

**Charakterisierung *14-3-3zeta* homologer Gene und deren
Bedeutung für die Parkinson'sche Erkrankung**

**der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN**

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

**von
Simone Mosbacher
aus Tübingen
vorgelegte**

Dissertation

2007

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2007

Dekan: Prof. Dr. Friedrich Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Rieß
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Werner J. Schmidt
-

Meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2002 bis Juni 2005 im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Tübingen in der Abteilung Medizinische Genetik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. O. Rieß durchgeführt.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß danke ich herzlich für seine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Werner J. Schmidt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Dr. Thorsten Schmidt, der sich der Aufgabe der ersten wissenschaftlichen Korrektur der Arbeit angenommen hat. Auch konnte ich während der Entstehung der Arbeit und bei Kongressen immer mit Unterstützung rechnen. Vielen Dank!!

Ich bedanke mich bei allen Doktoranden und Diplomandinnen für die freundliche Atmosphäre und vor allem Silke Nuber, Thomas Franck und Martina Zimmermann für die netten Gespräche und die gute Zusammenarbeit.

Für die nette und auch lustige Arbeitsatmosphäre in unserem Büro danke ich Dr. Andreas Dufke, Dr. Ute Grasshoff, Dr. Hoa Nguyen und natürlich Dr. Kathrin Grundmann, die immer hilfsbereit war und ein offenes Ohr hatte!

Oliver Schneider danke ich für eine exzellente Betreuung während der Diplomarbeit. Mit seinem vermittelten Wissen habe ich mich für den Beginn der Doktorarbeit gut gerüstet gefühlt.

Meinem Verlobten Matthias Härle danke ich dafür, dass er mir immer mit Verständnis und Geduld zur Seite stand und mich vor allem am Ende meiner Arbeit besonders unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines Studiums immer unterstützt hat und immer für mich da war. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Kongressen präsentiert:

Vorträge:

Charakterisierung 14-3-3zeta homologer Gene und deren Bedeutung für die Parkinson'sche Erkrankung.

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Düsseldorf 10/2004

(Einladung zum Vortrag aufgrund des 2003 verliehenen Posterpreises)

Poster:

Simone Mosbacher, Carsten Holzmann, Kristin Hermann, Norbert Schwarz, Rejko Krüger, Michael Bonin und Olaf Rieß

Functional analysis of mutations in 14-3-3zeta homologous genes and its relation to Parkinson's disease

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Hamburg 9/2003

(das Poster wurde mit einem Preis ausgezeichnet)

Simone Mosbacher, Carsten Holzmann, Kristin Hermann, Norbert Schwarz, Rejko Krüger, und Olaf Rieß

14-3-3zeta homologous genes: Possible impact on Parkinson's disease?

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Berlin 3/2004

Simone Mosbacher, Carsten Holzmann, Kristin Hermann, Norbert Schwarz, Rejko Krüger, Tohru Ichimura und Olaf Rieß

Charakterisierung 14-3-3zeta homologer Gene und deren Bedeutung für die Parkinson'sche Erkrankung

Tagung der Deutschen Parkinson-Gesellschaft, Frankfurt 3/2005

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA)
cM	Zentimorgan
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium (Medium für Zellkultur)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Komplexbildner)
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
kb	Kilobasen
LB	Luria broth
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Morbus Parkinson
SDS	Natrium-dodecylsulfat (Anionisches Detergenz)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSCP	Single-Strand-Conformation Polymorphism
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Enzym	Enzym aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxyethyl-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Beta-D-galactosid
YPD	Yeast-Peptide-Dextrose

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Prävalenz und Symptomatik der Parkinson'schen Erkrankung	1
1.1.1	Prävalenz	1
1.1.2	Symptomatik der Parkinson'schen Erkrankung	2
1.2	Neuropathologie der Parkinson'schen Erkrankung.....	4
1.3	Neurodegenerative Prozesse der Parkinson'schen Erkrankung	6
1.3.1	Umweltfaktoren	7
1.3.2	Autotoxizität des Transmitters Dopamin.....	8
1.3.3	Oxidativer Stress und Neurodegeneration.....	8
1.3.4	Mitochondriale Dysfunktionen.....	10
1.3.5	Proteinanhäufungen und Neurodegeneration	11
1.3.6	Genetische Faktoren	13
	PARK1 und PARK4- <i>α</i> -Synuklein.....	15
	PARK2- <i>Parkin</i>	16
	PARK3	17
	PARK5- <i>UCH-L1</i>	17
	PARK6- <i>PINK1</i>	18
	PARK7- <i>DJ-1</i>	19
	PARK8- <i>LRRK-2</i>	19
	PARK9	20
	PARK10	20
1.3.7	Das 14-3-3 Gen als Kandidatengene für die Parkinson'sche Erkrankung	23
1.4	Zielsetzung der Arbeit	30
2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	Material.....	32
2.1.1	Chemikalien und Bioreagenzien.....	32
2.1.2	Primer für die Erzeugung von 14-3-3zeta-like Konstrukten mit Schnittstellen für die jeweiligen Vektoren.....	34
2.1.3	Plasmide.....	36
2.1.4	Kits und Reagenziensysteme	37
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	38
2.1.6	Geräte.....	38
2.1.7	Lösungen und Puffer	39
2.2	Methoden.....	44
2.2.1	Methoden für das Arbeiten mit Bakterien	44
2.2.2	Methoden für das Arbeiten mit Hefen	48
2.2.3	Methoden für das Arbeiten mit Zellen	49
2.2.4	Molekulargenetische Methoden	56
2.2.5	Biochemische Methoden	62

3	ERGEBNISSE	69
3.1	14-3-3 Proteine als Kandidatengene für die Parkinson'schen Erkrankung.....	69
3.1.1	Zusammenfassung	72
3.2	Erzeugung von 14-3-3zeta-like Fusionsproteinen	73
3.2.1	Herstellung eines 14-3-3zeta-like-GST- Fusionsproteins für die Proteinisolierung aus prokaryontischen Zellen.....	73
3.2.2	Herstellung eines fluoreszierenden 14-3-3zeta-like-EGFP-Fusionsproteins für Zellkulturexperimente	75
3.2.3	Herstellung eines 14-3-3zeta-like-His- Fusionsproteins für die Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen und Protein-Protein-Interaktions-Versuche	77
3.2.4	Klonierung in Yeast-two Hybrid-Vektoren für die Expression von 14-3-3zeta-like in Hefezellen zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktions-Versuche.....	79
3.3	Funktionelle Charakterisierung.....	81
3.3.1	Zelluläre Lokalisation von 14-3-3zeta-like und Aggresomenbildung.....	82
3.3.2	Charakterisierung der Aggresomen und Analyse ihrer Bestandteile.....	83
3.3.3	Zentralisierung der Mitochondrien und der Lysosomen um die Aggresomen	89
3.3.4	Der Abbauweg des 14-3-3zeta-like Proteins	90
3.3.5	Zunahme der Aggresomenbilung unter zellulärem Stress.....	92
3.3.6	Die Chaperon-Funktion von 14-3-3zeta-like.....	93
3.3.7	Zusammenfassung der funktionellen Charakterisierung	96
3.4	Zell-Stress-Experimente	97
3.4.1	Zytotoxizitätsversuche und Proliferationstests mit 14-3-3zeta-like Zellen.....	97
3.4.2	Zusammenfassung der Zytotoxizitätsversuche.....	102
3.5	Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like.....	103
3.5.1	Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Ataxin-3	103
3.5.2	Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und α -Synuklein, Synphilin-1 und Periphilin	106
3.5.3	Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Tyrosin-Hydroxylase	109
3.5.4	Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Raf-1	112
3.5.5	Zusammenfassung der Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like.....	114
4	DISKUSSION	115
4.1	Genetik der Parkinson'schen Erkrankung.....	115
4.2	14-3-3 Proteine als Kandidatengene für die Parkinson'schen Erkrankung.....	117
4.2.1	Funktionelle Charakterisierung	119
4.2.2	Zell-Stress-Experimente	129
4.2.3	Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like.....	131
4.2.4	Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick.....	136
5	ZUSAMMENFASSUNG	139
6	LITERATURVERZEICHNIS	140
7	LEBENS LAUF	161

1 EINLEITUNG

1.1 Prävalenz und Symptomatik der Parkinson'schen Erkrankung

Die Parkinson'sche Erkrankung ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, die bevorzugt im höheren Lebensalter auftritt (de Rijk *et al.* 1997). Diese tödliche Erkrankung, die bis heute nicht geheilt werden kann, zeichnet sich durch die Kardinalsymptome Bradykinese (Bewegungsverlangsamung), Tremor (niederfrequentes Muskelzittern) und Rigor (Muskelsteifigkeit) aus und verdankt ihren Namen ihrem Erstbeschreiber Dr. James Parkinson.

Der Morbus Parkinson ist eine progrediente Erkrankung. Während zu Beginn nur leichte Symptome, wie zum Beispiel ein einseitig beschränkter Ruhetremor, auftreten, führt der Verlauf der Erkrankung bis zu einem Stadium, in dem der Patient sich nicht mehr selbst versorgen kann, bettlägerig wird und auf Hilfe angewiesen ist, bis er letztendlich verstirbt. Die neuropathologische Grundlage dieser Symptome ist ein zunehmender Verlust der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra* (Gibb 1992). Für die Ursache des Zelltods gibt es zwar viele Hypothesen, jedoch auch unzählige Fragen, denn bisher konnte noch kein alleiniger Auslöser der Erkrankung gefunden werden. Somit ist die Ätiologie des Parkinson-Syndroms noch weitgehend ungeklärt, man macht jedoch zunehmend ein Zusammenspiel von Umwelt- und genetischen Faktoren dafür verantwortlich (McCall *et al.* 2001). Das idiopathische Parkinson-Syndrom, welches 80-90 % aller Parkinson-Syndrome ausmacht, ist vom sekundären oder symptomatischen Parkinson-Syndrom zu trennen. Beim sekundären Parkinson-Syndrom unterscheidet man zum Beispiel das toxisch bedingte Parkinson-Syndrom, welches durch Mangan-, Kohlenmonoxid-, Methanol-Vergiftungen oder verunreinigte, synthetische Drogen hervorgerufen wird, vom hirnarteriosklerotische Parkinson-Syndrom, welches bei einer Zerebralsklerose auftritt, oder dem postenzephalitisches Parkinson-Syndrom nach einer Enzephalitis lethargica (Davis und Adair 1999, Gillespie *et al.* 1999, Kuopio *et al.* 1999, McCall *et al.* 2001).

1.1.1 Prävalenz

Das idiopathische Parkinson-Syndrom ist nach der Alzheimer-Erkrankung die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Mit Ausnahme der hereditären Form der Erkrankung beträgt

das mittlere Erkrankungsalter 55-60 Jahre (Dekker *et al.* 2003). Während die Prävalenz bei den 65-69-Jährigen noch bei 0,6 % liegt (Bild 1-1), steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter auf bis zu 3,5 % bei den 85-89-Jährigen an (de Rijk *et al.* 1997). In Deutschland ist von ca. 250000 Parkinson-Patienten auszugehen. Die Dunkelziffer geht jedoch von weiteren 100000 Patienten aus (Jost 2005).

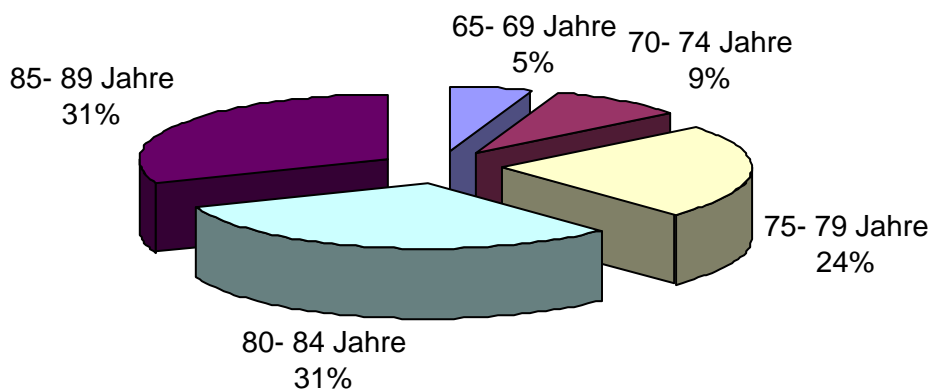


Bild 1-1 Altersverteilung unter den Parkinson-Patienten. Vorwiegend erkranken Menschen des höheren Alters an der Parkinson'schen Erkrankung, aber auch jüngere Menschen sind betroffen.

1.1.2 Symptomatik der Parkinson'schen Erkrankung

Bereits in alten Schriften (100 -1500 v. Chr.) finden sich Beschreibungen einer Krankheit mit Zittern der Hände, körperlicher Steifheit und Verlust der Beweglichkeit. Auch den Ärzten der Antike waren solche Krankheitsfälle schon bekannt (Henningsen 1983). Die genaue klinische Beschreibung der Kardinalsymptome gelang jedoch erst 1817 dem englische Arzt James Parkinson in seinem "*Essay on the shaking palsy*". James Parkinson beschrieb neben den typischen Symptomen Bradykinese (Bewegungsverlangsamung), Tremor (niederfrequentes Muskelzittern) und Rigor (Muskelsteifigkeit) auch den Verlauf dieser Erkrankung, die bis heute nicht geheilt werden kann. Alle therapeutischen Maßnahmen zielen auch heute noch auf eine Kompensation der Symptomatik ab, um dem Patienten so lange wie möglich eine selbständige Lebensführung zu ermöglichen (Jost 2005, Shults 2003).

Das Krankheitsbild ist geprägt von den Kardinalsymptomen: Bradykinese, Tremor, Rigor und einer Haltungsinstabilität. Minimalkriterien für die Diagnosestellung des Morbus Parkinson sind das Vorhandensein der zwei Kardinalsymptome Bradykinese und Rigor. Tremor und

Haltungsinstabilität können hinzutreten, müssen jedoch nicht notwendigerweise vorhanden sein (Colcher und Simuni 1999).

Die Bradykinese stellt das wichtigste Symptom der Parkinson'schen Erkrankung dar. Neben der zunehmenden Verlangsamung der Bewegung treten auch ein Fehlen von Spontan- und Willkürbewegungen und eine Verminderung der Sprechmodulation und der Mimik auf. Charakteristisch ist ebenfalls eine Beeinträchtigung feinmotorischer Tätigkeiten der Hand, vor allem bei repetitiven Bewegungen. Am deutlichsten zeigt sich die Bradykinese jedoch in einer Störung des Gangbildes. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung kann der Impuls, eine bestimmte Bewegung oder einen Bewegungsablauf auszuführen, erst nach längerer Anlaufzeit verwirklicht werden. Somit ist die Ausführung des ersten Schrittes, das Wenden auf der Stelle, eine Richtungsänderung während des Gehens oder gar das Anhalten der Bewegung erschwert. Diese Verlangsamung der Bewegungen (Bradykinese) führt schließlich bis zur vollständigen Bewegungsunfähigkeit (Akinese) (Colcher und Simuni 1999).

Das Kardinalsymptom Rigor stellt eine Tonuserhöhung der Muskulatur dar. Durch diesen erhöhten Muskeltonus befindet sich die Muskulatur in einem oft schmerzhaften Spannungszustand. Von den Betroffenen wird die zunehmende Versteifung des Körpers ähnlich einer Lähmung wahrgenommen, da kontrollierte Bewegungen immer schwerer werden, obwohl genau das Gegenteil der Fall ist. Die Kraft bleibt uneingeschränkt erhalten, nur der Ablauf der Bewegung verlangsamt sich und wird schwerer (Colcher und Simuni 1999).

Wie bereits erwähnt kann neben den Kardinalsymptomen Bradykinese und Rigor auch ein Ruhetremor auftreten. Dieser entsteht durch rhythmisch alternierende Aktivierung von Agonisten und Antagonisten. Gerade zu Beginn ist meist ausschließlich oder verstärkt nur eine Körperseite vom Tremor betroffen und die Arme meist stärker als die Beine. Der typische Parkinsontremor ist mit 3-6 Hertz niederfrequent und wird im Schlaf oder bei gezielten Bewegungen gehemmt (Colcher und Simuni 1999).

Neben den Kardinalsymptomen leiden die Patienten vielfach auch unter vegetativen und psychischen Störungen sowie Schmerzen infolge der Muskelverspannungen. Während die geistigen Fähigkeiten und die Intelligenz erhalten bleiben, sind eine verminderte Konzentrationsfähigkeit und eine Verlangsamung der Gedankengänge zu verzeichnen. Im späteren Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch bei etwa 40 % der Parkinson-Patienten zum Auftreten einer Demenz (Gibb und Lees 1989, Gibb 1992).

1.2 Neuropathologie der Parkinson'schen Erkrankung

Die kardinale pathogene Veränderung beim Morbus Parkinson ist eine Degeneration der von der *Substantia nigra pars compacta* zum *Corpus striatum* ziehenden dopaminergen Neurone. Pathologisch-anatomisches Zeichen des Zelluntergangs ist die Depigmentierung der *Substantia nigra*: Mit den dopaminergen Neuronen verschwindet das in ihnen enthaltene Pigment Neuromelanin, das aus oxidativen Abbauprodukten von Dopamin entsteht und dem die *Substantia nigra* ihren Namen verdankt (Bild 1-2).

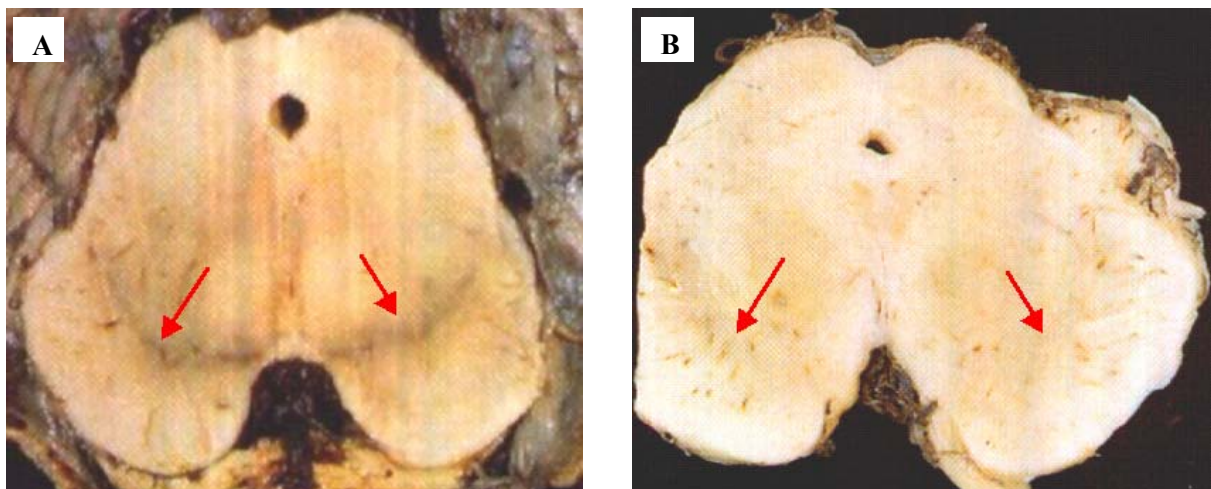


Bild 1-2 Zelluntergang der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra* (Jost 2005)

A Normalperson mit deutlicher Pigmentierung der *Substantia nigra*

B Parkinson Patient mit deutlich verblasster *Substantia nigra*

Beim Auftreten der ersten klinischen Symptome sind bereits 60-80 % der dopaminergen Zellen abgestorben (Fearnley und Lees 1991). Der Dopaminmangel kann lange Zeit durch eine vermehrte Dopaminsynthese und wahrscheinlich auch durch eine erhöhte Empfindlichkeit postsynaptischer Dopaminsynapsen im *Striatum* kompensiert werden, so dass die Neurotransmission aufrechterhalten wird. Man geht von einer vier bis fünf jährigen präklinischen Phase aus (Bild 1-3), in der die striatale Dopamin-Funktion bis zur kritischen Schwelle der Symptomausprägung progressiv abnimmt (Brooks 1998).

Bei einer physiologischen Degeneration bleibt man, bei der heutigen durchschnittlichen Lebenserwartung, von Parkinson-Symptomen verschont. Führen jedoch das Zusammenspiel von exogenen und genetischen Faktoren zur Unterschreitung der kritischen Schwelle bereits in früheren Jahren, so kommt es zum Dopamin-Mangel und zum Auftreten der parkinsontypischen Symptome (McGeer *et al.* 1988).

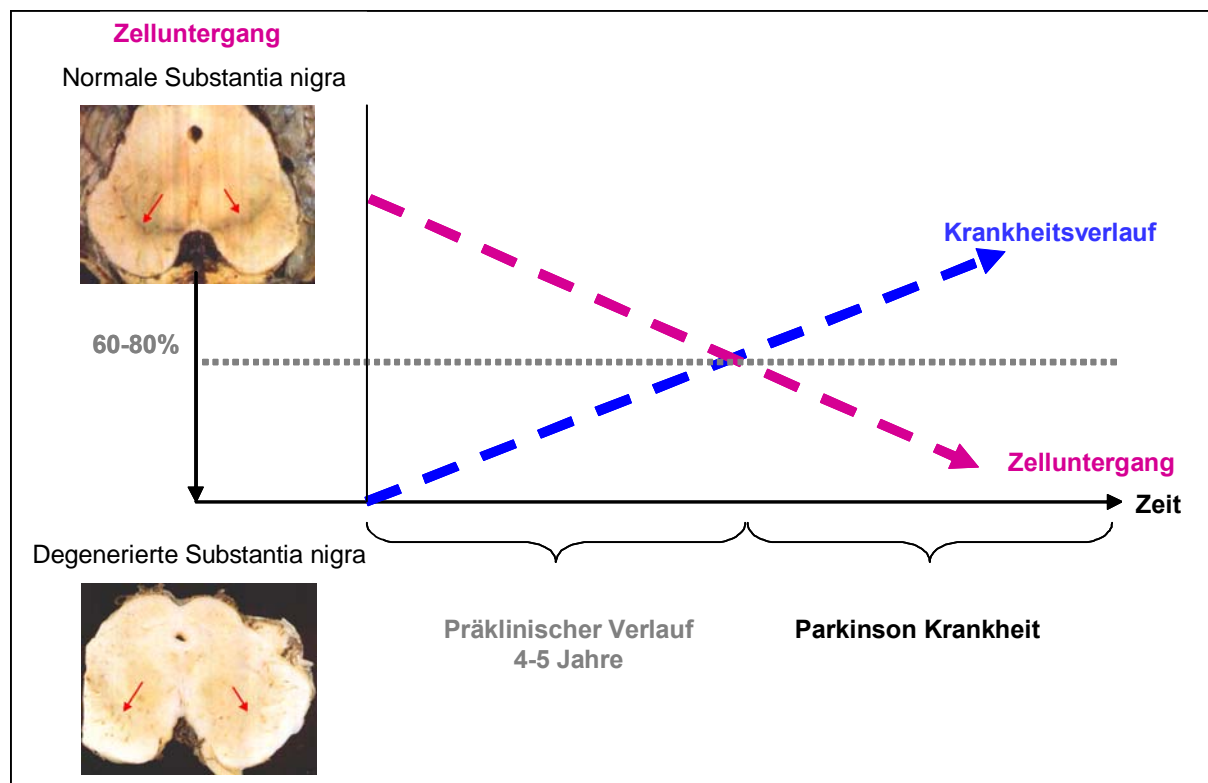


Bild 1-3 Fortschreiten des Zelltods in Korrelation mit der Stärke des Krankheitsverlaufs.

In einer präklinischen Phase von vier bis fünf Jahren kann der Dopaminmangel durch eine vermehrte Dopaminsynthese und durch eine erhöhte Empfindlichkeit postsynaptischer Dopaminsynapsen im *Striatum* kompensiert werden, so dass die Neurotransmission aufrechterhalten wird. Sind bereits 60-80 % der dopaminergen Neuronen abgestorben ist die kritische Schwelle der Symptomausprägung unterschritten und es kommt zum Krankheitsausbruch.

Eine medikamentöse Therapie zielt auf eine Erhöhung des Dopamin-Spiegels im Gehirn zur Kompensation des Dopamin-Mangels und auf eine vorübergehende, teilweise Wiederherstellung des Transmittergleichgewichts im Gehirn ab (Jost 2005). Da der Untergang der dopaminergen Neurone nicht verhindert werden kann, ist medikamentös lediglich eine Linderung der Symptome möglich.

Ein zweites pathologisch-anatomisches Merkmal ist das Auftreten von Lewy-Körperchen (Bild 1-5 und Bild 3-3), eosinophiler, zytoplasmatischer Einschlüsse, in den zugrunde gehenden Neuronen der *Substantia nigra*, des *Locus coeruleus*, des dorsalen *Vagus*kerns und anderer Kerngebiete (Gibb und Lees 1988). Die Degeneration der Neuronen im *Locus coeruleus* und im dorsalen *Vagus*kern ist vor allem für die vegetativen Störungen

verantwortlich, da diese Kerne die sympathische und parasympatische Steuerung des Herz-Kreislaufsystems, der Atmungsorgane sowie des Verdauungs-, Harn- und Geschlechtstraktes beeinflussen (Gibb und Lees 1988).

Die klinische Symptomatik lässt sich mit der Degeneration dopaminerger Neurone vereinbaren, betrachtet man die Modulation der pyramidalen Motorik durch die extrapyramidale Basalganglienschleife näher. Der Dopaminmangel beim Morbus Parkinson enthemmt die cholinergen Interneurone, was zu einem Ungleichgewicht zwischen dopaminerger und cholinerg Neurotransmission führt und hemmt die GABAergen Neurone im *Thalamus*, wodurch die Filterfunktion des Thalamus für sensomotorische Meldungen aus der Körperperipherie pathologisch verstärkt wird (Gibb 1992). Vereinfacht kann man somit die überreaktiven Symptome wie z.B. der Tremor als Ursache des cholinergen Transmitterübergewichts sehen. Das akinetische Symptom ist eher auf die fehlende Reizweiterleitung aufgrund des Zelluntergangs zurückzuführen (Gibb 1992).

1.3 Neurodegenerative Prozesse der Parkinson'schen Erkrankung

Für die selektive Degeneration der neuromelaninhaltigen, dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* gibt es mehrere Hypothesen. Mehrere Faktoren sind bekannt, die jeder für sich eine Neurodegeneration auslösen können, jedoch konnte bisher keiner davon ausschließlich kausal mit der Ätiopathogenese der Parkinson'schen Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Vielmehr scheint der Prozess der Degeneration multifaktoriell bedingt zu sein (Shastry 2001).

Der normale Alterungsprozess des menschlichen Gehirns geht mit einem progressiven Untergang nigrostriataler Neuronen einher, der allerdings beim Morbus Parkinson altersabhängig und exponentiell zunimmt. Ein Zusammenspiel vieler Faktoren wird als Ursache dieser Krankheit gesehen: Autotoxizität des Dopamins, oxidativer Stress, verstärkte Eisenablagerung in der *Substantia nigra*, verringerte Ferritin- und Glutathion-Mengen, Defekte in der mitochondrialen Atmungskette, vermehrte Proteinablagerungen, Umwelt- und genetische Faktoren (Shastry 2001, McCall *et al.* 2001, Olanow und Tatton 1999, Dekker 2003).

1.3.1 Umweltfaktoren

Bisher wirft die Ätiologie der Parkinson'schen Erkrankung noch viele Fragen auf und zahlreiche Faktoren scheinen eine Rolle bei der Entwicklung der Erkrankung zu spielen. Mehrfach wurde in Studien gezeigt, dass die chronische Exposition mit alltäglichen Pestiziden die neurochemischen Verhaltens- und neuropathologischen Merkmale der Parkinson'schen Erkrankung hervorrufen können (Olanow und Tatton 1999). Zu den Umweltschadstoffen, die zur Entstehung eines Parkinson-Syndroms beitragen können, zählen Kohlenmonoxid, Mangan, Zyanide und Schwermetalle wie Blei oder bestimmte Insektizide (Paraquat, Diquat) (Olanow und Tatton 1999).

Viele epidemiologische Studien basieren auf der Prävalenz des Morbus Parkinson in einer Bevölkerungsgruppe, die bestimmten Umweltfaktoren ausgesetzt ist. Diesen Studien liefern meist kontroverse Ergebnisse, eventuell aufgrund der unterschiedlichen Methoden der Gruppenbildung und der Analyse der Daten. Eine von Nuti *et al.* 2004 publizierte Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, Umweltfaktoren, die in Relation mit der Parkinson'schen Erkrankung stehen könnten, zu analysieren. Es wurde ein gut definierter geografischer Bereich in Tuscany/Italien für die Studie ausgewählt, jedoch konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen Parkinson-Patienten und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Da also andere Personenkreise, die diesen Stoffen ebenfalls ausgesetzt waren, nicht ebenso häufig an Parkinson erkrankt sind, konnten die bisher unter Verdacht stehenden Umweltgifte nicht als alleinige Auslöser der Parkinsonkrankheit identifiziert werden. Für Umwelteinflüsse gilt daher am ehesten, wie für viele mögliche Ursachen, dass das Zusammentreffen mehrerer Faktoren zum Ausbruch der Krankheit führt.

Unumstritten jedoch bleibt, dass es einzelne Stoffe gibt, die Parkinson ähnliche Symptome auslösen. So führt zum Beispiel der Komplex I-Inhibitor 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion (MPP+) zu einer parkinsonähnlichen Symptomatik (Dawson und Dawson *et al.* 2003). MPP+ entsteht nach der Injektion von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) verunreinigten synthetischen Drogen. Diese Substanz wird auch häufig für Tiermodelle der Parkinson'schen Erkrankung eingesetzt (Gille *et al.* 2004, Nagatsu 1990, Przedborski *et al.* 1996).

1.3.2 Autotoxizität des Transmitters Dopamin

Eine Hypothese zur Erklärung der Degeneration der dopaminergen Neurone ist die Autotoxizität des Transmitters Dopamin. Im ersten Schritt des Dopaminabbaus entsteht unter Katalyse der Monoaminoxidase neben 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd auch Wasserstoffperoxid, aus dem sich dann das Hydroxylradikal OH^\cdot bilden kann (Yu 2005, Haavik und Toska 1998, Ogawa und Mori 1995). Das in den dopaminergen Neuronen enthaltenen Pigment Neuromelanin wirkt als Redoxpolymer und begünstigt die Entstehung von OH^\cdot . Dieses Hydroxylradikal, mit seinen stark zytotoxischen Eigenschaften, ist das eigentlich schädliche Agens dieser Theorie und man nimmt an, dass seine Entstehung bei Parkinson-Patienten begünstigt wird, da vermutet wird, dass eine geringere Menge an Wasserstoffperoxid entgiftenden Enzyme in der *Substantia nigra* bei Parkinson-Patienten vorliegt (Olanow und Tatton 1999).

1.3.3 Oxidativer Stress und Neurodegeneration

Bei der Reduktion des Sauerstoffs entstehen unvollständig reduzierte, reaktive Sauerstoffmoleküle. Diese können lebensnotwendige Moleküle und Strukturen der Zelle (z.B. DNA, Proteine, Lipide) irreversibel schädigen. Diese wird auch als oxidativer Stress bezeichnet. Reaktive Sauerstoffspezies gelten inzwischen als Hauptauslöser für die Alterung von Organismen und als Auslöser für eine Reihe von Krankheiten. Nach Ashok und Ali (1999) gibt es mehr als 300 Theorien, die das Phänomen des Alterns zu klären versuchen. Die populärste ist die sogenannte „Freie Radikaltheorie des Alterns“, die das Auftreten von freien Radikalen in aeroben Organismen und die von ihnen ausgelösten Schäden für den Alterungsprozess verantwortlich macht. Gleichzeitig wird vermutet, dass viele Krankheiten, die im fortgeschrittenen Alter auftreten, wie z.B. Atherosklerose, Alzheimer-Krankheit, Parkinson'schen Erkrankung und rheumatische Arthritis, auf die Wirkung von Sauerstoffradikalen zurückzuführen sind (Bast und Goris, 1989, Davies 1995, Forsberg *et al.* 2001, Sayre *et al.* 2001, Warner 1994).

Man nimmt als Entstehungstheorie für die neurotoxischen Vorgänge ein Ungleichgewicht in der Bildung von toxischen Radikalen und Detoxikationsmechanismen an (De Haan *et al.* 2003, Olanow 1993, Halliwell 2001). Das Gehirn ist besonders anfällig für oxidativen Stress.

Da im Versuchsaufbau der Arbeit mehrfach mit oxidativen Stressoren gearbeitet wird, soll diese Sonderstellung des Gehirns im folgenden Abschnitt näher analysiert werden.

Die Anfälligkeit des Gehirns für oxidativen Stress

Oxidativer Stress kann als Ungleichgewicht zwischen Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies gesehen werden. Sowohl akuter als auch chronischer oxidativer Stress hat eine Bedeutung bei der Entstehung degenerativer Erkrankungen und betrifft viele physiologische Funktionen, wie z.B. bei der Entstehung von Atherosklerose, Diabetes, inflammatorische Erkrankungen (Rheumatische Arthritis und Pankreatitis), Krebs, neurologische Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson), Bluthochdruck, Atemwegserkrankungen und Blutbilderkrankungen (Halliwell und Gutteridge 1989, Maxwell 1995, Opara 2004).

Es gibt mehrere Anzeichen dafür, dass das Gehirn für oxidativen Stress anfälliger ist als andere Organe:

- Das Gehirn benötigt für die Energiegewinnung 1/5 des aufgenommenen Sauerstoffs, auch wenn es selbst nur 2 % des Körpergewichts ausmacht. Somit fallen im Gehirn wesentlich höhere Mengen an reaktiver Sauerstoffspezies an und es sind höhere Anforderungen an die Entgiftungssysteme gestellt um oxidativen Stress zu vermeiden (Halliwell 2001).
 - Die Zerebrospinalflüssigkeit enthält niedermolekulares Eisen und Kupfer, welches die Bildung von Hydroxylradikalen katalysiert. Normalerweise werden diese Moleküle von den Antioxidantien Transferin und Ceruloplasmin gebunden, jedoch ist die Konzentration dieser Antioxidantien in der Zerebrospinalflüssigkeit niedrig (Halliwell und Gutteridge 1992, Smith *et al.* 1997).
 - Die Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat induziert eine Kaskade von Reaktionen im postsynaptischen Neuron und führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Abhängig von der Dichte dieser Neuronen kann es zu lokalen Läsionen im Nervensystem kommen (Coyle und Puttfarcken 1993).
 - Aufgrund der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Oxidation von Dopamin durch die Monoaminoxidase wird vermutet, dass die Nervenendigungen dopaminerger Neurone vermehrt reaktive Sauerstoffspezies kompensieren müssen.
-

Demzufolge wären Gehirnregionen wie die *Substantia nigra* mit einer hoher Zelldichte an dopaminergem Neurone besonders anfällig für oxidativen Stress (Halliwell 2001).

- Betrachtet man die enzymatisch-antioxidativen Mechanismen einzelner Organe zum Schutz der Zellen vor einem Ungleichgewicht zwischen Entstehung und Elimination von reaktiven Sauerstoffmetaboliten fallen Unterschiede auf. Verglichen mit der Leber enthält das Gehirn keine Katalasen, weniger Glutathionperoxidasen und weniger Vitamin E (Behl 1999, Kayanoki *et al.* 1996, De Haan *et al.* 2003).
- Die Konzentration der Antioxidantie Melatonin sinkt mit dem Alter markant (Srinivasan *et al.* 2005, Burkhardt *et al.* 2001).
- Die Schäden durch reaktive Sauerstoffmetabolite addieren sich über die Zeit, da die Neurone im Gehirn nicht erneuert werden. Dies ist wohl das bedeutendste Argument im Vergleich der Zellschutzmechanismen einzelner Organe und zeigt besonders deutlich die Sonderstellung und die Anfälligkeit des Gehirns gegenüber oxidativem Stress (Halliwell 2001, Olanow 1993).

Somit wird deutlich, dass oxidativer Stress im Gehirn eine besonders schädigenden Wirkung auf die Zellen besitzt und somit eine wichtige Rolle bei der Degeneration von Neuronen spielt.

1.3.4 Mitochondriale Dysfunktionen

In der Zelle wird 95 % des molekularen Sauerstoffs in der Atmungskette verbraucht. Die Atmungskette findet in der inneren Membran der Mitochondrien statt. Dabei entsteht durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff ATP und Wasser. Jedoch werden etwa 1-2 % Sauerstoffs nicht vollständig reduziert, so dass es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten kommt.

Es gibt mehrere Hinweise für eine Fehlfunktion der Mitochondrien als Ursache für eine Neurodegeneration. An der Atmungskette sind die Enzymkomplexe I-IV, Ubichinon (Coenzym Q) und die ATP-Synthase beteiligt, die in die innere Mitochondrienmembran eingelagert sind. Der Komplex I-Inhibitor MPP⁺ führt zu einer parkinsonähnlichen Symptomatik (Dawson und Dawson 2003). Eine mitochondrielle Dysfunktion ist besonders

dramatisch für postmitotische Zellen wie den Neuronen, die den größten Teil ihrer Energie aus dem mitochondrialen Elektronentransport nehmen (Jellinger, 2003).

Konsequente mitochondrielle Dysfunktionen und Mutationen in der mitochondrialen DNA können zu erhöhtem oxidativem Stress und zum Zelltod führen (Jordan *et al.* 2003). Da die mitochondrielle H₂O₂ und O₂-Produktion mit zunehmendem Alter steigt kommt es zu einer Zunahme des oxidativen Stresses für die Zelle und führt zu Zell-Schäden (Sohal *et al.* 1994). Diese oxidativen Schädigungen im Gehirn konnte in Postmortemstudien von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Tritschler *et al.* 1995). Somit könnten mitochondrielle Dysfunktion, oxidativer Stress und ein verminderter Metabolismus die gemeinsame Grundlage verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen sein (Jordan *et al.* 2003).

1.3.5 Proteinanhäufungen und Neurodegeneration

Ein gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen ist die Aggregation und Ablagerung von Proteinen im Gehirn (Tabner *et al.* 2005, Gandhi und Wood 2005). Viele, wenn nicht gar alle, neurodegenerativen Erkrankungen zeichnen sich durch Proteinaggregate oder Proteineinschlüsse aus. Dies schließt die Prionen-Protein Plaques bei Prionen-Erkrankungen, die amyloiden Plaques und neurofibrilläre Tangles bei der Alzheimer-Erkrankung, Lewy-Körperchen bei der Parkinson'schen Erkrankung und der Demenz mit Lewy-Körperchen, neuronale Einschlüsse bei den Poly-Glutamin-Erkrankungen wie der Huntington-Erkrankung, der spinocerebellären Ataxie, der amyotrophen Lateralsklerose, der frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus und andere neurodegenerativen Erkrankungen mit ein (Chung *et al.* 2001, Sherman und Goldberg 2001).

Allerdings gibt es bei den Proteinanhäufungen Unterschiede in den Merkmalen und der Lokalisation: Amyloide Plaques, wie sie bei der Alzheimer-Erkrankung vorkommen, sind extrazellulär lokalisiert, während Lewy-Körperchen zytoplasmatisch sind und die Einschlüsse bei den Poly-Glutamin-Erkrankungen meist intranukleär vorkommen (Chung *et al.* 2001).

Ob die Bildung dieser Proteinanhäufungen protektiv für die Zelle ist oder gar den eigentlichen Grund für den Untergang der Zellen darstellt, wird kontrovers diskutiert (Chung *et al.* 2001, Bence *et al.* 2001, Taylor *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 2004). Derzeit wird jedoch die Isolierung von Protein in Form von Aggregaten als Schutzmechanismus der Zelle gesehen, wenn der Abbau von überschüssigem oder fehlgefaltetem Protein nicht mehr möglich ist (Tanaka *et al.* 2004). Für diese Situation der erhöhten Proteinanhäufung kann es zwei Gründe geben: erstens

eine größere Gesamtmenge an Protein oder zweitens mehr fehlgefaltete Proteine fallen in der Zelle an und können von den proteinabbauenden Systemen nur noch unzureichend abgebaut werden. Ebenfalls denkbar wäre auch, dass das System für den Proteinabbau in der Zelle defekt ist und somit die normal im Zellzyklus anfallenden Proteine nicht mehr abgebaut werden können. Zusätzlich wäre eine Kombination aus beiden Ursachen, erhöhte Mengen an abzubauenem Protein kombiniert mit einer Defizienz der proteinabbauenden Systeme, denkbar (Johnston *et al.* 1998).

Fehlgefaltete Proteine, das heißt Proteine deren Tertiär-Struktur nicht oder fehlerhaft ausgebildet ist, sind nicht in der Lage ihre vorgesehene Funktion zu erfüllen und müssen von der Zelle abgebaut oder isoliert werden (Johnston *et al.* 1998). Chaperone sind Proteine, die von der Zelle als Schutzmechanismus hergestellt werden, um die korrekte Faltung von Proteinen zu fördern und eine Aggregation und Elimination der Proteine zu verhindern (Sakahira *et al.* 2002). Ist die Fehlfaltung nicht mehr zu beheben, muss das Protein abgebaut werden.

Das wichtigste System für den Proteinabbau ist das Ubiquitin-Proteasomen System. Soll ein Protein über das Proteasom abgebaut werden, wird es zunächst durch eine kovalente Bindung von Polyubiquitin-Ketten mit Hilfe einer E3-Ligase für den Abbau markiert (Pickart 2001). Drei Enzymklassen, E1, E2 und E3, sind für die Ubiquitin-Markierung eines Proteins notwendig. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 aktiviert die Ubiquitin Monomere in einer ATP-anhängigen Reaktion. Das so aktivierte Ubiquitin wird auf das Ubiquitin-aktivierende Enzym E2 übertragen und mit Hilfe der E3-Ligase kovalent an das abzubauen Protein gebunden. Anschließend werden die Ubiquitin-Monomere zu Polyubiquitin-Ketten vervollständigt und das ubiquitinierte Protein über das 26S Proteasom abgebaut. Es sind mehrere hundert E3-Enzyme und mehr als 20 E2-Enzyme, aber nur ein E1 Enzym bei Säugerzellen gefunden worden. Auf diese Weise vermittelt ein E3-Enzym spezifisch die Ubiquitinierung von nur einem oder sehr wenigen Proteinen (Pickart 2001).

Bei allen bisher identifizierten Genloci des familiären Parkinsons sind Proteine betroffen, die mit der Proteinaggregation bzw. der Verhinderung der Aggregation und des Proteinabbaus im Zusammenhang stehen (Chung *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 2004, Kitada *et al.* 1998, Leroy *et al.* 1998). Die identifizierten Genloci werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.3.6 Genetische Faktoren

Die Rolle der Genetik in der Parkinson'schen Erkrankung wurde jahrzehntelang diskutiert. Etliche Familien mit mendelndem Vererbungsmuster wurden bereits detailliert beschrieben, jedoch ohne wirklichen Beweis für eine genetische Grundlage der Parkinson'schen Erkrankung. Schon früh war auffällig, dass Verwandte von Parkinson-Patienten häufiger von der Parkinson'schen Erkrankung betroffen waren. Während in der Zwillingsstudie von Duvoisin 1981 und deren Folgestudien keine signifikanten Unterschiede in der Konkordanz der Parkinson'schen Erkrankung beim Vergleich von monozygoten und dizygoten Zwillingen festgestellt werden konnte, lieferte die Studie von Piccini 1999 bereits eine signifikant erhöhte Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen. Mit dieser Studie und der Entdeckung des ersten parkinsonassoziierten Krankheitsgens (Polymeropoulos *et al.* 1996 und 1997) wurde somit eine genetische Ursache plausibel. Mit dem Einsatz von Kopplungsanalysen konnten inzwischen 11 Genorte lokalisiert und 6 Gene identifiziert werden, die mit der Parkinson'schen Erkrankung assoziiert sind (Tabelle 1-1). Dabei handelt es sich sowohl um autosomal rezessive wie autosomal dominante vererbte Merkmale, die zu der Erkrankung führen. Es gibt bereits zahlreiche weitere Kandidatengene und es ist anzunehmen, dass mit der steigenden Zahl von Patientenkollektiven noch weitere Gene gefunden werden, die mit der Parkinson'schen Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Gasser 2001, Hofer und Gasser 2004, Li *et al.* 2006, Farrer *et al.* 2006, Martinez *et al.* 2004, von Bohlen und Halbach *et al.* 2004). Die Entdeckung der Parkinson-Gene ergab wichtig Einblicke in die molekulare Ätiologie. Einige Parkinson-Gene verursachen Protein-Aggregationen. Nicht immer ist jedoch eine Lewy-Körperchen Pathologie vorhanden. Unabhängig, welche komplexe pathogene Zusammenhänge krankheitsauslösend waren, sie haben den gleichen klinischen Endpunkt: die Parkinson'sche Erkrankung.

Trotz des genetischen Wissens über die sehr seltenen, familiär bedingten Formen der Parkinson'schen Erkrankung ist das Wissen über die Ursache des weitaus häufigeren, idiopathischen Parkinson-Syndroms mit spätem Erkrankungsalter sehr beschränkt. Die Einblicke in die molekulare Ätiologie können jedoch auch beim Verständnis dieser Form helfen, da man von einem Zusammenwirken von genetischer Prädisposition und von Umweltfaktoren ausgeht. Somit wird das Zusammenspiel vieler Faktoren als Ursache der selektiven Degeneration der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra* gesehen: Autotoxizität des Dopamins, oxidativer Stress, verstärkte Eisenablagerung in der *Substantia*

nigra, verringerte Ferritin und Glutathion Mengen, Defekte in der mitochondriellen Atmungskette, vermehrte Proteinablagerungen, Umwelt- und genetische Prädisposition.

Tabelle 1-1: Gene und Genorte der familiären Form des Morbus Parkinson

Genort	Gen	Lokalisation und Referenz *	Erbgang	Lewy-Körperchen	Klinische Besonderheit
PARK1	<i>α-Synuklein</i>	4q21-23 (Polymeropoulos, 1996 und 1997)	AD	ja	später Beginn, Demenz, niedrige Prävalenz des Tremors, schnelle Krankheitsprogression
PARK2	<i>Parkin</i>	6q25.2-27 (Kitada, 1998)	AR	variabel	früh-juveniler Beginn, Dyskinesien/ Dystonien, langsame Progression
PARK3	unbekannt	2p13 (Gasser, 1998)	AD	ja	später Krankheitsbeginn, Demenz bei einigen Patienten
PARK4	<i>α-Synuklein</i>	4p15 (Singleton, 2003)	AD	ja	später Beginn, autonom. Dysfunktion, Demenz, Postural-Tremor bei einigen Verwandten
PARK5	UCH-L1	4q14 (Leroy, 1998)	AD	ja	später Krankheitsbeginn, nicht beschrieben
PARK6	PINK1	1p35-p36 (Valente, 2004)	AR	unbekannt	früher Beginn, langsame Krankheitsprogression
PARK7	DJ-1	1p36 (Bonifati, 2003)	AR	unbekannt	früher Krankheitsbeginn, Dystonien, Psychosen
PARK8	LRRK2	12p11.2-q13.1 (Zimprich, 2004; Nichols, 2005)	AD	ja	später Beginn, selten auch Vorderhornbeteiligung
PARK9	unbekannt	1p36 (Hampshire, 2001)	AR	unbekannt	früher Krankheitsbeginn, Spastik, Demenz, supranukleäre Blickparese
PARK10	unbekannt	1p32 (Hicks, 2002)	AD	unbekannt	später Krankheitsbeginn
PARK11	unbekannt	2p36-37 (Pankratz, 2003)	AD	unbekannt	nicht beschrieben

AD: autosomal dominant, AR: autosomal rezessiv, *Die Referenz stellt jeweils die Erstbeschreibung dar. Tabelle weiterentwickelt nach Dekker *et al.* 2003.

PARK1 und PARK4- α -Synuklein

Das α -Synuklein Gen stellt historisch gesehen einen Meilenstein in der Parkinson-Forschung dar. In einer großen Familie italienischen Ursprungs konnte 1996 erstmals ein Genort für eine autosomal dominante Form der Parkinson'schen Erkrankung kartiert werden. Somit wurde der erste wirkliche Beweis für eine familiäre Form der Parkinson'sche Erkrankung erbracht. Ein Jahr später wurde dann in der Kandidatenregion auf dem langen Arm des Chromosoms 4 eine Mutation im α -Synuklein Gen gefunden (Polymeropoulos *et al.* 1996 und 1997). Diese Mutation resultiert in einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin in Position 53 (A53T). Mittlerweile konnten zwei weitere Mutationen im α -Synuklein Gen gefunden werden, die ebenfalls zu einem Aminosäureaustausch führen: eine A30P-Mutation in einer deutschen Familie (Krüger *et al.* 1998) und eine E46K-Mutation in einer spanischen Familie (Zarranz *et al.* 2004). Zusätzlich konnte bei mehreren Familien mit autosomal dominant vererbtem Parkinson eine Triplikation des α -Synuklein Gens (Singleton *et al.* 2003) und damit verbunden eine verstärkte Proteinexpression nachgewiesen werden (Farrer *et al.* 2004). Somit scheinen also nicht nur die Mutationen, sondern auch die Expressionsstärke des Proteins eine Bedeutung bei der Neurodegeneration zu haben.

Die Funktion des α -Synuklein Proteins ist noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass das Protein an der Modulation der synaptischen Plastizität und der Regulation der dopaminergen Neurotransmission beteiligt ist. Auch gibt es die Hypothese, dass α -Synuklein und 14-3-3 Proteine als Gegenspieler regulatorisch auf die Dopaminsynthese einwirken. α -Synuklein ist ein wesentlicher Bestandteil der bei der Parkinson'schen Erkrankung gebildeten Lewy-Körperchen (Krüger *et al.* 2000). Transgene Tiermodelle konnten ebenfalls die Bedeutung des α -Synukleins in der Pathogenese der Parkinson'schen Erkrankung bestärken (Sommer *et al.* 2000, Masliah *et al.* 2000). Die Überexpression von Wildtyp- und mutiertem A30P- und A53T- α -Synuklein führte zur selektiven Degeneration dopaminergener Neurone, sowie zu progressiven, altersabhängigen Bewegungsstörungen (Feany und Bender, 2000; Masliah *et al.* 2000). Drosophila-Modelle zeigten ebenso intrazytoplasmatische α -Synuklein-haltige Proteinanhäufungen (Feany und Bender, 2000).

PARK2- *Parkin*

Kitada *et al.* konnte 1998 erstmals bei der Untersuchung einer japanischen Familie eine Deletion im *Parkin*-Gen für ein früh beginnendes, autosomal rezessiv vererbtes Parkinson-Syndrom verantwortlich machen. Als dann neben weiteren Deletionen im *Parkin*-Gen auch Duplikationen, Insertionen und Punktmutationen identifiziert werden konnten (Mata *et al.* 2004), wurde dieses Gen zum Gen mit der bisher größten klinischen Relevanz, da es bei ca. 49 % aller familiären und bei ca. 19 % aller sporadischen Parkinson-Patienten bei einem Erkrankungsalter vor dem 45. Lebensjahr (Lücking *et al.* 2000) eine Rolle spielt. Zunächst wurde die Pathogenese bei Patienten mit *Parkin*-Mutationen rein mit einem Funktionsverlust des Proteins also einer *loss of function*-Mutation in Verbindung gebracht (Kahle und Haass 2004). Jedoch zeigt sich, dass dies je nach Mutation näher analysiert werden muss. So wird die R275W-Punktmutation als *toxic gain of function*- Mutation diskutiert da eine Fehllokalisierung des Proteins zu einer verstärkten Aggregation und Accumulation des Proteins führt (Cookson *et al.* 2003).

Immunhistologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Parkin in Neuronen, Gliazellen und Blutgefäßen im menschlichen Gehirn exprimiert wird (Zarate-Lagunes *et al.* 2001).

Parkin wurde als E3-Ubiquitin-Protein Ligase identifiziert (Imai *et al.* 2000) und ist somit eine Komponente des Ubiquitin-Systems, des ATP-abhängigen Proteinabbaus (Mizuno *et al.* 2001). Substrate der E3-Ligase Parkin sind beispielsweise Synphilin-1, glykosyliertes α -Synuklein, Synaptotagmin XI, sowie α - und β -Tubulin (Chung *et al.* 2001, Shimura *et al.* 2001, Huynh *et al.* 2003, Ren *et al.* 2003).

Auffällig ist allerdings, dass mit Ausnahme einer Familie, keine Lewy-Körperchen Pathologie, jedoch aber eine Degeneration der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra* nachgewiesen werden konnte (Farrer *et al.* 2001). Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass Parkin bei der Bildung von Lewy-Körperchen, eine Rolle spielt (Zhang *et al.* 2000, Chung *et al.* 2001), denn die Lewy-Körperchen die klassischer Weise bei Parkinson-Patienten ohne Parkin Mutation gefunden werden konnten, enthielten Parkin.

PARK3

Kopplungsanalysen von Gasser *et al.* 1998 konnten in sechs Parkinson-Familien mit typischem L-Dopa responsiven Parkinsonismus eine Assoziation mit dem Genort 2p13 nachweisen. In zwei der Familien trat zusätzlich eine Demenz auf. Der Krankheitsbeginn lag zwischen dem 37. und 89. Lebensjahr. *Postmortem* konnten Lewy-Körperchen und eine Degeneration von dopaminergen Neuronen nachgewiesen werden. Bei einigen Patienten wurden zusätzlich alzheimerähnliche neurofibrilläre Bündel und Plaques festgestellt (Wszolek *et al.* 2002). Dies könnte bedeuten, dass der PARK3 Phänotyp ein breites pathologisches Spektrum umfasst. Die PARK3 Region wurde auf einen Bereich von 2,5 Mb kartiert. Die Analyse der Gene dieser Region lieferte bisher keine Mutation die für die Erkrankung verantwortlich gemacht werden könnte (West *et al.* 2001), so dass bisher nur der PARK3-Genort, nicht das Gen selbst bekannt ist. Neuere Untersuchungen von Sharma *et al.* 2006 konnten jedoch eine Assoziation zwischen der Sepiapterin-Reduktase-Genregion und dem PARK3 Genort belegen.

PARK5- UCH-L1

Ubiquitin C-terminale Hydrolasen sind deubiquitinierende Enzyme, welche die Spaltung von Polyubiquitin-Ketten katalysieren. Auf diesem Weg spielen sie eine wichtige Rolle bei der Wiedergewinnung von Ubiquitin-Monomeren (Lotharius und Bundin, 2002), welche unverzichtbar sind bei der Ubiquitin vermittelten proteasomalen Degradation von Proteinen. Eine Fehlfunktion dieses Enzyms würde zu vermindertem Proteinabbau führen und hätte neben einer Anhäufung von geschädigtem oder fehlgefaltetem Protein auch den Zelltod der Neurone zur Folge (Chung *et al.* 2001). Das neuronenspezifische UCH-L1 (Nishikawa *et al.* 2003) stellt mit bis zu zwei Prozent das häufigste Protein im Gehirn dar (Wilkinson *et al.* 1989, 1992).

Ausgehend von der Hypothese des gestörten Proteinabbaus und einer gesteigerten Anhäufung von Proteinen als Ursache der Parkinson'schen Erkrankung, ist es von Interesse, dass eine I93M-Mutation im Gen für die Ubiquitin-C-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1) belegt werden konnte (Leroy *et al.* 1998). Diese Mutation wurde in einer deutschen Familie mit autosomal dominant vererbtem Parkinson-Syndrom gefunden. Bisher konnten jedoch keine weiteren Mutationen im *UCH-L1*-Gen gefunden werden, jedoch ein S18Y-Polymorphismus, der mit

einem verminderten Parkinson-Risiko assoziiert wird (Wintermeyer *et al.* 2000). Bis jetzt gibt es keine Erklärung warum die I93M-Mutation krankheitsauslösend und der S18Y-Polymorphismus schützend sein soll (Harhangi *et al.* 1999, Shi und Tao 2003). Man geht bei UCH-L1 jedoch noch von einer weiteren Proteinfunktion aus: einer dimerisierungsunabhängigen Ubiquitin-Ligase Aktivität (Liu *et al.* 2002). Man könnte spekulieren, dass die hydrolytische Aktivität protektiv für die Zelle ist, während die Ligase-Aktivität durch die Anreicherung von α -Synuklein gefährlich sein könnte. Mausmodelle sollen helfen die Rolle von UCH-L1 zu klären (Saigoh *et al.* 1999, Kurihara *et al.* 2001).

PARK6- PINK1

Das *PINK1*-Gen wurde erstmals mit einer *early-onset* Form des Parkinsonismus assoziiert, nachdem eine große sizilianische Familie mit vier betroffenen Patienten analysiert wurde. Kopplungsstudien konnten die Lokalisation des *PINK1*-Gen auf eine 12,5cM große Region auf Chromosom 1p35-1p36 einengen. Weitere Untersuchungen ergaben in drei Familien zwei homozygote Mutationen die mit dem PARK6-Lokus assoziiert werden konnten: Eine *nonsense* (W437OPA) und eine *missense* (G309D) Mutation in einer hoch konservierten Aminosäure von PINK1. Weitere Analysen ergaben 10 heterozygot und 13 homozygot oder *compound* heterozygot auftretende Mutationen im *PINK1*-Gen bei Parkinson-Patienten (Valente *et al.* 2004). Weitere Analysen über die Bedeutung dieser unterschiedlichen Mutationen im *PINK1*-Gen und deren klinische Ausprägung stehen noch aus.

Zellkulturexperimente zeigen die mitochondriale Lokalisation von PINK1. Man geht von einer protektiven Funktion für die Zelle aus, die beim mutierten Protein verloren geht, wodurch die Mutationen als *loss of function*-Mutationen identifiziert werden konnten (Valente *et al.* 2004). Die Wildtyp-Form des Proteins schützt vor zellulärem Stress. Diese Schutzfunktion gegen stressinduzierte mitochondriale Dysfunktion und Apoptose ist bei den mutierten Proteinen anscheinend nicht mehr vorhanden, so dass man bei der Mutation von einem Funktionsverlust ausgehen muss. Somit konnte erstmals ein Defekt in einem mitochondrialen Protein nachgewiesen werden und ein Zusammenhang zur Parkinson'schen Erkrankung hergestellt werden. Schon früher wurde vermutet, dass ein Funktionsverlust von Mitochondrien an der sporadischen Form der Parkinson'schen Erkrankung beteiligt sein könnte (Jordan *et al.* 2003).

PARK7- DJ-1

Ursächlich für eine autosomal rezessive Form der Parkinson'schen Erkrankung konnten zwei Mutationen, eine Deletion und eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch führt, im DJ-1 Gen gefunden werden (Bonifati *et al.* 2003; Wilson *et al.* 2003). PARK7 wurde dem Genort auf Chromosom 1p36 zugeordnet.

Die physiologische Funktion von DJ-1 ist bisher unbekannt. Es wird jedoch angenommen, dass es eine Rolle in der zellulären Antwort auf oxidativen Stress besitzt und dass ein Funktionsverlust von DJ-1 zur Neurodegeneration führt (Bonifati *et al.* 2003). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum bakteriellen HSP31 könnte auch DJ-1 eine Chaperon-Funktion aufweisen (Quigley *et al.* 2003).

PARK8- LRRK-2

Mittels Kopplungsanalysen in einer japanischen Familie mit autosomal dominant vererbtem Parkinsonismus, die Samigahara Familie (Funayama *et al.* 2002), konnte der PARK8 Genort auf Chromosom 12p11.2-q13 lokalisiert werden. Die Symptome des Parkinsonismus in dieser Familie gleichen denen des typischen, auf L-Dopa ansprechenden, Krankheitsbildes. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 51 Jahren. Neuropathologische *Postmortem*-Untersuchungen ergaben eine reine Degeneration der *Substantia nigra* ohne das Auftreten von Lewy-Körperchen.

Der Genort konnte weiter eingegrenzt werden und schließlich das Kandidatengen identifiziert werden. Die Sequenzierung des 144 kb großen *LRRK-2* (*leucine-rich repeat kinase 2*) Gens, welches sich aus 51 Exons zusammensetzt, ergab vier *missense* Mutationen (Y1699C, R1441C, I1122V, I2020T) und einen Basenaustausch (L1114L, Zimprich *et al.* 2004). Die Funktion des 2527 Aminosäuren großen LRRK2-Proteins ist noch unbekannt. Die Studien von Williams *et al.* 2005 lassen vermuten, dass die Mutationen im *LRRK-2* Gen etwa fünf Prozent der vererbten Parkinson-Fälle und etwa zwei Prozent der sporadischen Fälle verursacht. Da diese Analyse nur mit einer der LRRK-Mutationen durchgeführt wurde, liegt die tatsächliche Zahl der *LRRK2*-Mutationen bei der familiären Form der Erkrankung wohl substantiell höher als fünf Prozent. Mutationen in diesem Gen könnten somit die wichtigsten bisher identifizierten Ursachen für die Parkinson'sche Erkrankung darstellen (Zimprich *et al.* 2004).

PARK9

Das Kufor-Rakeb Syndrom ist eine im Jugendalter (zwischen 12-16 Jahre) beginnende, neurodegenerative Erkrankung mit autosomal rezessivem Vererbungsmuster. Erstmals wurde dieses Syndrom in einer arabischen Familie gefunden und 1994 beschrieben (Najim al-Din *et al.* 1994). Das Kufor-Rakeb Syndrom gleicht klinisch dem typischen Parkinson-Syndrom mit dem Auftreten von Bradykinese, Rigor und einem maskenhaften Gesicht (Najim al-Din *et al.* 1994). Die Patienten sprechen im Bezug auf die extrapyramidalen Dysfunktionen gut auf eine L-Dopa Behandlung an. Der PARK9 Phänotyp wird ebenfalls den Formen des familiär bedingten Parkinsonismus zugesprochen, auch wenn mehrere zusätzliche Symptome, die nicht dem typischen Parkinsonismus entsprechen, wie Demenz, Spastik und supranukleäre Blickparese, aufgetreten sind. Bei der kernspintomografischen Bildgebung des Gehirns zeigte sich ein Schwund des *globus pallidus*, der sich im späteren Stadium generalisiert auf weitere Bereiche des Gehirns ausweitete. Neuropathologische postmortem Untersuchungen liegen jedoch bisher nicht vor. Die Kandidatenregion auf Chromosom 1p36 wurde bisher auf 9 cM eingegrenzt (Hampshire *et al.* 2001).

PARK10

Im Gegensatz zu den bisher behandelten Genorten und Genen für die familiäre Form der Parkinson'schen Erkrankung ist PARK10 ein Genort für eine nicht mendelnde Form mit spätem Erkrankungsalter (Hicks *et al.* 2002). Die klinischen Symptome von PARK10-assoziierten Familien entsprechen dem Bild der typischen sporadischen Form der Parkinson'schen Erkrankung. Das Erkrankungsalter liegt bei 85 % der Betroffenen über 50 Jahre und im Durchschnitt bei 65,8 Jahren (Hicks *et al.* 2002). Bisher wurden keine neuropathologischen Untersuchungen oder kernspintomografischen Untersuchungen publiziert. Auf der Grundlage einer genealogischen Datenbank wurde eine signifikante Häufung von Parkinson Erkrankungen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt, die eine Assoziation zwischen dem PARK10 Genort und der Parkinson'schen Erkrankung vermuten lassen (Sveinbjörnsdóttir *et al.* 2000). Genauere Daten lieferte die Studie von Hicks *et al.* 2002 in der 117 Parkinson-Patienten aus 51 Familien eines großen Stammbaums analysiert wurden. Nach dieser Studie deuten die Ergebnisse auf eine genetische Ätiologie der Parkinson'schen Erkrankung in diesen Familien hin. Jedoch gehörten alle untersuchten Familien zur isländischen Bevölkerungsgruppe und Untersuchungen in anderen Bevölkerungsgruppierungen stehen noch aus.

Wie kommt man also zu mehr Wissen über die molekularen Ursachen der Parkinson'schen Erkrankung? Während die Parkinson'schen Erkrankung lange als sporadisch auftretende Krankheit wahrgenommen wurde, hat sich in den letzten Jahren klar gezeigt, dass sie auch genetische Ursachen haben kann, auch wenn die bisher bekannten genetisch bedingten Formen einen kleineren Anteil der Parkinson-Patienten ausmachen. Bis heute sind mindestens 11 Genorte und sechs Gene (Synuklein, Parkin, PINK1, UCH-L1, DJ-1, LRRK1) und weitere Kandidatengene auf verschiedenen Chromosomen bekannt, die mit dem familiär bedingten Parkinson-Syndrom assoziiert werden (Tabelle 1-1).

Bei den bekannten Genen konnte die Analyse der Proteinfunktionen wichtige Hinweise über die molekularen Ursachen der Parkinson'schen Erkrankung liefern:

Parkin (PARK 2) und UCH-L1 (PARK 5) sind Proteine, die für den geordneten Proteinabbau in der Zelle notwendig sind. Parkin gehört zu der Familie der E3-Ubiquitinligasen (Shimura et al. 2000). Ubiquitinligasen beschleunigen den Proteinabbau durch die kovalente Bindung von Ubiquitin an das Substrat. Diese Markierung ermöglicht dem Proteasom das Erkennen des Substrates und ist somit für den Abbau der Proteine und für ein Überleben der Zelle lebenswichtig. Das Protein UCH-L1 (PARK 5) spaltet die Poly-Ubiquitin-Ketten zu einzelnen Ubiquitin-Molekülen, die der Zelle dann wieder für die Markierung von abzubauenen Proteinen zur Verfügung stehen. Defekte im Ubiquitin-Proteasomen System und im Ubiquitin-Kreislaufs erhöhen die Gesamtmenge an Protein in der Zelle. Dieses angereicherte Protein führt zum Absterben der Zelle und zur Neurodegeneration (Giasson und Lee 2003). Gestützt wird diese These auch durch die pathologischen Vorgänge beim autosomal dominant vererbten Parkinson-Syndrom aufgrund von Mutationen im α -Synuklein-Gen (PARK 1 und 4). Bei dieser Form der Parkinson'schen Erkrankung kommt es zur Bildung von Lewy Körpern im Zytoplasma von dopaminergen Neuronen. Die Lewy-Körperchen Pathologie, welche bei vielen Formen der Parkinson'schen Erkrankung auftritt, auch beim sporadischen Parkinson-Syndrom, stellt eine Ansammlung von überschüssigem Protein dar und ist das Anzeichen einer verringerten proteasomalen Aktivität (McNaught et al. 2003). Man glaubt deshalb, dass bei der sporadischen und den genetischen Formen der Parkinson'schen Erkrankung dieselben oder zumindest ähnliche zelluläre Mechanismen gestört sind.

Da bei der Parkin-Mutation (PARK 2) keine Lewy-Körperchen Pathologie auftritt, die Degeneration der *Substantia nigra* aber existiert, vermutet man, dass Parkin bei der Bildung von Lewy-Körperchen eine Rolle spielt (Zhang et al. 2000, Chung et al. 2001) .

Die physiologische Funktion von DJ-1 (PARK 7) ist bisher unbekannt, es wird aber angenommen, dass DJ-1 die Zellen gegen oxidativen Stress schützt und dass ein Funktionsverlust von DJ-1 zur Neurodegeneration führt (Bonifati *et al.* 2003). Da Sauerstoffradikale in dopaminergen Neuronen über den normalen Dopaminabbau entstehen, wären diese Neuronen möglicherweise besonders sensibel beim Verlust der normalen DJ-1-Funktion. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum bakteriellen HSP31 könnte DJ-1 auch eine Chaperon-Funktion aufweisen (Quigley *et al.* 2003), die ebenfalls für die 14-3-3 Proteine beschrieben wurde.

Bei dem mitochondriell lokalisierten PINK1 (PARK 6) -Protein geht man ebenfalls von einer protektiven Funktion für die Zelle aus. Die Wildtyp-Form des Proteins schützt vor zellulärem Stress. Diese Schutzfunktion gegen stressinduzierte mitochondriale Dysfunktion und Apoptose ist bei den gefundenen mutierten Proteinen nicht mehr vorhanden, so dass man bei der Mutation von einem Funktionsverlust ausgehen muss (Valente *et al.* 2004). Somit konnte erstmals ein Defekt in einem mitochondrialen Protein nachgewiesen werden und ein Zusammenhang zu den mitochondrialen Defekten der Parkinson'schen Erkrankung hergestellt werden. Schon früher wurde vermutet, dass ein Funktionsverlust von Mitochondrien an der sporadischen Form der Parkinson'schen Erkrankung beteiligt sein könnte.

Das letzte der bisher identifizierten parkinsonassoziierten Gene ist das *LRRK-2* Gen (PARK 8). Die Studien von Williams *et al.* 2005 lassen vermuten, dass die Mutationen im *LRRK-2* Gen etwa fünf Prozent der vererbten Parkinson-Fälle und etwa zwei Prozent der sporadischen Fälle verursacht. Da diese Analyse nur mit einer der *LRRK*-Mutationen durchgeführt wurde, liegt die tatsächliche Zahl der *LRRK2*-Mutationen bei der familiären Form der Erkrankung wohl substanziell höher als fünf Prozent. Mutationen in diesem Gen könnten somit die wichtigsten bisher identifizierten Ursachen für die Parkinson'sche Erkrankung darstellen (Nichols *et al.* 2005). Die Entwicklung eines genetischen Tests auf das Vorkommen dieser Mutation und dieser Form der Parkinson'schen Erkrankung ist bereits in Planung.

Die Identifizierung und Charakterisierung von Parkinson-Genen und deren Substraten lieferte klare Hinweise darauf, dass Fehler beim Abbau bestimmter Proteine im Ubiquitin-Proteasomen System (bei *parkin*-Mutationen), Protein-Aggregate (*α-Synuklein*) und Veränderungen in der dopaminabhängigen Neurotransmission bei der Pathogenese der Parkinson'schen Erkrankung eine zentrale Rolle spielen. In diesem Bereich lassen sich auch die Funktionen der 14-3-3 Proteine eingliedern, wie in den nächsten Absätzen näher beschrieben wird.

Beim Prozess der Proteinaggregation nehmen die Chaperone eine mehr und mehr an Bedeutung gewinnende Rolle ein. Die korrekte räumliche Faltung von Proteinen im Zytoplasma von Zellen ist ein komplexer Prozess, der maßgeblich von den Chaperon-Proteinen kontrolliert wird. Chaperone ermöglichen die richtige dreidimensionale Proteinfaltung, indem sie an neu synthetisierte Proteine binden und dadurch aberrante Faltungswege aktiv verhindern. Unter zellulärem Stress, der zu erhöhter Protein-Aggregation führt, werden bestimmte Chaperone aktiviert. So kann z.B. das Chaperone Hsp70 in verschiedenen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen den neuronalen Zelltod hemmen (Auluck *et al.* 2002, Cummings *et al.* 2001). Dies ist auch in einem Mausmodell der Parkinson'schen Erkrankung der Fall und zeigt, wie wichtig die weitere Analyse von Chaperon-Proteinen ist. Mit dem MPTP-Mausmodell für die Parkinson'sche Erkrankung konnte gezeigt werden, dass in der viral-Hsp70-überexprimierenden *Substantia nigra* signifikant mehr Neuronen überlebten als in der nicht behandelten Hirnseite der gleichen Mäuse. Diese Studie zeigt hoffnungsvolle Ansätze für die Gentherapie bei der Parkinson'schen Erkrankung. Beispielsweise stellen virale Vektoren, die vom Organismus gut toleriert werden, ein geeignetes Mittel für den Gentransport dar (Büeler 1999, Paterna und Büeler 2002) und könnten sich auch bei der Therapie der Parkinson'schen Erkrankung oder anderen neurodegenerativen Krankheiten, als nützlich erweisen. Es werden immer mehr genetische Tiermodelle für die Parkinson'schen Erkrankung generiert und dienen sowohl der Erforschung der molekularen Ursachen der Erkrankung, wie auch der Suche nach medikamentösen Angriffspunkten für die Therapie. Ziel neuer Therapien ist es, den Untergang der dopaminergen Neurone schon früh zu hemmen um damit vielleicht die Erkrankung zu verhindern oder wenigstens zu verzögern. In diesem Zusammenhang stellen Chaperone eine interessante Familie von Proteinen dar, weil sie die korrekte Proteinfaltung fördern und damit der Protein-Aggregation entgegenwirken (Bonini 2002).

1.3.7 Das 14-3-3 Gen als Kandidatengene für die Parkinson'sche Erkrankung

Mit der Entdeckung des α -Synuklein Gens als Genort für eine autosomal dominante Form der Parkinson'schen Erkrankung wurde der erste wirkliche Beweis für eine familiäre Form der Parkinson'sche Erkrankung erbracht (Polymeropoulos *et al.* 1996 und 1997). Somit wurde der Grundstein für die Suche nach weiteren Kandidatengenen für die Parkinson'sche Erkrankung gelegt.

In dieser Arbeit wird die Rolle von 14-3-3 Proteinen in der Parkinson'schen Erkrankung untersucht und diskutiert. 14-3-3 Proteine sind bekannt als Regulatoren der Zellteilung, der Signaltransduktion und der Apoptose. Sie fungieren als Chaperone und als Adaptermoleküle für Protein-Protein Interaktionen, beeinflussen die Lokalisierung von Proteinen und hemmen oder aktivieren Enzyme (van Hemert *et al.* 2001). Zahlreiche Funktionen und Regelkreise, an denen 14-3-3 Proteine beteiligt sind, wurden bereits beschrieben. Die ungewöhnliche Bezeichnung der 14-3-3 Proteine ist zurückzuführen auf die chromatographische Auftrennung in der DEAE-Zellulose Chromatographie und der Migrationsposition in der 2D-Gelelektrophorese (Fu *et al.* 2000). In Säugetieren sind bis jetzt sieben 14-3-3 Isotypen: beta, gamma, epsilon, zeta, eta, sigma, theta (Berg *et al.* 2003) und mehr als 100 Interaktionspartner bekannt (Yaffe 2002). Die bisher identifizierten Isoformen sind in Tabelle 1-2 aufgelistet.

Tabelle 1-2 Gegenwärtig sind 7 Unterformen der 14-3-3 Proteine bekannt

Unterformen	Gensymbol	Genort	Isoform spezifische Histologie
14-3-3beta und die phosphorylierte Isoform alpha	YWHAB	20q13.1	- in neurofibrillären Tangles bei der Alzheimer-Erkrankung - assoziiert mit Tau
14-3-3gamma	YWHAG	7q11.23	- erhöht bei der Alzheimer-Erkrankung - in Lewy-Körperchen bei PD - reduziert beim Down Syndrom
14-3-3epsilon	YWHAE	17p13.3	- erhöht bei der Alzheimer-Erkrankung - in Lewy-Körperchen bei PD
14-3-3zeta und die phosphorylierte Isoform delta	YWHAZ	2p25.1-p25.2, 8q23.1	- in neurofibrillären Tangles bei Alzheimer-Patienten - assoziiert mit Tau - in Lewy-Körperchen bei PD
14-3-3eta	YWHAH	22q12.3	- bindet an Ataxin-1 und wird mit der spinocerebellären Ataxie assoziiert - erhöht bei CF-Patienten
14-3-3sigma	SFN	1p35.3	nur in T- und Epithelzellen exprimiert
14-3-3theta	YWHAQ	2p25.1	in Lewy-Körperchen bei PD

Die Hauptunterschiede zwischen den Isotypen befinden sich im C-Terminus, der mit einer Röntgenstrukturanalyse nicht darstellbar ist und auf den α -I Helix folgt. Jedoch ist derzeit noch unklar, ob die unterschiedlichen Isoformen verschiedene, spezialisierte Funktionen haben oder ob sie nur unter dem bereits 2002 publizierten Einfluß von zeitlicher, entwicklungsabhängiger oder gewebsspezifischer Expression stehen (Yaffe 2002).

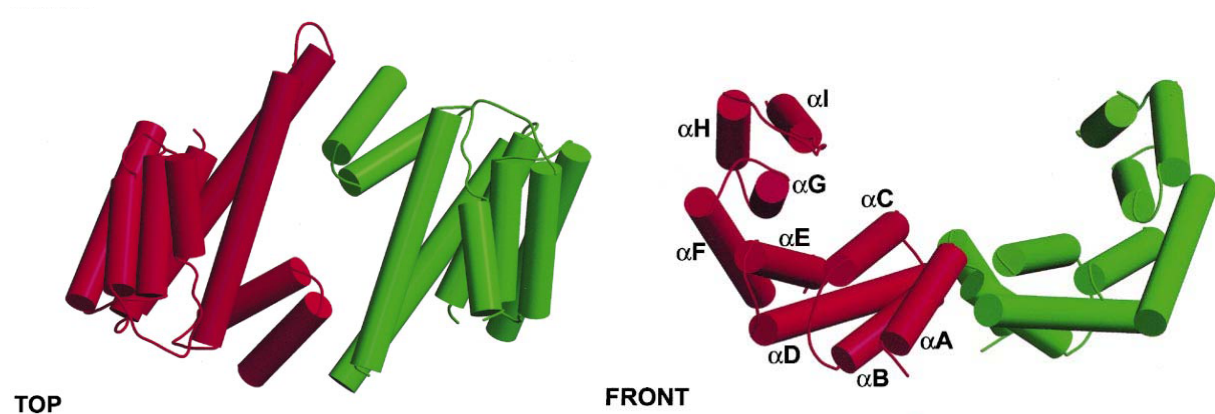


Bild 1-4 Die 3-Dimensionale Struktur der 14-3-3 Proteine. Die Struktur der 14-3-3 Proteine in zwei Ansichten. Jedes Monomer enthält neun α -Helices (benannt mit α -A bis α -I). Für die Dimerbildung sind die Helices α -A, α -C und α -D verantwortlich. Die Helices α -E bis α -I bilden die seitlichen Wände der U-förmigen Struktur, die die Bindungsstelle für andere Proteine darstellt. Die Hauptunterschiede zwischen den Isotypen befinden sich im C-Terminus, der mit einer Röntgenstrukturanalyse nicht darstellbar ist, und auf den α -I Helix folgt (Yaffe und Elia 2001, Yaffe *et al.* 1997).

14-3-3 Proteine sind hoch konservierte Chaperon-Proteine, die eine Vielzahl von regulierenden Funktionen im Zellzyklus, bei der Signalübertragung oder beim intrazellulären Transport einnehmen. 14-3-3 Proteine spielen eine Rolle in der Aktivierung der MAP Kinase, in der Apoptose, in der Zellzyklusregulation und in Prozessen der Genregulation (Takahashi 2003). Auch nach 30 Jahren Forschung ist es schwer, die Funktionen der 14-3-3 Proteine zu globalisieren. Die Suche nach Interaktionspartnern sollte Aufschluß über die Funktionen und Regelkreise, an denen 14-3-3 Proteine beteiligt sind, liefern. Jedoch sind die Interaktionspartner zahlreich. 14-3-3 interagiert mit Proteinkinasen, wie z. B. PKCs, Raf, Bcr, MEKK, PDK1, Akt und ASK1, mit Protein-Rezeptoren, wie dem *Insulin like growth factor* Rezeptor und dem GABA Rezeptor und mit Enzymen wie der Tyrosin- und der Tryptophan Hydroxylase. Weiterhin sind Interaktionen mit G-Proteinen, Transkriptionsfaktoren, Proteinen der Apoptose wie z.B. Bad und mit wichtigen Proteinen des Zellzyklus wie z.B.

Cdc25, Wee1 und p53 beschrieben (Reuther *et al.* 1994, Conklin *et al.* 1995, Craparo *et al.* 1997, Furlanetto *et al.* 1997, Powell *et al.* 2002, Yaffe 2002).

Jedoch ist es bei dieser Datenfülle an unterschiedlichen Funktionen der Proteine nicht leicht, die Rolle von 14-3-3 Proteinen bei neurodegenerativen Erkrankungen und im Speziellen bei der Pathogenese der Parkinson'schen Erkrankung zu verifizieren. Dies soll im Folgenden versucht werden. 14-3-3 Proteine werden mit der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen in Verbindung gebracht (Tabelle 1-3). So wurde z.B. nachgewiesen, dass das Gehirn das Organ im Körper mit der höchsten Konzentration von 14-3-3 Proteinen darstellt. 14-3-3 Proteine stellen im Gehirn einen Anteil von 1 % des gesamten löslichen Proteins dar. 14-3-3 Proteine finden sich zytoplasmatisch und werden axonal in die Nervenendigungen transportiert. Betrachtet man die Verteilung von 14-3-3zeta in den unterschiedlichen Regionen des Gehirns, so konnte 14-3-3zeta mRNA im Neocortex, Hippocampus, Nucleus caudatus/Putamen, Thalamus, dem cerebellären Cortex und weiteren Kernen des Gehirnstammes nachgewiesen werden (Takahashi 2003).

Tabelle 1-3 Bedeutung von 14-3-3 Proteinen bei neurologischen Erkrankungen des Menschen (nach Dougherty und Morrison 2004)

Neurologische Erkrankung	14-3-3-Isoform	angenommene Proteinfunktion
Alzheimer Erkrankung	zeta (beta in vitro)	in den neurofibrillären Bündel gefunden, eine Interaktion mit Tau könnte eine Rolle bei der Phosphorylierung von Tau haben
Parkinson'sche Erkrankung	epsilon, gamma, zeta, theta,	in Lewy Körperchen nachgewiesen, Assoziation mit α -Synuklein,
spinozerebelläre Ataxie Typ 1	eta, zeta, gamma, beta, epsilon	bindet Ataxin-1, die Bindung könnte das Ataxin-1 Protein stabilisieren und die Degeneration verzögern
Creutzfeld Jacob Erkrankung (CF)	beta, gamma, epsilon, eta,	bei CF-Patienten gefunden, jedoch keine Erklärung für die erhöhte 14-3-3 Konzentration

Um die Rolle von Proteinen bei neurodegenerativen Erkrankungen zu ermitteln werden häufig immunhistologischen Methoden eingesetzt um die pathologischen Veränderungen im Gehirn und deren beteiligte Proteine-Systeme darzustellen. So konnten z.B. 14-3-3 Proteine in den neurofibrillären Bündel bei Alzheimer Patienten (Layfield *et al.* 1996), in den kortikalen

Lewy-Körperchen bei der Demenz mit Lewy-Körperchen und in der Zerebrospinalflüssigkeit von Jakob-Creutzfeldt-Patienten (Zerr *et al.* 1998, Wiltfang *et al.* 1999, Beaudry *et al.* 1999) nachgewiesen werden. Zudem konnten histologische Untersuchungen von Gehirnschnitten von Parkinson-Patienten die 14-3-3zeta-Isoform als Bestandteil der Lewy-Körperchen identifizieren.

Kaneko und Hachiya haben 2006 die Hypothese formuliert, dass 14-3-3zeta in der Zelle die Rolle eines „Straßenkehrers“ für missgefaltete Proteine übernimmt indem es die Bildung von Aggregaten begünstigt. Durch die Bildung dieser Einschlusskörperchen werden die missgefaltete Proteine vom Zellstoffwechsel separiert und bewahren die Zellen vor dem Zelluntergang. Studien zur Lokalisation der 14-3-3 Proteine in unterschiedlichen Arten von Einschlusskörperchen im Gehirn bei Patienten mit Alzheimer, amyotropher Lateralsklerose, Creutzfeldt Jacob, spinocerebellärer Ataxie Typ1 und Parkinson lassen eine starke Assoziation dieser Erkrankungen mit 14-3-3zeta zu. Man nimmt an, dass missgefaltete Proteine an die hydrophobe Oberfläche der amphipathischen Furche des 14-3-3zeta Moleküls gebunden werden, wenn der Abbau missgefalteter Proteine verzögert ist. Die Bündelung dieser Proteine in Einschlusskörperchen bewahrt die Zelle vor einer toxischen Schädigung. Diese von Kaneko und Hachiya formulierte Hypothese passt sehr gut zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Gleichzeitig sollen die 14-3-3 Proteine eine chaperonähnliche Funktion besitzen mit der die Aggregation von neu synthetisierten Proteinen von Beginn minimieren werden soll. Dabei interagieren die Chaperon-Proteine spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen und haben so eine aggregationsmindernde Wirkung (Buchner 2002).

14-3-3 Proteine colokalisieren mit den Lewy-Körperchen (Berg *et al.* 2003), die bei der Parkinson'schen Erkrankung und der diffusen Lewy-Körperchen Erkrankung auftreten (Bild 1-5, Bild 3-3). Die Lewy Körperchen enthalten neben 14-3-3 Proteinen (Bild 1-5, Bild 3-3) auch das α -Synuklein Protein. Die Funktion des α -Synuklein Proteins ist noch weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass das Protein an der Modulation der synaptischen Plastizität und der Regulation der dopaminergen Neurotransmission beteiligt ist. Auch gibt es die Hypothese, dass α -Synuklein und 14-3-3 Proteine als Gegenspieler regulatorisch auf die Dopaminsynthese einwirken (Ostrerova *et al.* 1999, Perez *et al.* 2002). Bekannt wurde das α -Synuklein Protein im Zusammenhang mit der Parkinson'schen Erkrankung, nachdem bei einer italienischen Familie bei betroffenen Familienmitgliedern eine Mutation im *α -Synuklein* Gen gefunden wurde (Polymeropoulos *et al.* 1997). Im Gegensatz zu α -Synuklein, welches überexprimiert das Absterben der Zellen stimuliert (Iwata *et al.* 2001), verhindert eine Überexpression von 14-3-3 Proteinen den apoptotischen Zelltod (Xing *et al.* 2000). In einem

Drosophila-Modell führen Mutationen in 14-3-3 Proteinen zum Abbruch der neuronalen Differenzierung und der synaptischen Plastizität (Skoulakis *et al.* 1998) ähnlich wie es auch für α -Synuklein angenommen wird.

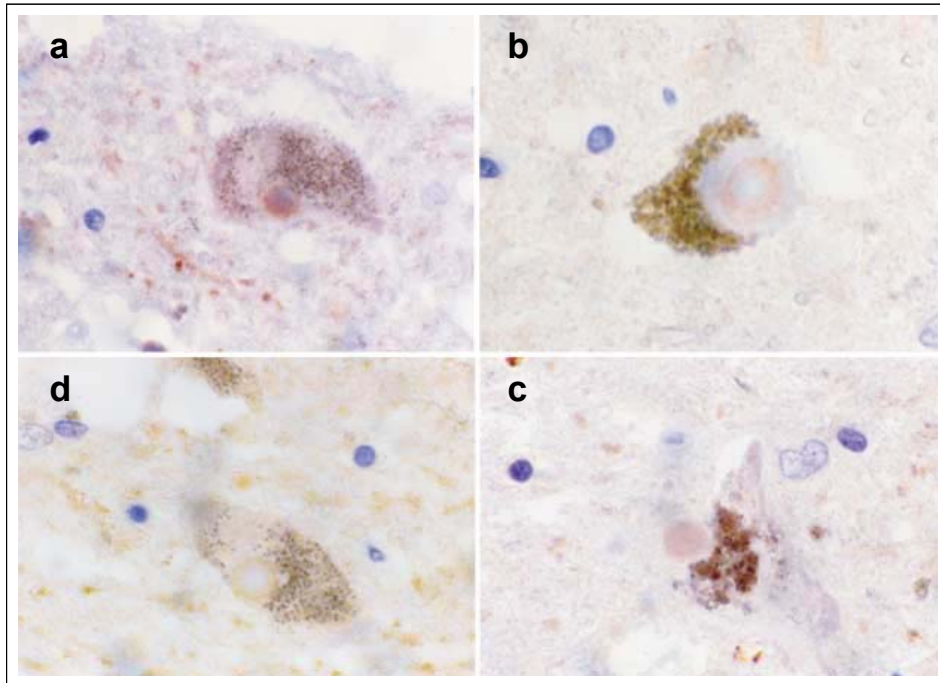


Bild 1-5 14-3-3 in Lewy-Körperchen: Die Immunfärbungen zeigen, dass 14-3-3 Proteine mit den Lewy-Körperchen, die bei der Parkinson'schen Erkrankung und der diffusen Lewy-Körperchen Erkrankung auftreten, ko-lokalisieren. Gezeigt ist die homogene Färbung der Lewy-Körperchen mit dem 14-3-3gamma (a) und dem 14-3-3theta (c) Antikörper und die Färbung des Halos mit dem 14-3-3zeta (d) und 14-3-3 epsilon (b) Antikörper (Berg *et al.* 2003).

Bei der Frage nach der Rolle der 14-3-3 Proteine bei der Parkinson'schen Erkrankung ist also neben der Chaperon-Funktion auch die Regulation der Dopaminsynthese durch 14-3-3 Proteine von Interesse. Die zeta-Untereinheit der 14-3-3 Proteine (Gensymbol: YWHAH) kodiert für einen proteinkinaseabhängigen Aktivator der Tyrosin- und Tryptophan-Hydroxylasen. Diese wiederum katalysieren die limitierenden Schritte in der Katecholamin- und Serotonin-Synthese (Dopaminsynthese). Es wird angenommen, dass α -Synuklein und 14-3-3 über die Bindung an Tyrosin-Hydroxylase die Dopaminsynthese regulieren (Bild 1-6, Perez *et al.* 2002). Da die Dopamin-Verarmung in der Parkinson'schen Erkrankung der entscheidende pathologische Mechanismus ist, ist diese These neben der Chaperon-Funktion wohl die interessanteste, die es in der Verbindung mit 14-3-3 Proteinen zu analysieren gilt

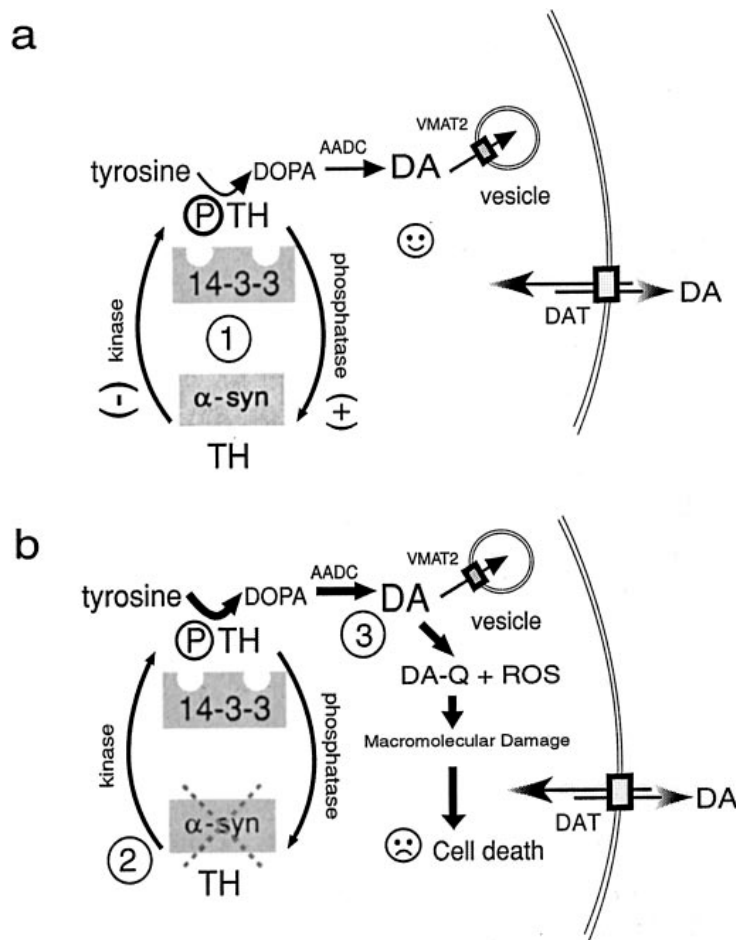


Bild 1-6 Hypothese zum Wechselspiel von α -Synuklein und 14-3-3 (Perez *et al.* 2002) in der Dopaminsynthese (a) und der Neurodegeneration (b).

(a) Die Dopaminsynthese ist ein Prozess, der in mehreren Schritten durch die Aktivität von Tyrosin-Hydroxylase und Decarboxylase abläuft. Dabei wird Tyrosin mit Hilfe der Tyrosin-Hydroxylase in DOPA und dieses durch die Decarboxylase der aromatischen Aminosäuren (AADC) in Dopamin umgewandelt. Das 14-3-3-Protein bindet an die phosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase und führt zu deren Aktivierung, während α -Synuklein an die dephosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase bindet und somit eine hemmende Wirkung auf die Dopaminsynthese besitzt. (b) Ist insgesamt mengenmäßig weniger oder weniger funktionstüchtiges α -Synuklein in der Zelle vorhanden, wird die Aktivierung der Tyrosin-Hydroxylase durch 14-3-3 zu einem höheren Dopaminspiegel führen. Greift kein Rückkopplungseffekt ein, der z.B. durch eine Reduktion an freiem 14-3-3 regulierend auf die Dopaminsynthese wirken würde, könnte es durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten zu oxidativem Stress und zu Neurodegeneration führen. Umgekehrt würde ein Mangel an 14-3-3 zu einer Verarmung der *Substantia nigra* und zu den Parkinson-typischen Syndromen führen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Parkinson'sche Erkrankung ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen und ist auf einen Zelluntergang der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* zurückzuführen (Gibb 1992). Die Ätiologie des Parkinson-Syndroms ist noch weitgehend ungeklärt, man geht jedoch von einem Zusammenspiel von Umwelt- und genetischen Faktoren aus (McCall *et al.* 2001). Mit der Entdeckung des α -Synuklein Gens als Genort für eine autosomal dominante Form der Parkinson'schen Erkrankung wurde der erste wirkliche Beweis für eine familiäre Form der Parkinson'sche Erkrankung erbracht (Polymeropoulos *et al.* 1996 und 1997). Somit wurde der Grundstein für die Suche nach weiteren Kandidatengenen für die Parkinson'sche Erkrankung gelegt.

Ein Kandidatengen ist das 14-3-3 Protein. 14-3-3 Proteine werden vorwiegend im Gehirn exprimiert, greifen regulierend in die Dopaminsynthese ein (Perez *et al.* 2002), colokalisieren mit Lewy-Körperchen und sind bekannt für ihre Bedeutung bei neurologischen Erkrankungen (Berg *et al.* 2003). Bei der Untersuchung von zwei neuen 14-3-3 Genen auf Chromosom 10 und Chromosom X, mit hoher Homologie zu 14-3-3zeta Isoform, wurden zwei Mutationen bei Parkinson-Patienten gefunden. Ein c.95A<G (p.Gln32Arg) Austausch (14-3-3zeta-likeXmut) bei einem sporadischen Parkinson-Patienten und eine Deletion eines Basenpaares (c.98delG, p.Gly33fs) bei einem familiären Parkinson-Patienten mit autosomal dominantem Vererbungsmuster (14-3-3zeta-like10del).

Ziel dieser Arbeit ist eine funktionelle und zellbiologische Charakterisierung der Wildtyp und der mutierten 14-3-3zeta-like Proteine. Dabei soll die Frage nach der pathologischen Relevanz der Mutationen geklärt werden.

Ein gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen ist die Aggregation und Ablagerung von Proteinen im Gehirn (Tabner *et al.* 2005, Gandhi und Wood 2005). Bei der funktionellen Charakterisierung der 14-3-3zeta-like Proteine stehen vor allem Fragestellungen im Vordergrund, die diese Proteinanhäufungen betreffen. Wo sind die 14-3-3 Proteine in der Zelle lokalisiert und wie ändert sich die Lokalisation bei erhöhter Proteinanhäufung in der Zelle wie es beim Parkinson'schen Syndrom der Fall ist? Besitzen die 14-3-3zeta-like Proteine eine Chaperon-Funktion wie sie für 14-3-3zeta beschrieben ist? Verhält sich 14-3-3zeta-like wie 14-3-3zeta? Gibt es Unterschiede zwischen den mutierten und den Wildtyp 14-3-3zeta-like Proteinen in ihrer Funktionsweise? Sprechen die Funktionen

für eine pathologische Relevanz der 14-3-3zeta-like Mutationen bei der Parkinson'schen Erkrankung? Damit soll die Hypothese über die Rolle von 14-3-3zeta als „Straßenkehrer“ für missgefaltete Proteine (Kaneko und Hachiya 2006), der die Zelle vor dem Untergang bewahrt, untersucht werden. Gleichzeitig sollen die 14-3-3 Proteine eine chaperonähnliche Funktion besitzen. Zellen haben mit Hilfe der Chaperone einen Weg gefunden, die Aggregation von neu synthetisierten fehlgefaltetem Proteinen von Beginn an zu minimieren. Da mit einer Neurodegeneration häufig eine Ansammlung von fehlgefaltetem Protein und eine mangelnde Bewältigung oxidativen Stresses assoziiert wird, soll die Bedeutung von 14-3-3zeta-like Proteinen bei zellulärem Stress analysiert werden. Proliferation- und Zytotoxizitätstest sollen die Auswirkung von zellulärem Stress ganz unterschiedlicher Art messen und Vergleiche zwischen den 14-3-3zeta-like Wildtyp- und mutierten Proteinen anstellen.

Da Proteine in einem pathologischen Signalweg selten eine isolierte Stellung einnehmen, soll die Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like Aufschluss über die Funktionsweise der Proteine in der Zelle geben. Bei der Suche nach Interaktionspartner von 14-3-3zeta-like sollen also folgende Fragen beantwortet werden: Haben 14-3-3zeta und zeta-like gleiche Interaktionspartner? Wenn ja, interagieren auch die mutierten 14-3-3zeta-like Proteine mit diesem Interaktionspartner? Beeinträchtigen die mutierten 14-3-3zeta-like Proteine die Dopaminsynthese? Lassen sich über den Interaktionspartner Rückschlüsse auf die Funktionsweise und die Aufgabe von 14-3-3zeta ziehen? In wie weit lässt sich die Interaktion in das Bild der Parkinson'schen Erkrankung einordnen?

Somit liegt der Schwerpunkt der Arbeit vorwiegend auf dem Vergleich der Proteinfunktionen der Wildtyp- und der mutierten Proteine, um die pathologische Relevanz der Mutationen zu klären. Haben die Mutationen eine pathologische Bedeutung, so wird dem Puzzle der Informationen über die Ursachen der Parkinson'schen Erkrankung nicht nur ein weiteres Teil hinzugefügt, sondern es werden auch wichtige Informationen über Signalwege und Proteine, die auch beim ideopathischen Parkinson-Syndrom eine Rolle spielen könnten, gewonnen .

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Chemikalien

Acrylamid Lösung	Bio-Rad München (30 % Mix: Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)
Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
Brillant Blue R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Merck, Darmstadt
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Hefeextrakt	BBL, Cockeysville, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Methyl-Methansulfonat (MMS)	Roth, Karlsruhe
MG132 (Z-LL-al)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MitoTracker Green FM	Invitrogen, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Slim Fast	Allpharm Vertriebs GmbH, Messel
S-Nitroso-Acetyl-Penicillamin (SNAP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sorbitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Disulfiram)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypticase peptone	BBL, Cockeysville, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vinblastin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

Sonstige Chemikalien wurden in größtmöglicher Reinheit von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Invitrogen, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe

Enzyme

Enzym	Hersteller	Puffersystem
<i>BamHI</i>	New England Biolabs, Frankfurt Main	NEB U + BSA
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs, Frankfurt Main	<i>EcoRI</i> -Puffer
<i>NotI</i>	New England Biolabs, Frankfurt Main	NEB 3 + BSA
<i>XbaI</i>	New England Biolabs, Frankfurt Main	NEB 2 + BSA
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth	T4-Ligase-Puffer (MBI)
Taq-PCR \times DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe	10x Taq-Polymerase Puffer (Invitrogen)
<i>Pwo</i> -Polymerase	Peqlab, Erlangen	<i>Pwo</i> -Polymerase-Puffer (Peqlab)
<i>PreScission Protease</i>	Amersham, Freiburg	<i>PreScission-cleavage</i> -Puffer, pH 7,5 siehe „Lösungen und Puffer“
SAP(<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)	Amersham, Freiburg	10x SAP-Puffer
T4-Polynukleotid-Kinase (PNK)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	PNK-Puffer A

Antikörper

Primär-Antikörper für Western-Blot und Immunfluoreszenz

Primär-Antikörper	Wirt	Verdünnung		Firma
		Western-Blot	Immunfluoreszenz	
Anti-Ataxin 3	Kaninchen	1:1000		Schmidt <i>et al.</i> 1998
Anti-V5	Maus	1:1000	1:500	Invitrogen (46-0705)
Anti-GST	Maus	1:1000		Santa Cruz (SC-138)
Anti-Ubiquitin	Maus	1:3000	1:500	Biotrend (242.9)
	Kaninchen	1:3000	1:500	DAKO (Z 0458)
Anti-14-3-3zeta	Kaninchen	1:200		Santa Cruz (C16)
Anti-Raf-1	Kaninchen	1:1000		Santa Cruz (SC-133)

Sekundär-Antikörper für Western-Blot

Sekundär-Antikörper	Wirt	Verdünnung	Markierung	Firma
Anti-Maus-HRP	Schaf	1:2500	HRP	Amersham, Freiburg (NXA931)
Anti-Kaninchen-HRP	Esel	1:3333	HRP	Amersham, Freiburg (NA9340)

Sekundär-Antikörper für Immunfluoreszenz

Sekundär-Antikörper	Wirt	Verdünnung	Markierung	Firma
Anti-Maus-Cy3 (rot)	Esel	1:500	Cy3	Jackson laboratories, Hamburg (715-165-150)

Cy3-markierte Primäantikörper für die Immunfluoreszenz

Primär-Antikörper	Wirt	Verdünnung	Markierung	Firma
Anti-Vimentin	Maus	1:200	Cy3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (C9080)
Anti- γ -Tubulin	Kaninchen	1:200	Cy3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (C7604)

Größenstandards**Proteingrößenstandards**

Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range) Bio-Rad, München

Multimark (Western-Blot-Marker) Multimark

DNA-Längenstandards

λ /Hind III MBI Fermentas St. Leon-Rot

100 bp-DNA-Ladder Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Primer für die Erzeugung von 14-3-3zeta-like Konstrukten mit Schnittstellen für die jeweiligen Vektoren (ausfühlicher Teil unter 3.2.):

Klonierung in den pGEX-6-P2 Vektor für die Proteinexpression in Bakterien

Forward-Primer mit *BamHI* Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:

5'- **CGGGATCCCGC ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG**-3'

Reverse-Primer mit *BamHI* Schnittstelle das 14-3-3zeta-like_{10del} Konstrukt:

5'-**GGAATTC CTG ACC TAT GGG CTC CTA CAA** -3'

Reverse-Primer mit *BamHI* Schnittstelle die 14-3-3zeta-like_{10wt}, -Xwt, -Xmut Konstrukte:

5'-**GGAATTC CTG GAA GGC CGG TTA ATT TTC** -3'

Klonierung in den eukaryontischen pEGFP-N1 Vektor

Forward-Primer mit *Bam*HI Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:

5'- **CGGGATCCCGC** ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG-3'

Reverse-Primer mit Age I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10del Konstrukt:

5'-GTCC**ACCGGTGG** CAA CAT TTT TAT AAG CAA CTG AGA GGA -3'

Reverse-Primer mit Age I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt

5'- GTCC**ACCGGTGG** ATT TTC CAC TCC TTC TCC TGC TTC ACC -3'

Reverse-Primer mit Age I Schnittstelle für die 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut Konstrukt

5'- GTCC**ACCGGTGG** ATT TTC CCC TCC TTC TCC TGC TTC AGC -3'

Klonierung in den eukaryontischen pcDNA3.1-V5-His Vektor

Forward-Primer mit *Bam*HI Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:

5'- **CGGGATCCCGC** ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG-3'

Reverse-Primer mit *Eco*RI Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10del Konstrukt:

5'-CG**GAATTCCG** CAA CAT TTT TAT AAG CAA CTG AGA GGA -3'

Reverse-Primer mit *Eco*RI Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt:

5'-CG**GAATTCCG** ATT TTC CAC TCC TTC TCC TGC TTC ACC-3'

Reverse-Primer mit *Eco*RI Schnittstelle für die 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut Konstrukte:

5'-CG**GAATTCCG** ATT TTC CCC TCC TTC TCC TGC TTC AGC-3'

Klonierung in die pGAD 426 und pBTM 117C Yeast-two Hybrid-Vektoren für die Expression in Hefe

Forward-Primer mit Sal I Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:

5'-ACG**CGTCGACG** ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG-3'

Reverse-Primer mit Not I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10del Konstrukt

5'-CCTTTT**GCGGCCGC** CTA CAA CAT TTT TAT AAG CAA CTG A-3'

Reverse-Primer mit Not I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt

5'-CCTTTT**GCGGCCGC** TTA ATT TTC CAC TCC TTC TCC T-3'

Reverse-Primer mit Not I Schnittstelle für die 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut Konstrukt

5'-CCTTTT**GCGGCCGC** TTA ATT TTC CCC TCC TTC TCC TG-3'

2.1.3 Plasmide

Expressions- und Klonierungsvektoren

Liste der in der Arbeit verwendeten Expressions- und Klonierungsvektoren

Vektor	Hersteller	Resistenz	Beschreibung
pGEX-6P-2	Amersham, Freiburg	Ampicilin	Vektor mit prokarontischem Promotor und N-terminaler Sequenz (bezogen auf die <i>Multiple-cloning site</i>) für das GST-Protein. Besonders geeignet für die Proteinaufreinigung aus Bakterien.
pEGFP-N1	BD clontech USA	Kanamycin, Neomycin	Vektor mit eukaryontischen Promotor und C-terminaler Sequenz für das grüne Fluoreszenz-Protein.
pcDNA3.1/V5-His	Invitrogen, Karlsruhe	Ampicilin, Neomycin	Vektor mit eukaryontischen Promotor und C-terminalen Epitop für die Erkennung mit einem V5- oder einem His-Antikörper, dadurch besonders für die Proteinaufreinigung aus eukaryontischen Zellen z.B. mit V5-Agarose geeignet.
pGAD 426	Wanker <i>et al.</i> 1997	Ampicilin	Aktivierungsdomänen-Vektor für die Expression in Hefe und für die Suche nach Interaktionspartnern.
pBTM 117C	Wanker <i>et al.</i> 1997	Ampicilin	Bindedomänen-Vektor für die Expression in Hefe und für die Suche nach Interaktionspartnern.

Klonierte Konstrukte

Bei der Analyse von 14-3-3 Genen wurden zwei neue 14-3-3 Gene identifiziert, die sich auf dem Chromosom 10 (Accession XM_005100) und dem X Chromosom (Accession XM_018019) befinden und eine hohe Homologie zur 14-3-3zeta-Isoform zeigen. Aufgrund dieser Ähnlichkeit zur zeta-Isoform, wurden die homologen Gene mit 14-3-3zeta-like

benannt. 14-3-3zeta-likeX unterscheidet sich in 9 Aminosäuren von der zeta-Isoform, 14-3-3zeta-like10 hingegen nur in 5 Aminosäuren. Mit SSCP-Analysen und anschließender Sequenzierung konnten zwei Mutationen in 14-3-3zeta-like Genen identifiziert werden. Ein c.95A>G Austausch im 14-3-3zeta-likeXwt Gen hat einen Aminosäureaustausch p.Gln32Arg zur Folge (14-3-3zeta-likeXmut). Im 14-3-3zeta-like10wt Gen wurde eine Deletion einer Base, c.98delG (p.Gly33fs), gefunden, bei der es zu einer Verschiebung des Leserahmens und im weiteren Verlauf der Sequenz zur Entstehung eines Stopcodon führt (E33fsX89).

Die cDNA der vier *14-3-3 zeta* homologen Gene (14-3-3zeta-like10wt, 14-3-3zeta-like10del, 14-3-3zeta-likeXwt und 14-3-3zeta-likeXwt) wurde amplifiziert und in die fünf Vektoren (pcDNA3.1/V5-His, pEGFP-N1, pGEX-6P-2, pGAD 426 und pBTM 117C) einkloniert (siehe und 2.1.1.4 und 2.2.4.4 und 3.2).

2.1.4 Kits und Reagenziensysteme

GST-Aufreinigung

GSTMag Agarose-Beads

Novogene/Merck,Darmstadt

Immunpräzipitation

Anti-V5-Agarose Affinity Gel

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Plasmid-Isolations-Kits

Wizard Plus SV Miniprep Promega, Karlsruhe
QIAfilter Plasmid Midi und Maxi Kit

Qiagen, Hilden

PCR-Aufreinigung-Kit und Gel-Extraktions-Kit

QIAquick PCR Purification Kit
QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden

Sequenzier-Kit

CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit

Beckman-Counter,Unterschleißh.

Western-Blot Detektions-System

ECL Western blotting Reagents

AmershamPharmacia, Freiburg

Bradford Färbereagenz

Protein Assay Dye Reagent Concentrate

Bio-Rad, München

Transfectionsreagenz

Effectene Transfectionsreagenz

Qiagen, Hilden

Zellproliferations-Messung

Cell Proliferation Kit I (MTT)

Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Centrifuge 5415R Rotor FA45-24-11
Nitrozellulose Optitran (BA-S 85)
Zellkulturgefäße

Geltrockenfolie (*Gel drying film*)
Reaktionsgefäße 5ml, 10ml, 50ml
Reaktionsgefäße
Einwegpipetten
Pipettenspitzen
Whatmanpapier
Sterilfilter

Eppendorf, Hamburg
Schleicher & Schüll, Dassel
Costar Corning, Amsterdam,
Nunc, Wiesbaden,
Greiner bio-one, Frickenhausen
Promega, Mannheim
Greiner bio-one, Frickenhausen
Greiner bio-one, Frickenhausen
Greiner bio-one, Frickenhausen
Greiner bio-one, Frickenhausen
Whatman, Dassel
Greiner bio-one, Frickenhausen

2.1.6 Geräte

Zentrifugen

Centrifuge 5415R, Rotor FA45-24-11
Centrifuge 5417C, Rotor FA45-24-11
Centrifuge 5810R, Rotor A4-62
Centrifuge 5804R, Rotor F34-6-38
Concentrator 5301, Rotor F45-48-11
Avanti J-30I, Rotor JA-24.15

Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Beckman Coulter, Unterschleißheim

Elektrophorese-Zubehör

Electrophoresis Power Supply
Consort E835
Elektrophoresekammer 40-0708
Elektrophoresekammer 40-1214

Peqlab, Erlangen
Peqlab, Erlangen
Peqlab, Erlangen

Dokumentation

Geldokumentations-System
Transilluminator
Digitalkamera Camedia C-5050 Zoom
Dokumentations-Software ArgusX1

Biostep, Jahnsdorf
Olympus, Hamburg
Biostep, Jahnsdorf

Thermocycler

GeneAmp PCR System 9700
PTC 200-DNA Engine

Applied Biosystems, USA
MJ Research, USA

Sequenzierer

Ceq 8000 Kapillar-Sequenzierer

Beckman Coulter, Unterschleißheim

SDS-PAGE und Western-Blot

Serva Blue vertical 101
Serva Blue Blot WET/100

Serva Electrophoresis, Heidelberg
Serva Electrophoresis, Heidelberg

Zellkultur

HeraSafe Sterilbank	Heraeus, Langenselbold
Inkubator CB 210	Binder, Tuttlingen
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, USA
Neubauer Zählkammer	Bright-Line Assistant, Deutschland

Photometer

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Ultraspec 3100pro	AmershamPharmacia, Freiburg
Sirius HAT Plattenphotometer	MWG, Ebersberg

Sonstige Geräte

Accu-Jet Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Autoklav ELV 5075	Systemec, Wettenberg
Röntgenfilm Entwickler, Curix 60	Agfa, Leverkusen
Inkubator BD 240	Binder, Tuttlingen

Magnetrührer Heidolph MR3000/3002	Heidolph, Schwabach
Milli-Q Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach
pH-Meter MP 239	Mettler Toledo, Giessen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator Multitron HT	Infors, Einsbach
Taumler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Reax control	Heidolph, Schwabach
Waage Precisa XT 6200C-FR	Precisa Instruments, Schweiz
Waage Precisa XB 620M	Precisa Instruments, Schweiz
Waage Precisa 404A	Precisa Instruments, Schweiz

2.1.7 Lösungen und PufferSDS-PAGE und Western- Blotting

Trenngel-Puffer (pH 8,8):	1,5 M Tris-HCl
Sammelgel-Puffer (pH 6,8):	0,5 M Tris-HCl
Laufpuffer (pH 8,3):	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
2x Laemmli-Probenauftragspuffer:	62,5 mM Tris-HCl 2 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Bromphenolblau 25 % Glycerin 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol

12,5 %iges Trenngel:	2,083 ml 30 %iges Acrylamid 1,875 ml Trenngelpuffer 0,948 ml H ₂ O _{bidest} 50 µl 10 % SDS 40 µl 10 % APS 4 µl 10 % TEMED
10 %iges Trenngel:	1,667 ml 30 %iges Acrylamid 1,875 ml Trenngelpuffer 1,364 ml H ₂ O _{bidest} 50 µl 10 % SDS 40 µl 10 % APS 4 µl 10 % TEMED
4 %iges Sammelgel:	0,333 ml 30 %iges Acrylamid 0,250 ml Sammelgelpuffer 1,385 H ₂ O _{bidest} 20 µl 10 % SDS 10 µl 10 % APS 2 µl 10 % TEMED

Das Volumen von 2 ml Sammel- und 5 ml Trenngel ist ausreichend für Minigele: Größe der Glasplatten 10 x 10 cm, Spacerdicke 0,75 -1 mm.

Coomassie Färbelösung:	45,5 % (v/v) Methanol 9,2 % Essigsäure 0,25 % Billant Blue R250
Entfärbelösung:	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 15 % (v/v) Methanol
10x TBS (pH 7,4):	100 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl
TBS-T (pH 7,4):	TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
Blockierlösung:	TBS mit 5 % Slim Fast
Stripping-Puffer (pH 2,8)	0,2M Glycin 0,5M NaCl 1 % (w/v) SDS

Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE (pH 8,0)	2M Tris-HCl 1M Essigsäure 50 mM EDTA
10xTBE (pH 8.0)	890 mM Tris-HCl 890 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH 8,0)
6x Probenpuffer:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 30 % (v/v) Glycerin in H ₂ O _{bidest}
Ethidiumbromid-Stocklösung:	10 mg/ml in H ₂ O _{bidest}
1,5 %iges Agarosegel	0,6 g Agarose 40 ml TAE-Puffer

GST-Pull down

GST-Wasch-/Binde-Puffer, pH 7,3	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
GST-Wasch-/Binde-Puffer, pH 7,3 + NP-40	1 % (v/v) Nonidet NP-40 GST-Wasch-/Binde-Puffer
Elutions-Puffer	50 mM Tris pH 8,0 4,5 mg/ml Glutathion (Amersham)
PreScission-Cleavage-Puffer, pH 7,5	50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM Dithiothreitol

Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden chemisch kompetente DH5 α -Bakterien oder elektrokompetente DH5 α -E-Bakterien verwendet (Invitrogen, Karlsruhe). Sollten die Bakterien zur Proteingewinnung eingesetzt werden, wurden BL21-Bakterien eingesetzt. Genaue Beschreibung der Stämme:

DH5 α	F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(rK-mK+)
BL21	deoRthi-1supE44 λ -gyrA96 relA1 (Invitrogen, Karlsruhe) F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm met (DE3) (Novagene/Merck, Darmstadt)

Lösungen zur Kultivierung von Bakterien

LB-Agar –Platte (pH 7,0):
 10 g Trypticase peptone
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 15 g Agar-Agar
 (nach Einstellen des pH-Wertes zugeben)

Zur Herstellung von Selektionsplatten wurde dem frisch autoklavierten LB-Agar erst nach Abkühlen unter 60°C das Antibiotikum zugegeben.

LB-Medium (pH 7,0):
 10 g Trypticase peptone
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl

Ampicillin-Stocklösung (1000x):
 100 mg/ml in H₂O_{bidest}
 Die Stocklösung wurde nach dem Ansetzen steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert

Kanamycin-Stocklösung (1000x):
 25 mg/ml in H₂O_{bidest}
 Die Stocklösung wurde nach dem Ansetzen steril filtriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert

Lösungen zur Kultivierung und für das Arbeiten mit Hefen

30x Aminosäure-Mischung
 0,6 g/l L-Adeninsulfat
 0,6 g/l L-Arginin
 0,9 g/l L-Isoleucin
 0,9 g/l L-Lysin
 1,5 g/l L-Phenylalanin
 3,0 g/l L-Glutamin
 4,5 g/l L-Valin
 11,25 g/l L-Serin
 0,9 g/l L-Tyrosin

Nicht autoklavierbare Aminosäuren
 3,0 g/l Asparaginsäure
 6,0 g/l L-Threonin

Hefe Selektions-Medium
 (ohne L-Leucin und L-Tryptophan)
 1 x Hefe-Stickstoffbasis (Difco)
 1 x Aminosäuremischung (30x)
 2 % (w/v) D-Glucose
 0,1 g/l Asparaginsäure
 0,2 g/l L-Threonin
 0,02 g/l L-Methionin
 0,02 g/l Uracil
 0,02 g/l L-Histidin

Hefe-Selektions-Platten (ohne L-Leucin und L-Tryptophan)	1x Hefe-Stickstoffbasis (Difco) 1x Aminosäuremischung (30x) 2 % (w/v) D-Glucose 20 g/l Bacto-Agar 0,03 g/l L-Tyrosin 0,1 g/l Asparaginsäure 0,2 g/l L-Threonin 0,02 g/l L-Methionin 0,02 g/l Uracil 0,02 g/l L-Histidin
YPD-Platten	50 g/l YPD-Bouillon 20 g/l Bacto Agar 10x TE, pH 8.0 100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA
Lithiumacetat/TE (pH 8,0):	0,1 M LiAc 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
Lithiumacetat/TE/PEG (pH 8,0):	0,1 M LiAc 10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 40 % (w/v) Polyethylenglycol 3350
Z-Puffer (pH 7,0):	60 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden für das Arbeiten mit Bakterien

Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur

3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit Bakterien aus Gefrierkulturen oder mit einer einzelnen Bakterienkolonie von Agar-Platten angeimpft und bei 37°C über Nacht in einem Bakterienerschüttelinkubator bei 200 Umdrehungen pro Minuten kultiviert.

Anlegen von Gefrierkulturen

Bakterienklone können in einer Glycerinkultur über lange Zeit gelagert werden. Es wurden 3 ml antibiotikahaltiges LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute in einem Bakterienerschüttelinkubator kultiviert. Die Bakterien wurden 5 min bei 4500 x g zentrifugiert und das Sediment in 750 µl LB-Medium mit 250 µl Glycerin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Transformation von Bakterien mit Hitzeschock

Chemokompetente DH5α Bakterien werden auf Eis aufgetaut, 100 µl Bakterien mit etwa 100 ng DNA vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 50s bei 42°C werden die Bakterien erneut auf Eis inkubiert (1 min) und nach Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium 30 min bei 37°C im Bakterienerschüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zur Volumenreduktion 2 min bei 4500 x g zentrifugiert, 800 µl des Überstands verworfen. Die Bakterien wurden in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert, auf antibiotikahaltigem LB-Agar ausplattiert und über Nacht im 37°C Wärmeschrank kultiviert.

Transformation von Bakterien über Elektroporation

Elektrokompetente DH5 α Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 20-25 μ l Zellen mit 1-2 μ l Plasmid (max. 1 μ g Plasmid-DNA) vermengt und für die Elektroporation (5 ms bei 1700 mV) in eine sterile Elektroporationskuvette überführt. Die Bakterien wurden sofort nach der Elektroporation in 250 μ l SOB-Medium aufgenommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 37°C 1 h in einem Bakterienschüttelinkubator kultiviert. Es wurden verschiedene Mengen der elektroporierten Bakterien ausplattiert (oder ein Teil über Nacht bei 4°C aufbewahrt) um zu gewährleisten, dass die Klone nicht zu dicht wachsen, was das Picken eines einzelnen Klons erschweren würde. Die ausplattierten Bakterien wurden über Nacht in einem 37°C Schrank inkubiert.

Minipräparation von Bakterien

Für eine Plasmidisolierung wurden 3 ml *E.coli*-Übernachtskultur in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen bei 37°C über Nacht in einem Bakterienschüttelinkubator kultiviert, abzentrifugiert und mit dem Wizard Plus SV Miniprep-Kit von Promega nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 100 μ l H₂O_{bidest.} Für größere Plasmid-Mengen wurde das QIAfilter Plasmid Midi- bzw. Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Methode der Plasmidpräparation basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und einer DNA-Aufreinigung über eine Anionenaustauscher Matrix.

Midi-und Maxipräparation von Bakterien

Für die Aufreinigung größerer Plasmid-Mengen wurden 100 bzw. 300 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum in einem sterilen Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute in einem Bakterienschüttelinkubator kultiviert. Um das Anwachsen der Bakterien zu erleichtern, erfolgte das Animpfen des grossen Volumens mit einer 3 ml *E.coli*-8h Kultur. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAfilter Plasmid Midi- bzw. Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

Colony-PCR

Mit diesem Verfahren kann der Erfolg einer Klonierung überprüft werden. Die in das Plasmid eingebrachte Zielsequenz wird mit der Colony-PCR amplifiziert. Für die Colony-PCR wurden entweder die gereinigte Plasmid-DNA der Bakterienpräparationen oder kleine Mengen der gepickten Bakterienkolonie eingesetzt. Durch das Erhitzen in der PCR-Reaktion wurden die Bakterienzellwände aufgebrochen, wodurch die Plasmid-DNA amplifiziert werden konnte. Wird die Colony-PCR mit Bakterienkolonien durchgeführt, ersetzt sie eine Plasmidpräparation nicht, ist aber ein sehr schnelles Verfahren um den Erfolg einer Klonierung zu überprüfen und kann bei negativem Ergebnis zeitaufwendige Plasmidpräparationen ersparen.

Pipettierschema für die Colony-PCR in einem Volumen von 20 µl:

		Endkonzentration	Hersteller
10 x Puffer (ohne Mg)	2 µl	1 x	Invitrogen
dNTP Mix (10 mM)	0,4 µl	0,2mM	Invitrogen
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 µl	1,5mM	Invitrogen
Vorwärtsprimer (10µM)	1 µl	0,5µM	Metabion
Rückwärtsprimer (10µM)	1 µl	0,5µM	Metabion
Taq-Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl	0,5U	Invitrogen
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl		

Cycler-Programm:

94°C-2 min

94°C-15 sec, 58°C-30 sec, 72°C-30 sec 30 Zyklen

72°C-7 min, 4°C hold

Sequenzierung von Plasmiden

Für die Sequenzierungsreaktion wurden das Kapillar-Sequenziergerät CEQ 8000 von Beckman Coulter und die von der Firma empfohlenen Fluoreszenzfarbstoffe (Quickstart: CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Beckman-Coulter) verwendet.

Sequenzierungsreaktion

Plasmid	500 ng
Primer (10 μ M)	1 μ l
Quickstart	4 μ l
Q-Solution	4 μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 20 μ l

Cycler-Programm:

94°C-1 min 30 sec

94°C-20 sec, 53°C-20 sec, 60°C-4 min 31 Zyklen

4°C hold

Stop-Mix für die Probenaufreinigung1 Teil Glycogen + 2 teile 100 mM Na₂EDTA + 2 Teile 3 M NaAcetat (pH 5.2)

Für Fragmente <400bp wurde entweder nur der Vorwärts- oder der Rückwärtsprimer verwendet. Längere Fragmente wurden in zwei Sequenzierungsreaktionen mit je einem der beiden Primer sequenziert.

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die DNA Fragmente durch DNA Fällung gereinigt. Hierzu wurden 5 μ l Stopp-Mix aus einem Teil Glycogen (Beckman-Coulter), zwei Teilen 3M NaAcetat pH 5,2 und zwei Teilen 100 mM Na₂EDTA pH 8,0 sowie 60 μ l 100 % Ethanol zu jeder Probe gegeben und 30 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde zuerst mit 100 μ l anschließend mit 70 μ l 70 % Ethanol gewaschen und 15 min bei 10000 x g zentrifugiert. Um die Ethanolreste zu entfernen wurde ein Vakuum-Konzentrator verwendet (12 min, 30°C). Das Sediment wurde in 40 μ l Proben-Ladepuffer (Beckman-Coulter) gelöst und nach einer 10 minütigen Inkubation im Dunkeln in die Sequenzierplatte überführt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet (Beckman-Coulter). Die Pufferplatte wurde zu zwei Dritteln mit Auftrennungs-Puffer (Beckman-Coulter) gefüllt. Für die Plasmid-Sequenzierung wurden folgende Parameter am Gerät eingestellt: Kapillartemperatur 50°C, 120 sec Denaturierung bei 90°C, Injektionszeit 120 sec bei 2,0 kV und 115 min Separierung bei 4,2 kV.

2.2.2 Methoden für das Arbeiten mit Hefen

Transfektion von Hefen mit Hitzeschock

Für eine Transformation von Plasmiden in Hefe wurden zunächst 50 ml YPD-Medium mit einer 2 ml Y190 Hefe-Übernachtskultur angeimpft und etwa 5 h bei 30°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (bei 600 nm) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 800 x g zentrifugiert, mit 10 ml bidestiliertem Wasser und anschließend mit 5 ml einer Lithiumacetat/TE Lösung gewaschen, zentrifugiert und schließlich in 0,5 ml Lithiumacetat/TE resuspendiert und auf Eis gestellt. Für eine Transformation wurden 2-5 µg Plasmid-DNA je Plasmid Konstrukt, 100 µl Hefen Suspension, 50 µg Transporter DNA (Lachssperma, Invitrogen) und 600 µl einer Lithiumacetat/TE/PEG Lösung gemischt und 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Der Hitzeschock für 10 min bei 42 °C ermöglichte das Eindringen der Plasmide in die Hefezellen. Die Hefezellen wurden kurz abzentrifugiert, in 100 µl 1x TE Puffer resuspendiert, auf Hefe Selektionsplatten ohne Leucin und Tryptophan ausplattiert und im 30°C Wärmeschrank kultiviert. Um eine Austrocknung zu verhindern wurden die Petrischalen mit Parafilm versiegelt. Erste Kolonien wurden nach 3-5 Tagen sichtbar.

β-Galaktosidase Filter-Test

Eine Interaktion der Proteine kann mit einem β-Galaktosidase Filter-Test nachgewiesen werden. Die Klone, die auf Interaktion getestet werden sollen, wurden zuvor auf eine neue Platte ausgestrichen. Dabei wurden immer 4-6 Klone der gleichen Platte, eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle, auf eine neue Platte übertragen und 2-3 Tage bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden Teile dieser Klone für den β-Galaktosidase Filter-Test auf einen Nitrozellulose Filter übertragen. Hierzu wurde ein Nitrozellulose-Filter in Größe der Petrischale (94mm Durchmesser, Schleicher und Schuell; Optitran BA-S 85) direkt auf die Klone gelegt und durch Streichen mit einem zellulosefreien Tuch über den Nitrozellulose-Filter darauf übertragen. Für den Zellaufschluss wurde der Nitrozellulose-Filter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach kurzem Auftauen bei Raumtemperatur auf mit X-Gal-Färbereagenz (40 mM β-Mercaptoethanol, 1 mg/ml X-Gal in Z-Puffer) getränktem Filterpapier bei 30°C inkubiert. Dabei wurden die Petrischalen mit Parafilm versiegelt, um

das Verdampfen der X-Gal Lösung zu verhindern. Eine Proteininteraktion wurde, je nach Stärke der Interaktion, nach 30 min bis zwei Tage nach dem β -Galaktosidase Filter-Test durch eine Blaufärbung der Kolonien sichtbar. Die Blaufärbung beruht auf dem Mechanismus, dass eine Proteininteraktion eine β -Galaktosidase Expression ausgelöst, die durch die Umsetzung des Substrats und Färbereagenz X-Gal sichtbar wird.

2.2.3 Methoden für das Arbeiten mit Zellen

Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- HEK293 Humane, embryonale Nierenzellen (Graham *et al.* 1977) ursprünglich von Microbix Kanada
- SH-SY5Y Humane Neuroblastomzellen ACC 209 (Biedler *et al.* 1973, Jalava *et al.* 1990) ursprünglich von der DSMZ/Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

Kultivierung von Zellen

Adherente Säugerzellen wurden bei 37°C in feuchter Atmosphäre eines Wärmeschanks mit 5 % CO₂-Gehalt in Kulturflaschen mit gasdurchlässigem Schraubverschluß kultiviert. Beim Arbeiten mit Zellen wurde auf die Verwendung steriler Materialien geachtet. Für HEK 293-Zellen wurden ein Medium aus DMEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Bei SH-SY5Y-Zellen wurde der Serumgehalt auf 15 % erhöht. Wurden stabile Zellen kultiviert, wurde eine geeignete Menge G418 beigemischt.

Medium für HEK293-Zellen:

DMEM
(Gibco, 4,5 g/L Glucose, ohne
L-Glutamin und Sodium Pyruvat)
10 % (v/v) FCS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Medium für SH-SY5Y-Zellen:	DMEM (Gibco, 4,5 g/L Glucose, ohne L-Glutamin und Sodium Pyruvat) 15 % (v/v) FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
----------------------------	--

Teilen und Passagieren von Zellen

Um konfluent gewachsene Zellen abzulösen, zu teilen und in ein neues Kulturgefäß zu überführen, wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit Dulbecco's PBS (Gibco) gewaschen und 5 min mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Zellen abgeklopft und der Trypsin-Verdau durch Resuspension in 10 ml serumhaltigen Kulturmedium gestoppt werden. Je nach Verwendungszweck wurden die Zellen entweder für eine weitere Kultivierung 1/10 mit Kulturmedium verdünnt und in ein neues Kulturgefäß überführt, oder für Versuche die Zellzahl bestimmt und eine bestimmte Anzahl von Zellen in 6- oder 96-*well*-Platten ausgesät.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung von Säugerzellen wurden diese wie beschrieben mit PBS abgelöst und durch Zentrifugation (10 min, 250 g) gesammelt. Sedimentierte Zellen wurden in 1 ml Gefriermedium (Kulturmedium für HEK293 oder SH-SY5Y Zellen (s.o.) mit 10 % (v/v) DMSO (Sigma-Aldrich)) aufgenommen, langsam tiefgekühlt und bei -80°C gelagert. Zum Animpfen einer Kultur aus tiefgefrorenen Zellen wurde diese in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, zum Verdünnen des DMSO in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 250 g) gesammelt. In Medium aufgenommene Zellen wurden wie beschrieben kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl von Zellen in Lösung wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Improved Bright-Line Assistant, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden 50 µl der Zellsuspension auf die Zählfläche gegeben und die Zellen nach Auflegen eines Deckgläschens gezählt. Man zählt die Zellen aus vier Quadraten der Zellkammer aus und bildet den Mittelwert. Dieser wird dann mit dem Faktor 10^4 multipliziert um die Zellzahl zu erhalten.

Transiente Transfektion

Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) wurden mittels einer liposomalen-Transfektionspräparation und dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) transfiziert. Für eine Transfektion der Plasmis-DNA in HEK293-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Effectene (Quiagen) verwendet. Das Prinzip einer liposomenvermittelten Transfektion besteht darin, dass negativ geladene DNA an kationische Lipide bindet. Dieser Komplex aus DNA und Lipiden, auch DNA-Liposomen-Komplex genannt, kann mit der Zellmembran fusionieren und so die Plasmide in die Zelle bringen. Für die Durchführung einer Transfektion wurden, je nach Zelltyp, ein Tag zuvor $3-7 \times 10^5$ Zellen in eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben und in 2 ml Kulturmedium über Nacht im Brutschrank kultiviert. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurde somit eine Zelldichte von 50-80 % Konfluenz erreicht.

Transfektion mittels Lipofectamin 2000-Transfektionsreagenz

Für die Vorbereitung der Transfektion wurden einen Tag vorher $5-7 \times 10^5$ SH-SY5Y-Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in 2 ml Medium ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert. 4 µg Plasmid-DNA werden in einem Geamtvolumen von 200 µl serumfreien Medium gelöst und gemischt. Das Lipofectamin wird vor der Verwendung vorsichtig gemischt. Anschließend werden 10 µl Lipofectamin 2000 in ein Geamtvolumen von 200 µl serumfreien Medium aufgenommen, gemischt und 5 min inkubiert. Dann wird das DNA- und Lipofectamin vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert, damit sich die Lipofectamin-DNA Komplexe bilden können. Währenddessen werden die Zellen mit PBS gewaschen und 1,6 ml neues, serumhaltiges Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden der Lipofectamin-DNA Komplexe langsam, unter leicht kreisenden Bewegungen der 6-well-

Platte, auf die Zellen getropft. Um einer eventuellen Zellschädigung durch das Lipofectamin-Transfektionsreagenz entgegen zu wirken wurden die Zellen nach einer 12-18 stündigen Inkubation im Wärmeschrank mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

Transfektion mittels Effectene-Transfektionsreagenz

Für die Vorbereitung der Transfektion wurden, wie schon bei der Lipofectamin-Transfektion, einen Tag vorher $3-5 \times 10^5$ HEK293-Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in 2 ml Medium ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert. 1 µg Plasmid-DNA und 8 µl *Enhancer* wurden 1 s mit einem Vortex-Gerät gemischt und für 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl Effectene und erneutem Mischen für 10 sec folgte eine Inkubationsphase von 10 min in denen der Effectene-DNA Komplex gebildet wird. Die Zellen werden in dieser Zeit mit PBS gewaschen und 1,2 ml neues Medium appliziert. Der Effectene-DNA Komplex wird mit 600 µl Medium durch auf und abpipetieren gemischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Leichte Kreisbewegungen der 6-well-Platte sorgen für eine gleichmäßige Verteilung des Gemisches. Nach einer 12-18 stündigen Inkubation im Wärmeschrank wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt um einer Zellschädigung durch den Effectene-DNA Komplex entgegen zu wirken.

Erzeugung stabil transfizierter Zell-Linien

Zellen, die mit einem Vektor mit Neomycin-Resistenzgen (Aminoglycosid-Phosphotransferase) transfiziert waren, konnten zur Selektion transfizierter Zellen mit G418 (Neomycin, Southern *et al.* 1982) behandelt werden. G418 (Gibco) ist ein Antibiotikum vom Kanamycin-Typ welches in Säugerzellen die Proteinsynthese blockiert, wenn kein Neomycin-Resistenzgen vorhanden ist. Somit führt die Behandlung mit G418 zu einem allmählichen Absterben nicht transfizierter Zellen. Nach drei Wochen ist der überwiegende Teil der nicht-transfizierten Zellen abgestorben. Da die Anfälligkeit für G418 von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich ist, musste für HEK293 und SH-SY5Y Zellen eine Dosis-Wirkungskurve bestimmt werden. 48 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit 1000 µg/ml G418 behandelt. Bei der Dauerkultur konnte die G418-Konzentration auf 500 µg/ml G418 gesenkt werden.

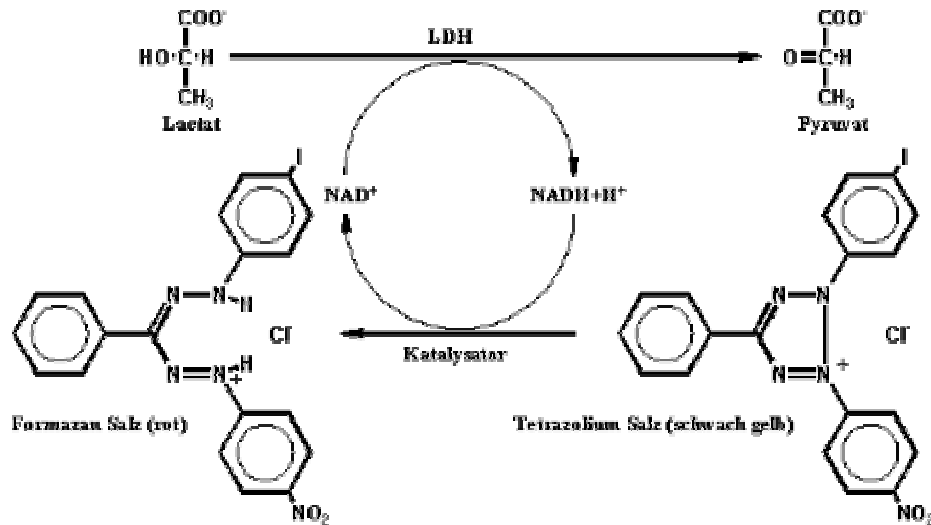
Zellyse- und Proteinextrakt Herstellung

Zellen werden in 6-*well*-Platten bis zur Konfluenz kultiviert, das Medium gewaschen und die Zellen mit 300 µl Lysispuffer 30 min auf Eis inkubiert. Dem Lysispuffer aus PBS mit 1 % (v/v) Triton X-100 wird der Protease-Hemmer Complete, nach Angaben des Herstellers Roche, zugegeben. Der Protease-Hemmer Complete ist eine Mischung verschiedener Protease-Hemmer und soll den Abbau der Proteine durch Proteasen verhindern. Um die Lyse durch Triton X-100 noch zu verstärken, wurde ein Zellschaber verwendet, um die Zellen zu zerstören. Zelltrümmer und Proteinlysate wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g separiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

Zellstressexperimente: LDH-Zytotoxizitätstest

Beim LDH-Zytotoxizitätstest wird die Zellvitalität an der Menge des ins Medium abgegebenen LDHs gemessen. Hohe Mengen LDH im Medium deuten auf den Zelltod vieler Zellen und deren dann brüchige Zellwand hin, wodurch ein Austreten des LDHs aus der Zelle ins Medium ermöglicht wird. Die Laktatdehydrogenase ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches sehr schnell in das Zellkulturmedium abgegeben wird, wenn die Zellmembran zerstört ist. Die LDH-Aktivität wird mittels eines enzymatischen Tests bestimmt. Es finden zwei Redoxreaktionen statt: Im ersten Schritt wird Laktat durch die Oxidoreduktase LDH zu Pyruvat oxidiert, während das Coenzym NAD^+ durch die Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testreagenz enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen NADH/H^+ auf das schwach gelbfarbene Tetrazolium-Salz, welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert wird, während das NADH/H^+ zu NAD^+ oxidiert wird (Bild 2-1). Diese Farbstoffbildung wird mit einem Photometer kolorimetrisch gemessen. Je höher der Grad der Zellschädigung ist, desto größer ist die Menge an freigesetztem LDH im Medium. Die Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen.

Bild 2-1 Umwandlung des Tetrazolium Salzes zu Formazan.



Bei diesem Versuch wurden die LDH Mengen von Zellkulturen unter Einfluss eines Stressors mit denen der Kontrolle verglichen. Da in neurodegenerativen Erkrankungen vermehrt Proteinablagerungen gefunden wurden, wurde hier als Stressor Lactacystin, ein Hemmer des proteasomalen Proteinabbaus, eingesetzt. Um den Einfluss von Lactacystin auf die Zytotoxizität der Zellen zu messen, wurde der LDH-Wert der Lactacystin (Calbiochem, Schwalbach) behandelten Zellen mit dem LDH-Wert der DMSO-Kontrolle verglichen (da Lactacystin in DMSO gelöst wird). Daraus ergab sich eine Zytotoxizität in Prozent verglichen mit der Zytotoxizität der Kontrolle.

Stabil exprimierende 14-3-3zeta-like Zellen wurden in einem Volumen von 100 μl in eine 96-well-Platte (30000 Zellen pro Vertiefung) ausplattiert. Nach dem Anheften der Zellen (für mehrere Stunden oder Inkubation über Nacht) wurde der Stressor zugegeben: 5 μM Lactacystin bei einer Inkubation für 24 h, 10 μM bei einer Inkubation für 13 h. Als Kontrolle für das in DMSO gelöste Lactacystin wurde die Menge an DMSO verwendet, die in der Lactacystinlösung enthalten war. Die Zellen wurden je nach Lactacystin Menge 13-24 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Nach der Inkubation wurde die Platte kurz zentrifugiert und 50 μl des zellumgebenden Mediums entnommen und in eine 96-well-Platte mit flachem Boden pipettiert. Der flache Boden ist für die photometrische Messung notwendig. Dem abgenommenen Medium wurden 100 μl des LDH Reaktionsmix und 50 μl Wasser zugegeben. Nach einer 5 minütigen Inkubation im Dunkel wurde die Absorption der Lösung bei 490 und 610 nm (Referenzwellenlänge) im 5 min Takt über 40 min gemessen. Die Zeitintervalle wurden so gewählt, um eine optimale Messung zu

erreichen. Je nach Menge des LDHs kann ein zu starker Farbumschlag im dunkelroten Bereich eine zu hohe OD in einem nicht mehr messbaren Bereich erzielen. Anschließend wurde die LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle berechnet.

Zellstressexperimente: MTT-Proliferations-Test

Der MTT Proliferations-Test ist ein Verfahren, bei dem die Proliferationsrate und Vitalität der Zellen anhand der Menge des, von metabolisch aktiven Zellen, in lila Formazan-Kristalle umgewandelten gelben Tetrazolium Salzes MTT gemessen wird.

Stabile 14-3-3zeta-like Zelllinien wurden in einer Konzentration von 30000 Zellen pro Vertiefung in eine 96-well-Platte (mit flachem Boden) in einem Volumen von 100 µl Kulturmedium (DMEM mit 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Um zellulären Stress zu induzieren, wurden dem Medium für 18 h verschiedene Stressoren zugegeben (Liste s.u.). Anschließend wurden 10 µl MTT (Endkonzentration 0,5 mg/ml) zugegeben und für 4 h inkubiert. In dieser Zeit bilden metabolisch aktive Zellen aus dem Tetrazolium-Salz Formazan-Kristalle, die durch Zugabe von 100 µl Löslichkeitspuffer (im Kit-System enthalten) über Nacht bei 37°C gelöst werden. Die entstehende farbige Lösung wird mit einem Plattenreader (MWG Sirius HT) quantifiziert. Die optische Dichte wird bei den Wellenlängen 580 nm (Probe) und 680 nm (Referenz) gemessen und die Zellaktivität von gestressten Zellen in % der Kontrolle (stabil transfizierte Zellen kultiviert ohne Stressor) spezifiziert. Dabei wurden die Zelllinien, die das Wildtyp-Protein exprimierten, mit denen verglichen die das mutierte Protein exprimierten und die Daten mit ANOVA auf ihre Signifikanz analysiert.

Stressoren:

600 µM SNAP (Alexis)

200 µM H₂O₂

300 mM Sorbitol (Sigma-Aldrich),

2 µM MMS (Methyl-Methansulfonat, Roth),

10 µM MG132 (Z-LL-al, Sigma-Aldrich)

2.2.4 Molekulargenetische Methoden

Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Durch Messung der optischen Dichte (OD) mit einem Spektralphotometer (Eppendorf) wurde der DNA-Gehalt bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht bei einer Wellenlänge zwischen 250 und 270 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Bei 260 nm gemessen entspricht ein Absorptionswert von 1 einer doppelsträngigen DNA Konzentration von 50 ng/µl. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäuren. Er sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

Gemessen wurde in einem Volumen von 60 µl in 1 cm Einwegküvetten (Eppendorf).

Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder durch eine Ethanol-Fällung oder mit dem QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden).

Beim QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen) werden Zentrifugationssäulen verwendet, deren Silikatmembran bei hohen Salzkonzentrationen eine starke Affinität zu Nukleinsäuren aufweist und diese bindet. Die DNA wird eluiert, indem man die Salzkonzentration mit EB-Puffer oder H₂O senkt. Mit diesem Verfahren soll das PCR-Produkt von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt werden.

Die Aufreinigungen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Da das Verfahren mittels Zentrifugationssäulen schnell ist, ist es gut für die Reinigung von DNA oder für einen Pufferaustausch geeignet, kann jedoch durch eine kostengünstigere Ethanol-Fällung ersetzt werden. Die Ethanol-Fällung der DNA wurde vor allem zur Senkung des Salzgehaltes eingesetzt. Ein hoher Salzgehalt kann z.B. bei einer Transformation von Bakterien mittels Elektroporation störend wirken. Bei einer Ethanol-Fällung wurden ein Zehntel des Volumens 3 M Na₂Acetat-Lösung pH 5,2 und drei Volumenteile 100 %igen Ethanols zugegeben und die DNA für eine Stunde oder besser über Nacht bei -20°C gefällt. Die DNA wurde bei 4°C und 16000 x g für 30 min zentrifugiert, das Sediment zweifach mit 100 µl 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend jeweils 15 min zentrifugiert und

der Überstand verworfen. Ethanol-Reste wurden durch Trocknen des DNA-Sediments mit einem Vakuum-Konzentrator (Eppendorf) entfernt und anschließend die DNA in H₂O_{bidest} resuspendiert.

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde mit 1,5 %igen Agarosegelen durchgeführt. 600 mg Agarose wurden mit 40 ml 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle erhitzt und gelöst. Nach dem Abkühlen unter 60°C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid-Stocklösung (10 mg/ml H₂O_{bidest}) zugegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und in eine Gelkammer (Peqlab, Erlangen) gegossen. Nach 30 min war das Gel fest und konnte verwendet werden. Die Gelkammer wurde mit 1x TAE gefüllt, die Proben mit Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als Längenmarker wurden, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente, entweder der λ Hind III (MBI Fermentas St. Leon-Rot) oder der 100 bp-DNA-Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 80V für 30-40 min.

Klonierung

Schema der Einzelschritte einer Klonierung

1.1 Vorbereitung des Inserts

- Amplifikation des Inserts mittels PCR
- Schneiden des PCR Produkts mit den jeweiligen Restriktionsenzymen
- Reinigung des Inserts über Gelextraktion

1.2 Vorbereitung des Vektors

Verdau mit den Restriktionsenzymen über deren Schnittstellen das Insert in die Multiple cloning side eingebracht werden soll

2. Vektor und Insert werden zur Mengenabschätzung auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen oder die DNA Mengen mittels eines Spektralphotometers bestimmt.
 3. Ligation von Vektor und Insert im Mengenverhältnis 1:4
 4. Transformation in elektro- oder chemokompetente DH5 α -Zellen. Ausplattieren der Bakterien
-

5. Picken der Klone, Colony-PCR und Animpfen von LB-Medium
6. Kontrolle, ob das Insert im Vektor enthalten ist, entweder durch Colony-PCR oder durch Plasmidpräparation mit anschließendem Verdau der Plasmide, um das Insert auszuschneiden. Auftrag auf 1,5 %iges Agarosegel
7. Sequenz-Kontrolle, um Lesefehler der Polymerase auszuschließen
8. Glycerinkultur der insertpositiven Klone

Insert-Amplifikation mit Pwo-DNA-Polymerase

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden mit Primern, die die entsprechenden Schnittstellen enthalten, amplifiziert. Um Fehler bei der Amplifikation zu minimieren wurde eine Pwo *proofreading* Polymerase verwendet.

Pipettierschema für die Insert-Synthese in einem Volumen von 20 μ l

		Endkonzentration	Hersteller
Template	x μ l	20 ng	
10 x Puffer	2 μ l	1x	PeqLab
dNTP Mix (10 mM)	0,4 μ l	0,2mM	Invitrogen
vorwärts Primer (10 μ M)	1 μ l	0,5 μ M	metabion
rückwärts Primer (10 μ M)	1 μ l	0,5 μ M	metabion
Pwo-Polymerase (1U/ μ l)	0,5 μ l	0,5 U	PeqLab
H ₂ O _{bidest}	ad 20 μ l		

Cycler-Programm:

94°C-2 min

94°C-15 sec, 58°C-30 sec, 72°C-1 min 30 sec 30 Zyklen

72°C-7 min, 4°C hold

Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und richtet sich nach dem GC-Gehalt der Primer. Die Elongationszeit hängt von der Größe des Amplifikats ab. Zur Kontrolle der PCR 2 μ l PCR-Produkt auf ein 1,5 %iges Agarosegel auftragen.

Präparativer Restriktionsverdau: Vorbereitung von Insert und Vektor

Vektor und Insert wurden über die Restriktionsenzyme verdaut, deren Erkennungssequenz dem Insert in einer PCR angefügt wurde. Der Verdau erfolgte über Nacht nach Angaben des Herstellers im Temperaturoptimum der Enzyme.

Vektor und Insert wurden durch den Verdau linearisiert und anschließend über eine Gelextraktion aufgereinigt.

Verdau des Vektors:

Plasmid-DNA (100-200 ng)	x µl (100-200 ng)
Restriktionsendonuklease 1	x µl (Menge abhängig von der Konzentration des Enzyms)
Restriktionsendonuklease 1	x µl (Menge abhängig von der Konzentration des Enzyms)
10x Enzympuffer	2,0 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Verdau des Vektors:

PCR-Produkt	18 µl
Restriktionsendonuklease 1	x µl (Menge abhängig von der Konzentration des Enzyms)
Restriktionsendonuklease 1	x µl (Menge abhängig von der Konzentration des Enzyms)
10x Enzympuffer	2,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl

Um Enzym und Nukleotidreste nach dem Verdau zu beseitigen, wurde eine Gelextraktion durchgeführt.

Zusätzliche Methoden zur Ligations-Vorbereitung von Vektor und Insert

Um eine Religation der Vektoren zu verhindern, wurde der Vektor mit einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

Dafür standen zwei Methoden zur Verfügung:

SAP-Dephosphorylierung

26 µl Vektor-DNA

3 µl 10 x SAP-Puffer

1 µl SAP

Inkubation bei 37°C für 1h, anschließend Hitzeinaktivierung bei 65°C für 15 min.

CIP-Dephosphorylierung

26 µl Vektor-DNA

3 µl 10 x CIP-Puffer

1 µl CIP

Inkubation bei 37°C für 1h, Reinigung des Vektors über PCR-Purifikation Kit oder Gelextraktion notwendig, da dieses Enzym hitzestabil ist.

Phosphorylierung der Inserts

Um Restriktionsenzym-Schnittstellen an Zielsequenzen anzubringen wurden diese mit Primern, die die jeweilige Schnittstelle enthielten amplifiziert. Das Insert muss dann phosphoryliert werden, wenn keine phosphorylierten Primer verwendet wurden und man den Vektor dephosphorylieren möchte. Die De- bzw. Phosphorylierung ist eigentlich nicht notwendig, wenn ein Vektor mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut wurde, da dann eigentlich eine Religation ausgeschlossen sein sollte.

Phosphorylierungsansatz mit der T4-Polynukleotid-Kinase (MBI Fermentas St. Leon-Rot)

Insert	x µl (5 µg)
PNK-Puffer A	2,0 µl
100 mM ATP	0,5 µl (2,5mM ATP)
T4-Polynukleotid-Kinase (PNK, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)	2,0 µl (20U)
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch 1 µl 0,5 M EDTA inaktiviert. Anschließend wurde eine Ligation des dephosphorylierten Vektors mit dem phosphorylierten Insert durchgeführt.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA aus einem Agarosegel wird der QIAquick Gel Extraction Kit, nach Angaben des Herstellers, verwendet (Qiagen).

Um die DNA zu eluieren wurden 25 µl H₂O_{bidest} auf die Silikatmembran gegeben, diese für 2 min inkubiert und anschließend für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert.

Ligation von Vektor und Insert

Vektor und Insert wurden zur Mengenabschätzung auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen oder die DNA Mengen mittels eines Spektralphotometers bestimmt. Ligation von Vektor und Insert erfolgte im Mengenverhältnis 1:4 (1:3-1:5)

x μ l Insert (400 ng-1 μ g)

y μ l Vektor (100-250 ng)

1 μ l T4-Ligase (5U/ μ l, MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

1 μ l T4-Ligase-Puffer

ad 10 μ l H₂O_{bidest}

Die Ligation erfolgt bei 16°C für 12 h. Anschließend wurde eine Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C für 15 min durchgeführt. Danach wurde eine Transformation in Bakterien durchgeführt.

Analytischer Restriktionsverdau zur Insert-Analyse

Zur Kontrolle, ob die Klonierung gelungen und das Insert erfolgreich in den Vektor eingebracht wurde, wurde nach der Plasmidpräparation ein analytischer Kontrollverdau durchgeführt. Dabei wurde das Insert über die Schnittstellen, die für die Klonierung verwendet wurden, wieder ausgeschnitten. Auf diese Art und Weise kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Insert bei der Klonierung mehrfach eingebracht wurde. Besser ist der Verdau mit Restriktionsenzymen, bei denen ein Enzym im Vektor und das andere im Insert schneidet. Für den Verdau wurden 6 μ l Plasmid-DNA (100-200 ng), 2 μ l 10x Enzympuffer und jeweils 1 μ l der beiden Restriktionsendonukleasen mit H₂O_{bidest} auf ein Volumen von 20 μ l gebracht und gemischt. Der Verdau wurde je nach Temperaturoptimum des Restriktionsenzym und notwendiger Inkubationszeit durchgeführt. Anschließend wurden 10 μ l des Reaktionsansatzes mit 2 μ l 6 x Probenauftragspuffer versetzt, auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und eine Stromspannung von 80 V angelegt. Die Auswertung erfolgte über die Auflage des Gels auf einen UV-Tisch.

2.2.5 Biochemische Methoden

Protein-Mengen-Bestimmung nach Bradford

Die Protein-Mengen-Bestimmung nach Bradford basiert auf einer photometrischen Messung bei 595 nm und einem Nachweis von Farbstoff-Protein-Komplexen. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 ändert sein Absorptionsmaximum (von 465 nm zu 595 nm), wenn er an Protein bindet. Die Menge an Protein wird über den Vergleich mit einer Eichkurve, aus Proben mit definierter Proteinkonzentration, bestimmt.

Die Referenzproben und die zu messenden Proben wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 800 μl verdünnt, mit 200 μl Bradford-Färbereagenz versetzt, 5 min inkubiert und bei 595 nm in einem Spektralphotometer gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen.

Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für eine Größenauftrennung von Proteinen wurde eine eindimensionale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Ornstein, L. (1964) und Davis, B.J. (1964)) unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) durchgeführt. Aufgrund des unterschiedlichen pH-Wertes und der unterschiedlichen Porengröße zwischen Sammel- und Trenngel, wird die Auftrennung verbessert und ein schärferes Bandenmuster erzielt.

Für eine SDS-PAGE mit der Blue Vertical 100 Kammer von Serva wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Die Acrylamid-Konzentration (10-12,5 %) des Trenngels wurde in Abhängigkeit vom aufzutrennenden Molekulargewicht des Zielproteins gewählt. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, mit 1x PAGE gespült, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt. Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 30 μg Gesamtprotein mit Laemmli-Probenauftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Für eine Western-Blot-Analyse wurde zusätzlich zu den Proben eine Tasche mit 10 μl Multimark (Invitrogen) Größenstandard beladen, um die Proteinauftrennung verfolgen zu können und später eine Aussage über die Größe der aufgetrennten Proteine machen zu können. Sollte eine Coomassie-Färbung folgen, wurde stattdessen ein Broad-Range Marker aufgetragen. Die Auftrennung in Laufpuffer erfolgte bis zum Eingang in das Trenngel bei einer Stromstärke von 80V, anschließend bei 120V.

Darstellung aufgetrennter Proteine mittels Coomassie-Färbung

Das zu färbende SDS-Gel wurde 20 min in einem Bad mit Coomassie Färbelösung gefärbt und anschließend bis zur gewünschten Färbung durch mehrmaligen Wechsel der Entfärbelösung entfärbt (ca. 1 h). Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen angefeuchtete Geltrockenfolie (Promega) und diese zwischen Whatman-Papier gelegt und in einem Geltrockner bei 80°C für 1-1,5 h getrocknet. Dabei wurde die Flüssigkeit aus dem Gel entfernt und die Geltrockenfolie verklebt, so dass das Gel leichter für längere Zeit archiviert werden konnte.

Darstellung aufgetrennter Proteine mittels Elektroblothing und Immunodetektion von Proteinen /Western-Blot

Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Blotting-Apparatur (Blue Blot 100, Serva) auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran BA-S 85) überführt. Der Zusammenbau der Blotting-Apparatur erfolgt in folgender Reihenfolge: auf die schwarze Gittervorrichtung der Apparatur wurden ein in Transferpuffer eingeweichter Schwamm, zwei eingeweichte Whatman Papiere und die in Wasser und Transferpuffer equilibrierte Membran aufgelegt. Auf die Membran wurde das SDS-Gel nach der Entfernung des Sammelgels luftblasenfrei überführt. Den Abschluss bildeten wieder zwei, in Transferpuffer eingeweichte, Whatman Papiere, ein Schwamm und der weiße Teil der Gel-Apparatur. Bei einem Aufbau in dieser Reihenfolge ist zu beachten, dass das schwarze Gitter zum Pluspol zeigt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt, die Proteine bei 70 V für 2 h im 4°C Raum auf die Membran übertragen und der Größenstandard (Multimark) mit Kugelschreiber nachgezeichnet. Anschließend wurden die Proteine mittels Immunodetektion nachgewiesen. Die folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur und, für eine bessere Verteilung der Lösungen, auf einem Taumel-Gerät. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden, wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran durch zweistündige Inkubation in 4 % SlimFast-TBST abgesättigt. Durch kurzes Schwenken in TBST wurden Reste des Milchpulvers auf der Membran entfernt und der Primär-Antikörper verdünnt in TBST für 2 h zugegeben. Nach 3 x 5 minütigem Waschen mit TBST wurde der geeignete, in TBST verdünnte, Sekundär-Antikörper für 1 h zur Membran hinzugegeben. Haben Primär- und Sekundär-Antikörper ein Protein gebunden, kann dieses mit einem Chemilumineszenz-Kit

(ECL Western Blotting Detection Kit, Amersham) nach Angaben des Herstellers nachgewiesen werden. Dabei wandelt die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Peroxidase Lumiol um, welches dann durch Lichtemission einen Röntgenfilm belichtet (Hyperfilm ECL, Amersham). Die Entwicklung des auf die Membran aufgelegten Röntgenfilms (Zeit variiert je nach Stärke der Signale zwischen 10 sec und 2 min) erfolgte in einer Dunkelkammer mittels eines Entwicklergerätes (Curix 60, Agfa).

Zur Detektion des Western-Blots mit einem anderen Antikörper, wurden zunächst Primär- und Sekundär-Antikörper durch 5 minütiges Waschen der Nitrozellulose-Membran in TBST und 3 minütiger Inkubation in Stripping-Puffer bei Raumtemperatur entfernt. Durch Titration mit Natronlauge wurde der pH-Wert von 2,8 auf 7,4 eingestellt und nach intensivem Waschen mit TBST erneut mit dem Blocken der Membran und einer neuen Immunodetektion begonnen.

Aufreinigung von Proteinen aus eukaryontischen Zellen mittels Immunopräzipitation

Über eine Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern ist eine selektive Anreicherung von Proteinen und deren Interaktionspartnern möglich. Für die Überexpression der 14-3-3zeta-like Konstrukte in Zellkultur wurde der pcDNA 3.1-V5-His Vektor verwendet. Dem exprimierten 14-3-3zeta-like Protein hängt ein V5-Ankerprotein an. Dies ermöglicht die Aufreinigung der Fusionsproteine über eine V5-Agarose, bei der der V5-Antikörper an eine Agarose-Matrix gebunden ist. Zuerst wurde die V5-Agarose gewaschen, indem 1 ml PBS zugegeben, das Gemisch 5 min auf einem Rollrad inkubiert und schließlich die V5-Agarose bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert und im ursprünglichen Volumen in PBS aufgenommen wurde. Die Zellextrakte (500µg) wurden mit 30 µl gewaschener V5-Agarose gemischt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert, um das Zielprotein an die V5-Agarose zu binden. Am nächsten Tag wurde nach der Zentrifugation zunächst das ungebundene Protein abgenommen und 1-2 mal, wie bei der Vorbereitung der V5-Agarose, gewaschen und nach der Zentrifugation das PBS abgenommen. Um das Zielprotein von der V5-Agarose zu lösen, wurde die V5-Agarose in 20 µl Laemmli-Probenauftragspuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die V5-Agarose verbleibt dabei in den Taschen und hindert die Proteine nicht an ihrer Auftrennung. Anschließend konnte in einem Western-Blot entweder mit einem V5-Antikörper oder mit einem spezifischen Antikörper gegen das isolierte Protein detektiert werden.

Interaktion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen/ Co-Immunopräzipitation

Soll eine Interaktion zweier Proteine dargestellt werden, kann entweder auf eine Interaktion mit einem endogen exprimierten Protein getestet werden, oder die zwei Zelllysate überexprimierender Zelllinien werden gemischt. Dazu wurden die zwei Zelllysate 1 h auf einem Rollrad bei 4°C inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, eine Immunopräzipitation durchgeführt. Da man davon ausgeht, dass die Menge des interagierenden Proteins geringer ist als die des direkt an die V5-Agarose gebundenen Proteins, wurde bei der Detektion das Protein als erstes detektiert, welches nicht an die V5-Agarose gebunden vorliegt, sondern durch Interaktion an das V5-markierte Fusionsprotein aufgereinigt wurde. Erst nach dem Strippen des Blots wurde dann das V5-Fusionsprotein detektiert. Es ist auch möglich eine Probe zweimal auf ein SDS-Gel aufzutragen, die Blots auseinander zu schneiden und jede Hälfte mit einem anderen Antikörper zu detektieren. Dadurch kann sichergestellt werden, dass durch das *Strippen* der Protein-Verlust nicht zu hoch für einen Nachweis im Western-Blot ist.

Aufreinigung und Interaktion von Proteinen aus prokaryontischen Zellen

Das GST-System

Gene, die in die Multiple Cloning side des pGEX-Vektors eingebracht wurden, werden als Fusionsprotein aus dem gewünschte Protein und der Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert. Dieses Ankerprotein bindet an eine Glutathion-beladene Matrix und ermöglicht somit die Aufreinigung des Fusionsproteins. Soll das Ankerprotein nach der Isolierung abgespalten werden, kann aufgrund der PreScission-Protease Schnittstelle ein enzymatischer Verdau angeschlossen werden.

Herstellung des Bakterienlysats

Zur Expression der Proteine wurden die Vektoren durch Elektro- oder Hitzeschock in BL21-Zellen transformiert, die sich besonders gut zur Proteinsynthese eignen. Mit einer 5 ml Über-Nacht-Kultur wurden 50-100 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium angeimpft und bei 30°C in einem Bakterienschüttelinkubator bis zu einer OD600 von 0,6 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach zweistündiger

Inkubation im Bakterienschüttelinkubator wurden die Bakterien 10 min bei 10000 x g zentrifugiert und das Sediment in mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 1 ml PBS resuspendiert. Eine Ultraschallbehandlung (5 x 40 sec) auf Eis zerstört die Bakterienzellwände und gibt das synthetisierte Protein frei. Das Lysat wurde mit 0,5 % NP-40 versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien-Zell-Trümmer wurden 30 Minuten bei 15000 g, 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das so gewonnene Rohlysat entweder gleich weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

GST-Protein-Aufreinigung

Um die Fusionsproteine über ihren GST-Anker vom Rohlysat zu trennen, wurden entweder magnetische *GST-Beads* (GSTMag Agarose-Beads, Novagene) oder GST-Sepharose (Amersham) verwendet. In beiden Fällen bindet das Fusionsproteine an die *Beads* und wird entweder durch Zugabe eines glutathionhaltigen Elutionspuffers oder durch Kochen der *Beads* eluiert.

Die 25 µl magnetischen *GST-Beads* wurden 3 mal mit GST-Wasch/-Binde-Puffer gewaschen und im ursprünglichen Volumen in GST-Wasch/-Binde-Puffer aufgenommen. Die *Beads* wurden zusammen mit 500 µl Rohlysat für 3 Stunden oder über Nacht bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. In diesem Vorgang bindet das Fusionsprotein an die *Beads*. Um ungebundenes Protein zu entfernen, wird zunächst der Überstand entfernt und die *Beads* 3-5 mal mit 1 ml GST-Wasch/-Binde-Puffer mit 1 % NP-40 gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte wahlweise entweder über das Erhitzen der *Beads* in 80 µl 1x Probenauftragspuffer auf 99°C für 5 min oder über die Zugabe von Elutionspuffer mit 10 mM Glutathion und einer Inkubation von 10 min auf einem Rollrad bei Raumtemperatur. Bei dieser Art der Elution wurde der Probenauftragspuffer anschließend hinzugegeben und das Gemisch für 5 min auf 99°C erhitzt. Eine dritte Alternative für die Elution ist die Inkubation der *Beads* für 4 h bei 4°C mit PreScission-Protease-haltigem Cleavage-Puffer. Damit verbleibt das GST-Protein an den *Beads* und das Ziel-Protein wird eluiert. Soll das aufgereinigte Protein nicht auf ein SDS-Gel aufgetragen, sondern z.B. für einen Aggregationsversuch verwendet werden, bietet es sich an, dass Protein entweder direkt mit einem PreScission-Protease-haltigen Puffer zu eluieren oder das Fusionsprotein mit einem Glutathion-haltigen Elutionspuffer von den *Beads* zu waschen, dem Eluat die PreScission-Protease zuzugeben und dann das GST-Protein alleine erneut an *Beads* zu binden. Der Verbrauch der *GST-Beads* ist dadurch jedoch höher.

Proteinaggregations Versuche

Um das Verhalten von 14-3-3 Proteinen in Gegenwart von aggregiertem Protein und eventuell eine chaperonähnliche Proteinfunktion analysieren zu können, wurde ein Alkoholdehydrogenase-Aggregations-Versuch in Anlehnung an bereits publizierte Alkoholdehydrogenase- oder Insulin-Aggregations-Versuche (Souza *et al.* 2000, Guha *et al.* 1998) konzipiert.

30µM des isolierten 14-3-3zeta-like Proteins in PBS Puffer wurden auf ein Volumen von 99 (bei der Messung mit dem MWG Sirius HT Platten-Spektralphotometer) oder auf ein Volumen von 990 µl (bei der Messung in einer 1 ml Kuvette mit dem Ultraspec 3100pro von Amersham) verdünnt und in eine Vertiefung einer 96-*well*-Platte oder in eine Kuvette vorgelegt. Je nach Volumen wurden 1 oder 10 µl einer 200 µM Alkoholdehydrogenase- 6 M Guanidinhydrochlorid Lösung zugegeben. Bei diesem Schritt begann die chemisch induzierte Proteinaggregation der Alkoholdehydrogenase durch das Absenken der Guanidinhydrochlorid Konzentration auf 0,06µM. Die Proteinaggregation wurde bei 320 nm im Abstand von 1 min über einen Zeitraum von 40 min (bei RT) gemessen. Dieser Versuch wird mehrmals mit Proteinen unterschiedlicher Proteinisolierungen durchgeführt.

Immunologische Darstellung von Proteinen in Zellen mittels Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung der Lokalisation von verschiedenen Proteinen *in vivo* wurden fluoreszierende Antikörper eingesetzt, um die Proteine anzufärben und mit einem Fluoreszenz-Mikroskop zu detektieren.

In eine 6-*well*-Platte wurden Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen gelegt, darauf Zellen ausgesät und diese bis zur 50 %igen Konfluenz zwei bis drei Tage kultiviert.

Die folgenden Schritte wurden zu besserer Verteilung der Lösungen auf einem Taumelgerät durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml 4 % (w/v) Paraformaldehyd-PBS Lösung 10 min fixiert. Um die Zellen zu permeabilisieren und somit das Eindringen des Antikörpers zu erleichtern, wurden die Zellen 10 min mit 0,1 % (v/v) Triton inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen für Antikörper mit 5 % normalem Esel Serum in PBS (NDS, Dianova) für 20 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurde ein primärer Antikörper in 3 % NDS in PBS gegen das Protein, welches lokalisiert werden sollte, für zwei Stunden bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C zugegeben. Wurde für diesen Schritt ein Antikörper verwendet, der bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, wurde dieser Schritt im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen mussten dann nur 5 mal 5 min gewaschen werden und konnten anschließend gleich eingebettet und analysiert werden. Wurde ein unmarkierter Primäantikörper verwendet, musste nach dem Waschschrift ein fluoreszenzmarkierter Sekundäantikörper in 3 % NDS in PBS gegen den Wirt des Primäantikörpers für eine Stunde auf die Zellen gegeben werden. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen auf Objekträger mit Einbettmedium aus MOWIOL mit 2,5 % DABCO gelegt und die Ränder des Deckgläschens mit farblosem Nagellack versiegelt. Nachdem der Nagellack getrocknet war, wurde das Präparat mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan 2 Imaging, Carl Zeiss) und einer Kamera (Spectra Cube, Applied Spectral Imaging) analysiert. Für eine detailliertere Darstellung wurde ein Zeiss LSM510 Fluoreszenz-Mikroskop verwendet, bei dem eine Zelle im nm Bereich durch Schichtaufnahmen unterteilt werden kann und somit eine räumliche Darstellung von Proteinen erlaubt.

3 ERGEBNISSE

3.1 14-3-3 Proteine als Kandidatengene für die Parkinson'schen Erkrankung

Die Ätiologie des Parkinson-Syndroms ist noch weitgehend ungeklärt, auch wenn man derzeit von einem Zusammenspiel aus Umwelt- und genetischen Faktoren ausgeht (McCall *et al.* 2001). Mit der Entdeckung des *α-Synuklein* Gens als Genort für eine autosomal dominante Form der Parkinson'schen Erkrankung wurde der erste wirkliche Beweis für eine familiäre Form der Parkinson'sche Erkrankung erbracht (Polymeropoulos *et al.* 1996 und 1997). Somit wurde der Grundstein für die Suche nach weiteren Kandidatengenen für die Parkinson'sche Erkrankung gelegt. Ein Kandidatengen ist das 14-3-3 Protein.

Bei der Analyse von 14-3-3 Genen wurden in Vorarbeiten zu dieser Arbeit zwei neue 14-3-3 Gene identifiziert, die sich auf dem Chromosom 10 (Accession XM_005100) und dem X Chromosom (Accession XM_018019) befinden und eine hohe Homologie zur 14-3-3zeta-Isoform zeigen (persönliche Mitteilung K. Herrmann und C. Holzmann, Universität Rostock). Aufgrund dieser Ähnlichkeit zur zeta-Isoform, wurden die homologen Gene mit 14-3-3zeta-like benannt. 14-3-3zeta-likeX unterscheidet sich in 9 Aminosäuren von der zeta-Isoform, 14-3-3zeta-like10 hingegen nur in 5 Aminosäuren (Bild 3-1). Somit ist die 14-3-3zeta-likeX zu 96 % und die 14-3-3zeta-like10 zu 98 % mit der 14-3-3zeta Form identisch. Dies zeigt eine hohe Homologie der *14-3-3zeta* und der *14-3-3zeta-like* Gene an. Vergleicht man die 14-3-3zeta Form des Menschen mit der von *Drosophila* so stimmen diese nur in 81 % überein. (Kockel *et al.* 1997).

Die *14-3-3zeta-like* Gene wurden mittels semiquantitativer PCR auf ihre Expression in unterschiedlichem Gewebe getestet (persönliche Mitteilung K. Herrmann und C. Holzmann, Universität Rostock). Die stärkste Expression wurde dabei im Gehirn festgestellt (Bild 3-2). Reamplifikation und Sequenzierung bestätigten die Expression der *14-3-3zeta-like* Gene. Anschließend wurden DNA-Proben von Parkinson-Patienten mittels SSCP-Analysen auf Mutationen in 14-3-3 Genen und dessen neuen homologen Genen untersucht. Im *14-3-3zeta* Gen konnte keine Mutation gefunden werden, dafür in den 14-3-3zeta homologen Genen. Für die Mutationssuche wurden DNA Proben von 303 deutschen Patienten mit ideopatischem Parkinsonsyndrom analysiert. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 55,9 Jahren ($\pm 11,45$). Bei 56 dieser Patienten war eine Häufung in der Familie festgestellt worden. Keiner der Patienten war Träger einer Mutation in den Genen: *α-Synuklein*, *Parkin* oder *Ubiquitin C-*

terminale Hydrolase L1. Als Kontrollen dienten gesunde, deutsche Individuen der „Augsburg Elderly“ Studie (Rothdach *et al.* 2000) ohne Parkinson-Kardinalsymptome und mit einem Durchschnittsalter von 72 Jahren ($\pm 4,34$).

Mit SSCP-Analysen und anschließender Sequenzierung konnten zwei Mutationen in 14-3-3zeta-like Genen identifiziert werden. Ein c.95A>G Austausch im 14-3-3zeta-likeXwt Gen hat einen Aminosäureaustausch p.Gln32Arg zur Folge (14-3-3zeta-likeXmut). Im 14-3-3zeta-like10wt Gen wurde eine Deletion einer Base, c.98delG (p.Gly33fs), gefunden, bei der es zu einer Verschiebung des Leserahmens und im weiteren Verlauf der Sequenz zur Entstehung eines Stopcodon führt (E33fsX89).

Der Patient mit der 14-3-3zeta-like10del Mutation entwickelte die ersten Symptome mit 62 Jahren: einen Rigor und einen Ruhetremor bei dem auch der Kopf betroffen war. Die Symptome verschwanden unter einer L-Dopa Behandlung. Vater, Onkel und Schwester des Patienten waren ebenfalls betroffen und ein autosomal dominantes Vererbungsmuster war zu erkennen. Eine Tochter des Patienten war ebenfalls Mutationsträgerin, jedoch zum Zeit der Untersuchung mit 41 Jahren noch nicht erkrankt. Die Mutation wurde weder bei den 360 nicht betroffenen Kontrollen-Individuen noch bei 305 Ataxie-Patienten gefunden.

Die Mutation im 14-3-3zeta-likeX Gen wurde bei einer weiblichen Patientin gefunden, die erstmals mit 55 Jahren Symptome der Parkinson'sche Erkrankung entwickelte. Es war eine Verlangsamung der Bewegungen, eine Starre der rechten Gliedmaßen und ein Nachschleppen des rechten Beins zu erkennen. Bei einer Untersuchung im Alter von 59 Jahren waren die Symptome Rigor und Bradykinese deutlich sichtbar. Bei der Gangbewegung vielen die kleinen langsamen Trippelschritte, ein reduziertes Mischwingen der Arme und eine milder haltungsbedingter Tremor der rechten Seite auf. Eine Behandlung mit L-Dopa und dem Dopamin Agonisten Bromocriptin führte zu einer Besserung der Symptome. Psychiatrische Untersuchungen ergaben eine leichte Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses, leichte Depressionen und lebhaftere Träume. In ihrer Familie war bisher kein weiterer Parkinson-Fall aufgetreten. Die Mutation wurde nicht in den 226 Kontrollen noch bei einer Untersuchung von 107 Ataxie-Patienten gefunden, wodurch nicht von einem Polymorphismus auszugehen ist. Das Glutamin an dieser Stelle ist beim Menschen, der Maus und der Ratte konserviert (Bild 3-1) und deutet somit auf eine funktionelle Bedeutung der Mutation hin.

In wie weit die Mutationen für den Krankheitsverlauf bedeutend sind, soll mit den folgenden Untersuchungen analysiert werden.

Mus musculus	MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSIVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGAEKK
Rattus norvegicus	MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSIVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGAEKK
Homo sapiens	MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSIVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGAEKK
14-3-3 10wt	MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSIVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGAEKK
14-3-3 10del	MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSIVTEQELNYPMRKGISSQLLIKML
14-3-3 Xwt	MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSIVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGAEKK
14-3-3 Xmut	MDKNELVQKAKLAEQAERYDDMAACMKSIVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVSSIEQKTEGAEKK
Mus musculus	QQMAREYREKIEETELRDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYLMKMGDYYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQ
Rattus norvegicus	QQMAREYREKIEETELRDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYLMKMGDYYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQ
Homo sapiens	QQMAREYREKIEETELRDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYLMKMGDYYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQ
14-3-3 10wt	QQMAREYREKIEETELRDICNDVLSLLEKFLIPNASQAESKVFYLMKMGDYYRYLAEVAAGDDKKGIVDQSQQAYQ
14-3-3 10del	-----
14-3-3 Xwt	QQMAREYREKIVDTELRDICNDVLFLEKFLIPASQAESKVFSLKMKGDYYHYLAEVATGDDKKGIVDQSQQAYQ
14-3-3 Xmut	QQMAREYREKIVDTELRDICNDVLFLEKFLIPASQAESKVFSLKMKGDYYHYLAEVATGDDKKGIVDQSQQAYQ
Mus musculus	EAFEISKKEMQPTHP IRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRDNL
Rattus norvegicus	EAFEISKKEMQPTHP IRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRDNL
Homo sapiens	EAFEISKKEMQPTHP IRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRDNL
14-3-3 10wt	EAFEISKKEMQPTHP IRLGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRDNL
14-3-3 10del	-----
14-3-3 Xwt	EAFEISKKEMQPTHP IRLPGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRDNL
14-3-3 Xmut	EAFEISKKEMQPTHP IRLPGLALNFSVFYYEILNSPEKACSLAKTAFDEAIAELDTLSEESYKDSLIMQLLRDNL
Mus musculus	TLWTSDTQGDEAEAGEGGEN
Rattus norvegicus	TLWTSDTQGDEAEAGEGGEN
Homo sapiens	TLWTSDTQGDEAEAGEGGEN
14-3-3 10wt	TLWTSDTQADEGEAGEGVEN
14-3-3 10del	-----
14-3-3 Xwt	TLWTSDTQGDEAEAGEGGEN
14-3-3 Xmut	TLWTSDTQGDEAEAGEGGEN

Bild 3-1 Aminosäuresequenzvergleich der 14-3-3zeta Proteine unterschiedlicher Spezies.

Vergleich der 14-3-3zeta Aminosäuresequenz von *Mus musculus* (accession BAA13421), *Rattus norvegicus* (accession BAA04534), human (accession PSHUAM) und der 14-3-3zeta-like Sequenzen (10wt, 10del, Xmut, Xwt). 14-3-3zeta Proteins sind hoch konservierte Proteine mit großer Sequenz-Homologie zu den 14-3-3zeta-like Proteinen. Übereinstimmende Aminosäuren sind grau hinterlegt dargestellt, unterschiedliche Aminosäuren sind weiß hinterlegt gekennzeichnet.

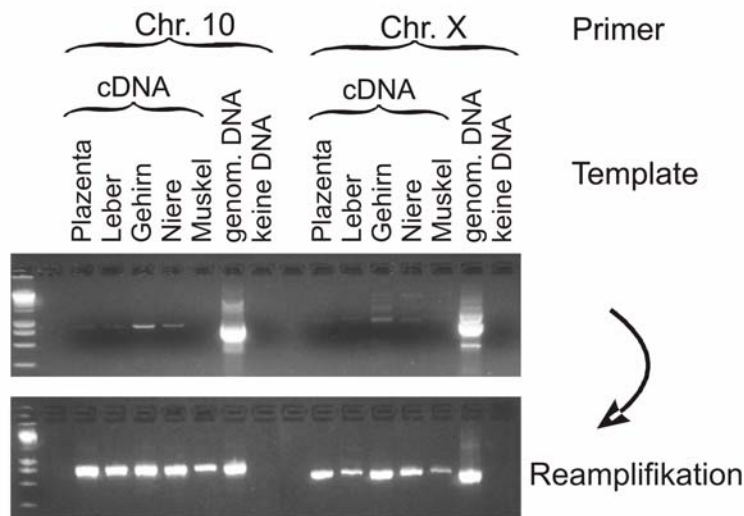


Bild 3-2 Gewebsspezifische Expression von 14-3-3zeta-like.

Die Expression von *14-3-3zeta* homologen Gene wurde durch die Amplifikation von cDNA unterschiedlichen Gewebes nachgewiesen. Durch eine Reamplifikation und anschließender Sequenzierung konnte sichergestellt werden, dass die PCR-Banden die richtigen Gene repräsentierten (Bild C. Holzmann, Universität Rostock).

3.1.1 Zusammenfassung

14-3-3 Proteine sind bekannt als Regulatoren der Zellteilung, der Signaltransduktion und der Apoptose und fungieren als Chaperone und als Adaptermoleküle für Protein-Protein Interaktionen. Bei der Analyse von 14-3-3 Genen wurden zwei neue 14-3-3 homologe Gene identifiziert, die sich auf dem Chromosom 10 (Accession XM_005100) und dem X Chromosom (Accession XM_018019) befinden. Die gewebsspezifische Analyse zeigt eine vorwiegend gehirnspezifische Expression von *14-3-3zeta-like*. Bei der Untersuchung von Parkinson-Patienten konnten in zwei Familien eine Mutation in einem *14-3-3zeta-like* Gen gefunden werden. Es wird angenommen, dass α -Synuklein und 14-3-3 über die Bindung an Tyrosin-Hydroxylase die Dopaminsynthese regulieren. Dieser Schritt könnte von besonderer Bedeutung bei der Parkinson'schen Erkrankung sein. Mit den folgenden funktionellen Untersuchungen soll die Frage geklärt werden, in wie weit die gefundenen Mutationen an der Entwicklung der Parkinson'schen Erkrankung beteiligt sind.

3.2 Erzeugung von 14-3-3zeta-like Fusionsproteinen

Für verschiedene Verwendungszwecke sollten mehrere 14-3-3zeta-like Fusionsproteine hergestellt werden. Mit einem prokaryontischen GST-Expressionssystem sollten größere Mengen an Proteinen hergestellt werden. Die Protein-Expression und Untersuchung von Interaktionen in eukaryontischen Zellen ermöglichte ein His-Vektor. Ebenfalls für Untersuchungen in eukaryontischen Zellen, wie zum Beispiel der Analyse der Proteinlokalisierung, wurde ein fluoreszierendes 14-3-3-EGFP Fusionsprotein verwendet. Für eine Expression in Hefe und die Suche nach Interaktionspartnern wurden 14-3-3 Konstrukte in Aktivierungsdomäne- und Bindedomänevektoren inkloniert. Somit wurde eine Bandbreite von Vektoren ausgewählt um den verschiedensten Fragestellungen nachgehen zu können.

3.2.1 Herstellung eines 14-3-3zeta-like-GST- Fusionsproteins für die Proteinisolierung aus prokaryontischen Zellen

Das GST-System mit dem prokaryontischen pGEX-6-P2 Expressionsvektor ermöglicht die Herstellung großer Proteinmengen. Die Bakterien können in großen Volumina LB-Medium vermehrt werden. Die Proteinexpression wird über die Zugabe von IPTG gesteuert und das Fusionsprotein mittels seines GST-Ankerproteins und einer einer Glutathion-beladene Matrix aufgereinigt (siehe auch Kapitel 2.2.5). Anker- und Zielprotein können nach der Isolierung aufgrund einer PreScission-Protease Schnittstelle voneinander getrennt werden.

Um das GST-System nutzen zu können, mussten zunächst die 14-3-3zeta-like Konstrukte in den pGEX-6-P2 Vektor eingebracht werden. Dies wird im Folgenden näher beschrieben.

Klonierung in den pGEX-6-P2 Vektor für die Proteinexpression in Bakterien

Für die Klonierung wurden Primer mit Restriktionsenzym-Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *EcoRI* generiert. Da das Ankerprotein des pGEX-6-P2 Vektors N-terminal ist, konnten die 14-3-3zeta-like Konstrukte mit ihrem Stopcodon amplifiziert werden. Da die Sequenzunterschiede zwischen 14-3-3zeta-like10wt, -Xwt, -Xmut vor dem Stopcodon auftreten, dieses hier aber mitamplifiziert werden konnte, reichte ein *Reverse*- Primer für die drei Konstrukte. Für das deletierte 14-3-3zeta-like10del Konstrukt

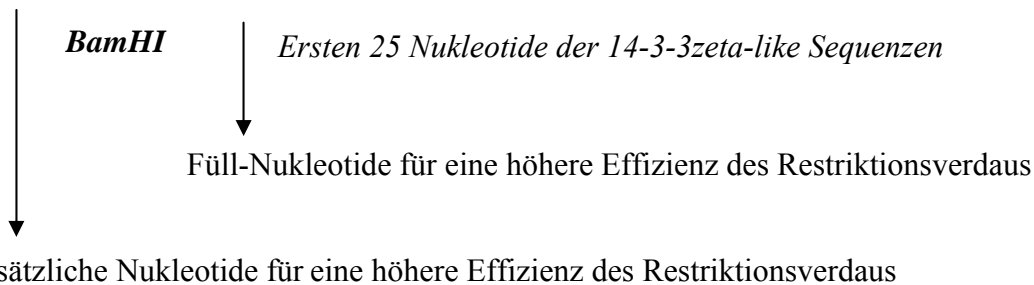
musste ein eigener *Reverse*- Primer angefertigt werden. Die Klonierung wurde anschließend mittels Sequenzanalyse überprüft.

Die Expression des Fusionproteins wurde in Bakterien überprüft und mittels Western-Blot-Analyse ausgewertet.

Primer für die Erzeugung von 14-3-3zeta-like Konstrukten mit *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle:

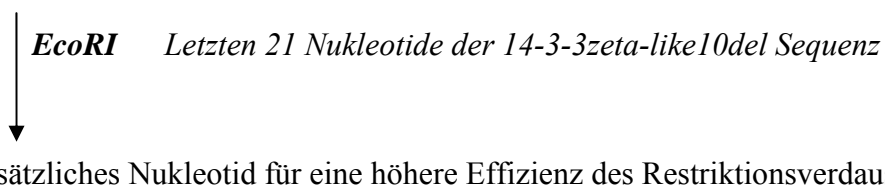
Forward-Primer mit *Bam*HI Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:

5'- **CGGGATCC**GC ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG-3'



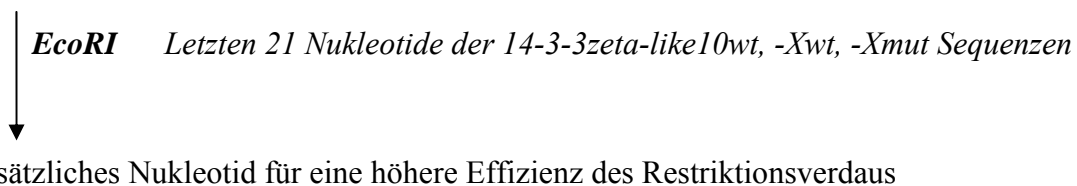
Reverse-Primer mit *Bam*HI Schnittstelle das 14-3-3zeta-like10del Konstrukt:

5'-**GGAATTC** CTG ACC TAT GGG CTC CTA CAA -3'



Reverse-Primer mit *Bam*HI Schnittstelle die 14-3-3zeta-like10wt, -Xwt, -Xmut Konstrukte:

5'-**GGAATTC** CTG GAA GGC CGG TTA ATT TTC -3'



3.2.2 Herstellung eines fluoreszierenden 14-3-3zeta-like-EGFP-Fusionsproteins für Zellkulturexperimente

Es gibt mehrere Methoden um Proteine in Zellen mikroskopisch sichtbar zu machen. Die Methode der Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit mehrfach für die Darstellung von Proteinen in Zellen verwendet. Jedoch sind bei dieser Methode sowohl die Fixierung der Zellen, wie auch eine aufwendige Antikörperfärbung nötig, bei der immer genau überprüft werden muß ob es sich um eine spezifische Färbung handelt. Eine Methode bei der diese Faktoren keine Rolle spielen, ist die Expression eines fluoreszierenden Fusionsproteins in der Zelle. Fluoreszierende Fusionsproteine zeichnen sich durch eine besonders intensive, spezifische und langlebige Fluoreszenz aus. Es wurden rot und grün fluoreszierende Fusionsproteine verwendet. Hier soll die Herstellung der grün fluoreszierenden Fusionsproteine unter Verwendung des pEGFP-N1 Vektors näher beschrieben werden. Bei einer Expression in Eukaryonten entsteht bei der Verwendung dieses Vektors ein Fusionsprotein aus dem 14-3-3zeta-like Protein und dem C-terminalen grünen Fluoreszenzprotein EGFP (enhanced green fluorescent protein). Über die grüne Fluoreszenz kann das Fusionsprotein mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Klonierung in den eukaryontischen pEGFP-N1 Vektor

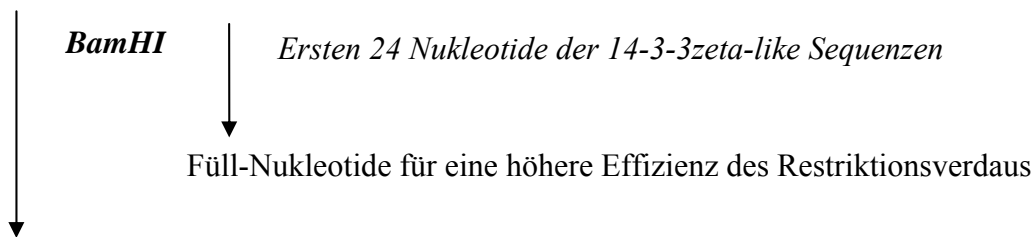
Im Gegensatz zum pGEX Vektor sind die Ankerproteine des pEGFP-N1 und des pcDNA3.1-V5-His Vektors C-terminal. Die 14-3-3zeta-like Konstrukte müssen also für die Klonierung ohne Stopcodon amplifiziert werden. Da die Sequenzunterschiede zwischen 14-3-3zeta-like10wt, -Xwt, -Xmut vor dem Stopcodon auftreten und das Stopcodon bei den Klonierungen in die Vektoren pEGFP-N1 und pcDNA3.1-V5-His nicht amplifiziert werden durfte, mussten für das 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt ein anderer Primer als für die 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut Konstrukte unterschiedliche Primer generiert werden. Bei der Wahl der Primersequenz war darauf zu achten, dass der Leserahmen erhalten bleibt, dass das Stopcodon am Ende der 14-3-3zeta-like Sequenz entfernt wird, um eine Expression des grünen Fluoreszenzproteins zu ermöglichen, und dass möglichst geeignete Nukleotide um die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym eingebaut werden, um die Effizienz des Restriktionsverdau zu optimieren. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Age*I wurden über eine PCR an die 14-3-3zeta-like Konstrukte angefügt, so dass die Konstrukte in den pEGFP-N1 Vektor inkloniert werden konnten. Die Sequenz wurde über

eine Sequenzierung kontrolliert und die Expression des grün fluoreszierenden Fusionsproteins in HEK Zellen überprüft.

Primer für die Erzeugung von 14-3-3zeta-like Konstrukten mit *Bam*HI- und *Age*I-Schnittstelle:

Forward-Primer mit *Bam*HI Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:

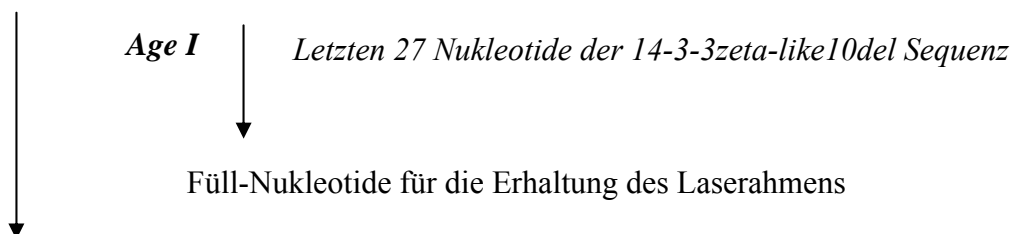
5'- CGGGATCCCGC ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG-3'



Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz des Restriktionsverdaus

Reverse-Primer mit *Age*I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10del Konstrukt:

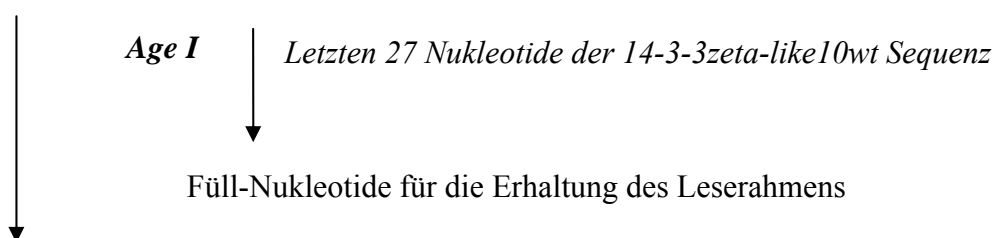
5'-GTCCACCGGTGG CAA CAT TTT TAT AAG CAA CTG AGA GGA -3'



Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz des Restriktionsverdaus

Reverse-Primer mit *Age*I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt

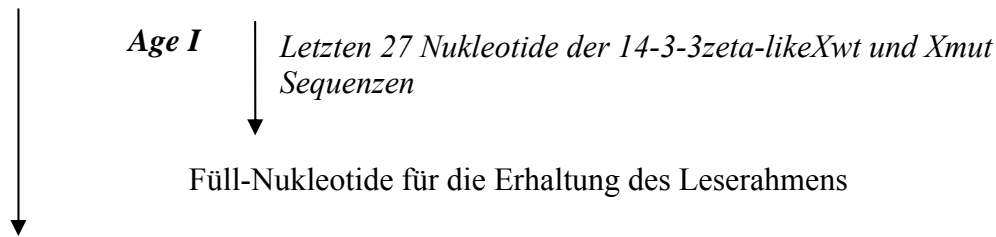
5'- GTCCACCGGTGG ATT TTC CAC TCC TTC TCC TGC TTC ACC -3'



Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz des Restriktionsverdaus

Reverse-Primer mit Age I Schnittstelle für die 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut Konstrukt

5'- GTCC**ACCGGTGG** ATT TTC CCC TCC TTC TCC TGC TTC AGC -3'



Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz des Restriktionsverdaus

3.2.3 Herstellung eines 14-3-3zeta-like-His- Fusionsproteins für die Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen und Protein-Protein-Interaktions-Versuche

Die Verwendung eines Fusionsproteins aus eukaryontischer Expression bietet sowohl die Möglichkeit mittels einer Immunopräzipitation eine selektive Anreicherung von Proteinen und deren Interaktionspartner zu ermöglichen, als auch die Darstellung von Proteinen in Zellen mittels Immunfluoreszenz. Soll eine Interaktion zweier Proteine dargestellt werden, kann entweder auf eine Interaktion mit einem endogen exprimierten Protein getestet werden oder zwei Zelllysate überexprimierender Zelllinien werden gemischt. Die Fusionsproteine und deren Interaktionspartner werden über eine Antikörper-Agarose-Matrix gebunden und mittels Western-Blot-Analyse dargestellt. In dieser Arbeit wurde für die Expression des 14-3-3zeta-like Proteins in Zellkultur der pcDNA 3.1-V5-His Vektor und für die Isolierung des Proteins eine V5-Agarose verwendet.

Klonierung in den eukaryontischen pcDNA3.1-V5-His Vektor

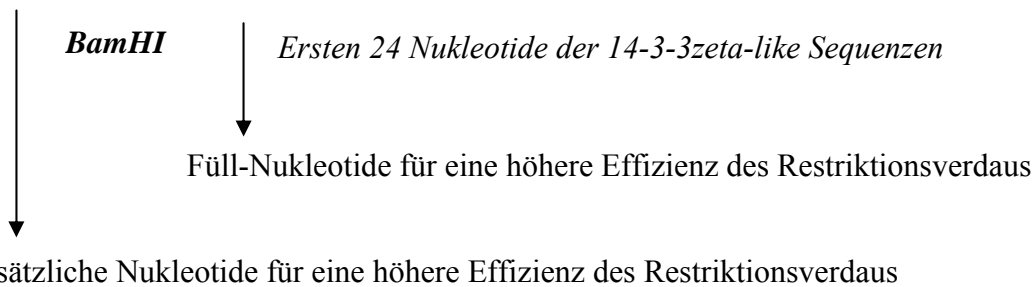
Über die Multiple cloning side des pcDNA3.1-V5-His Vektors und die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *EcoRI*, die in einer PCR an die 14-3-3zeta-like Konstrukte angefügt werden, konnten die 14-3-3zeta-like Konstrukte in den pcDNA3.1-V5-His Vektor eingebracht werden. Bei einer Expression in Eukaryonten entsteht ein Fusionsprotein aus dem 14-3-3zeta-like Protein und dem C-terminalen Epitop für die Erkennung mit einem V5- oder einem His-Antikörper. Auf diese Weise kann in Zellkultur exprimiertes 14-3-3zeta-like-V5-His Protein aufgereinigt und z.B. für eine Coimmunopräzipitation verwendet werden.

Wie schon bei der Klonierung in den pEGFP-N1 Vektor ist bei der Wahl der Primersequenz darauf zu achten, dass der Leserahmen erhalten bleibt, dass das Stopcodon am Ende der 14-3-3zeta-like Sequenz entfernt wird, um eine Expression Fusionsproteins zu ermöglichen, und dass möglichst geeignete Nukleotide um die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym eingebaut werden, um die Effizienz des Restriktionsverdau zu optimieren. Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung kontrolliert und die Expression des 14-3-3-V5-His Proteins in HEK Zellen mittels Western-Blot-Analyse überprüft.

Primer für die Erzeugung von 14-3-3zeta-like Konstrukten mit *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstelle:

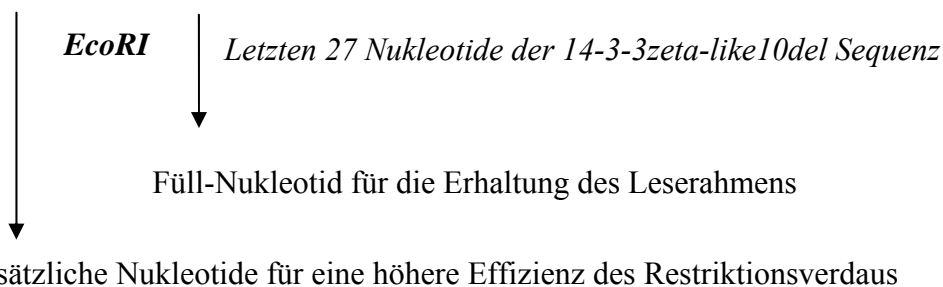
Forward-Primer mit *Bam*HI Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:

5'- CGGGATCCCGC ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG-3'

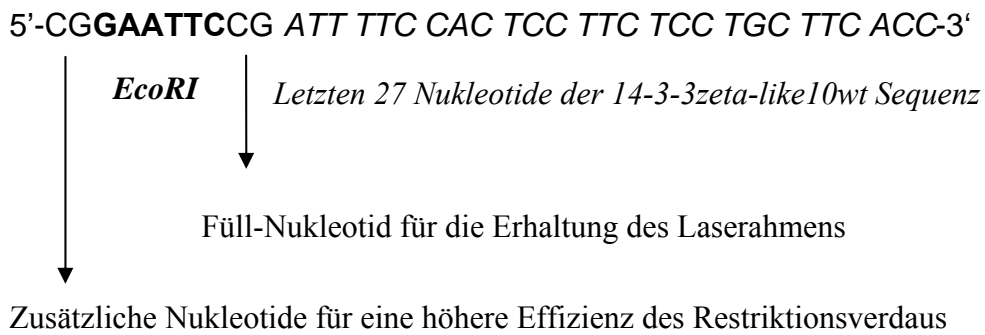


Reverse-Primer mit *Eco*RI Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10del Konstrukt:

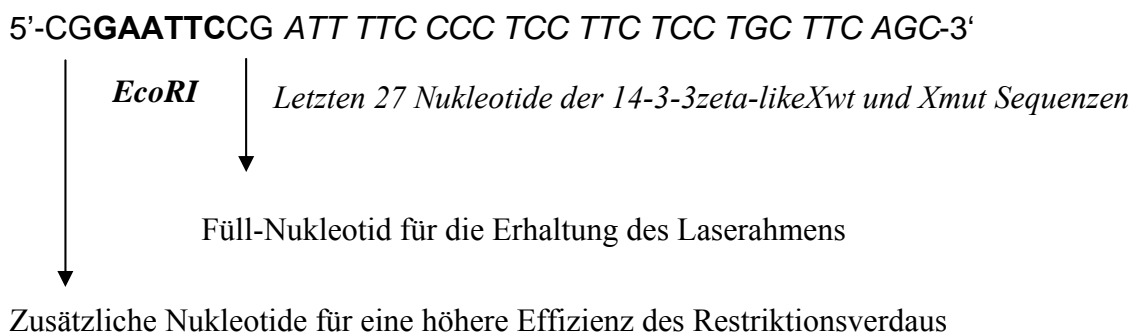
5'-CGGAATTCCG CAA CAT TTT TAT AAG CAA CTG AGA GGA -3'



Reverse-Primer mit *EcoRI* Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt:



Reverse-Primer mit *EcoRI* Schnittstelle für die 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut Konstrukte:

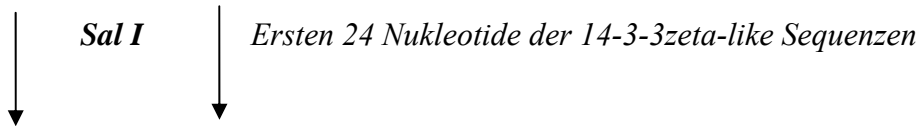


3.2.4 Klonierung in Yeast-two Hybrid-Vektoren für die Expression von 14-3-3zeta-like in Hefezellen zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktions-Versuche

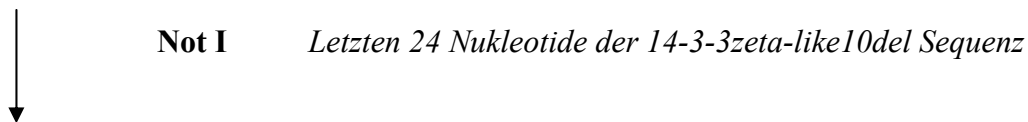
Das Yeast-two Hybrid System eignet sich besonders gut um auf schnelle Art und Weise Protein-Protein Interaktionen vieler Proteine miteinander zu untersuchen (Miller und Stagljar 2004). Um dieses System verwenden zu können, wurden zunächst die 14-3-3zeta-like Konstrukte in die Yeast-two Hybrid-Vektoren inkloniert. Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung kontrolliert und die Expression in Hefe-Zellen getestet und auf eine mögliche Selbstaktivierung untersucht.

Klonierung in die pGAD 426 und pBTM 117C Yeast-two Hybrid-Vektoren für die Expression in Hefe

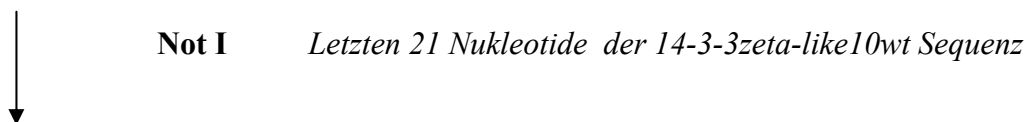
Über eine PCR wurden an die 14-3-3zeta-like Konstrukte Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sal I* und *Not I* angefügt. Dies ermöglichte eine Klonierung in die Yeast-two Hybrid-Vektoren: pGAD 426 und pBTM 117C, die für die Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like verwendet wurden.

Forward-Primer mit Sal I Schnittstelle für alle vier 14-3-3zeta-like Konstrukte:5'-ACGCGT**CGACG** ATG GAT AAA AAT GAG CTG GTT CAG-3'

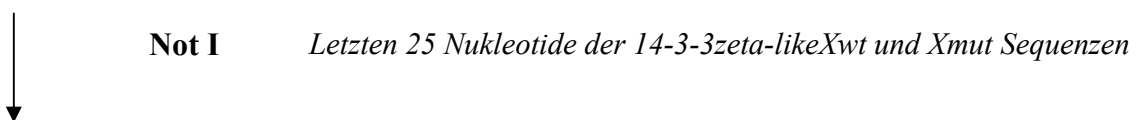
Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz Restriktionsverdaus

Reverse-Primer mit Not I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10del Konstrukt5'-CCTTTT**GCGGCCGC** CTA CAA CAT TTT TAT AAG CAA CTG A-3'

Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz des Restriktionsverdaus

Reverse-Primer mit Not I Schnittstelle für das 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt5'-CCTTTT**GCGGCCGC** TTA ATT TTC CAC TCC TTC TCC T-3'

Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz des Restriktionsverdaus

Reverse-Primer mit Not I Schnittstelle für die 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut Konstrukt5'-CCTTTT**GCGGCCGC** TTA ATT TTC CCC TCC TTC TCC TG-3'

Zusätzliche Nukleotide für eine höhere Effizienz des Restriktionsverdaus

3.3 Funktionelle Charakterisierung

Ein gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen ist die Aggregation und Ablagerung von Proteinen im Gehirn (Tabner *et al.* 2005, Gandhi und Wood 2005). Viele, wenn nicht gar alle, neurodegenerativen Erkrankungen zeichnen sich durch Proteinaggregate oder Proteineinschlüsse aus (Chung *et al.* 2001, Sherman und Goldberg 2001). Die Parkinson-typischen Proteinaggregate sind die Lewy-Körperchen. Lewy-Körperchen enthalten, wie in Bild 3-3 dargestellt, 14-3-3zeta Proteine.

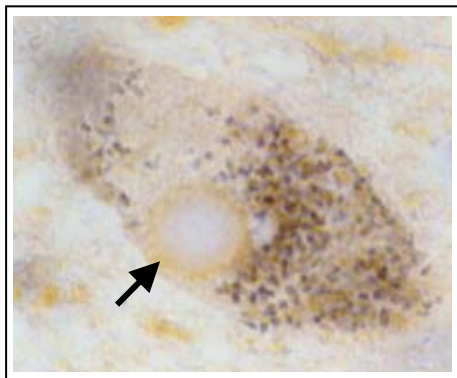


Bild 3-3 Nachweis von 14-3-3zeta in Lewy-Körperchen. Hirnschnitt gefärbt mit 14-3-3zeta-Antikörper. Der Pfeil zeigt auf das mit dem 14-3-3zeta-Antikörper orange angefärbte Halo des Lewy-Körperchens (Berg *et al.* 2003).

Derzeit wird die Isolierung von Protein in Form von Aggregaten als Schutzmechanismus der Zelle gesehen, wenn der Abbau von überschüssigem oder fehlgefaltetem Protein nicht mehr möglich ist (Tanaka *et al.* 2004). 14-3-3 Proteine besitzen eine Chaperon-Funktion (Vincenz und Dixit 1996). Chaperone sind Proteine, die von der Zelle als Schutzmechanismus hergestellt werden, um die korrekte Faltung von Proteinen zu fördern und eine Aggregation und Elimination der Proteine zu verhindern (Sakahira *et al.* 2002).

Bei allen bisher identifizierten Genloci des familiären Parkinsons sind Proteine betroffen, die mit der Proteinaggregation bzw. der Verhinderung der Aggregation und des Proteinabbaus im Zusammenhang stehen (Chung *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 2004, Kitada *et al.* 1998, Leroy *et al.* 1998).

3.3.1 Zelluläre Lokalisation von 14-3-3zeta-like und Aggresomenbildung

Um die zelluläre Lokalisation von 14-3-3zeta-like Proteinen zu untersuchen, wurden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293) mit 14-3-3zeta-like-EGFP und 14-3-3zeta-like-V5-His Konstrukten transfiziert und stabil exprimierende Zelllinien erzeugt. Die Fusionsproteine mit dem grünen Fluoreszenzprotein waren aufgrund der sehr intensiven und langlebigen Fluoreszenz gut und einfach mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Für die Konstrukte mit dem V5-Protein war eine Immunfluoreszenz mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper notwendig. Bei beiden Verfahren konnte eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation der 14-3-3zeta-like Wildtypproteine und des 14-3-3zeta-likeXmut-Proteins nachgewiesen werden. Lediglich das 14-3-3zeta-like10del Protein zeigte eine andere Lokalisation: zu der zytoplasmatischen Lokalisation kam bei diesem deutlich kleineren, verkürzten Protein eine nukleäre Lokalisation hinzu (Bild 3-4).

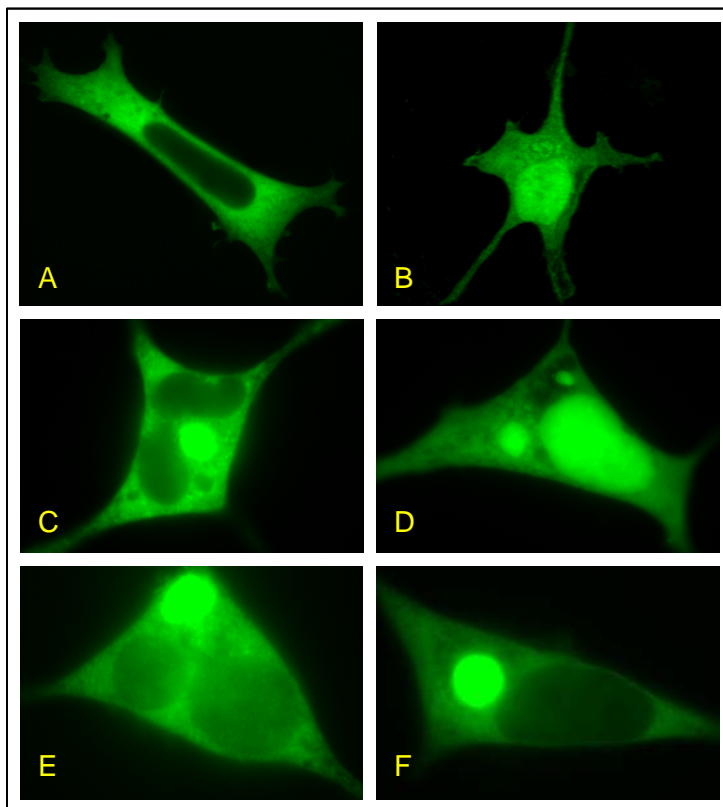


Bild 3-4 Zelluläre Lokalisation von 14-3-3zeta-like Proteinen.

Die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation (in 100 % der Zellen) von 14-3-3 zeta-like10wt (A) unterscheidet sich deutlich von der vorwiegend nukleären Lokalisation von 14-3-3zeta-like10del (dies trat in 87,5 % (± 2 %) der Zellen auf, siehe auch Bild 3-4 C und D). Nach proteasomaler Hemmung mit 5 μ M MG132 für 18 Stunden entwickeln 79,5 % ($\pm 3,4$ %) der 14-3-3zeta-like Zellen 1-2 zellkernnahe Aggresomen (siehe auch Bild 3-8). Legende zur Bildbeschriftung: 14-3-3 zeta-like10wt (C), 14-3-3zeta-like10del (D), 14-3-3zeta-likeXwt (E) und 14-3-3zeta-likeXmut (F).

Somit wurde schon in diesem Versuch ein Unterschied zwischen dem 14-3-3zeta-like10del Proteins und dem Wildtyp 14-3-3zeta-like10wt Protein deutlich.

Die Aminosäuresequenz der 14-3-3zeta-like Proteine enthält keine der bisher bekannten Nukleus-Export oder -Import Sequenzen. Somit ist die nukleäre Lokalisation des 14-3-3zeta-like10del Proteins entweder auf die verminderte Größe des deletierten Proteins oder ein bisher unbekanntes Nukleus-Export oder -Import-Signal zurückzuführen.

Die Lokalisation der 14-3-3zeta Proteine sollte ebenfalls in einer Situation, die der Parkinson'schen Erkrankung gleicht, analysiert werden. Die Verwendung eines proteasomalen Hemmstoffes wird häufig genutzt, um den Zustand der Proteinanhäufung, wie es bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, und der Parkinson'sche Erkrankung im Besonderen, in Gestalt der Lewy-Körperchen der Fall ist, in Zellkultur-Experimenten zu simulieren. Durch die Verwendung eines proteasomalen Hemmstoffes wird der Abbau über das Proteasom weitgehend verhindert. Dadurch kommt es zur Anreicherung der Proteine, die normalerweise über das Proteasom abgebaut werden. Auf diese Weise konnte die Lokalisation der 14-3-3zeta-like Proteine untersucht und Vergleiche zwischen den mutierten und den Wildtyp-Proteinen hergestellt werden und dies in einer parkinsonähnlichen Situation erhöhter Proteinanhäufung. Nach der Behandlung der stabilen exprimierenden 14-3-3zeta-like Zellen mit einem proteasomalen Hemmstoff kam es daraufhin zur Bildung von 1-2 runden, zellkernnahen Proteinanhäufungen (Bild 3-4 C-F), die als Aggresomen identifiziert wurden und im Folgenden näher charakterisiert werden (Bild 3-5, Bild 3-6).

3.3.2 Charakterisierung der Aggresomen und Analyse ihrer Bestandteile

Durch die immunologische Analyse der Bestandteile sollte die Ähnlichkeit zu Lewy-Körperchen gezeigt werden. Aggresomen sind nach Definition (Tanaka *et al.* 2004) 1-2 runde, juxt nukleäre Proteinanhäufungen pro Zelle, die Vimentin, γ -Tubulin und Ubiquitin enthalten. Vimentin ist ein fadenförmiges Proteinmolekül. Es gehört zu der Proteinklasse der Intermediärfilamente und ist somit ein Bestandteil des Zytoskeletts. Unter Verwendung eines Cy3-gekoppelten Primärantikörpers gegen Vimentin, konnte dieses Strukturprotein durch rote Fluoreszenz in der Oberfläche des Aggresoms dargestellt werden. Unter Normalbedingungen ist Vimentin diffus im Zytoplasma lokalisiert. Erst nach Einsatz des proteasomalen Hemmstoffs bündelt sich das Vimentin auf das Halo der Proteinanhäufung (Seitenansicht Bild 3-5).

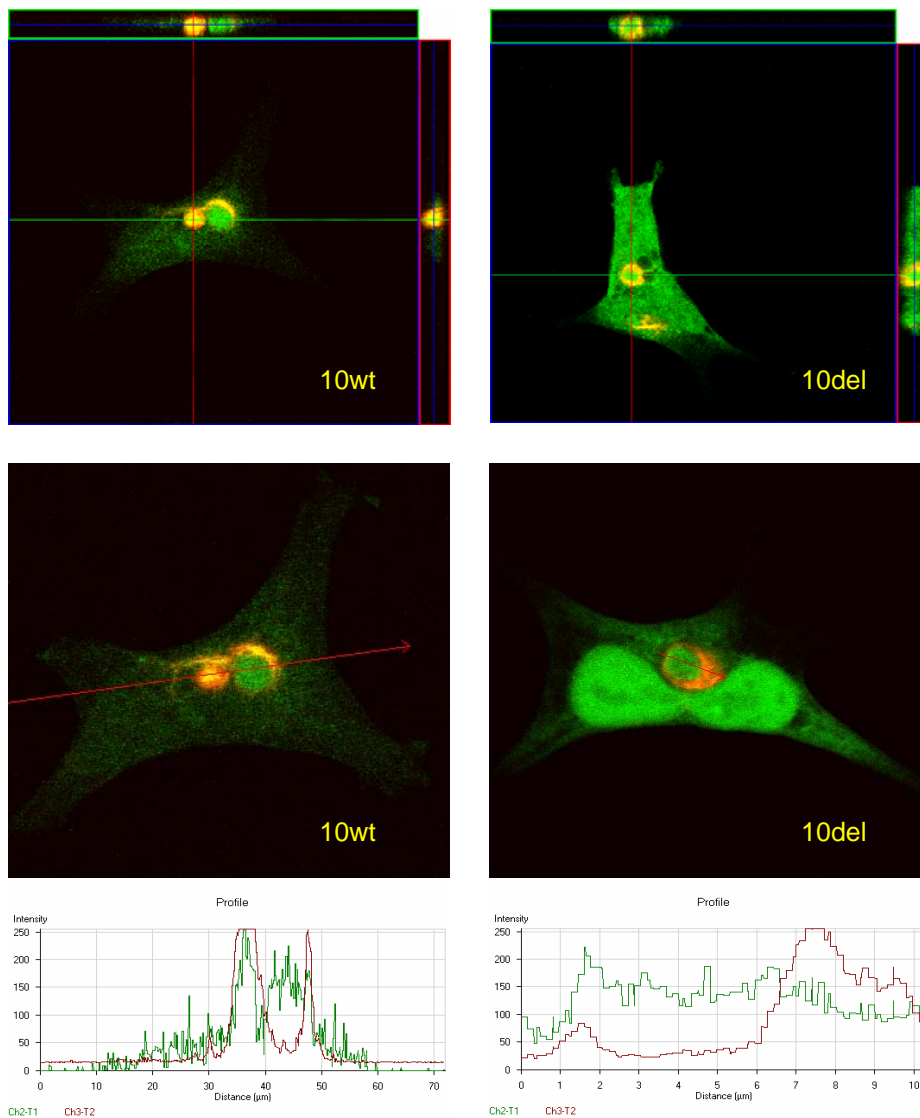


Bild 3-5 Räumliche Darstellung von Vimentin-gefärbten Aggresomen.

Die Verwendung eines Laserscan-Mikroskops ermöglicht die Unterteilung einer Zelle in einzelne Schnittebenen im nm-Abstand. Somit ist eine gute räumliche Darstellung aus unterschiedlichen Blickwinkeln und eine exakte Lokalisation von Proteinen möglich.

Bild oben:

Das 14-3-3zeta-like- (grün) und Vimentin- (rot) gefärbte Aggresom ist in verschiedenen Ansichten dargestellt, so dass man deutlich sieht, dass sich das Vimentin-Protein ausschließlich an der Oberfläche des Aggresoms befindet. Die grünen und roten Linien stellen die Schnittebenen durch die Zelle dar. Überlappende Bereiche im Bild sind gelb dargestellt.

Bild unten:

Das Diagramm zeigt die Verteilung der Fluorochrome auf der Linie des roten Pfeils. Im Diagramm ist das 14-3-3zeta-GFP Protein mit einer grünen Linie, das Vimentin-Protein mit einer gelben Linie dargestellt.

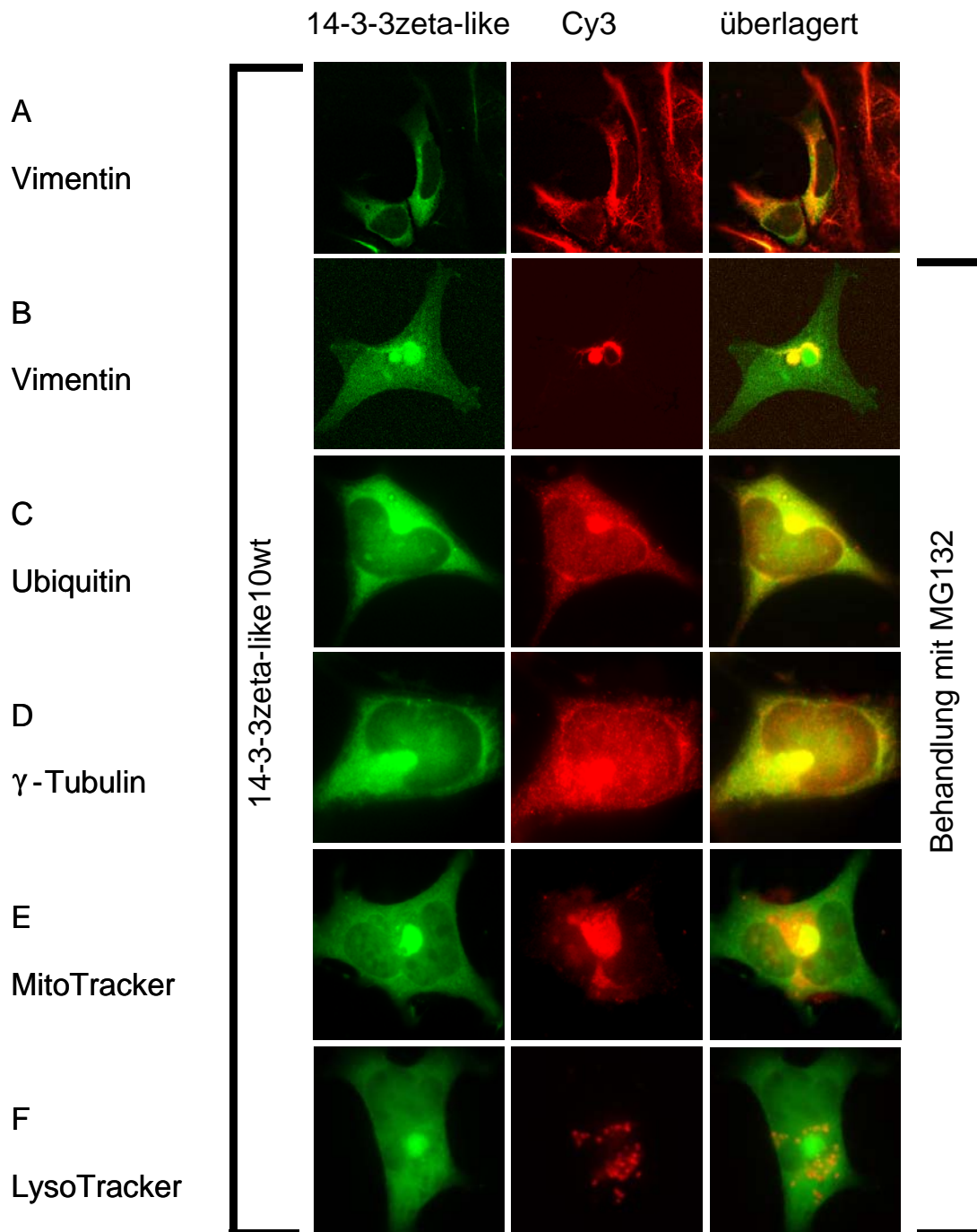


Bild 3-6 Immuncytologische Charakterisierung der Aggresomen in HEK293 Zellen. Charakterisierung der Aggresomen in 14-3-3zeta-like10wt überexprimierenden Zellen mit (B, C, D, E, F) und ohne (A) proteasomale Hemmung durch MG132. 14-3-3zeta-like Zellen wurden in DMEM entweder ohne oder mit MG132 kultiviert, fixiert und eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Zusätzlich zu der Grünfärbung der 14-3-3zeta-like-EGFP Proteine wurden Vimentin (A, B), γ -Tubulin (C), und Ubiquitin (D) mit einem Cy3 gekoppelten rot-fluoreszierenden Antikörper gefärbt. Mitochondrien und Lysosomen wurden mit rot fluoreszierendem MitoTracker (E) und LysoTracker (F) dargestellt. Die überlappenden Bereiche aus grüner und roter Fluoreszenz sind hier gelb dargestellt und repräsentieren Bereiche an denen die Proteine colokalisieren.

Eine grafische Diagramm-Darstellung ermöglicht es die Fluorochrom-Verteilung der einzelnen Fluorochrome auf einer gewählten Linie zu analysieren (dargestellt in den unteren Grafiken des Bildes 3-5). Dadurch lässt sich, besser als in einer Überlagerung der einzelnen Farbkanäle, sagen, ob an einem bestimmten Punkt oder auf einer bestimmten Linie zwei Proteine vorliegen oder ob zum Beispiel das eine Protein nur nahe an ein anderes angelagert ist. Dies ist wichtig für die Fragestellung ob Proteine im Aggresom vorliegen oder nur an das Aggresom angelagert oder in dessen Halo zu finden sind. Im Falle der in Bild 3-5 dargestellten Vimentin-Verteilung ist deutlich zu sehen, dass das Vimentin-Protein nur an das Aggresom angelagert vorliegt, während das 14-3-3 Protein im Aggresom enthalten ist. Je nach Schnittebene in der ein Bild aufgenommen wird, kann fälschlicherweise schnell ein Eindruck entstehen, dass z.B. ein Protein in einer Struktur wie dem Aggresom enthalten ist. Wichtig ist deshalb entweder die Diagramm-Darstellung der Fluorochrome und der Protein-Verteilung oder eine räumliche Betrachtung in der eine bestimmte Breite eines Schnittes durch mehrere Bilder dargestellt wird. Ein gutes Beispiel ist für diesen Fall das Bild 3-6 E. Hier sind zwei juxtannukleär gelegene Aggresomen dargestellt. Bei einem Aggresom könnte man von einer Lokalisation des Vimentins im Aggresom ausgehen, während beim rechten der beiden Aggresomen deutlich eine reine Lokalisation in der Umgebung oder im Halo des Aggresoms deutlich wird. Somit wurden bei allen mikroskopischen Fragestellungen die Struktur immer in Schnittebenen eingeteilt und durch mehrere Bilder in eine räumliche Darstellung gebracht. Zusätzlich wurde die Diagramm-Darstellung als Analyse-Methode hinzugezogen. Auf diese Weise wurde mit jeder der nun folgenden Färbungen verfahren.

Um zu beweisen, dass es sich bei den Proteinanhäufungen um Aggresomen handelt, wurden mehrere Antikörper-Färbungen durchgeführt. Vimentin ist bei proteasomaler Hemmung an die Oberfläche der juxtannukleären Proteinanhäufungen angelagert (Bild 3-6 A und 3-6 B). γ -Tubulin (Bild 3-Bild 3-6 D) und Ubiquitin (Bild 3-6 C) sind nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch im Aggresom zu finden. Jedoch befindet sich der Hauptteil des Ubiquitins im Halo des Aggresoms. Mitochondrien die normalerweise im Zytoplasma verteilt sind (Bild 3-6 F), zentralisieren sich ebenfalls um das Aggresom (Bild 3-6 E).

Ubiquitin, ein weiterer charakteristischer Bestandteil der Aggresomen, wurde ebenfalls in Zellen mit und ohne proteasomale Hemmung dargestellt. Während man in Bild 3-7 noch die typische Ubiquitin-Verteilung, wie man sie normalerweise in der Zelle antrifft, sieht, wird in Bild 3-8 nach proteasomaler Hemmung deutlich, dass sich das Ubiquitin Protein um die Aggresomen bündelt.

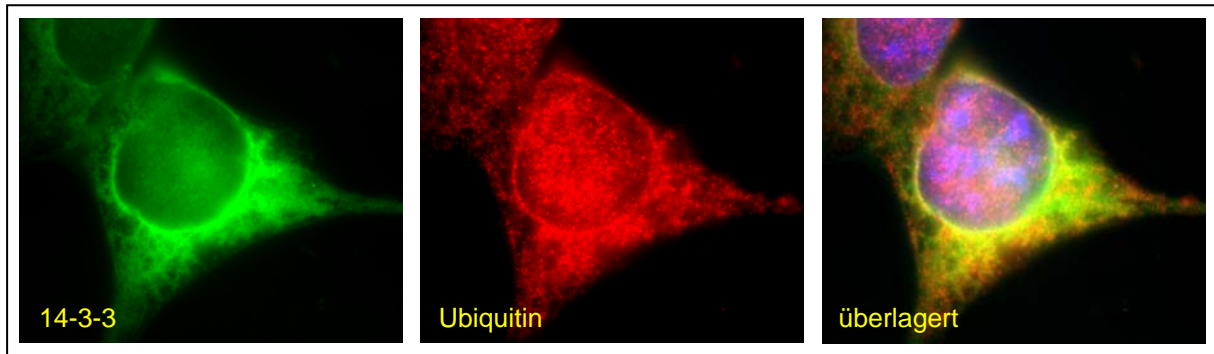


Bild 3-7 Darstellung der zellulären Ubiquitin-Verteilung in stabil exprimierende 14-3-3 zeta-like10wt Zellen. Stabil exprimierende 14-3-3zeta-like10wt Zellen ohne proteasomale Hemmung. 14-3-3zeta-like10wt und Ubiquitin sind im Zytoplasma lokalisiert. Im rechten Bild wurden das Bild des grünen und das des roten Kanals übereinander gelegt. Der Zellkern ist DAPI gefärbt und hier blau dargestellt. Für die Ubiquitin-Färbung wurde der Ubiquitin Antikörper aus Kaninchen und ein sekundärer Cy3-gekoppelter Kaninchen Antikörper verwendet.

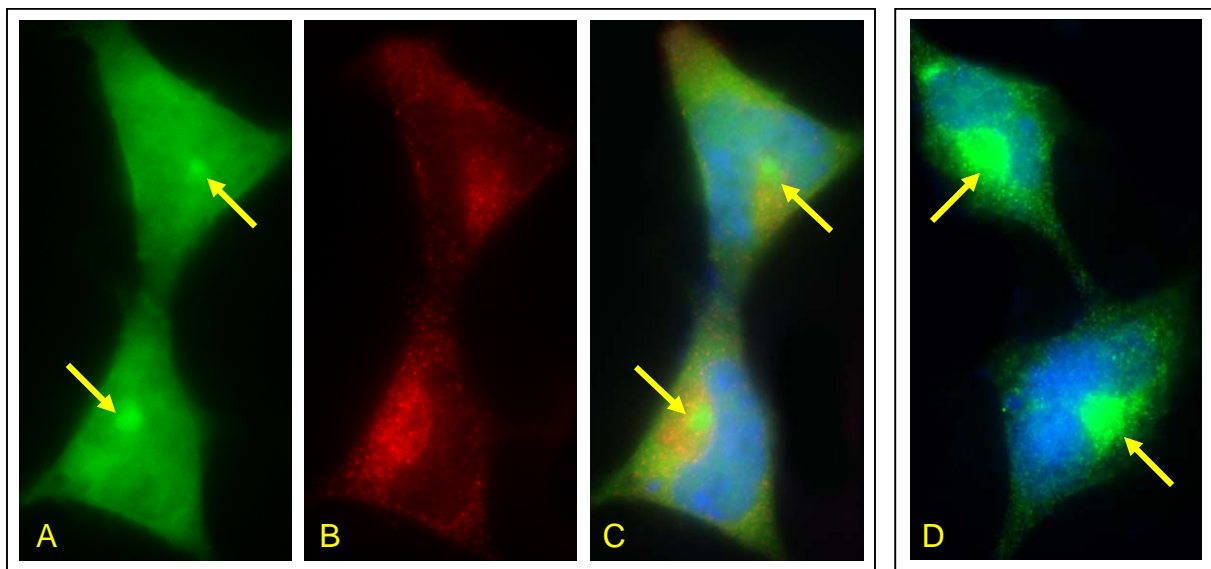


Bild 3-8 Darstellung Ubiquitin-haltiger Aggresomen in stabil exprimierende 14-3-3zeta-like10wt Zellen. Erst nach proteasomaler Hemmung bilden sich Aggresomen (mit Pfeilen gekennzeichnet) in denen 14-3-3zeta-like10wt (A) und Ubiquitin (B) colokalisieren (C). Um eine spezifische Ubiquitin-Färbung zu garantieren, wurde Ubiquitin zusätzlich noch mit einem Maus-Antikörper und sekundärem Cy2 Antikörper gefärbt (D). Diese zweite Färbung bestätigte das Ergebnis der ersten Färbung.

Die getrennte Darstellung der Farbkanäle in Bild 3-8 lässt deutlich die Ubiquitin und 14-3-3zeta-like Protein-Verteilung in der Zelle unter proteasomaler Hemmung erkennen. Während das Aggresom 14-3-3zeta-like enthält, lagert sich Ubiquitin granulär um das Aggresom.

Die juxtannukleäre Lokalisation der Aggresomen lässt sich durch die DAPI-Kernfärbung besonders schön sehen und ist ein weiteres Merkmal der Aggresomen.

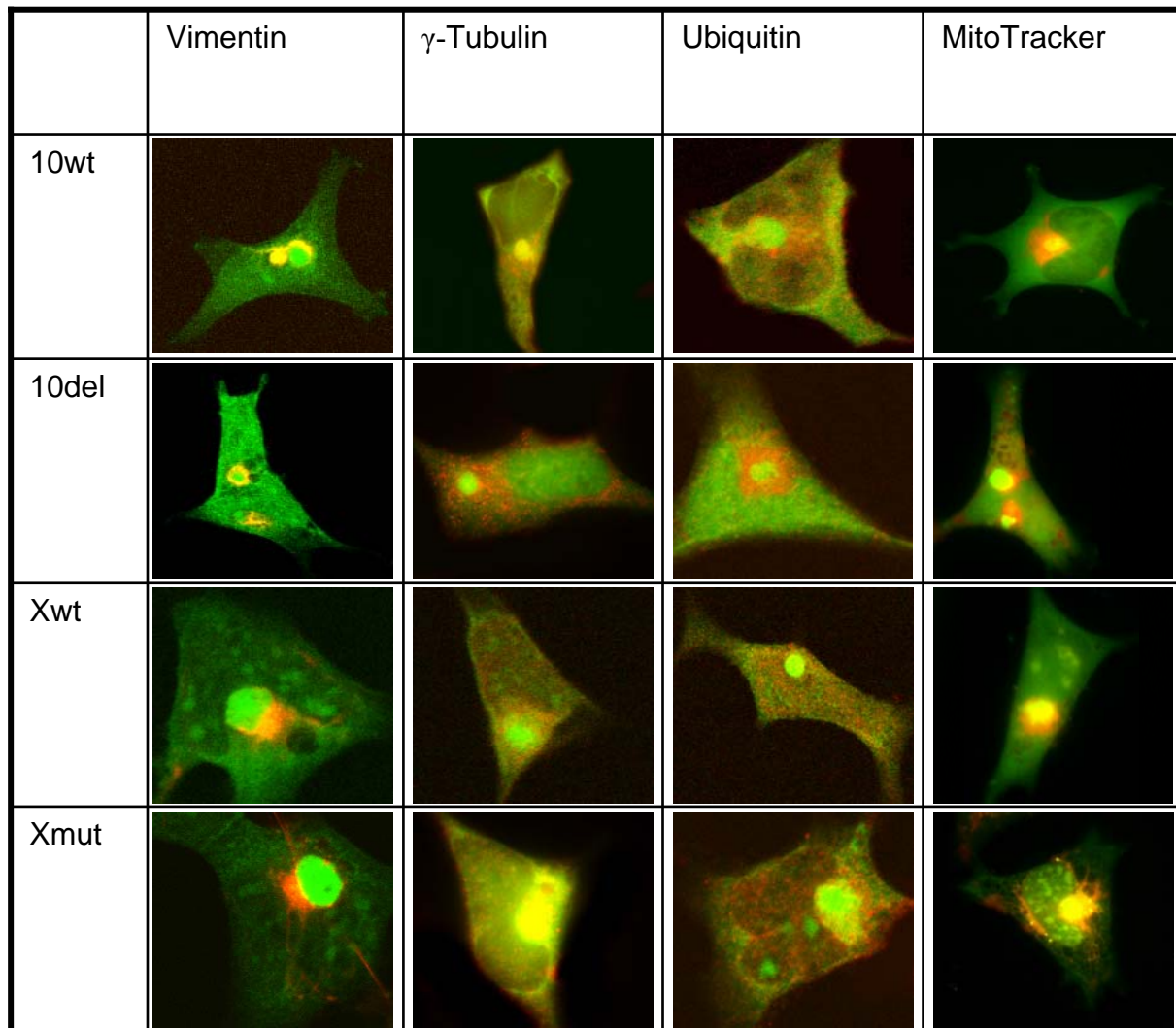


Bild 3-9 Übersicht über alle 14-3-3zeta-like Konstrukte (grün) unter proteasomaler Hemmung.

Für die Vimentin-, Tubulin- und Ubiquitin- Färbungen wurden rot-fluoreszierende Antikörper für die immuncytologische Färbung verwendet. Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker-Red ebenfalls rot dargestellt. Somit war ein guter Kontrast zu den grün fluoreszierenden 14-3-3 Proteinen gewährleistet. Es sind jeweils nur die übereinandergelagerten Bilder der zwei Kanäle dargestellt. So stellen sich die überlappenden, colokalisierenden Bereiche gelb dar.

Die Übersicht über alle 14-3-3zeta-like Konstrukte zeigt, dass sich bei der, durch proteasomale Hemmung hervorgerufenen, Proteinansammlungen kein Unterschied in der Aggresomenbildung zwischen den Konstrukten ergab. Es wird angenommen dass 14-3-3 Proteine zwar *in vivo* eine wichtige Rolle bei der Aggresomenbildung spielen, aber in diesem Fall wurde die Aggresomenbildung künstlich durch proteasomale Hemmung hervorgerufen.

Selbst wenn bei der Lokalisation in den Aggresomen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen 14-3-3zeta-like Proteinen auftraten ist noch nicht gesichert, dass es keine funktionellen Unterschiede zwischen den 14-3-3zeta-like Proteinen gibt. Dies wurde in den Aggregations-Versuchen (Kapitel 3.3.2) gesondert untersucht.

3.3.3 Zentralisierung der Mitochondrien und der Lysosomen um die Aggresomen

Bei der Betrachtung der Mitochondrien viel eine Zentralisierung der Organellen nach proteasomaler Hemmung auf (Bild 3-10 B), während die Mitochondrien ohne gehemmtetes Proteasom gleichmäßig in der Zelle verteilt vorliegen (Bild 3-10 A). Auch die Lysosomen waren um das Aggresom gruppiert, wie in Bild 3-11 sichtbar wird. Es ist anzunehmen, dass die Lysosomen um das Aggresom gruppiert sind, da immer mehr Protein zum Aggresom transportiert wird und dort höchstwahrscheinlich auch ein verstärkter lysosomaler Abbau stattfindet. Die Lokalisation der Mitochondrien weist auf einen erhöhten ATP-Bedarf hin.

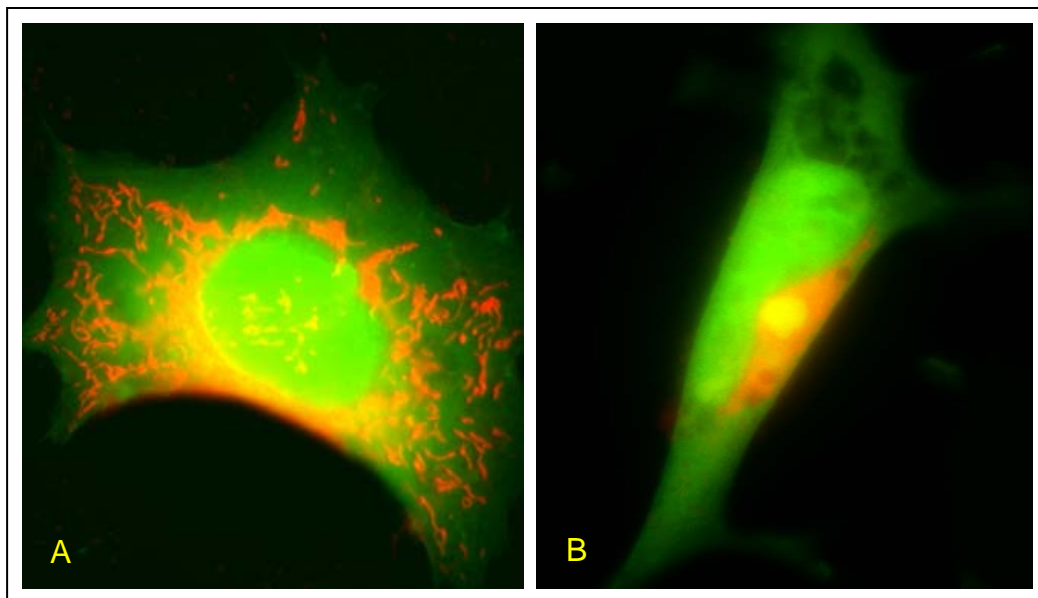


Bild 3-10 Lokalisation von Mitochondrien in HEK293 Zellen. Lokalisation der Mitochondrien (rot) und 14-3-3zeta-like10del (grün) mit und ohne MG132. Ohne proteasomale Hemmung sind die Mitochondrien gleichmäßig in der Zelle verteilt (A). Nach proteasomaler Hemmung gruppieren sich die Mitochondrien ebenfalls um das Aggresom (B).

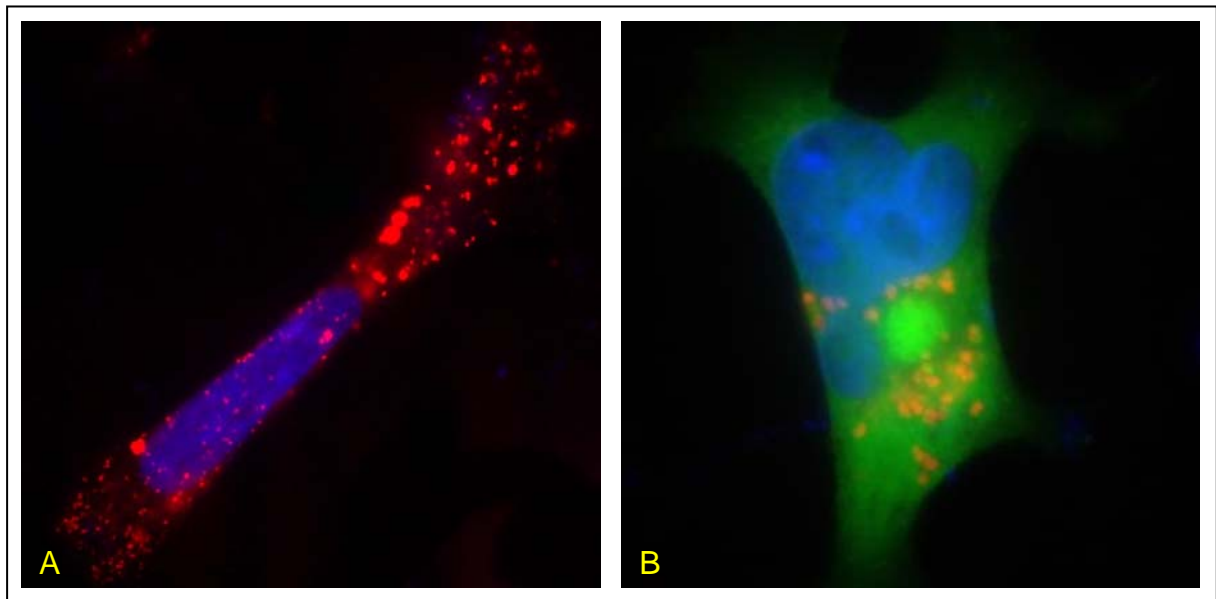


Bild 3-11 Lokalisation von Lysosomen in HEK293 Zellen. Lokalisation der Lysosomen (rot) und 14-3-3zeta-like10wt (grün) mit und ohne MG132. Ohne proteasomale Hemmung sind die Lysosomen gleichmäßig in der Zelle verteilt (A). 14-3-3zeta-like10wt ist im Zytoplasma lokalisiert. Der Nukleus wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Es gibt keine Colokalisation zwischen Lysosomen und 14-3-3zeta-like10wt. Nach proteasomaler Hemmung gruppieren sich die Lysosomen um das Aggresom (B).

3.3.4 Der Abbauweg des 14-3-3zeta-like Proteins

Da bei einer proteasomalen Hemmung der Abbau von Proteinen über das Proteasom stark eingeschränkt ist, ist es von Interesse zu wissen, ob 14-3-3zeta-like selbst über das Proteasom abgebaut wird. Eine andere Möglichkeit des Proteinabbaus wäre z.B. ein Abbau über Lysosomen. Um festzustellen ob 14-3-3zeta-like über das Lysosom abgebaut wird, wurde eine Colokalisation mit Lysosomen untersucht (Bild 3-11). Zusätzlich wurden die Zellen nach Hemmung des lysosomalen Abbaus auf Anreicherung des Proteins hin untersucht. 14-3-3zeta-like konnte weder in Lysosomen gefunden werden, noch konnte eine Anreicherung in der Zelle nach Hemmung des lysosomalen Abbaus durch Bafilomycin festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Von einem lysosomalen Abbauweg ist somit nicht auszugehen.

Da bei der Fragestellung des Abbauweges des 14-3-3zeta-like Proteins der lysosomale Abbauweg ausgeschlossen werden konnte (s.o.), wurde das 14-3-3zeta-like Protein auf eine Ubiquitinierung überprüft. Ubiquitin ist ein Protein, welches posttranslational an Proteine

angeknüpft wird, um sie für den Abbau durch das Proteasom zu markieren. Neben dieser Funktion hat die Modifikation mit Ubiquitin noch weitere Funktionen, die nicht zum Abbau des Proteins führen. Ein ubiquitinähnliches Protein ist das „*Small Ubiquitin-like Modifier*“-Protein SUMO (Melchior 2000, Müller *et al.* 2001). Die Konsequenz der Modifikation und das Zusammenspiel ubiquitinähnlicher-Systeme mit dem Ubiquitin-System sind bisher allerdings wenig verstanden. Für einen Test auf Ubiquitinierung wurden stabil exprimierende 14-3-3zeta-like10wt-V5 Zellen 18 Stunden mit 10 μ M MG132 inkubiert und anschließend das Lysat über eine Western-Blot-Analyse auf ubiquitiniertes 14-3-3zeta-like10wt getestet. Weder mono- noch polyubiquitiniertes 14-3-3zeta-like10wt konnte nachgewiesen werden. Ein Test auf Sumoylierung war ebenfalls negativ (Daten nicht dargestellt). Somit konnte der Abbauweg von 14-3-3zeta-like nicht eindeutig geklärt werden, es konnte jedoch gezeigt werden, dass das 14-3-3zeta-like Protein nicht durch proteasomale Hemmung angereichert wird (Bild 3-12). Von einem Abbau über das Proteasom ist somit nicht auszugehen.

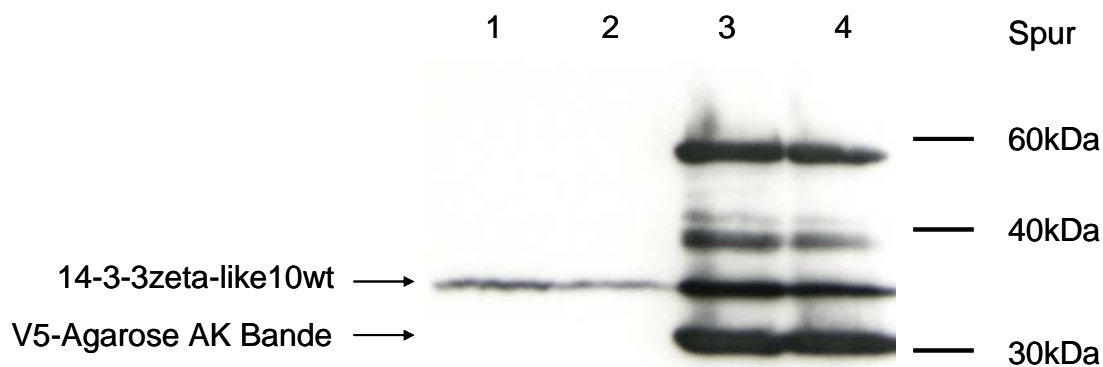


Bild 3-12 Mengenvergleich von 14-3-3zeta-like10wt ohne und mit proteasomale Hemmung mittels Western-Blot-Analyse. In den Spuren 1 und 2 des SDS-Gels ist jeweils das im Lysat enthaltene 14-3-3zeta-like10wt Protein sichtbar. Dabei ist kein Mengenunterschied zwischen den unbehandelten Zellen (Spur 1) und den mit Proteasomenhemmer MG132 behandelten Zellen (Spur 2) sichtbar. Reichert man das 14-3-3zeta-like10wt-V5 Protein an, sind ebenfalls keine Mengenunterschiede zu entdecken (Nebenbanden durch die V5-Agarose bedingt). Damit wird das 14-3-3zeta-like Protein nicht über eine proteasomale Hemmung angereichert, wodurch nicht von einem Abbau über das Proteasom auszugehen ist.

3.3.5 Zunahme der Aggresomenbildung unter zellulärem Stress

Während die großen, 1-2 juxtanukleären Aggresomen, wie sie in den vorherigen Kapiteln dargestellt wurden, in 83-90 % der proteasomal gehemmten Zellen auftraten, waren auch kleinere Proteinanhäufungen bei Zellen mit normaler proteasomaler Aktivität sichtbar. Bei stabil exprimierenden 14-3-3zeta-like Zellen kam es vereinzelt auch ohne proteasomalen Hemmer zu Proteinanhäufungen. Diese wesentlich kleineren und nicht so runden Proteinanhäufungen traten deutlich seltener auf (Bild 3-13, Bild 3-14). Die Proteinanhäufungen unterschieden sich auch dadurch deutlich von den Aggresomen, dass keine Zentralisierung der Organellen auftrat und die natürliche, gleichmäßige zytoplasmatische Lokalisation der Mitochondrien und der Lysosomen erhalten blieb (vergleichbar mit Bild 3-10 A und 3-11 A). Ein Zeichen dafür, dass die Vitalität der Zelle nicht in Mitleidenschaft gezogen ist.

Zellen mit Proteinanhäufungen

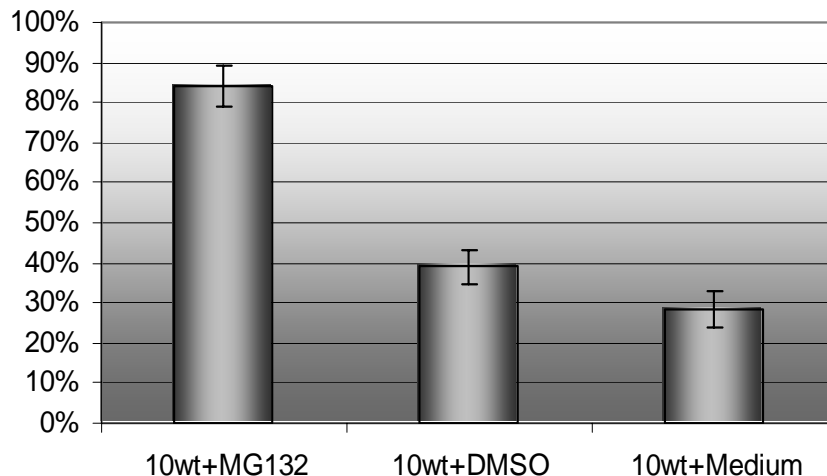


Bild 3-13 Anzahl der Zellen mit Proteinanhäufungen ohne proteasomale Hemmung. Stabil exprimierende 14-3-3zeta-like (hier 10wt-Zellen) wurden entweder mit 10 μ M MG132, 1 μ l DMSO oder ohne Noxe für 18 h kultiviert. Die mikroskopische Auswertung ergab, dass sich auch ohne proteasomalen Hemmer Proteinanhäufungen bildeten. Diese waren allerdings kleiner, traten seltener auf und hatten nicht die charakteristischen Merkmale von Aggresomen. Die Häufigkeit der Proteinanhäufungen stieg geringfügig durch die Kultivierung mit DMSO.

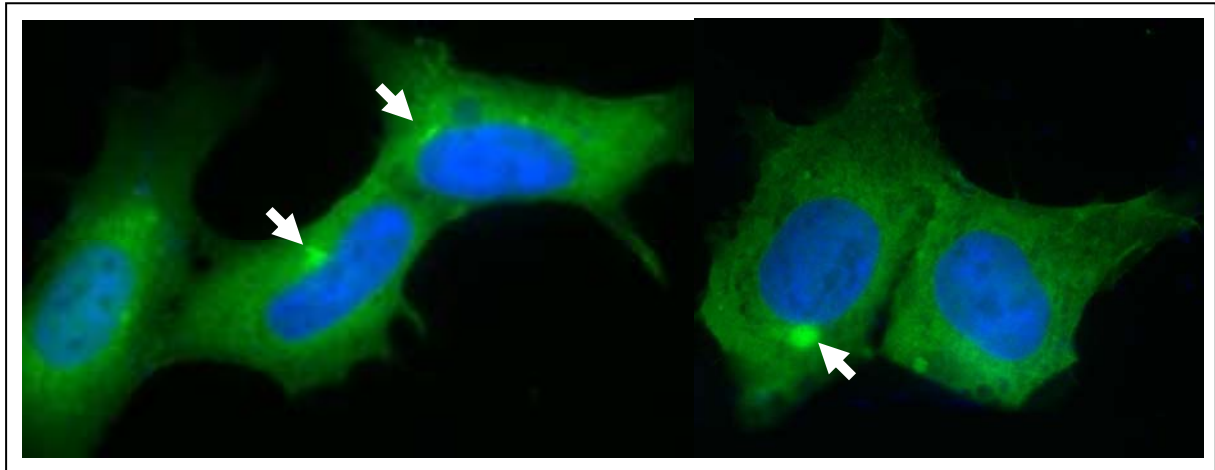


Bild 3-14 Proteinanhäufungen in stabil exprimierenden 14-3-3zeta-like10wt Zellen. Ohne proteasomale Hemmung traten vereinzelt kleine Proteinanhäufungen auf (siehe Pfeile), die sich jedoch von der Größe, der Form und der Häufigkeit des Auftretens von Aggresomen unterschieden.

Man geht davon aus, dass die 14-3-3zeta Proteine in der Zelle die Rolle eines „Straßenkehrers“ für missgefaltete Proteine übernehmen (Kaneko und Hachiya 2006) indem sie die Bildung von Aggregaten begünstigt und so die Zelle vor dem Zelltod bewahrt wird. Gleichzeitig soll eine chaperonähnliche Funktion des Proteins fehlgefaltete Proteine rückfalten, so dass der Proteinabbau oder eine Proteinaggregation verhindert werden kann. Somit ist also nicht verwunderlich, dass die kleinen Proteinanhäufungen, wie sie in Bild 3-14 dargestellt sind, das 14-3-3zeta Protein enthalten. Schon der Nachweis von 14-3-3zeta in Lewy-Körperchen (Berg *et al.* 2003) ließ vermuten, dass das 14-3-3 Protein aufgrund seiner Funktion überall dort zu finden ist, wo aggregierte Proteine vorliegen.

3.3.6 Die Chaperon-Funktion von 14-3-3zeta-like

Chaperone sind Proteine, die neu synthetisierten Proteinen "helfen", sich korrekt zu falten (Buchner 2002). Zellen haben mit Hilfe der Chaperone einen Weg gefunden, die Aggregation von neu synthetisierten Proteinen von Beginn an zu minimieren. Diese Chaperon-Proteine interagieren spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen und haben so eine aggregationsmindernde Wirkung.

Da schon früh eine Chaperon-Funktion von 14-3-3 Proteinen diskutiert wurde (Vincenz und Dixit 1996), sollte ein Protein-Aggregations-Versuch etabliert werden, bei dem sowohl eine mögliche Chaperon-Aktivität als auch ein Unterschied in der Protein-Funktion zwischen 14-

3-3zeta-like Wildtyp- und mutierten Protein getestet werden konnte. In Anlehnung an die Methoden, die von Souza *et al.* 2000 und Guha *et al.* 1998 publiziert wurden, wurde eine neue Methode eines chemisch induzierten Aggregationsversuchs etabliert. Das Protein Alkoholdehydrogenase wurde chemisch induziert zur Aggregation gebracht. Dadurch konnte eine mögliche aggregationshemmende Wirkung der 14-3-3zeta-like Proteine untersucht werden.

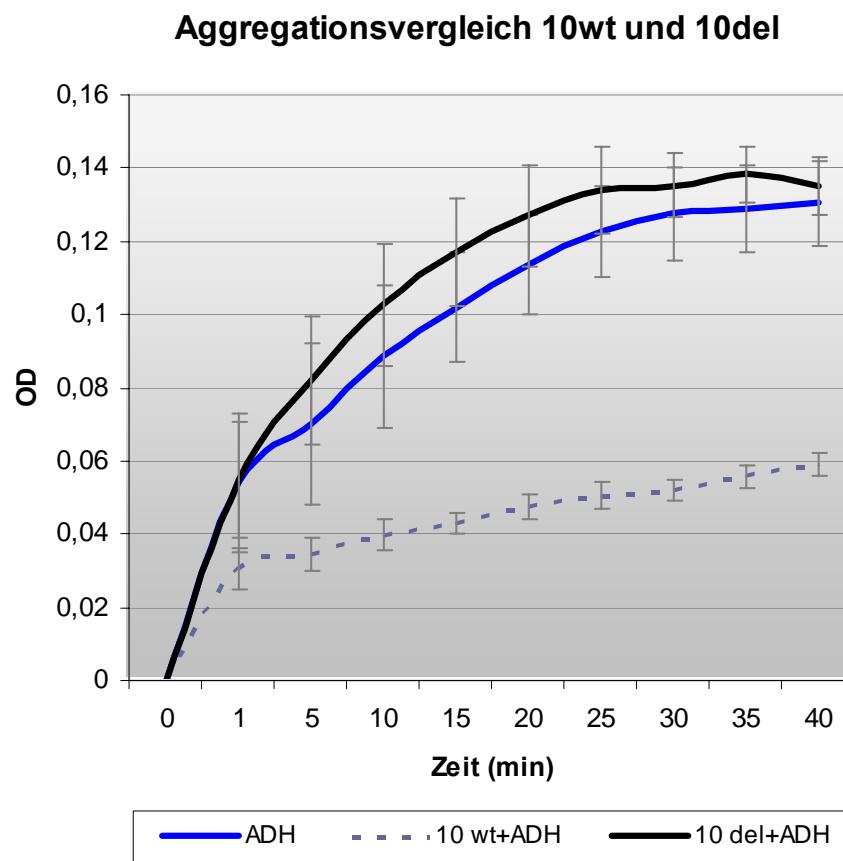


Bild 3-15 Aggregationsvergleich der 14-3-3zeta-like10 Wildtyp und mutierten Proteine. Mit einem Aggregationsversuch bei dem Alkohol-Dehydrogenase (ADH) chemisch induziert zur Aggregation gebracht wird, konnte das Verhalten von 14-3-3 Proteinen bei der Aggregation von Proteinen analysiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Mutation im 14-3-3zeta-like10wt Protein einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge hat. Das Wildtyp-Protein kann die Aggregation anderer Proteine hemmen (Kurve des aggregierten Proteins gesenkt), während das mutierte Protein keinen Einfluss auf die Aggregation von Proteinen hat (Kurve unverändert).

Beim Vergleich der chaperonähnlichen Aktivität der 14-3-3zeta-like Proteine fiel ganz besonders der Unterschied zwischen den 14-3-3zeta-like10 Proteinen auf. Hier konnte gezeigt werden, dass die Mutation im 14-3-3zeta-like10wt Protein einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge hat. Das Wildtyp-Protein kann die Aggregation anderer Proteine hemmen, während das mutierte Protein keinen Einfluss auf die Aggregation von Proteinen hat (Bild 3-15). Bei den 14-3-3zeta-likeX Proteinen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Bild 3-16).

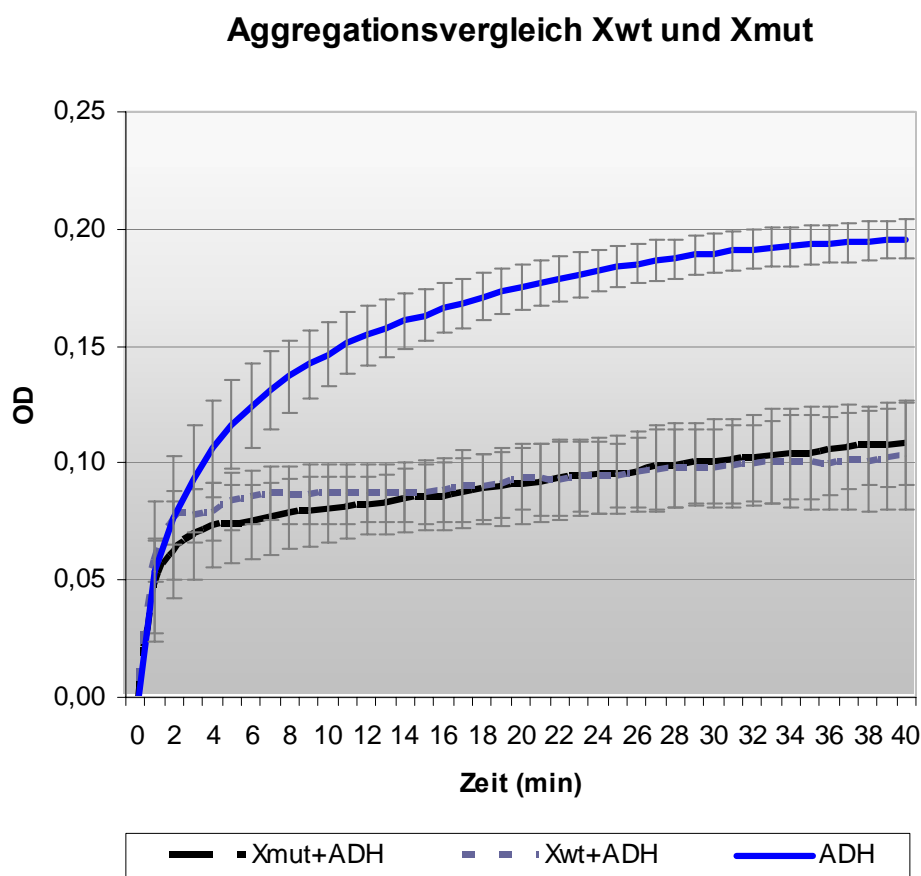


Bild 3-16 Aggregationsvergleich der 14-3-3zeta-likeX Wildtyp und mutierten Proteine. Alkohol-Dehydrogenase (ADH) wird chemisch induziert zur Aggregation gebracht. Die 14-3-3zeta-likeX-Proteine sind in der Lage, diese Aggregation zu hemmen (Kurve des aggregierten Proteins gesenkt). Zwischen 14-3-3zeta-likeXwt und Xmut konnte kein Unterschied in der Aggregationshemmung festgestellt werden.

3.3.7 Zusammenfassung der funktionellen Charakterisierung

Neben der Betrachtung der 14-3-3zeta-like Proteine in der Zelle ist auch die Funktion der Proteine von Bedeutung. Da bei der Parkinson'schen Erkrankung verstärkte Proteinanhäufungen in Form von Lewy-Körperchen auftreten, sind v.a. Proteinfunktionen von Interesse, die diesen Prozess verhindern können oder dazu führen, dass weniger fehlgefaltete Proteine auftreten. Chaperon-Proteine erfüllen diese Funktion. 14-3-3 Proteine wurden ebenfalls als Proteine mit Chaperon- oder chaperonähnlicher Funktion beschrieben. Es war also von besonderem Interesse gerade diese Proteinfunktion näher zu untersuchen und im Vergleich von Wildtyp- und mutierten Protein 14-3-3zeta-like zu analysieren. Mit dem ADH Aggregations-Versuch konnte das Verhalten von 14-3-3 Proteinen bei der Aggregation von Proteinen analysiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die 14-3-3zeta-like10 Mutation zu einem Verlust dieser chaperonähnlichen Funktion führt, während das Wildtyp-Protein in der Lage ist, die Aggregation anderer Proteine zu hemmen. Somit könnte der Verlust der Chaperon-Funktion die Ursache der Parkinson'schen Erkrankung der Mutationsträger sein.

3.4 Zell-Stress-Experimente

Für Zytotoxizitäts- oder Proliferationsuntersuchungen an Zellen in Kulturen ist ein direktes Zählen der Zellen mit Hilfe eines Mikroskops oder mit einem elektronischen Zellzähler nicht immer geeignet und es wurden stattdessen indirekte Methoden wie der MTT-Proliferationstest und der LDH-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Bei diesen Tests wurden die Stoffwechselfunktion der Zellen, sowie ihre Membranintegrität gemessen.

3.4.1 Zytotoxizitätsversuche und Proliferationstests mit 14-3-3zeta-like Zellen

Zytotoxizitätsversuche mit 14-3-3zeta-like Zellen

Die Zellschädigung oder der Zelltod wird häufig über die Quantifizierung der Membranschädigung bestimmt. Hohe Mengen LDH im Medium deuten auf den Zelltod vieler Zellen und deren dann brüchige Zellwand hin, wodurch ein Austreten des LDHs aus der Zelle ins Medium ermöglicht wird. Die Menge an LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen. Bei diesem Versuch wurden die LDH Mengen von Zellkulturen unter Einfluss eines Stressors mit denen der Kontrolle verglichen. Da in neurodegenerativen Erkrankungen vermehrt Proteinablagerungen gefunden wurden, wurde hier als Stressor Lactacystin, ein Hemmer des proteasomalen Proteinabbaus, eingesetzt. Um den Einfluss von Lactacystin auf die Zytotoxizität der Zellen zu messen, wird der LDH Wert der Lactacystin behandelten Zellen mit dem LDH Wert der DMSO-Kontrolle verglichen. DMSO wird zum Lösen von Lactacystin verwendet und muß somit bei der Kontrolle ebenfalls zugegeben werden. Daraus ergibt sich eine Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrolle.

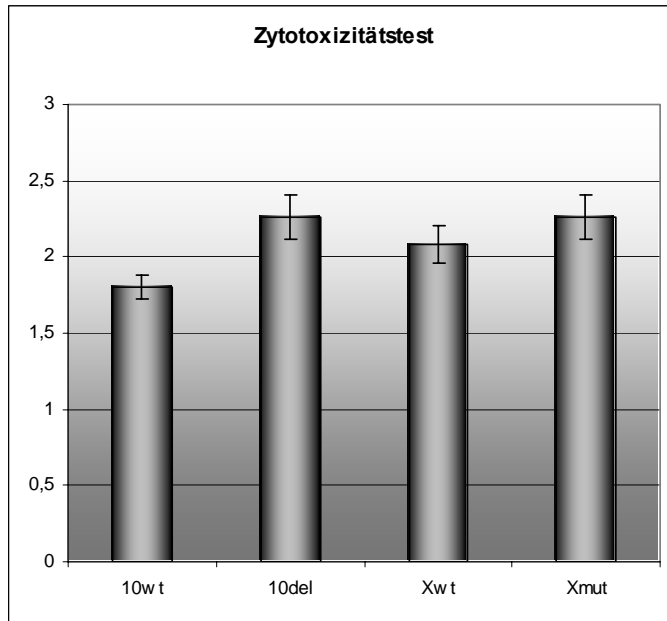


Bild 3-17 Vergleich der Zytotoxizität von 14-3-3zeta-like exprimierenden Zellen unter Einfluss von Lactacystin. Stabil exprimierende 14-3-3zeta-like Zellen wurden mit dem LDH-Zytotoxizitätstest auf ihre Zytotoxizität unter Einwirkung des proteasomen Hemmers Lactacystin getestet. Da das Lactacystin in DMSO gelöst vorlag, wurden die Zellen der Kontrolle mit der gleichen Konzentration DMSO, wie sie in der Lactacystin-Lösung vorlag, behandelt. In der behandelten DMSO Kontrolle gab es keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen den 14-3-3zeta-like Konstrukten. Betrachtet man jedoch den Einfluss von Lactacystin auf die Zellen (Zytotoxizität angegeben in % der DMSO-Kontrolle) sieht man einen Unterschied in der Bewältigung von zellulärem Stress.

Proliferationstests mit 14-3-3zeta-like Zellen

Während der LDH-Test den Beginn einer einsetzenden Zytotoxizität anzeigt, können bereits im MTT-Test deutlich gesenkte und signifikante Unterschiede in der Proliferationsrate nachgewiesen werden, da unter zellulärem Stress das Stadium der Proliferationshemmung vor dem Stadium der Zytotoxizität zu erwarten ist. Mit dem MTT-Test wurden in diesem Versuch die Proliferationsraten von stabil exprimierenden 14-3-3zeta-like Zellen unter Einfluss verschiedener Stressoren gemessen (Bild 3-17 bis 19).

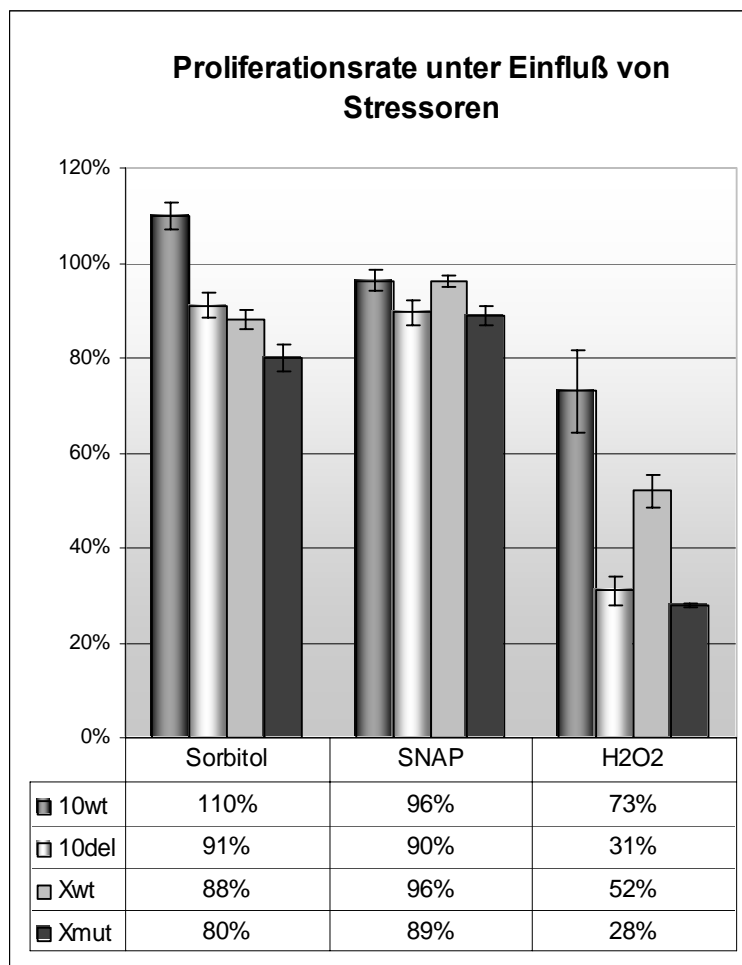


Bild 3-18 Vergleich der Proliferationsrate von 14-3-3 zeta-like exprimierenden Zellen unter Einfluss verschiedener Stressoren.

Stabil exprimierende 14-3-3zeta-like HEK Zellen werden für 18 Stunden mit verschiedenen Stressoren behandelt. Mittels MTT-Proliferationstest wird die Proliferationsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen, mit ANOVA ausgewertet und grafisch dargestellt (n=10, P-Werte <0,0001). Die hier dargestellten Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Wildtyp und mutiertem Protein unter allen drei Stressoren waren jeweils signifikant. Unter Verwendung von H₂O₂ als Stressor zeigten sich jedoch die gravierendsten Unterschiede.

Stressoren: 300 mM Sorbitol, 200µM H₂O₂, 600µM SNAP (S-Nitroso-Acetylpenicillamin)

Besonders deutliche wird der Unterschied in der Proliferationsrate zwischen Zellen, die das Wildtyp-, und Zellen, die das mutierte Protein unter Einwirkung von oxidativen Stress (H_2O_2) exprimieren. 14-3-3zeta-like10del Zellen weisen eine um 42 Prozentpunkte und 14-3-3zeta-likeXmut Zellen um 24 Prozentpunkte gesenkte Proliferationsrate im Vergleich zu Zellen mit dem jeweiligen Wildtyp-Protein auf. Somit konnte gezeigt werden, dass die Mutation im Zellkultur-Experiment einen Nachteil bei oxidativem Stress darstellt. Unter Einwirkung von osmotischem Stress (Sorbitol) oder unter Verwendung eines NO-Donors (SNAP) sind zwar signifikante aber nur geringe Unterschiede zu verzeichnen. Kaum (1,4 % höhere Proliferationsrate bei 14-3-3zeta-like10wt im Vergleich zur Mutante) bis keine (beim den 14-3-3zeta-likeX Konstrukten) Unterschiede waren zu erkennen, setzte man den Stressor Methylmethansulfonat (MMS, 2 μ g/ml) ein. Da sich die größten Unterschiede in der Proliferationsrate bei 14-3-3zeta-like10wt und 14-3-3zeta-like10del Zellen ergaben, wurden diese Zellen verwendet um weitere Stressoren zu testen.

Als weiterer Stressor wurden 2mM MPP^+ für 18h auf die stabilen 14-3-3zeta-like10 Zellen gegeben. Dabei zeigte sich, dass die Proliferationsrate von 14-3-3zeta-like10del Zellen mehr von der Noxe beeinflusst war als bei Zellen, die die Wildtyp-Form des Proteins exprimierten, wenn auch ein relativ geringer aber signifikanter Unterschied bestand. Da MPP^+ normalerweise selektiv dopaminerge Zellen schädigt, hier aber in einem *in vitro* Versuch HEK Zellen verwendet wurden, sind die Ergebnisse jedoch nicht repräsentativ für das Verhalten in neuronalen Zellen. Generell wurde beim Einsatz von Stressoren auch untersucht, ob es sich um reversible oder um irreversible Zellschädigungen handelte. Bestand eine verringerte Proliferationsrate, so bestand diese auch noch nach weiteren 24 h in stressorfremem Medium. Eine längere Inkubation ohne Stressor führt zu einer sehr langsamen Erholung der Zellen.

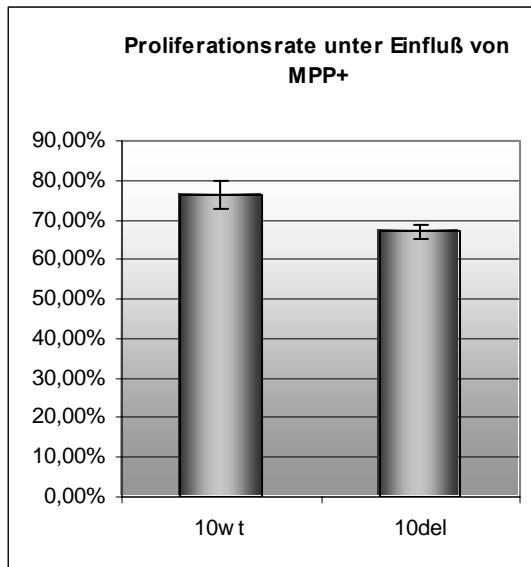


Bild 3-19 Vergleich der Proliferationsrate von 14-3-3zeta-like exprimierenden Zellen unter Einfluss von MPP⁺. Stabile 14-3-3zeta-like10 HEK-Zellen wurden 18 h mit 2 mM MPP⁺ exponiert. Anschließend wurde die Proliferationsrate mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen. Dabei zeigte sich ein kleiner, jedoch signifikanter Unterschied zwischen 14-3-3zeta-like10wt und 14-3-3 zeta-like10del Zellen.

Die Hypothese, dass die Parkinson'sche Erkrankung auch durch Gifte hervorgerufen werden kann, wurde bestärkt durch die Entdeckung, dass die Injektion von MTPT verunreinigten Drogen zu einer schweren parkinsonähnlichen Symptomatik führt. MTPT wird zu MPP⁺ oxidiert, welches sich in den Mitochondrien anreichert und zu einer Komplex I-Hemmung (NADH-Dehydrogenase) in der Atmungskette führt (Nicklas *et al.* 1991). Diese Hemmung führt zu einem ATP-Mangel im Gewebe (Chan *et al.* 1991), welcher zu einer Neurodegeneration führt. Für die neurotoxischen Wirkung von MPP⁺ ist die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich, die eine Erhöhung des oxidativen Stresses bedeuten (Hasegawa *et al.* 1997).

3.4.2 Zusammenfassung der Zytotoxizitätsversuche

Schon beim LDH-Zytotoxizitätstest konnte unter Einwirkung des proteasomalen Hemmers Lactacystin ein Unterschied in der Bewältigung von zellulärem Stress festgestellt werden. So war der LDH-Gehalt im Medium bei Zellen, die das mutierte 14-3-3zeta-like Protein exprimierten, höher, als bei Zellen, die das jeweilige Wildtyp-Protein exprimierten. Diese Ergebnisse bestätigten sich im MTT-Test. 14-3-3zeta-like^{10del} Zellen weisen eine um 42 Prozentpunkte und 14-3-3zeta-like^{Xmut} Zellen um 24 Prozentpunkte gesenkte Proliferationsrate im Vergleich zu Zellen mit dem jeweiligen Wildtyp-Protein auf. Somit konnte gezeigt werden, dass die Mutation im Zellkultur-Experiment einen Nachteil bei oxidativem Stress darstellt. Unter Einwirkung von osmotischem Stress (Sorbitol) oder unter Verwendung eines NO-Donors (SNAP) sind zwar signifikante aber nur geringe Unterschiede zu verzeichnen.

Da die Sensitivität des LDH Test geringer ist als die des MTT Tests und an einem anderen Stadium der Zellschädigung angreift, wurden beide Tests angewendet, um Wildtyp und mutiertes Protein exprimierenden Zellen mit verschiedenen Stressoren auf Unterschiede in der Bewältigung von zellulärem Stress zu testen. Eine vergleichende Studie von LDH- und MTT-Test von Dr. Peters am Institut für Pathologie der Johannes Gutenberg-Universität (unveröffentlicht) konnte ebenfalls eine unterschiedliche Sensitivität dieser Tests feststellen. Ein Einsetzen des zytotoxischen Effekts des Stressors Trichostatin A war bereits bei einer Konzentration von 1 μ M sichtbar, signifikant jedoch erst bei einer Konzentration von 1 mM. Im Gegensatz dazu war beim MTT Test eine hochsignifikante Proliferationshemmung bereits bei 1 μ M sichtbar. Der Effekt wurde auch nicht gesteigert durch eine weitere Erhöhung der Konzentration dieses Stressors. Diese Beobachtungen konnten mit den hier verwendeten Stressoren ebenfalls bestätigt werden. Während der LDH-Test den Beginn einer einsetzenden Zytotoxizität anzeigt, können bereits im MTT-Test deutlich gesenkte und signifikante Unterschiede in der Proliferationsrate nachgewiesen werden. Dies lässt sich vor allem auch dadurch erklären, dass unter zellulärem Stress das Stadium der Proliferationshemmung vor dem Stadium der Zytotoxizität zu erwarten ist.

Beide Tests führten zu dem Ergebnis, dass die 14-3-3zeta-like Zellen mit der mutierten Form des Proteins schlechter in der Lage waren zellulären Stress, insbesondere oxidativer Art, zu kompensieren.

3.5 Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like

Um die zellulären Funktionen und Stoffwechselkreisläufe an denen ein Protein beteiligt ist näher zu charakterisieren, kann die Suche nach Interaktionspartnern hilfreich sein. Auf diese Weise können wichtige Informationen über ein Zusammenspiel der Proteine in der Zelle aufgedeckt und sowohl pathogene Vorgänge wie auch Angriffspunkte für eine Therapie identifiziert werden. Dabei wurden in dieser Arbeit ausschließlich Proteine auf eine Interaktion mit 14-3-3zeta-like untersucht, bei denen eine Bedeutung bei der Parkinson'schen Erkrankung bekannt war und/oder von denen bereits eine Interaktion zu anderen 14-3-3 Isoformen bekannt war.

3.5.1 Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Ataxin-3

14-3-3 ist ein multifunktionales, regulatorisches Protein mit einer aggregationshemmenden Wirkung. Die Chaperon-Funktion der 14-3-3 Proteine ist überall dort von besonderem Interesse, wo höhere Proteinmengen anfallen. Dies ist zum Beispiel bei der autosomal dominant vererbten, neurodegenerativen Polyglutaminerkrankung SCA1 der Fall. In einer Studie von Chen *et al.* 2003 konnte eine Interaktion zwischen 14-3-3 Proteinen und dem SCA1 Protein nachgewiesen werden. Die spinocerebelläre Ataxie des Typ 1 (SCA1) ist eine von acht neurologischen Erkrankungen, die auf eine Wiederholung und Expansion des CAG-Motivs zurückzuführen ist. Dabei korreliert die Größe der Expansion mit dem Erkrankungsalter und der Schwere der Erkrankung. Die Polyglutamin-Expansion im Ataxin-1 Protein führt zur Akkumulation des Proteins in Neuronen und hat eine Neurodegeneration zur Folge (Kaytor *et al.* 1999). Eine ähnliche pathologische Ursache besitzt zum Beispiel auch die Huntington'sche Erkrankung (Zoghbi und Orr, 2000, Nakamura *et al.* 2001).

Mittels Coimmunopräzipitation und Yeast-two-Hybrid Versuchen konnte eine Interaktion zwischen Ataxin-1 und 14-3-3 (Isoformen 14-3-3eta und 14-3-3zeta) bereits nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Stärke der Bindungsaffinität dieser beiden Proteine von der Länge der Polyglutamin-Expansion des Ataxin-1 abhängig (Chen *et al.* 2003). Eine größere Expansion hatte eine höhere Bindungsaffinität zur Folge.

Eine der SCA1 von der Pathogenese sehr ähnliche Erkrankung ist die spinocerebelläre Ataxie des Typs 3 (SCA3). Hierbei ist das Ataxin-3 Protein von der Polyglutamin-Expansion betroffen. Aufgrund der ähnlichen Pathogenese zwischen SCA1 und SCA3 und der bereits

beschriebenen Interaktion von Ataxin-1 und 14-3-3 konnte man vermuten, dass eventuell auch eine Interaktion zwischen Ataxin3 und 14-3-3zeta-like besteht. Als Methoden für einen Test auf Interaktion der beiden Proteine wurden die Coimmunopräzipitation und das Yeast-two-Hybrid-Verfahren verwendet.

Die 14-3-3zeta-like Konstrukte 10wt und Xwt wurden in den Yeast-two-Hybrid Bindedomänen-Vektor pBTM117c (LexA BD) und in den Aktivierungsdomänen-Vektor pGAD426 (Gal4 AD) inkloniert. Ataxin-3 und verschiedene Ataxin-3-Deletions-Konstrukte wurden von Martina Zimmermann (Diplomandin der Medizinischen Genetik, Tübingen) über eine Klonierung ebenfalls in die Yeast-two-Hybrid Vektoren eingebracht. Die Ataxin-3 Konstrukte befanden sich nicht in den identischen, aber in kompatiblen Yeast-two-Hybrid Vektoren. Um die mögliche Interaktion zwischen den Ataxin-3 und 14-3-3zeta-like10wt oder 14-3-3zeta-likeXwt Proteinen zu überprüfen, wurden die Konstrukte in verschiedenen Kombinationen und jeweils ein Mal mit einem Aktivierungsdomänen- und Bindedomänen-Vektor in Hefezellen cotransformiert und durch die Zugabe von X-Gal auf eine Blaufärbung untersucht (Bild 3-20). Für eine Untersuchung auf Protein-Protein-Interaktionen wurde der L40-Hefestamm verwendet, wenn die 14-3-3 Konstrukte im pBTM117c-Bindedomänen-Vektor und die Ataxin-3 Konstrukte im pADGal4-Aktivierungsdomänen-Vektor eingesetzt wurden. Wurden jedoch die Ataxin-3 Konstrukte im pBDGal4-Bindedomänen-Vektor und die 14-3-3 Konstrukte im pGAD426-Aktivierungsdomänen-Vektor verwendet, so wurde der Hefestamm Y190 als Expressionssystem ausgewählt. Jedoch trat bei einigen Konstrukten eine Selbstaktivierung auf, dies war der Fall bei dem 14-3-3zeta-like10wt Konstrukt im Bindedomänen-Vektor pBTM117c und bei den an die Gal4 Bindedomäne gekoppelten vollständigen Ataxin-3-Fusionskonstrukte. Zwar zeigt sich bei diesen Konstrukten auch beim Test auf Interaktion eine Blaufärbung der Kolonien, diese ist aber höchstwahrscheinlich auf eine Selbstaktivierung zurückzuführen. Bei den Konstrukten ohne Selbstaktivierung konnten keine blauen Kolonien identifiziert werden. Somit konnte keine signifikante Interaktion zwischen Ataxin-3 und den 14-3-3zeta-like Proteinen gezeigt werden.

Um die Wahrscheinlichkeit eines falschnegativen Ergebnisses des Yeast-two Hybrid Systems zu minimieren, wurde ein weiteres Verfahren zur Identifikation einer Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Ataxin-3 durchgeführt: eine Coimmunopräzipitation. Das Zelllysat Ataxin-3 stabil exprimierender Zellen und stabile exprimierender 14-3-3zeta-like10wt-V5-Zellen wurde gemischt und mittels V4-Agarose 14-3-3zeta-like10wt-V5 Protein isoliert.

Ataxin-3 Fragmente	pGAD426			pBTM117c		
	14-3-3zeta-like10wt	14-3-3 zeta-likeXwt	pGAD426 Leervektor	14-3-3zeta-like10wt	14-3-3 zeta-likeXwt	pBTM117c Leervektor
N-Terminus (AS 1 - 180)						
vollständig (Q) ₁₅ (AS 1-368)						
vollständig (Q) ₈₃ (AS 1-436)						
C-Terminus (Q) ₁₅ (AS 181-368)						
C-Terminus (Q) ₁₀₈ (AS 181-461)						
Bindedomäne- bzw. Aktivierungdomäne- Leervektor						
Positivkontrolle: Ataxin-3 vollständig						

Bild 3-20 Test auf Interaktion zwischen Ataxin-3 und 14-3-3zeta-like mittels Yeast-two Hybrid.

Die Ataxin-3 Fragmente, jeweils gekoppelt an eine Aktivierungs- oder Bindedomäne, wurden auf Interaktion mit den 14-3-3zeta-like10wt und Xwt getestet (auch jeweils an eine Aktivierungs- oder Bindedomäne gekoppelt). Die blauen Kolonien entsprechen den blauen Kolonien im Test auf Selbstaktivierung (letzten zwei Zeilen). Selbstaktivierend sind: Ataxin-3 in voller Länge und 14-3-3zeta-like10wt jeweils wenn es gekoppelt an die Bindedomäne vorliegt. Für den Test auf Selbstaktivierung (letzten zwei Zeilen) wurden die Ataxin-3 Konstrukte gekoppelt an die Gal4 Aktivierungsdomäne (pAD Gal4) gegen den leeren Bindedomänen-Vektor pBTM117c (LexA BD), sowie die Ataxin-3 Konstrukte gekoppelt an die Gal4 Bindedomäne (pBD Gal4 Cam) gegen den leeren Aktivierungsdomänen-Vektor pGAD426 (Gal4 AD) getestet.

Jedoch auch bei diesem Verfahren konnte in den Westernblot-Analysen ebenfalls keine Interaktion von 14-3-3zeta-like10wt mit Ataxin-3 gefunden werden. Somit ist, nach den Ergebnissen dieser Studie, nicht von einer Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Ataxin-3 auszugehen.

3.5.2 Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und α -Synuklein, Synphilin-1 und Periphilin

Für die Proteine α -Synuklein, Synphilin-1 und Periphilin lagen bereits Ergebnisse vor, die eine Bedeutung für die Parkinson'sche Erkrankung darlegten. Da die Suche nach Interaktionspartnern eines Proteins wichtige Informationen über die Funktion eines Proteins und dessen Eingliederung in Stoffwechselkreisläufe liefern kann, sollten durch den Test auf Interaktion mit diesen Proteinen mehr Informationen über die Bedeutung und die Funktion von 14-3-3 in der Pathogenese der Parkinson'schen Erkrankung gesammelt werden. Von Ostrerova *et al.* 1999 war zu diesem Zeitpunkt eine Sequenzhomologie zwischen 14-3-3 und α -Synuklein (zwischen Aminosäure 8 und 61 existieren zwei Regionen mit 36-42 % Sequenzhomologie), sowie die Interaktion zwischen 14-3-3eta und α -Synuklein publiziert. Somit sollte in dieser Arbeit auch das 14-3-3zeta-like Protein auf eine Interaktion mit α -Synuklein untersucht werden. Zunächst wurden die 14-3-3zeta-like10wt und 14-3-3zeta-likeXwt Konstrukte in den Yeast-two-Hybrid Vektoren pBTM117c und pGAD426 verwendet, um im Yeast-two-Hybrid Versuch auf eine Interaktion mit α -Synuklein, ebenfalls kloniert in die Vektoren pBTM117c und pGAD426, zu testen. Da im X-Gal-Test keine Blaufärbung zu sehen war, konnte eine Interaktion nicht bestätigt werden.








pBTM117c	pGAD426		
	14-3-3zeta-like10wt	14-3-3zeta-likeX wt	pGAD426 Leervektor
Synuklein wt			
Synuklein A30P			
Positivkontrolle			

Bild 3-21 Test auf Interaktion zwischen α -Synuklein und 14-3-3zeta-like mittels Yeast-two Hybrid. Im Test auf Interaktion zwischen α -Synuklein wt bzw. α -Synuklein A30P und 14-3-3zeta-like10wt bzw. 14-3-3zeta-likeXwt konnte nach dem X-Gal Test keine Blaufärbung der Kolonien festgestellt werden, die auf eine Interaktion hinweisen würden.

Synphilin-1 und Periphilin wurden mittels Yeast-two Hybrid ebenfalls auf Interaktion mit 14-3-3zeta-like10wt und 14-3-3zeta-likeXwt untersucht. Auch hier konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu den Yeast-two Hybrid Versuchen wurden noch GST-Pull down-, Coimmunopräzipitation- und Biacore-Analysen durchgeführt. Für die Proteinaufreinigung im GST-Pull down wurden sowohl GST-Sepharose wie auch GST Magnetic beads verwendet. Die Coimmunopräzipitation wurde mit V5-Agarose und Lysat auf 14-3-3zeta-like10wt-V5 Zellen durchgeführt. Beide Verfahren konnten ebenfalls keine Interaktion zwischen α -Synuklein wt beziehungsweise α -Synuklein A30P und 14-3-3zeta-like10wt beziehungsweise 14-3-3zeta-likeXwt nachweisen. Die Biacore-Analysen bestätigten ebenfalls, dass keine Interaktion existierte. Für die Biacore-Analysen, die in Zusammenarbeit mit Dr. Ichimura (Tokyo Metropolitan University, Japan) durchgeführt wurden, wurde phosphoryliertes Synuklein verwendet, da 14-3-3 häufig mit phosphorylierten Proteinen interagiert. Die Biacore-Experimente wurden mit dem Biacore 2000 von Biacore durchgeführt. Die detaillierte Durchführung der Methode wurde von Itagaki *et al.* 1999 publiziert. Eine Protein-Proteininteraktion ist bei der Biacore-Analyse an einem Kurven-Ausschlag zu erkennen (Bild 3-25). Es gab jedoch keine Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like10wt oder 14-3-3zeta-like10del und α -Synuklein wt oder α -Synuklein A30P, weder in der unphosphorylierten (nicht dargestellt) noch in der phosphorylierten Form (Bild 3-23). Somit bestätigen die Biacore-Analysen eindeutig die Ergebnisse der Coimmunopräzipitations- und der Yeast-two Hybrid-Experimente.

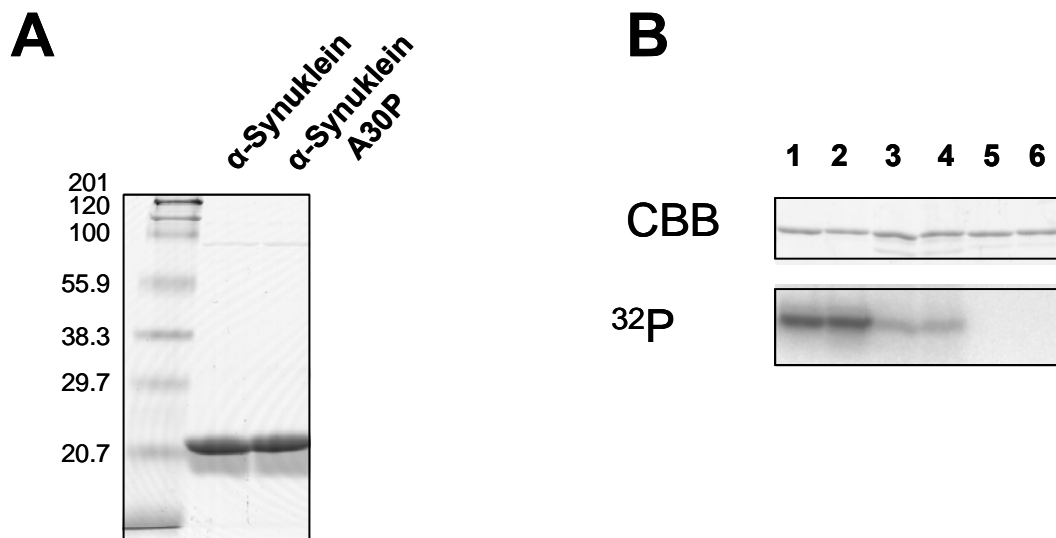


Bild 3-22 Herstellung, Isolierung und Phosphorylierung von α -Synuklein.

A α -Synuklein wt und α -Synuklein A30P GST-Protein wurde bakteriell exprimiert, aufgereinigt und das GST-Protein mittels Prescission-Protease Verdau entfernt. Die Reinheit des Proteins wurde in der hier dargestellten Western-Blot-Analyse gezeigt.

B Gereinigtes α -Synuklein wt (Spur 1, 3, 5) und α -Synuklein A30P (Spur 2, 4, 6) Protein wurde mit verschiedenen Kinasen phosphoryliert: Casein Kinase I (Spur 1 und 2) und Calmodulin-abhängige Protein Kinase Typ II (Spur 3 und 4). Unphosphoryliertes α -Synuklein ist in Spur 5 und 6 dargestellt. α -Synuklein wt und α -Synuklein A30P werden zwar durch die Calmodulin-abhängige Protein Kinase Typ II phosphoryliert (Spur 3 und 4) aber die Phosphateinlagerung ist wesentlich geringer als unter Verwendung der Casein Kinase I (Spur 1 und 2). Um sicherzustellen, dass die gleichen Mengen an Protein eingesetzt wurden, wurde zusätzlich eine Coomassie brillant blue (CBB) Färbung durchgeführt.

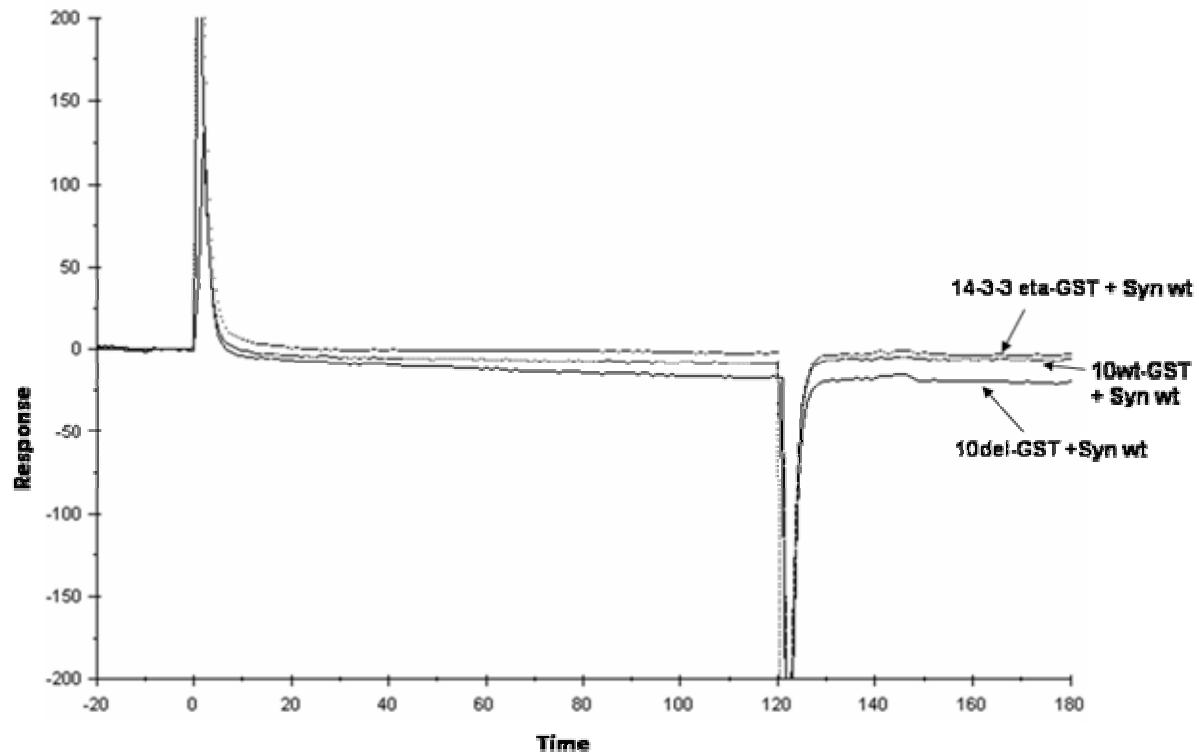


Bild 3-23 Test auf Interaktion zwischen α -Synuklein wt (phosphoryliert mit Casein Kinase I) und 14-3-3zeta-like10wt mittels Biacore-Analyse. Es gab keine Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like10wt oder 14-3-3zeta-like10del und α -Synuklein wt. Bei einer Interaktion, wie sie in Bild 3-32 beim Nachweis der Interaktion von phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase und 14-3-3zeta-like mittels Biacore-Analyse sichtbar ist, kommt es zu einem Kurven-Ausschlag. Weiterhin konnte jegliche Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like10wt bzw. 14-3-3zeta-like10del und α -Synuklein wt bzw. α -Synuklein A30P (unphosphoryliert oder phosphoryliert mit Casein Kinase I oder mit phosphoryliert mit Calmodulin-abhängiger Kinase II) mittels Biacore-Analyse ausgeschlossen werden (Bilder nicht dargestellt, da Kurvenverlauf mit dem in Bild 3-23 zu vergleichen ist).

3.5.3 Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Tyrosin-Hydroxylase

Bei der Parkinson'schen Erkrankung geht der Zelltod der dopaminergen Neuronen einher mit der Reduktion des Hirndopamins. Diese Dopamin-Verarmung in der *Substantia nigra* stellt die Hauptursache der Symptome dar. Betrachtet man die Dopaminsynthese, so stellt das Enzym Tyrosin-Hydroxylase das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym der Dopaminsynthese dar (Ostrerova *et al.* 1999, Ichimura *et al.* 1988). In der Arbeit von Perez *et al.* 2002 wurde 14-3-3 und α -Synuklein als Wechselspieler in der Dopaminsynthese beschrieben: Das α -Synuklein-Protein reduziert die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase durch die Bindung an dephosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase und mindert somit die Dopamin Biosynthese,

während das 14-3-3 Protein die Dopaminsynthese durch die Bindung an phosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase fördert. Ein Mangel an α -Synuklein würde zu einem Dopamin-Überschuss, ein Mangel an 14-3-3 Protein hingegen würde zu einer Verlangsamung der Dopaminsynthese und zu einer Verarmung an Dopamin führen. Eine grafische Darstellung dieser Zusammenhänge ist Bild 1-6 und Bild 4-4 dargestellt.

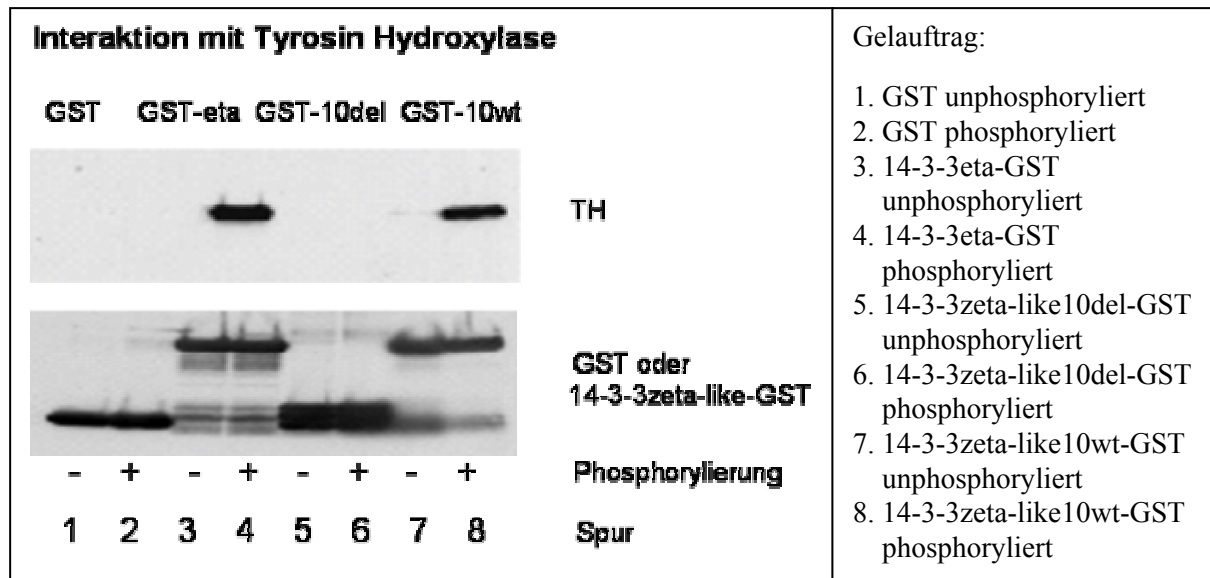


Bild 3-24 Nachweis der Interaktion von phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase und 14-3-3 zeta-like mittels GST-Pull down.

Bakteriell exprimiertes 14-3-3zeta-like 10wt-GST Protein bindet bakteriell exprimierte menschliche Tyrosin Hydroxylase nur, wenn sie zuvor durch CaM Kinase II phosphoryliert wurde (Spur 8). Diese Art der Interaktion ist vergleichbar mit der des Kontrollproteins, 14-3-3eta-GST (Spur 4). Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion mit GST alleine festgestellt werden, was auf eine spezifische Interaktion hinweist (Spur 1 und 2). Von besonderem Interesse war, dass keine Interaktion des 14-3-3zeta-like10del-GST Protein auftrat (Spur 5 und 6). Dieses Ergebnis wurde mehrfach wiederholt und bestätigt, so dass in diesem Fall die Deletion des Proteins zu einem Funktionsverlust führt.

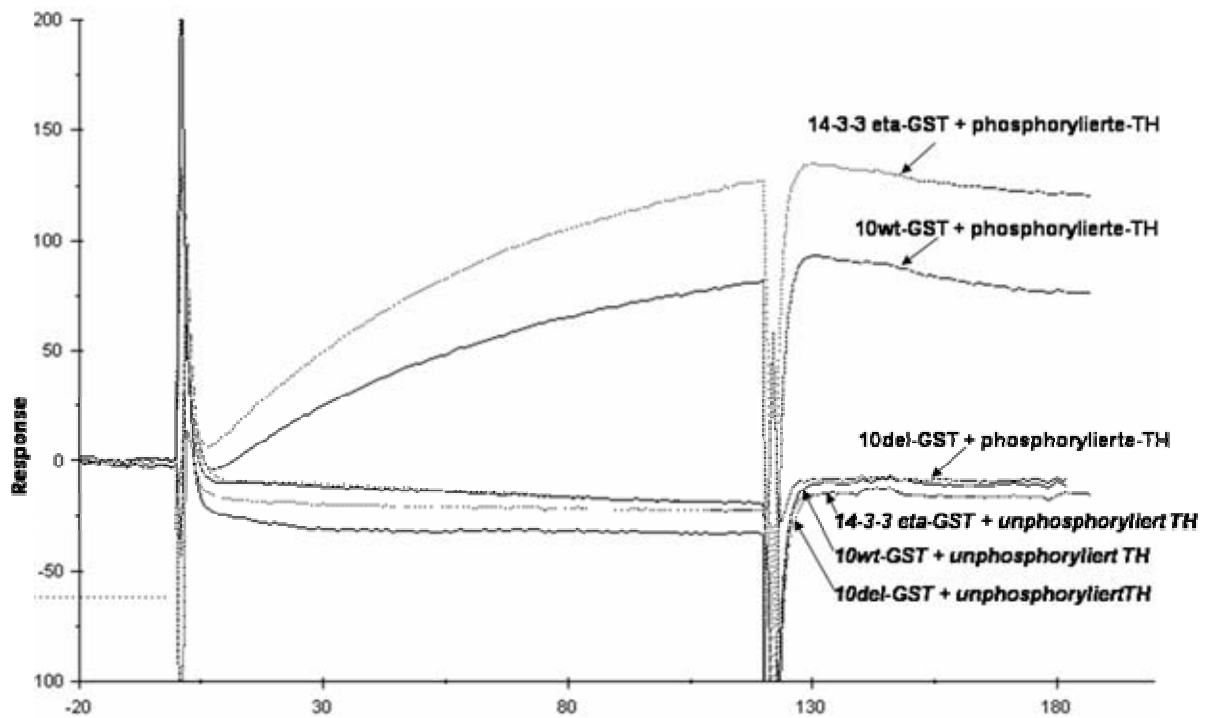


Bild 3-25 Nachweis der Interaktion von phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase und 14-3-3zeta-like mittels Biacore-Analyse. Die Biacore Methode wurde verwendet um eine Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like10wt und phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase (TH) nachzuweisen und auf diese Weise die Western-Blot-Analyse (Bild 3-24) nochmals zu bestätigen. Das 14-3-3zeta-like10wt Protein, jedoch nicht das 14-3-3zeta-like10del Protein bindet spezifisch an phosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase, wie auch die 14-3-3eta (Positivkontrolle). Eine Interaktion ist im Biacore durch einen Kurvenauschlag zu erkennen wie man deutlich an der erhöhte Linie des 14-3-3zeta-like10wt und des 14-3-3eta Proteins sieht im Vergleich zu den nicht erhöhten Linien des 14-3-3zeta-like10del Proteins und der Proteine zusammen mit der unphosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase. Somit ist die Interaktion gebunden an eine Phosphorylierung der Tyrosin-Hydroxylase und an ein funktionstüchtiges 14-3-3 Protein.

Die Bindung von 14-3-3 Proteinen ist für die optimale Aktivierung der Tyrosin-Hydroxylase durch Phosphorylierung des Enzyms notwendig (Ichimura *et al.* 1987, Kleppe *et al.* 2001). Da die Funktionen der 14-3-3 Proteine isotypenspezifisch sind (Kleppe *et al.* 2001), war es wichtig zu sehen, ob auch die 14-3-3zeta-like Isoform an die phosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase bindet. Damit ist auch das 14-3-3zeta-like Protein in diesen Zyklus der Dopamin-Biosynthese einzuordnen. In dieser Arbeit konnte die Interaktion von 14-3-3zeta-like10wt mit phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase bestätigt werden und gleichzeitig die schwere funktionelle Beeinträchtigung des mutierten 14-3-3zeta-like Proteins nachgewiesen

werden. Der Verlust dieser Interaktion mit der phosphorylierten Tyrosin-Hydroxylase würde *in vivo* eine verringerte Dopaminsynthese bedeuten und könnte somit zur Ausprägung der Parkinson- typischen Symptome führen.

3.5.4 Test auf Interaktion zwischen 14-3-3zeta-like und Raf-1

14-3-3 Proteine sind in vielen Signalwegen involviert und interagieren direkt mit einer großen Anzahl von regulatorischen Proteinen wie z.B. Raf-1, Cbl und c-Bcr (Irie *et al.* 1994).

Die Serin-259-Bindung von 14-3-3 an Raf-1 schützt das Raf-1 Protein vor der Dephosphorylierung des Proteins durch seinen negativen Regulator, der Protein Kinase A. Raf-1 und Protein Kinase A bilden einen Signalkomplex in den Zellen. Wenn die Protein Kinase A aktiviert wird, phosphoryliert sie das Raf-1 Protein und verhindert die Rekrutierung von Raf-1 zur Plasmamembran und blockiert die Raf-1-Aktivierung. Das 14-3-3 Protein schützt somit Raf-1 vor der Protein Kinase A induzierten Inhibition der Kinase Aktivität von Raf-1 (Dumaz und Marais 2003).

Die dreidimensionale Kristallstruktur von 14-3-3zeta deutet darauf hin, dass ein konservierter amphipathischer Molekülbereich das Bindeglied für viele Bindungspartner darstellt. Kleine strukturelle Änderungen dieses Molekülbereichs können bereits die Bindungsaffinität des Proteins herabsetzen oder gar soweit senken, dass eine Bindung nicht mehr möglich ist. Studien mit mehreren mutierten 14-3-3 Proteinen haben einen Hinweis auf Bereiche gegeben, die für die Interaktion mit Raf-1 notwendig sind. So mindern Mutationen, die die Ladung des amphipathischen Molekülbereichs betreffen, die Interaktion mit der Raf-1 Kinase und Mutationen, die die hydrophoben Eigenschaften des amphipathischen Molekülbereichs betreffen, verhindern die Interaktion vollständig (Zhang *et al.* 1997, Wang *et al.* 1998). Diese bekannten Mutationen betreffen Regionen, die ebenfalls bei der 14-3-3zeta-like10del Mutation, nicht aber bei der 14-3-3zeta-likeX Mutation, betroffen sind. Es sollte nun analysiert werden, ob die Mutation im 14-3-3zeta-like10 Deletionsprotein die Bindungsaffinität des Proteins beeinträchtigt. In Kooperation mit Haiyan Fu (Atlanta) wurde die Interaktion der 14-3-3zeta-like Proteine mit dem gut charakterisierten 14-3-3 regulierten Bindungspartner Raf-1 getestet (Bild 3-26).

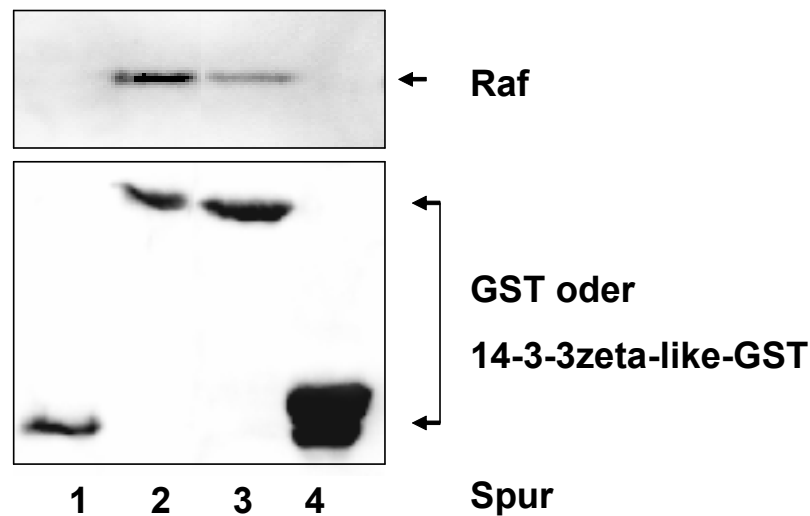


Bild 3-26 Nachweis der Interaktion von 14-3-3zeta-like mit Raf-1. 14-3-3 Proteine haben viele Funktionen und viele Interaktionspartner. Um zu testen ob die 14-3-3zeta-like10 Deletion zu einer veränderten Proteinfunktion führt, wurden die 14-3-3zeta-like Proteine auf eine Interaktion mit einem gut charakterisierten, 14-3-3-regulierten, Interaktionspartner Raf-1 getestet. Gereinigtes Raf-1 Protein aus Cos7 Zellen, phosphoryliert an Position 259, wurde mit 14-3-3zeta-like-GST Protein inkubiert. Raf-1 wurde auf Interaktion mit der Negativkontrolle (nur GST, Spur 1), mit der Positivkontrolle 14-3-3gamma-GST (Spur 2) und schließlich mit 14-3-3zeta-like10wt (Spur 3) und 14-3-3zeta-like10del (Spur 4) untersucht. GST Sepharose Beads werden verwendet, um das GST-Fusionsprotein zu isolieren. 14-3-3zeta-Raf-1 Proteinkomplexe werden unter Verwendung eines Kaninchen Anti-Raf-1 (C-12) Antikörper (SC-133, Santa Cruz) und eines Anti-14-3-3zeta Antikörpers über eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Während bei 14-3-3zeta-like10wt eine Interaktion deutlich sichtbar ist, tritt diese nicht bei der Mutante auf.

Während das 14-3-3zeta-like10wt Protein deutliche eine Interaktion mit Raf-1 zeigt, diese Interaktion tritt diese nicht beim mutieren 14-3-3zeta-like10del auf. Die Mutation bedingt also ein Verlust der Interaktion mit Raf-1, wie ein Verlust der Interaktion mit Tyrosin-Hydroxylase. Zusammen mit den Ergebnissen der Aggregationsversuchen ist somit bei der Mutation von meinem Funktionsverlust des Proteins auszugehen.

3.5.5 Zusammenfassung der Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like

Ziel der Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like war es, mehr über die Aufgaben des Proteins und die Stoffwechselkreisläufe, in die es involviert ist, in Erfahrung zu bringen. Gleichmaßen war von Interesse, ob oder in wie weit die Mutationen eine Auswirkung auf die Funktion der Proteine haben und ob eine Fehlfunktion des 14-3-3zeta-like Proteins wirklich mit den Symptomen der Parkinson'schen Krankheit korrelieren können.

Während die Suche nach Interaktionspartnern der 14-3-3zeta-like Proteine keine Interaktion mit den Proteinen α -Synuklein, Synphilin-1 und Periphilin erbrachte, konnte die Interaktion zu phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase und Raf-1 bestätigt werden. Gleichzeitig konnte die schwere funktionelle Beeinträchtigung des mutierten 14-3-3zeta-like Proteins nachgewiesen werden. Beide gefundenen Interaktionspartner interagieren nicht mehr mit dem mutierten Protein und die Proteinaggregationsversuche zeigen ebenfalls an, dass die Mutation des 14-3-3zeta-like¹⁰ Proteins einen Funktionsverlust zur Folge hat. Für die Fragestellung, ob die 14-3-3zeta-like Proteine eine Rolle bei der Entwicklung der Parkinson'schen Erkrankung haben könnten, war die Entdeckung der Interaktion mit der phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase der wohl wichtigste Hinweis, der direkt auf eine Funktion der 14-3-3 Proteine in der Dopaminsynthese hinweist.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit sollen erstmals Mutationen in 14-3-3zeta homologen Genen bei Parkinson-Patienten vorgestellt und charakterisiert werden. Damit wird erstmals ein Zusammenhang zwischen dem 14-3-3zeta Protein und der Parkinson'schen Erkrankung hergestellt. Die Ergebnisse der funktionellen und zellbiologischen Untersuchungen geben Aufschluss über die Bedeutung der Mutationen für die Parkinson'sche Erkrankung und sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Genetik der Parkinson'schen Erkrankung

Das Parkinson Syndrom: Prävalenz und Ursache der Erkrankung

Das ideopathische Parkinson-Syndrom ist nach der Alzheimer-Erkrankung die häufigste neurodegenerative Erkrankung. In Deutschland leben derzeit ungefähr 250000 Betroffene (Jost 2005). Während die Prävalenz bei den 65-69-Jährigen noch bei 0,6 % liegt (Bild 1-1), steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter auf bis zu 3,5 % bei den 85-89-Jährigen an (de Rijk *et al.* 1997). Noch immer kann die Erkrankung nicht geheilt werden, sondern lediglich eine Linderung der Symptomatik für eine beschränkte Zeit erzielt werden. Während zu Beginn nur leichte Symptome auftreten schreitet die Erkrankung mit zunehmendem Lebensalter fort und führt letztendlich zum Tod des Patienten. Die neuropathologische Grundlage dieser Symptome ist ein zunehmender Verlust der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra* (Gibb 1992). Als Ursache für das Sterben der dopaminergen Neurone wird derzeit ein Zusammenspiel aus Umwelt- und genetischen Faktoren gesehen (McCall *et al.* 2001).

Vorteile der genetischen Analysen: Rückschlüsse auf zelluläre Vorgänge beim ideopathischen Parkinson-Syndrom und die Option der Früherkennung

Nur ein kleiner Teil der Parkinson-Fälle ist kausal auf einen Gendefekt zurückzuführen. Diese wenigen genetischen Fälle können jedoch helfen, die Mechanismen zu verstehen, die ebenfalls in den Parkinson-Fällen mit unbekannter Krankheitsursache ablaufen. Die Identifizierung und Charakterisierung von Parkinson-Genen und deren Substraten lieferte klare Hinweise darauf, dass Fehler beim Abbau bestimmter Proteine im Ubiquitin-Proteasomen System (bei *parkin*-Mutationen), Protein-Aggregate (*α -Synuklein*) und

Veränderungen in der dopaminabhängigen Neurotransmission bei der Pathogenese der Parkinson'schen Erkrankung eine zentrale Rolle spielen. In diesem Bereich lassen sich auch die Funktionen der 14-3-3 Proteine eingliedern, wie in den nächsten Absätzen näher beschrieben wird.

Ein weiterer Vorteil der genetischen Analyse ist eine mögliche Früherkennung. Die Parkinson'sche Erkrankung ist eine progrediente, neurodegenerative Erkrankung, die sich klinisch erst manifestiert, wenn bereits 70-80 % der dopaminergen Neuronen abgestorben sind. Das bedeutet, dass es eventuell möglich wäre, die Parkinson'sche Erkrankung zu verhindern, wenn man das Absterben der dopaminergen Neuronen in seinen Anfängen hemmen oder verlangsamen könnte. International gewinnt das Thema Neuroprotektion mehr und mehr an Interesse. Die Hauptprobleme liegen jedoch darin, dass bisher zu wenig über die dem Zelltod zugrunde liegenden Mechanismen bekannt ist, um gezielt eingreifen zu können, und dass bisher keine Möglichkeit existiert, um die Parkinson-Patienten schon in der präklinischen Phase identifizieren zu können. Radiologische Untersuchungen ermöglichen zwar eine frühere Erkennung, sind aber weder für die Untersuchung von Patienten ohne klinische Beschwerden gedacht, noch können sie eine Erkrankung feststellen, bevor nicht 40-50 % der Zellen abgestorben sind. Eine Erkrankung vor Krankheitsbeginn zu identifizieren wäre lediglich bei einer familiären Form des Parkinson-Syndroms mit Hilfe von genetischen Tests möglich, wie es bei anderen genetisch bedingten Erkrankungen üblich ist (Lyon und Miller 2003, Ensenauer *et al.* 2005).

Somit gibt es mehr als genug Gründe für die Suche nach weiteren Kandidatengen und für die Ergründung der molekularen Ursache der Parkinson'schen Erkrankung.

4.2 14-3-3 Proteine als Kandidatengene für die Parkinson'schen Erkrankung

14-3-3 Proteine sind bekannt als Regulatoren der Zellteilung, der Signaltransduktion und der Apoptose. Sie fungieren als Chaperone und als Adaptermoleküle für Protein-Protein Interaktionen, beeinflussen die Lokalisierung von Proteinen und hemmen oder aktivieren Enzyme. Für diese Arbeit wichtiger war jedoch die Rolle der 14-3-3 Proteine in vielen neurologischen Erkrankungen des Menschen (Dougherty und Morrison 2004, Tabelle 1-3). Die Grundlage der Arbeit stellten die zur 14-3-3zeta Form homologen Gene und deren Mutationen, die bei Parkinson-Patienten gefunden wurden, dar. Ziel der Arbeit war die Charakterisierung dieser Gene und die Untersuchung ihrer funktionellen Relevanz für die Parkinson'sche Erkrankung.

Die 14-3-3zeta homologen Gene(14-3-3zeta-like) und die Mutationen 14-3-3zeta-like10del und 14-3-3zeta-likeXmut

Bei der Analyse von 14-3-3 Genen wurden zwei neue 14-3-3 Gene identifiziert, die sich auf dem Chromosom 10 (Accession XM_005100) und dem X Chromosom (Accession XM_018019) befinden und eine hohe Homologie zur 14-3-3zeta-Isoform zeigen. Aufgrund dieser starken Ähnlichkeit zur zeta-Isoform (Bild 3-1), wurden die homologen Gene mit 14-3-3zeta-like benannt. 14-3-3zeta-likeX ist zu 96 % und 14-3-3zeta-like10 zu 98 % mit der 14-3-3zeta Form identisch. Dies zeigt eine hohe Homologie der *14-3-3zeta* und der *14-3-3zeta-like* Gene an. Vergleicht man die 14-3-3zeta Form des Menschen mit der von *Drosophila* so stimmen diese nur in 81 % überein. (Kockel *et al.* 1997). Natürlich kann fragen wie ähnlich ein Gen dem anderen sein muß um ein homologes Gen darzustellen oder ab wann es als neue 14-3-3 Isoform angesehen werden sollte. Bei dieser hohen Homologie ist das zeta-like Protein dem zeta-Protein sehr ähnlich. Auch die Interaktions-Versuche bestätigen, dass man bei der 14-3-3zeta-like Form von einer identischen/homologen Form des 14-3-3zeta-Proteins ausgehen kann. Sowohl bei der Interaktion mit phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase als auch bei der Interaktion mit Raf-1 reagiert das 14-3-3zeta-like Protein wie das 14-3-3zeta Protein.

Die *14-3-3zeta-like* Gene wurden am stärksten im Gehirn exprimiert (Bild 3-2).

Bei der Untersuchung von DNA-Proben von 303 Parkinson-Patienten mittels SSCP-Analysen konnte keine Mutation im 14-3-3zeta Gen aber in den neuen 14-3-3zeta homologen Genen

gefunden werden (Carsten Holzmann, persönliche Mitteilung). Ein c.95A>G Austausch im 14-3-3zeta-likeXwt Gen hat einen Aminosäureaustausch p.Gln32Arg zur Folge (14-3-3zeta-likeXmut). Im 14-3-3zeta-like10wt Gen wurde eine Deletion einer Base, c.98delG (p.Gly33fs), gefunden, bei der es zu einer Verschiebung des Leserahmens und im weiteren Verlauf der Sequenz zur Entstehung eines Stopcodon führt (E33fsX89).

Die Krankheitsgeschichte der Mutationsträger und ihrer Familien

Der Patient mit der 14-3-3zeta-like10del Mutation entwickelte die ersten Symptome mit 62 Jahren: einen Rigor und einen Ruhetremor bei dem auch der Kopf betroffen war. Die Symptome verschwanden unter einer L-Dopa Behandlung. Vater, Onkel und Schwester des Patienten waren ebenfalls betroffen und die Familienanamnese zeigte einen autosomal dominanten Erbgang an. Eine Tochter des Patienten war ebenfalls Mutationsträgerin, jedoch zum Zeit der Untersuchung mit 41 Jahren noch nicht erkrankt. Die Mutation wurde weder bei den 360 nicht betroffenen Kontrollen-Individuen noch bei 305 Ataxie-Patienten gefunden.

Die Mutation im 14-3-3zeta-likeX Gen wurde bei einer weiblichen Patientin gefunden, die erstmals mit 55 Jahren Symptome der Parkinson'sche Erkrankung entwickelte. Es war eine Verlangsamung der Bewegungen, eine Starre der rechten Gliedmaßen und ein Nachschleppen des rechten Beins zu erkennen. Bei einer Untersuchung im Alter von 59 Jahren waren die Symptome Rigor und Bradykinese deutlich sichtbar. Bei der Gangbewegung vielen die kleinen langsamen Trippelschritte, ein reduziertes Mitschwingen der Arme und eine milder haltungsbedingter Tremor der rechten Seite auf. Eine Behandlung mit L-Dopa und dem Dopamin Agonisten Bromocriptin führte zu einer Besserung der Symptome. Psychiatrische Untersuchungen ergaben eine leichte Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses, leichte Depressionen und lebhafte Träume. In ihrer Familie war bisher kein weiterer Parkinson-Fall aufgetreten. Die Mutation wurde nicht in den 226 Kontrollen noch bei einer Untersuchung von 107 Ataxie-Patienten gefunden, wodurch nicht von einem Polymorphismus auszugehen ist. Das Glutamin an dieser Stelle ist beim Menschen, der Maus und der Ratte konserviert (Bild 3-1) und deutet somit auf eine funktionelle Bedeutung der Mutation hin.

In wie weit die Mutationen für den Krankheitsverlauf bedeutend sind, soll mit den folgenden Untersuchungen analysiert werden. Diese Arbeit soll den molekulargenetischen Fragestellungen, die sich bei den 14-3-3zeta homologen Genen und den Mutationen ergeben, nachgehen. Natürlich wären weitere Untersuchungen der Familienmitglieder von höchstem Interesse. Natürlich wünscht man sich bei der Untersuchung einer genetischen Erkrankung die

Untersuchung vieler Familienmitglieder einer möglichst großen Familie, ausführliche Segregations-Analysen, umfangreiche genetische Tests und eine regelmäßige Kontrolle des Krankheitsverlaufs aller betroffenen Personen. Mit dieser Datenlage wäre es der einfachste und naheliegendste Weg, den man einschlagen würde um eine genetische Ursache zu belegen. Leider sind nicht alle Familien groß und für diese Untersuchungen greifbar, so dass sich dieser Weg nicht immer verwirklichen lässt. So beschäftigt sich diese Arbeit rein mit der molekulargenetischen und zellbiologischen Charakterisierung von 14-3-3zeta-like und den Mutationen 14-3-3zeta-like10del und 14-3-3zeta-likeXmut. Dabei steht bei den Untersuchungen der Vergleich zwischen Wildtyp und mutiertem Protein im Vordergrund. Somit dient das Wildtyp-Protein immer als interne Referenz für das mutierte Protein.

4.2.1 Funktionelle Charakterisierung

Welche Fragestellungen wurden bearbeitet?

Bei der funktionellen Charakterisierung der 14-3-3zeta-like Proteine standen mehrere Fragestellungen im Vordergrund. Wo sind die 14-3-3 Proteine in der Zelle lokalisiert und wie ändert sich die Lokalisation bei erhöhter Proteinhäufung in der Zelle wie es beim Parkinson'schen Syndrom der Fall ist? Besitzen die 14-3-3zeta-like Proteine eine Chaperon-Funktion wie sie für 14-3-3zeta beschrieben ist? Verhält sich also 14-3-3zeta-like wie 14-3-3zeta? Gibt es Unterschiede zwischen den mutierten und den Wildtyp 14-3-3zeta-like Proteinen in ihrer Funktionsweise? Sprechen die Funktionen für eine Bedeutung der 14-3-3zeta-like Mutationen bei der Parkinson'schen Erkrankung? Diese Fragen sollen im Folgenden abgearbeitet und diskutiert werden.

Bei der funktionellen Charakterisierung von 14-3-3zeta-like Proteinen wurde das Hauptaugenmerk auf den Vergleich der Wildtyp-Proteine mit den mutierten Proteinen gesetzt. Dabei wurden die Proteine sowohl in isolierter Form wie auch in Zellkulturmodellen analysiert und miteinander verglichen.

Die Lokalisation der 14-3-3zeta-like Proteine

Um die zelluläre Lokalisation von 14-3-3zeta-like Proteinen zu untersuchen, wurden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293) mit 14-3-3zeta-like-EGFP und 14-3-3zeta-like-V5-His Konstrukten transfiziert und stabil exprimierende Zelllinien erzeugt. Die Fusionsproteine mit dem grünen Fluoreszenzprotein waren aufgrund der sehr intensiven und langlebigen Fluoreszenz gut und einfach mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Für die Konstrukte mit dem V5-Protein war eine Immunfluoreszenz mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper notwendig. Bei beiden Verfahren konnte eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation der 14-3-3zeta-like Wildtypproteine und des 14-3-3zeta-likeXmut-Proteins nachgewiesen werden. Lediglich das 14-3-3zeta-like10del Protein zeigte eine andere Lokalisation: zu der zytoplasmatischen Lokalisation kam bei diesem deutlich kleineren, verkürzten Protein eine nukleäre Lokalisation hinzu (Bild 3-4).

Schon hier ergab sich ein interessanter Unterschied in der zellulären Lokalisation der 14-3-3zeta-like10 Proteine. Während das Wildtyp-Protein ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert vorlag, war das mutierte Protein auch und sogar verstärkt im Zellkern zu finden.

Wie kann man sich die veränderte Lokalisation erklären? Bei Transkriptionsfaktoren und vielen anderen Proteinen wird die Lokalisation über Kernimport- oder Kernexport-Signale geregelt. Transkriptionsfaktoren werden wie alle Proteine im Zytoplasma synthetisiert und besitzen in der Regel ein Kernimport-Signal (NLS, von nuclear localisation signal). Das NLS wird von Kernimport-Rezeptoren spezifisch erkannt und bewirkt die schnelle Akkumulation dieser Proteine in den Zellkern. Einige Transkriptionsfaktoren (wie auch andere Proteine) besitzen jedoch zusätzlich auch ein Kernexport-Signal (NES, von nuclear export signal). Dieses wird spezifisch von Kernexport-Rezeptoren erkannt und führt zum schnellen Export des Proteins aus dem Zellkern. Durch Regulation von Import und Export bei Proteinen, die sowohl eine NLS als auch eine NES besitzen, kann die relative Menge solcher Proteine im Zellkern versus Zytoplasma, die so genannte nukleo-zytoplasmatische Partitionierung, sehr schnell beeinflusst und verändert werden. Solche Veränderungen können durch Umweltsignale und/oder entwicklungspezifische Signale hervorgerufen werden (Vetter *et al.* 2004).

Der Grund für die unterschiedliche Lokalisation des 14-3-3zeta-like10del Proteins

Die 14-3-3zeta-like Sequenzen wurden auf NES oder NLS untersucht. Man hätte sich bei dem 14-3-3zeta-like10del entweder ein, aufgrund der Mutation, fehlendes Nukleus Export Signals oder, durch die veränderte Sequenz, ein neu entstandenes Nukleus Import Signal vorstellen

können. Bei den 14-3-3zeta Proteinen ergab sich bei der Sequenzanalyse jedoch kein bisher bekanntes NLS oder NES. Wenn man nicht von einem bisher unbekanntem NLS ausgeht ist demzufolge anzunehmen, dass die veränderte, nukleäre Lokalisation des 14-3-3zeta-lile10del Proteins auf dessen geringere Größe zurückzuführen ist. Insgesamt sind ca. 100 bis 200 verschiedene Proteine am kontrollierten Ablauf von Kernexport und -import beteiligt. Allein 30 bis 40 Proteine werden für die Bildung der Kernporen gebraucht, die die Kernmembran durchspannen und den Transportkanal für den Import und Export von Molekülen darstellen. Während Proteine unterhalb einer bestimmten Größe (etwa 50 kDa) frei zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her diffundieren können, benötigen größere Makromoleküle die Mithilfe so genannter Rezeptorproteine, die die zu befördernde Ladung erkennen und durch die Kernporen schleusen (Seewald *et al.* 2002). Ändert sich die Lokalisation eines Proteins in so drastischer Weise, so ist anzunehmen, dass seine übliche Funktion im Zytoplasma nicht mehr erfüllt werden kann, allein durch die Lokalisation in einem anderen Kompartiment der Zelle.

Proteinansammlungen als gemeinsames Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen

Viele, wenn nicht gar alle, neurodegenerativen Erkrankungen zeichnen sich durch Proteinaggregate oder Proteineinschlüsse aus. Dies schließt die Prionen-Protein Plaques bei Prionen-Erkrankungen, die amyloiden Plaques und neurofibrilläre Tangles bei der Alzheimer-Erkrankung, Lewy-Körperchen bei der Parkinson'schen Erkrankung und der Demenz mit Lewy-Körperchen, neuronale Einschlüsse bei den Poly-Glutamin-Erkrankungen wie der Huntington-Erkrankung, der spinocerebellären Ataxie, der amyotrophen Lateralsklerose, der frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus und andere neurodegenerativen Erkrankungen mit ein (Chung *et al.* 2001, Sherman und Goldberg 2001).

Allerdings gibt es bei den Proteinanhäufungen Unterschiede in den Merkmalen und der Lokalisation: Amyloide Plaques, wie sie bei der Alzheimer-Erkrankung vorkommen, sind extrazellulär lokalisiert, während Lewy-Körperchen zytoplasmatisch sind und die Einschlüsse bei den Poly-Glutamin-Erkrankungen meist intranukleär vorkommen (Chung *et al.* 2001).

Ob die Bildung dieser Proteinanhäufungen protektiv für die Zelle ist oder gar den eigentlichen Grund für den Untergang der Zellen darstellt, wird kontrovers diskutiert (Chung *et al.* 2001, Bence *et al.* 2001, Taylor *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 2004). Derzeit wird jedoch die Isolierung von Protein in Form von Aggregaten als Schutzmechanismus der Zelle gesehen, wenn der Abbau von überschüssigem oder fehlgefaltetem Protein nicht mehr möglich ist (Tanaka *et al.* 2004).

Modell zur Analyse der 14-3-3zeta-like Proteine in Situationen erhöhter Proteinanhäufung

Von besonderer Bedeutung in der Parkinson'schen Erkrankung ist die Reaktion der Zelle auf den Zustand erhöhter Proteinanhäufung.

Der zelluläre Zustand erhöhter Proteinanhäufung, wie er bei der Parkinson'schen Erkrankung auftritt, sollte im Zellkulturmodell durch die Hemmung des Proteasomen-Systems in stabil exprimierenden 14-3-3zeta-like Zellen imitiert werden. Dabei stand die Rolle der 14-3-3zeta-like Proteine im Blickpunkt des Interesses. Da das gängigste System des Proteinabbaus, das Ubiquitin-Proteasomen-System, weitgehend blockiert wurde, häuften sich all die Proteine, die normalerweise über das Proteasom abgebaut werden an. Mit diesem Versuch sollte der Zustand stimuliert werden, der bei histologischen Untersuchungen an Gehirnen von Parkinson-Patienten festgestellt werden konnte: verstärkte Anhäufung von Proteinen mit Lewy-Körperchen-Bildung. Mikroskopisch fielen in den proteasomal gehemmten Zellen deutlich ein bis zwei Zellkernnahe kreisrunde Proteinansammlungen auf, die starke Ähnlichkeiten zu Lewy-Körperchen aufwiesen. Diese Proteinanhäufungen waren stabil und irreversibel von der Zelle gebildet worden und lösten sich kaum bis gar nicht durch Stoffe wie Vinblastin oder Nocodazol auf.

Die Aggresomenbildung von 14-3-3zeta-like exprimierenden Zellen

Die 14-3-3zeta-like stabil exprimierende Zellen entwickelten in einer Situation erhöhter Proteinanhäufung 1-2 runden, zellkernnahen Proteinanhäufungen. Durch die immunologische Analyse der Bestandteile sollte die Ähnlichkeit zu Lewy-Körperchen gezeigt werden. 14-3-3zeta ist in Lewy-Körperchen enthalten. Die Aggresomen, die sich im Zellkultur-Modell bildeten, enthielten 14-3-3zeta-like. Aggresomen sind nach Definition (Tanaka *et al.* 2004) 1-2 runde, juxt nukleäre Proteinanhäufungen pro Zelle, die Vimentin, γ -Tubulin und Ubiquitin enthalten. Vimentin ist ein fadenförmiges Proteinmolekül.

Aufgrund der Bestandteile der Aggresomen, die sich in einer Situation erhöhter Proteinanhäufung gebildet haben, wie sie bei der Parkinson'schen Erkrankung gegeben ist, ist eine Ähnlichkeit zur Bildung von Lewy-Körperchen gegeben. Man muß jedoch bedenken, dass die Situation, durch die Verwendung eines proteasomalen Hemmstoffs, künstlich geschaffene war. Mehr Einblicke in die Rolle der 14-3-3 Proteine bei der Aggregation von Proteinen bieten also die später behandelten Aggregationsversuche.

Immuncytologische Charakterisierung der Aggresomen

Die Aggresomen wurden immuncytologisch auf die Bestandteile Vimentin, γ -Tubulin und Ubiquitin untersucht. Zusätzlich wurden die Mitochondrien und die Lysosomen in der Zelle angefärbt. Besondere Sorgfalt wurde bei der Mikroskopie verwendet um sagen zu können, ob die untersuchten Bestandteile im ganzen Aggresom oder nur in dessen Halo enthalten waren. Bei allen mikroskopischen Fragestellungen wurde die Struktur immer in Schnittebenen eingeteilt und durch mehrere Bilder in eine räumliche Darstellung gebracht. Zusätzlich wurde die Diagramm-Darstellung als Analyse-Methode hinzugezogen. Eine grafische Diagramm-Darstellung ermöglicht es die Fluorochrom-Verteilung der einzelnen Fluorochrome auf einer gewählten Linie oder an einem bestimmten Punkt zu analysieren. Dadurch lässt sich, besser als in einer Überlagerung der einzelnen Farbkanäle, sagen, ob an einem bestimmten Punkt oder auf einer bestimmten Linie zwei Proteine vorliegen oder ob zum Beispiel das eine Protein nur nahe an ein anderes angelagert ist.

Durch Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die Proteinanhäufungen näher charakterisiert und als Aggresomen identifiziert. Diese Aggresomen waren Vimentin, Gamma-Tubulin und Ubiquitin positiv. Vimentin war an die Oberfläche der juxt nukleären Proteinanhäufungen angelagert (Bild 3-6 A und 3-6 B). γ -Tubulin (Bild 3-Bild 3-6 D) und Ubiquitin (Bild 3-6 C) waren nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch im Aggresom zu finden. Jedoch befand sich der Hauptteil des Ubiquitins im Halo des Aggresoms. Ebenfalls sehr auffallend war eine starke Zentralisierung der Mitochondrien und Lysosomen im Bereich des Aggresoms. 14-3-3zeta-like Proteine waren ebenfalls in den Aggresomen enthalten. Dabei stellte sich die Frage, ob die 14-3-3zeta-like Proteine in den Aggresomen zu finden waren, da sie selbst aufgrund des gehemmten Proteasoms nicht mehr abgebaut werden konnten, oder ob die 14-3-3zeta-like Proteine über einen anderen Abbauweg abgebaut werden und in den Aggresomen aktiv ihrer Chaperon-Funktion nachkamen. Die Frage des Abbauweges von 14-3-3zeta-like war jedoch schwer zu beantworten. Es konnte keine Ubiquitinierung von 14-3-3zeta-like, welche auf einen Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen System hinweisen würde, nachgewiesen werden, jedoch auch keine Sumoilierung oder ein lysosomaler Abbauweg. Da jedoch die Western-Blot-Analysen zeigten, dass sicher nicht von einer Ubiquitinierung auszugehen ist und auch keine Anreicherungen nach proteasomaler Hemmung im Sinne von einer höheren Menge an Gesamt-14-3-3 Protein erfolgt war, wird angenommen, dass die 14-3-3zeta-like Proteine nicht in den Aggresomen lokalisiert sind weil das Protein selbst dort angehäuft wird, sondern weil die 14-3-3zeta-like Proteine dort eine Rolle bei der Beseitigung von angehäuften und überschüssigen Proteinen spielen.

Die Rolle der 14-3-3 Proteine bei der Aggresomenbildung

Kaneko und Hachiya haben 2006 die Hypothese formuliert, dass 14-3-3zeta in der Zelle die Rolle eines „Straßenkehrers“ für missgefaltete Proteine übernimmt indem es die Bildung von Aggregaten begünstigt. Durch die Bildung dieser Einschlusskörperchen werden die missgefaltete Proteine vom Zellstoffwechsel separiert und bewahren die Zellen vor dem Zelluntergang. Studien zur Lokalisation der 14-3-3 Proteine in unterschiedlichen Arten von Einschlusskörperchen im Gehirn bei Patienten mit Alzheimer, amyotropher Lateralsklerose, Creutzfeld Jacob, spinocerebellärer Ataxie Typ1 und Parkinson lassen eine starke Assoziation dieser Erkrankungen mit 14-3-3zeta zu. Man nimmt an, dass missgefaltete Proteine an die hydrophobe Oberfläche der amphipathischen Furche des 14-3-3zeta Moleküls gebunden werden, wenn der Abbau missgefalteter Proteine verzögert ist. Die Bündelung dieser Proteine in Einschlusskörperchen bewahrt die Zelle vor einer toxischen Schädigung. Diese von Kaneko und Hachiya formulierte Hypothese passt sehr gut zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Gleichzeitig sollen die 14-3-3 Proteine eine chaperonähnliche Funktion besitzen mit der die Aggregation von neu synthetisierten Proteinen von Beginn minimieren werden soll. Dabei interagieren die Chaperon-Proteine spezifisch mit aggregationsanfälligen Proteinen und haben so eine aggregationsmindernde Wirkung (Buchner 2002).

Die Rolle der Chaperone in der Zelle

Chaperon-Proteine besitzen für die Zelle lebenswichtige Funktionen. Schon bei der Synthese von Proteinen helfen sie bei der korrekten Proteinfaltung. Die Aggregationsversuche konnten eindeutig einen Funktionsverlust des mutierten 14-3-3zeta-like Proteins belegen. Somit fällt nicht nur die Unterstützung bei der richtigen Proteinfaltung weg sondern vor allem auch die Möglichkeit der Rückfaltung. Es werden mehr fehlgefaltete Proteine anfallen. Können diese vom Proteasom nicht ausreichend abgebaut werden, kommt es im Falle der Parkinson'schen Erkrankung zur Bildung von Lewy-Körperchen und letztendlich zum Absterben der dopaminergen Zellen. Der normale Weg der Zelle für den Umgang mit fehlgefalteten Proteinen ist in Bild 4-1 dargestellt. Bei den Mutationen im *α-Synuklein* und im *Parkin* Gen ist dieser Ablauf gestört (Bild 4-2). In Lewy-Körperchen verpacktes und aggregiertes *α-Synuklein* richten weniger Schaden an, als wenn es frei in der Nervenzelle vorliegt und den Zellstoffwechsel behindert und zum raschen Untergang der Zelle führt. Dies zeigt die Schutzfunktion der Aggresomen- oder Lewy-Körperchen-Bildung an. Bild 4-3 zeigt die Vorgänge wie sie bei dem mutierten 14-3-3zeta-like10del Protein aussehen könnten.

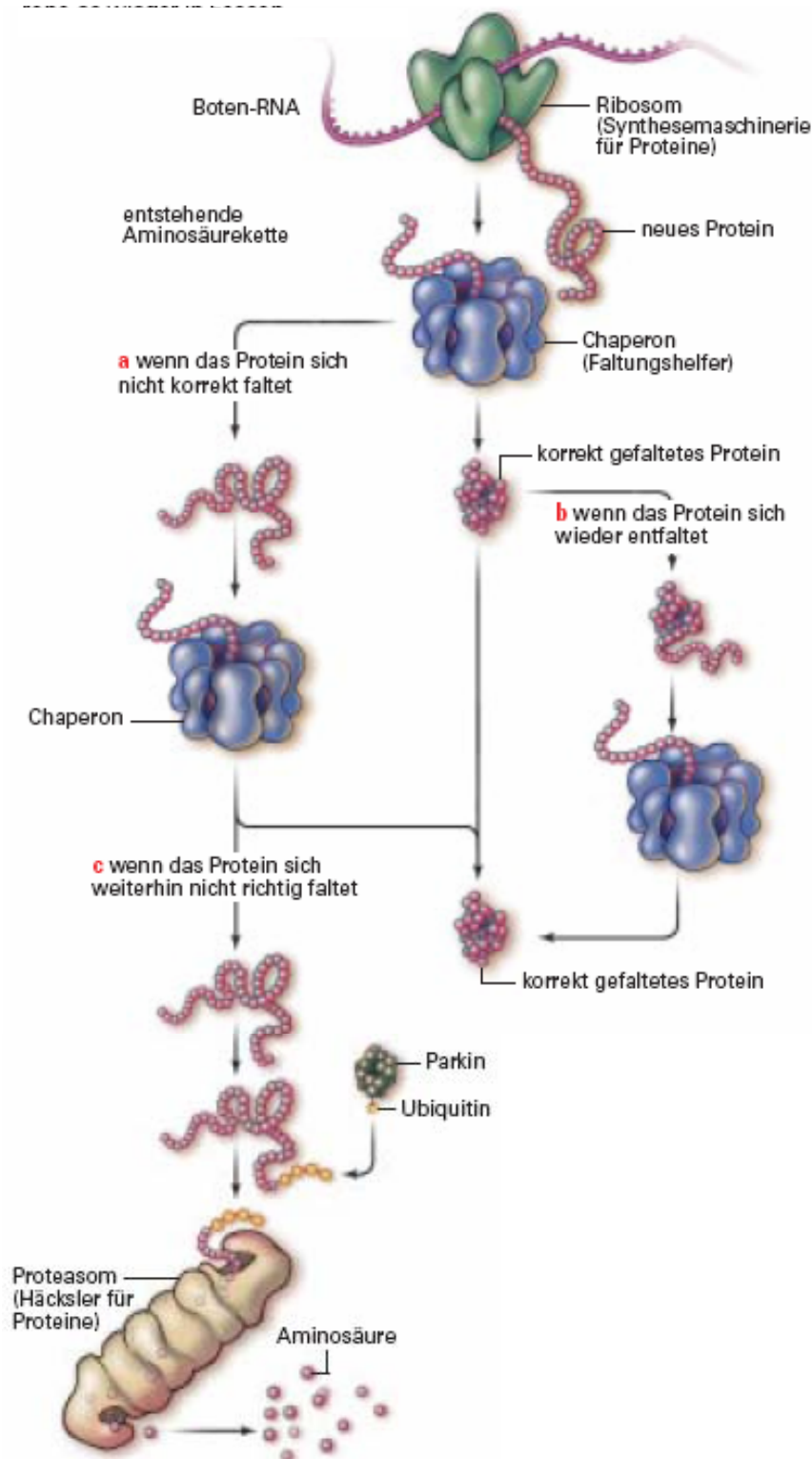


Bild 4-1 Proteinfaltung in normalen Zellen. In gesunden Zellen wird die korrekte Faltung von Proteinmolekülen durch die Chaperon-Proteine unterstützt. Dabei sorgen die Chaperone nicht nur bei der Neusynthese von Proteinen für die richtige Faltung, sondern können auch für die Rückfaltung von fehlgefaltetem Protein sorgen, dass entweder bei der Neusynthese (a) oder später auf Grund zahlreicher belastender Einflüsse die falsche Form annimmt (b). (Bild abgeändert Lozano und Kalia 2006)

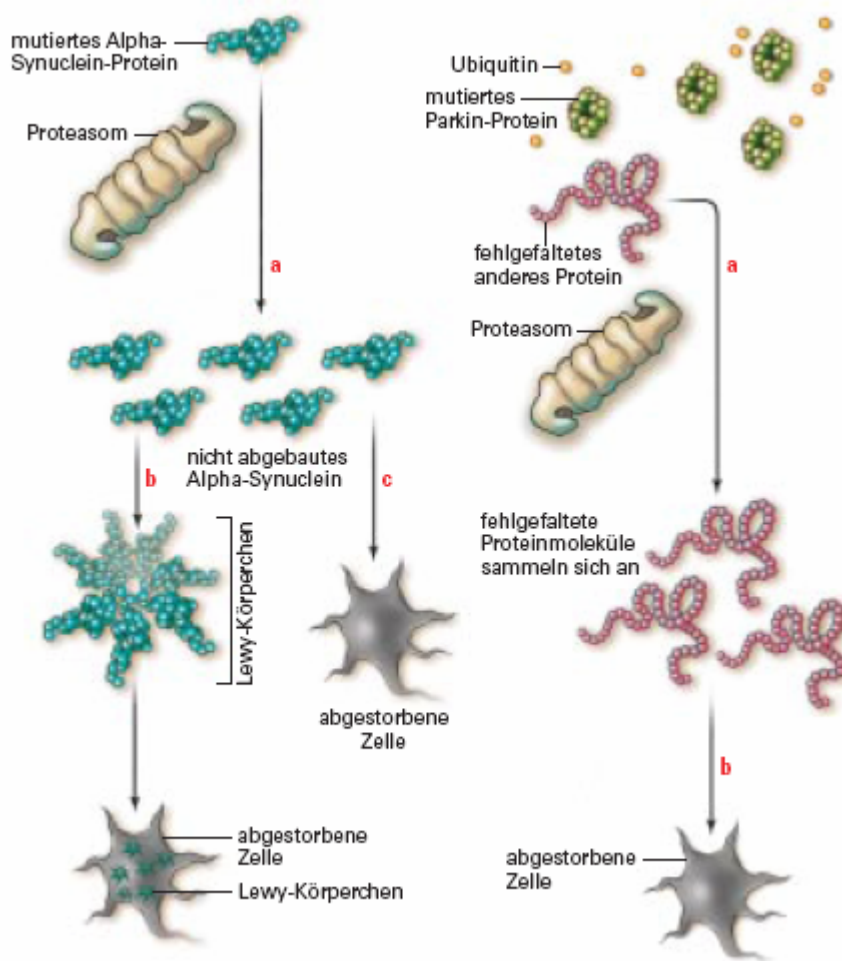


Bild 4-2 Die Fehlfunktionen bei PARK1 (links) und PARK2 (rechts dargestellt). Wenn das Chaperon-Proteasom-System bei Parkinson-Patienten versagt, wenn also die Chaperone nicht schnell genug arbeiten oder das Proteasom-System falsch gefaltete Proteine nicht schnell genug abbaut, sammeln sich Proteine in den Zellen an. Das führt zu Schäden und letztlich zum Tod der betroffenen Neuronen. **links:** Bei den Mutationen im α -Synuklein Gen häuft sich das mutierte α -Synuklein Protein in der Zelle an, da es nicht über das Proteasom abgebaut wird (a). In Lewy-Körperchen verpacktes und aggregiertes α -Synuklein (b) richten weniger Schaden an, als wenn es frei in der Nervenzelle vorliegt und den Zellstoffwechsel behindert und zum raschen Untergang der Zelle führt (c). Dies zeigt an, dass die Aggresomenbildung oder hier die Bildung von Lewy-Körperchen einen Schutzmechanismus der Zelle darstellt. **rechts:** Mutiertes Parkin-Protein kann kein Ubiquitin an falsch gefaltete Proteine anheften (a). Deshalb baut das Proteasom sie nicht mehr ab, was letztlich zum Tod der Zelle führt (b). Das mutierte Parkin-Protein führt nicht zur Bildung von Lewy-Körperchen (Bild abgeändert nach Lozano und Kalia 2006).

Die Chaperon-Funktion von 14-3-3zeta

Nachdem 14-3-3 als Protein mit einer chaperonähnlichen Funktion diskutiert wurden (Vincenz und Dixit, 1996), sollte ein Versuch etabliert werden, bei dem diese chaperonähnliche oder auch aggregationshemmende Funktion untersucht werden konnte. In Anlehnung an verschiedene Publikationen (Guha *et al.* 1998, Souza *et al.* 2000) wurde ein chemisch induzierter Alkohol-Dehydrogenase-Aggregations-Versuch völlig neu konzipiert. Dieser Versuch erfüllte die Anforderungen sowohl eine chaperonähnliche Funktion nachweisen zu können, als auch Unterschiede zwischen Wildtyp- und mutierten Protein bei ihrer aggregationshemmenden Wirkung aufdecken zu können. Zusätzlich war der Versuch entweder für höhere Volumina in 1 ml Kuvetten oder bei einem höheren Durchsatz mit größerer Stichprobenzahl in einer 96-well-Platte durchführbar. Eine photometrische Messung gab Aufschluss über die Menge an aggregiertem Protein. Erstmals wurde mit diesem Versuch eine chaperonähnliche Funktion von 14-3-3zeta-like Proteinen nachgewiesen. Während sowohl das Wildtyp als auch das mutierte 14-3-3zeta-likeX eine chaperonähnliche Funktion zeigte, konnten die Versuche bei der 14-3-3zeta-like10del Mutation einen Funktionsverlust des Proteins deutlich machen. Dies hat zur Folge, dass das mutierte Protein keine aggregationshemmende Wirkung mehr besitzt. Es ist anzunehmen, dass somit *in vivo* eine wichtige Funktion dieses Proteins stark beeinträchtigt bis aufgehoben wird. Die Auswirkungen der Mutation sind in Bild 4-3 grafisch dargestellt. Da die Beseitigung von überschüssigem Protein in der Parkinson'schen Erkrankung als zentraler Punkt in der Pathogenese gehandelt wird, könnte eine Beeinträchtigung der Chaperon-Funktion den Ausbruch der Erkrankung hervorrufen. Diese Mutation, die eine Anhäufung von Protein zur Folge hat, könnte also die kausale Ursache für die Parkinson'sche Erkrankung der Mutationsträger sein.

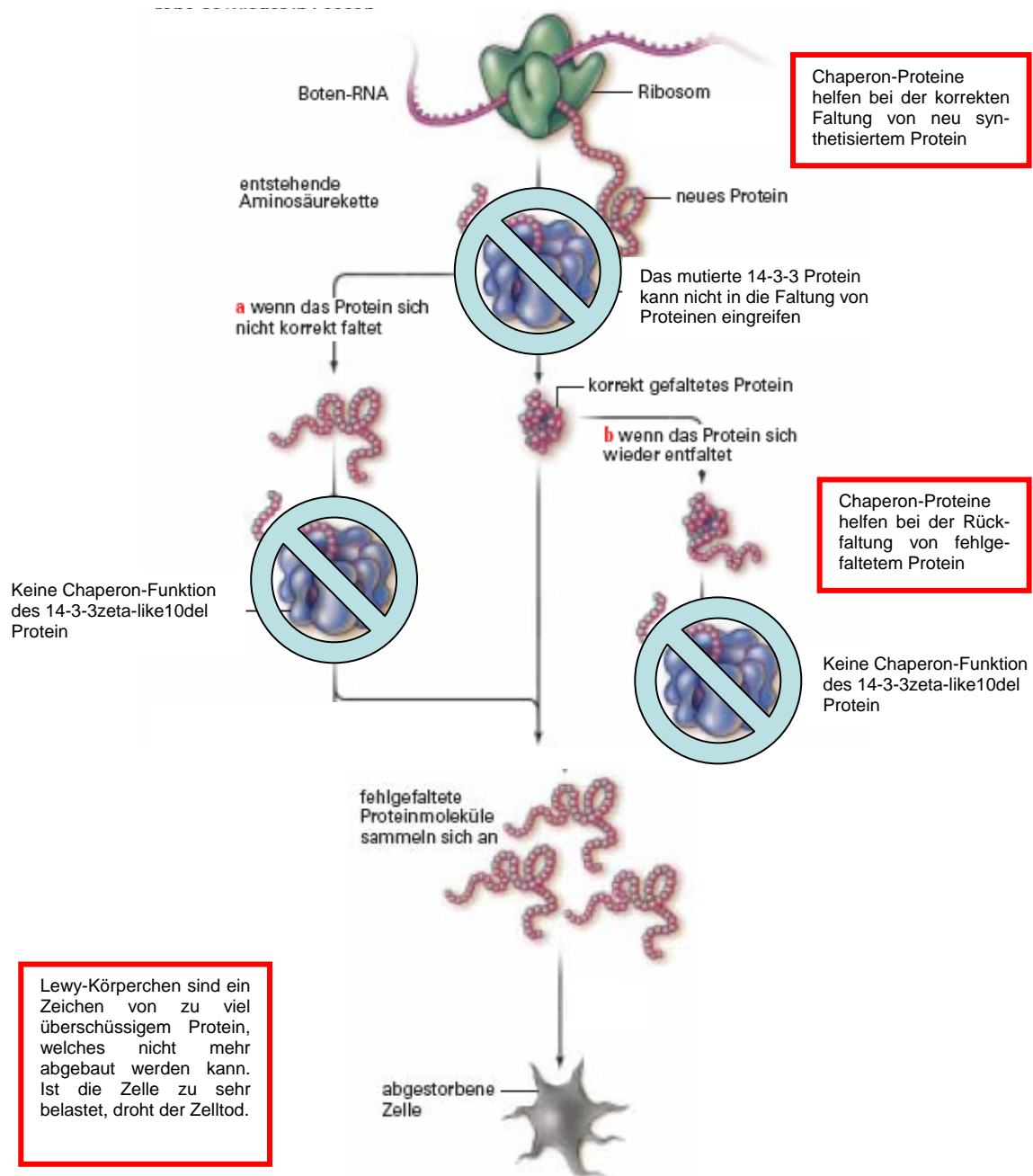


Bild 4-3 Die Auswirkung der 14-3-3zeta-like10del Mutation auf die Zelle. Chaperon-Proteine besitzen für die Zelle lebenswichtige Funktionen bei der Faltung der Proteine. Diese Arbeit kann den Funktionsverlust des mutierten 14-3-3zeta-like Proteins belegen. Somit fällt nicht nur die Unterstützung bei der richtigen Proteinfaltung weg sondern vor allem auch die Möglichkeit der Rückfaltung von fehlgefaltetem Protein, das entweder bei der Neusynthese entstehen kann (a) oder erst später eine falsche Faltung annehmen kann (b). Es werden mehr fehlgefaltete Proteine anfallen, die, wenn sie nicht vom Proteasom abgebaut werden, zum Absterben der Zelle führen.

4.2.2 Zell-Stress-Experimente

Die Parkinson'sche Erkrankung wird immer wieder als eine, in den meisten Fällen, sehr heterogene Erkrankung beschrieben, bei der mehrere Faktoren krankheitsauslösend wirken. Um weitere Indizien über die Faktoren, die zum Ausbruch der Erkrankung führen, zu sammeln, wurden mehrere Tests konzipiert, die das Verhalten der mutierten Proteine auch unter Einwirkung von zellulärem Stress zeigen sollten.

Zellkultur-Experimente: Die Wahl der Zellen und die Überexpression von 14-3-3zeta-like

Zellkultur-Experimente mit einer weiten Bandbreite von Analysemethoden für die Proteinanalyse eignen sich besonders gut um der Frage nachzugehen, welchen Einfluss bestimmte Proteine auf die Vorgänge im Zellinneren einer Zelle haben. In dieser Studie war von Interesse, welches die Folgen einer gezielten 14-3-3-Überexpression sind, sowie die Frage, was eine Überexpression eines Wildtypproteins im Vergleich zu mutierten Protein für die Zelle bedeutet. Da alleine die Überexpression eines Proteins einen starken Eingriff in die Stoffwechselfvorgänge der Zelle darstellt und bei der Parkinson'schen Erkrankung keine verstärkte Expression von 14-3-3zeta Proteinen bekannt ist, war für uns die zweite der oben genannten Fragestellungen von größerem Interesse: Was bedeutet die Expression eines mutierten 14-3-3zeta-like Gens im Vergleich zur Expression der Wildtyp-Form für die Zelle? Bei der Wahl der verwendeten Zelllinien wurde zunächst versucht ein System zu finden, welches die größtmögliche Ähnlichkeit zu den *in vivo* Vorgängen aufweist. Da Primärzellen schwerer zu beschaffen waren und es durch ihre stark begrenzte Lebensdauer deutlich schwerer ist, konstante, vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen, wurden zunächst dopaminerge SH-SY5Y Neuroblastomzellen ausgewählt. Bei Versuchen, bei denen es jedoch von enormer Bedeutung ist, dass eine stabile Expression der Proteine besteht und die Anzahl der transfizierten Zellen konstant bleibt, wurden stabil exprimierende 14-3-3zeta-like HEK293 Zellen verwendet. SH-SY5Y Zellen waren für eine transiente Transfektion geeignet, bei dem Versuch der Herstellung von stabil exprimierenden Zellen ergab sich jedoch häufig das Problem, dass die Geneticin-Resistenz nicht aber die 14-3-3zeta-like Gensequenz erhalten blieb. Gute reproduzierbare Ergebnisse konnten jedoch mit den HEK293 Zellen erzielt werden, so dass diese Zelllinie eingesetzt wurde, sobald eine stabile Transfektion erforderlich war. Diese stabilen Zelllinien wurden eingesetzt, um mittels Zytotoxizitäts- und Proliferationstests Unterschiede zwischen Zelllinien aufzudecken, die das Wildtyp- bzw. Zellen die das mutierte 14-3-3zeta-like Protein exprimierten.

Die Wahl der Stressoren für die Induktion von zellulärem Stress

Verschiedene Stressoren wurden als Auslöser bei der Parkinson'schen Erkrankung diskutiert. Neben dem Modell der Proteinhäufung durch Hemmstoffe des Ubiquitin-Proteasomen Systems wie Lactacystin oder MG132 wurden auch Stressoren des oxidativen Stresses wie Wasserstoffperoxid oder NO-Donoren diskutiert. Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Stoffwechselfunktion der Zellen, sowie ihre Membranintegrität unter Einfluss verschiedener Stressoren gemessen wurden. Zur Induktion von zellulärem Stress wurden Wasserstoffperoxid, NO-Donoren wie SNAP, DNA alkylierende Substanzen wie MMS, Zellgifte wie MPP⁺, Proteasomenhemmer wie MG132, osmotische Stressoren wie Sorbitol, Dopamin, Disulfiram und weitere Substanzen eingesetzt.

Die Wahl der Zytotoxizitätstest: LDH und MTT

Da die Sensitivität des LDH Test geringer ist als die des MTT Tests und an einem anderen Stadium der Zellschädigung angreift, wurden beide Tests angewendet, um Wildtyp und mutiertes Protein exprimierenden Zellen mit verschiedenen Stressoren auf Unterschiede in der Bewältigung von zellulärem Stress zu testen. Eine vergleichende Studie von LDH- und MTT-Test von Dr. Peters am Institut für Pathologie der Johannes Gutenberg-Universität (unveröffentlicht) konnte ebenfalls eine unterschiedliche Sensitivität dieser Tests feststellen. Während der LDH-Test den Beginn einer einsetzenden Zytotoxizität anzeigt, können bereits im MTT-Test deutlich gesenkte und signifikante Unterschiede in der Proliferationsrate nachgewiesen werden. Dies lässt sich vor allem auch dadurch erklären, dass unter zellulärem Stress das Stadium der Proliferationshemmung vor dem Stadium der Zytotoxizität zu erwarten ist.

Die mutierten 14-3-3zeta-like Proteine benachteiligen die Zellen

Bereits der LDH-Zytotoxizitätstest konnte unter Einwirkung des proteasomalen Hemmers Lactacystin ein Unterschied in der Bewältigung von zellulärem Stress aufzeigen. So war der LDH-Gehalt im Medium bei Zellen, die das mutierte 14-3-3zeta-like Protein exprimierten, höher, als bei Zellen, die das jeweilige Wildtyp-Protein exprimierten. Diese Ergebnisse bestätigten sich im MTT-Test. Bei den Untersuchungen mit den Stressoren SNAP, Sorbitol, H₂O₂ und MPP⁺ traten die stärksten Proliferationsunterschiede unter Verwendung des Stressors Wasserstoffperoxid auf. Somit konnte bei den 14-3-3zeta-like Zellen mit der mutierten Form des Proteins also eine wesentlich schlechtere Bewältigung von oxidativem

Stress gezeigt werden. Die 14-3-3zeta-like^{10del} Zellen wiesen eine um 42 Prozentpunkte und die 14-3-3zeta-like^{Xmut} Zellen eine um 24 Prozentpunkte gesenkte Proliferationsrate auf im Vergleich zu Zellen mit dem jeweiligen Wildtyp-Protein. Dieses bestätigt den Verdacht, dass die Mutation eine krankheitsbegünstigende oder auslösende Wirkung besitzt.

Die Tragweite der erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress

Sowohl akuter als auch chronischer oxidativer Stress, der durch das Ungleichgewicht zwischen Bildung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies entsteht, begünstigt degenerative Erkrankungen und betrifft viele physiologische Funktionen, wie z.B. die Entstehung von Atherosklerose, Diabetes, inflammatorische Erkrankungen (Rheumatische Arthritis und Pankreatitis), Krebs, neurologische Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson), Bluthochdruck, Atemwegserkrankungen und Blutbilderkrankungen (Halliwell und Gutteridge, 1989, Maxwell, 1995, Opara, 2004). Oxidativer Stress richtet beim Gehirn deutlich größere Schäden als in anderen Organen an, da das Gehirn aufgrund vieler physiologischer Unterschiede anfälliger ist. Grund dafür sind ein erhöhter Sauerstoffbedarf, das Vorhandensein vieler ungesättigter Fettsäuren, niedermolekularen Eisens und Kupfer, eine verringerte Konzentration von Antioxidantien und eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und in bestimmten Gehirnarealen die Autotoxizität des Transmitters Dopamin (Olanow 1993, Halliwell 2001). Die Schäden durch reaktive Sauerstoffmetabolite addieren sich über die Zeit, da die Neurone im Gehirn nicht erneuert werden. Dies ist wohl das bedeutendste Argument im Vergleich der Zellschutzmechanismen einzelner Organe und zeigt besonders deutlich die Sonderstellung und die Anfälligkeit des Gehirns gegenüber oxidativem Stress. Dieses Argument verdeutlicht auch die Tragweite der Mutation des im Gehirn am stärksten exprimierten 14-3-3zeta-like Proteins.

4.2.3 Suche nach Interaktionspartnern von 14-3-3zeta-like

Die Vielzahl an Interaktionspartnern von 14-3-3 Proteinen und ihre Schlüsselrolle in vielen physiologischen Prozessen machen 14-3-3 Proteine zu einem interessanten Zielprotein bei der Ermittlung der Rolle von 14-3-3 Proteinen in pathophysiologischen Prozessen.

Aufgrund der Fülle an Interaktionspartnern wurden folgende Kriterien für die gezielte Suche nach 14-3-3zeta-like interagierenden Proteinen angewendet: Das Protein ist als Interaktionspartner von 14-3-3zeta bereits bekannt und passt zu den Fragestellungen dieser

Arbeit oder das Protein ich als wichtig für die Parkinson'sche Krankheit beschrieben oder das Protein spielt eine Rolle in einer anderen neurologischen Erkrankung mit ähnlicher Erkrankungsursache. Der erste Punkt konnte somit gleichzeitig die Frage beantworten ob das 14-3-3zeta-like Protein wirklich wie das 14-3-3zeta Protein funktioniert und gleiche Interaktionspartner besitzt. Dies ließ die hohen Homologie von 14-3-3zeta-like zur 14-3-3zeta Isoform, 98 % bei 14-3-3zeta-like10 und 96 %14-3-3zeta-likeX, vermuten, musste aber noch bestätigt werden.

Welche Fragestellungen wurden bearbeitet?

Es sollten also folgende Fragen bei der Suche nach Interaktionspartner beantwortet werden: Haben 14-3-3zeta und zeta-like gleiche Interaktionspartner? Wenn ja, interagieren auch die mutierten 14-3-3zeta-like Proteine mit diesem Interaktionspartner? Lassen sich über den Interaktionspartner Rückschlüsse auf die Funktionsweise und die Aufgabe von 14-3-3zeta ziehen? In wie weit lässt sich die Interaktion in das Bild der Parkinson'schen Erkrankung einordnen? Und die wohl schwerste Frage: Geben die Ergebnisse dieses Teils in Verbindung mit den Ergebnissen der Aggregation-, Chaperon- und Zell-Stress Teile dieser Arbeit ein eindeutiges Ergebnis bei der Frage nach der Rolle der 14-3-3zeta-like Proteine in der Pathogenese der Erkrankung?

Welche Interaktionspartner wurden gefunden und wie lassen sich die Ergebnisse interpretieren?

Die Suche nach Interaktionspartnern der 14-3-3zeta-like Proteine ergaben keine Interaktion mit den Proteinen α -Synuklein, Synphilin-1 und Periphilin. Viel wichtiger jedoch war, dass die Interaktion mit phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase und Raf-1 bestätigt werden konnte. Die Interaktion dieser beider Proteine mit 14-3-3zeta wurde bereits gezeigt und weißt somit darauf hin, dass sich die 14-3-3zeta-like Isoform mit der 14-3-3zeta Form vergleichen lässt. Gleichzeitig konnte die schwere funktionelle Beeinträchtigung des mutierten 14-3-3zeta-like Proteins nachgewiesen werden. Da beide gefundenen Interaktionspartner nicht mehr mit dem mutierten 14-3-3zeta-like10 Protein interagieren, muß, in Verbindung mit den funktionellen Untersuchungen, angenommen werden, dass die Mutation des 14-3-3zeta-like10 Proteins einen Funktionsverlust zur Folge hat.

Die Bedeutung der Interaktion von 14-3-3zeta-like mit Raf-1

14-3-3 Proteine sind in der Lage, die Enzymaktivitäten anderer Proteine zu beeinflussen und so in Stoffwechselwege einzugreifen. Dies ist zum Beispiel der Fall bei der Regulierung der Raf-1 Kinaseaktivität. Die Raf-1 Kinase ist eine Serin/Threonin Kinase, die beteiligt ist an der Signalweiterleitung bei Wachstums- und Differenzierungs-Stoffwechselweg von Zellen (Fantl *et al.* 1994, Morrison und Cutle 1997, Williams und Roberts 1994). Es wurde nachgewiesen, dass 14-3-3 die Umwandlung von inaktiver zu aktiver Raf stimuliert (Wang *et al.* 1998). Aktive Raf-1 phosphoryliert die MEK Kinase und führt so zur Stimulation der mitogen aktivierten Proteinkinase und zur Transkription von Genen der Zellteilung (Kiryu *et al.* 1995, Fu *et al.* 2000). Das 14-3-3 Protein erlangte in diesem Signalweg an Bedeutung, nachdem Mutationen in der amino-terminalen 14-3-3 Bindungsstelle des Raf-1 gefunden wurden, die zur Folge hatten, dass die Fähigkeit der MEK-Aktivierung von der Fähigkeit Zelldifferenzierung zu induzieren getrennt wurde (Dhillon *et al.* 2003).

Man nimmt dadurch an, dass im Gehirn die Aktivierung von Raf-1 ein wichtiger Schritt bei der Neurodegeneration bedeutet (Namikawa *et al.* 1998).

Die Apoptose als kontrollierter Zelltod besitzt eine Schlüsselfunktion in der Zelldifferenzierung und wird streng reguliert über das Gleichgewicht zwischen Agonisten, die den Zelltod fördern, und Antagonisten, die den Zelltod hemmen. Die Stoffwechselwege des Zelltods sind eng mit denen, die für das Überleben der Zellen verantwortlich sind, verknüpft um sicherzustellen, dass der Zelltod nur wenn es nötig ist auftritt (Raff *et al.* 1993). Die Apoptose ist jedoch ebenso die Hauptursache der pathophysiologischen Kaskade, die bei den meisten neurodegenerativen Erkrankungen abläuft.

Normalerweise schützt die Serin-259-Bindung von 14-3-3 an Raf-1 das Raf-1 Protein vor der Dephosphorylierung durch seinen negativen Regulator die Protein Kinase A. Raf-1 und Protein Kinase A bilden einen Signalkomplex in den Zellen. Wenn die Protein Kinase A aktiviert wird, phosphoryliert sie das Raf-1 Protein und verhindert die Rekrutierung von Raf-1 zur Plasmamembran und blockiert die Raf-1-Aktivierung. Das 14-3-3 Protein schützt somit Raf-1 vor der Protein Kinase A induzierten Inhibition der Kinase Aktivität von Raf-1 (Dumaz und Marais 2003). Im Fall des mutierten 14-3-3zeta-like10-Proteins ist ein solcher Schutz des Raf-1 Proteins nicht mehr möglich. In wieweit das eine Auswirkung auf apoptotische Prozesse in der Zelle hat, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden, auch wenn die Zell-Stress-Experimente eine geringere Belastbarkeit der Zellen mit dem mutierten 14-3-3 zeta-like Protein ergaben.

Die Bedeutung der Interaktion von 14-3-3zeta-like mit phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase

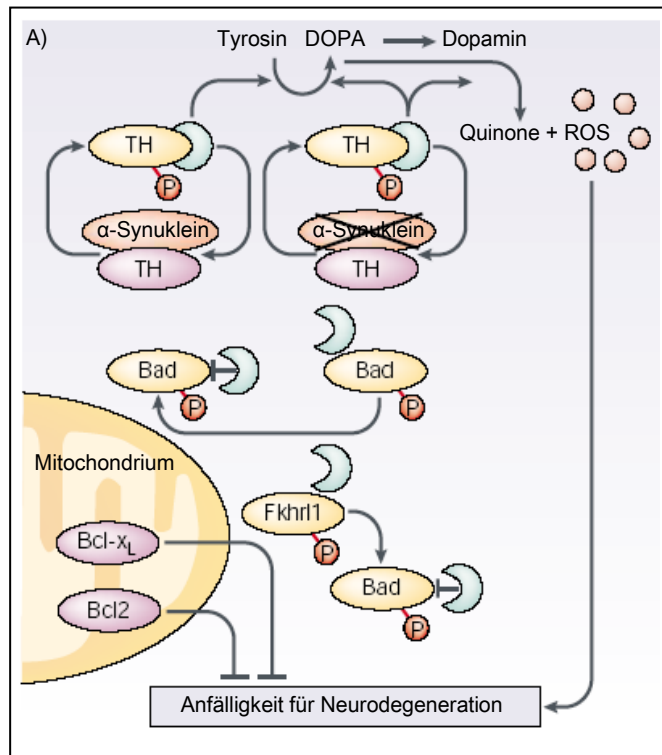
Wichtiger für die Fragestellung nach einer möglichen pathologischen Bedeutung der Mutation für die Parkinson'sche Erkrankung war die Entdeckung der Interaktion von 14-3-3zeta-like mit der Tyrosin-Hydroxylase.

Der neuronale Zelltod der dopaminergen Zellen geht einher mit der Reduktion des Hirndopamins und ist das Hauptmerkmal der Parkinson'schen Erkrankung. Das geschwindigkeitsbegrenzende Enzym der Dopaminsynthese ist die Tyrosin-Hydroxylase (Perez *et al.* 2002, Ichimura *et al.* 1988). Deshalb war die Entdeckung der Bindung von 14-3-3 Proteinen an dieses wichtige Enzym der Dopaminsynthese von großer Bedeutung (Yamauchi *et al.* 1981, Ichimura *et al.* 1987). Die Bindung von 14-3-3 Proteinen ist für die optimale Aktivierung durch Phosphorylierung des Enzyms notwendig (Ichimura *et al.* 1987, Kleppe *et al.* 2001). Es wurde sogar gezeigt, dass 14-3-3 Proteine durch eine Hemmung der Dephosphorylierung den stimulierten Zustand der Tyrosin-Hydroxylase verlängern (Toska *et al.* 2002). Dass die Rolle von 14-3-3 Proteinen in der Catecholamin-Biosynthese isotypenspezifisch ist, wurde von Kleppe *et al.* 2001 gezeigt. Die Studienlage lässt also annehmen, dass die unterschiedlichen Isoformen sehr spezifische und unterschiedliche Funktionen besitzen.

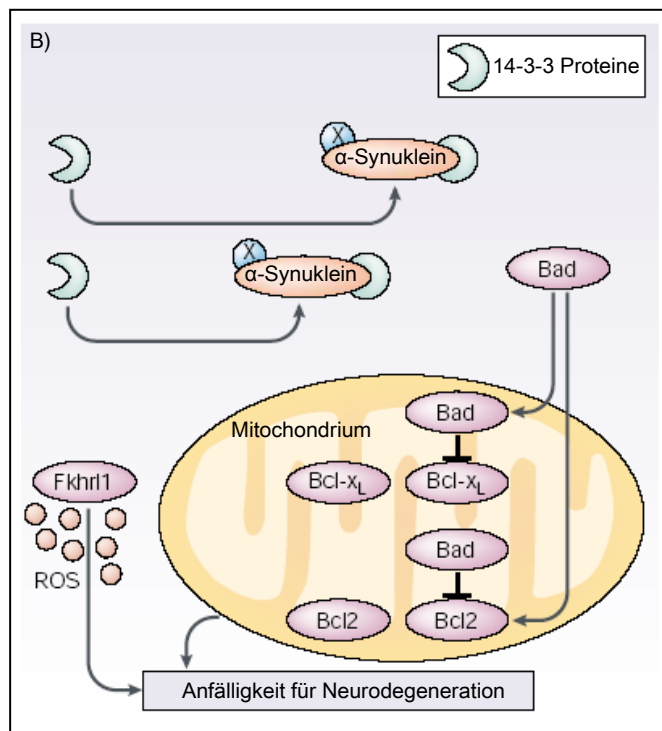
In der Arbeit von Perez *et al.* 2002 wurde 14-3-3 und α -Synuklein als Wechselspieler in der Dopaminsynthese beschrieben: Das α -Synuklein-Protein reduziert die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase durch die Bindung an dephosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase und mindert somit die Dopamin Biosynthese, während das 14-3-3 Protein die Dopaminsynthese durch die Bindung an phosphorylierte Tyrosin-Hydroxylase fördert. Ein Mangel an α -Synuklein würde folglich zu einem Überschuss an zytosolischem Dopamin in der Zelle und später zu einer vermehrten Bildung von Quinon und reaktiven Sauerstoffmetaboliten führen. Ein Mangel an frei verfügbarem oder funktionstüchtigem 14-3-3 Protein hingegen würde somit zu einer Verlangsamung der Dopaminsynthese und zu einer Verarmung an Dopamin führen. Eine grafische Darstellung dieser Zusammenhänge ist in Bild 4-4 und Bild 1-6 dargestellt.

In dieser Arbeit konnte die Interaktion von 14-3-3zeta-like^{10wt} Proteinen mit phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase bestätigt und gleichzeitig die schwere funktionelle Beeinträchtigung des mutierten 14-3-3zeta-like Proteins nachgewiesen werden. Der Verlust dieser Interaktion mit der phosphorylierten Tyrosin-Hydroxylase würde *in vivo* eine verringerte Dopaminsynthese bedeuten und somit zur Ausprägung der Parkinson-typischen Symptome führen.

Bild 4-4 Einfluss von 14-3-3 Proteinen auf die Dopamin-Biosynthese und die Neurodegeneration.



A Die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase wird reguliert über die Bindung an 14-3-3 Proteine und α -Synuklein, um ein optimales Dopamin Level zu erreichen. Dabei bindet 14-3-3 an phosphorylierte Tyrosin Hydroxylase und führt zur Aktivierung des Enzyms, wohingegen α -Synuklein mit der unphosphorylierten Tyrosin-Hydroxylase interagiert und somit eine hemmende Wirkung auf die Dopaminsynthese besitzt. Weniger α -Synuklein würde also zu einer gesteigerten Aktivität der Tyrosin Hydroxylase und zu einer verstärkten Dopaminsynthese führen, dadurch aber auch wegen der Autotoxizität des Transmitters die Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten fördern. Umgekehrt würde wenig oder funktionsuntüchtiges 14-3-3 Protein die Dopaminsynthese mindern und zu einer Verarmung an Dopamin führen. Dadurch könnten Symptome, wie sie bei der Parkinson'schen Erkrankung auftreten, erklärt werden. Unter normalen Bedingungen sind 14-3-3 Proteine in einer ausreichenden Konzentration vorhanden und können zudem über die Bindung an phosphoryliertes BAD-Protein und phosphoryliertes Fkhr1 eine Apoptose verhindern. Es würde also keine Anfälligkeit für eine Neurodegeneration bestehen. **B** Ein hoher Dopamingehalt könnte durch einen



Rückkopplungseffekt dazu führen, dass freies 14-3-3 Protein zunehmend in gebundener Form vorliegt, z.B. durch die Bildung von 14-3-3 Protein/ α -Synuklein Komplexen zusammen mit einer bisher unidentifizierten Komponente (X). Diese Reduktion an freiem 14-3-3 führt dazu, dass proapoptische Proteine nicht mehr gehemmt werden, erhöht die Empfindlichkeit für radikale Sauerstoffmetaboliten und begünstigt eine Neurodegeneration (Abbildung verändert nach Berg *et al.* 2003).

4.2.4 Zusammenfassung der Diskussion und Ausblick

Die 14-3-3zeta-like Wildtyp-Proteine

Mit dieser Arbeit konnten erstmals Mutationen in humanen 14-3-3 Proteinen beschrieben und charakterisiert werden. Bei der Analyse von 14-3-3 Genen wurden zwei neue 14-3-3 Gene identifiziert, die sich auf dem Chromosom 10 (Accession XM_005100) und dem X Chromosom (Accession XM_018019) befinden und eine hohe Homologie zur 14-3-3zeta-Isoform zeigen und mit 14-3-3zeta-like benannt wurden. Bei der Betrachtung der 14-3-3zeta homologen Gene konnte eine Chaperon-Funktion der 14-3-3zeta-like Wildtyp-Proteine nachgewiesen werden. Die Ähnlichkeit von 14-3-3zeta-like zu 14-3-3zeta wurde auch dadurch bestätigt, dass beide Proteine die gleichen Interaktionspartner Tyrosin-Hydroxylase und Raf-1 besitzen. Dies ließ die hohen Homologie von 14-3-3zeta-like zur 14-3-3zeta Isoform, 98 % bei 14-3-3zeta-like10 und 96 % 14-3-3zeta-likeX, zwar vermuten, wurde aber durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Zudem wurde 14-3-3zeta in Lewy-Körperchen von Parkinson-Patienten nachgewiesen. Die Lokalisation der 14-3-3zeta Proteine wurde in einer Situation, die der Parkinson'schen Erkrankung gleicht, analysiert. Durch die Verwendung eines proteasomalen Hemmstoffes wurde der Zustand erhöhter Proteinanhäufung simuliert, wie er bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, und der Parkinson'sche Erkrankung im Besonderen vorkommt. Daraufhin bildeten sich in fast allen Zellen 1-2 zellkernnahe runde Proteinansammlungen, die als Aggresomen identifiziert werden konnten und Lewy-Körperchen sehr ähnlich sind. Dieser Versuch bestätigt die Vermutung, dass 14-3-3 eine Rolle bei der Beseitigung von überschüssigem Protein spielt.

Die mutierten 14-3-3zeta-like Protein

Bei der Untersuchung von DNA-Proben von 303 Parkinson-Patienten mittels SSCP-Analysen konnte keine Mutation im 14-3-3zeta Gen aber in den neuen 14-3-3zeta homologen Genen gefunden werden (Carsten Holzmann, persönliche Mitteilung). Eine c.95A>G Mutation im 14-3-3zeta-likeXwt Gen, genannt 14-3-3zeta-likeXmut, bewirkt einen Aminosäureaustausch p.Gln32Arg. Im 14-3-3zeta-like10wt Gen wurde eine Deletion einer Base, c.98delG (p.Gly33fs), gefunden, bei der es zu einer Verschiebung des Leserahmens und im weiteren Verlauf der Sequenz zur Entstehung eines Stopcodon führt (E33fsX89).

Die Auswirkungen der 14-3-3zeta-like10del Mutation

Der Funktionsverlust des 14-3-3zeta-like10del-Proteins lässt wenig Zweifel an der pathologischen Wirkung des Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass die 14-3-3zeta-like Wildtyp-Proteine eine Chaperon-Funktion besitzen und dass diese Chaperon-Funktion nicht mehr beim mutierten 14-3-3zeta-like10del-Protein vorhanden war. Dies ist als schwerwiegender Eingriff in eine lebenswichtige Zellfunktion zu deuten. Durch die fehlende Chaperon-Funktion können fehlgefaltete Proteine nicht rückgefaltet werden. Mehr fehlgefaltetes Protein fällt in der Zelle an und behindert den Zellstoffwechsel und erzeugt zellulären Stress. Hier schließt sich die nächste Problematik an. Die Zellen die das mutierte Protein exprimierten zeigten eine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber zellulärem Stress. Somit wären die Kriterien, die man als Ursache für die Parkinson'sche Erkrankung annimmt „zellulärer Stress“ und „erhöhte Proteinanhäufung“ erfüllt. Neben einer veränderten Proteinlokalisierung und einer wahrscheinlich gestörten Dimerbildung kommt noch die fehlende Proteininteraktion zu phosphorylierter Tyrosin-Hydroxylase und zu Raf-1 hinzu.

Somit weist der bisherige Stand der 14-3-3zeta-like-Forschung darauf hin, dass die Parkinson'sche Erkrankung bei Trägern der 14-3-3zeta-like10-Mutation durch ein Triplet an Faktoren hervorgerufen oder stark begünstigt wird: Eine fehlenden Chaperon-Funktion, die die Anhäufung von überschüssigem und fehlgefaltetem Protein in der Zelle zur Folge hat, eine Verringerung der Dopamin-Produktion durch die fehlende Interaktion mit der phosphorylierten Tyrosin-Hydroxylase und eine mangelnde Kompensation von oxidativem Stress, die zu schweren Schäden der, gegenüber oxidativem Stress besonders sensiblen, Neuronen führt, bilden pathologische Prozesse, die eine Parkinson'sche Erkrankung hervorrufen können. Die Summe der Ergebnisse verdichten die Hinweise, die die 14-3-3zeta-like10-Mutation als Auslöser der Parkinson'schen Erkrankung erkennen lassen. Die gezeigte, fehlende Protein-Protein Interaktion des 14-3-3zeta-like10del-Proteins ist höchstwahrscheinlich auf eine gestörte Dimerbildung des Proteins zurückzuführen. Dadurch ist auch die Protein-Stabilität beeinflusst (Robert Liddington, persönliche Mitteilung). Somit konnte die funktionelle Relevanz der Mutation eindeutig bewiesen werden und lässt sich gut mit dem autosomal dominanten Vererbungsmuster der Familienanamnese vereinbaren.

Die Auswirkungen der 14-3-3zeta-likeXmut Mutation

Die Interpretation dieser Ergebnisse gestaltet sich schwieriger, da weniger Ergebnisse vorliegen und so wichtige Stücke beim Zusammensetzen des Puzzles fehlen. Grund dafür ist die Tatsache, dass es schwerer war großer Proteinmengen der 14-3-3zeta-likeX-Proteine

herzustellen. Die Expression schien schwächer zu sein. Aufgrund der Ähnlichkeit von 94,7 % von 14-3-3zeta-like10 und 14-3-3zeta-likeX ist dieser Unterschied schwer zu verstehen. Dieser Nachteil war besonders groß bei den Interaktionsversuchen mit Tyrosin-Hydroxylase und Raf-1. Deshalb liegen für diese Interaktion keine Ergebnisse für die 14-3-3zeta-likeX-Proteine vor. Die Dopaminsynthese ist jedoch eine entscheidende Säule bei der pathologischen Interpretation.

Betrachten wir die Ergebnisse so sehen wird dennoch Unterschiede in der Bewältigung von zellulärem, vor allem von oxidativem, Stress. Die Unterschiede waren zwischen dem Wildtyp- und dem mutierten 14-3-3zeta-likeX Protein signifikant und da für die 14-3-3zeta-like Proteine eine Expression vorwiegend im Gehirn nachgewiesen wurde, dürften diese Unterschiede dort auch eine Bedeutung haben. Dennoch ist die Datenlage nicht so deutlich wie bei den 14-3-3zeta-like10 Proteinen, zumal das mutierte 14-3-3zeta-likeX Protein keine Beeinträchtigung der Chaperon-Funktion aufwies. Eine Aussage über pathologische Wirkung des Proteins fällt demnach schwer. Auch ist die Bedeutung der Tatsache, dass es sich um ein X-chromosomales Gen handelt ist für die Pathogenese unklar. Hier sind weitere Versuche und vor allem weitere Untersuchung der Familie notwendig.

Die Qual der Wahl bei der Entscheidung welche Methoden eingesetzt werden sollten

Vor Beginn der Arbeit wurde lang über die Wahl der Methoden nachgedacht und die Verwendung eines Mausmodells ausgeschlossen. Mausmodelle mit anschließender *Micro-Array-Chip*-Analyse liefern auf schnellem Wege sehr umfangreiche Information über genregulative Prozesse. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass bei einem so vielseitigen Protein, wie es das 14-3-3 Protein ist, eher eine Datenflut zu verzeichnen wäre, bei der es kaum möglich wäre, die für unsere Fragestellung nach der Rolle für die Parkinson'sche Erkrankung erforderlichen Informationen zu selektieren. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt ganz auf funktionelle Untersuchungen und Zellkultur-Experimente gelegt. Diese haben erste und eindeutige Ergebnisse geliefert. Jedoch können funktionelle Untersuchungen und jede noch so gute molekulargenetische Studie die Arbeit am Patienten nicht ersetzen. Schon während der Entstehung dieser Arbeit waren vermehrt Studien mit den Familien der Patienten geplant. Da sich die Zusammenarbeit mit den Familien jedoch als schwer erwies, stehen diese noch aus. Hier muss die Tragweite der Mutationen und deren Verbreitung noch weiter untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Entdeckung des α -Synuklein Gens als Genort für eine autosomal dominante Form der Parkinson'schen Erkrankung wurde der erste wirkliche Beweis für eine familiäre Form der Parkinson'sche Erkrankung erbracht (Polymeropoulos *et al.* 1996 und 1997) und ein Grundstein für die Suche nach weiteren Kandidatengenen für die Parkinson'sche Erkrankung gelegt. 14-3-3 Proteine spielen eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen (Berg *et al.* 2003). Die Beteiligung an der Parkinson'schen Erkrankung wurde aufgrund der physikalischen und funktionellen Ähnlichkeit zu α -Synuklein (Ostrerova *et al.* 1999) und der gemeinsamen Rolle bei der Regulation der Dopaminsynthese vermutet (Perez *et al.* 2002). Bei der Untersuchung von zwei neuen 14-3-3 Genen auf Chromosom 10 und Chromosom X mit hoher Homologie zu 14-3-3zeta Isoform wurden zwei Mutationen gefunden. Ein c.95A<G (p.Gln32Arg) Austausch (14-3-3zeta-likeXmut) bei einem sporadischen Parkinson-Patienten und eine Deletion eines Basenpaares (c.98delG, p.Gly33fs) bei einem familiären Parkinson-Patienten mit autosomal dominantem Vererbungsmuster (14-3-3zeta-like10del). Die Mutation im 14-3-3zeta-likeX Protein führte zu einer signifikant erhöhten Anfälligkeit der Zellen gegenüber zellulärem, insbesondere oxidativem, Stress. Da die 14-3-3zeta-like Proteine vorwiegend im Gehirn exprimiert werden und dies das Organ ist welches am sensibelsten auf oxidativen Stress reagiert, dürften diese Stress-Anfälligkeit von Bedeutung sein. Wesentlich eindrücklichere Ergebnisse lieferte jedoch die Analyse der 14-3-3zeta-like10 Proteine. Der Funktionsverlust des 14-3-3zeta-like10del-Proteins lässt wenig Zweifel an der pathologischen Wirkung des Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass die 14-3-3zeta-like Wildtyp-Proteine eine Chaperon-Funktion besitzen und dass diese Chaperon-Funktion nicht mehr beim mutierten 14-3-3zeta-like10del-Protein vorhanden war. Die Zellen die das mutierte Protein exprimierten zeigten eine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber zellulärem Stress. Somit weist der bisherige Stand der 14-3-3zeta-like-Forschung darauf hin, dass die Parkinson'sche Erkrankung bei Trägern der 14-3-3zeta-like10-Mutation durch ein Triplet an Faktoren hervorgerufen wird: Eine fehlenden Chaperon-Funktion, die die Anhäufung von überschüssigem und fehlgefaltetem Protein in der Zelle zur Folge hat, eine Verringerung der Dopamin-Produktion durch die fehlende Interaktion mit der phosphorylierten Tyrosin-Hydroxylase und eine mangelnde Kompensation von oxidativem Stress, die zu schweren Schäden der, gegenüber oxidativem Stress besonders sensiblen, Neuronen führt, bilden pathologische Prozesse, die eine Parkinson'sche Erkrankung hervorrufen können. Somit konnte die funktionelle Relevanz der Mutation eindeutig bewiesen werden und lässt sich gut mit dem autosomal dominanten Vererbungsmuster der Familienanamnese vereinbaren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ashok, B. T., Ali, R. (1999). The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp. Gerontol.* 34, 293-303

Auluck, P., Chan, H. Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Bonini, N. M. (2002). Chaperone suppression of alpha-Synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* 295, 865– 868

Bast, A., Goris, R. J. (1989). Oxidative stress. *Biochemistry and human disease. Pharm. Weekbl. Sci.* 11, 199-206

Behl, C. (1999). Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int J Vitam Nutr Res.* 69, 213-219

Bence, N. F., Sampat, R. M., Kopito, R. R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* 292, 1552-1555

Berg, D., Holzmann, C., Riess, O. (2003). 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 4, 752-762

Berg, D., Riess, O., Bornemann, A. (2003). Specification of 14-3-3 proteins in Lewy bodies. *Ann. Neurol.* 53, 135

Bonifati, V., Breedveld, G.J., Squitieri, F., Vanacore, N., Brustenghi, P., Harhangi, B.S., Montagna, P., Cannella, M., Fabbrini, G., Rizzu, P., Van Duijn, C.M., Oostra, B.A., Meco, G., Heutink, P. (2002). Localization of autosomal recessive early-onset parkinsonism to chromosome 1p36 (PARK7) in an independent dataset. *Ann. Neurol.* 51, 253–256

Bonini, N. M. (2002). Chaperoning brain degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA (Suppl)* 99, 16407-16411

Brooks, D.J. (1998). The early diagnosis of Parkinson's disease. *Ann Neurol (Suppl)* 44, 10-18

-
- Buchner, J. (2002). Introduction: the cellular protein folding machinery. *Cell Mol Life Sci* 59, 1587-1588
- Büeler, H. (1999). Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem* 380, 613– 622
- Burkhardt, S., Reiter, R. J., Tan, D. X., Hardeland, R., Cabrera, J., Karbownik, M. (2001). DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, reseratrol and uric acid. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33, 775-783
- Chan, P., DeLanney, L. E., Irwin, I., Langston, J. W., Di Monte, D. (1991). Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.* 57, 348-351
- Chen, H. K., Funez, P. F., Acevedo, S. F., Lam, Y. C., Kaytor, M. D., Fernandez, M. H., Aitken, A., Skoulakis, E. M. C., Orr, H. T., Botas, J. Zoghbi, H. Y. (2003). Interaction of Akt-Phosphorylated Ataxin-1 with 14-3-3 Mediates Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Cell, 113(4), 457-468
- Chung, K. K., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (2001). The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 24, 7-14
- Colcher, A., Simuni, T. (1999). Clinical manifestations of Parkinson's disease. *Med Clin North Am.* 83, 327-347
- Conklin, D. S., Galaktionov, K., Beach, D. (1995). 14-3-3 proteins associate with Cdc25 phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7892-7896
- Cookson M.R., Lockhart P.J., McLendon C., O'Farrell C., Schlossmacher M., Farrer M.J. (2003). RING finger 1 mutation in Parkin produce alteres localisation of the protein. *Hum Mol Genet.*, 12(22), 2957-2965
-

Coyle, J. T., Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689-695

Craparo, A., Freund, R., Gustafson, T. A. (1997). 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phospho-serine-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 272, 11663-11669

Cummings, C. J., Sun, Y., Opal, P., Antalffy, B., Mestrl, R., Orr, H. T., Dillmann, W. H., Zoghbi, H. Y. (2001). Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet* 10, 1511–1518

Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31

Davis, L. E, Adair, J. C. (1999). Parkinsonism from methanol poisoning: benefit from treatment with anti-Parkinson drugs. *Mov Disord.* 14, 520-522

De Haan, J. B., Crack, P. J, Flentjar, N., Iannello, R. C., Hertzog, P. J., Kola, I. (2003). An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. *Redox Rep* 8, 69-79

Dekker, M. C., Bonifati, V., van Duijn, C. M.(2003). Parkinson's disease: piecing together a genetic jigsaw. *Brain.* 126, 1722-1733

Dougherty, M. K., Morrison, D. K. (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci.* 117, 1875-1884

Dumaz, N., Marais, R. (2003). Protein Kinase A Blocks Raf-1 Activity by Stimulating 14-3-3 Binding and Blocking Raf-1 Interaction with Ras. *J Biol Chem.* 278, 29819–29823

Duvoisin, R. C., Eldridge, R., Williams, A., Nutt, J., Calne, D. (1981). Twin study of Parkinson disease. *Neurology*31, 77-80

Dhillon, A. S., Meikle, S., Peyssonnaud, C., Grindlay, J., Kaiser, C., Stehen, H., Shaw, P. E., Mischak, H., Eychene, A., Kolch, W. (2003). A Raf-1 mutant that dissociates MEK/extracellular signal-regulated kinase activation from malignant transformation and differentiation but not proliferation. *Mol. Cell Biol.* 23, 1983-1993

Ensenauer, R. E., Michels, V. V., Reinke, S. S. (2005). Genetic testing: practical, ethical, and counseling considerations. *Mayo Clin Proc.* 80, 63-73

Fantl, W. J., Muslin, A. J., Kikuchi, A., Martin, J. A., MacNicol, A. M., Gross, R. W., Williams, L. T. (1994). Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 371, 612-614

Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Hernandez, D., Forno, L., Gwinn-Hardy, K., Petrucelli, L., Hussey, J., Singleton, A., Tanner, C., Hardy, J., Langston, J.W. (2001). Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann. Neurol.* 50, 293–300

Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D. S., Hulihan, M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, Z., Dickson, D., Langston, J. W. (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-Synuclein genomic multiplications. *Ann. Neurol.* 55, 174–179

Farrer, M. J., Haugarvoll, K., Ross, O. A., Stone, J. T, Milkovic, N. M, Cobb, S. A., Whittle, A. J., Lincoln, S. J., Hulihan, M. M., Heckman, M. G, White, L. R., Aasly, J. O., Gibson, J. M., Gosal, D. , Lynch, T., Wszolek, Z. K., Uitti, R. J., Toft, M.. (2006). Genomewide association, Parkinson disease, and PARK10 *Am J Hum Genet.* 78, 1084-1088

Feany, M. B., Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394–398

Fearnley, J. M., Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114, 2283-2301

Forsberg, L., de Faire, U., Morgenstern, R. (2001). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 84-93

Fu, H., Subramanian, R. R., Masters, S C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 617-647

Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann. Neurol.* 51, 296-301

Furlanetto, R. W., Dey, B. R., Lopaczynski, W., Nissley, S. P. (1997). 14-3-3 proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not with the insulin receptor. *Biochem. J.* 327, 765-771

Gandhi, S., Wood, N. W. (2005). Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 14, 2749-2755

Gasser, T. (2001). Genetics of Parkinson's disease. *J Neurol.* 248, 833-840

Giasson, B. I., Lee, V. M. (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 114, 1-8

Gibb, W. R., Lees, A. J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 51, 745-752

Gibb, W. R., Lees, A. J. (1989). The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Neuropathol-Appl-Neurobiol.* 15, 27-44

Gibb, W. R. (1992). Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. *Neurol Clin.* 10, 361-376

Gille, G., Hung, S. T., Reichmann, H., Rausch, W. D. (2004). Oxidative stress to dopaminergic neurons as models of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1018, 533-540

Gillespie, N. D., Hallhead, G., Mutch, B., James, P. B., McMurdo, M. E. (1999) Severe parkinsonism secondary to carbon monoxide poisoning. *J R Soc Med.* 92, 529-530

Guha, S., Manna, T.K., Das, K. P., Bhattacharyya, B. (1998). Chaperone-like activity of tubulin. *J Biol Chem.* 273, 30077-30080

Haavik J, Toska K. (1998). Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 16, 285-309

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Second edition Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 307 (1), 108-112

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implication for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685-716

Hampshire, D. J., Roberts, E., Crow, Y., Bond, J., Mubaidin, A., Wriekat, A. L., Al-Din, A., Woods, C. G. (2001). Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36 *J Med Genet.* 38, 680-682

Harhangi, B. S., Farrer, M. J., Lincoln, S., Bonifati, V., Meco, G., De Michele, G., Brice, A., Durr, A., Martinez, M., Gasser, T., Bereznoi, B., Vaughan, J. R., Wood, N. W., Hardy, J., Oostra, B. A., Breteler, M. M. (1999). The Ile93Met mutation in the ubiquitin carboxy-terminal-hydrolase-L1 gene is not observed in European cases with familial Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 270, 1-4

Hasegawa, E., Kang, D., Sakamoto, K., Mitsumoto, A., Nagano, T., Minatami, S., Takeshige, K. (1997). A dual effect of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺)-analogs in the respiratory chain of bovin heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 69-74

Henningsen, H. (1983). Morbus Parkinson im Wandel medizinischer Krankheitsvorstellungen. In: H. Gänshirt. *Pathophysiologie, Klinik und Therapie des Parkinsonismus*. Roche, Basel, 93-101

Hicks, A. A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H. S., Sainz, J., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K., Sveinbjornsdottir, S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 52, 549-55

Hofer, A., Gasser, T. (2004). New aspects of genetic contributions to Parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 24, 417-424

Huynh, D. P., Scoles, D. R., Nguyen, D., Pulst, S. M. (2003). The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI *Hum Mol Genet.* 12, 2587-2597

Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamauchi, T., Fujisawa, H. (1987). Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺-, calmodulin-dependent-protein kinase II. *FEBS Lett.* 219, 79-82

Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., Takahashi, Y. (1988). Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 7084-7088

Imai, Y., Soda, M., Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 35661-35664

Irie, K., Gotoh, Y., Yashar, B. M., Errede, B., Nishida, E., Matsumoto, K. (1994). Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase. *Science* 265, 1716-1719

Itagaki, C., Isobe, T., Taoka, M., Natsume, T., Nomura, N., Horigome, T., Omata, S., Ichinose, H., Nagatsu, T., Greene, L. A., Ichimura, T. (1999). Stimulus-coupled interaction of tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins. *Biochemistry.* 38, 15673-15680

Jellinger, K. A. (2003). General aspects of neurodegeneration. *J. Neural Transm., (Suppl)* 65, 101-144

Johnston, J. A., Ward, C. L., Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 143, 1883-1898

Jordan, J., Cena, V., Prehn, J. H. (2003). Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J. Physiol. Biochem.* 59, 129-141

Jost, W. (2005). Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms.
UNI-MED Science, 3 , Auflage 2005, ISBN 3-89599-861-3

Kahle, P. J., Haass, C. (2004). How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease?
EMBO Rep. 5, 681-685

Kaneko, K., Hachiya, N. S. (2006). The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions. *Med Hypotheses.* 67, 169-171

Kawamoto, Y., Akiguchi, I., Nakamura, S., Honjyo, Y., Shibasaki, H., Budka, H. (2002). 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 61, 245–253

Kayanoki, Y., Fujii, J., Islam, K. N., Suzuki, K., Kawata, S., Matsuzawa, Y., Taniguchi, N. (1996) The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. *J Biochem* 119, 817-822

Kaytor, M. D., Warren, S. T. (1999). Aberrant protein deposition and neurological disease. *J. Biol. Chem.* 274, 37507–37510

Kiryu, S., Morita, N., Ohno, K., Maeno, H., Kiyama, H. (1995). Regulation of mRNA expression involved in Ras and PKA signal pathways during rat hypoglossal nerve regeneration. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 29, 147-156

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

-
- Kleppe, R., Toska, K., Haavik, J. (2001). Interaction of phosphorylated tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins: evidence for a phosphoserine 40-dependent association. *J. Neurochem.* 77, 1097–1107
- Kockel, L., Vorbruggen, G., Jackle, H., Mlodzik, M., and Bohmann, D. (1997). Requirement for *Drosophila* 14-3-3 zeta in Raf-dependent photoreceptor development. *Genes Dev* 11, 1140-1147
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Eppelen, J. T., Schols, L., Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106–108
- Krüger, R., Müller, T., Riess, O. (2000). Involvement of alpha-synuclein in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *J Neural Transm.* 107, 31-40
- Kuopio, A. M., Marttila, R. J., Helenius, H., Rinne, U. K. (1999). Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 14, 928-939
- Kurihara, L. J., Kikuchi, T., Wada, K., Tilghman, S. M. (2001). Loss of Uch-L1 and Uch-L3 leads to neurodegeneration, posterior paralysis and dysphagia. *Hum Mol Genet.* 10, 1963-1970
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D., Polymeropoulos, M. H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 395, 451-452
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. A., Liu, Z., Lansbury, P. T. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-Synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111, 209–218
- Li, Y., Schiodi, S., Rowland, C., Tacey, K., Catanese, J., Grupe, A. (2006). Genetic evidence for ubiquitin-specific proteases USP24 and USP40 as candidate genes for late-onset Parkinson disease. *Hum Mutat.* 27, 1017-1023
-

Lotharius, J., Brundin, P. (2002). Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-Synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 932–942

Lozano, A. M., Kalia, S. K. (2006). *Spektrum der Wissenschaft*. Ausgabe August 2006

Lucking, C. B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B. S., Meco, G., Deneffe, P., Wood, N. W., Agid, Y., Brice, A. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N. Engl. J. Med.* 342, 1560–1567

Lyon, E., Miller, C. (2003). Current challenges in cystic fibrosis screening. *Arch Pathol Lab Med.* 127, 1133-1139

Arch Pathol Lab Med. 2004 Mar;128(3):366; author reply 366

Martinez, M., Brice, A., Vaughan, J. R., Zimprich, A., Breteler, M. M., Meco, G., Filla, A., Farrer, M. J., Betard, C., Hardy, J., De Michele, G., Bonifati, V., Oostra, B., Gasser, T., Wood, N. W., Durr, A. (2004). French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. Genome-wide scan linkage analysis for Parkinson's disease: the European genetic study of Parkinson's disease. *J Med Genet.* 41, 900-907

Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., Mucke, L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-Synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287, 1265–1269

Mata, I. F., Lockhart, P. J., Farrer, M. J. (2004). Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 13 Spec No 1, 127-133

Maxwell, S. R. J. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49, 345-361

McCall, S., Henry, J. M., Reid, A. H., Taubenberger, J. K. (2001). Influenza RNA not detected in archival brain tissues from acute encephalitis lethargica cases or in postencephalitic Parkinson cases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60, 696-704

McGeer, P. L., McGeer, E. G., Suzuki, J. S. (1977). Aging and Extrapyrarnidal function. *Arch. Neurol.* 34, 33-35

McGeer, P. L., Itagaki, S., Akiyama, H., McGeer, E. G. (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological processes. *Ann. Neurol.* 24, 574-576

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

Melchior, F. (2000).SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 591-626

Miller, J., Stagljar, I. (2004). Using the yeast two-hybrid system to identify interacting proteins. *Methods Mol Biol.* 261, 247-262

Mizuno, Y., Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T., Tanaka, K. (2001). Parkin and Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 477-482

Morrison, D. K., Cutler, R. E. (1997). The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 174-179

Muslin, A. J., Xing, H. (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal.* 12, 703-709

Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S. (2001).SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 202-210

Münter, M. D., Forno, L. S., Hornykiewicz, O., Kish, S. J., Maraganore, D. M., Caselli, R. J., Okazaki, H., Howard, F. M. Jr., Snow, B. J., Calne, D. B. (1998). Hereditary form of parkinsonism-dementia. *Ann. Neurol.* 43, 768-781

Nagatsu, T. (1990). Change of tyrosine hydroxylase in the parkinsonian brain and in the brain of MPTP-treated mice as revealed by homospecific activity. *Neurochem Res.* 15, 425-429

Najim Al-Din, A. S., Wriekat, A., Mubaidin, A., Dasouki, M., Hiari, M. (1994). Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol. Scand.* 89, 347-352

Nakamura, K., Jeong, S. Y., Uchihara, T., Anno, M., Nagashima, K., Nagashima, T., Ikeda, S., Tsuji, S., and Kanazawa, I. (2001). SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1441–1448

Namikawa, K., Su, Q., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H. (1998). Enhanced expression of 14-3-3 family members in injured motoneurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55, 315-320

Nicklas, W. J., Vyas, I., Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 38, 2503-2508

Nichols, W. C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Halter, C. A., Michaels, V. E., Reed, T., Rudolph, A., Shults, C. W., Singleton, A., Foroud, T., Parkinson Study Group-PROGENI investigators. (2005). Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet.* 365, 410-412

Nishikawa, K., Li, H., Kawamura, R., Osaka, H., Wang, Y.L., Hara, Y., Hirokawa, T., Manago, Y., Amano, T., Noda, M., Aoki, S., Wada, K. (2003). Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 176–183

Nuti, A., Ceravolo, R., Dell'Agnello, G., Gambaccini, G., Bellini, G., Kiferle, L., Rossi, C., Logi, C., Bonuccelli, U. (2004). Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in the Tuscany region of Italy. *Parkinsonism Relat Disord.* 10(8), 481-485

Ogawa, N., Mori, A. (1995). Parkinson's disease, dopamin and free radicals. In: Cutler, R. G., Packer, L., Bertram, J., Mori, A., (Eds.), *Oxidative Stress and Aging*. Birkhauser Verlag, Basel, 303-308

Olanow, C. W. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 16, 439-444

Olanow, C. W., Tatton, W. G. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 123-144

Opara, E.C. (2004). Role of oxidative stress in the etiology of type2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J. Investig. Med.* 52, 19-23

Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., Wolozin, B. (1999). α -Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.* 19, 5782–5791

Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P. M., Foroud, T., Parkinson Study Group. (2003). Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet.* 72, 1053-1057

Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsy.* Sherwood, Neely, and Jones, London.

Paterna, J. C., Büeler, H. (2002). Recombinant adeno-associated virus vector design and gene expression in the mammalian brain. *Methods* 28, 208–218

Perez, R. G., Waymire J. C., Lin E., Liu J. J., Guo F., Zigmond M. J. (2002). A Role for α -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. *Journal of Neuroscience* 22, 3090–3099

Periquet, M., Lucking, C., Vaughan, J., Bonifati, V., Durr, A., De Michele, G., Horstink, M., Farrer, M., Illarioshkin, S. N., Pollak, P., Borg, M., Brefel-Courbon, C., Deneffe, P., Meco, G., Gasser, T., Breteler, M. M., Wood, N., Agid, Y., Brice, A. (2001). Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from founder effects. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 617–626

Piccini, P., Burn, D. J., Ceravolo, R., Maraganore, D., Brooks, D. J. (1999). The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann Neurol.* 45, 577-582

Polymeropoulos, M. H., Higgins, J. J., Golbe, L. I., Johnson, W. G., Ide, S. E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E. S., Pho, L. T., Schaffer, A. A., Lazzarini, A. M., Nussbaum, R. L., Duvoisin, R. C. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science.* 274, 1197-1199

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., Nussbaum, R.L. (1997). Mutation in the alpha-Synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047

Powell, D. W., Rane, M. J., Chen, Q., Singh, S., McLeish, K. R. (2002). Identification of 14-3-3 zeta as a protein kinase B/Akt substrate. *J. Biol. Chem.* 277, 21639-21642

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (1996). Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4565-4571

Quigley, P. M., Korotkov, K., Baneyx, F., Hol, W. G. (2003). The 1.6-Å crystal structure of the class of chaperones represented by *Escherichia coli* Hsp31 reveals a putative catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3137-3142

Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M. D. (1993). *Science* 262, 695-700

Ren, Y., Zhao, J., Feng, J. (2003). Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci.* 23, 3316-24

Reuther, G. W., Fu, H., Cripe, L. D., Collier, R. J., Pendergast, A. M. (1994). Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 266, 129-133

de Rijk, M. C., Tzourio, C., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J. M., Alperovitch, A., Rocca, W. A. (1997). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 62, 10-5

Rothdach, A. J., Trenkwalder, C., Haberstock, J., Keil, U., Berger, K. (2000). Prevalence and risk factors of RLS in an elderly population: the MEMO study. *Memory and Morbidity in Augsburg Elderly*. *Neurology* 54, 1064-1068

Saigoh, K., Wang, Y. L., Suh, J. G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., Wada, K. (1999). Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in *gad* mice. *Nat Genet*. 23, 10-11

Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M. K., Hartl, F. U. (2002). Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 10, 16412-16418

Sayre, L. M., Smith, M. A., Perry, G. (2001). Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr. Med. Chem.* 8, 721-738

Seewald, M. J., Korner, C., Wittinghofer, A., Vetter, I. R. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature*. 2002 415, 662-666

Sharma, M., Mueller, J. C., Zimprich, A., Lichtner, P., Hofer, A., Leitner, P., Maass, S., Berg, D., Durr, A., Bonifati, V., De Michele, G., Oostra, B., Brice, A., Wood, N. W., Muller-Myhsok, B., Gasser, T., European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (GSPD). (2006). The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations. *J Med Genet*. 43, 557-562

Shastry, B. S. (2001). Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci Res.* 41, 5-12

Sherman, M. Y., Goldberg, A. L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron.* 29, 15-32

Shi, Q., Tao, E. (2003). An Ile93Met substitution in the UCH-L1 gene is not a disease-causing mutation for idiopathic Parkinson's disease. *Chin Med J.* 116, 312-313

Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hatton, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S., Selkoe, D. J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-Synuclein by parkin from human brain: implication for Parkinson's disease. *Science,* 293, 263-269

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T. (2002). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25, 302–305

Shults, C. W. (2003). Treatments of Parkinson disease: circa 2003. *Arch Neurol.* 60, 1680-1684

Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Münter, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K. (2003). Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841

Smith, M. A., Harrism, P. L., Sayre, L. M., Perry, G. (1997). Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redoxgenerated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9866-9868

Sohal, R. S., Ku, H. H., Agarwar, S., Forster, M. J., Lal. H. (1994). Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* 74, 121-133

Sommer, B., Barbieri, S., Hofele, K., Wiederhold, K., Probst, A., Mistl, C., Danner, S., Kauffmann, S., Spooren, W., Tolnay, M., Bilbe, G., van der Putten, H., Kafmann, S., Caromi, P., Rugg, M. A. (2000). Mouse models of alpha-synucleinopathy and Lewy pathology. *Exp Gerontol.* 35, 1389-1403

Souza, J. M., Giasson, B. I., Lee, V. M., Ischiropoulos, H. (2000). Chaperone-like activity of Synucleins. *FEBS Lett.* 474, 116-119

Spellman, G. G. (1962). Report of familial cases of parkinsonism. *J. Am. Med. Assoc.* 179, 372-374

Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S. R., Maestroni, G. J., Esquifino, A. I., Hardeland, R., Cardinali, D. P. (2005). Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res.* 7, 293-318

Sveinbjornsdottir, S., Hicks, A. A., Jonsson, T., Petursson, H., Gugmundsson, G., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K. (2000). Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med.* 343, 1765-17670

Tabner, B. J., El-Agnaf, O. M., German, M. J., Fullwood, N. J., Allsop, D. (2005). Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 33, 1082-1086

Takahashi, Y. (2003). The 14-3-3 proteins: gene, gene expression, and function. *Neurochem Res.* 28, 1265-1273

Tanaka, M., Kim, Y. M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., Mouradian, M. M. (2004) Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem.* 279, 4625-4631

Taylor, J. P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C. M., Taye, A., Markovic-Plese, S., Fischbeck, K. H. (2003). Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet.* 12, 749-757

Toska, K., Kleppe, R., Armstrong, C. G., Morrice, N. A., Cohen, P., Haavik J. (2002). Regulation of tyrosine hydroxylase by stress activated protein kinases. *J. Neurochem.* 83, 775–783

Tritschler, H. J., Packer, L., Medori, R. (1994). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Biochem Mol Biol Int.* 34, 169-181

Ubl, A., Berg, D., Holzmann, C., Krüger, R., Berger, K., Arzberger, T., Bornemann, A., Riess O. (2002). 14-3-3 protein is a component of Lewy bodies in Parkinson's disease—mutation analysis and association studies of 14-3-3 η . *Brain Res. Mol. Brain Res.* 108, 33–39

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., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzales-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N. W. (2004). Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1 *Science* 304, 1158-1160

van Hemert, M. J., Steensma, H. Y., van Heusden, G. P. (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays.* 23, 936-946

Vetter, G., Hily, J. M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T., Gilmer, D.(2004). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol.* 85, 2459-2469

Vincenz, C., Dixit, V. M. (1996). 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J. Biol. Chem.* 271, 20029-20034

von Bohlen und Halbach, O., Schober, A., Krieglstein, K. (2004). Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 73, 151-177

Wang, H., Zhang, L., Liddington, R., Fu, H. (1998). Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3zeta disrupt its interaction with Raf-1 kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 16297-16304

Wanker, E. E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., Lehrach, H. (1997). HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet.* 6, 487-495

Warner, H. R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 17, 249-258

Waters, C. H., Miller, C. A. (1994). Autosomal dominant Lewy body parkinsonism in a four-generation family. *Ann. Neurol.* 35, 59-64

West, A. B., Zimprich, A., Lockhart, P. J., Farrer, M., Singleton, A., Holtom, B., Lincoln, S., Hofer, A., Hill, L., Muller-Myhsok, B., Wszolek, Z. K., Hardy, J., Gasser, T. (2001). Refinement of the PARK3 locus on chromosome 2p13 and the analysis of 14 candidate genes. *Eur J Hum Genet.* 9, 659-666

Wilkinson, K. D., Lee, K. M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J. M., Pohl, J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9 5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 246, 670-673

Wilkinson, K. D., Deshpande, S., Larsen, C. N. (1992). Comparisons of neuronal (PGP 9 5) and non-neuronal ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 631-637

Williams, N. G., Roberts, T. M. (1994). Signal transduction pathways involving the Raf proto-oncogene. *Cancer Metastasis Rev.* 13, 105-116

Wilson, M. A., Collins, J. L., Hod, Y., Ringe, D., Petsko, G. A. (2003). The 1.1-Å resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9256-9261

Wintermeyer, P., Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Berg, D., Becker, G., Leroy, E., Polymeropoulos, M., Berger, K., Przuntek, H., Schols, L., Epplen, J. T., Riess, O. (2000). Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *NeuroReport* 11, 2079–2082

Wszolek, Z. K., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, E. K., Münter, M. D., Pfeiffer, R. F., Rodnitzky, R. L., Uitti, R. J., McComb, R. D., Gasser, T., Dickson, D. W. (2002). Neuropathology of two members of a German-American kindred (Family C) with late onset parkinsonism. *Acta Neuropathol* 103, 344-350

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C. (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971

Yaffe, M. B., Elia, A. E. (2001). Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 131-138

Yaffe, M. B. (2002). How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 513, 53-57

Yamauchi, T., Nakata, H., Fujisawa, H. (1981). A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺-, calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 256, 5404–5409

Yu, S., Ueda, K., Chan, P. (2005). Alpha-synuclein and dopamine metabolism. *Mol Neurobiol.* 31, 243-254

Zarate-Lagunes, M., Gu, W. J., Blanchard, V., Francois, C., Muriel, M. P., Mouatt-Prigent, A., Bonici, B., Parent, A., Hartmann, A., Yelnik, J., Boehme, G. A., Pradier, L., Moussaoui, S., Faucheux, B., Raisman-Vozari, R., Agid, Y., Brice, A., Hirsch, E. C. (2001). Parkin immunoreactivity in the brain of human and non-human primates: an immunohistochemical analysis in normal conditions and in Parkinsonian syndromes. *J. Comp. Neurol.* 432, 184–196

Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Tortosa, E. G., Del Ser, T., Munoz, D. G., De Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-Synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173

Zhang, L., Wang, H., Liu, D., Liddington, R., and Fu, H. (1997). Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3zeta through a common site involving lysine 49. *J. Biol. Chem.* 272, 13717–13724

Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L., Dawson, T.M. (2000). 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.* 97, 13354–13359

Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., Strom, T. M., Wszolek, Z. K., Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 44, 601-607

Zoghbi, H.Y., Orr, H.T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 217–247

7 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Simone Mosbacher
geboren am 07. August 1977 in Tübingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1985 – 1989 Kirschenfeld-Grundschule Nehren
1989 – 1997 Quenstedt-Gymnasium Mössingen, Abitur

Studium

10/1997 Grundstudium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
10/1999 – 02/2002 Hauptstudium der Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Hauptfach : Humangenetik
Nebenfächer: Parasitologie und Pharmakologie
02/2002 Erlangen des Diploms, Thema der Diplomarbeit: Nachweis differentiell exprimierter Gene in Abwehrzellen *Schistosoma mansoni* -resistenter und -susceptibler Zwischenwirtsschnecken *Biomphalaria glabrata*

Praktische Erfahrungen

06/1998 – 12/1998 Wissenschaftliche Hilfskraft, Lehrstuhl Tierphysiologie der Eberhard Karls Universität-Tübingen
10/1998 – 03/1999 Labormitarbeit in der Bundes-Forschungs-Anstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen AG Prof. Dr. Pfaff
08/1999 – 10/1999 Auslandsaufenthalt in Honduras, Freilandforschung
05/1999 – 12/2001 Wissenschaftliche Arbeiten in der molekularen Parasitologie des Universitätsklinikums Tübingen AG Dr. Ulrike Zelck: Leitung von Labor-Praktika, Betreuung von Praktikanten. Anfertigung der Diplomarbeit
09/2001 – 05/2002 Wissenschaftliche Arbeiten in der AG Prof. Dr. Nüsslein-Volhard / Dr. R. Geißler des Max-Planck Instituts Tübingen
06/2002 – 05/2005 Promotion in der Abteilung Medizinische Genetik von Prof. Dr. Olaf Rieß des Instituts für Humangenetik. Tätigkeiten im Bereich der Lehre und Betreuung von gentechnischen Arbeiten.
Thema der Promotion: Charakterisierung *14-3-3zeta* homologer Gene und deren Bedeutung für die Parkinson'sche Erkrankung
06/2005 – 10/2005 Klinikaußendienst für die Firma Baxter. Aufgaben: Bewerbung eines hochpreisigen Produktes, Preisverhandlungen, Organisation von Fortbildungsveranstaltungen und Tagungen
10/2005 – heute Zusatzstudium Mathematik auf Lehramt an der Eberhard Karls Universität