysosomen und Mitochondrien (Bild D-I – Pfeile). In beiden Fällen scheinen die Zellen generell über eine höhere Anzahl an Lysosomen zu verfügen.

Abbildung auf der nächsten Seite →



### 3.8.5 Immunhistochemie in Hirnschnitten von PK-Patienten

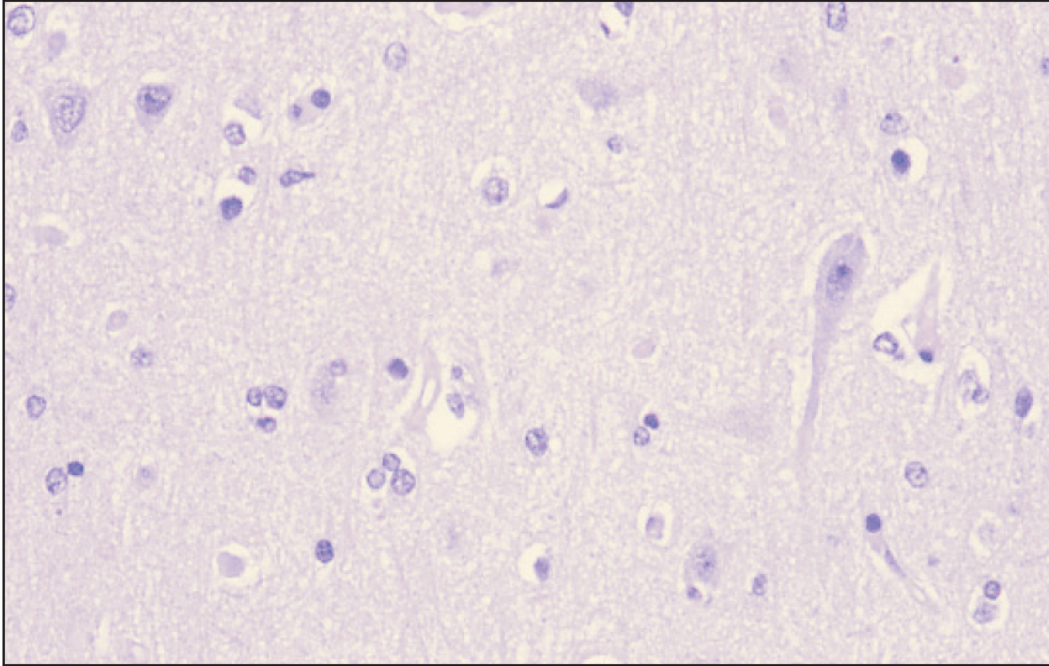
Immunhistochemische Untersuchungen in Gehirnschnitten von Parkinson-Patienten, bei denen die Krankheit pathologisch bestätigt war, wurden in Kooperation mit Frau Dr. Daniela Berg aus der Abteilung für medizinische Genetik des Universitätsklinikum Tübingen durchgeführt.



**Abbildung 3.8.6:** Immunhistochemische Untersuchung eines Hirnschnittes von einem Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom. Hierbei konnte Omi/HtrA2 als Bestandteil von Lewy-Körpern identifiziert werden. Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten 8  $\mu$ m dicken Gehirnschnitten mittels Avidin-Biotin-Immunperoxidase-Technik durchgeführt. Als primärer Antikörper diente ein polyklonaler Omi/HtrA2-Ak, eine Gegenfärbung der Schnitte erfolgte durch Hämatoxilin. Man erkennt Omi/HtrA2 vorwiegend um den Hof (Halo) lokalisiert.

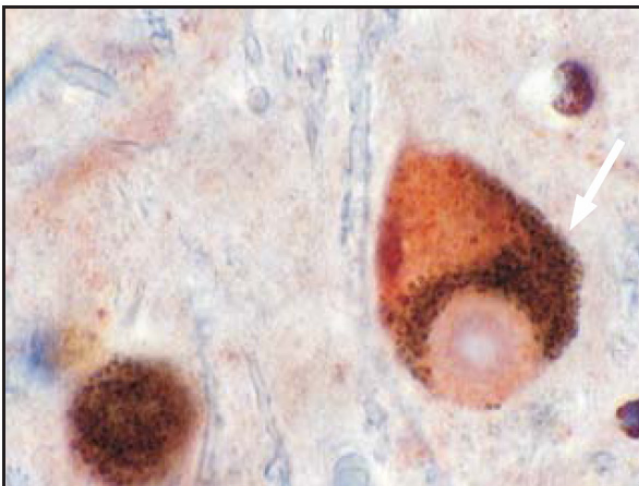
Durch die Benutzung eines polyklonalen Omi/HtrA2-Antikörpers konnten in Hirnstammsektionen und kortikalen Schnitten Omi/HtrA2 positive Ablagerungen, sogenannte Lewy-Körper, nachgewiesen werden. Dabei waren etwa 30-35% der untersuchten Lewy-Körper positiv für Omi/HtrA2. Die hauptsächliche, spezifische Lokalisation zeigte sich dabei im Hof des LK (Abbildung 3.8.6; Pfeil). Spezifische Nachweise von LK-Bestandteilen im Hof finden sich auch in der Literatur für Ubiquitin und  $\alpha$ -Synuklein (Spillantini et al., 1998), wobei  $\alpha$ -Synuklein auch im Kern der LK vorkommt. In Kontrollen, in diesem Fall Hämatoxilin-gefärbten Hirnschnitten von Patienten ohne Verwendung des

Omi/HtrA2-Antikörpers, konnte keine LK-Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 3.8.7).



**Abbildung 3.8.7:** Kontrollfärbungen in Hirnschnitten von Patienten mit PK nach Färbung mit Hämatoxylin. Es ist keine unspezifische LK-Färbung durch den Sekundärantikörper zu erkennen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass das während der Apoptose mit Omi/HtrA2 interagierende, anti-apoptotische Protein XIAP ebenfalls in ca. 20% der Lewy-Körper von Parkinson-Patienten nachweisbar ist.



**Abbildung 3.8.8:** Immunhistochemische Untersuchung eines Hirnschnittes von einem Patienten mit PK. XIAP konnte durch einen spezifischen Antikörper als Bestandteil von Lewy-Körpern nachgewiesen werden. Die Dicke der Paraffin-eingebetteten Schnitte betrug 3-4  $\mu\text{M}$ .

Die in Abbildung 3.8.8 durchgeführte Färbung wurde durch einen  $\alpha$ -XIAP Antikörper detektiert, die Schnittdicke betrug 3-4  $\mu\text{M}$ , gegengefärbt wurde mit Hämatoxylin.

### **3.8.6 Zusammenfassung**

Es wurde gezeigt, dass alle drei Formen des Omi/HtrA2-Proteins in den Mitochondrien lokalisiert sind und es somit zu keiner subzellulären Fehllokalisation einer mutierten Form des Proteins kommt.

Durch die Untersuchung von stabil überexprimierenden Zellen zeigte sich, dass eine dauerhafte Überexpression von S399-Protein zu morphologisch veränderten Mitochondrien führt und diese in geringem Maße auch bei S141-Omi/HtrA2 vorkommen. In ultrastrukturellen Untersuchungen stellte sich heraus, dass S399 überexprimierende Zellen auffällige, morphologisch veränderte Mitochondrien besitzen, welche disorganisierte Cristae aufweisen und membranumschlossene Vesikel besitzen, die mitochondriale Strukturen beinhalten. Da Mitochondrien durch Autophagie abgebaut werden, wurde untersucht, ob Hinweise auf solche Prozesse vorliegen.

Dies konnte durch Kollokalisationsstudien zwischen lysosomalen Bestandteilen und Mitochondrien im Laserscanning-Mikroskop nachgewiesen werden, welche bei S399-Omi/HtrA2 in vermehrtem Maße kollokalisieren.

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen in Gehirnschnitten von Parkinson-Patienten, konnte Omi/HtrA2 in Lewy-Körpern nachgewiesen werden. Auch das anti-apoptische Protein XIAP, welches beim Zelltod mit Omi/HtrA2 interagiert, konnte in Lewy-Körpern detektiert werden.

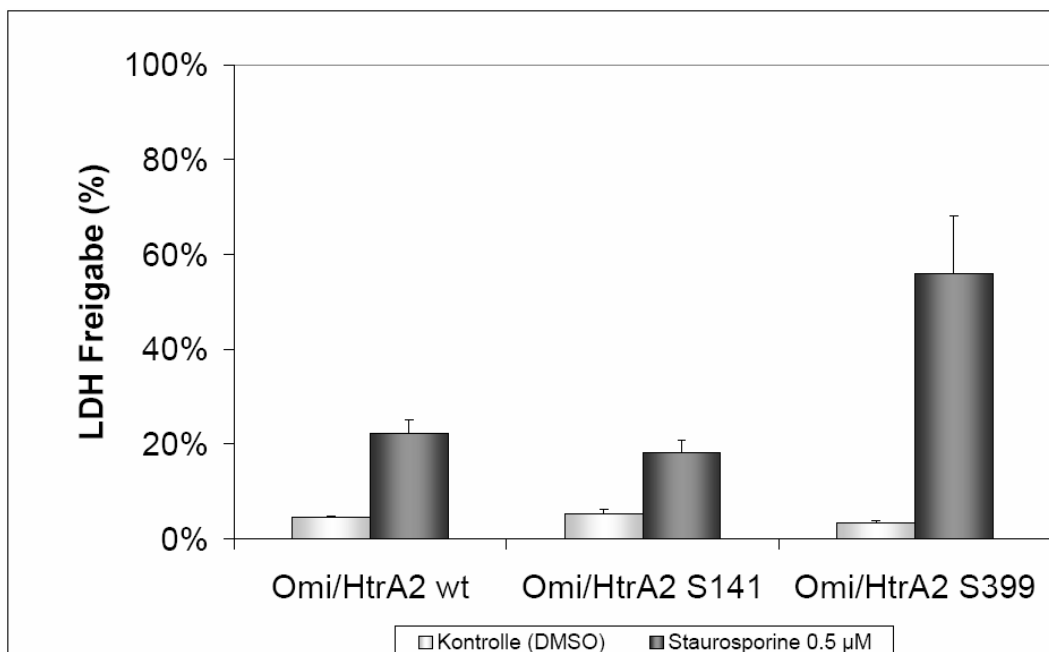
### 3.9 Viability und Apoptose Assays

Da die PK durch den Verlust bzw. Zelltod von dopaminergen Neuronen in der SNpc verursacht wird, stellt sich die Frage, ob die mutierten Omi/HtrA2-Proteine in Zellkultur eine erhöhte Suszeptibilität auf zellulären Stress zeigen und damit anfälliger für Mechanismen des Zelltods machen.

Um die Auswirkungen der veränderten Omi/HtrA2 S141- und S399-Proteine auf die Zellvitalität und einen möglichen negativen Effekt bei zellulärem Stress zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Tests zur Messung des Zelltodes unter Stressbedingungen durchgeführt.

#### 3.9.1 LDH-Assays

Mittels des Lactat-Dehydrogenase-Release-*Assay* wurde untersucht, ob Unterschiede zwischen Wt-, S141- und S399-Omi/HtrA2 bezüglich der Zytotoxizität nach Behandlung von stabil überexprimierenden HEK293 Zellen mit Staurosporine und MG132 auftreten. Als Stress-induzierende Substanzen wurden der Proteasomen-Inhibitor MG132 und der Kinase-Inhibitor Staurosporine verwendet, welcher PKC Isotope und Topoisomerase II inhibiert.



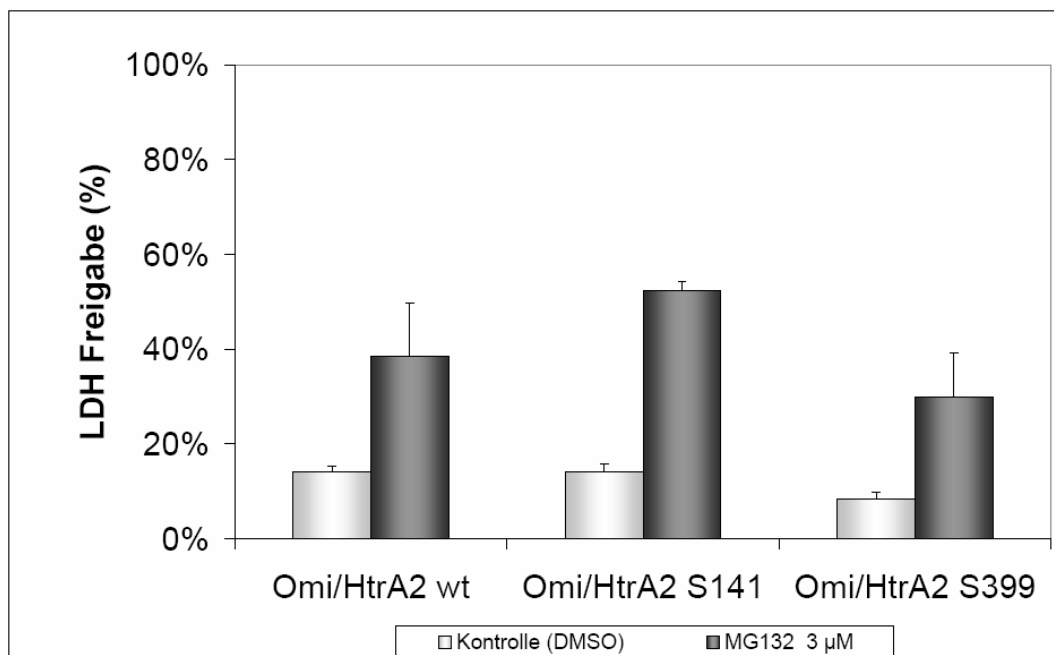
**Abbildung 3.9.1:** LDH-*Assay* nach Behandlung mit 0.5 µM Staurosporine für 6 Stunden. Zur Kontrolle wurden die stabil exprimierenden HEK293 Zellen mit der Trägersubstanz (DMSO) inkubiert. Die stark erhöhte LDH-Freigabe der S399-Mutation ist, bezogen auf Wt-Omi/HtrA2, signifikant (Student T Test:  $p=0,0091$ ).



Hierzu wurden stabil exprimierende HEK293-Zellen mit Staurosporine bzw. MG132 behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die LDH-Freigabe der toten Zellen im Kulturüberstand als Triplikat gemessen.

Bei der Intoxikation der stabil exprimierenden Zellen mit 0,5  $\mu\text{M}$  Staurosporine für 6 Stunden konnte eine deutliche Zunahme der freigesetzten LDH-Menge bei HEK293 Zellen mit dem S399-Omi/HtrA2-Protein gemessen werden (Abbildung 3.9.1). Die freigesetzte Menge an LDH betrug bei Wt-Omi/HtrA2 22,3%, bei S141-Omi/HtrA2 18,2% und bei S399-Omi/HtrA2 55,9%. Die Zunahme an freigesetztem LDH von S399- im Vergleich zu Wt-Omi/HtrA2 war damit im Student-T-Test signifikant unterschiedlich, womit die Sensibilität bei zellulärem Stress durch Staurosporine belegt wird.

Bei Behandlung der Zellen mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 konnte nach einer Inkubationsdauer von 24 h gezeigt werden, dass S141-Omi/HtrA2 eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber MG132, bezogen auf Wt-Omi/HtrA2, besitzt. Die Zunahme an freigesetztem LDH war jedoch nicht signifikant.

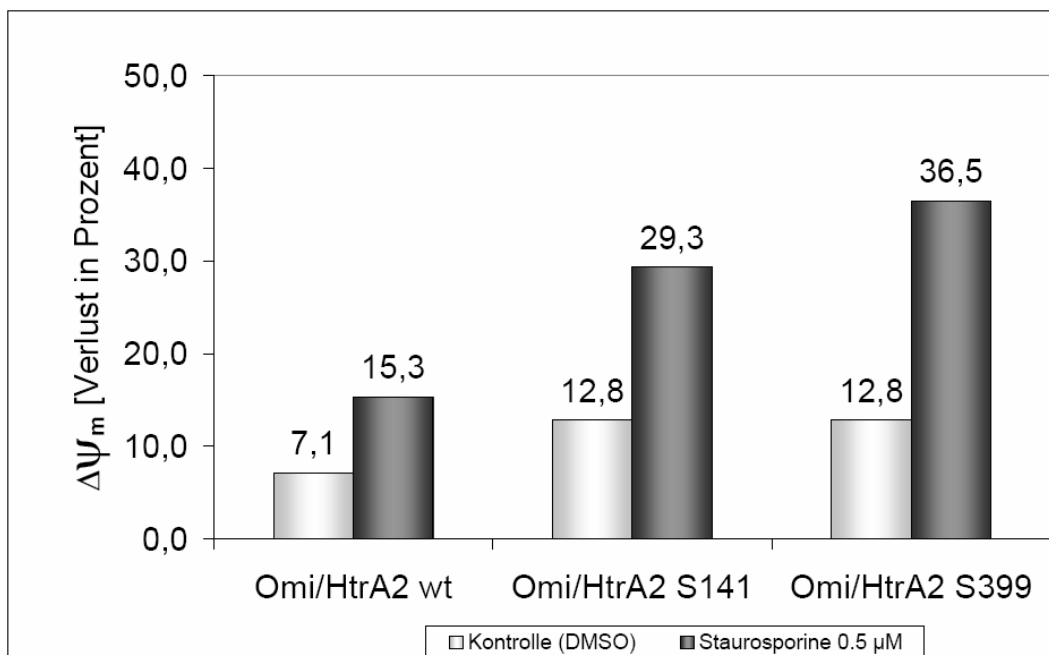


**Abbildung 3.9.2:** LDH-Assay nach Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  MG132 für 24 Stunden. Zur Kontrolle wurden die stabil exprimierenden HEK293 Zellen mit der Trägersubstanz (DMSO) inkubiert. Die erhöhte LDH-Freigabe der S141-Mutation ist, bezogen auf Wt-Omi/HtrA2, in drei unabhängigen Versuchen nicht signifikant (Student T Test:  $p=0,12$ ).

### 3.9.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Da Omi/HtrA2 in den Mitochondrien lokalisiert ist und eine erhöhte Zytotoxizität sich daher zuerst auf die mitochondrialen Funktionen auswirken könnte, sollte die Integrität der Mitochondrien unter Stressbedingungen untersucht werden. Da keine Veränderung von mutiertem Protein bezüglich der Interaktion mit XIAP nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.4) und sich die subzelluläre Lokalisation bei den mutierten Formen nicht vom Wt unterscheidet (vgl. 3.8), besteht die Möglichkeit, dass eine erhöhte Suszeptibilität auf zellulären Stress in der Mitochondrienfunktion von Omi/HtrA2 vorliegt.

Weiterhin weisen die morphologischen Veränderungen der Mitochondrien bei der S399-Mutation auf eine relevante Rolle von Omi/HtrA2 in den Mitochondrien hin, weshalb eine Untersuchung der Homöostase der Mitochondrienmembran eine tragende Rolle bezüglich der Zellvitalität darlegen könnte.

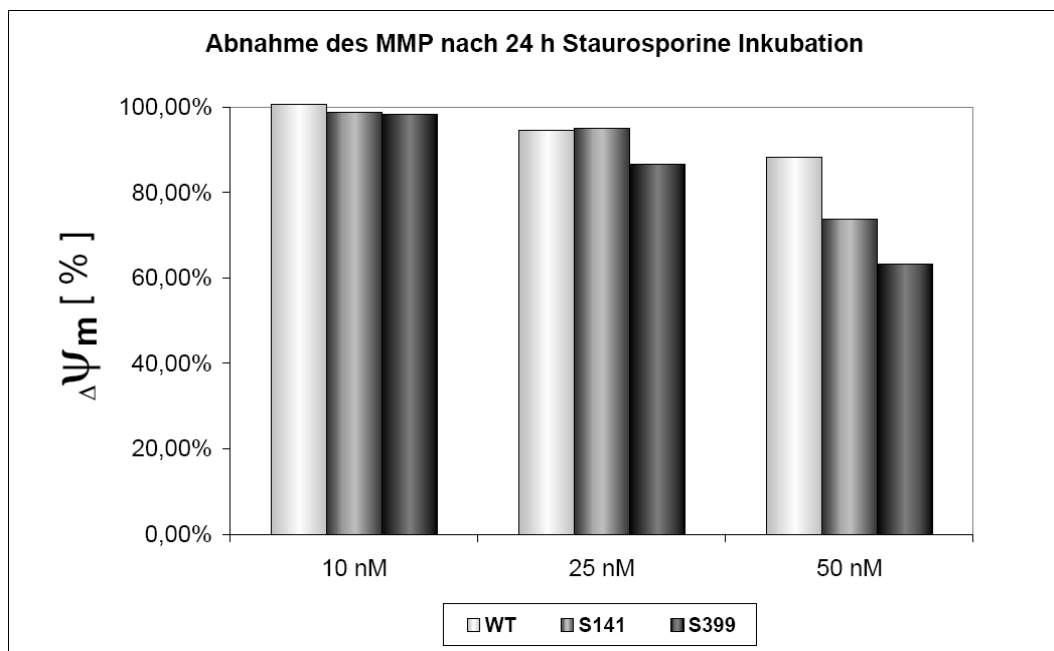


**Abbildung 3.9.3:** Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels des Markers JC-1. Dargestellt ist der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) in Prozent bezogen auf die Gesamtpopulation der untersuchten Zellen. Stabil Omi/HtrA2 überexprimierende SH-SY5Y-Zellen wurden für 4 Stunden mit Staurosporine behandelt, im Anschluss folgte die Inkubation mit JC-1 und die Messung im Durchflusszytometer. Als Negativkontrolle diente die Trägersubstanz DMSO.

Als Stress-induzierende Substanzen wurden Staurosporine und Rotenone verwendet. Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials wurde mit JC-1 und dem Mitotracker-Assay gemessen (vgl. 2.2.27.2). Da der Verlust des

mitochondrialen Membranpotentials bei Zelltod eines der ersten messbaren Ereignisse ist, wurde die Inkubationszeit mit Staurosporine bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  von 6 auf 4 Stunden verkürzt, um die Messung in der Anfangsphase des Potentialverlustes zu zeigen.

Dabei wurde durch JC-1 nachgewiesen, dass alle Omi/HtrA2 überexprimierenden Zellen unter zellulärem Stress einen Verlust des Membranpotentials aufweisen (Abbildung 3.9.3). Dieser Effekt war bei Zellen, welche das S141- und S399-mutierte Protein überexprimieren, im Vergleich zum Wt-Protein erhöht.

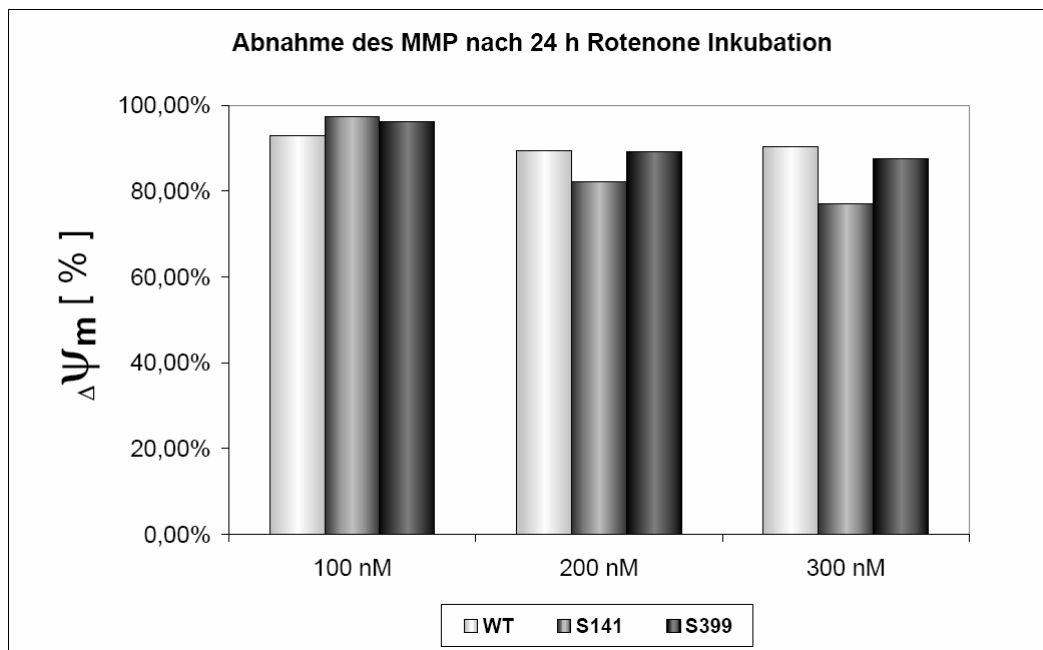


**Abbildung 3.9.4:** Messung des positiven Membranpotentials mittels des Mitotracker-Assays. Dargestellt ist das positive Membranpotential in Prozent bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Es wurde eine Inkubation von 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Staurosporine durchgeführt. Zellen mit S399-Omi/HtrA2 zeigen deutlich früher einen Verlust an positivem MMP als solche mit S141- und Wt-Protein. Bei einer Konzentration von 50 nM Staurosporine ist der Verlust an MMP bei der S399 überexprimierenden Zelllinie am stärksten.

Um diese Resultate zu bestätigen, wurden Inkubationen mit Staurosporine über 24 Stunden mit einer Konzentrationsreihe von 10, 25 und 50 nM durchgeführt. Die hierbei durch den Mitotracker-Assay gewonnenen Daten mit stabil überexprimierenden SH-SY5Y Zellen zeigten einen von der Staurosporine-Dosis abhängigen Effekt auf das mitochondriale Membranpotential. Dieser Effekt zog für die mutierten Formen des Omi/HtrA2-Proteins einen deutlich stärkeren Verlust des positiven Membranpotentials nach sich. Abbildung 3.9.4 zeigt ab einer Konzentration von 25 nM für Zellen welche das S399-Protein überexpro-

mieren, einen deutlichen Rückgang des Membranpotentials. Bei einer Konzentration von 50 nM Staurosporine weisen alle überexprimierenden Zellen einen deutlichen Rückgang des MMP auf. Dabei zeigt sich die gleiche Tendenz wie bei der 4 Stunden Inkubation mit 500 nM Staurosporine; am geringsten ist der Rückgang bei Wt-Omi/HtrA2, gefolgt von S141- und am höchsten bei S399-Omi/HtrA2.

Bei Intoxikation mit steigenden Konzentrationen des Komplex I-Inhibitors Rotenone zeigen Zellen, welche das S141-Protein exprimieren, ab einer Konzentration von 200 nM Rotenone einen deutlich höheren Verlust des positiven MMP als die Wt- und S399-Form von Omi/HtrA2. S399-Omi/HtrA2 zeigt einen stärkeren Effekt auf die Komplex I-Inhibition verglichen mit dem Wt, welcher den geringsten Effekt auf die Behandlung widerspiegelt.



**Abbildung 3.9.5:** Messung des positiven Membranpotentials mittels des Mitotracker-Assays. Dargestellt ist das positive Membranpotential in Prozent bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Es wurde eine Inkubation von 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Rotenone durchgeführt. S141-Omi/HtrA2 überexprimierende Zellen zeigen einen deutlich höheren Rückgang an positivem Membranpotential im Vergleich zu Wt- und S399-Omi/HtrA2 bei steigenden Konzentrationen an Rotenone.

### 3.9.3 Zusammenfassung

Durch Überlebens- und Zelltod-Tests konnte gezeigt werden, dass die mutierten Formen von Omi/HtrA2 eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber zellulärem Stress zeigen. Durch die Messung des mitochondrialen Membranpotentials stellte sich heraus, dass die Intoxikation der Zellen mit Staurosporine zu einer Verminderung des Membranpotentials bei beiden mutierten Omi/HtrA2-Formen führt. Dieser Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials weist auf eine Dysfunktion der Mitochondrien hin, die durch die S141- und S399-Form von Omi/HtrA2 ausgelöst wird.

Im Falle der S141-Mutation führt die mitochondriale Dysfunktion jedoch nicht zum Zelltod, da es durch die Intoxikation der Zellen mit Staurosporine zu einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials kommt, jedoch eine gesteigerte Zytotoxizität mit dem LDH-Assay nicht gemessen werden kann. Bei der S399-Form von Omi/HtrA2 ist die mitochondriale Dysfunktion bei Staurosporinebehandlung so ausgeprägt, dass die Zellen irreversibel geschädigt werden und absterben.

Bei Stressbedingungen durch proteasomale Hemmung und Komplex I-Inhibition zeigte die S141-Form von Omi/HtrA2 eine gesteigerte Empfindlichkeit verglichen mit Wt-Omi/HtrA2.

Beide mutierte Formen des Omi/HtrA2-Proteins weisen eine erhöhte Sensitivität auf zelluläre Stressbedingungen verglichen mit der Wt-Form des Proteins auf. Damit ist ein toxischer Effekt der Mutationen bei Stress nachgewiesen.

### **3.10 Charakterisierung der E64D-Mutation im DJ-1-Protein**

Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Robert Hering in der Medizinischen Genetik in Tübingen wurden Untersuchungen zu einer neuen Mutation im *DJ-1*-Gen durchgeführt. Durch die Mutationsanalyse mittels der dHPLC wurden vier Basensubstitutionen bei 104 Parkinson-Patienten mit frühem Krankheitsbeginn gefunden. Zwei der Sequenzvariationen konnten mittels Sequenzierung im Intron nachgewiesen werden, eine der Substitutionen T558C stellt einen stillen Austausch in Codon 186 dar, die andere Basensubstitution G192C führt zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz von Glutamat zu Aspartat (E64D).

Die G192C-Variation konnte einzig bei einem türkischen Patienten als homozygoter Austausch nachgewiesen werden und nicht in anderen Patienten detektiert werden. In einer türkischen Kontrollpopulation von 99 Individuen wurde die Variation nicht gefunden und damit als Polymorphismus der türkischen Population ausgeschlossen (Hering, 2004).

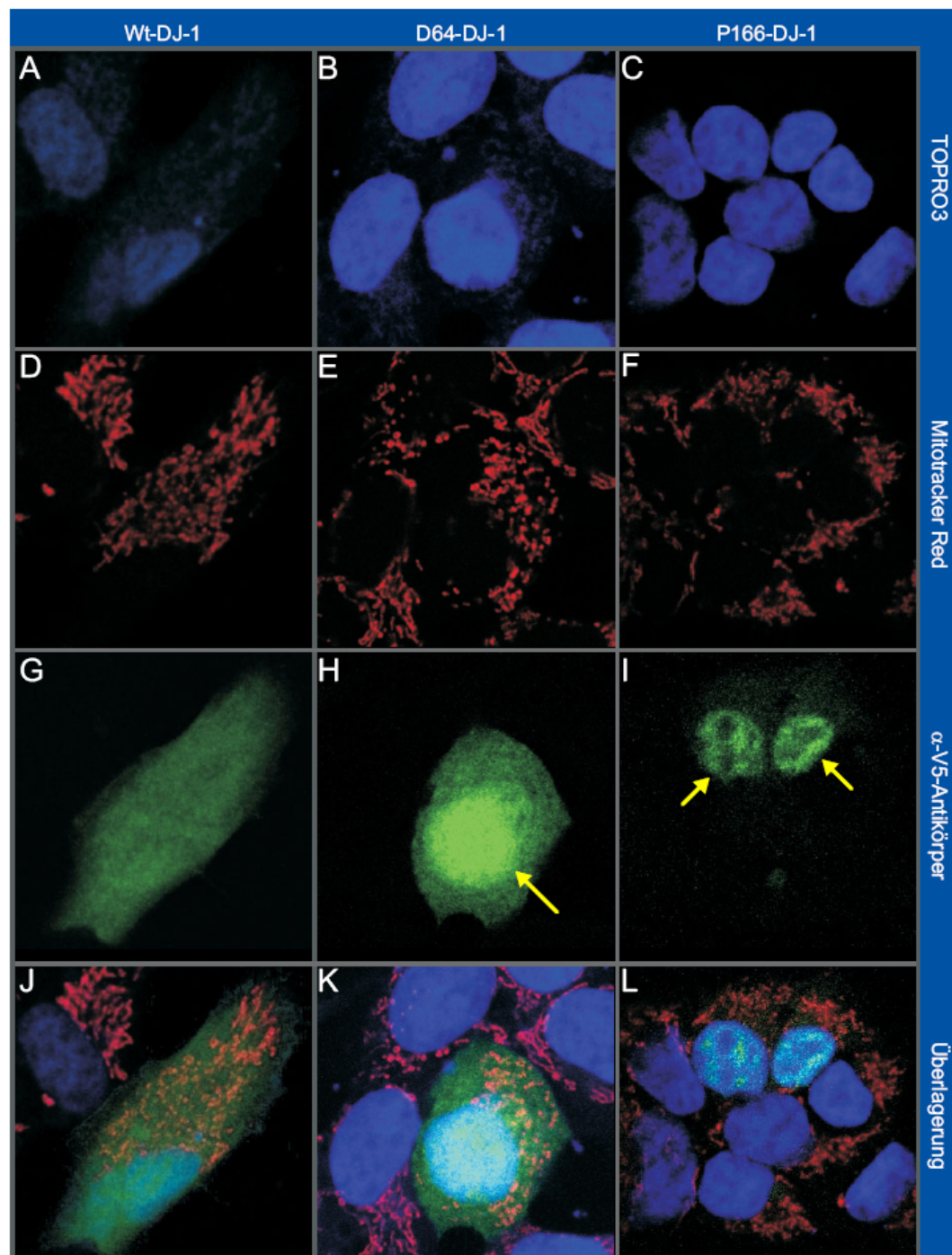
Aufgrund der bekannten Auswirkungen der L166P-Mutation im DJ-1-Protein (Bonifati, 2003), wie einer Veränderung der zellulären Lokalisation von DJ-1 mit Anreicherung im Zellkern und den Mitochondrien sowie der verminderten Stabilität von P166-DJ-1, sollte untersucht werden, ob sich die D64-Form des Proteins ähnlich verhalten könnte.

#### **3.10.1 Mikroskopische Untersuchungen von DJ-1**

Um mögliche Veränderungen der subzellulären Lokalisation von DJ-1 zu untersuchen, wurde die Untersuchung fixierter Zellen mittels des Laserscanning-Mikroskops gewählt. Hierzu wurden HEK293 Zellen mit den drei Formen (Wt-, P166- und D64-DJ-1-pcDNA3.1<sup>TM</sup>/V5-His TOPO TA) von DJ-1 mit FuGENE 6 transfiziert und mit Mitotracker<sup>®</sup> CMXRos, TO-PRO<sup>®</sup>-3 iodide und einem FITC-Sekundärantikörper nach Fixierung visualisiert. Zur Detektion von DJ-1 diente ein  $\alpha$ -V5-Primärantikörper.

Wt-DJ-1 konnte in einer gleichmäßigen Verteilung zytoplasmatisch nachgewiesen werden. D64-DJ-1 wurde ebenfalls im Zytoplasma beobachtet, es zeigte sich jedoch, dass die D64-Form von DJ-1 bei etwa 5% der untersuchten Zellen, verstärkt im Zellkern nachzuweisen ist (Abbildung 3.10.1; H). Wie zuvor beschrieben, wurde P166-DJ-1 nicht mehr im Zytoplasma nachgewiesen. In

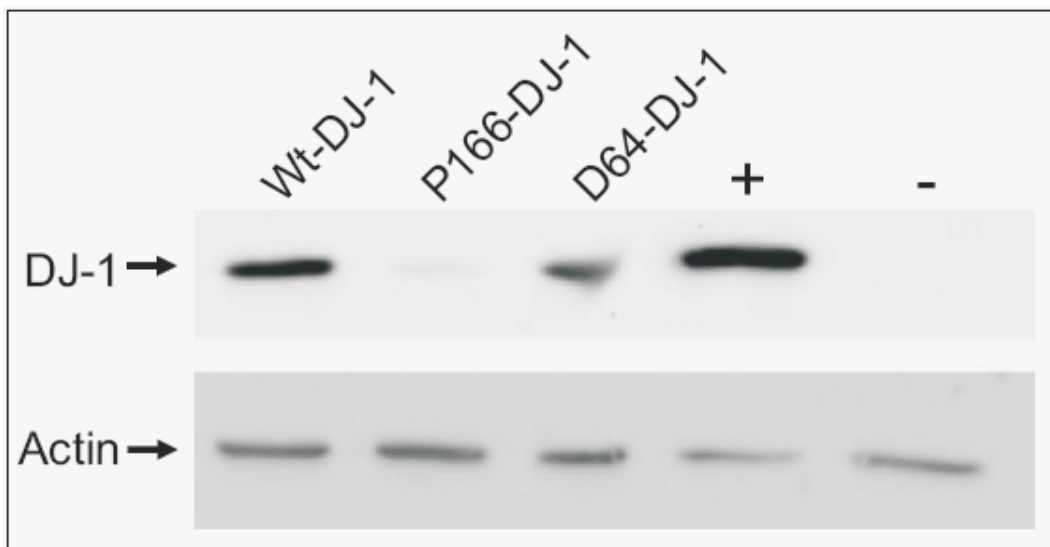
unseren Untersuchungen lokalisierte P166-DJ-1 vornehmlich im Zellkern, die beschriebene Lokalisation in den Mitochondrien konnte nicht bestätigt werden (Bonifati, 2003).



**Abbildung 3.10.1:** Laserscanning-Mikroskopie transient überexprimierender HEK293 Zellen der drei untersuchten Formen von DJ-1. Wt-DJ-1 zeigt eine homogene zytoplasmatische Verteilung ohne ein gehäuftes Auftreten im Zellkern oder in den Mitochondrien. Die neu identifizierte D64-Form von DJ-1 zeigt ebenfalls eine zytoplasmatische Verteilung mit einer stärkeren Lokalisation im Zellkern (H; Pfeil), wogegen die P166-Form des Proteins nur noch im Zellkern nachzuweisen ist und die ursprüngliche zytoplasmatische Lokalisation nicht mehr detektierbar ist (I, Pfeile).

### 3.10.2 Untersuchungen der Proteinstabilität von DJ-1

Da für P166-DJ-1 gezeigt wurde, dass die Stabilität des Proteins verändert ist und es zu einem verstärkten Abbau dieser Variante kommt (Miller, 2003), sollte durch Überexpression von D64-DJ-1 und anschließender Detektion im Westernblot untersucht werden, ob diese Form ebenfalls instabil ist. Durch die in den Lokalisationsstudien gewonnenen Erkenntnisse, dass die D64-Form von DJ-1 sich ähnlich verhält wie P166-DJ-1, wäre eine verminderte Stabilität des D64-Proteins denkbar. Hierzu wurde V5-His-markiertes Wt-, D64- und P166-DJ-1 in HEK293 Zellen transient überexprimiert und im Westernblot durch einen V5-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle für die eingesetzte Gesamtproteinmenge diente Aktin.



**Abbildung 3.10.2:** Detektion von Wt-, P166- und D64-DJ-1 nach Westernblot-Analyse mit einem V5-Antikörper. Deutlich zu beobachten ist der nahezu komplette Proteinverlust an P166-DJ-1 durch Degradation, wogegen Wt-DJ-1 eine klare Proteinbande zeigt. D64-DJ-1 zeigt einen leichten Rückgang des zellulären Proteinlevels.

Die vermehrte Instabilität der P166-Form von DJ-1 konnte hierbei bestätigt werden, es ist im Westernblot kaum noch nachweisbar (Abbildung 3.10.2). Es zeigte sich auch, dass D64-DJ-1 weniger stabil ist als die Wt-Form des Proteins, da die Proteinbande deutlich schwächer ist als die des Wt-Proteins, obwohl die eingesetzten Proteinmengen vergleichbar sind. Als Negativkontrolle wurde HEK293 Lysat untransfizierter Zellen verwendet, als Positivkontrolle diente ein bekanntes Wt-DJ-1 Lysat. Eine verminderte Expression des Konstruktes wurde ausgeschlossen (Gorner, 2004).



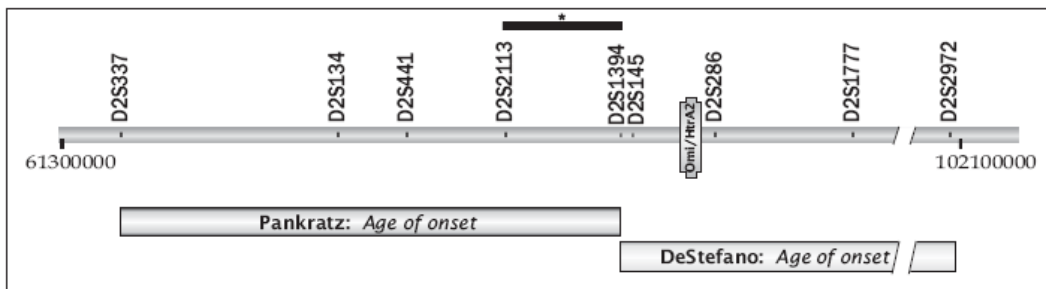
## 4 Diskussion

### 4.1 Mutationsscreening im *Omi/HtrA2*-Gen

Durch die Zuordnung von Genen bei familiären Fällen der PK und die Identifizierung von Mutationen in diesen Genen, Genen der PARK Loci, konnte eine bedeutende Rolle des Ubiquitin-Proteasomen-Systems bei der Pathogenese der PK erkannt werden. Hierbei spielen Störungen des UPS durch fehlgefaltete Proteine, Proteinaggregation und dem damit verbundenen proteolytischen Stress auf die Zelle, eine zentrale Rolle beim Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc. Somit konnten von den genetisch bedingten Formen der PK die Proteine  $\alpha$ -Synuklein, Parkin, UCH-L1 und DJ-1 in einem direkten Zusammenhang mit Dysfunktionen des UPS oder proteolytischen Stress durch die Akkumulation von fibrillären Strukturen identifiziert werden (Moore, 2005; Polymeropoulos, 1997; Krüger, 1998; Singleton, 2004; Kitada, 1998; Imai, 2000; Leroy, 1998; Bonifati, 2003). Die Zuordnung weiterer Gene zu den PARK Loci (Valente, 2004; Zimprich, 2004), deren Funktion und pathogenetische Bedeutung für die PK noch nicht geklärt sind, deutet auf weitere physiologisch relevante Wege in der Ausprägung der PK hin. So zeigt zum einen die mitochondriale Lokalisation von PINK1 (Valente, 2004), wie auch die Lokalisationsänderung von DJ-1 bei oxidativem Stress ins Mitochondrium (Moore, 2005), eine mögliche Beteiligung der Mitochondrien bei der PK. Weiterhin wird eine Beteiligung der Mitochondrien bei sporadischen Fällen unter anderem durch Toxine, welche die Komplexe I-III der Atmungskette blockieren, unterstützt (Beal, 2000; Schapira, 1999; Dauer, 2003).

Die Serin-Protease *Omi/HtrA2* ist ein proapoptisches Protein, welches innerhalb eines 4 cM Intervalls vom ursprünglichen PARK3 Locus kartiert (Gasser, 1998; West, 2001) und in den Mitochondrien lokalisiert ist (Hedge, 2002). Das bakterielle Homolog, *HtrA*, zeigt eine Protease- wie auch Chaperon-Funktion (Spiess, 1999). Neuere Studien zum PARK3-Locus legen nahe, dass es im weiteren Bereich der PARK3 Region ein krankheitsmodulierendes Gen gibt, in der das *Omi/HtrA2*-Gen in einem 18 cM großen Intervall liegt (Abbildung 4.1.1). Dieses Intervall wird von den genetischen Markern D2S337 und D2S2972 umschlossen, wobei die Marker D2S337 und D2S1777 die höchsten *lod scores* in

den zuvor genannten Studien aufweisen (DeStefano, 2002; Karamohamed, 2003; Pankratz, 2004).



**Abbildung 4.1.1:** Krankheitsmodulierende Kartierungen um den PARK3 Lokus, die das Erkrankungsalter beeinflussen. Die beiden Studien von Pankratz und DeStefano zeigen keine Überschneidung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass möglicherweise zwei Gene kartiert wurden. Der PARK3 Lokus (\*) ist oben im Bild durch einen schwarzen Balken markiert (Gasser, 1998; West, 2001).

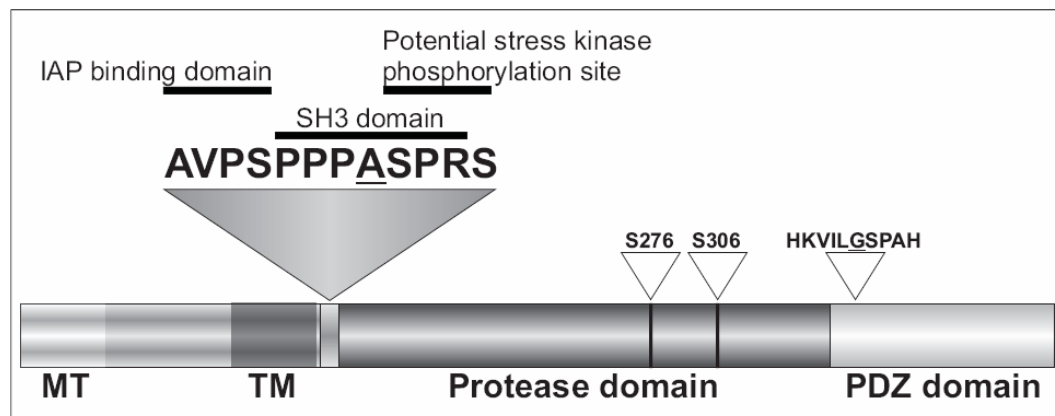
Durch die Kartierung auf den PARK3 Lokus, die mitochondriale Lokalisation und durch die Homologie mit bakteriellem HtrA stellte das *Omi/HtrA2*-Gen einen interessanten Kandidaten für ein Mutationsscreening bei Parkinson-Patienten dar. Aus einer DNA-Bank mit 518 Parkinson-Patienten DNA's konnten zwei neue Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen identifiziert werden. In dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal eine Assoziation zwischen Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen und einer neurodegenerativen Erkrankung beim Menschen gezeigt werden.

Bei der Mutationsanalyse der einzelnen Exons zeigten sich in drei von acht Exons - Exon 2, Exon 4 und Exon 8 - keine Auffälligkeiten einzelner Proben in den Elutionsprofilen bei der dHPLC. In fünf Exons konnten in der dHPLC bei Patienten-Proben Elutionsprofile beobachtet werden, die sich vom Großteil der anderen Patienten im entsprechenden Exon unterschieden. Bei der Sequenzierung der auffälligen Proben konnten in zwei der fünf Exons, Exon 1 und Exon 7, bisher unbekannte Varianten im humanen *Omi/HtrA2*-Gen gefunden werden.

Die Ursachen für die falsch positiven dHPLC-Ergebnisse der Exons 3, 5 und 6 beim Mutationsscreening sind nicht klar belegbar. Zum einen kommt es bei der Amplifikation mit *Taq*-Polymerase vermehrt zu Mutationen (vgl. Tabelle 2.1), die in der PCR für die dHPLC im betreffenden Exon auftreten können, bei der PCR zur Sequenzierung jedoch im zu untersuchenden Amplifikat fehlen. Andererseits kann durch kleine Verunreinigungen der Proben ein falscher Peak entstehen. Weiterhin führen Primerdimere zu einem frühen Anstieg der Elutionskurve. Außerdem zeigt auch die unterschiedliche Qualität der Ausgangs-DNA Aus-

wirkungen auf die Elutionspeaks. So können durch DNA-Strangbrüche, die durch eine schlechte Lagerung der DNA auftreten können, vermehrt kurze Amplifikate eines Einzelstrangs entstehen, die sich als falsch-positiver Heteroduplex in der Elutionskurve der dHPLC zeigen. Damit weist die dHPLC eine sehr hohe Sensitivität auf, die einer geringeren Spezifität gegenübersteht. Im Falle eines Mutationsscreenings auf bisher unbekannte Mutationen ist diese Methode aufgrund der hohen Sensitivität gut geeignet, neue Mutationen in einem Gen aufzuspüren.

Die teilweise schlechte Qualität der DNAs wurde speziell bei der PCR des Exons 1 ersichtlich, da in diesem Exon viele der Proben keine positiven Amplifikate zeigten, was auch die abweichende Zahl an untersuchten Patienten – wie auch Kontrollen – von Exon 1 und Exon 7 erklärt.



**Abbildung 4.1.2:** Proteinschema von Omi/HtrA2. Die Aminosäure des Wt-Proteins ist an den beiden Positionen unterstrichen, bei denen in dieser Arbeit Mutationen gefunden wurden. Die A141S-Mutation liegt nahe der IAP-Bindedomäne in einer SH3-Domäne und die G399S-Mutation in der PDZ-Domäne. Die für den Phänotyp der *md2*-Maus relevante Mutation S276C liegt in der Protease-Domäne. Die proteolytisch aktive Position der Proteasedomäne ist ein Serin, S306.

In Exon 1 wurde eine stille C447G Basensubstitution nachgewiesen. Zwei Basensubstitutionen, die Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz von Omi/HtrA2 aufweisen, wurden in Exon 1 und Exon 7 detektiert. Die G421T Basensubstitution in Exon 1 liegt dabei sehr nahe an der IAP-Bindedomäne und resultiert in einem Aminosäureaustausch A141S. Der in Exon 7 lokalisierte G1195A Basenaustausch liegt in der PDZ-Domäne des Proteins und führt zu einem Aminosäureaustausch G399S (Abbildung 4.1.2).

Die in Exon 1 detektierte Variante G421T ist durch das Auftreten mit einer Frequenz von mehr als einem Prozent in der gesunden Kontrollpopulation als

Polymorphismus definiert. Durch eine Assoziationsstudie mit 414 PK-Patienten und 331 Kontrollen konnte das T-Allel in 27 PK-Patienten in heterozygoter Form nachgewiesen werden (6,2 %), in der Kontrollgruppe wurden 10 heterozygote Träger des T-Allels gefunden (3%).

Dieses Ergebnis zeigt ein signifikant häufigeres Vorkommen des S141-Polymorphismus bei den PK-Patienten verglichen mit der Kontrollpopulation ( $p=0,039$ ), wodurch man die G421T-Variante als Risikoallel bezeichnen kann. Dabei zeigt die Assoziationsstudie ein 2.15-fach höheres Risiko für Träger des T-Allels, an der PK zu erkranken. Die Assoziationsstudie erfüllt mehrere wichtige Kriterien, wie eine große Patientenzahl sowie eine ethnisch und geschlechtlich angepasste Kontrollgruppe ohne klinische PK Symptome (vgl. Bird, 2001). Trotzdem ist es notwendig, den genetischen Einfluss des G421T-Risikoallels auf die Entwicklung sporadischer PK in unabhängigen Patientenkollektiven zu untersuchen, um die Bedeutung der G421T-Basensubstitution zu bestätigen.

<i>H sapiens</i>	134	AVPSPPP <b>A</b> SPRSQYN	148
<i>M musculus</i>		AVPAPPPTSPRSQYN	Omi/HtrA2
<i>R norvegicus</i>		AVPAPPPTSPRSQYN	Omi/HtrA2
<i>G gallus</i>		SPPAPPFGSPRAAFN	Omi/HtrA2
<i>D melanogaster</i>		KLPQPPVIVLQRGPH	CG8464-PA
<i>S cerevisiae</i>		-----	ORF YNL123W
<i>E coli</i>		-----	DegS
<i>H sapiens</i>	392	LIHKVIL <b>G</b> SPAHRAG	406
<i>M musculus</i>		LIHKVILGSPAHRAG	Omi/HtrA2
<i>R norvegicus</i>		LIHKVILGSPAHRAG	Omi/HtrA2
<i>G gallus</i>		LIHKVILGSPAHRAG	Omi/HtrA2
<i>D melanogaster</i>		LVWKVIVGSPAHS GG	CG8464-PA
<i>S cerevisiae</i>		YCTFRGESSPALQYG	ORF YNL123W
<i>E coli</i>		VVNEVSPDGPAAANAG	DegS

**Abbildung 4.1.3:** Vergleich der Aminosäureabfolge zwischen mehreren Spezies. An Aminosäureposition 141 besteht keine Homologie zwischen den verschiedenen Spezies. Die G399S-Mutation zeigt eine hohe Homologie in der Region um AS Position 399 zwischen den höheren Spezies und weist nur bei der Hefe und *E. coli* Abweichungen auf.

In Untersuchungen des *Omi/HtrA2*-Gens bei Personen der PARK3 Indexfamilien wurde das G421T Risikoallel in der PARK3 Indexfamilie B nachgewiesen. Es konnte keine Assoziation des G421T-Polymorphismus von Omi/HtrA2 mit der Erkrankung von betroffenen Personen dieser Familien festgestellt werden, da das T421-Allel nicht mit der Erkrankung in der Familie kosegregiert. Das krankheitsverursachende Allel des PARK3 Lokus liegt vermutlich nicht auf dem gleichen

Chromosom wie das T-Allel bei den heterozygoten G421T-Trägern und ist auf einem anderen Gen lokalisiert. Interessanterweise konnte jedoch in der cDNA eines Patienten mit der G421T-Mutation aus Familie B nachgewiesen werden, dass dieser nur das mutierte T421-Allel exprimiert.

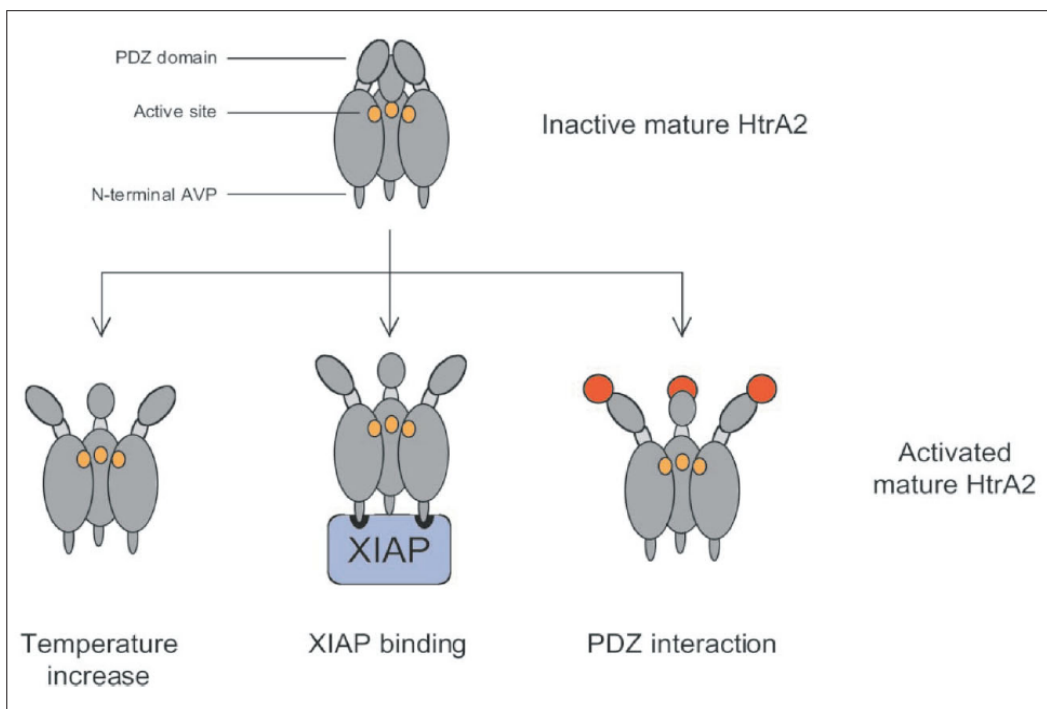
Der in Exon 7 detektierte Basenaustausch G1195A, der zu einem Aminosäureaustausch G399S führt, liegt in einer evolutionär hochkonservierten Region in der PDZ-Domäne des Omi/HtrA2-Proteins. Die hohe Homologie des Glyzins an Aminosäureposition 399 im Interspeziesvergleich ist ein Hinweis auf eine pathogenetische Bedeutung der G399S-Mutation. Da eine familiäre Anamnese für die G399S-Mutation nicht beobachtet wurde, ist es möglich, dass es sich bei dieser Mutation um einen Suszeptibilitätsfaktor handelt, der unter bestimmten Umweltbedingungen zur Ausprägung der PK führt. Ein homozygotes Auftreten der S141- und S399-Mutation konnte nicht beobachtet werden. Dies spricht für eine autosomal-dominante Mutation in der Vererbung im *Omi/HtrA2*-Gen. Dabei deutet die negative Familienanamnese auf eine unvollständige Penetranz hin. Dies entspricht der Vererbung des krankheitsverursachenden Gens auf dem PARK3 Locus mit unvollständiger Penetranz (Gasser, 1998).

## **4.2 Charakterisierung der Omi/HtrA2-Mutationen**

Veränderungen in der Aminosäureabfolge können die Funktionen eines Proteins modifizieren. So können Signalsequenzen oder aktive Domänen inaktiviert werden oder auch die räumliche Tertiärstruktur des Proteins verändert werden, so dass es zu einem kompletten Funktionsverlust kommt. Wie am Beispiel der L166P-Mutation des DJ-1-Proteins zu beobachten ist, kann eine Mutation auch zu einer Instabilität und verstärkter Degradation über das UPS führen (Taira, 2004).

Eine Instabilität der S141- und S399-Mutationen zum Wt wurde bei transienter und stabiler Überexpression von Omi/HtrA2 ausgeschlossen, da die Überexpression von Wt-, S141- und S399-Omi/HtrA2-FLAG-Konstrukten in HEK293 Zellen keine Unterschiede in der Quantität des Omi/HtrA2-FLAG-Proteins zeigte. Weiterhin konnte eine veränderte Prozessierung der *precursor*-Form des Proteins ausgeschlossen werden, da nach Überexpression wie erwartet die prozessierte *mature*-Form des Proteins nachweisbar war. Ein Funktionsverlust der Omi/HtrA2-Mutationen durch fehlerhafte Prozessierung oder durch eine verstärkte Degradation liegt somit nicht vor.

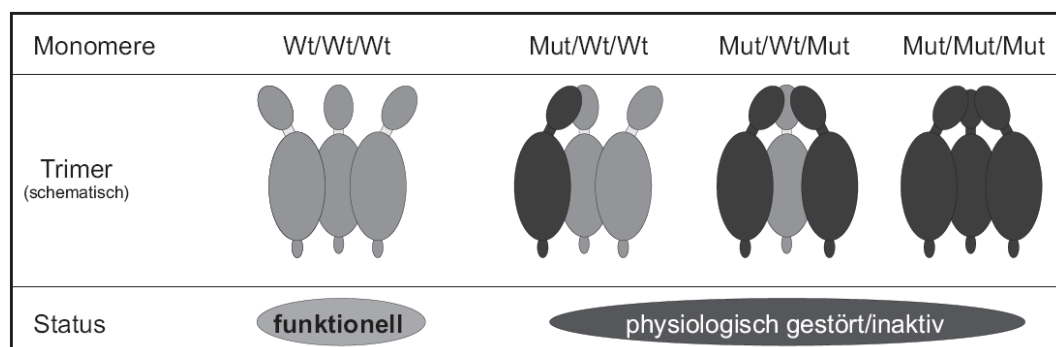
Bei Mäusen mit dem *mnd2* Phänotyp konnte eine S276C-Mutation im Maus-Homolog von Omi/HtrA2 gefunden werden. Die *mnd2*-Mäuse weisen histologisch einen Verlust der striatalen Neurone auf. Das Krankheitsbild dieser neurologisch auffälligen Mutante weist eine abnorme Körperhaltung, veränderten Gang, Akinese und den Tod etwa 40 Tage nach der Geburt auf. Die S276C-Mutation wirkt sich dabei durch einen Funktionsverlust der Proteasedomäne aus, welcher wahrscheinlich durch eine verschlechterte Substrataktivierung ausgelöst wird (Rathke-Hartlieb, 2002; Jones, 2003).



**Abbildung 4.2.1:** Modell der Homotrimerisierung und der Substrataktivierung von nativem Omi/HtrA2 (aus Martins, 2003). So kann die Proteasefunktion durch Interaktion der PDZ- und der IAP-Domäne aktiviert werden. Eine Aktivierung über einen Temperaturanstieg, wie bei HtrA, konnte auch gezeigt werden (nach Martins, 2003).

Die physiologische Relevanz der Proteasefunktion von Omi/HtrA2 wurde durch die phänotypische Charakterisierung der Omi/HtrA2 *knock-out* Maus unterstützt. Der Verlust der Omi/HtrA2 Proteasefunktion führt in diesen *knock-out* Mäusen zu einer neurologischen Abnormalität mit Parkinson-ähnlicher Symptomatik, die sich vor allem in Bewegungsarmut und Zittern auszeichnet. Ferner zeigen viele Organe eine Volumen- und Gewichtsabnahme ab dem 18. Tag nach der Geburt und einen Rückgang der Körperbehaarung. Durch eine mendelnde Vererbung der homozygoten *knock-out* Mutanten konnte eine embryonal-letale Wirkung des fehlenden *Omi/HtrA2*-Gens bei der Maus ausgeschlossen werden (Martins, 2004).

Für die N-terminal lokalisierte S141- und die in der PDZ-Domäne lokalisierte S399-Mutation des *Omi/HtrA2*-Gens konnte eine negative Auswirkung auf die Proteasefunktion des Proteins gezeigt werden. Bei der Aktivierung über das GST-BIR2-Substrat konnte für beide Mutationen eine deutliche Abnahme der Proteaseaktivität im Vergleich zum Wt bei zunehmender Konzentration festgestellt werden. Eine erhebliche Differenz zeigte sich bei der Aktivierung über die PDZ-Domäne, bei der die Proteasefunktion des mutierten Proteins um bis zu 50% erniedrigt ist. Somit zeigt sich die Modulation der Proteasefunktion der mutierten Proteine nicht auf eine Domäne beschränkt. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass beide Mutationen eine Konformationsänderung des Proteins hervorrufen, die sich negativ auf die Proteaseaktivierung durch unterschiedliche Substrate auswirkt, sowohl durch Bindung an die PDZ-Domäne, wie auch an das IAP-Binde-Motiv (Abbildung 4.2.1).



**Abbildung 4.2.2:** Modell der molekularen Heterosis für die Auswirkungen der Mutationen auf die Trimerisierung des physiologisch aktiven *Omi/HtrA2* Trimers. Dabei wird offensichtlich, dass es statistisch bei Vorliegen einer heterozygoten Mutation zu einem 75%igen Funktionsverlust an physiologisch aktivem *Omi/HtrA2* in der Zelle kommen kann.

Das native *Omi/HtrA2*-Protein liegt in aktiver Form als Homotrimer vor. Für die nur homozygot krankheitsauslösende C276-Mutation konnte gezeigt werden, dass die Trimerisierung mit dem Wt-*Omi/HtrA2* nicht beeinträchtigt ist (Jones, 2003). Eine normale Fähigkeit zur Trimerisierung mit dem Wt-Protein konnte für die S141- und die S399-Mutation nachgewiesen werden. Durch Bindung zwischen mutierten und Wt-Monomeren kann es somit zu einem Funktionsverlust der Trimere kommen, wenn diese nun als Heterotrimere zwischen normalen und mutierten Monomeren vorliegen. Dies kann einen dominanten Phänotyp der Mutationen erklären, der durch molekulare Heterosis bedingt ist (Abbildung 4.2.2). Dabei bewirkt eine heterozygote Mutation statistisch einen 75%igen Verlust an physiologisch aktivem *Omi/HtrA2*, wodurch es zu einem toxischen

Effekt auf die Zelle kommen kann (ÜA: Comings, 2000). Dies zeigen auch die Ergebnisse mit stabil Omi/HtrA2 überexprimierenden Zellen in den Viabilitätsuntersuchungen, da in diesen Zellen das endogene Omi/HtrA2 weiter exprimiert wird und die Zellen, die mutierte Formen von Omi/HtrA2 überexprimieren, empfindlicher auf Stress reagieren. Dieser toxische Effekt, der durch die molekulare Heterosis erklärt wird, unterstützt das Argument für einen dominanten Erbgang bei den Omi/HtrA2-Mutationen und wird durch das Fehlen familiärer homozygoter Mutationsträger bekräftigt.

Der durch das heterozygote C276-Allel unbeeinflusste Phänotyp der *mnd2*-Mäuse weist bei dieser Mutation auf keine Störung der Proteinfunktion von Heterotrimeren zwischen C276- und Wt-Monomeren von Omi/HtrA2 hin. Das Fehlen einer Auffälligkeit im Phänotyp der heterozygoten *mnd2*-Mäuse kann sich jedoch in der geringen Lebensspanne der Maus erklären. So ist denkbar, dass ein Organismus mit einer heterozygoten C276-Mutation bei einer höheren Lebenserwartung ebenfalls PK-ähnliche Symptome ausprägen könnte.

Als Interaktionspartner von Omi/HtrA2 wurden bislang vor allem Proteine identifiziert, die ein bis drei BIR-Domänen aufweisen. Hierzu zählen die IAPs, die Caspasen inaktivieren und im Zytosol lokalisiert sind. Zu einer Interaktion dieser Proteine mit Omi/HtrA2 kommt es nur bei der Aktivierung von Zelltodmechanismen, wie der Apoptose (vgl. Kapitel 1.2). Für den Phänotyp der *mnd2*- und der *knock-out* Maus stellte sich jedoch heraus, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Apoptose der Organismen zeigen, sondern vielmehr ein protektiver Effekt von Omi/HtrA2 in den Mitochondrien aufgehoben ist (Martins, 2004).

Um eine mögliche Auswirkung der humanen Mutationen des *Omi/HtrA2*-Gens auf die Apoptose zu untersuchen, wurde die bekannte Interaktion mit XIAP überprüft (Hedge, 2002). Zwischen dem Wt- und mutierten Formen von Omi/HtrA2 konnte kein Unterschied in der Bindespezifität und Bindekapazität mit XIAP nachgewiesen werden. Eine Aufrechterhaltung der Bindespezifität konnte auch für die S276C-Mutation nachgewiesen werden. Bei dieser Mutation wird die Proteasefunktion nach der Bindung von XIAP an Omi/HtrA2 jedoch nicht mehr aktiviert (Jones, 2003). Eine Auswirkung der S141- und S399-Mutation auf die Degradation von XIAP über das UPS konnte nicht festgestellt werden. Alle drei Formen von Omi/HtrA2 zeigten keinen unterschiedlichen



Einfluss auf die Stabilität von XIAP, da XIAP durch die Zugabe des Proteasomen-Inhibitors MG132 bei Ko-Expression mit den drei Formen von Omi/HtrA2 angereichert werden konnte.

XIAP besitzt wie einige andere IAP-Proteine eine RING-Finger Domäne, die für E3-Ubiquitin-Ligasen üblich sind. Es konnte gezeigt werden, dass XIAP unter apoptotischen Bedingungen das proapoptotische Protein Smac/DIABLO, welches vor allem XIAP inhibiert, ubiquitinieren kann. Die Ubiquitinierung von Smac/DIABLO führt dann zur Degradation über das UPS (MacFarlane, 2002). Dieser proteasomale Abbau von Smac/DIABLO dient vermutlich als Schutzmechanismus für die Zellviabilität bei Freisetzung geringer Mengen an Smac/DIABLO. Während der Apoptose werden keine Proteine über das UPS abgebaut (Sun, 2004) und die Interaktion von Smac/DIABLO mit XIAP führt so zur Inhibition der IAPs.

Durch einen Ubiquitinierungsassay konnte gezeigt werden, dass Omi/HtrA2 polyubiquitiniert wird und über das Proteasom abgebaut werden kann. Dies konnte für alle drei Formen in gleichem Maße gezeigt werden, durch proteasomale Inhibition konnten die polyubiquitinierten Omi/HtrA2-Formen angereichert werden. Die Akkumulation aller drei Formen von Omi/HtrA2 bei proteasomaler Inhibition weist dabei auf die Degradation des Proteins über das Proteasom hin. Es konnte bei keiner der mutierten Formen von Omi/HtrA2 ein Hinweis auf eine veränderte Funktion im Apoptose-Signalweg festgestellt werden. Hierfür spricht, dass keine differenzielle XIAP-Interaktion nachgewiesen wurde und die Ubiquitinierung der Wt-, S141- und S399-Omi/HtrA2-Proteine im Zytosol sich nicht unterscheidet. Untersuchungen von Smac/DIABLO -Omi/HtrA2-Doppel-*knock-out* Mäusen bekräftigen diese Hypothese. In diesen Tieren kommt es durch den Wegfall der beiden proapoptotischen Proteine nicht zu einem schützenden Effekt vor der Apoptose, sondern die Zellen der Mäuse sind anfälliger für zellulären Stress (Martins, 2004). Durch die Charakterisierung der *mnd2*- und der *knock-out* Maus scheint sich vielmehr ein protektiver Effekt von Omi/HtrA2 auf die Homöostase der Mitochondrien abzuzeichnen (Martins, 2004; Jones, 2003).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Omi/HtrA2 in Lewy-Körpern von PK-Patienten nachgewiesen werden kann und mit einer gestörten proteasomalen Degradation bei der PK assoziiert ist. Interessanterweise wurde auch das anti-apoptotische Protein XIAP in Lewy-Körpern nachgewiesen, so dass ein

Zusammenhang zwischen einer möglichen Ubiquitinierung von Omi/HtrA2 durch XIAP und der Sequestration in proteinhaltige Inklusionen bei proteasomalen Stress denkbar wäre. Viele der bisher identifizierten Gene, die durch pathogenetische Veränderungen zur PK führen, wurden in den Gehirnen von PK-Patienten in Lewy-Körpern nachgewiesen (Spillantini, 1997; Lowe, 1990; Schlossmacher, 2002; Jin, 2005). Durch den Nachweis von Omi/HtrA2 in Lewy-Körpern ist eine Interaktion des Proteins mit den bekannten PK-assoziierten Proteinen des UPS möglich. Dies gilt im speziellen für DJ-1, welches nach oxidativem Stress in die Mitochondrien transloziert. Bei Interaktionsstudien, unter normalen physiologischen Bedingungen, konnte jedoch eine Interaktion mit den Proteinen Parkin,  $\alpha$ -Synuklein, Synphilin-1 und DJ-1 ausgeschlossen werden. Keines der Proteine zeigte eine direkte Interaktion mit Omi/HtrA2 Wt, S141 oder S399 *in vitro*.

Omi/HtrA2 besitzt in der *precursor*-Form eine mitochondriale Translokationssequenz. Diese wird nach der Prozessierung zur *mature*-Form in den Mitochondrien abgespalten. Durch den Nachweis der *mature*-Form bei allen drei Varianten von Omi/HtrA2 scheint die Lokalisierung der mutierten Varianten von Omi/HtrA2 in die Mitochondrien nicht gestört zu sein. Das Protein liegt, wie die Wt-Form, im Intermembranraum der Mitochondrien vor. Eine Anreicherung im Zytosol oder einem anderen zellulären Kompartiment als den Mitochondrien wurde nicht beobachtet. Die beschriebene Kernlokalisierung (Gray, 2000) konnte nicht bestätigt werden, vielmehr wurde beobachtet, dass eine FITC-positive Färbung unter längerer Anregung bei einer Wellenlänge von 350 nm im Zellkern nachweisbar wird. Dies wurde für alle drei Formen gleichermaßen beobachtet und als Artefakt festgehalten. Ob dieser Nachweis eines Signals durch ein Diffundieren des Sekundärantikörpers in den Zellkern oder durch eine Verschiebung des Emissionspektrums des Hoechstfarbstoffs in den Detektionsbereich des FITC-Filters ausgelöst wurde, kann nicht näher beschrieben werden.

Ein Effekt auf die Mitochondrien-Morphologie wurde bei HEK293 und SH-SY5Y-Zellen beobachtet, die S141- und S399-Omi/HtrA2 stabil überexprimierten. Speziell bei S399-Omi/HtrA2 stabil überexprimierenden Zellen konnten geschwollene Mitochondrien beobachtet werden, die bei der S141-Mutation weniger häufig waren und beim Wt-Protein nur selten auftraten. Zu einer Schwellung der Mitochondrien kommt es beim Verlust des mitochondrialen

Membranpotentials durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom oder mitochondrialer Schädigung (ÜA: Rodriguez-Enriquez, 2004). Dieser Prozess der Schwellung ist reversibel, so dass sich die Mitochondrien zu einer normalen Morphologie zurückbilden können (Minamikawa, 1999).

Mittels ultrastruktureller Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die beobachtete mitochondriale Schwellung die Mitochondrien der S399-Mutation überexprimierenden Zellen irreversibel schädigt und abnormale Mitochondrien in gehäufte Form auftreten. Die Mitochondrien der S399-Omi/HtrA2 stabil überexprimierenden HEK293 Zellen wiesen eine Schwellung mit disorganisierten *Cristae* auf, ferner konnten Strukturen beobachtet werden, die mit lysosomaler Morphologie lokalisiert waren. Geschädigte Zellorganellen werden in der Zelle durch Autophagie abgebaut. So werden generell Mitochondrien in der Zelle durch Autophagie beseitigt, wobei die normale Regenerationszeit der Mitochondrien, abhängig vom Zelltyp, bei 10-25 Tagen liegt (ÜA: Mariño, 2004; Rodriguez-Enriquez, 2004). Kolokalisationsuntersuchungen zwischen mitochondrialen und lysosomalen Markern zeigten ein gehäuftes Auftreten lysosomaler Aktivität bei Mitochondrien von Zellen mit mutiertem Omi/HtrA2-Protein. Dies zeigt, dass die Mitochondrien insbesondere bei mutiertem Omi/HtrA2 lysosomal abgebaut werden. Die ultrastrukturellen Untersuchungen und die lysosomale Kolokalisation weisen dabei auf Autophagie hin. Autophagischer Zelltod wurde in pathologischen Untersuchungen bei Neurodegeneration nachgewiesen, hierzu zählen Morbus Alzheimer, Corea Huntington und die PK. Interessanterweise wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Synuklein- und Huntingtin-Aggresomen nach Induktion mit Rapamycin über Autophagie abgebaut werden. Hierdurch könnten Insuffizienzen im proteasomalen Proteinabbau ausgeglichen werden (Webb, 2003; ÜA: Mariño, 2004). So zeigen die bisherigen Erkenntnisse der Autophagie positive wie auch negative Einflüsse auf die Neurodegeneration. Damit könnte die Autophagie eine bedeutende Rolle bei der Neurodegeneration gewinnen. Dies unterstreichen Untersuchungen zur lysosomalen Degradation von  $\alpha$ -Synuklein. So konnte gezeigt werden, dass Wt- $\alpha$ -Synuklein selektiv in Lysosomen transloziert, um über Chaperon-vermittelte Autophagie abgebaut zu werden, jedoch A53T- und A30P- $\alpha$ -Synuklein nur an den lysosomalen Rezeptor bindet und diesen blockiert (Cuervo, 2004).

Basierend auf den morphologischen Veränderungen der Mitochondrien stellte sich die Frage, inwieweit die Mitochondrien durch die Überexpression der mutierten Formen von Omi/HtrA2 in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Ein wichtiger Marker für die Funktion der Mitochondrien ist das mitochondriale Membranpotential. Untersuchungen zeigten, dass unter normalen Bedingungen keine wesentliche Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials bei den mutierten Formen von Omi/HtrA2 messbar war. Unter zellulärem Stress kam es bei Zellen, die mutierte Formen von Omi/HtrA2 stabil überexprimierten, zu funktionellen Veränderungen in den Mitochondrien. So zeigten beide mutierte Formen von Omi/HtrA2 bei Überexpression in HEK293 und SH-SY5Y Zellen einen Rückgang der mitochondrialen Stabilität im Vergleich zum Wt. Interessanterweise beeinflussten die Mutationen die Integrität der Mitochondrien in unterschiedlicher Weise. S399-Omi/HtrA2 weist eine stark erhöhte Empfänglichkeit auf mitochondrialen Stress durch den Serine/Threonine-Kinase-Inhibitor Staurosporine auf, wogegen S141-Omi/HtrA2 die Mitochondrien eher suszeptibel für Stress durch eine Komplex I-Hemmung macht. Der Verlust des Membranpotentials unter Stressbedingungen führt in Zellen, welche mutierte Formen von Omi/HtrA2 überexprimieren, zu einem Verlust der Stresstoleranz. Bei Untersuchungen der Zellvitalität durch Messung der LDH-Freisetzung zeigten S399-Omi/HtrA2 überexprimierende Zellen einen erhöhten toxischen Effekt auf Staurosporine-Intoxikation im Vergleich zu Wt-Protein exprimierenden Zellen, welcher unter normalen Kulturbedingungen nicht vorlag. Für S141-Omi/HtrA2 überexprimierende Zellen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden, obwohl das mitochondriale Membranpotential im Vergleich zum Wt gestört war. Dies lässt auf einen geringen Effekt der A141S-Mutation verglichen mit der G399S-Mutation schließen und weist auf eine reversible Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials bei dieser Mutation hin. Der verminderte toxische Effekt der S141-Mutation könnte auch das Vorkommen des T421-Allels in normalen Populationen erklären. Hierbei stellt sich die Frage nach weiteren genetischen Faktoren oder Umweltfaktoren, die zur Entwicklung einer PK führen. Interessanterweise führt die Hemmung des Proteasoms bei der S141-Mutation zu einer gesteigerten Sensitivität auf proteasomalen Stress, die für die S399-Mutation nicht in diesem Ausmaß zu beobachten war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen zu einer gesteigerten Empfindlichkeit für äußere Stressbedingungen führen. Die S399-Mutation scheint dabei zu einer insgesamt höheren Stressintoleranz zu führen, wogegen die S141-Mutation auf Stressfaktoren unterschiedlich anspricht und der Effekt im Vergleich zu Wt-*Omi/HtrA2* weniger stark ausgeprägt ist.

Bei einem generellen Funktionsverlust der Proteaseaktivierung durch ein Substrat kann man spekulieren, dass beide Mutationen auf die gleichen Stressfaktoren suszeptibel sein müssten. Hier sprechen jedoch die Ergebnisse der Vitalitätsuntersuchungen wie auch der Untersuchungen des MMP dagegen, da die beiden mutierten Formen von *Omi/HtrA2* auf unterschiedliche Stressfaktoren unterschiedlich ansprechen.

Die Hypothese, dass *Omi/HtrA2* in den Mitochondrien unterschiedliche Substrate bindet und somit auf unterschiedliche Signalwege unter Stressbedingungen Einfluss nehmen kann, bedarf weiterer Untersuchungen. So zum Beispiel der Zuordnung spezifischer Substrate und Untersuchungen mit weiteren Toxinen und Faktoren. Da für die *mnd2*-Maus wie auch für die *knock-out* Maus eine Degradation der striatalen Neurone gezeigt wurde, dopaminerge Neurone in der SNpc jedoch keine Anzeichen einer gesteigerten Toxizität aufweisen, stellt sich die Frage, welche Faktoren die Neurone des nigrostriatalen *Pathways* im Striatum untergehen lassen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es regionale Unterschiede in der Stresstoleranz bei Mitochondrien gibt. Versuche an Rattenneuronen aus dem Striatum zeigten eine gesteigerte Sensitivität auf eine Stimulation mit erhöhten Kalziumkonzentrationen als Neurone des Kortex, was in einem früheren Verlust des mitochondrialen Membranpotentials resultierte (Brustovetsky, 2003). Inwieweit die humanen *Omi/HtrA2*-Mutationen mit den Erkenntnissen der *mnd2*- und der *knock-out* Maus korrelieren, müssen funktionelle und pathologische Untersuchungen der SNpc und des Striatums bei betroffenen Patienten zeigen.

Die genaue Ursache, wie Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen ein Parkinson-Syndrom verursachen, ist noch nicht geklärt. Ob sich die Mutationen nur zu einer Empfindlichkeit für bestimmte Umweltfaktoren auswirken oder die Mutationen selbst einen pathogenen Faktor bei der Neurodegeneration verursachen, muss in weiteren Untersuchungen noch genauer eingegrenzt werden.

Zusammenfassend ist die Pathogenese der PK weiterhin unklar. Die Erkenntnisse der funktionellen Untersuchungen der *Omi/HtrA2*-Mutationen unterstreichen

jedoch die zunehmende Bedeutung mitochondrialer Pathogenesemechanismen in der PK. Besonders Defekte des Komplex I der Atmungskette weisen auf einen Zusammenhang von mitochondrialer Dysfunktion und dem Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc hin. Hinweise auf diese Hypothese liefern Untersuchungen von idiopathischen PK-Patienten, bei denen ein 30-40%iger Verlust der Komplex I-Aktivität in der SNpc nachgewiesen wurde (Bindoff, 1989; Schapira, 1990; Mann, 1992; Janetzky, 1994). Unterstützt wird dies durch immunhistochemische Untersuchungen von PK-Patienten, bei denen eine Verminderung der Komplex I-Färbung vorlag, hingegen sich die Komplexe II und III nicht von Kontrollhirnschnitten unterschieden (Hattori, 1991). Neuere Untersuchungen von Parkin *knock-out* Mäusen weisen auf Zusammenhänge von mitochondrialer Dysfunktion und Parkin hin. So zeigen diese *knock-out* Mäuse einen Verlust an Proteinen, welche in mitochondrialen Funktionen und der oxidativen Stressantwort beteiligt sind. Es zeigten sich dabei Funktionsverluste in der Atmungskette, die durch einen Rückgang von Untereinheiten der Komplexe I und IV bedingt waren (Palacino, 2004). Weitere Erkenntnisse können dabei helfen, einen direkten Zusammenhang zwischen Störungen des UPS und mitochondrialer Dysfunktion in der Pathogenese der PK zu liefern.

### **4.3 Charakterisierung der E64D-Mutation im DJ-1-Protein**

Im *DJ-1*-Gen wurden bisher eine homozygote Deletion, drei homozygote und zwei heterozygote Punktmutationen beschrieben (Moore, 2005). Mutationen im *DJ-1*-Gen konnten bislang nur sehr selten nachgewiesen werden und begründen etwa 1% der familiären Ursachen der PK (Lockhart, 2004).

Hier konnte eine neue homozygote Mutation im *DJ-1*-Gen entdeckt werden. Diese neue E64D-Mutation von DJ-1 wurde in einer türkischen Familie nachgewiesen. Der betroffene Patient zeigte eine erste Symptomatik im Alter von 34 Jahren und in PET Studien verminderte DAT Bindung in beiden Striata. Eine homozygote Trägerin des G192C-Allels weist bisher keine Parkinson-Symptome auf, jedoch zeigten PET Untersuchungen eine geringere DAT Bindung verglichen mit einem nicht-betroffenen Bruder, der heterozygot für die Mutation ist (Hering, 2004). Dies spricht für die pathogene Bedeutung der Mutation.

Die primär beschriebene Punktmutation in DJ-1, eine L166P-Mutation, führt zu einer verminderten Proteinstabilität von DJ-1. So sind die *Steady-State-Level* der

L166P-Mutation in Westernblots schwierig nachweisbar, lassen sich jedoch durch proteasomale Inhibition mit MG132 wieder detektieren (Miller, 2003). Bei mikroskopischen Untersuchungen zeigen Zellen, die mutiertes P166-DJ-1 überexprimieren, einen Verlust des DJ-1 Signals im Zytoplasma und das Protein ist nur noch im Zellkern und in den Mitochondrien detektierbar (Bonifati, 2003). Die transiente Überexpression von E64D-DJ-1 zeigt eine Abnahme der *Steady-State-Level* des Proteins im Vergleich mit Wt-DJ-1. Die Abnahme ist dabei nicht so ausgeprägt wie bei der L166P-Form. Ein vergleichbarer leichter Rückgang der *Steady-State-Level* konnte auch für die M26I-Form von DJ-1 gezeigt werden (Abou-Sleiman, 2003). Die E64D-Mutation führt zu keiner Veränderung der Kristallstruktur des Proteins, interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass ein monoklonaler Antikörper gegen Wt-DJ-1 (3E8), die D64-Form des Proteins, nicht detektieren kann. Nachweislich gilt die Sequenz um Aminosäureposition 64 als Epitop des Antikörpers (Hering, 2004; Gorner, 2004). Eine Veränderung in dieser Region könnte somit die Interaktion von nativem D64-DJ-1 mit anderen Proteinen beeinflussen.

Ein weiterer Effekt, der auf eine funktionelle Relevanz der D64-Form von DJ-1 schließen lässt, konnte bei mikroskopischen Untersuchungen beobachtet werden. Die Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der E64D-Mutation zeigten eine Abnahme an zytoplasmatisch vorhandenem D64-V5-DJ-1, welche ca. 5% der Zellen aufwies. Es kommt dabei zu einer Lokalisationsverschiebung vom Zytoplasma in den Zellkern, das zytoplasmatische DJ-1 zeigt nur ein schwaches Signal. P166-V5-DJ-1 wurde nur im Zellkern detektiert, ein Signal in anderen zellulären Kompartimenten trat nicht auf. Eine Lokalisation in die Mitochondrien, wie in anderen Studien für die L166P-Form von DJ-1 beschrieben, konnte für P166-DJ-1 nicht beobachtet werden (Bonifati, 2003). Die D64-Form von DJ-1 zeigte ebenfalls keine Lokalisation in den Mitochondrien. Da DJ-1 unter oxidativem Stress in die Mitochondrien transloziert wird, kann die ursprünglich beobachtete Lokalisation in die Mitochondrien durch oxidativen Stress der Zellen hervorgerufen worden sein.

Weitere Untersuchungen der E64D-Mutation müssen nachweisen, inwiefern sich die Mutation verglichen mit bislang identifizierten Mutationen im *DJ-1*-Gen verhält. So könnten Erkenntnisse über die Homodimerisierung und Interaktionsstudien mit Parkin die Relevanz der E64D-Mutation bekräftigen.

## 5 Zusammenfassung

Aktuelle Konzepte zur Neurodegeneration bei der Parkinson-Krankheit beinhalten die Aggregation von fehlgefalteten Proteinen und mitochondriale Dysfunktion. Vor kurzem wurden *Omi/HtrA2 knock-out* Mäuse beschrieben, die Neurodegeneration und einen Parkinson-ähnlichen Phänotyp aufweisen.

Ausgehend von einem Kandidatengenansatz im Bereich des PARK3 Locus auf Chromosom 2p13, wurden Gene gesucht, die eine Rolle bei der zellulären Stressantwort und Zelltodmechanismen spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen und Neurodegeneration beim Menschen gezeigt werden. In einer Kandidatengen-Untersuchung bei 518 Parkinson-Patienten wurde bei vier Patienten eine neue Mutation in Exon 7 des *Omi/HtrA2*-Gens gefunden. Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch in der PDZ-Domäne des Peptids und konnte bei einer Kontrollgruppe in 740 Chromosomen ausgeschlossen werden. Darüberhinaus konnte ein neuer A141S-Polymorphismus identifiziert werden, der mit der Parkinson-Krankheit assoziiert ist ( $p < 0,05$ ).

Beide Aminosäureaustausche führten zu einer reduzierten Protease-Aktivität des *Omi/HtrA2*-Proteins nach Aktivierung. Immunhistochemische und funktionelle Analysen in stabil transfizierten Zellen zeigten, dass die PDZ-mutierte Form von *Omi/HtrA2* und – in geringerem Ausmass – auch das Risikoallel des neu identifizierten Polymorphismus zu einer Mitochondriendysfunktion mit veränderter Mitochondrien-Morphologie führen. Dabei waren Zellen, die PDZ-mutierte *Omi/HtrA2* exprimieren empfindlicher gegenüber zellulärem Stress als Zellen, die das Wildtyp-Protein exprimieren. Darüberhinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neu identifizierte homozygote E64D-Mutation bei einer türkischen Familie im DJ-1-Protein funktionell untersucht. Bislang identifizierte Mutationen im *DJ-1*-Gen weisen darauf hin, dass DJ-1 als Sensor zur Regulation von oxidativem und mitochondrialem Stress dient. Die neu identifizierte E64D-Mutation im DJ-1-Protein führt zu einem Verlust der Proteinstabilität und zu subzellulärer Fehllokalisierung von E64D-DJ-1 in Zellkultur *in vitro*.

Diese Ergebnisse zu Mutationen im *Omi/HtrA2*-Gen und *DJ-1*-Gen unterstreichen die Bedeutung von mitochondrialer Dysfunktion für die Neurodegeneration bei der Parkinson-Krankheit.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Abeliovich A., Schmitz Y., Farinas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A. *et al*: **Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system.** *Neuron*. 2000, **25**(1):239-252.
2. Abou-Sleiman P.M., Healy D.G., Quinn N., Lees A.J., Wood N.W.: **The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease.** *Ann Neurol*. 2003, **54**(3):283-286.
3. Allen R.C., Graves G., Budowle B.: **Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver.** *Biotechniques*. 1989, **7**(7):736-744.
4. Assuncao Guimaraes C., Linden R.: **Programmed cell death.** *Eur J Biochem*. 2004, **271**:1638-1650.
5. Baker M.G., Graham L.: **The journey: Parkinson's disease.** *Bmj*. 2004, **329**(7466):611-614.
6. Beal M.F.: **Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases.** *Trends Neurosci*. 2000, **23**(7):298-304.
7. Beal M.F.: **Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease.** *Ann N Y Acad Sci*. 2003, **991**:120-131.
8. Bezard E., Gross C.E., Fournier M.C., Dovero S., Bloch B., Jaber M.: **Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter.** *Exp Neurol*. 1999, **155**(2):268-273.
9. Bindoff L.A., Birch-Machin M., Cartlidge N.E., Parker W.D., Jr., Turnbull D.M.: **Mitochondrial function in Parkinson's disease.** *Lancet*. 1989, **2**(8653):49.
10. Bird T.D., Jarvik G.P., Wood N.W.: **Genetic association studies: genes in search of diseases.** *Neurology*. 2001, **57**(7):1153-1154.
11. Blackinton J., Ahmad R., Miller D.W., van der Brug M.P., Canet-Aviles R.M., Hague S.M., Kaleem M., Cookson M.R.: **Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization.** *Brain Res Mol Brain Res*. 2005, **134**(1):76-83.
12. Blink E., Maianski N.A., Alnemri E.S., Zervos A.S., Roos D., Kuijpers T.W.: **Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils.** *Cell Death Differ*. 2004, **11**(8):937-939.

13. Boatright K.M., Salvesen G.S.: **Mechanisms of caspase activation.** *Curr Opin Cell Biol.* 2003, **15**(6):725-731.
14. Bonifati V., Dekker M.C., Vanacore N., Fabbrini G., Squitieri F., Marconi R., Antonini A., Brustenghi P., Dalla Libera A., De Mari M. *et al*: **Autosomal recessive early onset parkinsonism is linked to three loci: PARK2, PARK6, and PARK7.** *Neurol Sci.* 2002, **23 Suppl 2**:S59-60.
15. Bonifati V., Oostra B.A., Heutink P.: **Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease.** *J Mol Med.* 2004, **82**(3):163-174.
16. Bonifati V., Rizzu P., Squitieri F., Krieger E., Vanacore N., van Swieten J.C., Brice A., van Duijn C.M., Oostra B., Meo G. *et al*: **DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism.** *Neurol Sci.* 2003, **24**(3):159-160.
17. Bonifati V., Rizzu P., van Baren M.J., Schaap O., Breedveld G.J., Krieger E., Dekker M.C., Squitieri F., Ibanez P., Joesse M. *et al*: **Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism.** *Science.* 2003, **299**(5604):256-259.
18. Bonifati V., Rohe C.F., Breedveld G.J., Fabrizio E., De Mari M., Tassorelli C., Tavella A., Marconi R., Nicholl D.J., Chien H.F. *et al*: **Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes.** *Neurology.* 2005, **65**(1):87-95.
19. Bossy-Wetzel E., Schwarzenbacher R., Lipton S.A.: **Molecular pathways to neurodegeneration.** *Nat Med.* 2004, **10 Suppl**:S2-9.
20. Bradford M.M.: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 1976, **72**:248-254.
21. Brock R., Hamelers I.H., Jovin T.M.: **Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor.** *Cytometry.* 1999, **35**(4):353-362.
22. Brustovetsky N., Brustovetsky T., Purl K.J., Capano M., Crompton M., Dubinsky J.M.: **Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition.** *J Neurosci.* 2003, **23**(12):4858-4867.
23. Burke R.E.: **Recent advances in research on Parkinson disease: synuclein and parkin.** *Neurologist.* 2004, **10**(2):75-81.

- 
24. Bursch W.: **The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death.** *Cell Death Differ.* 2001, **8**(6):569-581.
  25. Canet-Aviles R.M., Wilson M.A., Miller D.W., Ahmad R., McLendon C., Bandyopadhyay S., Baptista M.J., Ringe D., Petsko G.A., Cookson M.R.: **The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, **101**(24):9103-9108.
  26. Chung K.K., Zhang Y., Lim K.L., Tanaka Y., Huang H., Gao J., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M.: **Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease.** *Nat Med.* 2001, **7**(10):1144-1150.
  27. Cilenti L., Lee Y., Hess S., Srinivasula S., Park K.M., Junqueira D., Davis H., Bonventre J.V., Alnemri E.S., Zervos A.S.: **Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2.** *J Biol Chem.* 2003, **278**(13):11489-11494.
  28. Cilenti L., Soundarapandian M.M., Kyriazis G.A., Stratico V., Singh S., Gupta S., Bonventre J.V., Alnemri E.S., Zervos A.S.: **Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death.** *J Biol Chem.* 2004, **279**(48):50295-50301.
  29. Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K.: **Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis.** *J Biol Chem.* 1977, **252**(3):1102-1106.
  30. Comings D.E., MacMurray J.P.: **Molecular heterosis: a review.** *Mol Genet Metab.* 2000, **71**(1-2):19-31.
  31. Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T.: **Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease.** *Nat Med.* 1998, **4**(11):1318-1320.
  32. Conway K.A., Lee S.J., Rochet J.C., Ding T.T., Williamson R.E., Lansbury P.T., Jr.: **Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, **97**(2):571-576.
  33. Cookson M.R., Lockhart P.J., McLendon C., O'Farrell C., Schlossmacher M., Farrer M.J.: **RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein.** *Hum Mol Genet.* 2003, **12**(22):2957-2965.
-

34. Corti O., Hampe C., Koutnikova H., Darios F., Jacquier S., Prigent A., Robinson J.C., Pradier L., Ruberg M., Mirande M. *et al*: **The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration.** *Hum Mol Genet.* 2003, **12**(12):1427-1437.
35. Cuervo A.M.: **Autophagy: many paths to the same end.** *Mol Cell Biochem.* 2004, **263**(1-2):55-72.
36. Cuervo A.M., Stefanis L., Fredenburg R., Lansbury P.T., Sulzer D.: **Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy.** *Science.* 2004, **305**(5688):1292-1295.
37. Dauer W., Przedborski S.: **Parkinson's disease: mechanisms and models.** *Neuron.* 2003, **39**(6):889-909.
38. DeStefano A.L., Lew M.F., Golbe L.I., Mark M.H., Lazzarini A.M., Guttman M., Montgomery E., Waters C.H., Singer C., Watts R.L. *et al*: **PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study.** *Am J Hum Genet.* 2002, **70**(5):1089-1095.
39. Dong Z., Ferger B., Paterna J.C., Vogel D., Furler S., Osinde M., Feldon J., Bueler H.: **Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, **100**(21):12438-12443.
40. Edinger A.L., Thompson C.B.: **Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy.** *Curr Opin Cell Biol.* 2004, **16**(6):663-669.
41. Engelender S., Kaminsky Z., Guo X., Sharp A.H., Amaravi R.K., Kleiderlein J.J., Margolis R.L., Troncoso J.C., Lanahan A.A., Worley P.F. *et al*: **Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions.** *Nat Genet.* 1999, **22**(1):110-114.
42. Engelender S., Wanner T., Kleiderlein J.J., Wakabayashi K., Tsuji S., Takahashi H., Ashworth R., Margolis R.L., Ross C.A.: **Organization of the human synphilin-1 gene, a candidate for Parkinson's disease.** *Mamm Genome.* 2000, **11**(9):763-766.
43. Eriksen J.L., Wszolek Z., Petrucelli L.: **Molecular pathogenesis of Parkinson disease.** *Arch Neurol.* 2005, **62**(3):353-357.
44. Faccio L., Fusco C., Chen A., Martinotti S., Bonventre J.V., Zervos A.S.: **Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia.** *J Biol Chem.* 2000, **275**(4):2581-2588.

45. Fahn S.: **Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome.** *Ann N Y Acad Sci.* 2003, **991**:1-14.
46. Farrer M., Chan P., Chen R., Tan L., Lincoln S., Hernandez D., Forno L., Gwinn-Hardy K., Petrucelli L., Hussey J. *et al*: **Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations.** *Ann Neurol.* 2001, **50**(3):293-300.
47. Farrer M., Destee T., Becquet E., Wavrant-De Vrieze F., Mouroux V., Richard F., Defebvre L., Lincoln S., Hardy J., Amouyel P. *et al*: **Linkage exclusion in French families with probable Parkinson's disease.** *Mov Disord.* 2000, **15**(6):1075-1083.
48. Feany M.B., Bender W.W.: **A Drosophila model of Parkinson's disease.** *Nature.* 2000, **404**(6776):394-398.
49. Ferri K.F., Kroemer G.: **Organelle-specific initiation of cell death pathways.** *Nat Cell Biol.* 2001, **3**(11):E255-263.
50. Funayama M., Hasegawa K., Kowa H., Saito M., Tsuji S., Obata F.: **A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1.** *Ann Neurol.* 2002, **51**(3):296-301.
51. Garrido C., Kroemer G.: **Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins.** *Curr Opin Cell Biol.* 2004, **16**(6):639-646.
52. Gasser T.: **Genetics of Parkinson's disease.** *J Neurol.* 2001, **248**(10):833-840.
53. Gasser T., Muller-Myhsok B., Wszolek Z.K., Oehlmann R., Calne D.B., Bonifati V., Bereznoi B., Fabrizio E., Vieregge P., Horstmann R.D.: **A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13.** *Nat Genet.* 1998, **18**(3):262-265.
54. Gorner K., Holtorf E., Odoy S., Nuscher B., Yamamoto A., Regula J.T., Beyer K., Haass C., Kahle P.J.: **Differential effects of Parkinson's disease-associated mutations on stability and folding of DJ-1.** *J Biol Chem.* 2004, **279**(8):6943-6951.
55. Gray C.W., Ward R.V., Karran E., Turconi S., Rowles A., Viglienghi D., Southan C., Barton A., Fantom K.G., West A. *et al*: **Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response.** *Eur J Biochem.* 2000, **267**(18):5699-5710.
56. Gupta S., Singh R., Datta P., Zhang Z., Orr C., Lu Z., Dubois G., Zervos A.S., Meisler M.H., Srinivasula S.M. *et al*: **The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity.** *J Biol Chem.* 2004, **279**(44):45844-45854.

57. Hampshire D.J., Roberts E., Crow Y., Bond J., Mubaidin A., Wriekat A.L., Al-Din A., Woods C.G.: **Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36.** *J Med Genet.* 2001, **38**(10):680-682.
58. Hardy J.: **The relationship between Lewy body disease, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease.** *Ann N Y Acad Sci.* 2003, **991**:167-170.
59. Hatano Y., Li Y., Sato K., Asakawa S., Yamamura Y., Tomiyama H., Yoshino H., Asahina M., Kobayashi S., Hassin-Baer S. *et al*: **Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism.** *Ann Neurol.* 2004, **56**(3):424-427.
60. Hattori N., Tanaka M., Ozawa T., Mizuno Y.: **Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease.** *Ann Neurol.* 1991, **30**(4):563-571.
61. Hegde R., Srinivasula S.M., Zhang Z., Wassell R., Mukattash R., Cilenti L., DuBois G., Lazebnik Y., Zervos A.S., Fernandes-Alnemri T. *et al*: **Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction.** *J Biol Chem.* 2002, **277**(1):432-438.
62. Hengartner M.O.: **Apoptosis: corralling the corpses.** *Cell.* 2001, **104**(3):325-328.
63. Hengartner M.O.: **The biochemistry of apoptosis.** *Nature.* 2000, **407**(6805):770-776.
64. Hering R., Strauss K.M., Tao X., Bauer A., Voitalla D., Mietz E.M., Petrovic S., Bauer P., Schaible W., Muller T. *et al*: **Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7).** *Hum Mutat.* 2004, **24**(4):321-329.
65. Hicks A.A., Petursson H., Jonsson T., Stefansson H., Johannsdottir H.S., Sainz J., Frigge M.L., Kong A., Gulcher J.R., Stefansson K. *et al*: **A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease.** *Ann Neurol.* 2002, **52**(5):549-555.
66. Hishikawa N., Niwa J., Doyu M., Ito T., Ishigaki S., Hashizume Y., Sobue G.: **Dorfin localizes to the ubiquitylated inclusions in Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and amyotrophic lateral sclerosis.** *Am J Pathol.* 2003, **163**(2):609-619.
67. Hod Y., Pentylala S.N., Whyard T.C., El-Maghrabi M.R.: **Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-protein interaction.** *J Cell Biochem.* 1999, **72**(3):435-444.

68. Huynh D.P., Scoles D.R., Nguyen D., Pulst S.M.: **The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI.** *Hum Mol Genet.* 2003, **12**(20):2587-2597.
69. Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y., Takahashi R.: **An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin.** *Cell.* 2001, **105**(7):891-902.
70. Imai Y., Soda M., Takahashi R.: **Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity.** *J Biol Chem.* 2000, **275**(46):35661-35664.
71. Ito T., Niwa J., Hishikawa N., Ishigaki S., Doyu M., Sobue G.: **Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1.** *J Biol Chem.* 2003, **278**(31):29106-29114.
72. Jaattela M., Tschopp J.: **Caspase-independent cell death in T lymphocytes.** *Nat Immunol.* 2003, **4**(5):416-423.
73. Janetzky B., Hauck S., Youdim M.B., Riederer P., Jellinger K., Pantucek F., Zochling R., Boissl K.W., Reichmann H.: **Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease.** *Neurosci Lett.* 1994, **169**(1-2):126-128.
74. Jenner P.: **Oxidative stress in Parkinson's disease.** *Ann Neurol.* 2003, **53 Suppl 3**:S26-36; discussion S36-28.
75. Jin J., Meredith G.E., Chen L., Zhou Y., Xu J., Shie F.S., Lockhart P., Zhang J.: **Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins: relevance to Lewy body formation and Parkinson's disease.** *Brain Res Mol Brain Res.* 2005, **134**(1):119-138.
76. Jin S., Kalkum M., Overholtzer M., Stoffel A., Chait B.T., Levine A.J.: **CIAP1 and the serine protease HTRA2 are involved in a novel p53-dependent apoptosis pathway in mammals.** *Genes Dev.* 2003, **17**(3):359-367.
77. Jones J.M., Datta P., Srinivasula S.M., Ji W., Gupta S., Zhang Z., Davies E., Hajnoczky G., Saunders T.L., Van Keuren M.L. *et al*: **Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice.** *Nature.* 2003, **425**(6959):721-727.
78. Kachergus J., Mata I.F., Hulihan M., Taylor J.P., Lincoln S., Aasly J., Gibson J.M., Ross O.A., Lynch T., Wiley J. *et al*: **Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations.** *Am J Hum Genet.* 2005, **76**(4):672-680.

79. Kahle P.J., Haass C.: **How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease?** *EMBO Rep.* 2004, **5**(7):681-685.
80. Kahle P.J., Neumann M., Ozmen L., Muller V., Jacobsen H., Schindzielorz A., Okochi M., Leimer U., van Der Putten H., Probst A. *et al*: **Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain.** *J Neurosci.* 2000, **20**(17):6365-6373.
81. Karamohamed S., DeStefano A.L., Wilk J.B., Shoemaker C.M., Golbe L.I., Mark M.H., Lazzarini A.M., Suchowersky O., Labelle N., Guttman M. *et al*: **A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease: the GenePD study.** *Neurology.* 2003, **61**(11):1557-1561.
82. Kim T.D., Paik S.R., Yang C.H.: **Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein.** *Biochemistry.* 2002, **41**(46):13782-13790.
83. Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N.: **Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.** *Nature.* 1998, **392**(6676):605-608.
84. Kitanaka C., Kuchino Y.: **Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology.** *Cell Death Differ.* 1999, **6**(6):508-515.
85. Kruger R.: **The role of synphilin-1 in synaptic function and protein degradation.** *Cell Tissue Res.* 2004, **318**(1):195-199.
86. Kruger R., Eberhardt O., Riess O., Schulz J.B.: **Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes?** *Trends Mol Med.* 2002, **8**(5):236-240.
87. Kruger R., Fischer C., Schulte T., Strauss K.M., Muller T., Voitalla D., Berg D., Hungs M., Gobbele R., Berger K. *et al*: **Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease.** *Neurosci Lett.* 2003, **351**(2):125-129.
88. Kruger R., Kuhn W., Muller T., Voitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schols L., Riess O.: **Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease.** *Nat Genet.* 1998, **18**(2):106-108.
89. Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I.: **Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis.** *Science.* 1983, **219**(4587):979-980.
90. Larsen K.E., Sulzer D.: **Autophagy in neurons: a review.** *Histol Histopathol.* 2002, **17**(3):897-908.



91. Lawen A.: **Apoptosis-an introduction**. *Bioessays*. 2003, **25**(9):888-896.
92. Le W.D., Xu P., Jankovic J., Jiang H., Appel S.H., Smith R.G., Vassilatis D.K.: **Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease**. *Nat Genet*. 2003, **33**(1):85-89.
93. Lee S.H., Lee J.W., Kim H.S., Kim S.Y., Park W.S., Kim S.H., Lee J.Y., Yoo N.J.: **Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer**. *Apmis*. 2003, **111**(5):586-590.
94. Leroy E., Boyer R., Auburger G., Leube B., Ulm G., Mezey E., Harta G., Brownstein M.J., Jonnalagada S., Chernova T. *et al*: **The ubiquitin pathway in Parkinson's disease**. *Nature*. 1998, **395**(6701):451-452.
95. Li W., Lesuisse C., Xu Y., Troncoso J.C., Price D.L., Lee M.K.: **Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation**. *J Neurosci*. 2004, **24**(33):7400-7409.
96. Li W., Srinivasula S.M., Chai J., Li P., Wu J.W., Zhang Z., Alnemri E.S., Shi Y.: **Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi**. *Nat Struct Biol*. 2002, **9**(6):436-441.
97. Lim K.L., Dawson V.L., Dawson T.M.: **The cast of molecular characters in Parkinson's disease: felons, conspirators, and suspects**. *Ann N Y Acad Sci*. 2003, **991**:80-92.
98. Lindholm D., Eriksson O., Korhonen L.: **Mitochondrial proteins in neuronal degeneration**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004, **321**(4):753-758.
99. Liu H.R., Gao E., Hu A., Tao L., Qu Y., Most P., Koch W.J., Christopher T.A., Lopez B.L., Alnemri E.S. *et al*: **Role of Omi/HtrA2 in apoptotic cell death after myocardial ischemia and reperfusion**. *Circulation*. 2005, **111**(1):90-96.
100. Liu Y., Fallon L., Lashuel H.A., Liu Z., Lansbury P.T., Jr.: **The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility**. *Cell*. 2002, **111**(2):209-218.
101. Lockhart P.J., Lincoln S., Hulihan M., Kachergus J., Wilkes K., Bisceglia G., Mash D.C., Farrer M.J.: **DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function**. *J Med Genet*. 2004, **41**(3):e22.

102. Lowe J., McDermott H., Landon M., Mayer R.J., Wilkinson K.D.: **Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases.** *J Pathol.* 1990, **161**(2):153-160.
103. Lucking C.B., Abbas N., Durr A., Bonifati V., Bonnet A.M., de Broucker T., De Michele G., Wood N.W., Agid Y., Brice A.: **Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group.** *Lancet.* 1998, **352**(9137):1355-1356.
104. Macedo M.G., Anar B., Bronner I.F., Cannella M., Squitieri F., Bonifati V., Hoogeveen A., Heutink P., Rizzu P.: **The DJ-1L166P mutant protein associated with early onset Parkinson's disease is unstable and forms higher-order protein complexes.** *Hum Mol Genet.* 2003, **12**(21):2807-2816.
105. MacFarlane M., Merrison W., Bratton S.B., Cohen G.M.: **Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro.** *J Biol Chem.* 2002, **277**(39):36611-36616.
106. Mann V.M., Cooper J.M., Krige D., Daniel S.E., Schapira A.H., Marsden C.D.: **Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease.** *Brain.* 1992, **115** (Pt 2):333-342.
107. Maraganore D.M., Lesnick T.G., Elbaz A., Chartier-Harlin M.C., Gasser T., Kruger R., Hattori N., Mellick G.D., Quattrone A., Satoh J. *et al*: **UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene.** *Ann Neurol.* 2004, **55**(4):512-521.
108. Marino G., Lopez-Otin C.: **Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology.** *Cell Mol Life Sci.* 2004, **61**(12):1439-1454.
109. Martins L.M.: **The serine protease Omi/HtrA2: a second mammalian protein with a Reaper-like function.** *Cell Death Differ.* 2002, **9**(7):699-701.
110. Martins L.M., Iaccarino I., Tenev T., Gschmeissner S., Totty N.F., Lemoine N.R., Savopoulos J., Gray C.W., Creasy C.L., Dingwall C. *et al*: **The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif.** *J Biol Chem.* 2002, **277**(1):439-444.

- 
111. Martins L.M., Morrison A., Klupsch K., Fedele V., Moiso N., Teismann P., Abuin A., Grau E., Geppert M., Livi G.P. *et al*: **Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice.** *Mol Cell Biol.* 2004, **24**(22):9848-9862.
112. Martins L.M., Turk B.E., Cowling V., Borg A., Jarrell E.T., Cantley L.C., Downward J.: **Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi.** *J Biol Chem.* 2003, **278**(49):49417-49427.
113. Marx F.P., Holzmann C., Strauss K.M., Li L., Eberhardt O., Gerhardt E., Cookson M.R., Hernandez D., Farrer M.J., Kachergus J. *et al*: **Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease.** *Hum Mol Genet.* 2003, **12**(11):1223-1231.
114. Mata I.F., Lockhart P.J., Farrer M.J.: **Parkin genetics: one model for Parkinson's disease.** *Hum Mol Genet.* 2004, **13 Spec No 1**:R127-133.
115. McLean P.J., Hyman B.T.: **An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation.** *Neurosci Lett.* 2002, **323**(3):219-223.
116. McNaught K.S., Belizaire R., Isacson O., Jenner P., Olanow C.W.: **Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease.** *Exp Neurol.* 2003, **179**(1):38-46.
117. McNaught K.S., Perl D.P., Brownell A.L., Olanow C.W.: **Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease.** *Ann Neurol.* 2004, **56**(1):149-162.
118. Miller D.W., Ahmad R., Hague S., Baptista M.J., Canet-Aviles R., McLendon C., Carter D.M., Zhu P.P., Stadler J., Chandran J. *et al*: **L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system.** *J Biol Chem.* 2003, **278**(38):36588-36595.
119. Minamikawa T., Williams D.A., Bowser D.N., Nagley P.: **Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells.** *Exp Cell Res.* 1999, **246**(1):26-37.
120. Mitsumoto A., Nakagawa Y., Takeuchi A., Okawa K., Iwamatsu A., Takanezawa Y.: **Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat.** *Free Radic Res.* 2001, **35**(3):301-310.
121. Moore D.J., West, A.B., Dawson, V.L., Dawson, T.M.: **Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease.** *Annu. Rev. Neurosci.* 2005, **28**:57-87.
-

122. Moore D.J., Zhang L., Troncoso J., Lee M.K., Hattori N., Mizuno Y., Dawson T.M., Dawson V.L.: **Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress.** *Hum Mol Genet.* 2005, **14**(1):71-84.
123. Nagakubo D., Taira T., Kitaura H., Ikeda M., Tamai K., Iguchi-Ariga S.M., Ariga H.: **DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, **231**(2):509-513.
124. Newmeyer D.D., Ferguson-Miller S.: **Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death.** *Cell.* 2003, **112**(4):481-490.
125. Niwa J., Ishigaki S., Doyu M., Suzuki T., Tanaka K., Sobue G.: **A novel centrosomal ring-finger protein, dorfins, mediates ubiquitin ligase activity.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, **281**(3):706-713.
126. Okada H., Suh W.K., Jin J., Woo M., Du C., Elia A., Duncan G.S., Wakeham A., Itie A., Lowe S.W. *et al*: **Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice.** *Mol Cell Biol.* 2002, **22**(10):3509-3517.
127. Opferman J.T., Korsmeyer S.J.: **Apoptosis in the development and maintenance of the immune system.** *Nat Immunol.* 2003, **4**(5):410-415.
128. Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E.W., Gilks W.P., Simon J., van der Brug M., de Munain A.L., Aparicio S., Gil A.M., Khan N. *et al*: **Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease.** *Neuron.* 2004, **44**(4):595-600.
129. Palacino J.J., Sagi D., Goldberg M.S., Krauss S., Motz C., Wacker M., Klose J., Shen J.: **Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice.** *J Biol Chem.* 2004, **279**(18):18614-18622.
130. Pankratz N., Nichols W.C., Uniacke S.K., Halter C., Rudolph A., Shults C., Conneally P.M., Foroud T.: **Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37.** *Am J Hum Genet.* 2003, **72**(4):1053-1057.
131. Pankratz N., Uniacke S.K., Halter C.A., Rudolph A., Shults C.W., Conneally P.M., Foroud T., Nichols W.C.: **Genes influencing Parkinson disease onset: replication of PARK3 and identification of novel loci.** *Neurology.* 2004, **62**(9):1616-1618.
132. Park H.J., Seong Y.M., Choi J.Y., Kang S., Rhim H.: **Alzheimer's disease-associated amyloid beta interacts with the human serine protease HtrA2/Omi.** *Neurosci Lett.* 2004, **357**(1):63-67.

- 
133. Perlmann T., Wallen-Mackenzie A.: **Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells.** *Cell Tissue Res.* 2004, **318**(1):45-52.
134. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R. *et al*: **Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.** *Science.* 1997, **276**(5321):2045-2047.
135. Rathke-Hartlieb S., Schlomann U., Heimann P., Meisler M.H., Jockusch H., Bartsch J.W.: **Progressive loss of striatal neurons causes motor dysfunction in MND2 mutant mice and is not prevented by Bcl-2.** *Exp Neurol.* 2002, **175**(1):87-97.
136. Recchia A., Debetto P., Negro A., Guidolin D., Skaper S.D., Giusti P.: **Alpha-synuclein and Parkinson's disease.** *Faseb J.* 2004, **18**(6):617-626.
137. Ren Y., Zhao J., Feng J.: **Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation.** *J Neurosci.* 2003, **23**(8):3316-3324.
138. Renart J., Reiser J., Stark G.R.: **Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979, **76**(7):3116-3120.
139. Rideout H.J., Lang-Rollin I., Stefanis L.: **Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2004, **36**(12):2551-2562.
140. Riess O., Krüger, R., Schöls, L., Kösel, S., Graeber, M.B.: **Zur Genetik und Pathogenese des Morbus Parkinson.** *Deutsches Ärzteblatt.* 1999, **96**(Heft 43).
141. Rodriguez-Enriquez S., He L., Lemasters J.J.: **Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2004, **36**(12):2463-2472.
142. Rogaeva E., Johnson J., Lang A.E., Gulick C., Gwinn-Hardy K., Kawarai T., Sato C., Morgan A., Werner J., Nussbaum R. *et al*: **Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease.** *Arch Neurol.* 2004, **61**(12):1898-1904.
143. Roos-Mattjus P., Sistonen L.: **The ubiquitin-proteasome pathway.** *Ann Med.* 2004, **36**(4):285-295.
144. Saigoh K., Wang Y.L., Suh J.G., Yamanishi T., Sakai Y., Kiyosawa H., Harada T., Ichihara N., Wakana S., Kikuchi T. *et al*: **Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice.** *Nat Genet.* 1999, **23**(1):47-51.
-

145. Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R.: **Parkinson's disease**. *Lancet*. 2004, **363**(9423):1783-1793.
146. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977, **74**(12):5463-5467.
147. Sawada R., Lowe J.B., Fukuda M.: **E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell surface lysosomal membrane glycoprotein-1 expression levels**. *J Biol Chem*. 1993, **268**(17):12675-12681.
148. Schapira A.H.: **Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia**. *Biochim Biophys Acta*. 1999, **1410**(2):159-170.
149. Schapira A.H., Cooper J.M., Dexter D., Clark J.B., Jenner P., Marsden C.D.: **Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease**. *J Neurochem*. 1990, **54**(3):823-827.
150. Schlossmacher M.G., Frosch M.P., Gai W.P., Medina M., Sharma N., Forno L., Ochiishi T., Shimura H., Sharon R., Hattori N. *et al*: **Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies**. *Am J Pathol*. 2002, **160**(5):1655-1667.
151. Schulz J.B., Falkenburger B.H.: **Neuronal pathology in Parkinson's disease**. *Cell Tissue Res*. 2004, **318**(1):135-147.
152. Seong Y.M., Choi J.Y., Park H.J., Kim K.J., Ahn S.G., Seong G.H., Kim I.K., Kang S., Rhim H.: **Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP**. *J Biol Chem*. 2004, **279**(36):37588-37596.
153. Shimura H., Schlossmacher M.G., Hattori N., Frosch M.P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K.S., Selkoe D.J.: **Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease**. *Science*. 2001, **293**(5528):263-269.
154. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R. *et al*: **alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease**. *Science*. 2003, **302**(5646):841.
155. Spiess C., Beil A., Ehrmann M.: **A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein**. *Cell*. 1999, **97**(3):339-347.

- 
156. Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M.: **alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, **95**(11):6469-6473.
157. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M.: **Alpha-synuclein in Lewy bodies.** *Nature.* 1997, **388**(6645):839-840.
158. Srinivasula S.M., Gupta S., Datta P., Zhang Z., Hegde R., Cheong N., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S.: **Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2.** *J Biol Chem.* 2003, **278**(34):31469-31472.
159. Staropoli J.F., McDermott C., Martinat C., Schulman B., Demireva E., Abeliovich A.: **Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity.** *Neuron.* 2003, **37**(5):735-749.
160. Stefanis L., Larsen K.E., Rideout H.J., Sulzer D., Greene L.A.: **Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death.** *J Neurosci.* 2001, **21**(24):9549-9560.
161. Sun X.M., Butterworth M., MacFarlane M., Dubiel W., Ciechanover A., Cohen G.M.: **Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis.** *Mol Cell.* 2004, **14**(1):81-93.
162. Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R.: **A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death.** *Mol Cell.* 2001, **8**(3):613-621.
163. Suzuki Y., Takahashi-Niki K., Akagi T., Hashikawa T., Takahashi R.: **Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways.** *Cell Death Differ.* 2004, **11**(2):208-216.
164. Swerdlow R.H., Parks J.K., Davis J.N., 2nd, Cassarino D.S., Trimmer P.A., Currie L.J., Dougherty J., Bridges W.S., Bennett J.P., Jr., Wooten G.F. *et al*: **Matrilineal inheritance of complex I dysfunction in a multigenerational Parkinson's disease family.** *Ann Neurol.* 1998, **44**(6):873-881.
165. Swerdlow R.H., Parks J.K., Miller S.W., Tuttle J.B., Trimmer P.A., Sheehan J.P., Bennett J.P., Jr., Davis R.E., Parker W.D., Jr.: **Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease.** *Ann Neurol.* 1996, **40**(4):663-671.
166. Syntichaki P., Tavernarakis N.: **Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?** *EMBO Rep.* 2002, **3**(7):604-609.
-

167. Taira T., Iguchi-Arigo S.M., Arigo H.: **Co-localization with DJ-1 is essential for the androgen receptor to exert its transcription activity that has been impaired by androgen antagonists.** *Biol Pharm Bull.* 2004, **27**(4):574-577.
168. Taira T., Saito Y., Niki T., Iguchi-Arigo S.M., Takahashi K., Arigo H.: **DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death.** *EMBO Rep.* 2004, **5**(2):213-218.
169. Takahashi K., Taira T., Niki T., Seino C., Iguchi-Arigo S.M., Arigo H.: **DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor.** *J Biol Chem.* 2001, **276**(40):37556-37563.
170. Tanaka M., Kim Y.M., Lee G., Junn E., Iwatsubo T., Mouradian M.M.: **Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective.** *J Biol Chem.* 2004, **279**(6):4625-4631.
171. Tatton N.A.: **Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease.** *Exp Neurol.* 2000, **166**(1):29-43.
172. Toft M., Mata I.F., Kachergus J.M., Ross O.A., Farrer M.J.: **LRRK2 mutations and Parkinsonism.** *Lancet.* 2005, **365**(9466):1229-1230.
173. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979, **76**(9):4350-4354.
174. Trencia A., Fiory F., Maitan M.A., Vito P., Barbagallo A.P., Perfetti A., Miele C., Ungaro P., Oriente F., Cilenti L. *et al*: **Omi/HtrA2 promotes cell death by binding and degrading the anti-apoptotic protein ped/pea-15.** *J Biol Chem.* 2004, **279**(45):46566-46572.
175. Tritschler H.J., Packer L., Medori R.: **Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration.** *Biochem Mol Biol Int.* 1994, **34**(1):169-181.
176. Tsai Y.C., Fishman P.S., Thakor N.V., Oyler G.A.: **Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function.** *J Biol Chem.* 2003, **278**(24):22044-22055.
177. Valente E.M., Abou-Sleiman P.M., Caputo V., Muqit M.M., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A.R., Healy D.G. *et al*: **Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1.** *Science.* 2004, **304**(5674):1158-1160.



- 
178. Valente E.M., Salvi S., Ialongo T., Marongiu R., Elia A.E., Caputo V., Romito L., Albanese A., Dallapiccola B., Bentivoglio A.R.: **PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism.** *Ann Neurol.* 2004, **56**(3):336-341.
179. van Gurp M., Festjens N., van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P.: **Mitochondrial intermembrane proteins in cell death.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, **304**(3):487-497.
180. van Loo G., Saelens X., van Gurp M., MacFarlane M., Martin S.J., Vandenabeele P.: **The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.** *Cell Death Differ.* 2002, **9**(10):1031-1042.
181. van Loo G., van Gurp M., Depuydt B., Srinivasula S.M., Rodriguez I., Alnemri E.S., Gevaert K., Vandekerckhove J., Declercq W., Vandenabeele P.: **The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity.** *Cell Death Differ.* 2002, **9**(1):20-26.
182. Vaux D.L., Silke J.: **HtrA2/Omi, a sheep in wolf's clothing.** *Cell.* 2003, **115**(3):251-253.
183. Vaux D.L., Silke J.: **Mammalian mitochondrial IAP binding proteins.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, **304**(3):499-504.
184. Verhagen A.M., Silke J., Ekert P.G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L.M., Day C.L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C. *et al*: **HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins.** *J Biol Chem.* 2002, **277**(1):445-454.
185. Vila M., Przedborski S.: **Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease.** *Nat Med.* 2004, **10** Suppl:S58-62.
186. Vila M., Przedborski S.: **Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases.** *Nat Rev Neurosci.* 2003, **4**(5):365-375.
187. von Bohlen und Halbach O., Schober A., Kriegstein K.: **Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease.** *Prog Neurobiol.* 2004, **73**(3):151-177.
188. Webb J.L., Ravikumar B., Atkins J., Skepper J.N., Rubinsztein D.C.: **Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome.** *J Biol Chem.* 2003, **278**(27):25009-25013.
189. West A., Periquet M., Lincoln S., Lucking C.B., Nicholl D., Bonifati V., Rawal N., Gasser T., Lohmann E., Deleuze J.F. *et al*: **Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease.** *Am J Med Genet.* 2002, **114**(5):584-591.
-

190. West A.B., Zimprich A., Lockhart P.J., Farrer M., Singleton A., Holtom B., Lincoln S., Hofer A., Hill L., Muller-Myhsok B. *et al*: **Refinement of the PARK3 locus on chromosome 2p13 and the analysis of 14 candidate genes.** *Eur J Hum Genet.* 2001, **9**(9):659-666.
191. Yang Q.H., Church-Hajduk R., Ren J., Newton M.L., Du C.: **Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis.** *Genes Dev.* 2003, **17**(12):1487-1496.
192. Young J.C., Hartl F.U.: **A stress sensor for the bacterial periplasm.** *Cell.* 2003, **113**(1):1-2.
193. Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atares B. *et al*: **The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia.** *Ann Neurol.* 2004, **55**(2):164-173.
194. Zhang Y., Gao J., Chung K.K., Huang H., Dawson V.L., Dawson T.M.: **Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, **97**(24):13354-13359.
195. Zimprich A., Biskup S., Leitner P., Lichtner P., Farrer M., Lincoln S., Kachergus J., Hulihan M., Uitti R.J., Calne D.B. *et al*: **Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology.** *Neuron.* 2004, **44**(4):601-607.

**Inhalte von Internetseiten, die für diese Arbeit gelesen wurden:**

[www.parkinson-web.de](http://www.parkinson-web.de)

[www.pyrosequencing.com](http://www.pyrosequencing.com)

[www.transgenomic.com](http://www.transgenomic.com)

<http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.shtml>

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Karsten Strauß

geboren am 15.04.1971 in Titisee- Neustadt

ledig

## **Schulbildung**

1977 - 1982	Grund- und Hauptschule, Allensbach und Rielasingen-Worblingen
1982 - 1988	Ten-Brink-Realschule, Rielasingen-Worblingen
1988 - 1991	Agrarwissenschaftliches Gymnasium, Mettnau-Schule, Radolfzell

## **Grundwehrdienst**

1991 - 1992	2. Fernmeldebataillon 10, Graf-Stauffenberg-Kaserne, Sigmaringen
-------------	--

## **Hochschulausbildung**

1992 - 1995	Studium der Informatik (Diplom) mit Nebenfach Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
1995 - 2000	Wechsel des Studienfachs zur Biologie (Diplom) an der Universität Tübingen, Thema der Diplomarbeit: 'Charakterisierung einer 5'-Nukleotidase aus der Rattenniere'
05 - 07.2000	Laborpraktikum in der medizinischen Virologie des Universitätsklinikums Tübingen, AG Hamprecht
09.2000 - 11.2001	Forschungsvorhaben am Max-Planck-Institut Tübingen (FML) auf die Promotion durch Anfertigen einer wissenschaftlichen Arbeit mit dem Thema: 'Identifizierung von Komponenten der asymmetrischen Zellteilung in <i>C. elegans</i> '
12.2001 - 2005	Promotionsarbeit im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung des Universitätsklinikums Tübingen über das Thema: 'Mutationsanalyse und funktionelle Charakterisierung des <i>Omi/HtrA2</i> -Gens in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit'. Betreuer: PD Dr. Rejko Krüger, Prof. Dr. Olaf Riess