

**Funktion von Synphilin-1 bei der Pathogenese
des Morbus Parkinson**

**Charakterisierung im Mausmodell
und
Auffinden neuer Interaktionspartner
mittels Yeast 2-Hybrid Technologie**

**der Fakultät für Biologie der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

von

Thomas Franck
aus Freiburg i. Brsg.

vorgelegte

Dissertation

2007

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Oktober 2007

Dekan: Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schwarz

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2001 bis April 2006 im Instiut für Medizinische Genetik des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. O. Rieß durchgeführt.

*to those, who left & can't come back
to those, who stayed & supervened*

to my family

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Danksagung	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
1. EINLEITUNG	1
1.1. Allgemeines zur Parkinson'schen Krankheit	1
1.1.1. Klinik	1
1.1.2. Neuropathologie	2
1.2. Umwelteinflüsse	4
1.3. Oxidativer Stress	6
1.4. Genetische Faktoren	7
1.4.1. PARK1 und PARK4 – α -Synuklein	8
1.4.2. PARK2 – Parkin	10
1.4.3. PARK5 – UCH-L1	12
1.4.4. PARK6 – PINK1	13
1.4.5. PARK7 – DJ-1	14
1.4.6. PARK8 – LRRK-2	15
1.4.7. PARK9 – ATP13A2 (lysosomale Typ 5 P-Typ ATPase)	15
1.4.8. PARK13 – HtrA2/Omi	16
1.5. Suszeptibilitätsgene	17
1.5.1. Neurofilament	17
1.5.2. Nurr-1	18
1.5.3. Synphilin-1	18
1.6. Tiermodelle	20
1.6.1. Allgemeine Tiermodelle in der Parkinson-Forschung	20
1.6.2. Transgene Tiermodelle	21
1.6.2.1. Mausmodelle für α -Synuklein	21
1.6.2.2. Mausmodelle für Parkin	23
1.6.2.3. Mausmodelle ohne DJ-1	23
1.6.2.4. Weitere Mausmodelle	24
1.7. Zusammenfassung	25
1.8. Zielsetzung der Dissertation	27
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1. Material	28
2.1.1. Geräte	28
2.1.2. Puffer	29
2.1.2.4. Proteinextraktion aus Mäusegewebe	29
2.1.2.6. PAGE und Westernblotting	29
2.1.2.5. Agarose-Gel	30
2.1.2.4. Allgemeine Puffer	30
2.1.3. Medien	31
2.1.3.1. Zellkultur	31

2.1.3.2. Bakterienkultur	31
2.1.3.3. Hefekultur	32
2.1.4. verwendete Antikörper	34
2.1.4.1. polyklonale Antikörper:	34
2.1.4.2. monoklonale Antikörper:	34
2.1.4.3. sekundäre Antikörper (Peroxidasemarkiert)	34
2.1.4.4. sekundäre Antikörper (Biotinyliert)	34
2.1.5. verwendete Kits	34
2.2. Methoden	35
2.2.1. Allg. molekularbiologischen Methoden:	35
2.2.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.2. Sequenzieren	36
2.2.1.3. DNA-Konzentrationbestimmung:	36
2.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.1.5. Klonieren	37
2.2.1.6. Präparation und Vermehrung von Plasmiden	38
2.2.3. Western-Blotting	40
2.2.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	40
2.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford	40
2.2.3.3. Elektrophoretische Transfer	40
2.2.3.3. Immunodetektion von Proteinen	41
2.2.3.4. Strippen der Nitrozellulosemembran	42
2.2.4. Transgene Mäuse	42
2.2.4.1. Herstellen der transgenen Mäuse	42
2.2.4.2. Expressionsverhalten in murinen Neuroblastomzellen	43
2.2.4.3. Haltung und Versorgung der Mäuse	44
2.2.4.4. DNA-Isolierung und Maustypisierung	45
2.2.4.5. Durchführung der quantitativen PCR (qPCR)	45
2.2.4.6. Histologische Färbung	46
2.2.4.7. Microarray-Analyse	48
2.2.4.8. Expressionsverhalten der transgenen Mäuse	49
2.2.4.9. Rota-Rod	50
2.2.4.10. beam-walking Test	50
2.2.4.11. Bestimmung der Dopamin-Konzentration in verschiedenen Gehirnarealen	51
2.2.5. Hefe zwei-Hybrid	51
2.2.5.1. Prinzip	51
2.2.5.2. Hefe 2-Hybrid Screening	52
2.2.5.3. Klonierung der <i>bait</i> - und <i>prey</i> -Vektoren	54
2.2.5.4. Hefe Transformation	54
2.2.5.5. β -Galactosidase-Filter-Färbetest	56
2.2.5.6. β -Galactosidase-Färbetest in Flüssigkultur	56
2.2.6. Mutationsscreening	57
2.2.6.1. Amplifikation der Exons	57
2.2.6.2. Testen auf erfolgreiche Amplifikation	57
2.2.6.3. dHPLC	57
2.2.6.4. Sequenzieren	59
3. ERGEBNISSE	60
3.1. Transgenes Mausmodell mit WT621R- und mut621C-Synphilin-1	60
3.1.1. Generieren der Mauslinien	60
3.1.1.1. Wahl der beiden zu untersuchenden Mauslinien	60
3.1.1.2. Untersuchung des Expressionsverhalten der beiden Mauslinien mittels Western-Blot (WB)	61
3.1.1.3. Untersuchung des Expressionsverhaltens der beiden Mauslinien T01 und T09 mittels Immunhistochemie (IHC)	62
3.1.2. Charakterisierung der beiden Mauslinien	67
3.1.2.1. Verhaltensstudien mittels Rota-Rod und <i>beam-walking</i> Test	67
3.1.2.2. Auswertung des Expressionsverhalten der beiden transgenen Mauslinien	69

3.1.2.3. Verifizierung der gewonnenen Microarray-DNA-Chip Daten.....	76
3.1.2.4. Quantifizierung von Neurotransmittern und ihren Stoffwechselprodukten.....	78
3.2. Auffinden von neuen Interaktionspartner von Synphilin-1	79
3.2.1. Allgemeines.....	79
3.2.2. Hefe zwei-Hybridscreening.....	80
3.2.2.1. Synphilin-1-Konstrukt A (Aminosäure 1-348 und 557-920).....	80
3.2.2.2. Synphilin-1-Konstrukt B (Aminosäure 177-348 und 557-920).....	81
3.2.3. Charakterisierung der Interaktion zwischen Duo und Synphilin-1.....	81
3.2.3.1. Eingrenzung des Interaktionsbereiches von Synphilin-1:.....	81
3.2.3.2. Quantifizierung der Interaktion	82
3.2.3.3. Eingrenzung des Interaktionsbereiches von Duo/HAPIP bzw. Kalirin-7:.....	83
3.2.4. Untersuchung der Interaktion von Synphilin-1 mit Interaktionspartnern von Duo	85
3.2.4.1. Allgemeines zur Pathogenese des Morbus Huntington	85
3.2.4.2. Untersuchung einer Interaktion von Synphilin-1 mit PSD95	86
3.2.4.3. Untersuchung einer Interaktion von Synphilin-1 mit NMDAR1A/2B.....	87
3.2.4.4. Untersuchung einer Interaktion von Synphilin-1 mit IP3R	88
3.3. Mutationscreening des Gens von Seven in absentia homolog-1 (SIAH-1) bei Parkinsonpatienten	89
3.3.1. Allgemeines.....	89
3.3.2. Untersuchtes Patientenkollektiv	89
3.3.3. dHPLC-Messung.....	90
3.3.4. Bestimmung des Basenaustausches.....	90
4. DISKUSSION	92
4.1. Diskussion der Ergebnisse der transgenen Mäuse	92
4.1.1. Verhaltensstudien.....	92
4.1.2. Expressionsstudien	94
4.1.3. Stoffwechselprodukte von Dopamin bzw. Serotonin	96
4.2. Diskussion der Hefe 2-Hybrid Ergebnisse	97
4.2.1. Interaktion mit DUO bzw. HAPIP	97
4.2.2. Interaktion mit dem Inositol-3-Phosphatrezeptor	98
4.3. Diskussion des Mutations-Screening von SIAH-1	99
5. ZUSAMMENFASSUNG	100
6. LITERATURLISTE	101
7. LEBENS LAUF	121

Danksagung

„Humor und Geduld sind Kamele, mit denen wir durch jede Wüste kommen.“

(Phil Bosmans, belgischer Theologe u. Schriftsteller)

... ich bedanke mich bei all den Menschen, ...

- die mir halfen sowohl meine Geduld als auch meinen Humor nicht zu verlieren und die Geduld mit mir hatten und diese nie verloren;
- die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben, sei es mit Ihrem Wissen, sei es durch durch interessante Denkanstöße, sei es mit Ihrer Hilfsbereitschaft, sei es bei der Durchführung von Experimenten, sei es durch Tipps und Tricks, sei es durch Ihre ermutigende Worte und auch Taten, sei es auch durch finanzielle Unterstützung;
- die mich während der Zeit der Promotion begleitet haben und die für mich da waren, wann immer ich sie brauchte;
- die neue Freunde wurden oder alte blieben – auch wenn ich den Kontakt nicht so regelmäßig belebte wie es nötig wäre bzw. wie ich es wollte;
- die mir Auswege aus schier ausweglosen Situationen aufzeigten.

Ein herzliches Dankeschön an Euch allen!

jetzt Euer

dr. rer. nat. thomas franck

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>
μ	mikro- (Faktor: 10 ⁻⁶)
AADC	L-Aminosäuredecarboxylase
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ad	autosomal dominant
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Alzheimer'sche Krankheit
Amp.	Ampicillin
ar	autosomal rezessiv
AR-JP	autosomal rezessives juveniles Parkinsonsyndrom
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	kodierende bzw. komplementäre DNA
CEPH	Centre d'Etudes Polymorphisme Humain
CH	Schweiz
C _p	<i>crossingpoint</i>
Cyt-c	Cytochrom c
Da	Dalton
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dHPLC	denaturierende <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DK	Dänemark
DOPAC	Dihydroxyphenylsäure
dt.	deutsch
DUB	De-Ubiquitinierungsenzyme
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	Gramm
GE	Gelelektrophorese
gr.	griechisch
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IBR Domäne	<i>In-between-RING-finger</i> Domäne
IHC	Immunohistochemie
IPS	Idiopatisches Parkinson-Syndrom
Jhdt. n. Chr.	Jahrhundert nach Christus
Jhdt. v. Chr.	Jahrhundert vor Christus
k	kilo- (Faktor: 10^3)
Kan.	Kanamycin
L	Liter
LB	luria bertani
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LK	Lewy Körperchen
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
m	Meter
M	Molar [mol/L]
MAO-B	Monoaminoxidase B
Min.	Minute
MP	Morbus Parkinson
MPDP ⁺	1-methyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridiniumion
MPP ⁺	1-methyl-4-phenyl-pyridiniumion
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger</i> bzw. Boten-RNA
MS	Massenspektroskopie
n	nano- (Faktor: 10^{-9})
NL	Niederlande
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasenketten Reaktion)
PET	Positionenemmissionstomographie

PFA	para-Formaldehyd
PK	Parkinson'sche Krankheit
RING finger Domäne	<i>Really Interesting New Gene finger</i> Domäne
RING	<i>really interesting new gene</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
S	Schweden
SC	<i>synthetic complete</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SELDI	<i>surface enhanced laser desorption ionisation</i>
SNpc	Substantia Nigra pars compacta
T _A	Anlagerungstemperatur
TEAA	Triethylammionium-Anion
t _{elong.}	Elongationszeit
TF	Transkriptionsfaktor
TH	Tyrosinhydroxylase
u. a.	unter anderem
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
Ub	Ubiquitin
Ubl Domäne	<i>Ubiquitin like</i> Domäne
UCH	Ubiquitin Carboxy-Terminalen Hydroxylase
UpM	Umdrehungen pro Minute
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
VMAT-2	Monoamin-Transporter-2
WB	Western-Blot
Y2H	Hefe 2-Hybrid oder <i>Yeast 2-hybrid</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Abkürzungen für Nukleoside bzw. Nukleotide

A	Adenin bzw. Adenosin
C	Cytosin bzw. Cytidin
G	Guanin bzw. Guanosin
T	Thymin bzw. Thymidin

Für Aminosäuren wurde der Ein- oder Dreibuchstaben-Code entsprechend den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur (1984) verwendet.

1. Einleitung

1.1. Allgemeines zur Parkinson'schen Krankheit

1.1.1. Klinik

Die schon in der Antike beispielsweise von Erasistras im 3. Jhdt. v. Chr. oder von Galen von Pergamon im 2. Jhdt. n. Chr. erwähnte Krankheit wurde erstmals 1817 vom englischen Arzt und Apotheker James Parkinson (1755-1824) in der Monographie „*An Essay on the Shaking Palsy*“ ausführlich beschrieben. Die anschließend nach ihm benannte Parkinson'sche Krankheit (PK), die auch als *Morbus Parkinson* oder idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS) bezeichnet wird, ist nach der Alzheimer Krankheit (AK) die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit. Die Prävalenz der PK ist altersabhängig und steigt von 1,4% bei 55-Jährigen bis auf 3,4% bei den über 75-Jährigen. Frauen sind von dieser Krankheit etwas häufiger betroffen als Männer. Dies wird darauf zurückgeführt, dass unter anderem der Einfluss von Sexualhormonen bei älteren Frauen fehlt und damit deren neuroprotektive Wirkung und deren günstige Einflüsse auf die kognitive Funktion (Sherwin, 2003).

Drei Kardinalsymptome charakterisieren die PK klinisch: ein fakultativer (Ruhe-)Tremor (Abb. 1.1.B), eine akinetisch-rigide Bewegungsstörung, sowie ein reduzierter Stellreflexe (posturale Instabilität) (Abb. 1.1.A). Das bekannteste Symptom der PK ist das Ruhezittern, welches jedoch nicht jeden Krankheitsverlauf begleitet. Es betrifft meistens eine Seite stärker als die andere und die Arme stärker als die Beine.

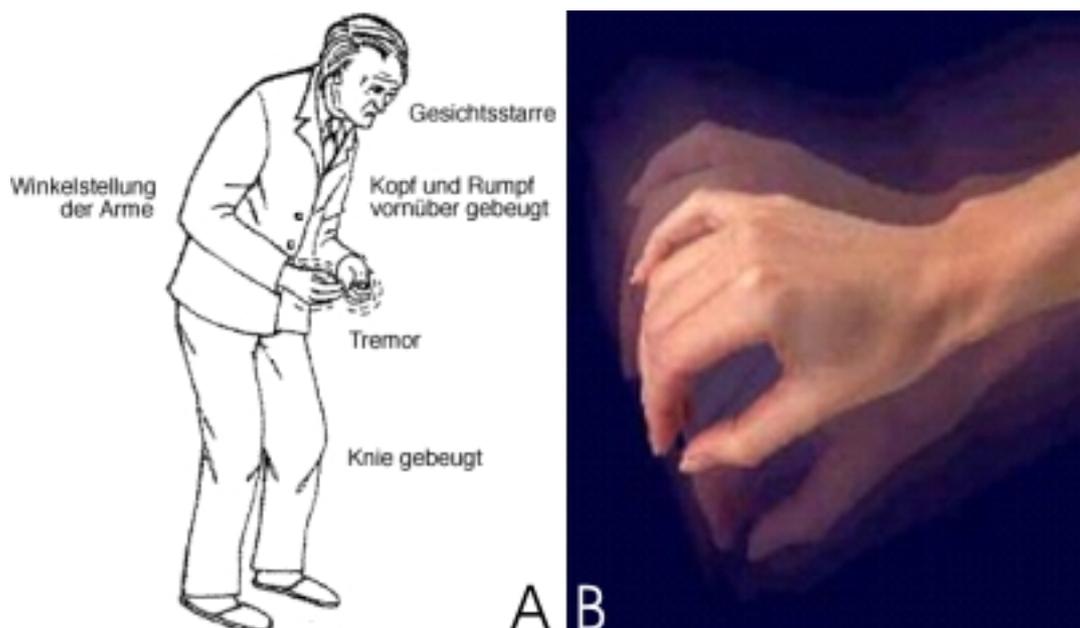


Abb. 1.1.: **A:** Typische Haltung und Beschwerden bei Parkinson (aus onmeda.de). **B:** Stroboskophafte Aufnahme des Tremors eines Parkinson-Patienten (Photo aus www.kompetenznetz-parkinson.de).

Aufgrund des Tremors wurde die Krankheit von James Parkinson als Schüttellähmung bezeichnet. Der Begriff Lähmung ist jedoch aus heutiger Sicht irreführend, da es sich um eine Steifheit der Muskeln (Rigor) handelt; die Kraft bleibt erhalten, nur die Bewegung der Gelenke ist nicht mehr so flexibel und es tritt ein erhöhter Widerstand auf. Die reduzierten Stellreflexe führen dazu, dass je nach Ausprägung Patienten zu Gangunsicherheit und zu erhöhter Sturzanfälligkeit neigen. Außerdem werden im Krankheitsverlauf typische kognitive, psychische und autonome Veränderungen beobachtet.

1.1.2. Neuropathologie

Die Ursache in den Störungen der Motorik liegt im Absterben der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) im Mittelhirn. Die Region SNpc erhielt ihren Namen, da sie dunkel bzw. schwarz gefärbt wird (*niger* – *lat.*: dunkel, schwarz). Diese Dunkelfärbung ist auf ein durch Autooxidation von Dopamin entstehendes Stoffwechselprodukt (Neuro-)Melanin (*melanos* – *gr.*: schwarz) zurückzuführen.

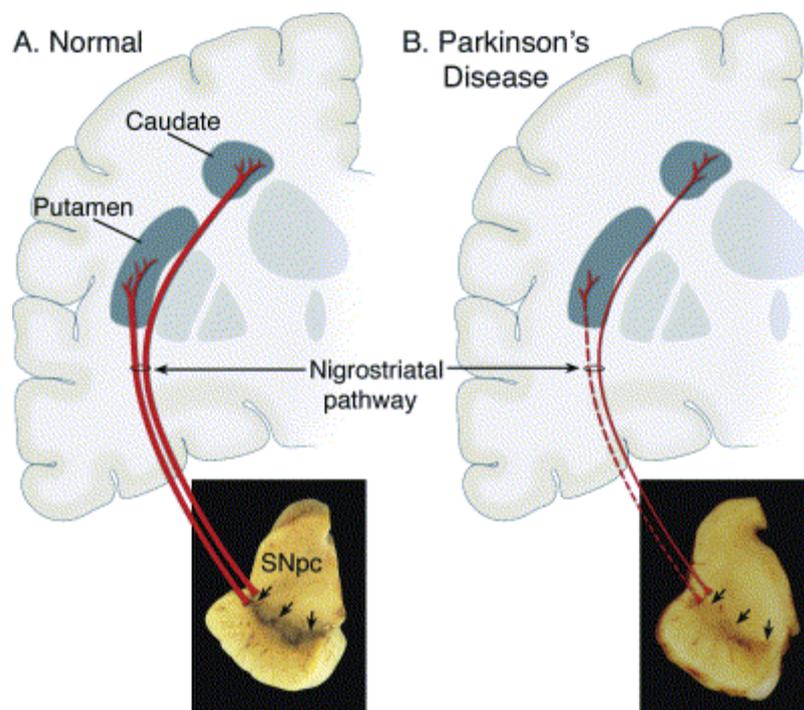


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Neuropathologie der PK. **A** zeigt die normale nigrostriatale Verknüpfung (rot), der das in der SNpc (dunkel angefärbt) gebildete Dopamin in das Striatum (spezifischer: Caudatem und Putamen) über Basalganglien ausschüttet. (Dargestellt durch die dicken, rote Linien). Das Fehlen dopaminergener Neurone in der SNpc bei Parkinsonpatienten (**B**) führt zu einer verminderten DA-Bildung und Ausschüttung (dünne bzw. gestrichelte rote Linie). Die verminderte DA-Menge im Striatum ist für die beschriebenen Parkinsonsymptome verantwortlich. In den Fotos ist zusätzlich die Depigmentierung der SNpc im Vergleich zu gesundem Gewebe gut ersichtlich (siehe Pfeile) (Dauer and Przedborski, 2003).

Das Absterben der Zellen führt dazu, dass Dopamin (DA) nicht mehr über die Basalganglien in das Striatum ausgeschüttet werden kann (siehe Abb. 1.2.). Das Gleichgewicht zwischen den Neurotransmittern Acetylcholin und Glutamat im Striatum und dem freigesetztem DA ist

Vorraussetzung für eine koordinierte Willkürmotorik und verhindert die beschriebenen Symptome. In gesunden Gehirnen sterben von der 5. bis zur 9. Lebensdekade zwischen 4,7% – 6% dieser dopaminergen Zellen je Jahrzehnt (Gibb et al., 1991), was nicht für die Entstehung der PK ausreicht. Das Absterben von mehr als 50% der dopaminergen Neuronen in der SNpc führt zu einem mehr als 80%igem Verlust des DA-Spiegels im Striatum. Dies wiederum verursacht die typischen Symptome der PK (Deumens et al., 2002). Nach Braak ist das Absterben der dopaminergen Neuronen nur der Beginn der 4. Stufe eines sechsstufigen Voranschreitens (siehe Abb. 1.3.) der Gehirnpathologie des idiopathischen Parkinson Syndroms (Braak et al., 2003). Er stellt die Hypothese auf, dass die Parkinson'sche Krankheit durch ein neurotropes Pathogen, das von außen in das ZNS eintritt, verursacht werden könnte.

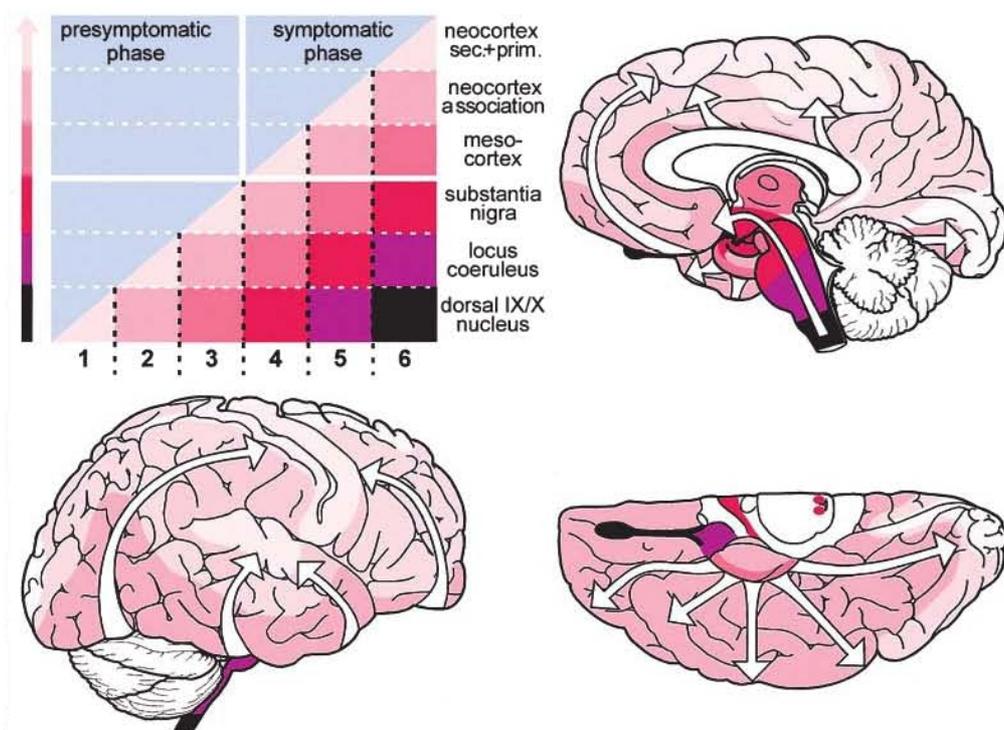


Abb. 1.3.: Schematische Darstellung der sechs verschiedenen Stadien der Neuropathologie der idiopathischen Variante der Parkinson'schen Krankheit nach Heiko Braak. Sie beginnt mit ersten Läsionen im Olfaktorischen Bulbus und breitet sich dann über das gesamte Gehirn aus. Je betroffener der entsprechende Bereich ist, desto dunkelroter ist dieser in der Skizze markiert (Braak *et al.*, 2003).

Der von ihm vorgestellte Mechanismus erklärt die sequentielle Art und Weise, in dem unterschiedliche Gehirnbereiche von der idiopathischen Parkinsonerkrankung vereinnahmt werden. Ein weiteres Hauptmerkmal der PK sind die von Frederich H. Lewy 1912 erstmals beschriebenen 5-25 μm großen, hyalinen Proteinaggregate im Zytoplasma von überlebenden Neuronen (Lewy, F.H. 1912), die in Parkinsongehirnen hauptsächlich in der SNpc und im Locus coeruleus nachgewiesen werden (Gibb and Poewe, 1986; Pollanen et al., 1993). Diese nach ihrem Entdecker bezeichneten Lewy Körperchen (LK) sind zusammen mit dem Verlust der

dopaminergen Neuronen in der SNpc ein typisches, pathologisches Kennzeichen der Krankheit, wobei neuere Studien Formen des Parkinson vorstellen, die keine LK aufweisen (Dawson and Dawson, 2003).

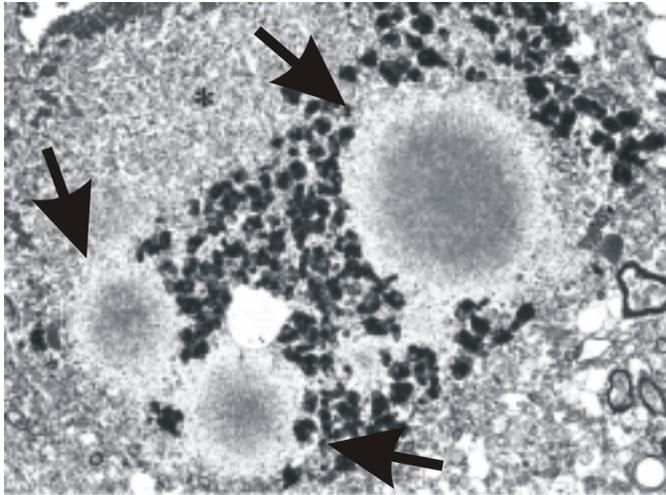


Abb. 1.4.: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines pigmentierten Neurons mit drei Lewy Körpern (siehe Pfeile). Die LK besitzen einen dunklen, eosinophilen Kern mit einem hellen, strahlenförmigen Randbereich (genannt: halo)

(Takahashi and Wakabayashi, 2001).

Zur Unterdrückung der Symptome wird der Vorläufer von DA, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), welcher im Gegensatz zu DA die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, verabreicht. Aus L-DOPA wird durch Decarboxylierung mittels der unspezifischen aromatischen L-Aminosäuredecarboxylase (AADC) DA hergestellt.

Diese Form der Therapie schützt weder vor weiterem Absterben der Neurone noch einer Regeneration dieses Hirnareals. Außerdem muss mit anhaltender Therapie die L-DOPA-Dosis erhöht werden. Die Ursache für das Absterben der Zellen und das Fortschreiten der Krankheit ist bis heute noch nicht geklärt. Jedoch können nur Antworten auf diese Frage zu neuroprotektiven Medikamenten führen.

1.2. Umwelteinflüsse

In frühen Untersuchungen wurden Umwelteinflüsse auf die Ätiologie der PK hin untersucht. Ein Hinweis auf eine Verbindung der Umgebung mit einer Krankheit kann aus der Erkrankungsrate von Immigranten gewonnen werden. So ist zum Beispiel die Prävalenz der PK in Nigeria um einiges geringer als unter Afroamerikanern in den USA, obwohl beide Gruppen genetisch betrachtet sehr homolog sind (Schoenberg et al., 1988). Gleichzeitig liegt eine ähnliche Prävalenz in den Vereinigten Staaten von Amerika zwischen weißen und Afroamerikanern vor (Schoenberg et al., 1985). Des Weiteren hat sich herauskristallisiert, dass Industrienationen die höchsten Prävalenzen dieser Krankheit innehaben. Tanner und seine Kollegen führt dies auf industrielle Umweltgifte zurück (Tanner, 1989).

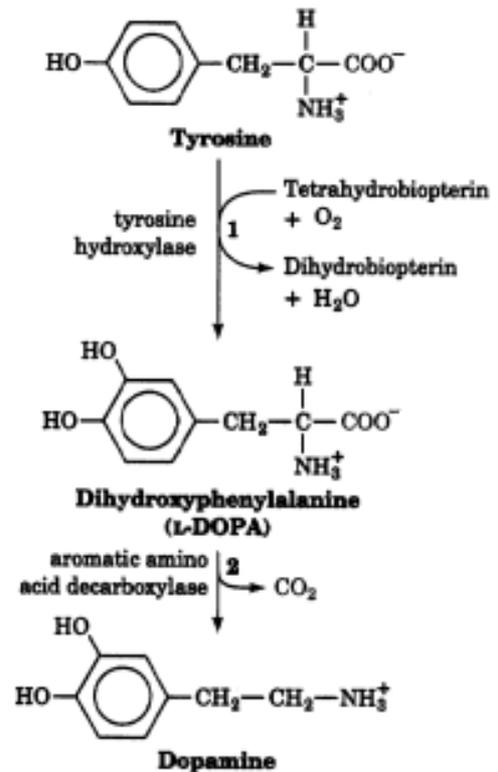


Abb. 1.5.: Bildung von Dopamin (DA) aus der Aminosäure Tyrosin. Dabei wird Tyrosin im ersten Schritt durch die Tyrosinhydroxylase (TH) in L-DOPA verstoffwechselt. Anschließend decarboxyliert die L-Aminosäuredecarboxylase (AADC) L-DOPA zu DA. Da Dopamin die Bluthirnschranke nicht überwindet, wird Parkinson-Patienten L-DOPA verabreicht.

Die Beobachtung bei Drogenabhängigen, dass das Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) schwere Parkinson-ähnliche Symptome hervorruft, hat diese These untermauert und einen ersten Einblick in das Absterben der nigralen Neurone erlaubt. Das lipophile MPTP kann die Blut-Hirn-Schranke passieren (Markey et al., 1984). Im Zentralen Nervensystem (ZNS) wird MPTP zunächst in Gliazellen und serotonergen Neuronen durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) zum 1-Methyl-4-Phenyl-1,2-Dihydropyridiniumion (MPDP⁺) oxidiert, welches wahrscheinlich spontan weiter zum toxischen Agens 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridiniumion (MPP⁺) oxidiert. Über einen derzeit noch unbekanntem Mechanismus wird MPP⁺ in den Extrazellulärraum freigesetzt und anschließend über den Dopamin-Transporter (DAT) in dopaminerge Neurone aufgenommen (Chiba et al., 1985; Javitch et al., 1985), wo es mit zytosolischen Enzymen interagieren kann (Klaidman et al., 1993). Des Weiteren reichert es sich in Mitochondrien an (Ramsay et al., 1986) und wird über den vesikulären Monoamin-Transporter-2 (VMAT2) in synaptische Vesikel aufgenommen (Liu et al., 1992). Während die Aufnahme in Vesikel protektiv zu sein scheint, hemmt MPP⁺ in den Mitochondrien den Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette (Nicklas et al., 1985). Einerseits führt diese Hemmung zu einem Mangel an Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) (Chan et al., 1991), andererseits zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-

spezies (ROS), die zu oxidativem Stress führen (Hasegawa et al., 1990; Hasegawa et al., 1997). Beide Wege sind Erklärungen für die neurotoxische Wirkung von MPP⁺.

Interessanterweise fördert eine ländliche Umgebung die Entwicklung der PK, was an in der Landwirtschaft verwendeten Herbiziden bzw. Insektiziden liegen könnte. So besitzt das Herbizid Paraquat eine ähnliche Struktur wie MPP⁺ (siehe Abb. 1.6.). Das Insektizid Rotenon hemmt analog zu MPP⁺ den Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien.

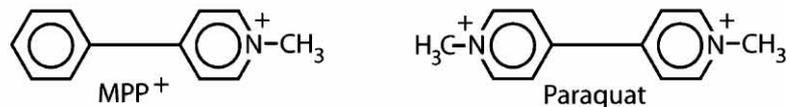


Abb. 1.6.: Vergleich der Struktur des Herbizids Paraquat mit MPP⁺.

In weiteren empirischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Genuss von Brunnenwasser (Nitrate), die Belastung mit Schwermetallen, Zyaniden, organischen Lösungsmittel, Kohlenstoffmonoxid und Kohlenstoffdisulfid das Risiko an Parkinson zu erkranken, erhöht (Tanner and Langston, 1990).

Auch die Lebensgewohnheiten verändern die Prävalenz. Sowohl der Genuss von Zigaretten (Morens et al., 1995), als auch der Konsum von Kaffee (Ross et al., 2000) wirkt sich hemmend auf die Entwicklung der PK aus.

1.3. Oxidativer Stress

Als weitere Ursache der PK wird oxidativer Stress innerhalb der Neuronen der SNpc diskutiert. Carbonylmodifikationen, die Hinweise auf Proteinoxidationen darstellen, sind in der SNpc im Vergleich zu Basalganglien von gesunden Individuen verdoppelt (Floor and Wetzel, 1998). Die Ursache dieser Oxidation liegt wahrscheinlich im Metabolismus von Dopamin selbst. DA wird durch die MAO-B zu Dihydroxyphenylsäure (DOPAC) und Wasserstoffperoxyd (H₂O₂) verstoffwechselt (Maker et al., 1981; Gesi et al., 2001). Des Weiteren entstehen durch zytosolische Autooxidation aus DA Dopamin-Quinone, H₂O₂ und reaktiver Sauerstoff (O₂^{•-}) (Graham et al., 1978; Sulzer and Zecca, 2000). Die Bildung von Dopamin-Quinone hat weitreichenden Einfluss auf die Hauptaufgabe der dopaminergen Neuronen. Es inhibiert Glutamat- und Dopamintransporter in den Synaptosomen (Berman and Hastings, 1997) und die Tyrosin-Hydroxylase (TH) (Kuhn et al., 1999), die Tyrosin in L-DOPA umwandelt. Außerdem fördert es die Abnahme der Protonenmenge innerhalb der Mitochondrien, die sich in einer Entkoppelung der ATP-Produktion aus der Atmungskette manifestiert (Berman *et al.*, 1997; Khan et al., 2001). Das bei der (Auto-)Oxidation von DA gebildete H₂O₂ kann bei der

Fenton-Reaktion in Anwesenheit von zweiwertigen Eisenionen (Fe^{2+}) in Hydroxylradikale (HO^\bullet) umgewandelt werden. HO^\bullet ist eine höchst reaktive Substanz und kann nahezu mit jedem zellulären Makromolekül reagieren. Ein Hinweis darauf, dass die eisenvermittelte Fenton-Reaktion eine Rolle bei der Entstehung der PK spielen könnte, ist die Entdeckung, dass

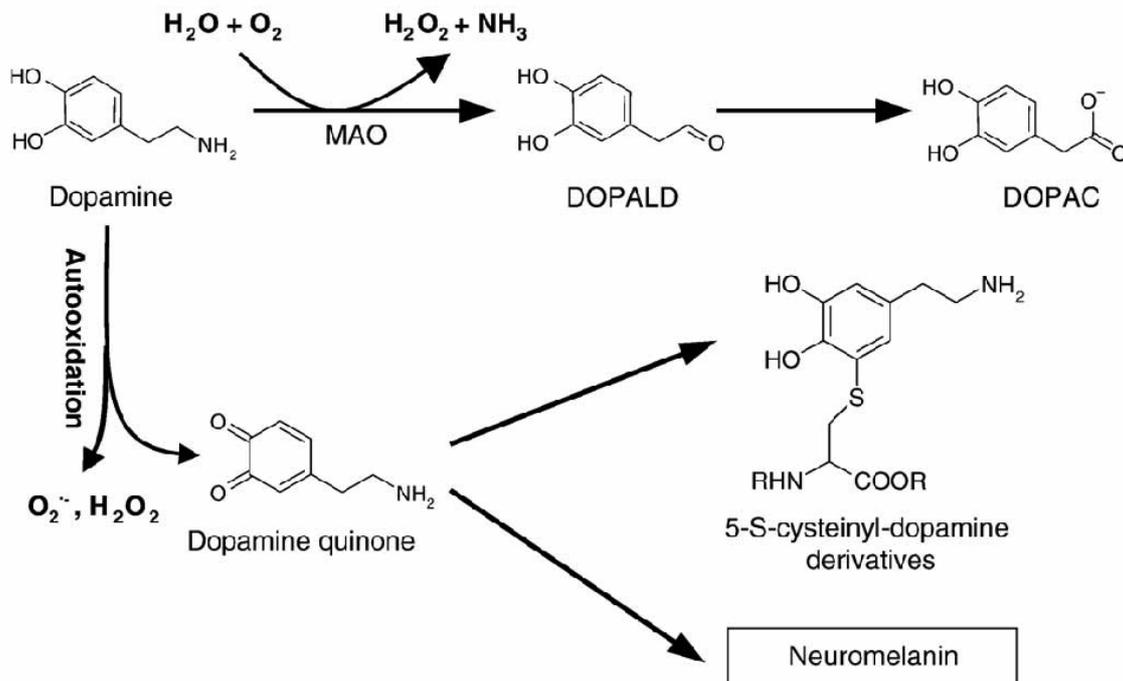


Abb. 1.7.: Bildung von H_2O_2 durch Autooxidation oder mittels einer Monoaminoxidase (MAO). Dies kann mittels der Fenton-Reaktion in Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen zu reaktivem Sauerstoff führen. Außerdem können auch direkt Sauerstoffradikale gebildet werden. Das dabei gebildete Neuromelanin färbt die SNpc schwarz (Hald and Lotharius, 2005).

nicht nur der Eisenspiegel in der SNpc höher ist als im übrigen Gehirn (Gerlach et al., 1994), sondern auch eine Erhöhung um etwa 35% von an Parkinson Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen wurde (Sofic et al., 1988; Dexter et al., 1989).

1.4. Genetische Faktoren

Erste Studien weisen nur geringe Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen auf, die sich nur unwesentlich von denen bei dizygoten unterscheiden (Duvoisin, 1977; Ward et al., 1983; Marttila et al., 1988). Spätere Untersuchungen wählten einen längeren Beobachtungszeitraum, um dem spät-manifestierenden Charakter der PK Rechnung zu tragen. Außerdem konnte Burn und seine Mitarbeiter 1992 durch Verwendung modernerer Methoden (^{18}F Fluorodopa-Positionenemissionstomographie (PET)) eine wesentliche höhere Konkordanzrate (45 % bei monozygoten Zwillingen) ermitteln (Burn et al., 1992). Dies bestärkte eine genetische Komponente in der Pathogenese dieser Krankheit.

Tabelle 1.1.: Gene und Loci bei familiärem Parkinson

Lokus	Gen	Genloci	Erbgang	Referenz
PARK1	α -Synuklein	4q21	AD	(Polymeropoulos et al., 1997; Krüger et al., 1998)
PARK2	Parkin	6q25.2-27	AR	(Kitada et al., 1998)
PARK3	Unbekannt	2p13	AD	(Gasser et al., 1998)
PARK4	α -Synuklein (Triplikation)	4q21-23	AD	(Singleton et al., 2003)
PARK5	UCH-L1	4p14	AD	(Leroy et al., 1998a)
PARK6	PINK1	1p35-36	AR	(Valente et al., 2004)
PARK7	DJ-1	1p36	AR	(Bonifati et al., 2003)
PARK8	LRRK2	12q12	AD	(Funayama et al., 2002)
PARK9	ATP13A2	1p36	AR	(Ramirez et al., 2006)
PARK10	unbekannt	1p32	AD	(Hicks et al., 2002)
PARK11	unbekannt	2q36-37	AD	(Pankratz et al., 2003b)
PARK12	unbekannt	Xq21-q25	AR	(Pankratz et al., 2003a)
PARK13	HtrA2/Omi	2p12	AD	(Strauss et al., 2005)

AD – autosomal dominant; AR – autosomal rezessiv

In genetischen Untersuchungen innerhalb Familien, in denen die PK autosomal dominant bzw. rezessiv vererbt wird, konnten bis jetzt 11 Genloci (siehe Tabelle 1.1.) identifiziert werden, die eine kausale Rolle in der Pathogenese spielen. Die dabei gefundenen Gene bzw. translatierte Proteine ermöglichen es, Stoffwechselwege aufzuzeigen, die unter bestimmten Bedingungen (z.B. Verlust der Aktivität eines Enzyms) zur Pathogenese von Parkinson führen.

Mit Hilfe der auf diese Weise gefundenen Gene ist es möglich, ein Verständnis der molekularen Vorgänge für die Pathogenese der PK zu entwickeln. So führen Mutationen in den Genen einerseits direkt zum Absterben der dopaminergen Neuronen, andererseits kann die protektive Funktion der entsprechenden Genprodukte nicht mehr wahrgenommen werden.

1.4.1. PARK1 und PARK4 – α -Synuklein

Alpha-Synuklein ist das erste Protein, welches als Auslöser für eine vererbte Form von PK entdeckt wurde (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998). Das Protein gehört einer Proteinfamilie an, von der bisher drei Mitglieder bekannt sind: α -, β - und γ -Synuklein (Kahle *et al.*, 2002). Humanes α -Synuklein wurde erstmals als Vorläuferpeptid (NACP) in amyloiden

Plaques bei der Alzheimer'scher Krankheit identifiziert (Ueda et al., 1993). Das Protein ist durch unvollständige Wiederholungen der Aminosäuren KTKEGV am N-Terminus, einem hydrophoben mittleren Teil (NAC) und einem sauren Carboxy-Terminus charakterisiert (Eliezer et al., 2001). Alle bisher gefundenen Mutationen befinden sich in dem carboxy-terminalen Bereich des Proteins, welches die kurzen Repeats enthält. Alpha-Synuklein weist eine hohe Plastizität der Tertiärstruktur auf, so dass je nach Umfeld verschiedene Konformationen eingegangen werden können (Uversky, 2003). Es wurden u. a. sowohl alpha-helikale als auch beta-Faltblatt-Strukturen, die als Monomer oder als Oligomer vorliegen, nachgewiesen. Auch die Form der gebildeten Aggregate ist sehr unterschiedlich (Uversky, 2003). Interessanterweise können verschiedene Pestizide wie z. B. Rotenon und Paraquat eine Konformationsänderung induzieren und so die Bildung von Fibrillen – längliche Proteinaggregate – beschleunigen (Uversky et al., 2001). Das Protein wird in hohen Konzentrationen innerhalb des Gehirns exprimiert, und kann innerhalb der SNpc, in den Somata und in den Nervenendigungen nachgewiesen werden (Li et al., 2002; Andringa et al., 2003). Die Funktion von nicht-mutiertem α -Synuklein ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Aus unterschiedlichen Untersuchungen wird geschlossen, dass α -Synuklein eine Rolle in der Regulierung von synaptischen Vesikeln spielt. Dafür spricht die Lokalisation des Proteins an synaptischen Vesikeln (Li et al., 2002). Außerdem reduziert α -Synuklein in Zellkultur die Aktivität einer extrazellulären Proteinkinase (ERK) (Hashimoto et al., 2003). ERK ist zuständig für das Überleben (Subramaniam et al., 2003) und das Wachstum von Neuronen, sowie für die Ausbildung und die Plastizität von Synapsen (Impey et al., 1999). Einen weiteren Hinweis dafür liefert die Beteiligung von α -Synuklein am axonalen Transport (Mizuno et al., 2001). Alpha-Synuklein knock-out Mäuse weisen synaptische Defizite auf: im Striatum wird in diesen Mäusen kein Dopamin mehr freigesetzt (Abeliovich et al., 2000). Dies steht mit der Beobachtung in Zellkulturexperiment im Einklang, dass Überexpression von α -Synuklein die TH-Aktivität reduziert und demzufolge die DA-synthese verringert (Perez et al., 2002). Diese Forschungsergebnisse unterstützen die Hypothese, dass α -Synuklein ein aktivitätsabhängiger Negativregulator der DA Neurotransmission ist.

Interessanterweise konnte nicht nur bei Mutationsträgern, sondern auch bei sporadischen Parkinson-Patienten α -Synuklein als Bestandteil von LK nachgewiesen werden (Takahashi et al., 2001). Eine Hypothese zur Entstehung der LK aus monomerem α -Synuklein ist in Abb. 1.8.B. dargestellt. Ein weiterer Beweis für die Beteiligung an der PK gelang in drei Mutationsstudien an unterschiedlichen Familien. Dabei wurden drei verschiedene Mutationen gefunden (siehe Abb. 1.8.A): Ala53Thr (Polymeropoulos et al., 1997), Ala30Pro (Krüger et al., 1998) und

Glu46Lys (Zarranz et al., 2004). Außerdem konnte in einer weiteren Familie eine Triplikation

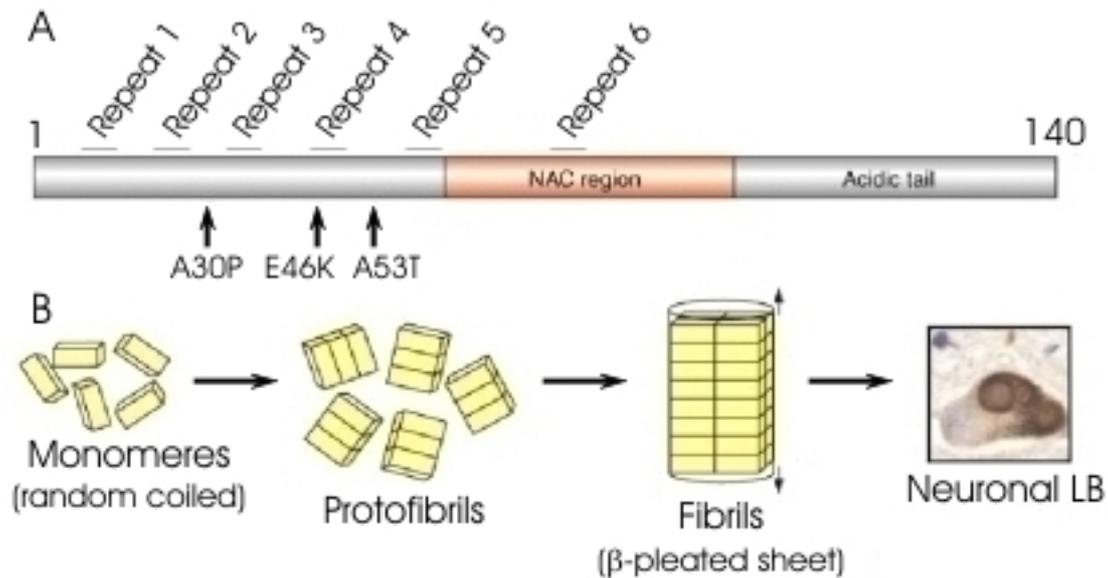


Abb. 1.8.: **A:** Schematische Darstellung von α -Synuklein. Die sechs Aminosäurewiederholungen KTKEGV (Repeat 1-6) sind eingezeichnet, in denen sich die bisher drei nachgewiesenen Mutationen aufgefunden wurden. **B:** vermutete Entstehung der LK aus monomerem α -Synuklein, die durch Überexpression oder Mutationen zur Protofibrillen aggregieren, die sich zu größeren Fibrillen zusammenschließen und die für Parkinson typischen LK bilden (modifiziert nach (Giasson and Lee, 2001).

des α -Synukleingens nachgewiesen werden (Singleton *et al.*, 2003), die zu einer erhöhten Expressionsrate führt (Farrer et al., 2004; Miller et al., 2004).

1.4.2. PARK2 – Parkin

Bei den ersten aufgefundenen Parkin-Mutationen handelte es sich um große homozygote Deletionen (Kitada *et al.*, 1998). In weiteren Studien konnten auch Multiplikationen, kleinere Deletionen bzw. Insertionen und Missense-Mutationen aufgefunden werden (West and Maidment, 2004). Mutationen im Parkin-Gen sind mit autosomal rezessiver PK assoziiert, deren Krankheitssymptome im Allgemeinen vor dem 45. Lebensjahr auftreten; sie wird deshalb als autosomal rezessives juveniles Parkinsonsyndrom (AR-JP) bezeichnet. Mutationen in Parkin können sogar als Hauptursache für das Entstehen von AR-JP verantwortlich gemacht werden, da in fast 50% der familiären und 20% der sporadischen frühen Form von Parkinson Mutationen aufgefunden werden konnten (Lücking et al., 2000). Die Neuropathologie, die durch die unterschiedlichen Mutationen hervorgerufen werden, unterscheidet sich von einander. So wird nur von zwei Fällen berichtet, in denen ein Mutationsträger LK besitzt (Farrer et al., 2001; Klein et al., 2005). Dies wirft die Frage auf, ob AR-JP eine andere Pathogenese

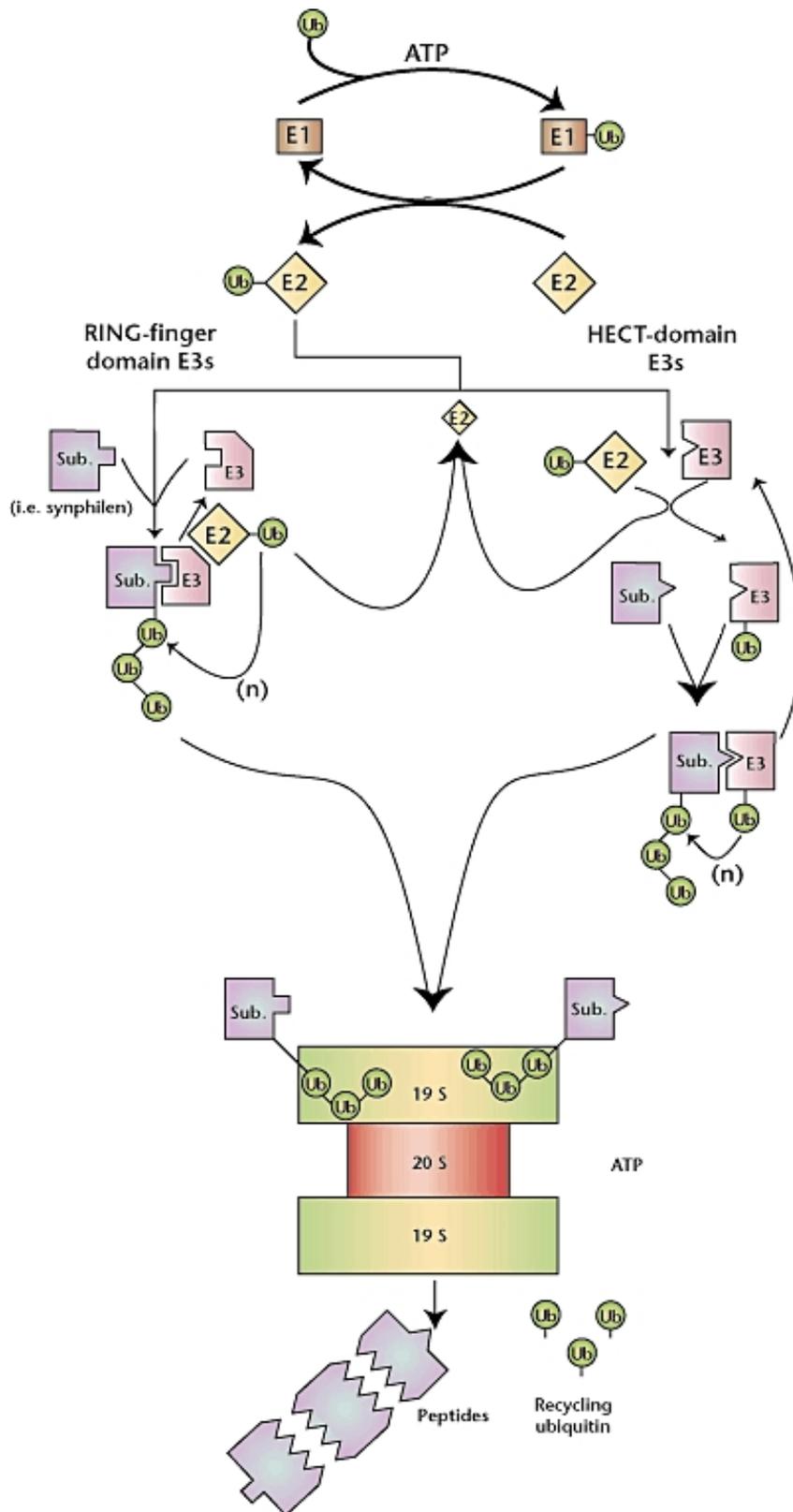


Abb. 1.9.: Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS): Ub wird mittels E1-Enzymen aktiviert und auf E2-Enzyme übertragen. Das aktivierte Ub kann so auf die zwei unterschiedlichen E3-Ligasefamilien übertragen. Parkin gehört zur RING-finger E3 Enzymen (linker *pathway*), das Substrate polyubiquitiniert und sie so für die Degeneration über das Proteasom markiert. Weitere Enzyme (z. B. UCH-L1) spalten PolyUb-Ketten, so dass diese wieder für den ersten Schritt zur Verfügung stehen (Ciechanover, 2001).

innehat als die idiopathische PK oder ob die Expression von nicht-mutiertem Parkin Voraussetzung für die Bildung von LK darstellt (Chung et al., 2001).

Das Parkin-Gen wurde auf Chromosom 6q25.2-q27 kartiert und überspannt mit seinen 12 Exonen insgesamt 1,5 Millionen Basenpaare (Kitada *et al.*, 1998). Das translatierte Protein besitzt eine *Ubiquitin-like* (Ubl) Domäne am Amino-Terminus. Am Carboxy-Terminus befinden sich zwei *Really Interesting New Gene* (RING) *finger* Domänen vom Typ C₃HC₄, die von einer *In-between-RING-finger* Domäne (IBR) getrennt wird.

Wie viele weitere *RING finger* Proteine gehört auch Parkin zu den E3 Ligasen (Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000). E3 Ligasen sind Teil des Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), welches mit Ubiquitin (Ub) markierte Proteine über das Proteasom abbaut. Für die Markierungen werden außer den E3-Ligasen auch Ub-aktivierende E1- und Ub-konjugierende E2-Enzyme benötigt (Pickart, 2001). Die zwei RING-finger Domänen führen zu einer sterischen Annäherung eines E2-Enzyms (UbcH7 oder UbcH8) und des abzubauenen Zielproteins. Die verschiedenen Mutationen im Parkin-Gen stören einerseits die Interaktion der E3-Ligase mit den Ub-konjugierenden E2-Enzymen, aber vor allem die Erkennung von Zielproteinen. Es wurden bisher einige Interaktionspartner wie z. B. cell division control related protein 1 (CDCrel-1) (Zhang *et al.*, 2000), Synphilin-1 (Chung *et al.*, 2001), Parkin-assoziiertes endothelien receptor-like Rezeptor (PaelR) (Imai et al., 2001), Synaptotagmin XI (Huynh et al., 2003), die durch Mutationen in Parkin verhindert oder zumindest abgeschwächt werden, nachgewiesen. Ein erhöhter Spiegel des an synaptischen Vesikeln assoziierten Proteins CDCrel-1 kann die Freigabe von Dopamin verhindern (Zhang *et al.*, 2000). Auch Synphilin-1 ist mit synaptischen Vesikeln assoziiert (Ribeiro et al., 2002). Die gesamte Synaptotagmin-Familie ist wichtig für die Bildung und auch das Andocken von Vesikeln. Außerdem wurde Synaptotagmin XI im Kern von LK nachgewiesen (Huynh et al., 2003). Ein weiteres Substrat von Parkin ist der PaelR-Rezeptor, der bei Überexpression eine unlösliche und ungefaltete Form bildet, die den Zelltod induziert (Imai *et al.*, 2001).

Neben dem indirekten Einfluss von mutiertem Parkin, indem es missgefaltete Proteine nicht mehr erkennt und deshalb nicht dem UPS zuführen kann, scheint die S-Nitrosylierung von Parkin wichtig zu sein. Dies wurde in der sporadischen, häufiger auftretenden Form der PK nachgewiesen (Chung et al., 2004; Yao et al., 2004).

1.4.3. PARK5 – UCH-L1

In der Ubiquitin Carboxy-Terminalen Hydroxylase L1 (UCH-L1) konnte von Leroy und Kollegen 1998 die Punktmutation Ile93Met identifiziert werden (Leroy et al., 1998b). Die Fami-

lie der UCH gehört zur Gruppe der De-Ubiquitinierungsenzyme (DUB) und zerschneidet polymere Ub-Ketten zu monomerem Ub und hydrolysiert zusätzlich Verbindungen zwischen Ub und kleinen Anhängseln wie z. B. Glutathione oder Amine (Larsen et al., 1996). Außer der Thiol-Protease-Aktivität konnte gezeigt werden, dass UCH-L1 monomeres Ub stabilisiert (Osaka et al., 2003). So werden Ub-Moleküle dem Kreislauf des UPS wieder zugeführt. Die Isoform UCH-L1 wird nur im Gehirn und den Hoden bzw. den Ovarien exprimiert. Dabei stellt das Protein bis zu 2% der Gesamtproteinmenge im Gehirn dar, wobei sich ein beträchtlicher Teil davon in synaptischen Vesikeln befindet (Liu et al., 2003). Neben dem Auffinden der Mutation stellt die Detektion von UCH-L1 in LK einen weiteren Hinweis an einer Beteiligung an der PK dar (Ardley et al., 2004).

Die Ile93Met-Mutation führt *in-vitro* zu einer etwa 50% verringerten Enzymaktivität, ohne aber dabei das bisher unbekannte spezifische Substrat zu verwenden (Leroy *et al.*, 1998a). Außerdem kann diese Mutation die Aggregatbildung erhöhen, so dass beide Möglichkeiten die Krankheit beschleunigen. Andererseits wurde in einer Metaanalyse ein protektiver Effekt eines Ser18Tyr-Polymorphismus in UCH-L1 nachgewiesen (Maraganore et al., 2004). Träger eines Tyr18-Allels waren im Patientenkollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe unterrepräsentiert. Außer der Hydrolyse von Ub, wurde gezeigt, dass UCH-L1 zusätzlich eine Ligase-Funktion für die Lys63-Aminosäure besitzt (Liu et al., 2002). Während die Konjugation an Lys48 das Zielprotein für den Abbau über das Proteasom markiert, führt die andere zu einem intrazellulärem Signal (Hofmann and Pickart, 2001). Die Ser18Tyr Mutation verschiebt die Aktivität von UCH-L1 zur Hydrolase, während die Ile93Met Mutation die Ligase-Fähigkeit bestärkt (Liu *et al.*, 2002). Dies führt zu einem Mangel an freiem, monomerem Ub und daraus folgend eine erniedrigte Proteasom-Aktivität.

1.4.4. PARK6 – PINK1

Mutationen im PARK6-Gen verursachen die autosomal rezessive Variante der Parkinson'schen Krankheit. PARK6 konnte auf Chromosom 1p35-1p36 kartiert werden. Das als *PTEN-induced kinase 1* (PINK1) bezeichnete Transkript besitzt ein amino-terminales mitochondriales Lokalisationssignal und eine höchst konservierte Proteinkinase-Domäne, die eine beträchtliche Homologie zu Serin-Threonin-Kinasen der Ca²⁺/Calmodulin-Familie aufweist (Unoki and Nakamura, 2001). Dennoch konnte das fertig prozessierte Protein auch im Zytosol nachgewiesen werden (Beilina et al., 2005).

Die ersten nachgewiesenen Mutationen waren Gly309Asp und Trp437STOP (Valente *et al.*, 2004). Valente und ihre Kollegen vermuten nach vergleichenden Versuchen mit der

Gly309Asp-Mutante und der Wildtypvariante, dass PINK1 Neuronen vor stressinduzierten mitochondrialen Funktionsstörungen und Apoptose schützt und dass diese Eigenschaft durch die Gly309Asp-Mutation verloren geht (Valente *et al.*, 2004). Dies wird wahrscheinlich durch Phosphorylierung von mitochondrialen Proteinen gewährleistet. Sicher ist, dass PINK1 Apoptose durch Reduktion der Cytochrom-C-Freigabe (Cyt-C) aus Mitochondrien verhindert. Vermindertes zytosolisches Cyt-C beschränkt die Aktivität der nachfolgenden Caspasen-9, -7, -3 und der poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Auch dieser schützende Effekt wird durch die Mutation aufgehoben (Petit *et al.*, 2005). Eine weitere Mutation (Leu347Pro) destabilisiert das Protein und vermindert seine Kinaseaktivität stark im Vergleich zur davor gefundenen Gly309Asp-Mutation.

1.4.5. PARK7 – DJ-1

Mutationen in DJ-1 wurden ebenfalls mit autosomal rezessivem Parkinsonismus in Verbindung gebracht, nachdem bei einer holländischen und italienischen Familie Mutationen nachgewiesen werden konnten (Bonifati *et al.*, 2003). Dabei wurde sowohl eine große Deletion der ersten fünf Exone, als auch eine Punktmutation an Position Leu166Pro gefunden. In Röntgenkristallstrukturuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass DJ-1 als Homo-Dimer vorliegt (Honbou *et al.*, 2003; Tao and Tong, 2003; Wilson *et al.*, 2003). Die Mutation Leu166Pro verhindert die Dimerisierung, indem Prolin als „ α -Helixbrecher“ wirkt. Das Monomer ist sehr instabil und wird durch das Proteasom abgebaut, so dass die Funktion des Proteins verloren geht. Es wurden auch weitere Mutationen detektiert (Abou-Sleiman *et al.*, 2004), deren Auswirkungen nicht eindeutig charakterisiert sind, aber sehr wahrscheinlich genauso zu einem Funktionsverlust führen wie die erstbeschriebene.

Die genaue Funktion ist bisher unbekannt, aber es wird besonders im Zusammenhang mit der PK eine neuroprotektive diskutiert. In Zellkultur ohne exprimierendes DJ-1 konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber H₂O₂-induziertem oxidativem Stress gezeigt werden. Überexpression des natürlichen DJ-1 rettet diese Zellen, wohingegen die Leu166Pro-Mutation keine Veränderung aufzeigt (Yokota *et al.*, 2003). So wird vermutet, dass funktionelles DJ-1 als Antioxidationsmittel Nervenzellen vor den als Nebenprodukt der DA-Synthese auftretenden Radikalen dient.

Dagegen spricht, dass in erst kürzlich publizierten DJ-1 Knock-out-Mäusen weder Verhaltensauffälligkeiten, noch Neurodegeneration der dopaminergen Zellen oder erhöhte Suszepti-

bilität für Neurotoxine nachgewiesen werden konnte (Goldberg et al., 2005). Bisher konnte DJ-1 nicht in LK nachgewiesen werden.

1.4.6. PARK8 – LRRK-2

Als PARK8 wurde die Leucinreiche Repeatkinase 2 (LRRK-2) identifiziert (Zimprich et al., 2004) und das translatierte Protein Dardarin kloniert (Paisan-Ruiz et al., 2004). Dardarin stammt von dem baskischen Wort *dardara* ab, das Zittern bzw. Tremor bedeutet. Die Funktion dieser Kinase ist bis heute unbekannt, sie stellt aber nach PINK-1 die zweite Kinase dar, die in Zusammenhang mit der PK steht. Diese Kinase ist mit einer Vielzahl von Membranen, vesikulären Strukturen, membrangebundenen Organellen und Mikrotubuli assoziiert. Dies weist auf eine Affinität von LRRK-2 zu Lipiden oder lipid-assoziierten Proteine hin und damit lässt sich vermuten, dass es eine Rolle in der Biogenese und/oder Regulation von vesikulären und intrazellulären Membranstrukturen innerhalb des Gehirns spielt (Biskup et al., 2006). Die bisher beschriebenen Mutationen führen aber zu einer fortschreitenden Reduktion der Länge und Verzweigung der Neurite sowohl in Zellkultur, als auch im Nagergehirn. Dies gilt auch für dopaminerge Neurone (MacLeod et al., 2006). Im Gegenzug dazu steht, dass ein Mangel an LRRK-2 zu gesteigerter Länge und Verzweigung der Neurite führt (MacLeod *et al.*, 2006). Sieben der zehn bisher aufgefundenen Mutationen führen zu einer Steigerung der Kinaseaktivität (West et al., 2007). Die Gruppe um Andrew West diskutiert, dass eine Verbindung zwischen der Aktivität und dem pathologischen Mechanismus, welcher zur Neurodegeneration führt, besteht (*gain-of-function*).

Dardarin wird zur Familie der ROCO-Proteine gerechnet (Bosgraaf and van Haastert, 2003), da eine charakteristische Roc- (*Ras in complex proteins*) und eine COR-Domäne (*C-Terminal of Roc*) vorhergesagt wurde. Des weiteren besitzt Dardarin eine leucine-rich repeat Domäne (LRR), eine katalytische Tyrosinkinase-Domäne (TyrKc) und eine WD40-Domäne, die sowohl bei der prä-messengerRNA (mRNA) Prozessierung, als auch bei der Zusammenfügung des Zytoskeletts eine Rolle spielt (Paisan-Ruiz *et al.*, 2004). Die Größe des Proteins und die vielen verschiedenen Domänen deuten auf eine Vielzahl an Funktionen dieses Proteins hin. Die bisher nachgewiesenen Mutationen lassen sich nicht auf eine Domäne fokussieren (Paisan-Ruiz et al., 2005).

1.4.7. PARK9 – ATP13A2 (lysosomale Typ 5 P-Typ ATPase)

In einer nicht-blutsverwandten chilenischen Familie konnte in allen betroffenen Personen mit frühem Ausbruch des Parkinson-Syndroms zwei Mutationen im Gen ATP13A2 identifiziert

werden (Ramirez *et al.*, 2006). Zum einen konnte die Deletion eines Cysteins an Position 3057 in Exon 26 aufgezeigt werden, die zu einer Rasterverschiebung und damit zu einem verfrühten Stop-Codon führt. Die zweite Mutation ist ein intronischer Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Position +5 der *donor splice site* von Exon 13. Diese Mutation führt in dieser hochkonservierten Spleißstelle zu einer vorausberechneten Verringerung der Effizienz von 0,98 auf 0,11.

Das translatierte Protein ist 1.180 Aminosäuren lang und wird ubiquitär, aber am stärksten im Gehirn exprimiert. Während das nicht mutierte Protein im Lysosom lokalisiert wird, wird die verkürzte, instabile und mutierte Variante im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und anschließend vom Proteasom abgebaut (Rao and Bredesen, 2004; Ramirez *et al.*, 2006). Die Gruppe um Christian Kubisch diskutiert zwei Arten des Einflusses dieser Mutation auf die Pathogenese von Morbus Parkinson. Zum einen fehlt die ATPase innerhalb des Lysosoms, was zu einer Dysfunktion der lysosomalen Proteindegeneration führen kann. Ein direkter Einfluss kann nicht beurteilt werden, da bisher keine Substratspezifitäten bzw. Funktionen der verschiedenen Typ 5 P-Typ ATPasen bekannt sind (Axelsen and Palmgren, 1998). Zum anderen verursacht eine verminderte Effizienz dieser ATPase durch Mutation eine Überbeanspruchung des Proteasoms, die wiederum zu toxischen Proteinaggregaten führen kann.

1.4.8. PARK13 – HtrA2/Omi

Eine erste Verbindung von HtrA2/Omi mit neurodegenerativen Erkrankungen war in der Interaktion zwischen diesem Protein und Presenilin-1 begründet (Gray *et al.*, 2000). Mutationen in Presenilin-1 sind für eine erbliche Form der Alzheimer'schen Krankheit verantwortlich. Außerdem interagiert HtrA2/Omi mit den Amyloid β -Plaques. Anfangs wurde diskutiert, ob es sich bei HtrA2/Omi wirklich nur um ein Suszeptibilitätsgen handelt. Aus diesem Grund wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt und in vier Parkinsonpatienten eine neue, heterozygote Gly399Ser Mutation identifiziert. In der gleichen Studie wurde zusätzlich ein neuer Ala141Ser Polymorphismus aufgefunden, der mit der Parkinson'schen Krankheit assoziiert ist (Strauss *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Studie führten dazu, dass dieses Gen nun als PARK13 bezeichnet wird.

HtrA2/Omi besitzt eine PDZ-Domäne, eine Serinprotease-Domäne und ein mitochondriales Lokalisationssignal. Dieses führt zu einer Lokalisation des Proteins zwischen den Mitochondrienmembranen. Zusätzlich besitzt es eine amino-terminale Sequenz, die mit den *Drosophila melanogaster* pro-apoptotischen Proteinen Repear, Grim und Hid verwandt ist. Bei apoptotischen Stimuli wird HtrA2/Omi aus Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt und diese N-

terminale Domäne bindet an „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs) (Suzuki et al., 2001; Hedge and Williams, 2002). Durch weitere Studien wurde gefolgert, dass HtrA2/Omi analog zu Reaper den protektiven Effekt der IAPs (*inhibitor of apoptosis*) aufhebt und den Effekt des parallel aus Mitochondrien freigesetzten Cytochrom C zur Auslösung der Aktivität von Caspasen potenziert (Martins et al., 2002; Wolf and Green, 2002; Van Gurp et al., 2003). Zusätzlich wird auch die eigene Serin-Protease-Aktivität von HtrA2/Omi in Verbindung mit Caspasen-unabhängigem Zelltod gebracht (Suzuki *et al.*, 2001; Hedge *et al.*, 2002). Interessanterweise wurde in dieser Domäne die oben beschriebene Mutation gefunden, die sich in verstärkter Anfälligkeit auf stressinduzierten Zelltod auswirkt (Strauss *et al.*, 2005). Des Weiteren bilden HtrA2/Omi-*knock out* Mäuse parkinsonähnlichen Phänotyp aus (Martins et al., 2004).

1.5. Suszeptibilitätsgene

Im Unterschied zu den PARK-Genen, die über Kopplungsstudien bei familiären Parkinsonerkrankungen gefunden wurden, werden die Suszeptibilitätsgene anhand Ihrer Funktion bzw. Interaktionen mit bekannten, Parkinson assoziierten Proteinen in einem Patientenkollektiv gescreent.

1.5.1. Neurofilament

Das Neurofilament wurde verdächtigt, an der PK beteiligt zu sein, da es sich auf einem Suszeptibilitätslocus auf Chromosom 8p befindet (Scott et al., 2001). Es besteht aus den unterschiedlich schweren Untereinheiten L (*low*), M (*mid*) und H (*heavy*). Zusätzliches Interesse weckte das Auffinden aller Neurofilamentuntereinheiten in LK (Hill et al., 1991). Bisher konnte nur in der M-Untereinheit eine Gly336Ser-Mutation bei einem 22-jährigem AR-JP Patienten aufgefunden werden (Lavedan et al., 2002). Die Funktion der mutierten Neurofilamentuntereinheit wird dadurch aber nicht beeinträchtigt (Perez-Olle et al., 2004). In weiteren Mutationsanalysen konnten zwei weitere Mutationen in dieser Untereinheit aufgefunden werden; die Deletion von Valin an Position 829 und der Aminosäurereposition Pro725Gln. Beide Mutationen liegen in einem Bereich, der stark konserviert innerhalb verschiedener Spezies ist (Krüger et al., 2003). Dennoch stehen hier weitere physiologische Untersuchungen noch aus.

1.5.2. Nurr-1

Nuclear receptor related 1 (Nurr-1), auch als NR4A2-Gen bezeichnet, gehört zur Superfamilie der Kernrezeptoren und ist stark in dopaminergen Zellen der SNpc exprimiert. *Knock-out* Mäuse zeigen einen Verlust von dopaminergen Neuronen, während heterozygote *knock-out* Mäuse verstärkt auf MPTP reagieren (Zetterstrom et al., 1997). Diese Erkenntnisse führten dazu, dass Nurr-1 als Kandidatengene für PK in Frage kommt. Bisher konnten zwei Mutationen (del291Tyr und Tyr24Gly) in diesem Gen in Patienten mit familiärem Parkinson nachgewiesen werden (Le et al., 2003).

1.5.3. Synphilin-1

Synphilin-1 wurde als Interaktor der zwei wichtigen PARK-Gene α -Synuklein und Parkin identifiziert (siehe Abb. 1.10.). Seinen Namen erhielt das Protein durch die Interaktion mit α -Synuklein (Engelender et al., 1999) im Aminosäurebereich von 349 – 555 (Neystat et al., 2002). Durch Phosphorylierung von Synphilin-1 durch die Casein-Kinase II wird diese Interaktion abgeschwächt (Lee et al., 2004). In Zellexperimenten konnte gezeigt werden, dass Co-Expression der beiden Proteine die Aggregatbildung von α -Synuklein fördert (Engelender et al., 1999). In späteren Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass alleinige Überexpression von Synphilin-1 für die Bildung von Proteineinschlüssen in HEK-Zellen ausreicht (O'Farrell et al., 2001). Dies wird noch erleichtert, wenn das Proteasom gehemmt wird (Lee et al., 2002a). Des Weiteren wird es von der E3-Ligase Parkin poly-ubiquitiniert (Chung et al., 2001). Hier wird spekuliert, ob die Phosphorylierung von Synphilin-1 die Ubiquitinierung bzw. die Degeneration des Proteins einleitet (Chung et al., 2001; Lee et al., 2002a). Synphilin-1 ist außerdem Substrat von drei weiteren *RING-finger* E3-Ligasen (siehe Abb. 1.10. – Bereich der Interaktion mit SIAH-2 ist noch nicht bekannt): Dorfin (Ito et al., 2003), SIAH-1 und SIAH-2 (Liani et al., 2004). Die funktionelle Ähnlichkeit dieser E3-Ligasen suggeriert physiologische Redundanz und mehrere Stoffwechselwege, welche den Synphilin-1 Abbau betreffen (Lim et al., 2005). Eine direkte Verbindung zwischen dem Proteasom und Synphilin-1 zeigt die Interaktion zwischen der S6 ATPase, eine regulierende Untereinheit des 19S Proteasoms, auf (Krüger et al., 2003).

Interessanterweise sind neben Synphilin-1 (Wakabayashi et al., 2002) auch SIAH-1 (Liani et al., 2004) und Dorfin (Ito et al., 2003) in LK nachweisbar. NUB1, ein Herabregulator des Ubiquitin-ähnlichen Proteins NEDD8, interagiert über diese Bindungsstelle mit Synphilin-1 und führt es zum Proteasom. Die Überexpression beider Proteine unterdrückt die Bildung von Synphilin-1 positiven Proteinaggregaten in Zellkultur (Tanji et al., 2006).

Bisher konnte die Mutation Arg621Cys in Synphilin-1 (siehe Abb. 1.10.) bei zwei sporadischen Parkinsonpatienten nachgewiesen werden (Marx et al., 2003). Diese führt einerseits zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Stress, andererseits zu einer verminderten LK-Bildung, so dass vermutet wird, dass die Proteinaggregate eine protektive Wirkung auf die Zelle haben könnte (Marx *et al.*, 2003; Tanaka et al., 2004).

Das 919 Aminosäure lange Protein Synphilin-1 enthält sechs Ankyrin-like Domänen, eine coiled-coil Domäne und ein ATP/GTP-Bindungsmotiv. Synphilin-1 wird vorwiegend neuronal exprimiert und reichert sich während der Entwicklung in präsynaptischen Nervenendigungen an (Ribeiro *et al.*, 2002). Während dieser Umverteilung scheint eine posttranslationale

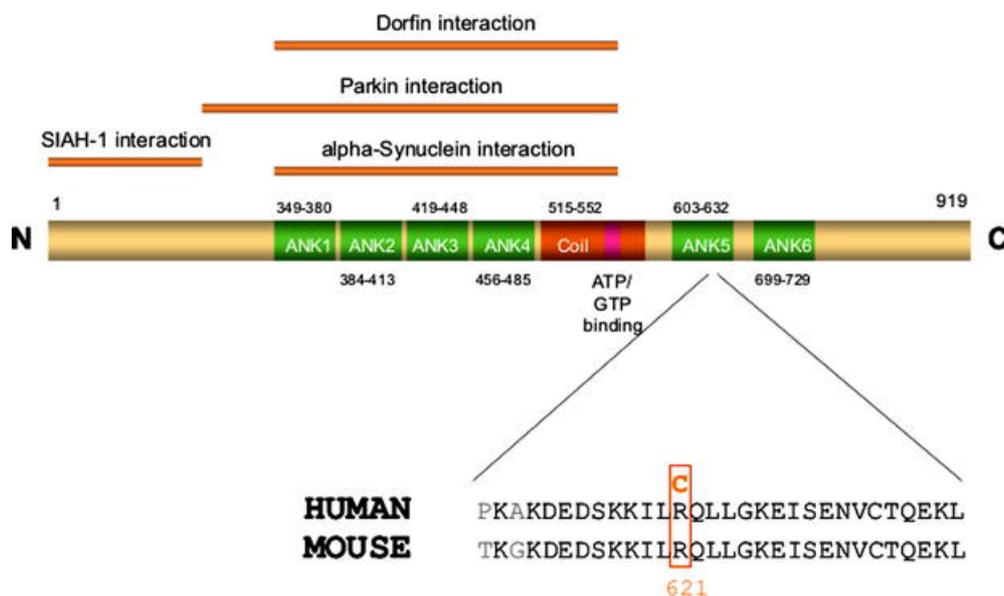


Abb. 1.10.: Schematische Darstellung von Synphilin-1. Die für die Interaktion mit α -Synuklein und den unterschiedlichen E3-Ligasen benötigten Bereiche sind mit roten Balken markiert. Außerdem ist die konservierte homologe Sequenz zwischen Maus und Mensch aufgezeigt, in der der Aminosäureaustausch nachgewiesen wurde (Krüger, 2004).

Modifikation aufzutreten, da sich die molekulare Masse von 115-140 kDa auf 80-90 kDa reduziert (Ribeiro *et al.*, 2002). Trotz aller bisherigen Untersuchungen ist die physiologische Funktion von Synphilin-1 nach wie vor kaum bekannt. Als eine Funktion wird vermutet, dass es die synaptischen Aufgaben von α -Synuklein reguliert, in dem es α -Synuklein mit Membranen von Vesikeln verbindet. Synphilin-1 könnte auch eine schützende, anti-apoptotische Funktion innehaben, die durch ein C-terminales Fragment reguliert wird, welches mittels Proteolyse der Caspase-3 reguliert wird (Giaime et al., 2006). Neben der Casein-Kinase II wird Synphilin-1 auch durch die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) hauptsächlich an der Aminosäure Ser556 phosphoryliert (Avraham et al., 2005). Kann die Phosphorylierung an dieser Stelle durch Punktmutation (Ser556Ala) nicht mehr stattfinden, werden mehr Proteinag-

gregate in der Zelle gebildet. Außerdem ist diese Mutation effizienter bei der Inhibition des Proteasoms. Dies wirft die Frage auf, ob der Grad der Phosphorylierung von Synphilin-1 die Funktion des Proteasom reguliert (Avraham *et al.*, 2005).

Erst kürzlich wurde eine Isoform von Synphilin-1 gefunden: Synphilin-1A (Eyal *et al.*, 2006). Synphilin-1A ist eine alternative Spleißvariante von Synphilin-1 dem die Exone 3 und 4 fehlen, dafür besitzt es ein bisher nichtidentifiziertes Exon 9A des SNCAIP-Gens (*α-Synuclein interacting protein*). Zusätzlich unterscheiden sie sich durch unterschiedliche Start-Codons und dem Anfangsleseraster. Beide Proteine interagieren mit α -Synuklein. Synphilin-1A führt im Gegensatz zu Synphilin-1 in verschiedenen Zellkulturen auch ohne Proteasomhemmung zur Aggregatbildung. Die Forschergruppe um Simone Engelender erklärt dies, dass die Ankyrin-like Domänen von Synphilin-1 durch die 350 Aminosäuren des N-Terminus maskiert werden könnten. Außerdem interagieren die beiden Isoformen über die Ankyrin-like Domänen miteinander und können so co-aggregieren, was zur Vermutung veranlasst, dass die Freilegung der Ankyrin-like Domänen von Synphilin-1 entscheidend für die Aggregatbildung ist. Die wichtigste Entdeckung von Synphilin-1A ist jedoch dessen Neurotoxizität, die auf einen direkten Einfluss auf den Zelltod schließen lässt.

1.6. Tiermodelle

1.6.1. Allgemeine Tiermodelle in der Parkinson-Forschung

Tiermodelle sind eine sehr wichtige Vorgehensweisen, um die Mechanismen menschlicher Erkrankungen zu studieren. Viele dieser Krankheiten entstehen nicht spontan in Tieren. Deshalb werden Modelle generiert, die die charakteristischen funktionellen Veränderungen nachahmen. Dazu dienen toxische Reagenzien, Überexpression von transgenen, humanen Proteinen oder das Abschalten von endogenen Proteinen in z. B. *knock-out* Mäusen. Solche Tiermodelle dienen nicht nur dem Verständnis von Krankheiten, sondern werden auch in der Erforschung neuer Therapieansätze verwendet. Mausmodelle sind dafür besonders geeignet, da sie nur eine kurze Lebensspanne von bis zu 30 Monaten besitzen (Harman, 2001), leicht zu handhaben sind und dem Menschen genomisch sehr nahe stehen.

Die ersten zwei Parkinson-Modelle bestanden in der Injektion von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) in bestimmte Areale von Rattengehirnen (Ungerstedt, 1971). Die Injektion von 6-OHDA in die SNpc führte zu einem Verlust an dopaminergen Neuronen, der das langsame Voranschreiten der PK nachahmte.

In weiteren Tiermodellen wurde das Toxin MPTP verwendet. Wie schon unter 1.2. beschrieben verursacht die Gabe von MPTP bei Menschen irreversible und schwere Symptome der

PK. Die Wirkung bei Affen ist dieselbe wie bei Menschen und deshalb kann die Injektion von MPTP in Gehirne von Primaten als sehr exaktes Modell für die Entstehung der PK verwendet werden (Burns et al., 1983). Außerdem wurde MPTP in vielen weiteren, unterschiedlichen Tiermodellen verwendet, um die biochemischen Mechanismen der PK aufzuklären (Przedborski and Jackson-Lewis, 1998). Während Ratten durch die Injektion von MPTP keine Parkinson-ähnlichen Symptome aufzeigen (Boyce et al., 1984), ist dies bei Mäusen der Fall. Mäuse reagieren im Allgemeinen aber weniger stark auf die Gabe von MPTP als Primaten, wobei sich herauskristallisiert hat, dass die Mauslinie C57/Bl6 am empfindlichsten auf das Toxin reagiert (Sedelis et al., 2000).

1.6.2. Transgene Tiermodelle

Transgene Mausmodelle helfen bei der Charakterisierung der entsprechenden Proteine. Dazu wird die kodierende Sequenz des zu untersuchenden Proteins und ein entsprechender Promotor in das Genom eingefügt, so wird eine permanente Expression garantiert. Bei transgenen Tieren muss jedoch bedacht werden, dass Komplikationen zwischen dem transgenen und dem endogenem Protein auftauchen können. So konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass äquimolare Mengen an murinem und humanem α -Synuklein die Fibrillenbildung verlangsamen (Rochet et al., 2000). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass endogenes α -Synuklein eine protektive Funktion auf transgenes mutiertes Ala53Thr innehat, wenn man dies mit transgenen Mäusen vergleicht, deren endogenes α -Synuklein ausgeschaltet wurde (Cabin et al., 2005).

1.6.2.1. Mausmodelle für α -Synuklein

Die ersten Mausmodelle, die die Funktion von α -Synuklein klären sollen, wurden nach der Erkenntnis der Beteiligung von α -Synuklein an der Pathogenese von MP (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998) generiert. Abeliovich und Kollegen generierten ein α -Synuklein *knock-out* Mausmodell, in dem sie Exon 1 und 2 deletierten (Abeliovich *et al.*, 2000). Dadurch sollte die Auswirkungen des Funktionsverlusts von α -Synuklein untersucht werden. Dabei konnte eine reduzierte DA-Konzentration im Striatum werden. Bei einem weiteren *knock-out* Modell, dem Exon 4 und 5 entfernt wurde, wurde der Vorrat an synaptischen Vesikeln im Hippocampus verringert, während kein signifikanter Einfluss auf den Dopaminspiegel im Striatum feststellbar war (Cabin et al., 2002). Dieses Modell bestätigt *in-vivo* die Funktion von α -Synuklein als Feinregulator in der Verformbarkeit von Synapsen und für die Aufrechterhaltung von Vesikeln. In einer Subpopulation der Mauslinie C57Bl/6J wurde der Ge-

nomabschnitt auf dem sich das SNCA-Gen befindet spontan deletiert. Analog zu den *knock-out* Mäusen waren diese phänomenologisch unauffällig und es konnte auch keine kompensatorische Hochregulierung von β - oder γ -Synuklein identifiziert werden (Specht and Schoepfer, 2001).

Neben den *knock-out* Mausmodellen wurden auch transgene α -Synuklein Mäuse generiert. Bei Überexpression von WT- α -Synuklein wurde nicht mehr die normale Verteilung des Proteins in Axonen bzw. an Synapsen von Neuronen nachgewiesen, sondern im Zellkörper (Kahle et al., 2000). Des Weiteren wurden in überexprimierenden Mausmodellen nicht-faserige α -Synuklein-Aggregate gefunden (van der Putten et al., 2000;Kahle et al., 2001), eine Verringerung der Anzahl von dopaminergem Nervenenden im Striatum und motorische Auffälligkeiten (van der Putten *et al.*, 2000;Fleming et al., 2004).

In transgenen Mäusen, die mutiertes Ala30Pro- α -Synuklein exprimieren, konnte das Protein auch im Zellkörper nachgewiesen werden, während diesmal keine faserige Aggregate vorhanden waren (Kahle *et al.*, 2000). Dennoch konnte gezeigt werden, dass dieses mutierte α -Synuklein im Mausmodell auch zu den Synapsen transportiert wird (Kahle *et al.*, 2001). Dies steht im Gegensatz zu davor erhaltenen *in-vitro* Ergebnissen (Jensen et al., 1998). Die Mutation Ala53Thr hat im Mausmodell den größten toxischen Effekt (Kahle *et al.*, 2000;Lee et al., 2002b). Auch hier konnte das mutierte α -Synuklein im Zellkörper der Neuronen und schwere, fortschreitende motorische Auffälligkeiten nachgewiesen werden (van der Putten *et al.*, 2000;Lee *et al.*, 2002b). Zusätzlich führt dieses Transgen sowohl zu nicht- als auch zu faserigen Proteinaggregaten, die α -Synuklein und Ubiquitin enthalten (van der Putten *et al.*, 2000;Giasson et al., 2002). Des Weiteren wurden mitochondriale DNA Beschädigungen und eine Verringerung der Aktivität des Komplex IV der Atmungskette beobachtet (Martin et al., 2006).

Interessant ist, dass Mausmodelle, die beide Mutationen enthalten, nicht den pathologischen oder motorischen Phänotyp im Vergleich zu den Mäusen mit nur einer Mutation verschlimmern (Richfield et al., 2002).

Die Triplikation bzw. Duplikation von α -Synuklein führt zu Morbus Parkinson (Singleton *et al.*, 2003;Chartier-Harlin et al., 2004;Ibanez et al., 2004) und aus diesem Grund geht man davon aus, dass der Expressionslevel Einfluss auf die Pathogenese von Morbus Parkinson hat (Eriksen et al., 2005). Dies stimmt damit überein, dass die Mausmodelle mit den höchsten Expressionsraten auch die stärksten Phänotypen aufweisen. Zusätzlich schränken die Mutationen Ala53Thr und Ala30Pro den lysosomalen Abbau von α -Synuklein ein (Cuervo et al., 2004). Dies führt auch zu einer erhöhten Proteinkonzentration im Zytosol.

Auch der Einfluss von unterschiedlichen Promotoren auf die Pathogenese von MP wurde untersucht (Maskri et al., 2004). Die Gruppe verglich das Expressionsschema von drei verschiedenen Promotoren: β -Actin- aus Huhn, muriner Tyrosinhydroxylase- und muriner Prionenprotein-Promotor. Dabei führten alle drei Promotoren zu einer Expression von α -Synuklein im Gehirn. Bei Verwendung des murinen Prionenprotein-Promotors konnte die höchste Expression im Gehirn nachgewiesen werden (Maskri *et al.*, 2004).

1.6.2.2. Mausmodelle für Parkin

Außer den vielen α -Synuklein Mausmodellen wurden auch mit weiteren Parkinson-relevanten Proteinen Mausmodelle generiert. Da nicht funktionsfähiges Parkin für fast 50 % der familiären und 20 % der sporadischen frühen Form von Parkinson verantwortlich ist (Lücking *et al.*, 2000), wurden zum Verständnis der Funktion auch Parkin *knock-out* Mäuse generiert. Dazu wurde entweder Exon 3 (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003), Exon 7 (von Coelln et al., 2004) oder Exon 2 (Perez and Palmiter, 2005) des Parkin-Gens deletiert.

Goldberg und seine Kollegen konnten bei Ihrem Mausmodell keine Veränderung der dopaminergen Neuronen in der SNpc oder der gesamten Gehirnmorphologie festgestellt werden. Dennoch weisen diese Mäuse Defizite beim Überqueren eines Stabes (siehe *beam-walking* Experiment – 2.2.4.10.) auf, die sie auf Dysfunktionen in der Verbindung zwischen der SNpc und dem Striatum (siehe Abb. 1.2. – *nigrostriatal pathway*) zurückführen (Goldberg *et al.*, 2003). Deletion von Exon 7 führt zu einem Verlust von Tyrosinhydroxylase-haltigen Neuronen im *Locus Coeruleus* und Degeneration in dieser Gehirnregion stellt ein Merkmal von MP dar (von Coelln *et al.*, 2004). Dieser entsteht wahrscheinlich während der Entwicklung. Genauso wie im Modell von Goldberg und Kollegen konnte aber kein Verlust von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* nachgewiesen werden. Auch die sonstigen Phänotypen stimmen recht gut miteinander über ein.

Ein weiteres Parkin *knock-out* Modell, in dem Exon 2 deletiert wurde, um so dessen Enzymfunktion auszuschalten, zeigt hingegen in groß angelegten Verhaltensstudien keinerlei Unterschiede zu nicht behandelten Mäusen (Perez *et al.*, 2005). Es ist deshalb schwer zu beurteilen, ob Parkin *knock-out* Mäuse ein hilfreiches Mausmodell zum Verständnis zur Entstehung der PK darstellen.

1.6.2.3. Mausmodelle ohne DJ-1

Zur Charakterisierung von DJ-1 wurden bis jetzt drei publizierte *knock-out* Modelle generiert. Dazu wurde Exon 2 (Goldberg *et al.*, 2005) bzw. Exon 1 – 5 (Chen et al., 2005) deletiert oder

ein vorzeitiges Stop-Codon in Exon 1 eingeführt (Kim et al., 2005b). Auch diese Mauslinien weisen keinen Verlust von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* auf. Die deletierten DJ-1 Mäuse weisen schwache Verhaltensdefizite auf, erhöhte Wiederaufnahme von Dopamin im Striatum und einen gesteigerten Dopaminlevel (Goldberg et al., 2005; Chen et al., 2005). Primäre kortikale Neuronen aus mutierten DJ-1 Mäusen reagierten *in-vitro* sensitiver auf oxidativen Stress (Kim et al., 2005b).

1.6.2.4. Weitere Mausmodelle

Mäuse, denen das Gen für Nurr1 (Zetterstrom et al., 1996) bzw. die Tyrosinhydroxylase (Zhou et al., 1995) fehlt oder ein Defizit in der Produktion von Dopamin besitzen (Zhou and Palmiter, 1995) sterben im späten embryonalen Entwicklungsstadium oder kurz nach der Geburt. Diese Mausmodelle zeigen auf, dass Dopamin für eine erfolgreiche embryonale Entwicklung essentiell ist.

1.7. Zusammenfassung

Wenn man die bisher durch Mutationsstudien bekannten Proteine zusammenfasst, so lässt sich erkennen, dass es zwei Möglichkeiten gibt, die zum Absterben der Neuronen in der *Substantia Nigra* führen. Mitochondrien können als Organellen beschrieben werden, die als Aufbewahrungsbecken für eine Vielzahl von pro-apoptischen Proteinen dienen (Gulbins et al., 2003). Eine Dysfunktion der Mitochondrien kann zu deren Freisetzung führen. Ein weiterer Ansatzpunkt innerhalb der Mitochondrien stellt der oxidative Stress, ausgelöst u. a. von der Atmungskette, dar. Besonders der Komplex I (*NADH-ubiquinone oxidoreductase*) und Komplex III (ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase) sind verantwortlich für die Bildung von Superoxiden oder freien Radikalen (Raha and Robinson, 2001). Nicht nur reaktive Sauerstoffspezies beeinflussen die Entstehung der PK, sondern auch Inhibitoren des Komplexes I wie z. B. das Pestizid Rotenon oder das Toxin MPP⁺. Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der Mitochondrien kann durch das Auffinden des Mitochondrien-assoziierten Proteins HtrA2/Omi und deren Mutationen gezeigt werden (Gray et al., 2000).

Proteindegeneration scheint ein wichtiger Schutzmechanismus gegen toxische Proteine zu sein, deren Anhäufung normale Zellfunktionen und -überlebensfähigkeit beeinträchtigen können. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist eine Möglichkeit der Zelle, beschädigte Proteine zu markieren und anschließend abzubauen. Ein partieller oder kompletter Verlust der Funktion des UPS kann verantwortlich für die Bildung von Proteinaggregaten sein (siehe Abb. 1.11.). Aber auch Proteinaggregate, in der PK Lewy Körperchen genannt, an sich können das UPS beeinträchtigen. Direkte Beteiligung an diesem Stoffwechsel haben zwei PARK-Gene: Parkin und UCH-L1. Mutiertes Parkin kann seine Substrate nicht mehr erkennen und folglich werden diese nicht mehr dem Proteasom zugeführt. Eine Mutation in UCH-L1 führt dazu, dass weniger freies Ub zur Verfügung steht. Viele Proteine der PARK-Gene konnten in LK nachgewiesen werden. Nachdem der UPS in der Pathogenese in der erblichen Form von Parkinson impliziert zu sein scheint, sollte vermutet werden, dass dieser Einfluss auch in der sporadischen Form auftritt. Tatsächlich konnte in post-mortem Gewebe von Patienten Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität und reduzierte Expression von Untereinheiten des Proteasoms in der SNpc nachgewiesen werden (McNaught et al., 2003). Es ist aber bis jetzt nicht eindeutig, ob Beeinträchtigungen im UPS primäre oder sekundäre Ursache des Absterbens der Neuronen ist.

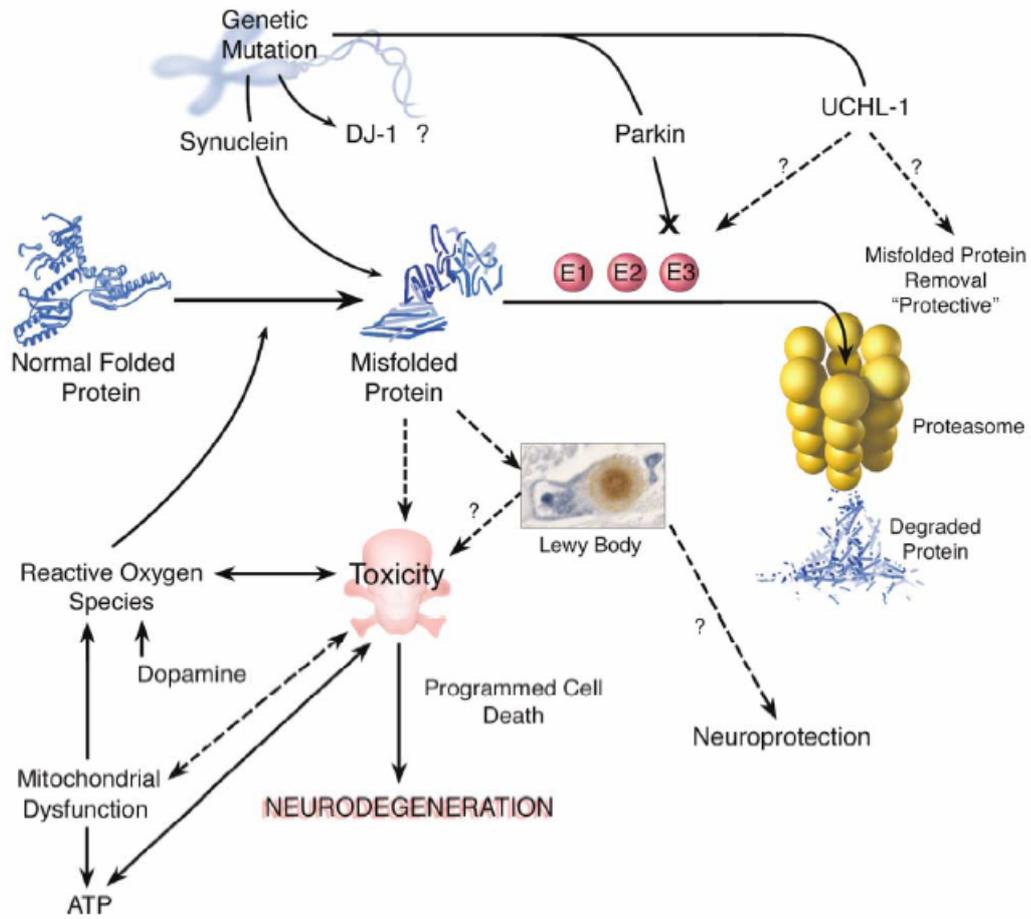


Abb. 1.11.: Zusammenfassung der möglichen Wege zur Neurodegeneration. Sowohl das UPS als auch mitochondriale Dysfunktionen sind mit ihren Auswirkungen und ihrem gegenseitigem Einfluss dargestellt. Durch die Verwendung der vielen Fragezeichen wird ersichtlich, dass noch viele Fragen bisher unbeantwortet sind (Dauer *et al.*, 2003).

1.8. Zielsetzung der Dissertation

Eines der Schlüsselproteine in der aktuellen Parkinsonforschung ist Synphilin-1. So wurde es in Lewy Körpern nachgewiesen (Wakabayashi *et al.*, 2002). Ein Interaktionspartner von Synphilin-1 ist α -Synuklein, in dem die erste Mutation nachgewiesen werden konnte und somit der Beweis gelang, dass Parkinson in einer vererbaren Form vorliegen kann ((Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998). Synphilin-1 fördert in Zellkultur die Aggregatbildung von α -Synuklein. Ein weiterer Interaktionspartner ist die E3-Ligase Parkin. Mutationen in Parkin sind für einen Großteil der familiären und sporadischen Form der PK verantwortlich (Lücking *et al.*, 2000). Im Synphilin-1 Gen selbst konnte in zwei sporadischen Parkinsonpatienten eine Mutation nachgewiesen werden (Marx *et al.*, 2003). Dennoch ist die Aufgabe dieses Proteins weitgehend unbekannt. Auch die Mutation Arg621Cys ist bisher noch wenig charakterisiert.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Generierung eines Tiermodells, welches sowohl die Wildtyp, als auch die mutierte Form von humanem Synphilin-1 exprimiert. Diese Modelle sollen dazu beitragen, die Aufgabe des Proteins *in vivo* zu charakterisieren. Zusätzlich kann durch Kreuzung mit weiteren transgenen Mäusen, die andere in der Pathogenese von Parkinson involvierte Proteine exprimieren, das Zusammenspiel dieser verstanden werden.

Ein weiterer Weg im Verständnis von Synphilin-1 besteht im Auffinden neuer Interaktionspartner durch ein Hefe Zwei-Hybrid-Screening. Das Auffinden neuer Interaktionspartner hilft die Funktion des Proteins Synphilin-1 über interagierende Proteine zu beschreiben und dadurch in den molekularen Mechanismus der Pathogenese einordnen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

AgaroseGE:	kleine Kammer: Model 40-0708	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
	große Kammer: Model 40-1214	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
	Consort Electrophoresis Power Supply E385	Sigma-Aldrich, München
	Mikrowelle	LG, Willich
	Biostep Systems für Dokumentation	Biostep, Jahnsdorf
	Argus X1-Software, um die Digitalkamera	Olympus Camedia zu steuern
Autoklav:	5075 ELV	Tutthauer Systec, Wettenburg
Brutschrank:	Artikelnr.: 9010-0089 BD240	Binder, Tuttlingen
dHPLC:	WAVE	Transgenomic, Crewe; UK
Eismaschine:		Ziegra Eismaschine, Isernhagen
ELISA-Reader:	Synergy HAT	Bio-TEK, Bad Friedrichshall
Magnetrührer:	MR3000	Herdolph – neoLab, Heidelberg
	MR3002 (mit Heizplatte)	Herdolph – neoLab, Heidelberg
Mikroskop:	Axioplan 2 imaging	Zeiss
	Objektive: Plan-Neofluar (2,5x; 10x; 20x)	Zeiss
	Plan-Apochromat Oil (100 x)	Zeiss
	Immersionsöl: Immersol [®] 518N	Zeiss
	Digitalkamera: AxioCam MRc	Zeiss
PCR-Cycler:	PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research – BioRad, München
	GeneAmp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems; Darmstadt
pH-Meter:	MP230	Mettler Toledo, Giessen
Photometer:	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
	Ultrospec [®] 3100 pro – (UV/Vis)	Amersham Bioscience, Freiburg
Pipetten:	Eppendorf Research 1000, 100, 10	Eppendorf, Hamburg
	Mehrkanalpipette Research pro 5-100 µL	Eppendorf, Hamburg
	Multipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg

	accu-jet [®]	Brand, Wertheim
	5 mL, 10 mL, 25 mL (steril)	Costar,
Schüttler:	Multitron HAT	Infors AG, Bottmingen; CH
	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
SDS-PAGE:	Mini-PROTEAN [®] 3 Cell	BioRad, München
	PowerPac Basic [™] (Spannungsgerät)	BioRad, München
Waagen:	XT 6200C-FR	Precisa, Dietikon; CH
	XB 620 M	Precisa, Dietikon; CH
	404A	Precisa, Dietikon; CH
Wasseraufbereitung:	Quantum [™] EX 06196	Millipore, Schwalbach
	Q-Guard O3 (Reinigungs-Kartusche)	Millipore, Schwalbach
Wasserbad:	GFL [®] 1083	GFL, Großburgwedel
Western-Blot:	Model BB100	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Zentrifugen:	Centrifuge 5471c	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5415R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5804 und 5804R	Eppendorf, Hamburg
	Concentrator 5301 (Vakuumzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Puffer

2.1.2.4. Proteinextraktion aus Mäusegewebe

TES:	50 mM Trizma [®] base (Sigma-Aldrich, München)
	2 mM EDTA
	100 mM NaCl (Merck, Darmstadt)
TES-complete [®]	TES + Zugabe von 40 µL complete [®] -Lösung/1 mL TES
complete [®] -Lösung	eine <i>protease inhibitor cocktail tablets</i> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 2 mL H ₂ O _{bidest.} lösen
TNES-complete [®]	TES-complete [®] + Zugabe von 100 µL IGEPAL (NP-40) (Sigma-Aldrich, München) je mL TES-complete [®]

2.1.2.6. PAGE und Westernblotting

PAGE-Laufpuffer:	1 % (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe)
	192 mM Glycin (Merck, Darmstadt)

2. Material und Methoden

	25 mM Trizma [®] base (Sigma-Aldrich, München)
Laemmli-Puffer:	2 % (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe)
(Ladepuffer)	5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München)
	1 % (v/v) Glycerin
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau
	in 62,5 mM Trizma [®] base (Sigma-Aldrich, München) pH 6,8
Transferpuffer:	192 mM Glycin (Merck, Darmstadt)
	25 mM Trizma [®] base (Sigma-Aldrich, München)
	10 % (w/v) Methanol (Merck, Darmstadt)
	0,005 % (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe)
TBS:	10 mM Trizma [®] base (Sigma-Aldrich, München) pH 7,5
	150 mM NaCl (Merck, Darmstadt)
TBST:	TBS + Zugabe von 0,1 % (v/v) Tween20 [®] (Merck, Darmstadt)
<i>stripping</i> -Puffer	25 mM Glycin (Merck, Darmstadt)
	1 % (w/v) SDS (Roth, Karlsruhe)
	pH-Wert mit Salzsäure (VWR, Darmstadt) auf 2,0 einstellen

2.1.2.5. Agarose-Gel

TBE:	100 mM Trizma [®] base (Sigma-Aldrich, München)
	100 mM Borsäure
	20 mM EDTA; pH 8,0
Ladepuffer:	8 % (v/v) Ficoll Typ 400 (Sigma-Aldrich, München)
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau
	in TBE

2.1.2.4. Allgemeine Puffer

Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O
(Y2H)	40 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
	10 mM KCl
	1 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O
Z-Puffer <i>complete</i>	3 mL Z-Puffer
(Y2H)	30 μ L 100 mg/mL X-Gal (Roth, Karlsruhe)
	8,1 μ L β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)

Elutionspuffer	9 Teile 75 mM Na ₃ PO ₄
(HPLC)	1 Teil Methanol
	275 mg/L Oktan-Sulfonsäure

2.1.3. Medien

2.1.3.1. Zellkultur

D-MEM-Medium + 4.500 ^g /L Glucose GlutaMAX TM I ØPyrovate	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS) (Hitzeinaktiviert: 1h bei 56°C)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicilin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Medium für SHSY-Zellen (15 % FCS):	500 mL D-MEM-Medium 90 mL FCS 6 mL Penicilin/Streptomycin 7,9 mL Geneticin
Medium für HEK-Zellen (10 % FCS):	500 mL D-MEM-Medium 56,5 mL FCS 5,5 mL Penicilin/Streptomycin 7,9 mL Geneticin

2.1.3.2. Bakterienkultur

2.1.3.2.1. LB-Medium

10 g NaCl

5 g Bacto-Yeast Extract (BD Bioscience, Clonotech, Heidelberg)

10 g Bacto-Penton (BD Bioscience, Clonotech, Heidelberg)

- in 1 L H₂O_{bidest.} lösen und mit Natronlauge (NaOH) den pH-Wert auf 7,4 einstellen, danach autoklavieren

2.1.3.2.2. LB-Agarplatten

2. Material und Methoden

zu fertigem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g Bacto-Agar (BD Bioscience, Clonotech, Heidelberg) hinzugeben

2.1.3.2.3. Selektionsmarker

Nach dem Autoklavieren der Medien bzw. der Agarplatten (bei 121°C und 2 bar für 20 Min.) wurden Selektionsmarker steril bei einer Temperatur unter 60 °C zugegeben. Konzentration der Stammlösung von Ampicillin: 100 mg/mL. Der Verdünnungsfaktor für LB-Agarplatten betrug 1:500 und in Flüssigkultur wurde diese 1:1.000 verdünnt.

Konzentration der Stammlösung von Kanamycin: 100 mg/mL. Der Verdünnungsfaktor für LB-Agarplatten betrug 1:1.000 und in Flüssigkultur wurde diese 1:4.000 verdünnt.

2.1.3.3. Hefekultur

2.1.3.3.1. YPD-Medium

10 g Bacto-Yeast Extract (BD Bioscience, Clonotech, Heidelberg)

20 g Bacto-penton (BD Bioscience, Clonotech, Heidelberg)

20 g D-Glucose (Roth, Karlsruhe)

- in 1 L H₂O_{bidest.} lösen und mit Natronlauge (NaOH) den pH-Wert auf 5,8 einstellen, danach autoklavieren

2.1.3.3.2. YPD-Agarplatte

zu fertigem YPD-Medium vor dem Autoklavieren 20 g Bacto-Agar hinzugeben

2.1.3.3.3. Synthetic Complete (SC)(-Leu, -His)-Agarplatte

Aminosäure-Mix:

0,6 g Adeninsulfat (Roth, Karlsruhe)

0,6 g Argenin (Arg – R) (Roth, Karlsruhe)

0,9 g Isoleucin (Ile – I) (Roth, Karlsruhe)

0,9 g Lysin (Lys – K) (Roth, Karlsruhe)

1,5 g Phenylalanin (Phe – F) (Roth, Karlsruhe)

3,0 g Glutamin (Glu – E) (Roth, Karlsruhe)

3,0 g Asparaginsäure (Asp – D) (Roth, Karlsruhe)

4,5 g Valin (Val – V) (Roth, Karlsruhe)

6,0 g Threonin (Thr – T) (Roth, Karlsruhe)

11,25 g Serin (Ser – S) (Roth, Karlsruhe)

- in 800 mL H₂O_{bidest.} lösen und Zugabe von steriler Tyrosin-(Tyr – Y)-Lösung (Roth, Karlsruhe) (0,9 g in 200 mL)

10x Yeast Nitrogen Base (YNB)

16,6 g Yeast nitrogen base (ohne Aminosäure und Ammoniumsulfat) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)

50,0 g Ammoniumsulfat (Roth, Karlsruhe)

- in 1 L H₂O_{bidest.} lösen und steril filtrieren; Aufbewahrung bei 4 °C und im Dunkeln

SC(-Leu, -His)-Agarplatte:

20 g D-Glucose (Roth, Karlsruhe)

20 g bacto-agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)

0,03 g Tyrosin (Roth, Karlsruhe)

- in 842,1 mL H₂O_{bidest.} lösen und autoklavieren

33 mL Aminosäure-Mix

100 mL 10x yeast nitrogene base

8,3 mL von folgenden Aminosäuren-Lösungen: 2,4 mg/mL Methionin (Met – M)
(Roth, Karlsruhe)

2,4 mg/mL Histidin (His – H)
(Roth, Karlsruhe)

2,4 mg/mL Uracil (Roth, Karlsruhe)

2.1.3.3.4. Synthetic Complete (SC) Flüssig-Medium

10 g Galaktose

11,5 mL 87 %iges Glycerin

10 mL 100 %iger Ethanol

50 mL 10x Yeast Nitrogene Base

16,5 mL Aminosäure-Mix

4,2 mL 2,4 mg/ mL Methionin-Lösung

4,2 mL 2,4 mg/mL Histidin-Lösung

4,2 mL 2,4 mg/mL Uracil-Lösung

- in 400,9 mL H₂O_{bidest.} lösen und steril filtrieren

2.1.4. verwendete Antikörper

2.1.4.1. polyklonale Antikörper:

gegen Synphilin-1 α Synphilin-1 1007 – Epitop: 83-99; freundliche Überlassung von Dr. Simone Engelender, The B. Rappaport Faculty of Medicine, Haifa, Israel
S6071 – Sigma-Aldrich, München

2.1.4.2. monoklonale Antikörper:

gegen SP1	Delta Biolabs, Vandell Way Campbell, USA
gegen PTEN	Delta Biolabs, Vandell Way Campbell, USA
gegen XIAP	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
gegen ROCK1	Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA
gegen Neurofilament (phosphoryliert)	Dako, DK
gegen β -Actin	Sigma-Aldrich, München
gegen α -Tubulin	Chemicon International Inc., USA

2.1.4.3. sekundäre Antikörper (Peroxidasemarkiert)

gegen Kaninchen	Amersham, GE Healthcare Life Science, Freiburg
gegen Maus	Amersham, GE Healthcare Life Science, Freiburg
gegen Ziege	Amersham, GE Healthcare Life Science, Freiburg

2.1.4.4. sekundäre Antikörper (Biotinyliert)

gegen Kaninchen	Vector Laboratories, UK
gegen Maus	Vector Laboratories, UK

2.1.5. verwendete Kits

Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Endonukleasenverdau:

QIAquick[®] PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden)

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen:

QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden)

Gewinnung von DNA aus Ohrstanzgewebe zur Mausgenotypisierung:

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Präparation von Plasmiden aus Bakterienkulturen:

QIAFilter[®] Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden)

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim)

2.2. Methoden

2.2.1. Allg. molekularbiologischen Methoden:

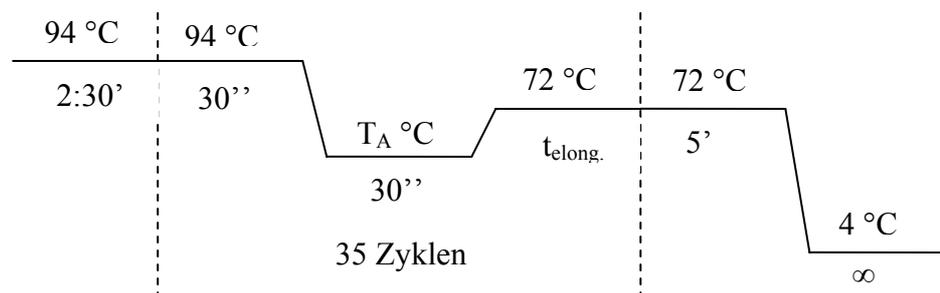
2.2.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde die PCR benutzt. Für analytische Zwecke diente die GeneCraft Taq-Polymerase (GeneCraft GmbH, Lüdinghausen), wohingegen zur Klonierung die *proofreading* Polymerase Pwo von PeqLab verwendet wurde.

Reaktionsansatz:

Primer 10 pmol/ μL	je 1,0 μL	je 1,0 μL
10x PCR-Puffer	2,5 μL	2,5 μL
Taq-Polymerase	0,3 μL	
Pwo-Polymerase		0,5 μL
dNTPs 10 mM	0,5 μL	0,5 μL
H ₂ O _{bidest.} (Ampuwa injection water)	18,7 μL	18,5 μL
cDNA, Vektor, ...	1,0 μL	1,0 μL
	Σ 25,0 μL	Σ 25,0 μL

Temperaturprofil:



Die Anlagerungstemperatur (T_A °C) der Primer ist von deren Sequenz während die Elongationszeit ($t_{\text{elong.}}$) von der Amplikonlänge und der verwendete Polymerase abhängig ist.

2.2.1.2. Sequenzieren

Die Sequenzierung erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Sanger (Sanger et al., 1980). Aufgereinigte PCR-Produkte wurden nach dem beigelegtem Protokoll des CEQ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Krefeld) mit einem CEQTM8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Krefeld) sequenziert. Vektoren wurden vor Zugabe des Start Kits für 3 Min. bei 95 °C denaturiert. Zusätzlich wurden 4µL 5x Q-Solution (QIAGEN, Hilden) zugegeben. Die verwendeten Primer sind komplementär zu den sequenzierten Fragmentabschnitten. Die gebildeten DNA-Fragmente denaturierten vor der Auftrennung in der 50 °C warmen Kapillare für 2 Min. bei 90 °C. Die Injektion fand bei 2 kV für 15 Sekunden statt und die Trennung betrug bei PCR-Produkten 85 Min. und bei Plasmiden 105 Min. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mittels der CEQ8000 Analysesoftware (Beckman Coulter, Krefeld).

2.2.1.3. DNA-Konzentrationsbestimmung:

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde an einem Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Das Gerät berechnet anhand der OD bei 260 nm und dem Verdünnungsfaktor die Konzentration der ursprünglichen Lösung. Dabei wird beachtet, dass eine OD_{260nm} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml DNA entspricht (Sambrook and Gething, 1989)

2.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1%igen Agarose-Gelen (Agarose MEEO-Ultra Qualität, Roth; gelöst in 1x TBE; 0.75 µg Ethidiumbromid/10 mL Gel) (Laufbedingungen: 30 Min. und 80 V und maximaler Stromstärke bei kleinen Gelen bzw. 30 Min. und 120 V bei großen Gelen). Bei analytischen Gelen wurden zu den Amplifikaten jeweils 8 µL 10x GLB-Puffer zum 25 µL-Ansatz zugegeben und davon 10 µL aufgetragen. Bei präparativen Gelen (Restriktionsverdauung, Aufreinigung, ...) wurde der gesamte Ansatz auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden auf einem UV-Tisch (Bachofer, Reutlingen) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell (Feather Safety Razor Co., Kita-Ku, JP) ausgeschnitten. Zur Größenbestimmung der DNA-Banden im Bereich bis zu 2 kb fanden 5 µL 100 bp (Invitrogen, Karlsruhe) oder bei größeren Fragmenten 5 µL 1 kb Marker (Invitrogen, Karlsruhe) Verwendung.

2.2.1.5. Klonieren

Für das Klonieren wurde nach den von Maniatis und Kollegen entwickelten Methoden vorgegangen (Maniatis et al., 1989).

2.2.1.5.1. Einführen von Schnittstellen:

Für das Einfügen von DNA-Sequenzen in Vektoren mussten oft neue Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen mittels PCR an die Anfangs- bzw. Endsequenz angehängt werden. Dazu verlängerte man die Sequenzen der Primer um die entsprechende Erkennungssequenz. Zusätzliche Basen an den Enden der Primer erhöhten die Effizienz der Restriktionsenzyme.

2.2.1.5.2. Aufreinigung über Agarose-Gelelektrophorese

Die mit den Restriktionserkennungssequenzen versetzte Amplifikate wurden über Agarose-Gele aufgetrennt. Die ausgeschnittenen Gelfragmente wurden mit dem QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben in Lösung gebracht. Eine Einengung des Elutionsvolumen auf etwa 10 μL fand in der Vakuumzentrifuge Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg) statt.

2.2.1.5.3. Präparativer Restriktionsverdau

Die Nutzung eines präparativen Restriktionsverdaus sollte dazu dienen, Vektoren zu linearisieren und aufgereinigte, amplifizierte Genabschnitte für die Ligation vorzubereiten.

Restriktionsansatz:

Restriktionsendonuklease 1	1,0 μL
Restriktionsendonuklease 2	1,0 μL
10x Restriktions-Puffer	2,0 μL
(20x BSA	1,0 μL)
DNA	x μL
H ₂ O _{bidest.} (Ampuwa injection water)	ad 20,0 μL
	Σ 20,0 μL

Einige Restriktionsendonukleasen benötigen *bovine serum albumin* (BSA) als Co-Faktor. Die Reaktionsansätze inkubierten für 20 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden die Reaktionsansätze der verdauten PCR-Produkte mittels des QIAquick[®] PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Aufreinigung der linearisierten Vektoren fand mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese statt.

2.2.1.5.4. Ligation

Für eine Ligation wurde eine drei- bis fünffache molekulare Menge an *Insert*-DNA im Verhältnis zur Vektor-DNA eingesetzt. Die Bestimmung der Konzentrationen der DNA-Lösungen erfolgte wie unter 2.2.1.3. beschrieben.

Ligationsansatz:

Vektor DNA (~100 ng)	x μ L
<i>Insert</i> -DNA	y μ L
10x Ligations-Puffer	1,5 μ L
T4-DNA-Ligase	1,0 μ L
H ₂ O _{bidest.} (Ampuwa injection water)	ad 15,0 μ L
	<hr/>
	Σ 15,0 μ L

Der Ligationsansatz inkubierte bei Raumtemperatur für zwei Stunden und fand anschließend für eine Transformation in elektrokompente Bakterien Verwendung.

2.2.1.5.5. Kontrolle der Plasmidkonstrukte

Die Sequenzen der neu erzeugten Plasmidkonstrukte mussten anschließend kontrolliert werden. Dazu wurden sie wie beschrieben sequenziert.

2.2.1.6. Präparation und Vermehrung von Plasmiden

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden sowohl elektro- als auch chemisch kompetente DH5 α TM-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.2.1.6.1. Transformation in kompetente Bakterien

Die Transformation von ligierten Plasmiden in elektrokompente ElektroMAXTM DH5 α TM Bakterien erfolgte nach dem beiliegenden Protokoll. Dazu wurden 1,0 μ L - 1,5 μ L des Ligationsansatzes mit 25 μ L auf Eis aufgetauter Bakteriensuspension vermengt. Diese Lösung wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die Transformation fand in einem Multiporator (Eppendorf, Hamburg) bei einer Spannung von 1,7 kV und τ von 5 ms statt, anschließend wurde zügig 450 μ L das mitgelieferte, auf 37 °C vorgewärmte SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und bei 37 °C und 225 UpM für mindestens 45 Min. unter Schütteln inkubiert.

Fertige Plasmide wurden in chemisch kompetente DH5 α TM-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) nach einer modifizierten Methode von Hanahan (Hanahan, 1983) mittels Hitzeschock re-

transformiert. 100 μL der Bakteriensuspension tauten auf Eis auf und man vermischte diese mit etwa 100 ng des gereinigten Plasmids. Dann inkubierte die Suspension für 30 Min. auf Eis. Anschließend erfolgte für 45 Sekunden der Hitzeschock in einem 42 °C warmen Wasserbad. Nach einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde 450 μL auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und bei 37 °C und 225 UpM für mindestens 45 Min. unter Schütteln inkubiert.

Die Zellsuspension der beiden unterschiedlichen Transformationsmethoden wurde nach der Inkubation in unterschiedlichen Mengen auf zwei vorgewärmten LB-Amp. bzw. LB-Kan.-Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten inkubierten bei 37 °C für 16 Stunden in einem Brutschrank. Danach wurden sie bis zur weiteren Verwendung mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Inc., Neenah, USA) versiegelt und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.6.2. Minipräparation von Plasmiden

Zur Minipräparation wurden 10 mL LB-Amp.- bzw. LB-Kan.-Flüssigmedium in einem sterilen 50 mL Falcon[®]-Röhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Die Kultivierung fand bei 37 °C und 225 UpM für 16 Stunden unter Schütteln statt. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mittels des Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.6.3. Maxipräparation von Plasmiden

Um größere Mengen an Plasmiden zu erhalten, wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Dazu wurden 400 mL LB-Amp.- bzw. LB-Kan.-Flüssigmedium in einem großen Erlenmeyerkolben mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Diese wurde bei 37 °C und 225 UpM für 16 Stunden unter Schütteln kultiviert. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mittels des QIAfilter[®] Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.6.4. Anlegen von Glycerinstocks

Es wurden 3 mL LB-Amp.- bzw. LB-Kan.-Flüssigmedium in einem 15 mL Falcon[®]-Röhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Nach der Kultivierung der Bakterien bei 37 °C und 225 UpM für 16 Stunden unter Schütteln, wurde von dieser Bakteriensuspension zweimal 800 μL in Einfrierröhrchen überführt und jeweils mit 200 μL 87%iger (v/v) Glycerinlösung versetzt und vorsichtig vermengt. Anschließend erfolgte eine dauerhafte Lagerung bei -80 °C.

2.2.3. Western-Blotting

2.2.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Es wurden 7,5 %ige und 10 %ige Trenngele mit 4 %igen Sammelgelen (siehe Tabelle 2.1.) für die diskontinuierliche PAGE (ORNSTEIN, 1964;DAVIS, 1964) unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) verwendet.

Jeweils 50 µg Proteinlysate vermengte man mit einem Volumen 5x Laemmli-Puffer und denaturierte es bei 95 °C für 5 Min. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben in die Geltaschen pipetiert. Zusätzlich wurde in eine Geltasche der Proteinmarker MultiMark® Multi-Colored Standard (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen, um die Proteingröße abschätzen zu können. Die Auftrennung erfolgte bei maximaler Stromstärke und einer Spannung von 80 V, bis die Proben das Trenngel erreichten. Dann erhöhte man die Spannung auf 120 V.

Tabelle 2.1.: Pipetierschema jeweils für zwei SDS-Gele:

	10 %iges Trenngel	7,5 %iges Trenngel	4 %iges Sammelgel
H ₂ O _{bidest.}	3,86 mL	4,69 mL	3,14 mL
1,5 M Tris pH 8,8	2,60 mL	2,60 mL	–
0,5 M Tris pH 6,8	–	–	1,25 mL
30 % Acrylamid	3,32 mL	2,49 mL	1,00 mL
10 % SDS	100 µL	100 µL	50 µL
10 % APS	100 µL	100 µL	50 µL
TEMED	4 µL	4 µL	8 µL

2.2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Das Probenvolumen wurde mit Wasser im Verhältnis 1:10 bis 1:100 verdünnt, um so die Absorption des Farbreagens in den linearen Bereich zu legen. Zu der verdünnten Lösung wurde das gleiche Volumen einer 2:3 verdünnte *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Biorad, München) Färbelösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur von 10 Min. wurden die Absorptionen bei 595 nm in einem ELISA-Reader Synergy HT (BioTEK, Bad Friedrichshall) bestimmt. Aus der Absorption konnte mittels einer Eichkurve (0,25 µg/200 µL – 5,0 µg/200 µL) die Proteinmenge berechnet werden.

2.2.3.3. Elektroblothing

Die Proteine wurden nach dem Nasszellen-Blotting-Verfahren von Polyacrylamid-Gelen auf PVDF-Membran (Immobilon –P Transfer Membrane von Millipore, Schwalbach) transferiert (Twobin et al., 1979). Die PVDF-Membran musste vor dem Transfer in Methanol für 30 Se-

kunden und anschließend für 2 Min. in bidestilliertem Wasser aktiviert werden. Danach inkubierte die Membran zusammen mit den Whatman-Filterpapieren (Dassel, Hamburg) für mindestens 15 Min. in Transferpuffer. Der Proteintransfer erfolgte mittels folgender Versuchsanordnung:

⊕-Elektrode

Schwamm
2 Whatman-Filterpapiere
PVDF-Membran
Protein-Gel
2 Whatman-Filterpapiere
Schwamm

⊖-Elektrode

Die zusammengebaute Versuchsanordnung überführte man in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 4 °C und entweder bei einer Spannung von 85 V für 2 Stunden oder bei 35 V über Nacht. Dabei wurde der Transferpuffer ständig gerührt.

Die Güte des Transfers konnte mittels Ponceaus S-Färbung überprüft werden.

2.2.3.3. Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulose mit einer 4%igen (w/v) SlimFast-Blockier-Lösung in TBST bei Raumtemperatur (RT) für 2 Stunden oder bei 4 °C über Nacht abgeblockt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit dem Primärantikörper (entsprechend verdünnt in TBS mit 4 % (w/v) SlimFast und 0,02 % (w/v) Natriumazid) bei RT für 2 Stunden oder bei 4 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Danach folgten drei 10-minütige Waschschrte mit TBST bei RT unter Schütteln. Der entsprechende Zweitantikörper (anti-Hase in einer Verdünnung 1:3000, anti-Maus in einer Verdünnung von 1:2500, anti-Ziege in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST mit 4 % (w/v) SlimFast) wurde bei RT für 75 Min. unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 Min. mit TBST und einmal für 10 Min. mit TBS bei RT unter Schütteln gewaschen. Die Detektion mittels ECL™ Western-Blotting-Detektions-Reagenz (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz wurde durch Exposition von high performance chemiluminescence-Filmen (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) sichtbar gemacht.

2.2.3.4. Strippen der Nitrozellulosemembran

Um den Primär- und den Sekundärantikörper von einer Nitrozellulose-Membran zu entfernen, wurde dieser einmal für 10 Min. in TBST unter Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 5 Min. bei Raumtemperatur in *stripping*-Puffer inkubiert. Nach Einstellen des pH-Wertes mit Natronlauge von 2,2 auf 7,4 und intensivem Waschen mit TBS fand die Membran für weitere Immunodetektionen Verwendung.

2.2.4. Transgene Mäuse

2.2.4.1. Herstellen der transgenen Mäuse

Um die Expression des humanen Synphilin-1 in der Maus zu gewährleisten, wurde ein 3,4 kb großes Fragment des Promotors des humanen Prionenproteingens verwendet. Dieses besteht aus 1140 bp Strangaufwärts von Exon 1, dem vollständigen Exon 1 und dem ersten 52 bp von Exon 2. Der Promotor wurde von Ulrike Bichelmeier (Medizinische Genetik Tübingen - 2005) zusammen mit einem SV40 Polyadenylierungssignal in den pBluescript II KS Vektor (Stratagene, Amsterdam, NL) kloniert. WT621R und mut621C Synphilin-1 wurden über die Schnittstellen *Xba I* und *Bam HI* in diesen modifizierten Vektor kloniert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.2. dargestellt. Als Matrize diente die Sequenz von beiden Synphilin-1-Varianten im Plasmid pEGFP-N1 (Krüger, Hertie-Institut für Hirnforschung Tübingen). Die Anlagerungstemperatur T_A betrug 54 °C und die Elongationszeit dauerte 2 Min. Zusätzlich zu den Restriktionsschnittstellen wurde N-terminal ein myc-Tag (EQKLISEEDL), um das Protein mit monoklonalen Antikörper zu detektieren, eingefügt.

Tabelle 2.2.: Verwendete Primer für die Klonierung von Synphilin-1 in den pBluescript II KS Vektor

Gen	Sequenz (5'→3')	Schnittstelle	T_A	$t_{\text{elong.}}$
Synphilin-1 <i>full length</i>	CGC GGATCC GCCACCATGGAACAAAAGCTCATAT CTGAAGAAGACTTGGAAGCCCCTGAATACCTTGA CCG CTCGAG TTATGCTGCCTTATTCTTTCCTT	Bam HI Xho I	54 °C	2 '

fett – Endonukleaseerkennungssequenz; unterstrichen – Überhang für effizienteren Verdau; *kursiv* – eingefügter N-terminaler myc-Tag

Das Plasmid wurde mittels elektrokompenten ElektroMAX™ DH5α™-Bakterien in großem Maßstab amplifiziert, präpariert und sequenziert. Anschließend schnitt man den Promotor, die Gensequenz und die Adenylierungssequenz aus dem Vektor mit den Endonukleasen *Not I* und *Bgl I* aus dem Vektor aus und reinigte das DNA-Fragment über ein ethidiumbromidfreies Agarosegel auf. Die linearisierte DNA-Sequenz wurde von Dr. Johannes Wilbertz und seinen

Mitarbeitern (Karolinska Institut, Stockholm, S) in befruchtete Mäuseeizellen der C57/Bl6-Linie injiziert.

2.2.4.2. Expressionsverhalten in murinen Neuroblastomzellen

Der Promotor wurde vor der Injektion in murine Mäuseeizellen in der murinen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y getestet. Die Transfektion des Plasmid in die Zellen erfolgte mit Hilfe von FuGene.

2.2.4.2.1. Zellkultivierung

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte unter einer Sterilbank HERAsafe (Kendro, Langenselbold) unter Verwendung steriler Materialien. SH-SY5Y-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 15 % (v/v) FCS, 100 units/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit einem 5 %igem CO₂-Gehalt kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt, bis die Zellen konfluent gewachsen waren.

2.2.4.2.2. Passagieren von Zellen

Für das Passagieren der konfluent gewachsenen Zellen wurde das Medium steril abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert und der Verdau nach 5 Min. durch Zugabe von 10 mL serumhaltigen Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen wurden in diesem Medium resuspendiert und die Zelldichte bestimmt. Das Volumen, das der gewünschten Zellzahl entsprach, wurde auf neue Zellkulturgefäße verteilt oder in einem Verhältnis von 1:10 geteilt. Nach 4-6 Tagen erreichten die Zellen wieder einen konfluenten Zustand.

2.2.4.2.3. Bestimmung der Zelldichte

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim) wurde die Zelldichte bestimmt. Die Fläche eines großen Quadrates (bestehend aus 16 kleineren) beträgt 1 mm², die Tiefe 0,1 mm. Die Zelldichte einer Zellsuspension lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Zellzahl pro mL} = \text{Anz. der Zellen pro Großquadrat} \times 10.000 \times F_v$$

Bei F_v handelt es sich um einen etwaigen Verdünnungsfaktor. Es wurden jeweils mindestens drei Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet.

2. Material und Methoden

2.2.4.2.3. Transfektion mittels FuGENE 6-Transfektionsreagenz

Einen Tag vor der Transfektion wurden 70.000 Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in 2 mL Medium ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Die Transfektion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Erzeugung des DNA-Liposomen-Komplexes erfolgte in serumfreien OPTIMEM 1 Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden dafür 2 µg Vektor verwendet.

2.2.4.2.4. Herstellung von Zellextrakten

Nachdem das Medium der transient transfizierten Zellen aus den Vertiefungen einer 6-well-Platte abgesaugt wurde, wurden diese zweimal mit PBS gewaschen. Zur Lyse wurden 300 µL Trypsin/0,5% EDTA (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummischaber vom Boden abgelöst und in ein eiskühles 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde bei 4 °C für 30 Min. inkubiert und dann bei 13.000 UpM und 4 °C für weitere 30 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4.2.5. Nachweis der Expression

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde mittels Bradford-Reagenz bestimmt. Anschließend wurde ein Western-Blot wie in 2.2.3. beschrieben durchgeführt.

2.2.4.3. Haltung und Versorgung der Mäuse

Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen mit Edelstahlgitter (E. Becker & Co GmbH, Castrop Rauxel) in Gruppen von maximal 6 Tieren gehalten, wobei die Mindestfläche von 200 cm² pro erwachsenes Tier eingehalten wurde. Die Innenausstattung bestand aus staubfreiem Weichholzgranulat. Das in Flaschen angebotene Wasser sowie das Weichholzgranulat wurde ein Mal pro Woche erneuert. Die Haltung erfolgte bei einer Temperatur von ca. 20 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 50 %. Die Mäuse lebten in einer natürlichen 12-stündigen Photoperiode. Nachkommen wurden in einem Alter von ca. 21 Tagen von dem Mutter-Tier abgesetzt und nach Geschlecht in getrennten Käfigen untergebracht. Mit Erlangen der Zuchtreife (8 bis 10 Wochen) wurden die Mäuse verpaart, wobei die Dauer der Trächtigkeit ca. 20 Tage betrug und die durchschnittliche Wurfgröße bei etwa 8 Tieren lag. Die Verpaarung wurde in der Regel im Verhältnis 1:1 durchgeführt, d. h. ein Weibchen wurde mit einem Männchen verpaart.

2.2.4.4. DNA-Isolierung und Maustypisierung

Zur Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde DNA aus Ohrstanzgewebe isoliert. Um Gewebe zu erhalten, wurden die ca. 4 Wochen alten Mäuse mit Diethylether (Roth, Karlsruhe) betäubt und mit Hilfe einer Tätowierzange (E. Becker & Co GmbH, Castrop Rauxel) markiert. Die DNA-Gewinnung erfolgte mittels des *high pure PCR template preparation kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Der Nachweis des Transgens fand mittels PCR (verwendete Primer sind in Tabelle 2.3. dargestellt) und Agarose-Gelelektrophorese statt.

Gen	Name	Sequenz (5'→3')	T _A	t _{elong.}
tgSynphilin-1	tgSph1-Pr-F	TTTGGAATATGTTTGCCTG	53,5 °C	45 "
	tgSph1-R	GTGCCATGTTGGATGATGAG		
tgα-Synuklein	tgSNCA_LC_For	CCAGTTGGGCAAGAATGAAG	56,0 °C	20 "
	tgSNCA_LC_Rev	CCCTTCCTCAGAAGGCATTT		

agnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Der Nachweis des Transgens fand mittels PCR (verwendete Primer sind in Tabelle 2.3. dargestellt) und Agarose-Gelelektrophorese statt.

2.2.4.5. Durchführung der quantitativen PCR (qPCR)

Mittels quantitativer PCR konnten heterozygote von homozygoten transgenen Tieren voneinander unterscheiden werden.

2.2.4.4.1. Prinzip der qPCR

Der Fluoreszenzfarbstoff CYBRgreen lagert sich in die kleine Furche von doppelsträngiger DNA an. In einem LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wird nach jedem Amplifizierungszyklus die Fluoreszenz bestimmt. So kann die Menge an gebildetem Produkt einer laufenden PCR während dem Lauf verfolgt werden. Im Idealfall wird eine sigmoidale Kurve erreicht. Der Crossingpoint (C_p) gibt den Punkt an, an dem eine Grundfluoreszenz überschritten wird. Mit Hilfe der C_ps der Amplifikate des transgenen Konstrukts und eines *house-keeping genes* (murines α-Synuklein) kann nach folgender Formel auf die Allelzahl des Transgens geschlossen werden.

$$\Delta C_p = C_{P_{ig.}} - C_{P_{endog.}}$$

$$\Delta\Delta C_p = \Delta C_{P_{Maus}} - \Delta C_{P_{Kontrolle}}$$

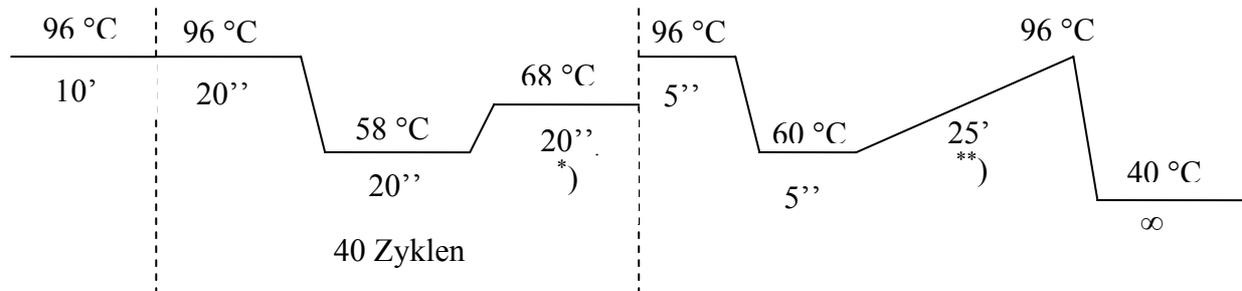
$$ratio = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

Dabei werden zusätzlich als Bezugspunkt die C_p-Werte einer bekannten, transgenen heterozygoten Maus benötigt (ΔC_{p-Kontrolle}). Werte der *ratio* um 1 bedeuten, dass die untersuchte Maus heterozygot transgen ist. Die Berechnung von homozygoten transgenen Mäusen liefert eine *ratio* von etwa 2 oder höher.

2. Material und Methoden

2.2.4.5.2. Durchführung

Die Unterscheidung der Allelzahl erfolgte mittels des CYBRgreen Kit von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Es wurde folgendes PCR-Programm unter Verwendung der in Tabelle 2.4. beschriebenen Primer für alle Reaktionsansätze verwendet:



*) – bei jedem Zyklus wird nach der Elongation die Fluoreszenz mittels Laser bestimmt

**) – die Schmelzkurve dient zur Bestimmung der Reinheit des qPCR-Produktes

Tabelle 2.4.: Sequenzen der Primer für die Unterscheidung zwischen Homo- und Heterozygoten Mäusen

Gen	Name	Sequenz (5'→3')
tgSynphilin-1	Sph1_LC_For	CAGAACTGAACCATTTCAACC
	Sph1_LC_Rev	GGGCTTCCAAGTCTTCTTC
tgα-Synuklein	tgSNCA_LC_For	CCAGTTGGGCAAGAATGAAG
	tgSNCA_LC_Rev	CCCTTCCTCAGAAGGCATTT
murα-Synuklein	murSNCA_LC_For	CAGCAGTCGCTCAGAAGACA
	murSNCA_LC_Rev	AGCATAAAACAGGCAGCCATA

2.2.4.6. Histologische Färbung

2.2.4.6.1. Herstellen von Paraffinschnitten

Den betäubten Mäusen wurde der Brustkorb geöffnet und der Blutkreislauf mit 50 mL vorgewärmten PBS durch Injektion in die linke Herzkammer unter gleichzeitigem Öffnen des rechten Vorhofes gespült. Anschließend wurde zur Fixierung des Gewebes 4% (w/v) paraformaldehyd (PFA; Merck, Darmstadt) in PBS benutzt.

Das Gehirn wurde vorsichtig aus dem Kopf präpariert und für mindestens 24 Stunden in 4% (w/v) PFA in PBS bei 4 °C inkubiert. Anschließend schnitt man das Gehirn sagittal in zwei Hälften. Das Wasser wurde dem Gehirn durch verschiedene Ethanol-Konzentrationen (70 %ig (v/v), zweimal 96 %ig (v/v), dreimal 100 %ig (v/v) für je zwei Stunden) und drei weitere Schritte in Xylol für je 2 Stunden entzogen. Anschließend inkubierten die Gehirne dreimal für je zwei Stunden in 60 °C warmes Paraffin (Leica TP1020, Leica, Bensheim). Danach wurden die Gehirnhälften mittels der Leica EG1160 (Leica, Bensheim) in Paraffin eingebettet und bei -20 °C gelagert.

Mittels des Mikrotoms Leica RCI2155 (Leica, Bensheim) wurden die eingebetteten Gehirne in 7µm dünne Scheiben geschnitten. Diese überführte man in ein erwärmtes (zwischen 42 °C und 46 °C) Wasserbad (Leica HI1210) und legte sie von dort auf Objektträger (OT) (Super-Frost® Plus, R. Langenbrinck, Teningen). Das warme Wasser löste das Gewebe vom Paraffin und glättete dieses. Die Fixierung der Gehirnschnitte auf den OT fand bei 54 °C für 12 Stunden statt.

2.2.4.6.2. Färbung der Paraffinschnitte

Das Paraffin um die Gewebeschnitte wurde mittels Xylol entfernt und eine Ethanolreihe überführte diese wieder in wässrige Lösung. Dabei wurde folgendes Programm in einem Leica Auto Stainer XL (Leica, Bensheim) verwendet:

Xylol (I-III) 8 Min. bei Raumtemperatur (RT)
Ethanol 100% (I-II) 5 Min. bei RT
Ethanol 96% (I-II) 5 Min. bei RT
Ethanol 80% 5 Min. bei RT
Ethanol 70% 5 Min. bei RT
Ethanol 50% 5 Min. bei RT
Ethanol 30% 5 Min. bei RT
PBS ∞

Anschließend fanden zwei weitere Waschschriffe in PBS für 2,5 Min. bei RT statt. Die OT wurde in 250 mL Citratpuffer (9 mL 0,1 M Citronensäure + 41 mL 0,1 M Natriumcitrat) überführt und dreimal für jeweils 5 Min. denaturiert. Es folgten drei weitere Waschschriffe. Dann wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation in 0,3 %iger Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) für 20 Min. gehemmt. Diesmal wurde nur zweimal mit PBS gewaschen; beim dritten Schritt wurde PBS + 0,015% (v/v) Brij® eingesetzt. Um unspezifische Bindungsstellen abzublockieren, wurde 5 %iges (v/v) Normales Kaninchenserum (NGS) in 0,3 % (v/v) Triton-X100 und PBS verwendet. Der Gehirnschnitt inkubierte für 16 Stunden und 4 °C in feuchter Atmosphäre mit dem Primärantikörper bei 50 UpM unter Schütteln. Der Antikörper wurde mit drei Waschschriffen mit PBS-Brij® für je 2,5 Min. bei RT unter Schütteln entfernt. Der entsprechende Sekundärantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre unter Schütteln inkubiert und es wurde wieder dreimal mit PBS-Brij® gewaschen. Eine Verstärkung des Signals erfolgte mittels des Vextastain® ABC-Kit (Linaris GmbH, Wertheim) nach Herstellerangaben. Er wurde im Verhältnis 1:1 in PBS gelöst und für eine Stunde bei RT in feuchter Atmosphäre geschüttelt. Nach wiederholtem Waschen mit

2. Material und Methoden

PBS-Brij[®] wurde die Primärantikörperbindung mit DAB-Sigma-fast-Tablets (Sigma-Aldrich, München) nach Herstellerangaben sichtbar gemacht.

Manche Gehirnschnitte wurden mit Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Dazu wurde der Farbstoff für 20 Sekunden auf den gefärbten Schnitt gegeben. Die Färbereaktion wurde in einer Salzsäure-Ethanol-Lösung (Verhältnis 1:50) abgestoppt und unter fließendem Leitungswasser für 10 Min. gebläut.

Die gefärbten Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert und in Xylol überführt:

Ethanol 70% 5 Min. bei Raumtemperatur (RT)

Ethanol 80%: 5 Min. bei RT

Ethanol 96% I-II 5 Min. bei RT

Ethanol 100% I-II 5 Min. bei RT

Xylol I-II 5 Min. bzw. ∞ bei RT

Anschließend wurden Deckgläser mit Hilfe des Einschlussmittels Leica CV Ultra (Leica, Bensheim) auf die Schnitte fixiert und nach 24-stündigem Trocknen konnten sie für die Mikroskopie verwendet werden.

2.2.4.6.3. Mikroskopieren

Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Zeiss Mikroskop mit verschiedenen Objektiven und daraus resultierenden Vergrößerungen aufgenommen. Dabei wurde die Software AxioVision sowohl zur Steuerung der Digitalkamera, als auch zur Bearbeitung der Bilder verwendet.

2.2.4.7. Microarray-Analyse

2.2.4.7.1. Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix-Microarray-Technologie

Für die Untersuchung der differentiellen Genexpression in WT621R- oder mut621C-Synphilin-1 transgenen Mäusen wurden Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix-Microarray-Technologie durchgeführt. Der verwendete MOE430 2.0 DNA-Array enthält mehr als 45.000 Transkripte. Für jedes Transkript stehen je elf verschiedene *missmatches* Oligos und elf verschiedene *perfect matches* Oligos auf dem Chip zur Verfügung.

2.2.4.7.2. Durchführung der Microarray-Analyse

Jeweils drei heterozygote transgene WT621R- und mut621C-Synphilin-1 Tiere wurden geopfert. Das präparierte Gehirn wurde sofort in eisgekühlte 15mL Falcon[®]-Röhrchen überführt. Die IZKF Microarray-Facility Tübingen (MFT) isolierte daraus die Gesamt-RNA überprüfte

und deren Qualität. Anschließend wurde die RNA mittels RT-PCR (reverse transkriptase) unter Verwendung von T7-Oligo-Primern in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung einer RNA-Polymerase bildete die Facility aus cDNA cRNA, wobei biotinylierte Primer Verwendung fanden. Diese so entstandene cRNA ist komplementär zur ursprünglich isolierten RNA. Die biotinylierte cRNA wurde fragmentiert und hybridisiert. Dabei wurde von jeder Probe ein eigener Array verwendet. Gefärbt wurde mit Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin. Die Detektion erfolgte mit dem GeneChip[®] Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, USA) und die Analyse mittels der Affymetrix Suite Software (Version 2.0).

2.2.4.8. Expressionsverhalten der transgenen Mäuse

Mit Hilfe der Microarray Analyse ist es nur möglich auf Boten-RNA-Ebene (*messengerRNA*; mRNA) Expressionsunterschiede festzustellen. Die Menge an Protein hängt nicht nur von der Anzahl der Vorlagen in Form von mRNA ab, sondern unter anderem auch vom Proteinabbau. Aus diesem Grund wurden zusätzlich WesternBlot-Analysen durchgeführt. Die Möglichkeit, die vorhandenen Proteinmengen zu vergleichen, wird durch auftragen der gleichen Gesamtproteinmenge und die Detektion mit einem konstant exprimierenden *house-keeping gene* (β -Actin) gewährleistet.

2.2.4.8.1. Gewinnung der Organe

Die zu untersuchende Maus wurde mit Hilfe von CO₂ getötet. Anschließend präparierte man folgende Organe: Gehirn, Herz, Leber, Niere, Lunge, Milz, Testis und Muskel. Die Organe konnten anschließend bei -80 °C für eine Weiterverwertung gelagert werden.

2.2.4.8.2. Extraktion der Proteine

Die Organe wurden auf Eis aufgetaut. Vor der Lyse wurde Gehirn, Herz, Leber und Lunge je 1 mL TES-complete[®] und den übrigen Organen jeweils ½ mL TES-complete[®] zugegeben. Zur Lyse der Organe wurde ein Ultra-Thorax (VWR International GmbH, Darmstadt) verwendet. Dies geschah bei maximaler Geschwindigkeit und eisgekühlt für 30 Sekunden. Dem Lysat wurde TNES-complete[®] zugegeben und für mindestens 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend zentrifugierte man die Proteinlösungen bei 4 °C und Maximalgeschwindigkeit. Der Überstand ohne die darauf schwimmende Lipidschicht wurde vorsichtig entnommen. War der Überstand nicht klar, so wurde der letzte Schritt wiederholt.

2.2.4.9. Rota-Rod

Rota-Rod (Accel. Rota-Rod for Rats 7750, technical & scientific equipment GmbH, Bad Homburg) ist eine Methode, um das Koordinationsverhalten von Mäusen beurteilen zu können (Rozas et al., 1998). Da die Willkürmotorik in der Parkinson'schen Krankheit beeinträchtigt ist (siehe Einleitung), sollte diese Methode helfen, die Auswirkung der transgenen Synphilin-1-Konstrukte auf den Bewegungsapparat zu quantifizieren und damit zu vergleichen. Im Rota-Rod-Versuch wurden die zu testenden Tiere auf einen sich um seine Längsachse drehenden Stab ($\varnothing = 3 \text{ cm}$) gesetzt und die Zeit gemessen, wie lange sie sich auf diesem halten konnten (siehe Abb. 2.1.). Jede Maus wurde zwei Mal am Tag mit einer Pause von einer Stunde getestet. Der Test fand bei Dunkelheit, zwei Stunden nachdem das Licht im Tierhaltungsraum ausgeschaltet wurde, statt.



Abb. 2.1.: Photographie des verwendeten Rota-Rods (freundliche Überlassung von J. Boy, Medizinische Genetik, Tübingen)

In den ersten fünf Tagen wurden die Mäuse trainiert. Dazu musste jede Maus bei einer konstanten Geschwindigkeit 2 Min. auf dem Rota-Rod laufen (siehe Tabelle 2.5.).

Tabelle 2.5.: Trainingsgeschwindigkeiten des Rota-Rod-Versuches in der ersten Woche

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Messung 1:	4 UpM	8 UpM	12 UpM	16 UpM	20 UpM
Messung 2:	8 UpM	12 UpM	16 UpM	20 UpM	20 UpM

In der zweiten Woche fand dann der Test statt. Dazu stieg die Geschwindigkeit von einer Grundgeschwindigkeit von 4 UpM linear mit einer Beschleunigung von 8 UpM/Minute an. Die Laufzeit von jeder Maus auf dem Rota-Rod wurde gestoppt und der jeweilige Tagesdurchschnitt berechnet. Außerdem wurden der Tagesdurchschnitt einer jeder Gruppe (WT621R- bzw. mut621C-Synphilin-1) gebildet und grafisch dargestellt.

2.2.4.10. beam-walking Test

Ein weiteres Experiment zur Analyse des Koordinationsverhalten ist der sog. *beam-walking test* (Carter et al., 1999). Dabei werden die Mäuse an den Anfang von verschiedenen Stäben

in einem abgedunkelten Raum gesetzt. Die Stäbe unterscheiden sich sowohl in der Grundfläche (quadratisch und kreisförmig) als auch in der Kantenlänge (28 mm, 12 mm und 5 mm) bzw. im Durchmesser (28 mm, 17 mm und 11 mm). Der Startpunkt ist von einer Lampe beleuchtet und die Maus erreicht nach Überqueren des Stabes einen abgedunkelten Käfig. Die Zeit für das Überqueren wird doppelt bestimmt. Falls eine Maus vom Stab abrutscht wird eine volle Minute berechnet.

2.2.4.11. Bestimmung der Dopamin-Konzentration in verschiedenen Gehirnarealen

Die Bestimmung der Dopamin-Konzentration in der *Substantia nigra* und im *Striatum* wurde in enger Kooperation mit Dr. Teismann (University of Aberdeen, UK) durchgeführt. Von jeder Linie wurden mindestens vier Tiere geopfert, die Gehirne präpariert und anschließend daraus *Substantia nigra* und *Striatum* gewonnen. Jeweils 20 μ L 0,1 M Perchlorsäure pro mg Gewebe wurden hinzu gegeben und mittels Ultraschall lysiert. Nach 30-minütigem Zentrifugieren wurden 20 μ L des Überstandes in eine HPLC-Anlage mit einer C18-reverse-phase HR-80 Catecholamin Säule (ESA, Bedford, USA) injiziert. Als mobile Phase diente der unter 2.1.2.4. beschriebene Elutionspuffer und die Flussgeschwindigkeit betrug 0,8 $\text{mL}/\text{Min.}$. Die Aufnahme der Chromatogramm-Peaks erfolgte mittels einem ESA Coulchem II mit einem Modell 5010 Detektor (E1 = 20 mV, E2 = 320 mV). Die Daten wurden aufgenommen und analysiert mit dem Chromeleon Computersystem (Dionex, Idstein). Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte unter einer Varianzanalyse mit anschließender *Tukey post-hoc* Test. Diese fand unter zur Hilfenahme der Software JMP IN 5.1 statt.

2.2.5. Hefe zwei-Hybrid

2.2.5.1. Prinzip

Mit der Methode Hefe zwei-Hybrid (Yeast 2-hybrid – Y2H) kann man Proteininteraktionen *in-vitro* nachweisen (Fields and Song, 1989). Bei einem *Y2H-screening* wird nicht die Interaktion einzelner Proteine getestet, sondern es wird in einer cDNA-Bank (*cDNA-library*) nach neuen Interaktionspartnern durchsucht.

Das Prinzip des Y2H, grafisch in Abb. 2.2. dargestellt, basiert auf die Erkenntnis, dass Transkriptionsfaktoren (TF) aus zwei Domänen bestehen: aus einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) und einer Aktivierungsdomäne (AD). Diese müssen sich nur in sterischer Nähe befinden und nicht als ein Molekül vorliegen. Man kann auch zwei Domänen aus unterschiedlichen TF verwenden, dabei muss nur die Promotorsequenz und das Reportergen entsprechend modi-

fiziert werden. Für einen Y2H werden an die DBD das interessierende Protein X fusioniert (*bait* – dt.: Köder), während an die AD ein weiteres Protein Y fusioniert wird oder eine cDNA-Bank Verwendung findet (*prey* – dt.: Beute).

Eine cDNA-Bank besteht aus einer Vielzahl verschiedener cDNA-Plasmide, die an die AD-Sequenz angehängt wurde. Beide Konstrukte werden in Hefe transformiert. Findet eine physische Interaktion zwischen den Proteinen X und Y statt, so folgt daraus eine enge Nachbarschaft der AD und der DBD. Dies führt zu einem funktionierenden Transkriptionsfaktor, der ein Reporter gen anschaltet. Das Produkt des Reporters wird auf unterschiedliche Weise sichtbar gemacht. So kann die Transkription von β -Galactosidase erfolgen, die bei Zugabe von β -Galactose einen blauen Farbstoff bildet. Auch sind Enzyme möglich, die bei Interaktion ein Wachstum auf Aminosäure defizitären Selektionsplatten ermöglichen. Da falschpositive Klone nicht zu vermeiden sind, muss die Interaktion in einem weiteren Test mit vertauschten Plasmiden wiederholt werden.

2.2.5.2. Hefe 2-Hybrid Screening

2.2.5.2.1. Konstruktion des Köders

Für das Y2H-screening fand als Köder nicht das vollständige Synphilin-1 Verwendung. Um nicht unspezifische Interaktionspartner aufzufinden, wurden die ersten vier Ankyrin-like repeats, die coiled-coil Domäne und die ATP/GTP-Bindungsdomäne (Aminosäure 348-557) entfernt. Dazu wurden der N- und der C-terminale Bereich aus dem Vektor mit einer Anlagerungstemperatur von 54 °C und einer Elongationszeit von 45 Sekunden amplifiziert und Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die Restriktionsschnittstellen waren so konstruiert, dass die äußeren Restriktionsschnittstellen mit dem linearisierten Vektor pEGFP-N1 (BD Bioscience, Clontech, Heidelberg) übereinstimmten, während die inneren miteinander ligieren konnten (siehe Tabelle 2.6.).

Die Ligation der zwei *inserts* in den Vektor erfolgte mittels einer 3-Punkt-Ligation. Das geklonte Plasmid wurde mittels elektrokompetenten ElektroMAX™ DH5 α ™-Bakterien amplifiziert und präpariert. Die Sequenzierung fand mit zwei Primern statt, die komplementär an der Vektor-DNA banden und so von beiden Richtungen das *insert* abdeckten. Außerdem wurden zusätzlich Primer verwendet, die komplementär zur Synphilin-1-Sequenz binden.

und testete auf seine Selbstaktivierung. Bei Selbstaktivierung findet eine positive Reaktion statt, obwohl nur ein leerer *prey*-Vektor (pACT2) verwendet wird. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen besteht im Vorhandensein von sauren Domänen. Saure Aminosäurereste

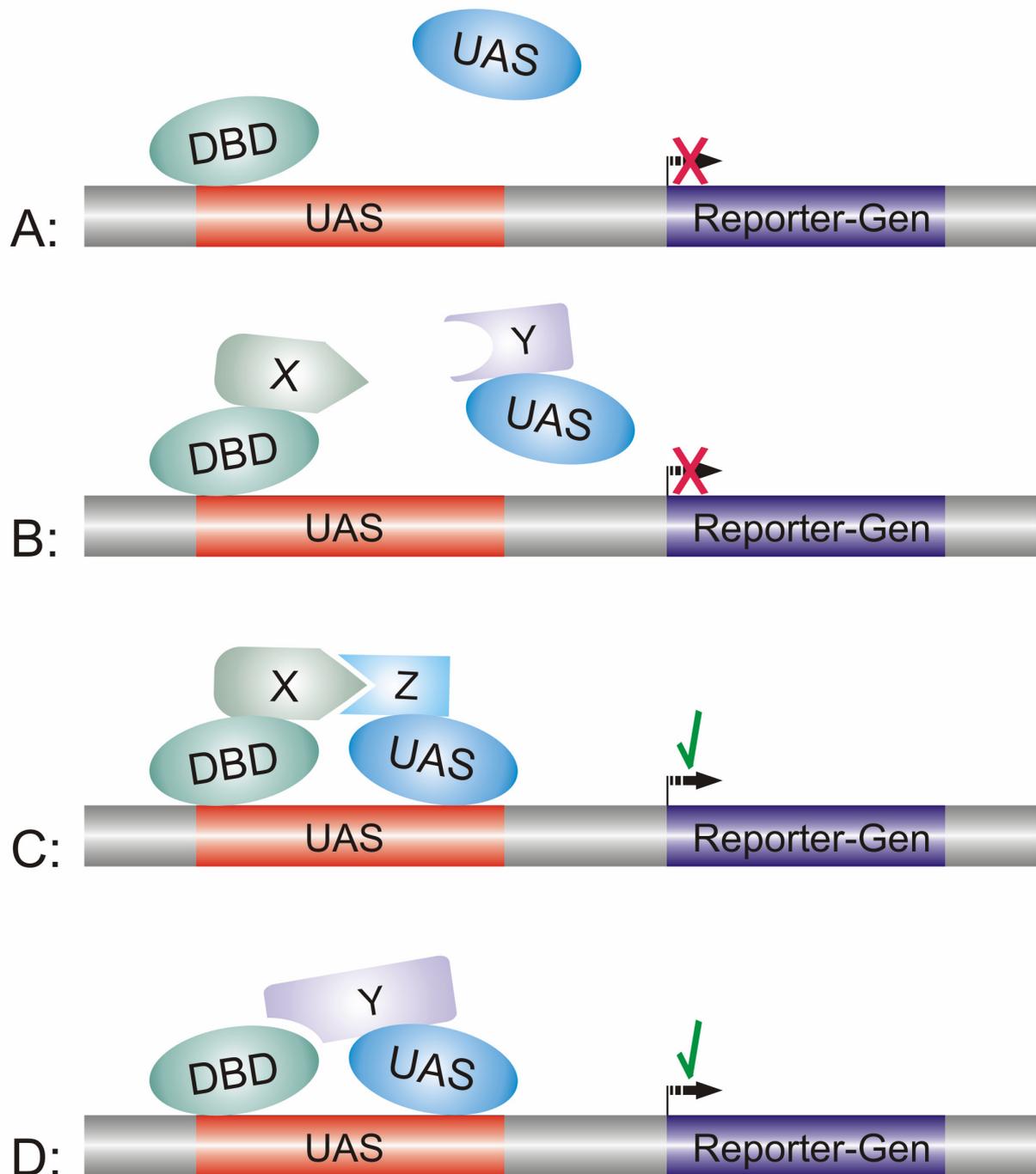


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung des Prinzips des Y2H. Der Transkriptionsfaktor ist in zwei Moleküle aufgeteilt, so dass die DBD zwar an die UAS bindet, die AD jedoch nicht in sterische Nähe gelangt (A). So wird das Reporter-Gen nicht exprimiert. Dies geschieht auch, wenn keine Interaktion zwischen zwei an die Transkriptionsfaktor-Fragmente fusionierte Proteine (X und Y) stattfindet (B). Interagieren zwei fusionierte Proteine (X und Z) miteinander, gelangt die AD auch an die UAS und das Reporter-Gen wird abgelesen und eine Selektion der positiven Klone kann stattfinden (C). Es ist aber auch eine Selbstaktivierung möglich, die zu falsch-positiven Klone führt. Dies kann verursacht werden, wenn ein fusioniertes Protein mit dem anderen Fragment des Transkriptionsfaktors direkt interagiert (D). DBD – *DNA binding domain*; AD – *activation domain*; UAS – *upstream activating sequence*.

2. Material und Methoden

Das *Y2H-screening* führte die schweizer Firma Dualsystems Biotech AG (Zürich, CH) durch. Dualsystems klonierte die modifizierte Synphilin-1 cDNA in den *bait*-Vektor (pLEXA-dir)

Tabelle 2.6.: Klonierungsprimer, zur Konstruktion des Hybrid-Proteins Synphilin-1 für das Y2H-screening

Gen	Name	Sequenz (5'→3')	Schnittstelle
Synphilin-1	Sph-1 N-Term.	ACGC GT CGACATGGAAGCCCCTGAATAC AA GGCGCGCC TTCGTCGTGAATTTTGTCTAG	Sal I Asc I
	Sph-1 C-Term.	TT GGCGCGCC ACTCCCTTCTTCACCCAGTT CGC GGATCC TTATGCCTTATTCTTTCC	Asc I Bam HI

fett – Endonukleaseerkennungssequenz; unterstrichen – Überhang für einen effizienteren Verdau

sind mit aktivierenden Regionen von Transkriptionsfaktoren assoziiert worden (Ma and Ptashne, 1987; Ruden et al., 1991; Ruden, 1992), wobei nicht alle saure Proteine transkribierend aktiv sind. Aus diesem Grund wurden zusätzlich noch die ersten 176 Aminosäuren entfernt.

2.2.5.3. Klonierung der *bait*- und *prey*-Vektoren

Die zu untersuchenden Gene bzw. Genfragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *Sal I* und *Not I* (NEB, Frankfurt am Main) in den *bait*- (pBTM117c – LEX A-DNA-Bindungsdomäne) bzw. den *prey*-Vektor (pGAD426 – β -Galactosidase-AktivierungsDomäne) kloniert. Die mit den in Tabelle 2.8. beschriebenen Primern erhaltenen Fragmente wurden jeweils in beide Vektoren kloniert, da bei einer Selbstaktivierung die Wahrscheinlichkeit bestand, dass bei umgekehrten Verhältnissen diese nicht mehr auftrat.

Tabelle 2.7.: Primer zur Sequenzierung über die Klonierungsstelle des *bait*- und des *prey*-Vektors

Plasmid	Name	Sequenz (5'→3')
pBTM117c	<i>bait</i> -forward	TTGGGGTTATTTCGCAACGGCGA
	<i>bait</i> -reverse	AAATCATAAGAAATTCGCCCG
pGAD426	<i>prey</i> -forward	ATGATGAAGATACCCACCAAAA
	<i>prey</i> -reverse	GCGGGGTTTTTCAGTATCTACG

Alle klonierten Vektoren wurden mittels elektrokompetenten ElektroMAX™ DH5 α ™-Bakterien amplifiziert und präpariert. Die Sequenzierung fand mit jeweils zwei Primern statt (siehe Tabelle 2.7), die im *prey*- bzw. *bait*-Vektor komplementär banden und so in beiden Richtungen das *insert* abdeckten. Bei größeren Fragmenten wurden zusätzlich Primer verwendet, die komplementär zur DNA-Sequenz binden.

2.2.5.4. Hefe Transformation

Die Hefe Transformation mittels eines modifizierten Protokolls nach Mitsuzawa (Mitsuzawa and Tamanoi, 1995) durchgeführt. 5 mL YPD-Medium in einem 50 mL Falcon® Röhren

Tabelle 2.8.: Sequenzen der Primer zur Herstellung der verschiedenen *bait*- und *prey*-Vektoren

Gen	Name	Bereich [AS]	Sequenz (5'→3')	Schnittstelle
Duo	ΔDuo-S5	731 – 892	<u>ACGCGTCGAC</u> GCCCCACAGCAGCTCCATCAGC CCTTTTT GCGGCCGC CTATAATTGGAGGCACTGCTC	Sal I Not I
	ΔDuo-S5lo	717 – 892	<u>ACGCGTCGAC</u> GCCCAGCGAGGCCAGGG CCTTTTT GCGGCCGC CTATAATTGGAGGCACTGCTC	Sal I Not I
	ΔDuo+S6	893 – 1000	<u>ACGCGTCGAC</u> GCGTCACCTCCAGGCTGAAG CCTTTTT GCGGCCGC CTATTTTAGCCGGTCTTCCATC	Sal I Not I
	ΔDuo-S8	992 – 1142	<u>ACGCGTCGAC</u> GCTGAAGATGGAAGACCGGC CCTTTTT GCGGCCGC TTACCTGCTTAGCGCTGCGCTC	Sal I Not I
	ΔDuo+S9	1126 – 1243	<u>ACGCGTCGAC</u> AGACCAATGCCAGCAATATG CCTTTTT GCGGCCGC TTACTGTGTTGACTCCTAGGGC	Sal I Not I
	ΔDuo-S7	1224 – 1664	<u>ACGCGTCGAC</u> CCCTGAGGATGGGAAAGTAC CCTTTTT GCGGCCGC CTAAACGTAAGTGGAGAAAG	Sal I Not I
	ΔDuo-B1	717 – 1000	<u>ACGCGTCGAC</u> GCCCAGCGAGGCCAGGG CCTTTTT GCGGCCGC CTATTTTAGCCGGTCTTCCATC	Sal I Not I
	ΔDuo-B2	893 – 1142	<u>ACGCGTCGAC</u> GCGTCACCTCCAGGCTGAAG CCTTTTT GCGGCCGC TTACCTGCTTAGCGCTGCGCTC	Sal I Not I
	ΔDuo-B3	992 – 1243	<u>ACGCGTCGAC</u> GCTGAAGATGGAAGACCGGC CCTTTTT GCGGCCGC TTACTGTGTTGACTCCTAGGGC	Sal I Not I
	ΔDuo-B4	1126 – 1370	<u>ACGCGTCGAC</u> AGACCAATGCCAGCAATATG CCTTTTT GCGGCCGC TTAACAGTAGGTGACATACATC	Sal I Not I
NMDAR	cyt2B	zytosol.	<u>ACGCGTCGAC</u> TTGGCAGTTCCGACATTGC CCTTTTT GCGGCCGC TCAGACATCAGACTCAATAC	Sal I Not I
	cyt1A	zytosol.	<u>ACGCGTCGAC</u> CAAGCGGCACAAGGATGCTC CCTTTTT GCGGCCGC TCAGCTCTCCCTATGACGG	Sal I Not I
PSD95	PSD95	full length	<u>ACGCGTCGAC</u> CAAGAAATACCGCTACCAAG CCTTTTT GCGGCCGC TCAGAGTCTCTCTCGGG	Sal I Not I

AS – Aminosäuren; **fett** – Restriktionsschnittstelle; unterstrichen – Überhang für effizienteren Verdau; *kursiv* – zusätzliche Base im Forward-Primer, damit Codons des angehängten Proteins erhalten bleiben oder Stop-Codon im Reverse-Primer

wurden mit einer einzelnen L40-Hefekolonie angeimpft und bei 30 °C und 225 UpM für 16 Stunden unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in 100 mL YPD-Medium in einem Erlenmeyerkolben überführt und bis zu einer OD_{600nm} von ~0,8 kultiviert. Die Hefen wurden bei 2.500 UpM bei Raumtemperatur (RT) für 5 Min. zentrifugiert und in 20 mL sterilem H₂O resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter identischen Bedingungen wurden die Hefen in 10 mL 0,1 M Lithiumacetat (LiAc) resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden die Hefen in 1 mL 0,1 M LiAc resuspendiert und für 10 Min. bei RT inkubiert. Zu jeweils 100 µL Hefesuspension gab man 2,5 µg sowohl des *bait*- als auch des *prey*-Konstrukts hinzu. Um eine Selbstaktivierung zu erkennen, wurde jedes Konstrukt zusätzlich mit dem entsprechenden leeren Gegenvektor transformiert. Als *carrier-DNA* fügte man außerdem noch 100 µg denaturierte einzelsträngige Lachssperma-DNA (Invitrogen, Karlsruhe) hinzu. Nach Zugabe von 600 µL 40 %iger (v/v) Polyethylenglycol (PEG) in 0,1 M LiAc wurde die Lösung vorsichtig vermengt und bei 30 °C und 120 UpM für 30 Min. unter Schütteln inkubiert. Dann fand der Hitzeschock bei 42 °C für 10 Min. in einem Wasserbad statt. Die Hefen wurden kurz herabzentrifugiert und in 100 µL sterilem Wasser

vorsichtig resuspendiert und auf SC-Agarplatten, denen die Aminosäuren Leu und His fehlten (SC(-Leu, -His)-Agarplatte), ausplattiert. Die Platten inkubierten bei 30 °C für 3 Tage. Anschließend wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.5.5. β -Galactosidase-Filter-Färbetest

Mit *bait*- und *prey*-Konstrukten transformierten Klone wurden auf Optitran BA-S-85 (Schleicher & Schuell, Dassel) ausgestrichen und so immobilisiert. Versorgt wurden die Hefen durch auflegen der Membranen auf SC(-Leu, -His)-Agarplatten. Die Platten inkubierten bei 30 °C für 3 Tage. Zur Lyse der Hefen wurden die Membranen kurz in flüssigen Stickstoff getaucht. Diese Membran wurde auf mit vollständigem Z-Puffer getränktem Whatman-Papier (Dassel, Hamburg) gelegt und bis zur entstehenden Blaufärbung beobachtet und photographisch dokumentiert.

2.2.5.6. β -Galactosidase-Färbetest in Flüssigkultur

Der β -Galactosidase-Filter-Färbetest ist nicht geeignet, um Interaktionen zu quantifizieren. Die quantitative Bestimmung der Interaktion wurde nach einer modifizierten Methode nach Miller (Miller, 1972) durchgeführt. Dabei wird die Hydrolyse von O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) (Fluka, Buchs, CH) in O-Nitrophenol photometrisch bestimmt.

Vier 3 mL SC(-Leu, -His)-Flüssigkulturen in 15 mL Falcon[®]-Röhrchen wurden jeweils mit einer transformierten Hefekolonie angeimpft und bei 30 °C und 225 UpM für 3 - 4 Tage unter Schütteln bis eine OD_{600nm} von ~1,0 erreicht wurde, kultiviert. Die Hefesuspension verdünnte man mit Z-Puffer auf eine OD_{600nm} zwischen 0,1 und 0,5. Von jedem Klon wurden jeweils drei Replikate á 800 μ L in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt. Zur Lyse der Hefe wurde eine Mischung aus 50 μ L 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) und 2,16 μ L β -Mercaptoethanol hinzugegeben. Nach der Zugabe von 50 μ L Chloroform wurde für 15 Sekunden stark geschüttelt und 200 μ L ONPG (8 mg/mL in Z-Puffer) hinzugegeben. Nun erfolgte die Zeitmessung, bis eine leichte Gelbfärbung auftrat und mit 500 μ L 1 M Natriumcarbonat (Na₂CO₃) wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend zentrifugierte man den Reaktionsansatz für 10 Min. bei Raumtemperatur. Mit einem Photometer bestimmte man die optische Dichte (OD_{600nm}) der Hefesuspension bei 600 nm und in den Überständen die Absorption des Farbstoffes bei 420 nm (A_{420nm}) und bei 550 nm (A_{550nm}).

Mit folgender Formel erfolgte die Berechnung der β -Galactosidaseaktivität in Miller units:

$$\beta - Galactosidaseunits = \frac{1000 \cdot (A_{420nm} - 1,75 \cdot A_{550nm})}{t \cdot V \cdot OD_{600nm}}$$

V beschreibt das Volumen der Kultur, welches in dem Assay benutzt wurde; während t die Zeit der Reaktion in Min. darstellt.

2.2.6. Mutationsscreening

2.2.6.1. Amplifikation der Exons

Die Optimierung der PCR erfolgte mittels CEPH-DNA (Centre d'Etudes Polymorphisme Humain) in einer 1:10 Verdünnung der Originallösung. Zur Optimierung wurden Reaktionsansätze sowohl mit als auch ohne Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur (T_A) der Primer wurde eine Temperaturgradienten-PCR (PTC-0200 DNA Engine (MJ Research, Inc.; Waltham, Mass.) benutzt. Die Primer-Paare wurden anhand der veröffentlichten genomischen Sequenzen mittels des Online-Werkzeugs *primer3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Rozen, 2000) gestaltet. Dabei wurden die Primer, wie in Tabelle 2.9. beschrieben, mindestens 20 Basenpaare außerhalb des Exons gelegt. Die als optimal ermittelten PCR-Bedingungen wurden anschließend noch an zwei weiteren CEPH-DNAs getestet (CEPH 2306 und 142314). Mit den etablierten

Tabelle 2.9.: Sequenzen der Amplifizierungsprimer

Gen	Exon	Sequenz (5'→3')	T_A [°C]	$t_{\text{elong.}}$ [Sek.]
SIAH-1	Promotor-Ex1	CGGCTCCTCCCTCAG CCCCCGCACCTACTG	68-58 *)	30
	Ex2 Teil 1	TTTTTCTCCTGCCTCCTTATGTAT CAGATGGGGCATTACAGCA	56	30
	Ex2 Teil 2	GTGCCCTGGTGCTTCCTG GTTTTAAACACTGGCCAGAAAATG	58	30

*) TouchDown-PCR: innerhalb der ersten 10 Zyklen wurde die Anlagerungstemperatur (T_A) pro Zyklus um 1 °C gesenkt

PCR-Bedingungen erfolgte die Amplifizierung der genomischen DNA der Patienten in 96-well-Platten.

2.2.6.2. Testen auf erfolgreiche Amplifikation

Die PCR-Produkte trennte man anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese auf. So wurde ersichtlich, welche genomischen DNAs sich amplifizieren ließen und für das Screening weiterverwendet werden konnten.

2.2.6.3. dHPLC

Die denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (dHPLC) ist eine Methode zur schnellen Detektion bekannter und unbekannter Mutationen. Das Transgenomic WAVE™

2. Material und Methoden

DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Crewe, UK) nutzt diese Technologie und wurde zum Screening von Parkinson-Patienten-DNA eingesetzt.

2.2.6.3.1. Prinzip der dHPLC

DHPLC basiert auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplices der zu untersuchenden DNA-Fragmente. Zur Ausbildung von Heteroduplices muss eine Probe bestehend aus normaler und mutierter DNA zunächst erhitzt und anschließend langsam abgekühlt werden. Heteroduplexbildung kann sowohl im Fall heterozygoter Mutationen erreicht werden oder aber durch Zugabe von Wildtyp-DNA zu homozygotmutierter Patienten-DNA. Die Trennung von Homo- und Heteroduplices erfolgt in der Säule des Wave Systems. Die DNA-Fragmente werden über Triethylammonium-Ionen (TEAA) als Brückenmolekül an eine hydrophobe Polymermatrix aus Polystyren-Divinylbenzol, die stationäre Phase, gebunden. Dabei binden doppelsträngige Fragmente fester als einzelsträngige. Die Bindung der DNA an die Brückenmoleküle wird durch eine steigende Acetonitrilkonzentration in der mobilen Phase kompetitiv verdrängt. Die mobile Phase besteht dabei aus einem Puffer-System aus Puffer A und B. Puffer A enthält 0.1 M TEAA und 0.025% (v/v) Acetonitril (ACN), und Puffer B enthält 0.1 M TEAA und 25% (v/v) ACN. Die eluierten Fragmente werden bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert. Der physikalische Unterschied zwischen Homo- und Heteroduplices besteht in ihrem Schmelzpunkt. In einem bestimmten Temperaturbereich (unter teilweise denaturierenden Bedingungen) liegen Heteroduplices zu einem höheren Anteil einzelsträngig vor als Homoduplices, binden folglich schwächer an die Säule und werden daher früher eluiert. Dieser physikalische Unterschied manifestiert sich im Idealfall in vier Peaks im Chromatogramm (zwei verschiedene Homo- und zwei verschiedene Heteroduplices). Praktisch treten jedoch meist nur zwei Peaks bei der Analyse auf (je einer für beide Homo- bzw. Heteroduplices). Eine genauere Beschreibung des Verfahrens findet sich bei (Huber et al., 1993; Kuklin et al., 1997).

2.2.6.3.2. Durchführung

Da im vorliegenden Fall nicht bekannt war, ob es sich um dominante oder rezessive Mutationen handeln würde und ob dementsprechend homo- oder heterozygote Patientenproben zu erwarten wären, vermischte man jeweils zwei PCR-Produkte miteinander. Dazu wurden von zwei PCR-Amplifikaten jeweils 10 µL in eine neue 96-well-Platte pipetiert und mit 10 µL H₂O_{bidest.} verdünnt. Die Ausbildung der Heteroduplices erfolgte mittels 2-minütiger Denaturierung der Amplifikate bei 94 °C und langsamer Renaturierung innerhalb von 20 min auf 10 °C.

Jeweils 5 μL dieser Proben wurden in die dHPLC injiziert. Zur Optimierung der dHPLC-Bedingungen fanden die amplifizierte CEPH-DNAs Verwendung. Die Bedingungen für die optimierten Ofentemperaturen und Elutionsbedingungen sind in der Tabelle nachzulesen.

2.2.6.4. Sequenzieren

Auffällige Proben wurden anschließend mit Hilfe des QIAgen PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und sequenziert. Nur so konnten Mutationen sicher nachgewiesen und ihre Position festgestellt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Transgenes Mausmodell mit WT621R- und mut621C-Synphilin-1

3.1.1. Generieren der Mauslinien

3.1.1.1. Wahl der beiden zu untersuchenden Mauslinien

Die beiden Synphilin-1-DNAs (WT621R und mut621C) wurden mit einem Prionen-Promotorgenfragment und einem Poly-A-Schwanz verbunden und anschließend in großem Maßstab amplifiziert, linearisiert und die in 70 %igem Ethanol gelösten DNA-Fragmente zu Dr. Wilbertz (Karolinska Institut, Oslo, S) geschickt. Seine Arbeitsgruppe generierte damit die transgenen Tiere mit C57/Bl6-Hintergrund. Die Arbeitsgruppe schickte uns vier WT621R- und 16 mut621C-Mauslinien. Im ersten Schritt wurden die Founder typisiert und so auf ein erfolgreiches Transgen getestet. Von den positiv getesteten Mauslinien wurde die Expression des Transgens im Gehirn mittels Western-Blot untersucht.

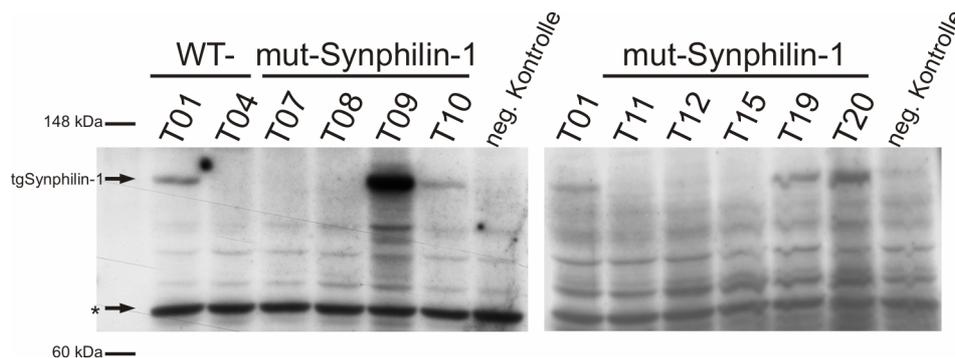


Abb. 3.1.: Western-Blot von Gehirnllysaten der verschiedenen transgenen Mauslinien. Es wurden jeweils 30 μg Protein aufgetragen. Bei T01 und T04 handelt es sich um WT R621-Synphilin-1 Mauslinien, während es sich bei den übrigen (T07, T08, T09, T10, T11, T12, T15, T19 und T20) um transgene mut C621-Synphilin-1 handelt. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) diente lysiertes Mausgehirn von C57Bl/6-Mäusen. Bei dem Synphilin-1-Antikörper handelt es sich um anti-Synphilin-1 1007. Die mit dem Stern (*) markierte untere Proteinbande wird durch ein unbekanntes Protein erhalten, das in allen Mauslinien gleichermaßen exprimiert wird und deshalb als Ladekontrolle verwendet wird.

Zur weiteren *in-vivo* Charakterisierung von WT621R-Synphilin-1 wurde die Mauslinie T01 verwendet. Die Mauslinie T09 exprimiert die größte messbare Menge an mut621C-Synphilin-1 und wurde für weitere Experimente verwendet, da bei transgenen α -Synuklein-Mausmodellen ein Zusammenhang zwischen Ausprägung des Phänotyps und exprimierter Proteinmenge festgestellt werden konnte (Eriksen *et al.*, 2005).

3.1.1.2. Untersuchung des Expressionsverhalten der beiden Mauslinien mittels Western-Blot (WB)

Nachdem die Mauslinien für das weitere Vorgehen ausgewählt wurden, wurde das Expressionsverhalten des Transgens innerhalb der einzelnen Organe mittels Western-Blot (WB) untersucht.

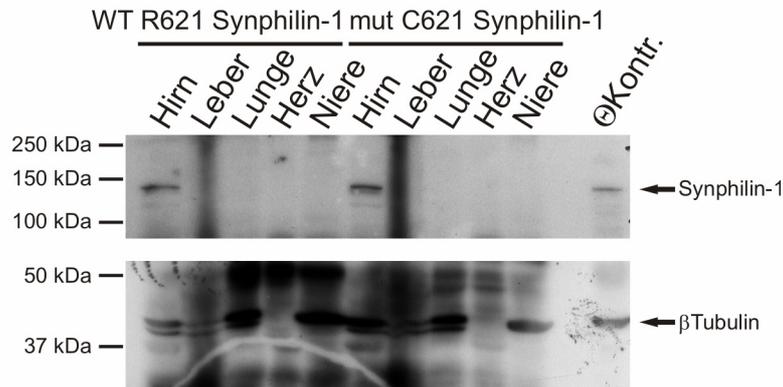


Abb. 3.2: Das Expressionsverhalten von WT 621R- (T01) und mut621 C-Synphilin-1 (T09) in verschiedenen Organen. Da der Antikörper auch endogenes Synphilin-1 erkennt, wurde zusätzlich noch eine Negativkontrolle (ThetaKontr. – C57/Bl6-Maus) aufgetragen. Es ist gut ersichtlich, dass der humane Prionen-Promotor nur im Gehirn exprimiert. Zur Detektion wurde der polyklonale Antikörper anti Synphilin-1 S6071 verwendet. Als Ladekontrolle dient das Protein des *house-keeping gene* β -Tubulin, wobei beachtet werden muss, dass die in Skelett- bzw. Herzmuskel exprimierte Form dieses Proteins von dem verwendeten Antikörper nicht erkannt wird.

Vergleicht man die Expressionsmenge der transgenen Mäuse mit der Kontrollmaus (ThetaKontr. – C57/Bl6-Hintergrund) in Abb. 3.2., so wird die erhöhte Expression, die schon in Abb. 3.1. ersichtlich war, nochmals verifiziert. Außerdem bestätigt dieser Versuch die Ergebnisse des Expressionsverhaltens früherer generierter transgener Tiere, die einen Prionen-Promotor zur Expression verwendeten (Maskri *et al.*, 2004).

Im nächsten Schritt wurde die Expression der beiden Transgene in verschiedenen Gehirnarealen untersucht. Dazu präparierte man von jeder Mauslinie ein Gehirn. Dieses wurde anschließend in die Bereiche Bulbus, Cortex, Basalganglien, Cerebellum und Stammhirn eingeteilt und lysiert. Auch mit diesen Proteinlösungen wurde ein Western-Blot durchgeführt (siehe Abb. 3.3).

Die Mauslinien T01 und T09 ist gemeinsam, dass eine große Menge an Synphilin-1 im Cerebellum exprimiert wird. Dagegen ist die Menge im Cortex, in den Basalganglien und im Stammhirn geringer. Interessant ist, dass die WT R621 Synphilin-1 Mauslinie fast keine detektierbare Menge Synphilin-1 im Bulbus exprimiert, während die mut621CSynphilin-1 Mauslinie die höchste Konzentration in diesem Gehirnareal bildet. Dies könnte für die unterschiedlich detektierte Gesamtmenge an Synphilin-1 im Gesamthirnlysate (siehe Abb. 3.1. und 3.2.) verantwortlich sein.

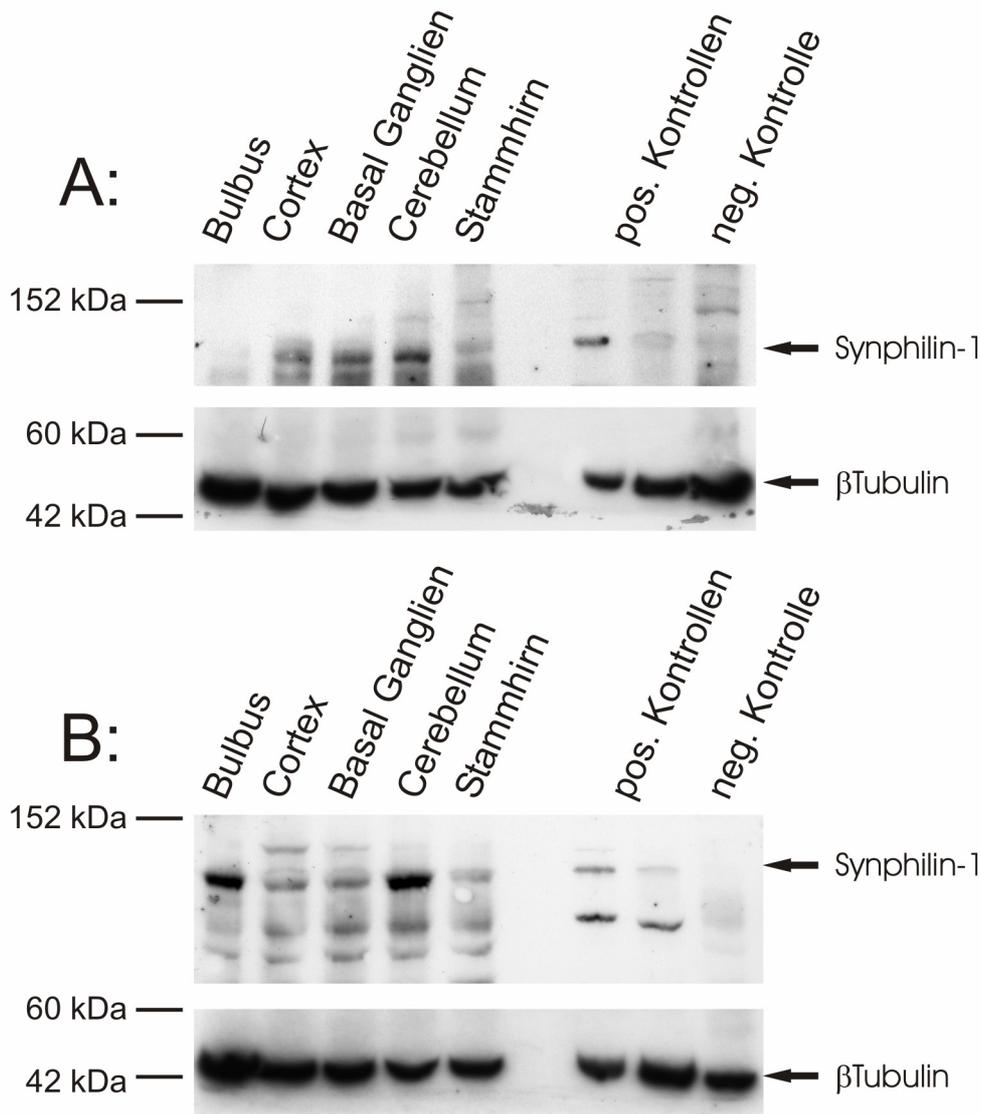


Abb. 3.3.: Expression von humanem Synphilin-1 (~ 120 kDa) in verschiedenen Gehirnbereichen sowohl bei der charakterisierten WT 621R- (A) als auch der mut 621C-Synphilin-1-Mauslinie (B) T01 bzw. T09. Für die Positivkontrollen diente exprimiertes WT-Synphilin-1 aus Zellkultur, während für die Negativkontrolle Gesamthirnlisat aus C57Bl/6-Maus verwendet wurde. Zur Detektion wurde der polyklonale Antikörper anti Synphilin-1 1007 verwendet. Als Ladekontrolle dient ein Antikörper gegen das *house-keeping gene* β -Tubulin (42 kDa).

3.1.1.3. Untersuchung des Expressionsverhaltens der beiden Mauslinien T01 und T09 mittels Immunhistochemie (IHC)

Neben der Detektion des Expressionsverhaltens von Synphilin-1 mittels Western-Blots wurde die Methode der Immunhistochemie (IHC) durchgeführt. Dazu wurde präpariertes Gehirn in para-Formaldehyd (PFA) fixiert und 7 μ m dünne Schnitte angefertigt, die mit dem Synphilin-1 1007-Antikörper angefärbt wurden. So kann die Proteinexpression von Synphilin-1 in den verschiedenen Gehirnbereichen genau untersucht werden. Ein weiterer Vorteil besteht bei genügender Vergrößerung in der Untersuchung von Zellen. So werden eventuell auftauchende morphologische Änderungen und sogar das Auffinden von Proteinaggregaten darstellbar.

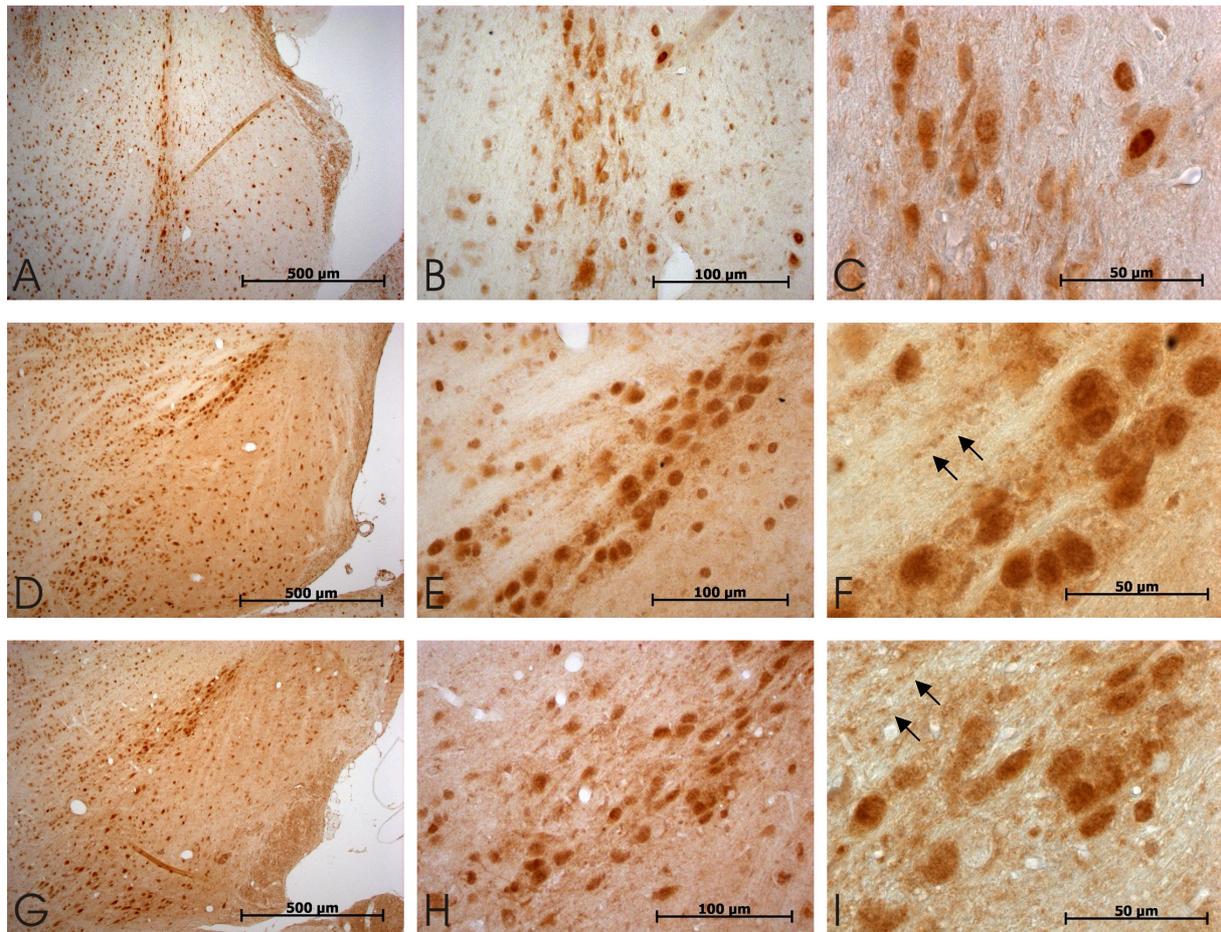


Abb. 3.4.: Mit dem anti-Synphilin-1 1007 Antikörper angefärbte Gehirnschnitte. In dieser Abbildung wurde das Expressionsverhalten in der *Substantia nigra* untersucht. Die Schnitte **A**, **B** und **C** stammen aus einem Kontrollmausgehirn (C57/Bl6), **D**, **E** und **F** aus einer WT621R-Synphilin-1 Maus und **G**, **H** und **I** aus einer mut621C-Synphilin-1 Maus. Die erste Spalte (**A**, **D** und **G**) wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung, die Mittlere (**B**, **E** und **H**) mit einer 400-fachen Vergrößerung und die rechte Spalte (**C**, **F** und **I**) mit einer 1000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Längen können jeweils am Maßstabsbalken bestimmt werden. Man kann sehen, dass eine starke Kernanfärbung der dopaminergen Zellen sichtbar ist. Aber auch das Zytoplast ist angefärbt. Die Färbung ist nicht homogen, sondern es sind zusätzlich einzelne dunkel gefärbte Punkte auffindbar. Hervorzuheben ist, dass diese Punkte bei den transgenen Tieren in den Axonen aufzufinden sind (siehe Pfeile in **F** und **I**). Außer diesem sind keine weiteren auffälligen Unterschiede zwischen den beiden transgenen Tieren und der Kontrollmaus ersichtlich.

Die Abb. 3.4. zeigt das Gehirnareal um die Substantia nigra pars compacta einer Kontrollmaus und der beiden transgenen Synphilin-1 Tiere in drei unterschiedlichen Vergrößerungen. Es ist gut ersichtlich, dass die Zellkerne der dopaminergen Zellen stärker gefärbt sind als das Zytoplast. Im Unterschied zu den Kontrollmäusen sind jedoch granuläre Strukturen innerhalb des Zytoplasts der transgenen Tiere auffindbar. Was die Ursache für diese Strukturen muss in weiteren Versuchen ermittelt werden. So könnte es sich um Proteinaggregate handeln, die analog zu Lewy Körperchen (LK) in Morbus Parkinson Synphilin-1 enthalten (Wakabayashi *et al.*, 2002), auch wenn die Morphologie nicht mit der von LK übereinstimmt. Dazu müsste weitere Antikörper, die Proteine detektieren, die sich in LK auffinden lassen (α -Synuklein, Ubiquitin, ...) verwendet werden. Außerdem erkennt man bei den transgenen Tieren ange-

3. Ergebnisse

färbte Punkte (siehe Pfeile in Abb. 3.4.F und I), die sich nicht im Zellkörper befinden. Diese sind wie an einer Perlenkette aufgereiht. Dies lässt vermuten, dass Überexpression von Synphilin-1 – unabhängig, ob WT- oder mut- Variante – auch zu Aggregaten in den Axonen führt. Andererseits kann dies aber auch ein Artefakt der Schnittebene sein.

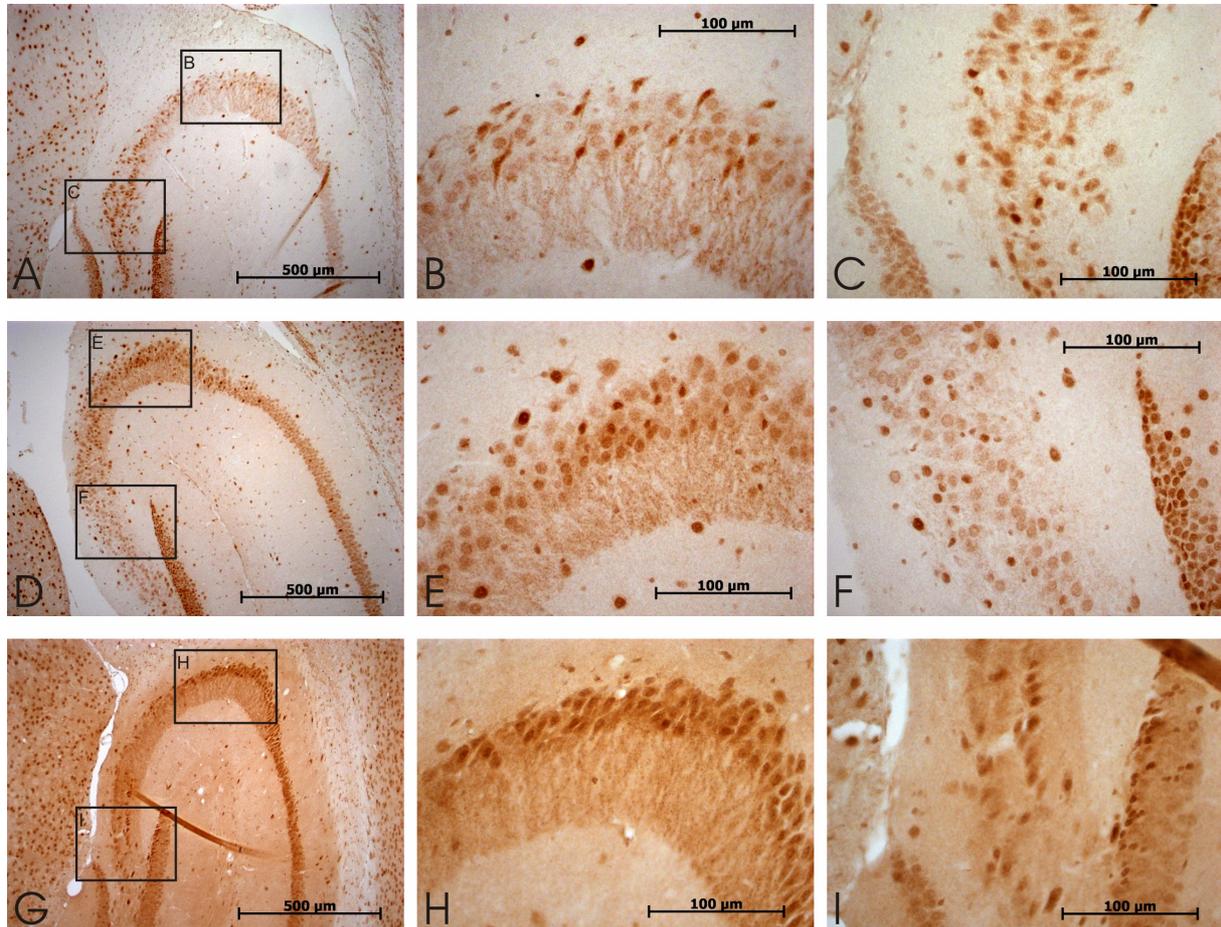


Abb. 3.5.: Mit dem anti-Synphilin-1 1007 Antikörper angefärbte Gehirnschnitte. In dieser Abbildung wurde das Expressionsverhalten im Hippocampus untersucht. Die Schnitte **A**, **B** und **C** stammen aus einem Kontrollmausgehirn (C57/Bl6), **D**, **E** und **F** aus einer WT-Synphilin-1 Maus und **G**, **H** und **I** und aus einer mut-Synphilin-1 Maus. Die Bilder der ersten Spalte (**A**, **D** und **G**) wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung und die Mittlere und die Rechte (**B**, **C**, **E**, **F**, **H** und **I**) mit einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Längen können jeweils am Maßstabsbalken bestimmt werden. In den Mikroskopiebildern der ersten Spalten sind die Ausschnitte der beiden anderen Spalten eingezeichnet und mit den entsprechenden Buchstaben markiert.

Neben der Substantia nigra wurden auch Mikroskopieaufnahmen vom Hippocampus durchgeführt. Innerhalb des Hippocampus wurden zwei Bereiche genauer untersucht. In der ersten Spalte von Abb. 3.5. sind die Ausschnitte der vergrößerten Bereiche eingezeichnet. Die Färbung der Zellen wurde analog zu denen in der Substantia nigra durchgeführt. Die Zellkerne sind auch hier dunkler gefärbt als das Zytosol. Ein genauerer Blick in den Hippocampus ließ jedoch keine Unterschiede zwischen den transgenen und den Kontrolltieren erkennen.

Der dritte Bereich, der mit Hilfe des Mikroskops untersucht wurde, war das Cerebellum; genauer gesagt der 4. und 5. Lobus Cerebellum (siehe Abb. 3.6.). Dabei ist schon in der gerin-

gen 100-fachen Vergrößerung ein Verlust der Purkinje-Zellschicht bei den transgenen

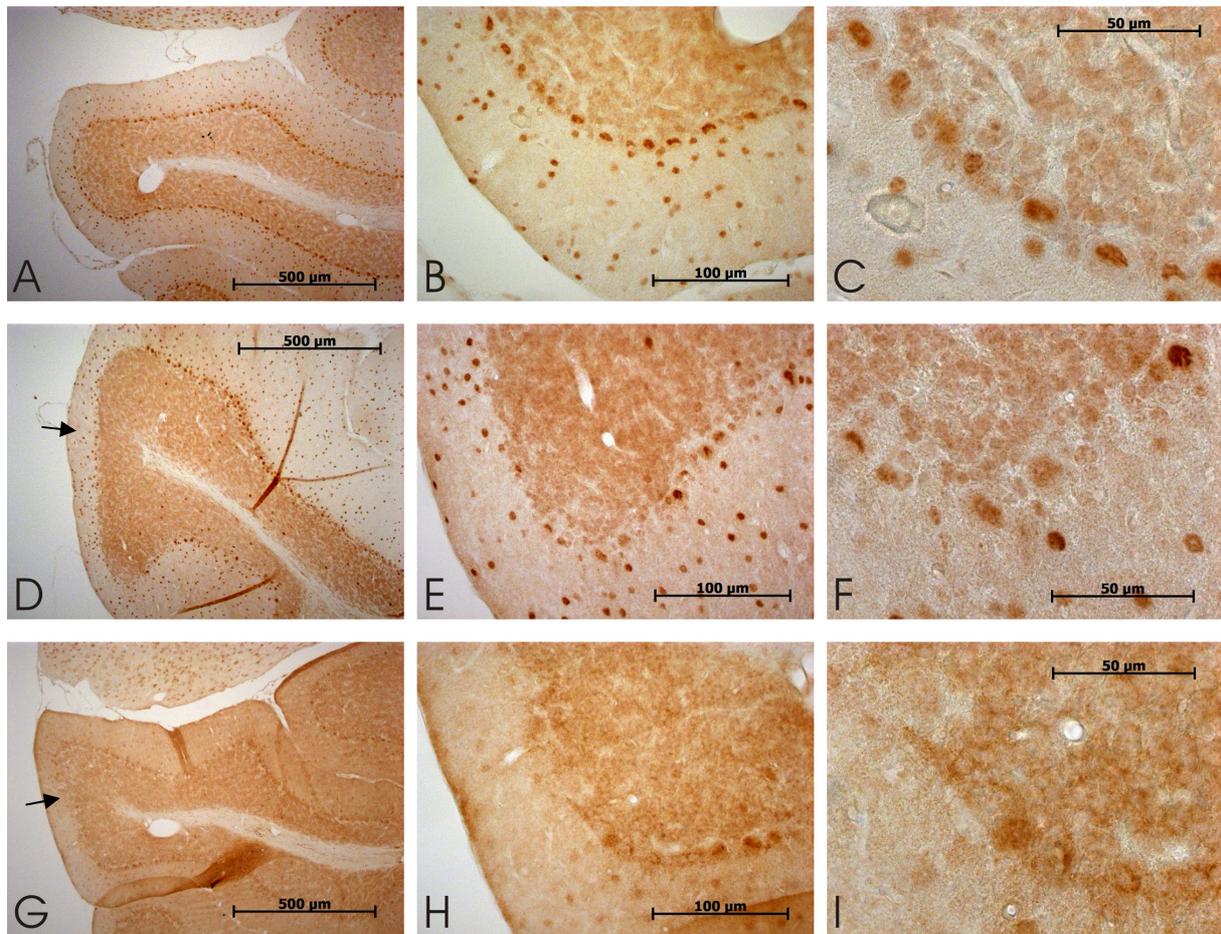


Abb. 3.6.: Mit dem anti-Synphilin-1 1007 Antikörper angefärbte Gehirnschnitte. In dieser Abbildung wurde das Expressionsverhalten im 4. und 5. Lobus Cerebellum untersucht. Die Schnitte **A**, **B** und **C** stammen aus einem Kontrollmausgehirn (C57/Bl6), **D**, **E** und **F** aus einer WT-Synphilin-1 Maus und **G**, **H** und **I** und aus einer mut-Synphilin-1 Maus. Die erste Spalte (**A**, **D** und **G**) wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung, die Mittlere (**B**, **E** und **H**) mit einer 400-fachen Vergrößerung und die rechte Spalte (**B**, **F** und **I**) mit einer 1000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Längen können jeweils am Maßstabsbalken bestimmt werden. Auffällig ist das Absterben der Purkinje-Zellen bei den transgenen Tieren (siehe Pfeile in Aufnahme **D** und **G**)

Tieren zu erkennen (siehe Pfeile in Abb. 3.6. **D** und **G**). Wenn man sich die Übergänge zwischen dem vollständigen Verlust der Purkinje-Zellen und den noch vorhandenen anschaut, erkennt man, dass sich schon dort die Reihen der Purkinje-Zellen lichten. Neben dem vollständigen Verlust der Zellen gibt es also auch schon an den Seiten einzelne tote Zellen, die Löcher in die Reihe reißen. Im Vergleich der transgenen Tiere kann man erkennen, dass bei der mut621C-Synphilin-1 Maus T09 mehr Purkinje-Zellen fehlen als bei der WT621R-Synphilin-1 Maus T01. Bei der IHC-Untersuchung mit dem Antikörper Synphilin-1 der mut621C Maus ist jedoch ein Fehlen bzw. nur eine schwache Anfärbung der vereinzelt Zellen in der Molekularschicht auffällig. Dies könnte dazu geführt haben, dass auch vorhandenen Purkinje-Zellen nicht angefärbt wurden und deshalb nicht in den Abb. 3.6. **G** – **H** auffindbar sind. Aber nicht nur aus diesem Grund wurde zusätzlich eine anti-Neurofilament-

3. Ergebnisse

Färbung (Koeppen, 2005) durchgeführt, sondern um die mit dem Synphilin-1-Antikörper erhaltene Ergebnisse zu verifizieren. Dabei werden die so genannten Korbzellen (engl.: *basket cells*) angefärbt (Gatti and Vinters, 1985), die die Purkinje-Zellen versorgen. Ist die Purkinje-

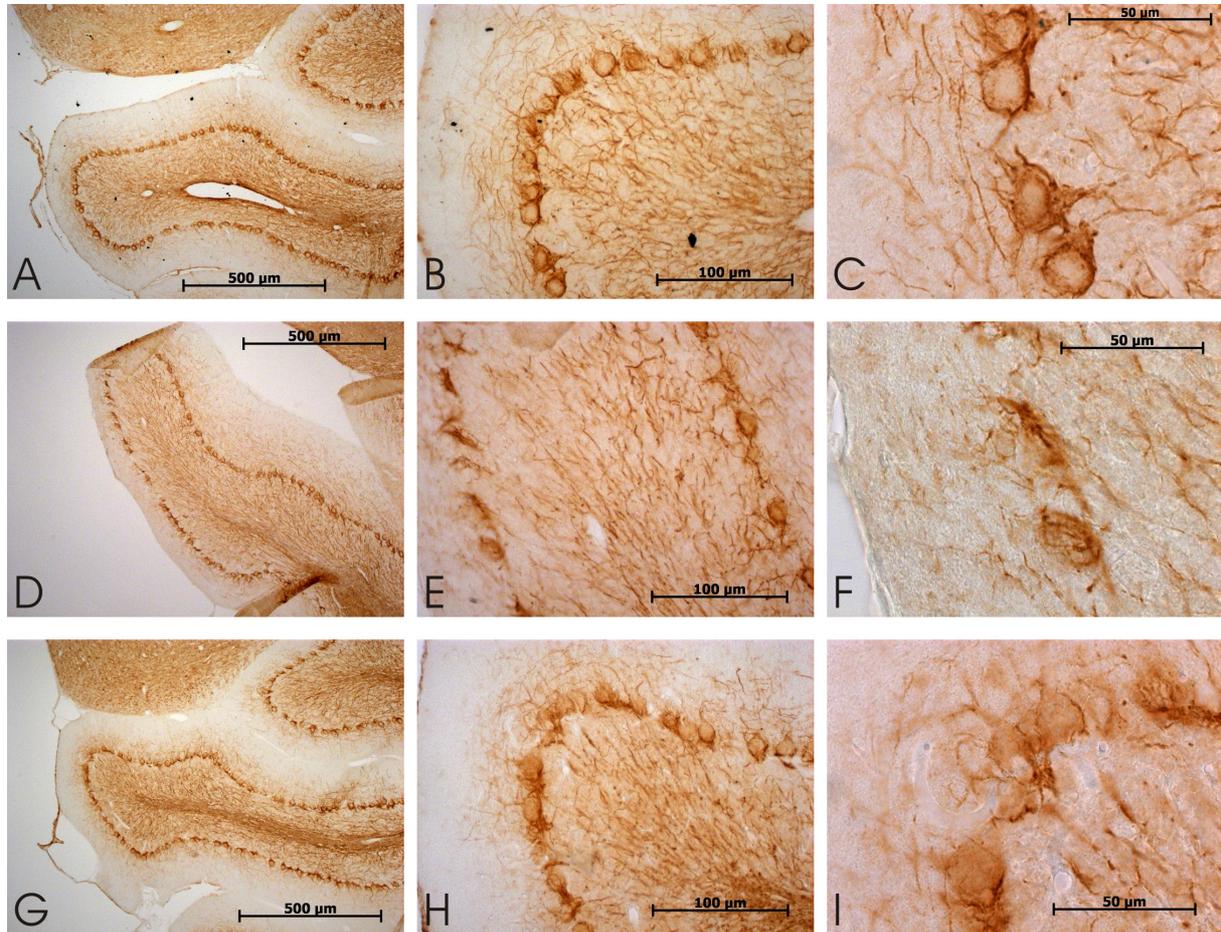


Abb. 3.7.: Mit einem anti-Neurofilament Antikörper gefärbtes Cerebellum. In dieser Abbildung wurden nach sog. ‚empty basket‘ Zellen im 4. und 5. Lobus des Cerebellum gesucht. Die Schnitte **A**, **B** und **C** stammen aus einem Kontrollmausgehirn (C57/Bl6), **D**, **E** und **F** aus einer WT-Synphilin-1 Maus und **G**, **H** und **I** und aus einer mut-Synphilin-1 Maus. Die erste Spalte (**A**, **D** und **G**) wurde mit einer 100-fachen Vergrößerung, die Mittlere (**B**, **E** und **H**) mit einer 400-fachen Vergrößerung und die rechte Spalte (**B**, **F** und **I**) mit einer 1000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Längen können jeweils am Maßstabsbalken bestimmt werden. Bei der Kontrollmaus sind die ‚basket cells‘ lehrbuchmäßig zu erkennen. Bei den beiden transgenen Tieren sind sie eindeutig als ‚empty basket‘ Zellen zu bezeichnen und lassen auf ein Absterben der Purkinje-Zellen schließen.

Zelle vital, so ist in der Filament-Färbung ein $\frac{3}{4}$ -Kreis zusehen (siehe Abb. 3.7. **C**). Bei einer toten Purkinje-Zelle sieht man auch den hinteren Bereich der „Korbzelle“, so dass diese dunkel erscheint oder schon ganz fehlt (siehe Abb. 3.7. **F** und **I**) (Koeppen, 2005). Die Färbung der ‚basket cells‘ führt deshalb zu der gleichen Schlussfolgerung wie die Betrachtung der Synphilin-Färbung des Cerebellums: die Purkinje-Zellen sterben bei der Überexpression von Synphilin-1 im Mäusehirn. Dabei ist zusätzlich erkennbar, dass der Verlust von Purkinje-Zellen in der transgenen Maus mit mutiertem Synphilin-1 größer ist als bei der WT-Variante.

3.1.2. Charakterisierung der beiden Mauslinien

3.1.2.1. Verhaltensstudien mittels Rota-Rod und *beam-walking* Test

Für die Verhaltensstudien wurden Tiere beider Linien verwendet, die innerhalb eines Zeitraumes von 14 Tagen geboren wurden. Es befanden sich sowohl hetero- als auch homozygote Tiere in den Testgruppen.

Der Rota-Rod-Versuch wurde im Alter von 48, 56 und 66 Wochen mit den beiden Mauslinien durchgeführt (siehe Abb. 3.4.). Der Versuch fand mit sieben T01- und mit neun T09-Mäusen statt. Vor der letzten Messung verstarben zwei WT621R- und eine mut621C-Synphilin-1-Maus. In der Auswertung der Laufzeiten der Mäuse auf der sich drehenden Walze ist ersichtlich, dass die T01-Mauslinie länger lief, als die T09-Mäuse. Der Unterschied ist zwar nicht signifikant, aber zieht sich, abgesehen vom vierten Tag der ersten Messreihe, konstant durch alle Wochen.

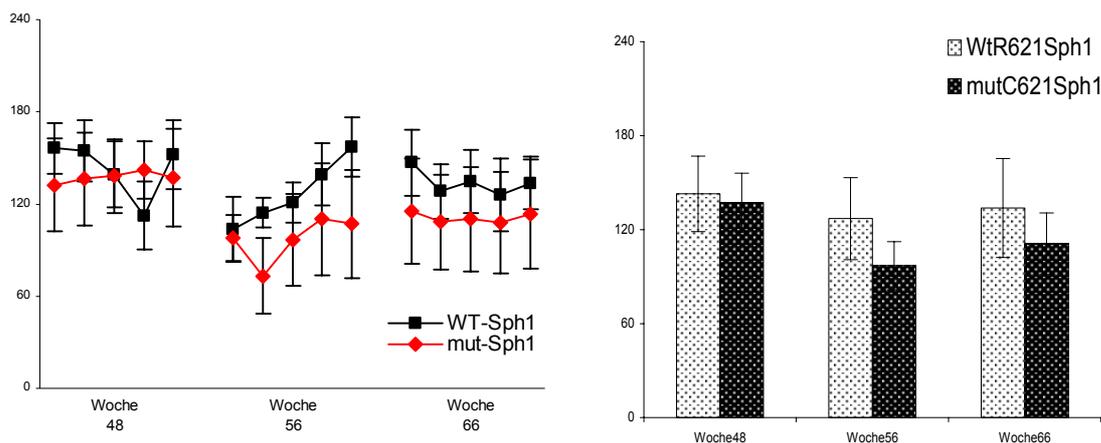


Abb. 3.8.: Zusammenfassende Darstellung des Rota-Rod-Versuches. Auf der linken Seite ist der Verlauf der unterschiedlichen Laufzeiten pro Tag der drei verschiedenen Versuchswochen dargestellt. Schwarze Quadrate zeigen die durchschnittliche Laufzeit der WT621R-Synphilin-Mäuse pro Tag an, hingegen sind die Leistungen der mut621C-Synphilin-1 transgenen Tiere mit roten Rauten dargestellt. Auf der rechten Seite sind die durchschnittlichen Laufzeiten dieser Wochen abgebildet. Die X-Achse gibt die jeweilige Laufzeit der Mäuse auf der sich drehenden Walze in Sekunden an.

Die Größe des Unterschiedes wird besonders deutlich, wenn man die Durchschnittswerte der einzelnen Versuchswochen miteinander vergleicht. Auffällig ist eine nachlassende Laufzeit der T09-Mauslinie im Laufe der Wochen, während die T01-Linie relativ konstante Laufzeiten aufweist. Daraus kann man schließen, dass das mutierte Synphilin-1 als Transgen einen größeren negativen Einfluss auf die Koordination besitzt, als die Wildtyp-Variante. Dieser Unterschied wird mit steigendem Alter der Mäuse immer deutlicher.

Dennoch ist die Aussage des Rota-Rod-Versuches nicht eindeutig und für die Auswirkung der Transgene auf Mäuse müssten vergleichbare Kontrollmäuse getestet werden. Aus diesem

3. Ergebnisse

Grund wurde zusätzlich der *beam-walking*-Test durchgeführt. Dabei müssen die Tiere einen Stab mit unterschiedlicher Geometrie und Größe überwinden. Die benötigte Zeit zum Überqueren des Hindernisses wird gemessen. Falls Tiere das Gleichgewicht verlieren und von dem Stab herunterfallen wurde die maximale Zeit von einer Minute für die Auswertung notiert. Der Versuch fand in der 67. Lebenswoche derselben transgenen Tiere statt, die auch schon am Rota-Rod-Versuch teilnahmen. Als Kontrollen dienten diesmal sieben nicht-transgene C75/Bl6-Mäuse, deren Alter zwischen 67 und 80 Wochen lag.

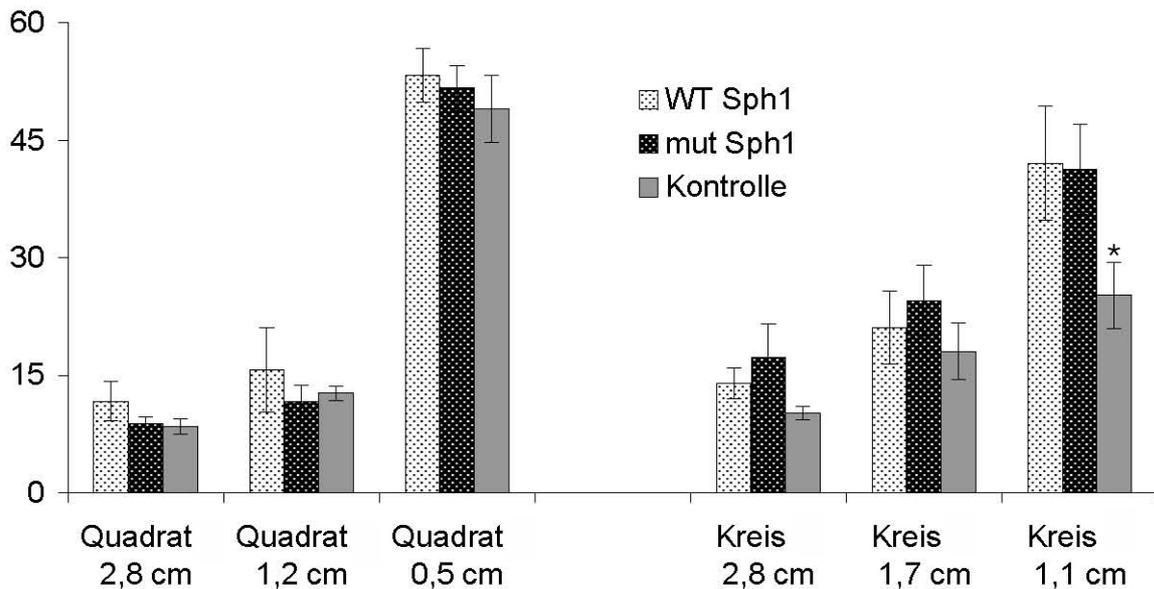


Abb. 3.9.: Auswertung des *beam-walking* Experiments. Auf der linken Seite des Diagramms sind die benötigten Zeiten der Tiere zum Überqueren des Hindernisses in Sekunden angegeben. Der Querschnitt der Stäbe (quadratisch oder kreisförmig) ist als Quadrat bzw. Kreis bezeichnet. Die Kantenlänge bzw. der Kreisdurchmesser sind darunter in Zentimeter angeführt. Die Balken der transgenen WT621R-Synphilin-1 Mäuse sind weiß mit schwarzen Punkten, während die mut621C-Synphilin-1 Mäuse umgekehrt gefärbt sind. Die Balken der Kontrollmäuse (C57/Bl6-Hintergrund) sind grau. Das Sternchen (*) gibt an, dass die Kontrollmäuse signifikant schneller ($p < 0,05$) das Hindernis überqueren konnten, als die transgenen Synphilin-1 Tiere.

Allen drei Mausgruppen ist die Überquerungsgeschwindigkeit des Hindernisses mittels eines quadratischen Stabes gemeinsam. Die Zeiten zum Überqueren der beiden größeren quadratischen Stäbe sind nahezu identisch. Bei dem sehr kleinen Stab tun sich jedoch schon alle Mäuse sehr schwer. Wird zur Überquerung ein Stab mit kreisförmigem Durchmesser verwendet, sind die Kontrollmäuse im Vorteil. Besonders deutlich wird dies bei Verwendung des kleinsten runden Stabes (Durchmesser = 1,1 cm). Hier sind die Kontrollmäuse sogar signifikant schneller als die transgenen Mausgruppen (WT621R-Synphilin-1 gegenüber den Kontrolltieren: $p = 0,047$ und mut621C-Synphilin-1: $p = 0,035$). Zwischen den transgenen Mausgruppen ist jedoch nur ein minimaler Unterschied erkennbar.

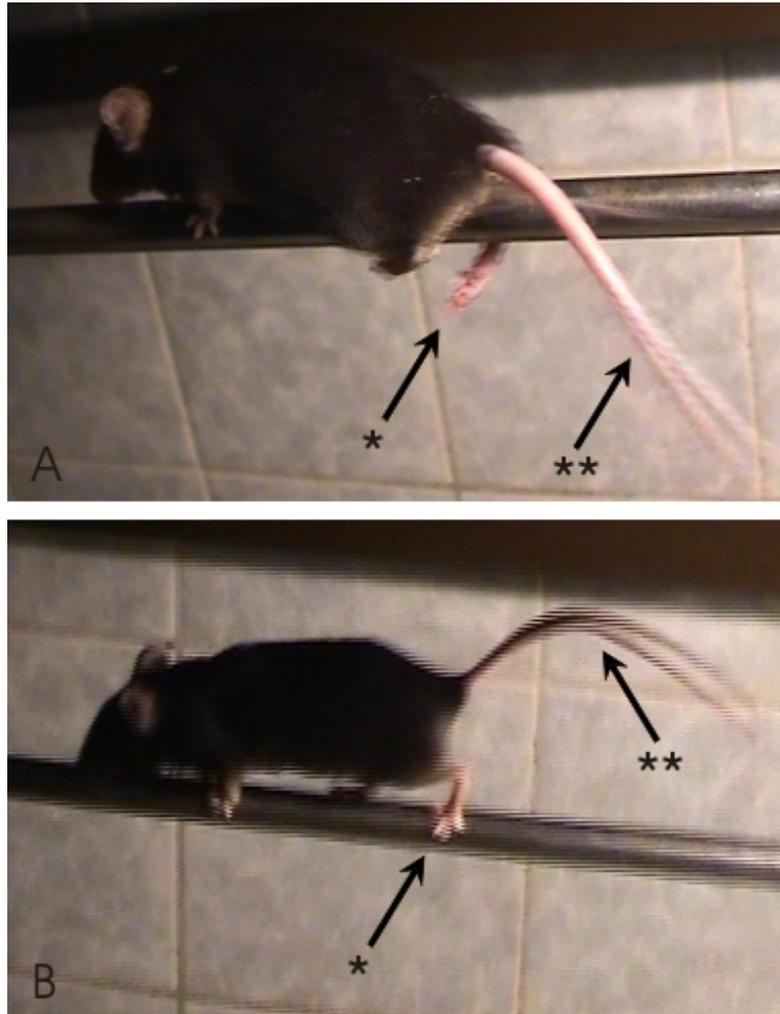


Abb. 3.10.: Momentaufnahmen des Laufes über den runden, 1,7 cm starken Balken einer mut621C-Synphilin-1- (A) und einer Kontrollmaus (B). Es sind zwei große Unterschiede ersichtlich, die dazu führen, dass die Kontrollmäuse das Hindernis schneller und sicherer überqueren können. Bei den transgenen Mäusen ist ein häufiges Abrutschen der Hinterbeine (siehe Pfeil, markiert mit einem Stern) zu beobachten. Außerdem ist die Haltung des Schwanzes (siehe Pfeil, markiert mit zwei Sternen) unterschiedlich.

Der Lauf der unterschiedlichen Mauslinien lässt sich aber nicht nur an Hand der gemessenen Zeiten charakterisieren. Es wurden auch Unterschiede im Laufverhalten beobachtet. Während die Kontroll-Mäuse auch noch auf dem mittleren runden Balken keine Auffälligkeiten zeigten, zeigten die transgenen Mäuse erste Schwächen beim Überqueren des Hindernisses (siehe Abb. 3.10.). So rutschten sie öfter mit Ihren Hinterbeinen von der Stange ab. Des Weiteren benötigten die transgenen Mäuse ihren Schwanz zum Gleichgewichtsausgleich. In Abb. 3.10. ist dies gut ersichtlich, dass die transgene Maus ihren Schwanz unterhalb der Stange hält.

3.1.2.2. Auswertung des Expressionsverhalten der beiden transgenen Mauslinien

Das Aufstellen und Vergleichen des mRNA-Expressionsprofils der WT621R- und der mutC612-Synphilin-1-Mäuse erfolgte mittels Micro-Array-DNA-Chips der Firma Affymetrix. Dazu wurden aus jeweils drei 3-Monate alten, männlichen, heterozygoten Tieren jeder

3. Ergebnisse

Linie die Gehirne präpariert und lysiert. Aus den Lysaten isolierte man die mRNA und retranskribierte sie in DNA. Diese wurden auf je einen DNA-Chip hybridisiert und die Bindungsintensitäten gemessen, so dass man quantitative Rückschlüsse auf die mRNA-Menge ziehen kann.

Als Kontrolle dienten Ergebnisse früherer Experimente mit C57Bl/6 Mäusen. Das Translationsniveau der verschiedenen Gene der Kontrollmäuse wurde denen der transgenen Mäuse gegenübergestellt. Dabei zeigte sich ein starker Unterschied in der Anzahl der regulierten Genen zwischen den transgenen WT R621 und den mut C621 Tieren (siehe Abb. 3.11). So wurden bei den transgenen mut C621 Mäusen nur 188 Gene unterschiedlich translatiert, während es sich bei den WT R621 Mäusen um 772 handelt. Von diesen sind 107 gemeinsame Gene unterschiedlich translatiert.

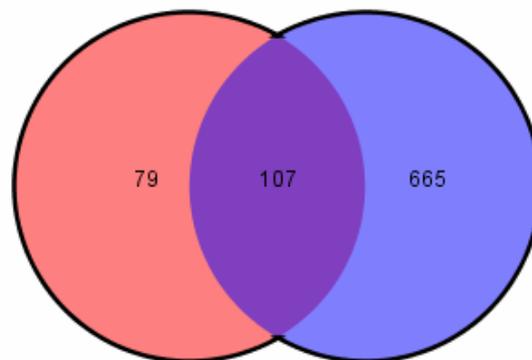


Abb. 3. 11.: Vergleich der Anzahl der regulierten Gene der transgenen mut C621 Mausgruppe (rote Kreisfläche) und der WT R621 (blaue Kreisfläche) Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe, bestehend aus drei nicht-transgenen Hintergrundtieren (C57Bl/6). Es ist ersichtlich, dass bei der mut C621 Mauslinie nur 188 Gene im Vergleich zu den Kontrollmäusen hochreguliert sind, während sich bei den WT R621 Mauslinien 772 Gene anders reguliert waren. Von diesen Genen sind in beiden Mauslinien 107 identische Gene (lilafarbener Bereich in der Schnittmenge der beiden Kreise) reguliert.

Im Anschluss wurden die gemittelten Expressionsprofile der beiden transgenen Mauslinien gegeneinander verglichen, um den Einfluss des mutierten Synphilin-1 gegenüber dem normalen Synphilin-1 untersuchen zu können. Dazu wurde die Software *Ingenuity Pathways Analysis* von Ingenuity Systems (Redwood City, USA) verwendet, die automatisch Stoffwechselwege und Proteinnetzwerke aufzeigen, in denen sich die unterschiedlich stark translatierten Gene befinden. So können die dazugehörenden Proteine in Zusammenhänge gestellt werden (siehe Abb. 3.12.).

Es wurden vier unterschiedlich regulierte Gene genauer untersucht (in Abb. 3.12. rot umrandet): SP1 (*network1*), ROCK1 (*network1* und *network2*), BIRC4 (*network2*) und PTEN (*network3*), die interessant für die Pathogenese der Parkinson'schen Krankheit sein könnten. Die

verschiedenen Faktoren der unterschiedlichen Expressionsraten zwischen der WT R621- und der mut C621-Synphilin-1-Mäuse sind in Tabelle 3.1. zusammengefasst.

Tabelle 3.1.: Zusammenfassung der Expressionsunterschiede der untersuchten Gene zwischen der WT- zur mutSynphilin-1 Mauslinie. Der Faktor des Unterschiedes bezieht sich dabei auf die WT-Synphilin-1 Mauslinie.

Name des Gens	X-Wert (aus Abb. 3.12.)	F-Wert ($F = 2^X$)
SP1	-2,163	0,22
ROCK1	-1,097	0,47
BIRC4 / XIAP	3,5097	11,39
PTEN	-1,511	0,35

Die F-Werte bzw. Expressions-Faktoren geben an, wie groß der Unterschied der exprimierten Menge der einzelnen Gene zwischen den beiden Mauslinien ist. Dabei liegt der Wert von WT 621R-Synphilin-1 immer bei ‚1‘ und der der mut 621C-Synphilin-1 Linie ist in Tabelle 3.1. ersichtlich. So liegt der Expressionslevel von SP1 bei mut 621C-Synphilin-1 im Vergleich zu WT 621R-Synphilin-1 bei etwa $\frac{1}{4}$, bei ROCK1 bei etwa der Hälfte, bei PTEN $\frac{1}{3}$. Das Gen BIRC4 ist hingegen in der mutSynphilin-1 um mehr als den Faktor elf erhöht.

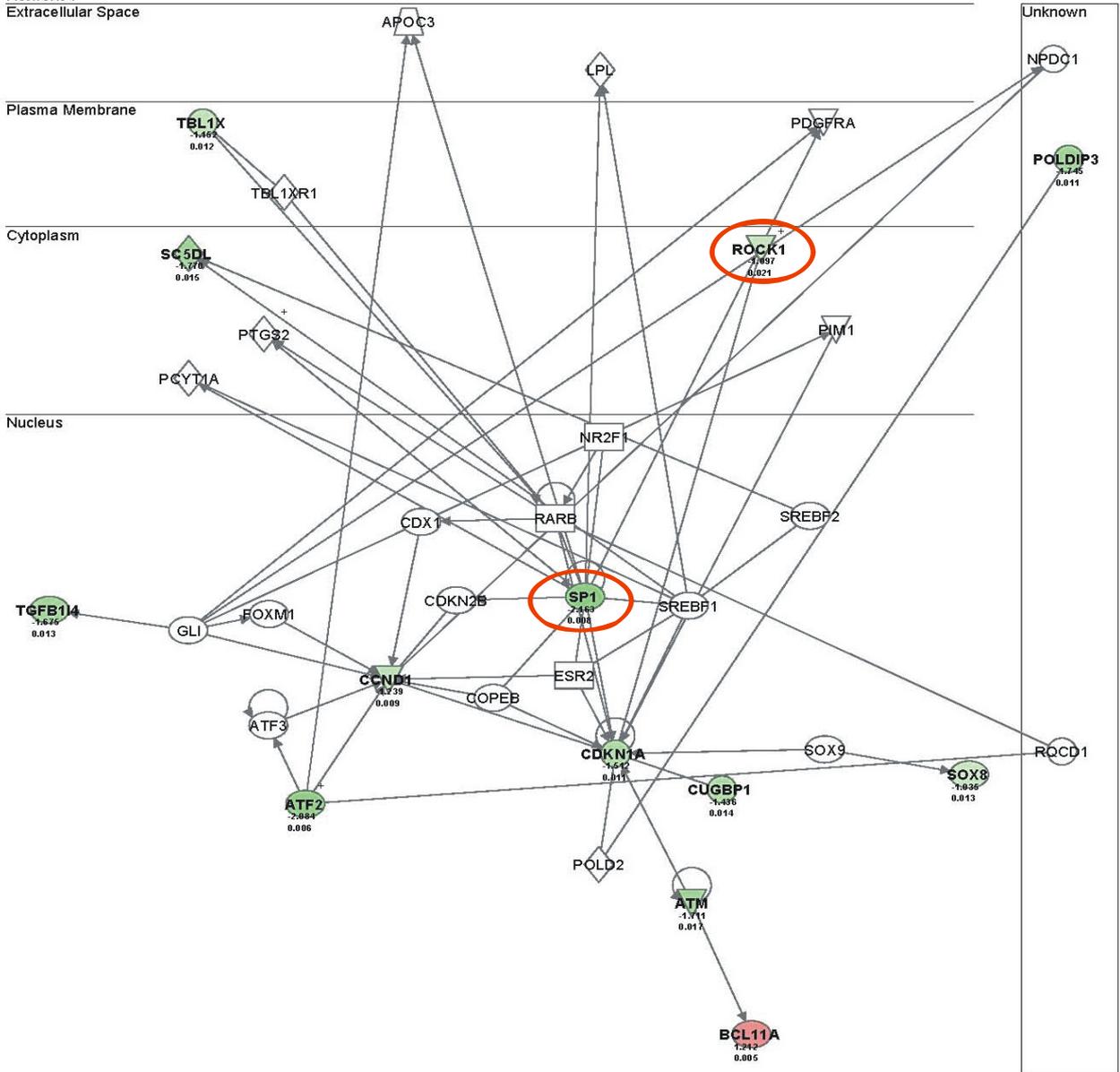
Zusätzlich wurden die Veränderungen der Expressionslevel der oben beschriebenen Proteine ins Verhältnis zu Kontrolltieren gesetzt. In Tabelle 3.2. sind die F-Werte dargestellt, wobei die Kontrolle den Wert ‚1‘ erhält und so leicht die Abweichung erkennbar ist.

Tabelle 3.2.: Vergleich der Expressionslevel der vier für die Pathogenese interessanten Genen zwischen der WT R621- und der mut C621 Synphilin-1 Mauslinie jeweils in Bezug zu Kontrolltieren.

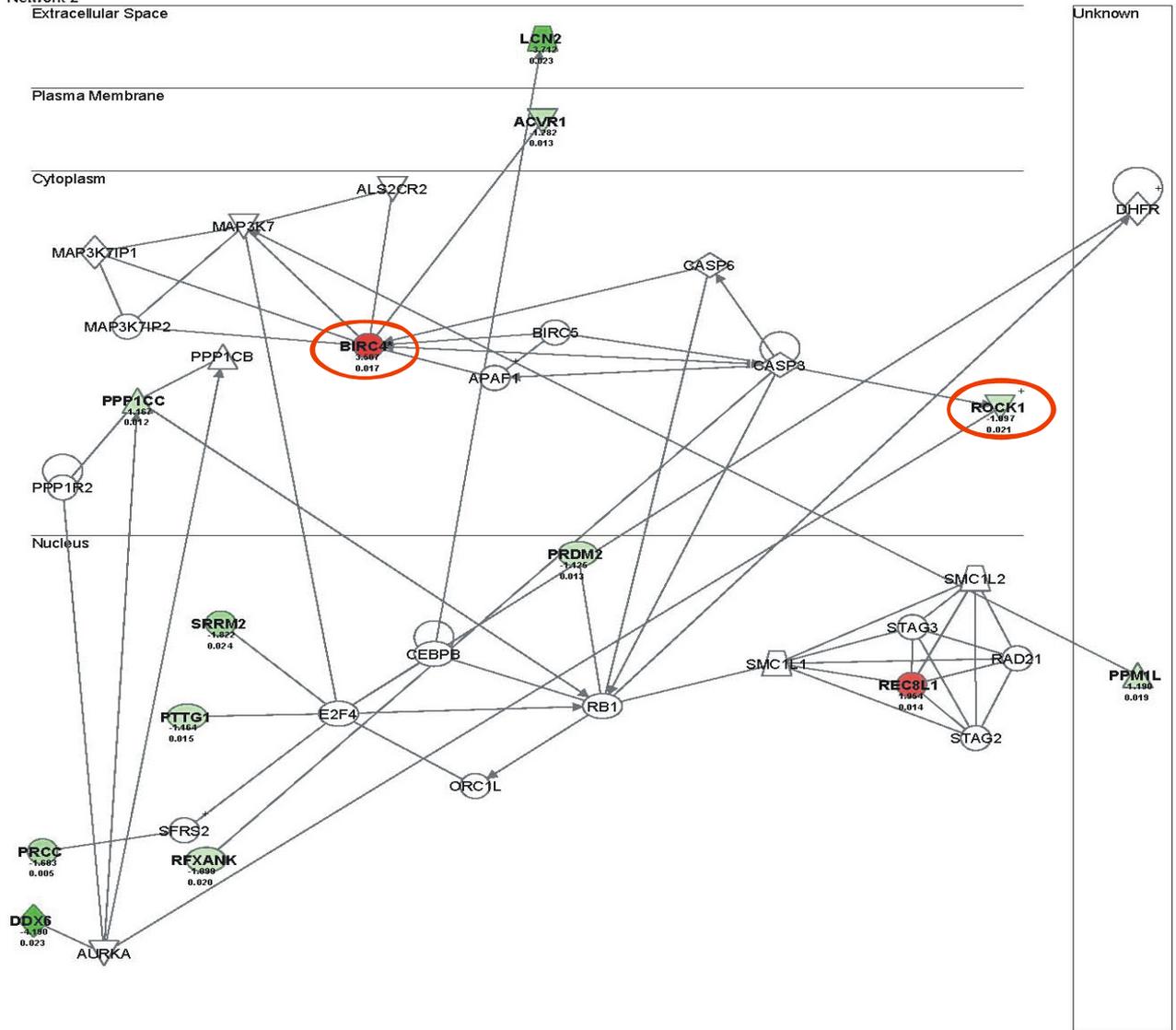
Name des Gens	C57Bl/6 vs. WT R621 Synphilin-1	C57Bl/6 vs. mut C621 Synphilin-1
SP1	3,33	0,60
ROCK1	2,03	0,96
BIRC4 / XIAP	0,48	1,73
PTEN	8,19	3,16

3. Ergebnisse

sphwt_vs_sphmut: 2vs3_ingenuity_Allein.txt
 Network 1
 Extracellular Space



sphwt_vs_sphmut: 2vs3_ingenuity_Allein.txt
 Network 2



3. Ergebnisse

sphwt_vs_sphmut: 2vs3_ingenuity_Allein.txt
 Network 3
 Extracellular Space

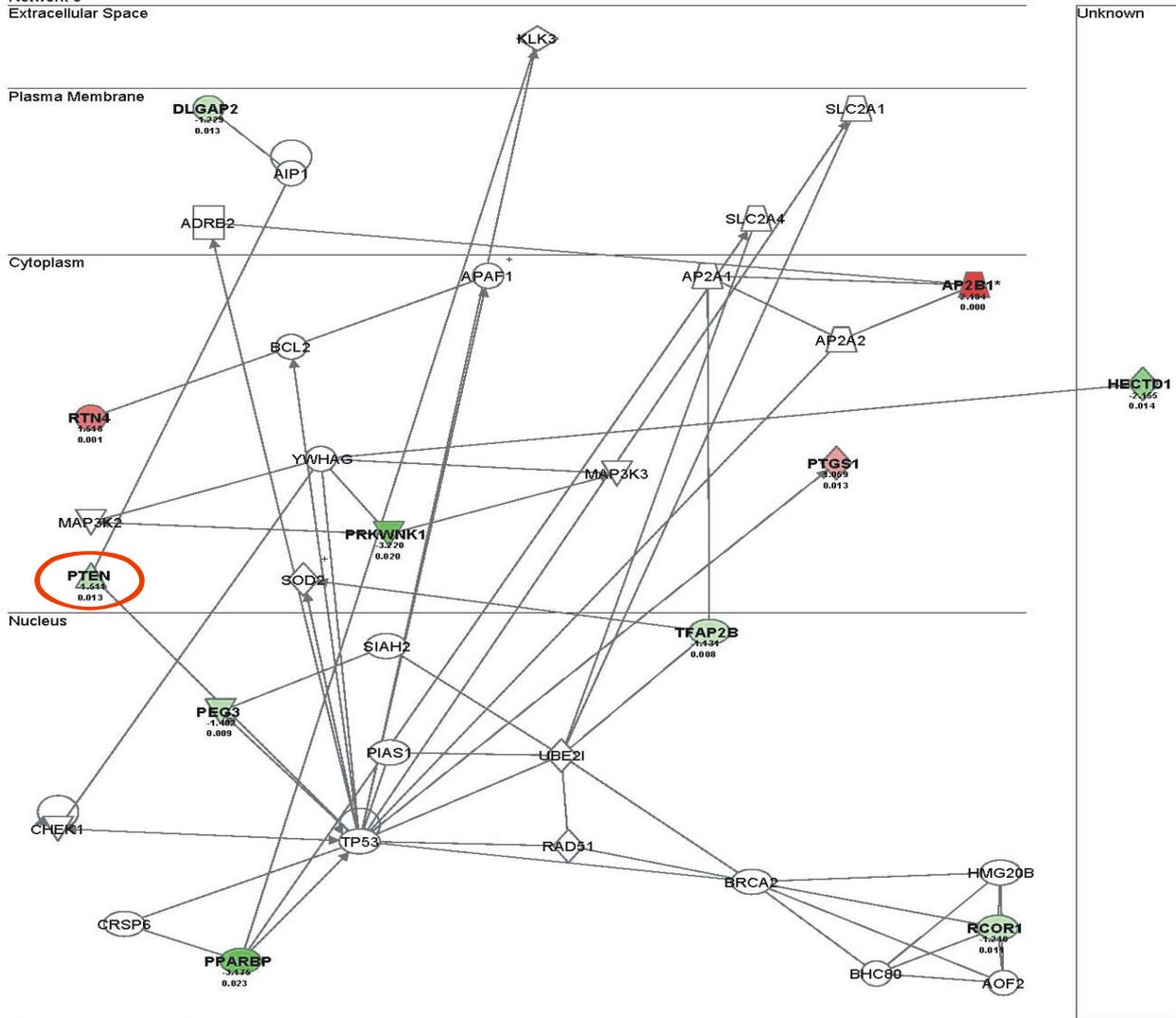


Abb. 3.12.: In dieser Abbildung sind drei verschiedene Protein-Netzwerke dargestellt, deren Gene in den mut621C- im Verhältnis zu den WT621R-Synphilin-1-Mäusen hoch- (rot) bzw. herunterreguliert (grün) sind. Damit das Netzwerk zustande kommt, werden zusätzlich nichtregulierte Proteine (weiß) eingezeichnet. Die einzelnen Netzwerke sind in Zellkompartimente eingeteilt, wobei sich bisher noch nicht lokalisierten Proteine in der rechten Spalte (bezeichnet mit *unkown*) befinden. Der Faktor der Genregulation lässt sich anhand des Wertes unter dem Namen des entsprechenden Gens nach der Formel: $F = 2^X$ berechnen. Vier ausgesuchte Gene (rot umrandet) wurden für besonders interessant erachtet und mittels Western-Blot verifiziert.

3.1.2.2.1. Transkriptionsfaktor SP1

Der Transkriptionsfaktor SP1 bindet an verschiedene GC-Boxen (GGGGCGGGG) und reguliert bzw. aktiviert so die Expression einer Vielzahl an Genen (Li et al., 2004). Dabei befinden sich auch zwei Gene, die in enger Beziehung zur Pathogenese von Parkinson stehen: die Monoaminoxidase B (MAO B) (Wong et al., 2001) und der Dopamintransporter (DAT) (Wang and Bannon, 2005). Die MAO B oxidiert Dopamin (DA) zu Dihydroxyphenylsäure (DOPAC) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Maker et al., 1981; Gesi et al., 2001). Das dabei gebildete

H₂O₂ führt dann zu den in der Einleitung beschriebenen Folgen eines oxidativen Stresses innerhalb der dopaminergen Zellen. Bei DAT handelt es sich um ein Plasmamembranprotein, welches freigesetztes DA aus dem synaptischen Spalt wieder in die präsynaptischen Nervenenden zurücktransportiert. Es steuert so die DA-Menge und deren Aufenthaltsdauer in der extrazellulären Region.

3.1.2.2.2. PTEN (phosphatase and tensin homolog on chromosome ten):

PTEN wurde als Tumorsuppressor-Gen identifiziert (Cantley and Neel, 1999). Das Protein besitzt eine Tyrosinphosphatase Domäne mit zweifacher Spezifität: zum einen als Proteinphosphatase, zum anderen eine sehr signifikante Affinität zum Lipid Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP3) (Maehama et al., 2000). Der Phosphoinositol-3-kinase (PI3K) Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle einer Vielzahl biologischer Prozesse; unter anderem beim Überleben der Zelle, Zellteilung, Wachstum und Zellmotilität (Vanhaesebroeck et al., 2001; Cantley, 2002). Aktivierte PI3K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP2) zu PIP3 (Fruman et al., 1998). PIP3 ermöglicht der *PIP3-dependent kinase* (PDK) die Aktivierung der Protein Kinase B, die zum Überleben der Zelle beiträgt (Stokoe et al., 1997). Dieser Signalweg wird durch Dephosphorylierung von PIP3 durch PTEN negativ reguliert, so dass die Expression von PTEN in Zellen zu erhöhter Apoptose führt (Davies et al., 1998). Interessanterweise gilt das Parkinson-relevante Protein DJ-1 (PARK7) als ein Negativregulator von PTEN (Kim et al., 2005a).

3.1.2.2.3. BIRC4 oder XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis)

Ein wichtiger Schritt in der Entstehung von Apoptose ist die Aktivierung von verschiedenen Cystein-Proteasen, sog. Caspasen, die ihre Substrate an spezifischen Aspartaten schneiden (Thornberry and Molineaux, 1995). Caspasen werden als inaktive Pro-Caspasen exprimiert und erst durch proteolytischen Verdau aktiviert. Die Caspase-9 ist der Initiator einer Kaskade, die durch ein mitochondriales Apoptosesignal (Freisetzung von Cytochrom C) autoproteolytisch aktiviert wird (Li et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass XIAP an die Caspase-3, -7 und auch -9 sehr stark bindet, diese inaktiviert und als effizientester Inhibitor der Apoptose seiner Familie gilt (Deveraux et al., 1997). Für diese Inhibition besitzt diese Proteinfamilie bis zu drei verschiedene *baculoviral IAP repeat* (BIR) Domänen, die spezifisch mit unterschiedlichen Caspasen interagieren. XIAP besitzt zusätzlich eine C-terminale *Really Interesting New Gene* (RING) finger Domäne (Deveraux et al., 1997). Somit besitzt auch XIAP, genau wie Parkin (PARK2), die Funktion einer E3-Ligase und spielt eine Rolle in der Markierung

3. Ergebnisse

zur Degeneration von Proteinen über das Proteasom (Pickart, 2001). Ein Kandidat dieser E3-Ligaseaktivität von XIAP ist z. B. die Caspase-9.

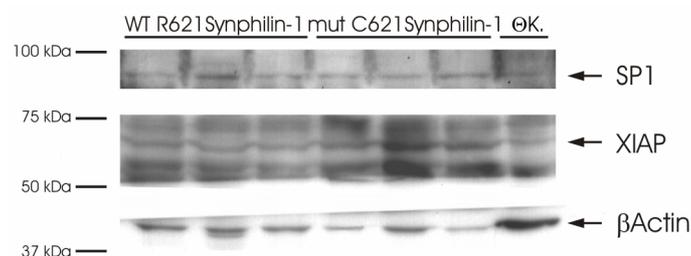
Das Parkinson- Suszeptibilitätsgen Omi/HtrA ist ein Inhibitor von XIAP und inaktiviert dieses bei Freisetzung aus den Mitochondrien durch kompetitive Bindung an XIAP (Martins *et al.*, 2002).

3.1.2.4. ROCK1 (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1)

ROCK1 ist eine Serin/Threonin Kinase, die durch GTP-gebundenes Rho aktiviert wird. Diese Kinase phosphoryliert eine große Anzahl von Signalproteinen und reguliert unter anderem den Aufbau des Actin-Zytoskeletts (Maekawa *et al.*, 1999) und die Kontraktion des glatten Muskelfasern (Van Eyk *et al.*, 1998). Für die Hirnforschung spielt die Regulation des Neuri-tenfortsatzwachstums in Kultur eine weitaus größere Rolle. Es wird vermutet, dass Überex-pression von vorherrschend aktivem ROCK axonales Wachstum verhindert. Der Rho/ROCK Signalweg ist der kritische Schritt in der Einleitung von axonalem Wachstum (Bito *et al.*, 2000). Zusätzlich wird ROCK1 auch durch die Caspase-3 aktiviert, indem die C-terminale, inhibitorische Domäne entfernt wird. Die Aktivierung durch die Caspase wird für die mor-phologische Blasenbildung von apoptotischen Zellen verantwortlich gemacht (Sebbagh *et al.*, 2001).

3.1.2.3. Verifizierung der gewonnenen Microarray-DNA-Chip Daten

Um die gewonnenen Daten des DNA-Chip-Experiments zu verifizieren, wurden Western-Blots mit entsprechenden Antikörpern gegen diese vier Proteine durchgeführt. Dazu opferte man von jeder Mauslinie drei Mäuse und lysierte deren Gehirne. Ein gleichmäßiges Auftragen der Proteinmenge gewährleistete die detektierte Proteinmenge mit Antikörpern gegen das *house-keeping gene* β -Actin.



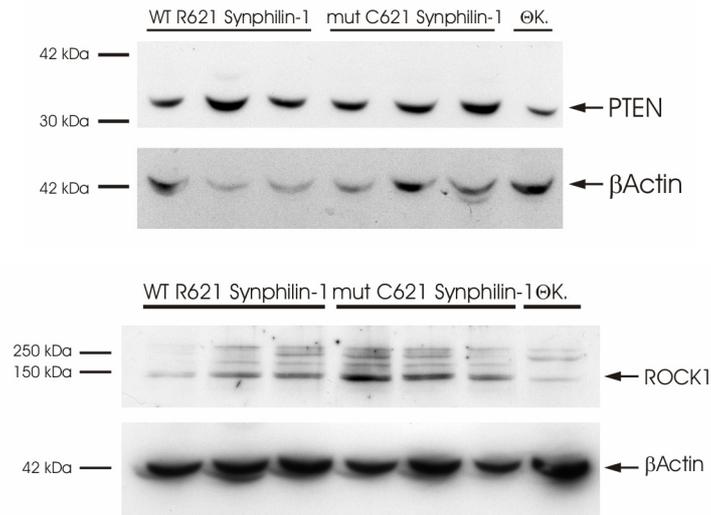


Abb. 3.13.: Western-Blots mit Antikörper gegen die vier ausgewählten Proteine SP1, XIAP, PTEN und ROCK1. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein aus Hirnlysate drei transgener Mäuse jeder Mauslinie. Zusätzlich wurde noch eine Negativkontrolle (ØK. – C57/Bl6-Maus) aufgetragen. So konnte nicht nur der Vergleich der unterschiedlichen Proteinexpressionen zwischen den beiden Mauslinien verglichen werden, sondern auch mit den Kontrollmäusen untersucht werden. Als Ladekontrolle diente bei jedem Western-Blot ein Antikörper gegen das *house-keeping gene* β-Actin.

Während der Expressionslevel von Proteinen bei der Methode der DNA-Chips indirekt erfolgt und nur die Mengen an mRNA bestimmt, wird die reale Proteinmenge mittels Western-Blot nachgewiesen.

Vergleicht man die Bandenstärken der Proteine in Bezug auf die aufgetragene gesamte Proteinmenge, die durch die Ladekontrolle ersichtlich wird, kann man diese mit den Werten der DNA-Chips vergleichen (siehe Tabelle 3.3). Da die Bestimmung der Banden nur semiquantitativ erfolgt, kann jeweils nur eine Tendenz wiedergegeben werden.

Tabelle 3.3.: In dieser Tabelle wird gezeigt, inwieweit die Daten und die Tendenzen der Veränderungen der mRNAs, gewonnen aus den DNA-Chip Experimenten, mit denen der Western-Blots übereinstimmen. Das Zeichen ‚Ø‘ bedeutet, dass keine Übereinstimmung ersichtlich ist, während ‚✓‘ für eine gleiche Tendenz steht.

Gen bzw. Protein	Westernblot stimmt mit Ergebnissen der DNA-Chips tendentiell überein		
	WT vs. mut	C57Bl/6 vs. WT	C57Bl/6 vs. mut
SP1	Ø	✓	Ø
BIRC4 / XIAP	Ø	Ø	Ø
PTEN	Ø	✓	✓
ROCK1	Ø	✓	✓

Nur wenige Ergebnisse der Western-Blots stimmen mit denen der DNA-Chip-Experimenten überein.

3.1.2.4. Quantifizierung von Neurotransmittern und ihren Stoffwechselprodukten

In diesem Versuch wurden die Konzentrationen der Neurotransmitter Dopamin (DA) und Serotonin (5'-Hydroxytryptamin; 5'-HT) und deren Stoffwechselprodukte DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylethylsäure) und Homovanilinsäure (HVA) bzw. 5-HIAA (5-Hydroxy-indoyl-essigsäure) in den beiden transgenen Synphilin-1-Mausmodellen miteinander verglichen. Zusätzlich wurden C57/Bl6-Mäuse als Kontrollen verwendet. Dazu wurden aus den getöteten Mäusen das Striatum und die *Substantia nigra pars compacta* herauspräpariert, ly-siert und die Menge mittels *high pressure liquid chromatography* (HPLC) bestimmt.

Dopamin wird mittels MAO B zu DOPAC umgewandelt (siehe Abb.1.5.), dann aus der Zelle transportiert und dort in HVA verstoffwechselt. Durch Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Moleküle kann geklärt werden, ob weniger DA gebildet oder mehr DA abgebaut wird und, ob dieser Abbau intra- oder extrazellulär stattfindet. Bei Serotonin handelt es sich um einen Antagonisten von Dopamin (Huttunen, 1995), so dass die Wirkung und die Höhe

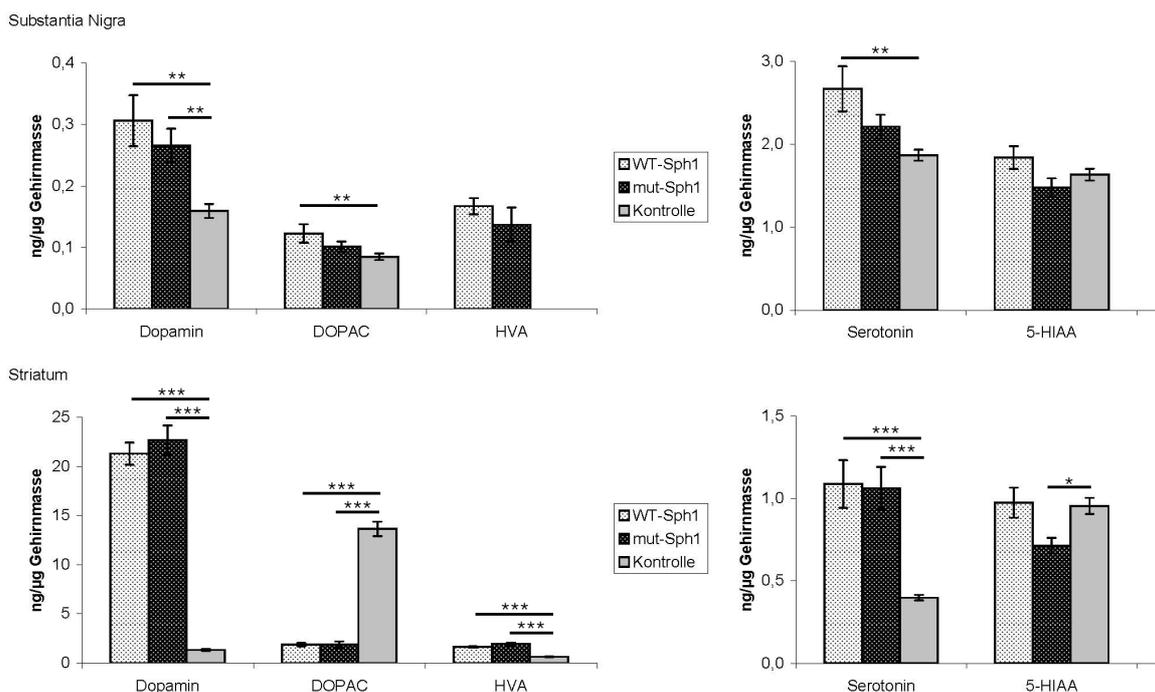


Abb. 3.14.: Auf der linken Seite dieser Abbildung befinden sich die Konzentrationen von Dopamin und seiner Metaboliten innerhalb des Substantia nigra und im Striatum. Die rechte Seite zeigt Serotonin und sein Abbauprodukt 5-Hydroxy-indoyl-essigsäure (5-HIAA). Die nach einer Varianz-Analyse berechneten Signifikanzbalken stellen die entsprechenden Balken der Diagramme in Beziehung; mehr dazu im Text. Die Sternchen (*) in der Grafik geben die berechneten Signifikanzwerte an (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ und ***: $p < 0,001$). Bei der Messung von HVA in den Kontrollmäusen konnte keine Konzentration bestimmt werden, so dass eine statistische Auswertung nicht möglich ist.

der DA-Konzentration in der Pathogenese von Morbus Parkinson auch von der des Serotonin abhängt. Die Untersuchung des Metaboliten 5'-HIAA lässt auf eine Veränderung der Konzentration von Serotonin schließen.

Der Unterschied zwischen Dopamin in der Substantia nigra zwischen den transgenen Tieren und der Kontrolle ist signifikant ($F(2, 19) = 9,00$, $p = 0,0018$). Das Gleiche gilt für die Konzentrationen innerhalb des Striatums ($F(2, 20) = 194,00$, $p < 0,0001$). Während die Konzentration des Stoffwechselproduktes DOPAC im Striatum bei beiden transgenen Tieren höchst signifikant gesenkt ist ($F(2, 20) = 113,21$, $p < 0,0001$), zeigt sich eine Signifikanz in der SNpc nur bei der WT-Synphilin-1-Maus ($F(2, 20) = 4,06$, $p = 0,0031$). Bei der Messung von Homovanilinsäure (HVA) in der SNpc konnte bei den Kontrollmäusen keine messbare Menge bestimmt werden, so dass eine statistische Auswertung nicht möglich ist. Innerhalb des Striatums konnte ein höchst signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen ($F(2, 20) = 65,18$, $p < 0,0001$) festgestellt werden.

Der Unterschied zwischen Serotonin im Striatum ist höchst signifikant ($F(2, 20) = 18,93$, $p < 0,0001$) zwischen den transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrollmäusen, während in der SNpc ein signifikanter Unterschied nur zwischen den WT-Synphilin-1 Mäusen und den Kontrollmäusen aufzufinden war ($F(2, 20) = 6,32$, $p = 0,0075$). Der Unterschied des Metaboliten von Serotonin 5'-HIAA ist nur im Striatum zwischen dem transgenen, mutierten Synphilin-1 und den Kontrollmäusen signifikant ($F(2,20) = 4,04$, $p = 0,0336$).

3.2. Auffinden von neuen Interaktionspartnern von Synphilin-1

3.2.1. Allgemeines

Die Funktion von Synphilin-1 liegt bisher immer noch im Dunkeln. Aus den vorhergesagten Domänen lassen sich keine Rückschlüsse auf das Wirken des Proteins schließen. Die Ankyrin-like Domain wurde nach dem Protein Ankyrin benannt. Ankyrin ist ein Vermittler zwischen Spectrin-Domänen und integralen Membranproteinen (Batrakova et al., 2000). Spectrin hingegen ist bekannt als Membran-Strukturprotein, welches zusammen mit Actin innerhalb der Erythrocyten die Eigenschaften der Zellmembran reguliert (Bennett, 1989). So kann das Erscheinungsbild der Erythrozyten von der normalen in die „Pantoffelform“ verändert werden, die es den roten Blutkörperchen ermöglicht, auch die vom Durchschnitt her viel zu kleinen Kapillaren zu durchwandern. Für genauere Einblicke in die Funktion von Synphilin-1 wäre das Auffinden der spezifischen Membranproteine hilfreich. Die Coiled-coil-Domäne (Aminosäure 515 bis 552) gehört auch in die Klasse der Domänen, die durch Interaktionen das Zytoskelett von Zellen aufbauen und stabilisieren. Beide Domänen sind in diesem Zusammenhang für die Erklärung der Funktion nicht hilfreich. Neben der Schlussfolgerung der Funktion aus der Domänenstruktur ist das Auffinden von Interaktionspartnern hilfreich. Synphilin-1

selbst wurde als Interaktor von α -Synuklein aufgefunden und gelangte so in das Interesse der Parkinson-Forschung (Engelender *et al.*, 1999). Später wurde die Interaktion mit der E3-Ligase Parkin aufgefunden (Chung *et al.*, 2001). Beide Wechselwirkungen konnten mittels der Hefe Zwei-Hybrid-Methode (*yeast 2-hybrid* – Y2H) nachgewiesen werden. Zusätzlich bestätigte das Auffinden in Lewy-Körperchen diesen Verdacht (Wakabayashi *et al.*, 2002).

Um mehr von der Funktion von Synphilin-1 im Allgemeinen und im Speziellen in der Pathologie von Morbus Parkinson zu verstehen, haben wir ein Y2H-screening durchgeführt. Die neuen Interaktionspartner sollen helfen, Synphilin-1 besser zu charakterisieren. Ein Y2H-screening mit Synphilin-1 wurde zuvor schon durchgeführt und dabei die E3-Ligasen SIAH-1 und SIAH-2 als Interaktionspartner identifiziert (Liani *et al.*, 2004). Auch wir verwendeten für unseren Y2H-screening die klassische Methode, die nur lösliche, zytosolische Proteinwechselwirkungen auffinden kann. Dennoch können weitere Interaktionspartner herausgefischt werden, wenn eine andere cDNA-Bank verwendet wird.

3.2.2. Hefe zwei-Hybridscreening

Für das bessere Verständnis der Funktion von Synphilin-1 wurde ein Hefe Zwei-Hybrid screening durchgeführt. So sollten neue Interaktionspartner identifiziert werden. Da das Vorhandensein der Ankyrin-like repeats und der coiled-coil Domäne auf viele unspezifische Bindungspartner schließen lässt wurde nur die Sequenz der Aminosäuren 1-348 und 557-920 verwendet. Die ersten vier Ankyrin-like repeats, die coiled-coil Domäne und die GTP/ATP-Bindungsdomäne wurden so aus der cDNA entfernt.

3.2.2.1. Synphilin-1-Konstrukt A (Aminosäure 1-348 und 557-920)

Das neue Konstrukt wurde an Dualsystems Biotech AG (Zürich, CH) geschickt, die das screening für uns durchführten. Sie klonierten das Konstrukt in den pLEXA-dir (*bait*)Vektor, transformierten das gewonnene Plasmid zusammen mit einem leeren pACT2- (*prey*)Vektor in den Hefestamm L40 und testeten, ob er selbstaktivierend ist. Es ist leicht ersichtlich, dass das erste Synphilin-1-Konstrukt selbstaktivierend war (siehe Abb 3.15.).

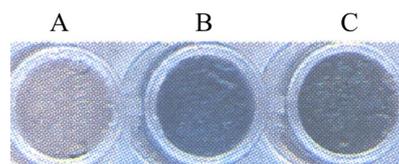


Abb. 3.15.: Nachweis der Selbstaktivierung des ersten Synphilin-1-Konstruktes, durchgeführt von Dualsystems Biotech AG (Zürich, CH). Eine blaue Färbung zeigt die Aktivierung des Reportergens β -Galactosidase an. **A:** Negativkontrolle; **B:** Synphilin-1-Konstrukt in pLEXA-dir; **C:** Positivkontrolle

3.2.2.2. Synphilin-1-Konstrukt B (Aminosäure 177-348 und 557-920)

Von Dualsystems AG wurde vorgeschlagen, die ersten 176 Aminosäuren zusätzlich zu entfernen. Es handelt sich dabei vorwiegend um saure Aminosäurereste. Saure Aminosäurereste sind oft mit aktivierenden Regionen von Transkriptionsfaktoren assoziiert worden (Ma *et al.*, 1987; Ruden *et al.*, 1991; Ruden, 1992). Nach dieser weiteren Verkürzung des Synphilin-1 Konstrukts konnte keine Selbstaktivierung mehr festgestellt werden.

Dualsystems AG konnte vier Klone finden, die mit Synphilin-1 positiv interagierten. Anhand der Sequenzen konnten drei verschiedene, neue Interaktionspartner ermittelt werden:

1. Duo/HAPIP – Sequenzbereich von Aminosäure 717 bis 1664.
2. Periphilin-1 – Sequenzbereich von Aminosäure 2 bis 1337.
3. Proteinphosphatase 1, katalytische Untereinheit, α -Isoform – Sequenzbereich von Aminosäure 19 bis 239.

Das Protein Periphilin-1 und seine Interaktion mit Synphilin-1 wurde von Anne Söhn charakterisiert (Söhn, A *et al.*, eingereicht). Der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1 wurde bisher – aus Zeitmangel – noch keine Aufmerksamkeit geschenkt.

3.2.3. Charakterisierung der Interaktion zwischen Duo und Synphilin-1

3.2.3.1. Eingrenzung des Interaktionsbereiches von Synphilin-1:

Es wurde für den Y2H-screening keine fortlaufende Sequenz von Synphilin-1 verwendet. So kann die Interaktion durch eine neu auftretende Tertiärstruktur des Hybridmoleküls entstanden sein. Deshalb wurde die Interaktion zwischen dem vollständigen Duo mit dem vollständigen Synphilin-1 Protein nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Interaktion von Synphilin-1 mit dem Duo-Ortholog aus der Ratte Kalirin-7c getestet. Kalirin-7c besitzt auf Aminosäureebene eine 98 %ige identische Sequenz zu humanem Duo. Da Synphilin-1 im *bait*-Vektor selbstaktivierend ist, wurde die Sequenz in den *prey*-Vektor kloniert. Duo und Kalirin-7c waren im *bait*-Vektor nicht selbstaktivierend.

Die bei einer Interaktion exprimierende β -Galactosidase färbt die Kolonie bei Anwesenheit von β -Galactose blau. Abb. 3.16. unterstützt so die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen den Proteinen Synphilin-1 und Duo bzw. Kalirin-7c. Das Fehlen der Blaufärbung bei Transformation der Vektoren mit entsprechenden leeren zweiten Vektoren lässt eine Selbstaktivierung der Konstrukte ausschließen.

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion auf den vorderen oder hinteren Bereich des Synphilin-1 Hybridproteins beschränkt. Dazu wurde sowohl die N-terminale, als auch die C-

3. Ergebnisse

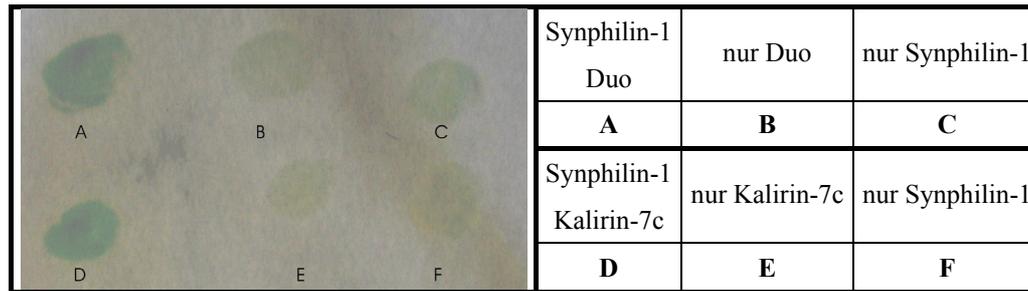


Abb. 3.16.: Verifizierung der im Yeast 2-Hybrid aufgefundenen Interaktion zwischen den Synphilin-1 und Duo-Konstrukten. Dazu wurde die Interaktion mit den vollständigen Proteinen (**A**) und zusätzlich mit dem Ratten-Ortholog von Duo, Kalirin-7c, (**D**) durchgeführt. Eine Selbstaktivierung der Konstrukte wurde mittels der Klone **B**, **C** und **E**, **F** ausgeschlossen.

terminale (in der WT621R- und mut621C-Variante) Sequenz von Synphilin-1 alleine verwendet und in den *bait*-Vektor ligiert. Jedes Plasmid wurde zusammen mit Δ Duo in pACT2 (*prey*-Vektor) in Hefe transformiert. Außerdem wurde, um Selbstaktivierung der einzelnen Konstrukte auszuschließen, leerer *prey*-Vektor zusammen mit den Synphilin-1-Konstrukten transformiert. Keines dieser Plasmide zeigte Selbstaktivierung auf.

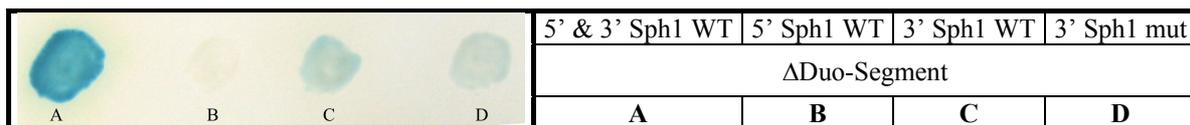


Abb. 3.17.: Nachweis der Interaktion zwischen den Synphilin-1-Konstrukten und dem aufgefundenen Duo-Segment. Für die Transformation wurde als *bait* Synphilin-1 mit der AS-Sequenz von 177-348 und 557-920 (**A**), Synphilin-1 mit dem AS-Bereich 177-348 (**B**) und Synphilin-1 mit dem AS-Bereich von 557-920 (**C** und **D**). Bei **C** handelte es sich um die WT621R- während bei **D** die mut621C-Variante verwendet wurde.

Abb. 3.17. zeigt eine sehr starke Interaktion zwischen dem Hybrid-Konstrukt und dem Duo-Segment. Bei Verwendung von 5'-Synphilin-1 wird keine β -Galactosidase gebildet, so dass auch keine Interaktion zwischen diesem Bereich und Duo stattfindet. Die Blaufärbung der letzten beiden Klone weist darauf hin, dass eine Interaktion zwischen dem C-terminalen Synphilin-1 Bereich mit Duo stattfindet. Dies beweist, dass die gefundene Interaktion nicht nur auf Grund des neugebildeten Hybridproteins zustande kam. Für das Zustandekommen der Interaktion wird von Duo der Aminosäurenbereich von 717 bis 1664 und von Synphilin-1 von 557 bis 920 benötigt.

3.2.3.2. Quantifizierung der Interaktion

Anhand von β -Galaktosidase-Filterassays ist ein quantitativer Nachweis über die Stärke der Interaktion nicht möglich. In mehreren Filterassays konnte jeweils beobachtet werden, dass die Interaktion zwischen 3' WT621R-Synphilin-1 und Δ Duo eine scheinbar intensivere und schnellere Färbung verursacht, als die mit dem mutierten Konstrukt. Deshalb wurde ein β -Galaktosidase-Assay in Flüssigkultur durchgeführt, der die Vermutung der Filterassays verifi-

zieren sollte. In zwei Ansätzen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen dem Duo-Fragment und WT621R-Synphilin-1 im Durchschnitt der vier analysierten Klone höchst signifikant ($p \leq 0,0002$) stärker war als mit der mut621C-Variante (siehe Abb. 3.18.).

In weiteren Liquid-Assays konnten die zuvor erzielten Ergebnisse nicht mehr reproduziert werden, da bei diesen Versuchen sowohl bei WT621R als auch bei mut621C Synphilin-1 gar keine Enzymaktivitäten mehr gemessen werden konnte. Der gemessene Unterschied der ersten beiden Versuche muss deshalb mit Vorsicht genossen werden.

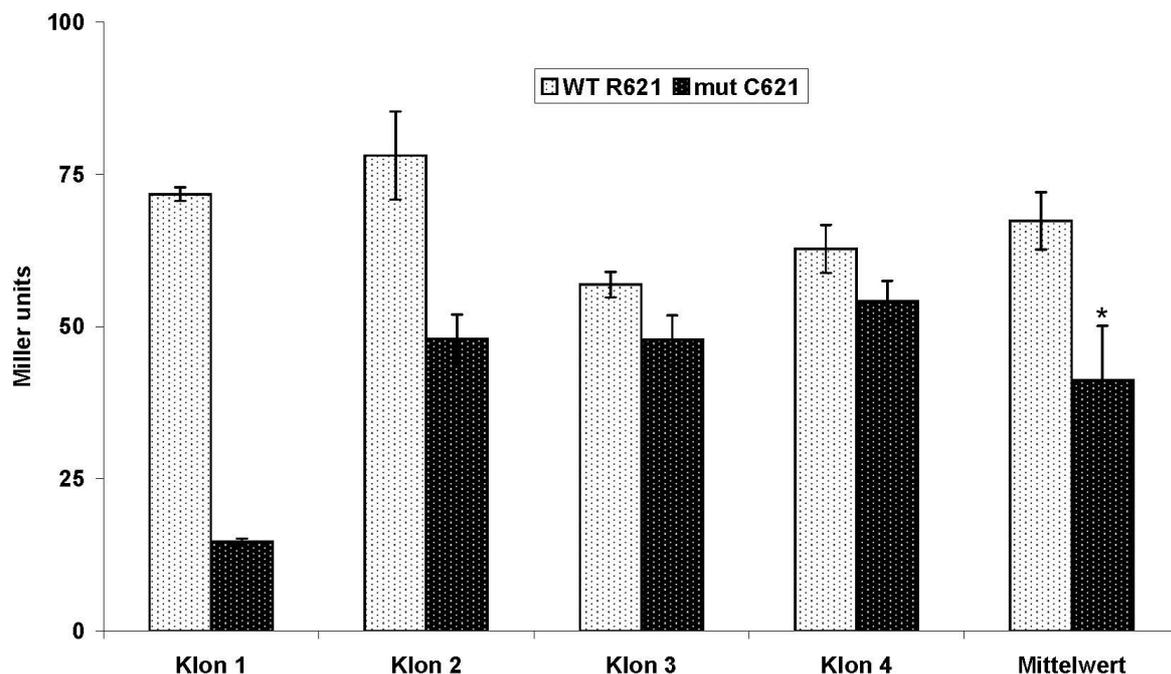


Abb. 3.18.: Quantitative Untersuchung der Interaktion zwischen WT621R und mut621C Synphilin-1 mit Δ Duo. Es wurden jeweils die Enzymaktivitäten von vier unterschiedlichen Klonen in einer 3-Fachbestimmung gemessen. Von den 4 Klonen wurde zusätzlich der Mittelwert bestimmt.

3.2.3.3. Eingrenzung des Interaktionsbereiches von Duo/HAPIP bzw. Kalirin-7:

Im nächsten Schritt sollte der Bereich des Duo-Fragments, der mit Synphilin-1 interagiert, genauer charakterisiert werden. Dazu wurden kleinere Fragmente von Duo in den *bait*-Vektor kloniert. Diese beinhalten jeweils eine einzelne Ankyrin-like Domäne (siehe Abb. 3.20.: Δ Duo 1 – 4 short) oder einen größeren Bereich zwischen diesen. Die Plasmide wurden, nachdem ihre Selbstaktivität ausgeschlossen werden konnte, zusammen mit dem C-terminalen Bereich von Wt621R-Synphilin-1 in Hefen transformiert. Keine dieser doppeltransformierten Klone wies eine Interaktion nach Lyse und β -Galactose-Färbung auf, so dass mit keinem dieser Konstrukte eine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurden anschließend größere Fragmente (siehe Abb. 3.20.: Δ Duo 1 – 4 long und Δ Duo 5) in die Vektor-

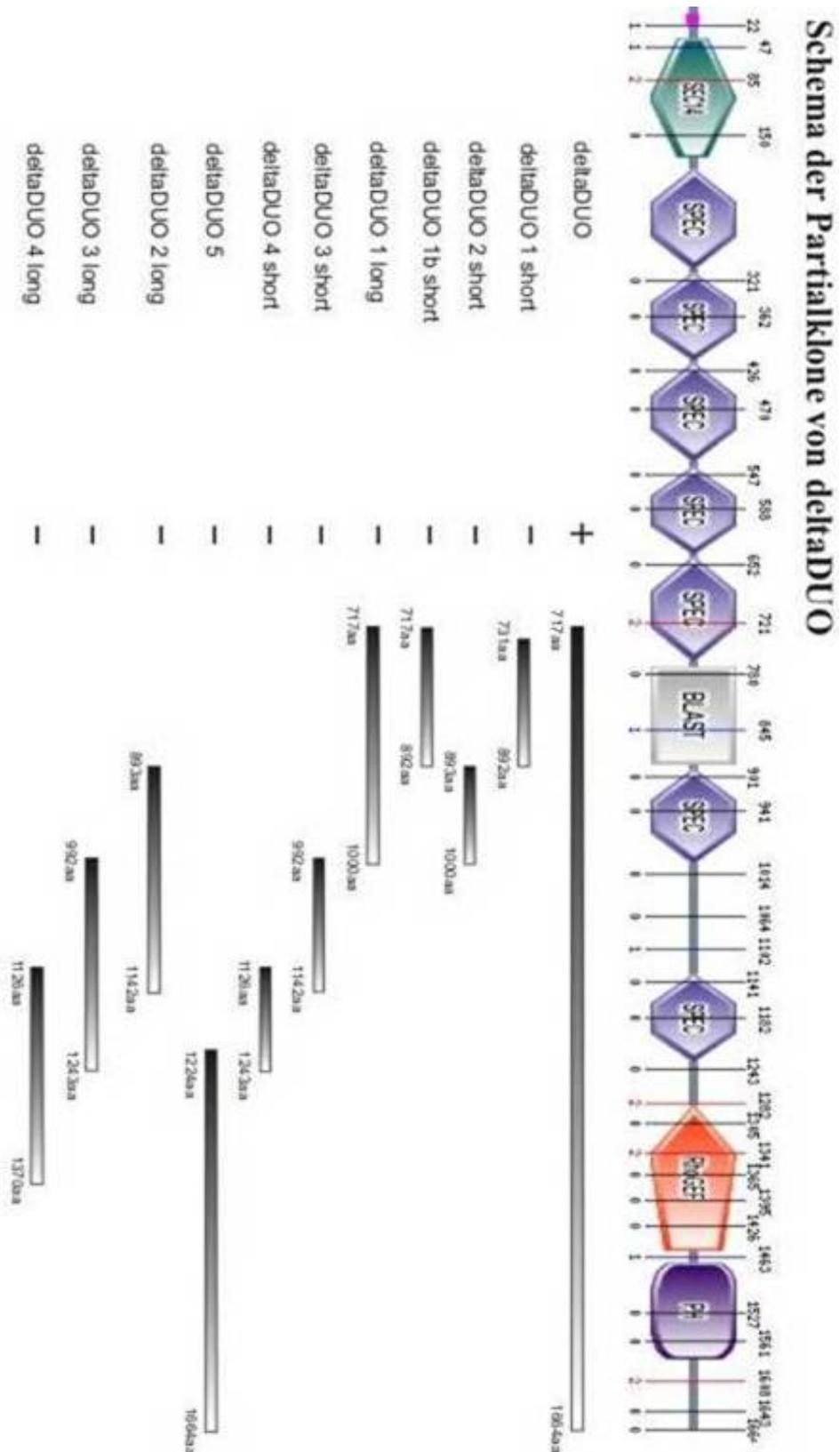


Abb. 3.19.: Zur weiteren Charakterisierung des Interaktionsbereiches wurden verschiedene Partialklone von Duo kloniert. Die Partialklone *deltaDuo 1 short* bis *deltaDuo 4 short* decken jeweils überlappend eine Spektrin-Domäne ab; die längeren Partialklone decken jeweils zwei ab. Zusätzlich wurde der *deltaDuo 5*-Klon kloniert, der den spektrin-freien C-Terminus abdeckt. Die Einteilung der Domänen fand mittels des Programms SMART (simple modular architecture research tool – <http://smart.embl-heidelberg.de/>) statt.

ren kloniert. Diese Fragmente bestanden aus jeweils zwei der kleinen, überlappenden Frag-

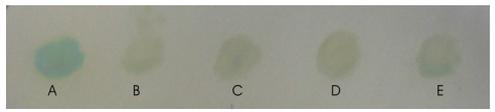
						Synphilin-1 3' WT					
						Δ Duo	Δ Duo1 long	Δ Duo2 long	Δ Duo3 long	Δ Duo4 long	Δ Duo5
						A	B	C	D	E	F

Abb. 3.20.: β -Galactosidasetest der langen Duo-Fragmente (siehe auch Abb. 3.20.). Die Interaktion zwischen Synphilin-1 3' WT und Δ Duo diente dabei als Positivkontrolle (A). Es konnte keine eindeutige Blaufärbung und damit auch keine eindeutige Wechselwirkung zwischen Synphilin-1 und den Duo-Fragmenten nachgewiesen werden (B – C).

mente. Falls für die Interaktion der Bereich zwischen den kleinen Klonen benötigt wird, werden sie durch überlappende Bereiche der großen Klone abgedeckt. Auch mit den langen Fragmenten misslang es, eine Interaktion festzustellen. Es war mir deshalb nicht möglich, den Bereich der Interaktion zwischen dem C-Terminus von Synphilin-1 und Duo enger einzugrenzen.

3.2.4. Untersuchung der Interaktion von Synphilin-1 mit Interaktionspartnern von Duo

3.2.4.1. Allgemeines zur Pathogenese des Morbus Huntington

Mit Duo konnte ein neuer Interaktionspartner von Synphilin-1 identifiziert werden. Duo wird bisher nicht mit der Parkinson'schen Krankheit in Verbindung gebracht, sondern mit der Polyglutaminerkrankung Morbus Huntington. Die Huntington'schen Krankheit wird durch die Expansion eines *CAG-repeats* im Gen, welches Huntingtin (Htt) kodiert, verursacht (Zühlke et al., 1993; Kremer et al., 1994). Je länger die Glutaminkette in diesem Protein ist, desto früher erkrankt die betroffene Person daran (Meyers, 2004; Übersichtsartikel). Als ein Interaktor von Huntingtin wurde das Protein HAP1 (huntingtin associated protein 1) identifiziert, wobei die Stärke der Interaktion mit der Anzahl der Glutamin-Wiederholungen korreliert (Li et al., 1995). HAP1 hingegen interagiert mit Duo, welches auch als HAPIP (huntingtin associated protein interacting protein) bezeichnet wird.

Tang und seine Kollegen haben das Zusammenspiel von Huntingtin und HAP1 genauer untersucht (siehe Abb. 3.21.). Dabei konnten sie einen ternären Komplex von Htt und HAP1 mit dem Ca^{2+} -Ionenkanal Inositol-3-Phosphatrezeptor (IP3R) des endoplasmatischen Retikulums aufzeigen (Tang et al., 2003). Huntingtin mit verlängertem Glutamin-repeat bindet schwächer an PSD95, dafür stärker an IP3R (Tang et al., 2003). Dies führt zu einer erhöhten Sensitivität des Rezeptors für Inositol-3-Phosphat (InsP_3) und einem damit verbundenem erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom in das Zytosol. Eine Wechselwirkung zwischen einer PDZ-Domäne von PSD95 und Kalirin-7 wurde schon früher beschrieben (Penzes et al., 2001).

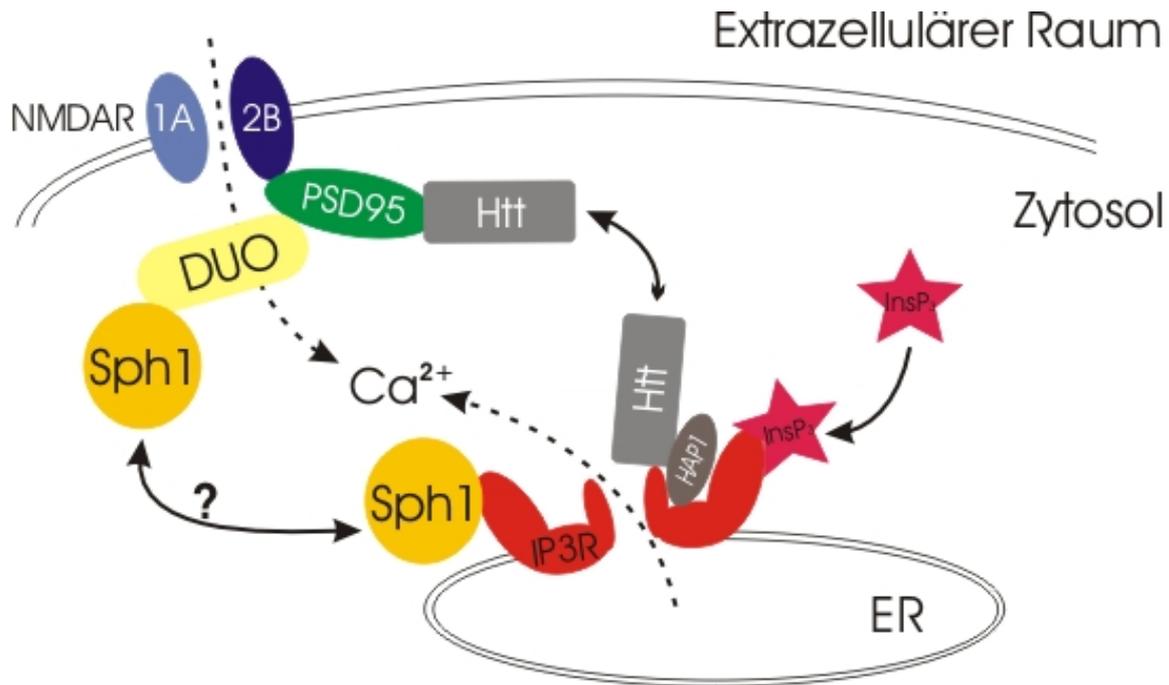


Abb. 3.21.: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen verschiedener, mit Morbus Huntington assoziierter Proteine. Sowohl die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch Glutamat, als auch die des Inositol-3-Phosphat-Rezeptors (IP3R) durch Inositol-3-Phosphat (InsP₃) führt zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen ins Zytosol. Die Stärke der Wechselwirkung von Huntingtin (Htt) mit PSD95 bzw. dem ternären Komplex mit HAP1 und IP3R hängt von der Länge der Glu-Repeats ab. Synphilin-1 (Sph1) interagiert mit Duo/HAP1 und zusätzlich noch mit IP3R (Abbildung verändert nach (Tang *et al.*, 2003)).

Ausgehend von diesem Wissen wurde überprüft, ob eine Wechselwirkung zwischen Synphilin-1 und den in Abb. 3.21. aufgezeigten Proteinen mittels Y2H aufgefunden werden kann.

3.2.4.2. Untersuchung einer Interaktion von Synphilin-1 mit PSD95

Das *postsynaptic density protein 95* (PSD95 oder auch *disc large homolog 4* – DLG4) besitzt drei PDZ-Domänen, mit denen es sowohl mit Huntingtin als auch mit dem zytosolischen Bereich von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) interagiert (Kornau *et al.*, 1995). Ein

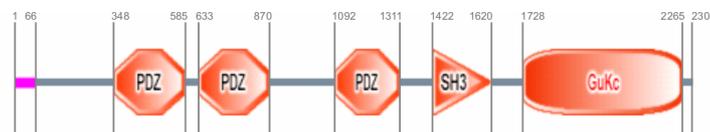


Abb. 3.22.: Schematische Darstellung von PSD95 (oder DLG4). Das Protein besitzt drei PDZ-Domänen und jeweils eine „src Homology-3“- (SH3) bzw. GuKc-Domäne (diese Domänen wurden nach ihrem auffinden in Guanylatkinasen so bezeichnet). Zusätzlich gibt es noch ein C-terminales Signalpeptid. Die Zahlen geben die Position der Domänen in bp an. Die Einteilung fand mittels des Programms SMART (siehe Abb. 3.20.) statt.

Absenken der PSD95-Konzentration verschiebt das Verhältnis von Anregen zu Inhibieren neuronaler Synapsen innerhalb des Hippocampus (Migaud *et al.*, 1998).

Aus Mangel an humaner cDNA wurde das Ortholog aus der Ratte verwendet. Dies dürfte keinen großen Einfluss auf eine Interaktion haben, da auf Aminosäureebene eine 99 %ige Sequenzhomologie vorliegt. Die Sequenz lag im Vektor GW1-CMVector vor und war eine

freundliche Überlassung von Yi-Peng Hsueh (Hsueh et al., 1997). Zwischen der neunten und der zehnten Aminosäure befindet sich jedoch ein myc-Tag-Fragment (Sequenz: KKYRYQ). Die cDNA-Sequenz von PSD95 ab Aminosäure 10 wurde in den *prey*-Vektor kloniert und auf eine Interaktion mit Synphilin-1 im *bait*-Vektor via Y2H untersucht.

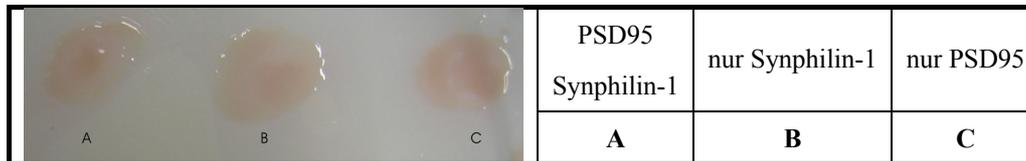


Abb. 3.23.: β -Galactosidasetest der Interaktion zwischen PSD95 im *bait*- und Synphilin-1 im *prey*-Vektor (**A**). Die Klone **B** und **C** wurden jeweils mit dem leeren Gegenvektor transformiert und zeigen so eine eventuelle Selbstaktivierung auf; sie gelten als Negativkontrolle.

Zwischen Synphilin-1 und PSD95 konnte keine Wechselwirkung mittels Y2H nachgewiesen werden.

3.2.4.3. Untersuchung einer Interaktion von Synphilin-1 mit NMDAR1A/2B

Da keine humane cDNA der beiden in der von Tang und Kollegen (Tang *et al.*, 2003) vorgestellten NMDA-Rezeptor-Untereinheiten vorhanden war, wurde versucht, eine Interaktion mit denen aus Rattenhirn gewonnenen DNA-Sequenzen durchzuführen. Der Nachweis einer Wechselwirkung fand außerdem nur mit den zytosolischen Bereichen der beiden Proteine statt, da hydrophobe Membrandomänen in wässriger Lösung zu einer Aggregation führen. Des Weiteren spielen die Transmembrandomänen und extrazelluläre Bereiche eines Proteins bei einer intrazellulären Interaktion *in vivo* höchstens eine geringe Rolle spielen.

Für den NMDAR1A-Klon wurden die Aminosäuren 837 – 939 und für den NMDAR2B-Klon die Aminosäuren 843 – 1483 verwendet. Die verwendete NMDAR2B-Sequenz hat eine 98 %ige Homologie zum humanen Pendant, während sich die Sequenz von NMDAR1A aus Ratte und Mensch die Sequenz doch stark unterscheidet. Die ersten 26 Aminosäuren sind zwar identisch, doch danach unterscheidet sich die Sequenz erheblich; interessanter Weise ist die zytosolische Sequenz aus Rattenhirn dreimal so lang wie die humane Sequenz.

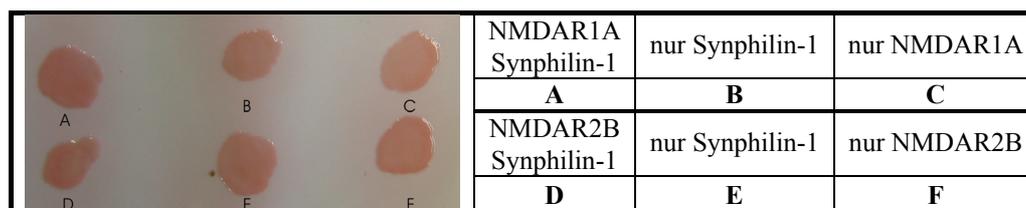


Abb. 3.24.: β -Galactosidasetest der beiden NMDAR-Untereinheiten. Weder bei NMDAR1A (**A**) noch bei NMDAR2B (**D**) konnte eine Interaktion mit Synphilin-1 nachgewiesen werden. Auch die Negativkontrollen (**B** und **C** bzw. **E** und **F**) blieben negativ.

3. Ergebnisse

Wie Abb. 3.23. zeigt wurde keine Interaktion von Synphilin-1 mit den zytosolischen Bereichen der Untereinheiten 1A und 2B des NMDA-Rezeptors aufgefunden.

3.2.4.4. Untersuchung einer Interaktion von Synphilin-1 mit IP3R

Der Inositol-3-Phosphat-Rezeptor (IP3R) ist ein zytosolischer Kanal, der Ca^{2+} -Ionen bei Stimulierung mit Inositol-3-Phosphat ($InsP_3$) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytosol freisetzt. Auch für den Versuch mit dem IP3R wurde anstatt der humanen Sequenz die aus Ratte verwendet. Dank der freundlichen Überlassung von Ilya Bezprozvanny (University of British Columbia in Vancouver, Kanada) erhielten wir zwei C-terminale Klone des

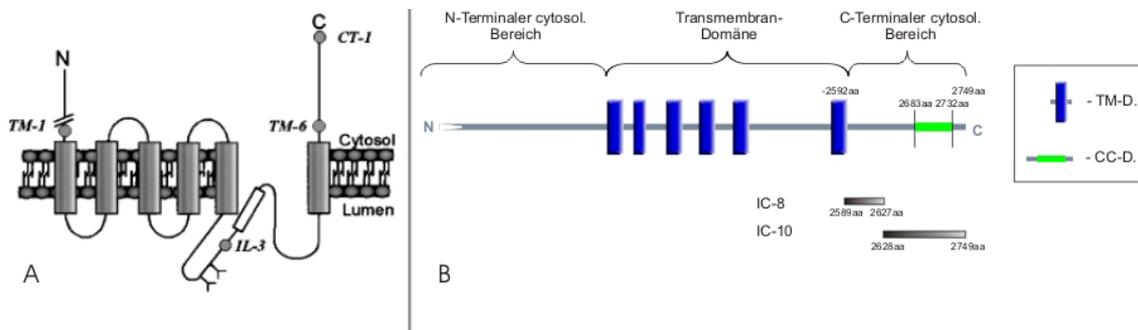


Abb. 3.25.: Schematische Darstellung des kompletten IP3R (A) (Khan *et al.*, 2001) und die Position der zwei Klone IC-8 und IC-10 innerhalb des IP3R (B). Mit blau sind die Transmembran-Domänen (TM-D.) und mit grün eine Coiled-coil-Domäne (CC-D.) dargestellt.

Rattenhomologs von IP3R. Klon 1 (IC-8) enthält die Aminosäuren von 2589 bis 2627 und Klon 2 (IC-10) die von 2628 bis 2750. Die beiden Klone decken dabei den C-terminalen, zytosolischen Bereich des Rezeptors ab (siehe Abb. 3.25.).

Die Sequenzen der beiden Klone wurden jeweils in *prey*-Vektoren kloniert und zusammen mit Synphilin-1 im *bait*-Vektor in Hefe transformiert. Mit den so gewonnenen Hefeklonen wurde anschließend ein β -Galactosidasetest durchgeführt.

A	IC-8	nur IC-8	nur Synphilin-1
	Synphilin-1	B	C
E	IC-10	nur IC-10	nur Synphilin-1
	Synphilin-1	D	F

Abb. 3.26.: β -Galactosidasetest des C-terminalen zytosolischen Bereichs des IP3-Rezeptors. Während die IC-10 Klone keine Interaktion mit Synphilin-1 aufweisen (E), ist eine starke Blaufärbung im IC-8 Klon zu sehen (A). Die Negativkontrollen (B – C und F – G) sind nicht gefärbt, so dass eine Selbstaktivierung des IC-8-Klons ausgeschlossen wird.

Während mit den bisherigen Proteinen keine Interaktion mit Synphilin-1 nachgewiesen werden konnte, findet eine Wechselwirkung zwischen dem Inositol-3-Phosphat-Rezeptor und Synphilin-1 statt. Die Interaktion kann sogar bei dem IP3R auf die 38 Aminosäuren direkt nach der siebten Transmembran-Domäne (Aminosäurenbereich 2589 bis 2627) eingeschränkt werden.

3.3. Mutationsscreening des Gens von Seven in absentia homolog-1 (SIAH-1) bei Parkinsonpatienten

3.3.1. Allgemeines

Synphilin-1 wird von den Ubiquitin-E3-Ligasen Parkin (Chung *et al.*, 2001) bzw. Dorfin (Ito *et al.*, 2003) ubiquitiniert. Mittels eines Hefe Zwei-Hybrid-Versuches wurden zwei weitere E3-Ligasen gefunden, die mit Synphilin-1 interagieren und dieses auch ubiquitiniieren. Es handelt sich dabei um SIAH-1 und SIAH-2 (Liani *et al.*, 2004). Während die Interaktion zwischen SIAH-1 bzw. SIAH-2 mit α -Synuklein gleich stark ausgeprägt ist, interagiert SIAH-1 stärker mit Synphilin-1 als SIAH-2. Zusätzlich konnte SIAH-1 in Lewy Körperchen nachgewiesen werden (Liani *et al.*, 2004). Da Mutationen in der E3-Ligase Parkin häufige Formen der Parkinson'schen Krankheit hervorrufen, erscheint es sehr möglich, dass auch Mutationen im Gen SIAH-1 bei Parkinsonpatienten nachweisbar sind.

Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von SIAH-1 beim Absterben von Neuronen lieferten Versuche von Hara und Kollegen. Stickoxide werden im Zytosol durch Hyperoxid-Anione gebildet. Diese können in Neuronen ein apoptotisches Signal in den Kern überführen. Dabei spielt SIAH-1 als ein Mitauslöser eine wichtige Rolle (Hara *et al.*, 2005). Aus diesem Grund haben wir innerhalb von 209 Parkinsonpatienten nach Mutationen in diesem Gen gesucht.

3.3.2. Untersuchtes Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv setzte sich aus 153 sporadischen und 56 familiären Parkinsonpatienten zusammen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug 57,7 Jahre (S.D. \pm 11 Jahre) und 54,7 % waren männlich. Das untranslatierte Exon 1 und der kurze Promotorbereich wurden nur bei 68 Patienten des oben beschriebenen Patientenkollektivs amplifiziert (Durchschnittsalter: 58,1 Jahre (S.D. \pm 10,8); 48,5 % männlich). Alle Patienten wurden nach den *UK Parkinson's disease brain bank criteria* bewertet.

3.3.3. dHPLC-Messung

SIAH-1 befindet sich auf Chromosom 16q12 und besitzt zwei Exone, wobei das erste nicht translatiert wird. Dennoch wurde das erste Exon (317 bp) und zusätzlich 79 bp des Promotors untersucht. Da das zweite Exon mit 849 bp zu groß für eine Messung in der dHPLC ist, wurde das Gen in zwei etwa gleichgroße, überlappende Fragmente zerlegt. Bei der Analyse der 418 Allele wurde nur ein auffälliges Chromatogramm erhalten (siehe Abb. 3.27.).

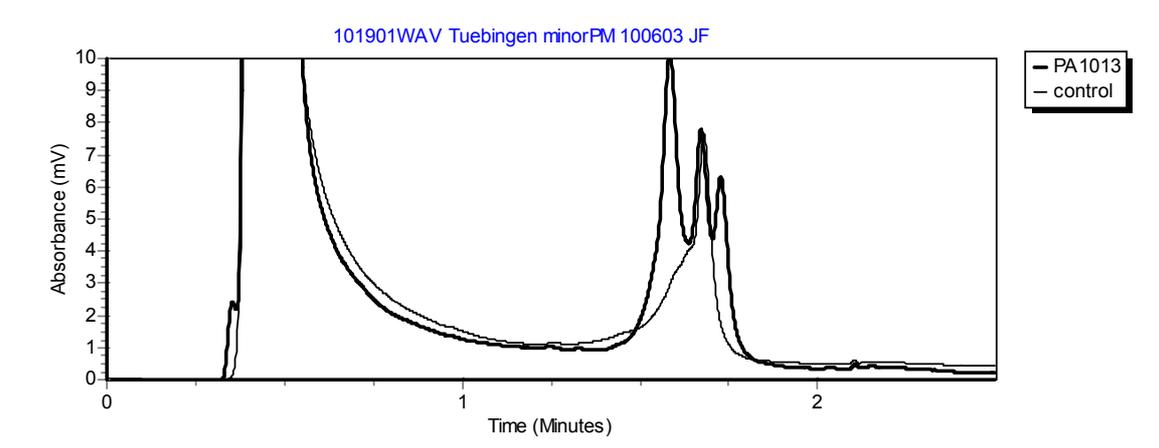


Abb. 3.27.: Auffälliges Chromatogramm einer Patientenprobe (PA1013) – dicke Linie. Im Vergleich dazu ist noch eine Kontroll-DNA (dünne Linie) abgebildet.

3.3.4. Bestimmung des Basenaustausches

Die dHPLC ist nur eine Methode, um schnell eine Vielzahl an DNA-Fragmente auf Mutationen zu untersuchen. Ein auffälliges Chromatogramm ist jedoch kein Beweis für ein Auffinden einer Mutation, lässt sich aber sehr gut als Vorauswahl für die Sequenzierung verwenden. Deshalb wurde die Basenabfolge dieses Fragments sequenziert. Es konnte an Position 531 eine heterozygote Mutation (C531A – siehe Abb. 3.28.) detektiert werden.

Dieser Basenaustausch hat jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Proteins, da er sich an der dritten Position eines Codons befindet, und sowohl GTA als auch GTC für die Aminosäure Valin kodieren.

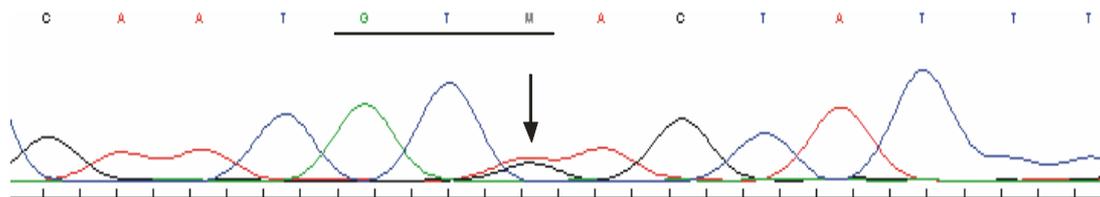


Abb. 3.28.: Sequenzabschnitt aus Exon 2 des Patient PA1013. Die heterozygote Mutation ist mit einem Pfeil markiert. Sowohl das Codon GTA, als auch GTC (unterstrichen) kodieren beide für die Aminosäure Valin.

Da wir in 418 Allelen keine funktionelle Mutation auffinden konnten, schlossen wir daraus, dass Mutationen, die die kodierende Sequenz von SIAH-1 betreffen, keine häufige Ursache für die Entstehung von Parkinson darstellen.

4. Diskussion

Synphilin-1 ist eines der zentralen Proteine in der Pathogenese von Morbus Parkinson. Es interagiert sowohl mit Parkin (Chung *et al.*, 2001), als auch mit α -Synuklein (Engelender *et al.*, 1999). Dennoch weiß man bis heute nur wenig über dessen Funktion. Um die Funktion bzw. Aufgabe dieses Proteins besser zu verstehen, wurden zwei Herangehensweisen parallel durchgeführt. Zum einen sollten neue Interaktionspartner von Synphilin-1 mittels der Hefe Zwei-Hybrid-Methode aufgefunden werden. Das Auffinden neuer Partner ermöglicht den Blick auf Stoffwechselwege, in denen Synphilin-1 beteiligt ist. Des Weiteren wurden zwei transgene Mausmodelle generiert. Beide Mauslinien exprimieren humanes Synphilin-1, eines aber die mutierte Variante R621C (Marx *et al.*, 2003). In der Einleitung wurde schon beschrieben, dass transgene Mausmodelle einfach zu handhabende Möglichkeiten sind, um die Auswirkung bestimmter, eventuell mutierter Gene *in-vivo* auf Wirbeltiere untersuchen zu können.

4.1. Diskussion der Ergebnisse der transgenen Mäuse

Das Ziel, transgene Mäuse zu generieren, konnte erfolgreich erreicht werden. In der Kooperation mit der Mäuse-Einheit des Karolinska Institut unter Leitung von Dr. Wilbertz wurden mehrere transgene Mauslinien generiert.

Für die Charakterisierung der Mauslinien und der Untersuchung der Auswirkung des humanen, transgenen Proteins wurden jeweils die Linien ausgewählt, die die größte Menge an WT (T01) bzw. mutiertem Synphilin-1 (T09) exprimieren. Es ist jedoch in einem Western-Blot gut zu erkennen, dass die T09-Mauslinie stärker Synphilin-1 exprimiert, als die T01-Linie. Dennoch wurde die T09-Mauslinie gewählt, da in vorhergehenden Studien mit transgenen α -Synuklein Mausmodellen gezeigt werden konnte, dass der Einfluss des Transgens auf die Pathogenese der Parkinson'schen Krankheit stark mit der Expressionsmenge korreliert (Eriksen *et al.*, 2005).

4.1.1. Verhaltensstudien

Der Rota-Rod-Versuch musste in beengten Stallbedingungen stattfinden, so dass keine in den Käfig aufgewachsenen, nicht-transgenen Kontrollmäuse zur Verfügung standen. Die Aussage dieser Studie ist deshalb nur bedingt aussagekräftig. Dennoch sind innerhalb der beiden Mauslinien Unterschiede ersichtlich. Die mut C621-Mauslinie T09 hat an jedem Testtag schlechtere Leistungen auf dem Rota-Rod gezeigt als die WT R621-Mauslinie T01. Da keine

Kontrollmäuse zur Verfügung standen, kann nur von einem tendenziellen besseren Abschneiden der WT-Mäuse ausgegangen werden. Um eine Verhaltensstudie mit Kontrolltieren durchzuführen, wurde eine zweite, zudem sensitivere Methode gewählt, der sog. *beam-walking* Test. Dabei konnte bei der Überquerung des Stabes mit dem geringsten kreisförmigen Durchmesser signifikante Unterschiede in der Geschwindigkeit der transgenen Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch im Vergleich der transgenen Tiere untereinander ist ein tendenziell leichter Vorsprung in der Koordination der WT-Mauslinie zu beobachten, der mit den Ergebnissen des Rota-Rod-Versuches übereinstimmt. Ob dies wirklich nur mit dem mutierten Transgen zu erklären ist oder ob die höhere Expressionsrate dies verursacht muss in weiteren Verhaltensstudien betreffend das Koordinationsverhalten mit der T10-Mauslinie geklärt werden. Diese Mauslinie exprimiert die ungefähr gleiche Menge an Synphilin-1 wie die T01-Mauslinie (siehe Abb. 3.1.).

Für einen Einfluss des mutierten Synphilin-1 spricht, dass mit mutiertem R621C Synphilin-1 transfizierte Neuronen sensitiver gegen Zellstress reagieren als mit wildtyp Synphilin-1 (Marx *et al.*, 2003). Dies führte in deren *in-vitro* Experimenten zu erhöhter Apoptose der transfizierten C621 Synphilin-1 Neuroblastomzelllinie. Die kombinierte Expression von α -Synuklein mit Synphilin-1 in der HEK 293 Zelllinie führt zu zytoplasmatischen, eosinophilen *inclusion bodies* (Engelender *et al.*, 1999). Es ist bisher jedoch noch nicht beschrieben, ob erhöhte Proteinmengen auch mehr Proteinaggregate verursachen, aber dies ist wahrscheinlich (Eriksen *et al.*, 2005). Auch wenn Frank-Peter Marx und seine Kollegen diskutieren, dass Lewy Körperchen einen schützenden Einfluss auf Neuronen haben (Marx *et al.*, 2003) ist die genaue Rolle der Lewy Körperchen in der Pathogenese der Parkinson'schen Krankheit noch nicht endgültig geklärt (Olanow *et al.*, 2004).

Auffällig sind die durch den Synphilin-1 Antikörper angefärbten Proteinaggregate in den Axonen der dopaminergen Neuronen in den beiden transgenen Tieren (siehe Abb. 3.4.). Die Morphologie der Proteinaggregate entsprechen zwar nicht den humanen Lewy Körperchen (LK), da der typische Halo, der sog. Sternenkranz, um den Kern fehlt. Für eine genauere Untersuchung der Aggregate und Analyse auf eine molekulare Ähnlichkeit mit den LK müsste mit weiteren Antikörpern untersucht werden, ob weitere Proteine, die sich sonst in LK wie z. B. α -Synuklein (Takahashi *et al.*, 2001) oder Ubiquitin (Kuusisto *et al.*, 2003) befinden, auch hier nachweisbar sind. Dennoch könnte die Existenz dieser Proteinaggregate den gerichteten Transport von Vesikeln entlang der Tubulinmoleküle behindern und zu einem geringeren Dopamintransport in das Striatum führen. Für eine genauere Sicht auf diesen Befund sind elektronenmikroskopische Aufnahmen geplant.

Weitaus interessanter ist das Absterben der Purkinje-Zellschicht im Cerebellum (siehe Abb. 3.7.). Die Expression eines Transgens mit Hilfe eines Prionen-Promotors findet normalerweise nicht in den Purkinje-Zellen statt. Da wir aber nicht den vollständigen Promotor verwendet haben, ist zu vermuten, dass sich im vorderen Bereich ein *silencer* für die Purkinje-Zellen befindet. Eine Aufgabe des Kleinhirns ist die Steuerung der Motorik. Das Vestibulocerebellum erhält aus dem Gleichgewichtsorgan Information über Körperlage und -bewegung. Diese nutzt es zum einen zur Steuerung der Halte- und Stützmotorik. Außerdem empfängt das Spinocerebellum die Afferenzen aus dem Rückenmark, die Informationen über die Stellung von Gelenken und Muskeln geben. Es erhält kontinuierliche Rückmeldung über die zum Rückenmark und damit in die Peripherie gesendeten Bewegungssignale. Es gliedert sich nach den Efferenzen in zwei funktionell unterschiedliche Zonen. Der Vermis selbst, der in den *Nucleus fastigii* projiziert, ist vor allem für Stand-, Gang- und Stützmotorik verantwortlich. Die angrenzenden Hemisphärenanteile (intermediäre Zone, Projektion in *Nucleus globosus* und *Nucleus emboliformis*) sind entscheidend an der Zielmotorik und der Bewegungsdurchführung beteiligt. Diese Anteile sorgen dafür, dass eine Bewegung wie geplant abläuft, ihr Ziel exakt trifft, und sie sorgen für einen Abgleich von Efferenzen und Afferenzen, also dafür, dass die gesendeten Kommandos der tatsächlichen augenblicklichen Lage der Extremitäten entsprechen und ständig fein an die neue Lage angepasst werden.

Ein teilweiser Verlust der Funktion des Cerebellums macht sich in dem durchgeführten Koordinationstest bemerkbar. Im *beam-walking* brauchten die beiden transgenen Tierlinien auf dem dünnsten runden Stab signifikant länger als die Kontrolltiere. Das Absterben der Zellen betrifft nur Teile der Zellschicht. Dies macht sich auch im Koordinationstest bemerkbar. Nur auf dem am schwierigsten zu überquerenden, dem kleinsten runden Stab des *beam-walking*-Experimentes konnten signifikante Unterschiede in der Laufzeit gestoppt werden. Zusätzlich konnten sowohl im *beam-walking*- als auch im Rota-Rod-Experiment Unterschiede zwischen den Leistungen der WT621R-Synphilin-1 und der mut621C-Synphilin-1 Mäusen aufgefunden werden. Diese waren jedoch nicht signifikant. Dieses Ergebnis lässt sich jedoch mit dem Verlust der Purkinje-Zellschicht der beiden transgenen Tiere erklären.

4.1.2. Expressionsstudien

Mit der DNA-Chip Technologie von Affymetrix ist es möglich, das unterschiedliche Expressionsverhalten von unterschiedlich behandelten Zellen, Geweben oder ganzen Tieren miteinander zu vergleichen. Dabei geht man davon aus, dass sich die Menge an unterschiedlicher Boten-RNA (*messengerRNA*; mRNA) auch wieder in Protein äußert (Reimers et al., 2005).

Wir haben die Expressionsmengen der beiden transgenen Mauslinien miteinander verglichen und vier unterschiedlich exprimierte Proteine genauer untersucht. Die Verifizierung dieser Ergebnisse mittels Western-Blots führte nicht zum gewünschten Erfolg. Es konnten nur wenige Übereinstimmungen festgestellt werden. Dies kann beispielsweise daran liegen, dass die Menge an mRNA nicht in jedem Fall mit der Proteinmenge korreliert. Außerdem kann trotz größter Genauigkeit bei der Bestimmung der Proteinmenge mittels der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) nicht immer gewährleistet werden, dass die gleiche Proteinmenge in die Geltaschen pipetiert werden. Eine bessere Möglichkeit die Daten der DNA-Chip-Experimente zu bestätigen, wäre die Quantifizierung der mRNA mittels qPCR. Dies würde aber auch nur eine indirekte Methode zur Proteinmengenbestimmung darstellen.

Die geringere Menge des Transkriptionsfaktors SP1 in der transgenen WT-Mauslinie, führt dazu, dass weniger Dopamintransporter (DAT) und Monoaminoxidase B (MAO B) vorhanden ist. Eine geringere Menge des DATs lässt die Verweildauer und damit die Reizweiterleitung durch Dopamin (DA) steigen. Die MAO B hingegen wandelt innerhalb der dopaminergen Neuronen DA um und bildet dabei giftiges H_2O_2 (Gesi *et al.*, 2001). Der Effekt lässt sich so zusammenfassen, dass bei der transgenen mutSynphilin-1 Mauslinie weniger DA an die Synapsen geleitet und freigesetzt werden kann. Dieses wird dann aber durch DAT schneller rücktransportiert. So wird die Reizweiterleitung von der *Substantia nigra* in das *Striatum* gehemmt. Außerdem sind die dopaminergen Neurone durch erhöhtes H_2O_2 einem vergrößerten oxidativen Stress ausgesetzt. Dies kann zur Apoptose dieser Zellen führen. Andererseits ist SP1 ein sehr allgemeiner Transkriptionsfaktor, der unzählige Zielproteine reguliert (Cook *et al.*, 1999).

Neben oxidativem Stress führen weitere Wege zur Apoptose. Innerhalb dieser Kaskaden spielen die Proteine PTEN und BIRC4 eine Rolle. Eine erhöhte Expression von PTEN führt zur Apoptose in diesen Zellen. Dies ist bei der mut R621Synphilin-1 Mauslinie der Fall. Umgekehrt wird in der WT C621 Synphilin-1 Mauslinie der Apoptose-Hemmer BIRC4 bzw. XIAP um ein vielfaches stärker synthetisiert. Ein sicheres Element der Parkinson'schen Krankheit ist das Absterben der Dopamin produzierenden und in das *Striatum* ausschüttenden Neuronen der *Substantia nigra*. Im Gehirn der WT R621-Synphilin-1 Mauslinie sind die beiden Proteine so reguliert, dass im Vergleich zur mut C621-Synphilin-1 Mauslinie, Apoptose unterdrückt wird.

Der Rho/ROCK Signalweg ist der kritische Schritt in der Einleitung des axonalen Wachstums (Bito *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass Überexpression von überwiegend aktiviertem ROCK dieses Wachstum hemmt. In der mut C621 Synphilin-1 Mauslinie wird mehr ROCK

exprimiert. Dies kann direkten Einfluss auf die Gehirnstruktur und das Wachstum haben. Dopamin wird über Basalganglien in das *Striatum* transportiert und dort ausgeschüttet. Ein geringeres oder schwächeres Wachstum dieser Axone kann auch die Reizweiterleitung erschweren.

All diese Ergebnisse wurden mit einem Gesamthirnlisat erzielt. Dadurch kann man nicht direkt auf die Situation in der *Substantia nigra* und die dopaminergen Neuronen rückschließen. Die Unterschiede in den Expressionsprofilen, speziell der vier Proteine, liefern Erklärungen, weshalb die WT-Mäuse in den Verhaltensstudien besser abschnitten, als die mut-Mäuse. Die aufgefundene Mutation im Synphilin-1 Gen bei zwei idiopathischen Parkinsonpatienten (Marx *et al.*, 2003) lässt sich durch diese Untersuchung in engen Bezug mit der Krankheit bringen. Die Mutation im Synphilin-1 Gen kann Mäusehirne *in-vivo* vor Apoptose schwächer schützen. Auch die Reizleitung mittels Dopamin aus der *Substantia nigra* in das *Striatum* zur Steuerung der Willkürmotorik wird analog zur Parkinson'schen Krankheit vermindert. In den Mäusehirnen wird zusätzlich noch endogenes Synphilin-1 exprimiert. Da bleibt natürlich die Frage offen, inwieweit die Effekte des transgenen mutierten Synphilin-1 kompetitiv durch das endogene minimiert werden. So müsste das endogene Synphilin-1 ausgeschaltet werden, um vielleicht in den Verhaltensstudien größere Effekte zwischen den beiden Linien aufdecken zu können.

4.1.3. Stoffwechselprodukte von Dopamin bzw. Serotonin

In den Gehirnarealen Substantia nigra und Striatum konnte in beiden transgenen Mauslinien signifikant mehr Dopamin (DA) gemessen werden als in den Kontrollmäusen. Ein Grund für die erhöhte DA-Menge könnte in dem gehinderten Dopamin-Transport liegen, der durch die mit dem Synphilin-1 Antikörper angefärbten Proteinaggregate in den Dendriten gehemmt werden kann. Die erhöhte Dopaminkonzentration im Striatum und nur die geringen Menge an extrazellulärem Stoffwechselprodukt von DA, der Homovanilinsäure (HVA), kann an einem Schutzmechanismus liegen. So kann das aufgenommene DA länger seine Funktion ausführen und wird deshalb nicht so schnell abgebaut wie in den Kontrollmäusen. Dies gilt auch im Striatum für das intrazelluläre Stoffwechselprodukt DOPAC. Interessant ist, dass in der *Substantia nigra* das extrazelluläre Stoffwechselprodukt HVA in der Kontrollmaus nicht mehr nachweisbar ist. In den transgenen Mäusen beträgt der Wert etwa die Hälfte des DA-Wertes.

Ein andere Erklärung für die erhöhten Werte von DA sowohl in der Substantia nigra als auch im Striatum, kann in der Synthese von DA liegen. Alpha-Synuklein ist ein konzentrationsabhängiger Inhibitor der Tyrosinhydroxylase (TH) (Perez *et al.*, 2002). Dieses Enzym wird in der Synthese von DA aus Tyrosin (siehe Abb. 1.5.) benötigt. Durch die

der Synthese von DA aus Tyrosin (siehe Abb. 1.5.) benötigt. Durch die erhöhte Expression von Synphilin-1 in den transgenen Tieren kann es zu einer erhöhten Aggregatbildung von α -Synuklein kommen. Die Co-Expression von Synphilin-1 und α -Synuklein führt *in-vitro* zu einer erhöhten Aggregatbildung (Engelender *et al.*, 1999). Würde dies auch in der Substantia nigra der untersuchten, transgenen Tiere stattfinden, so würde freies α -Synuklein aus dem Zytosol entfernt werden. Damit wird die TH durch die geringere Menge an freiem α -Synuklein weniger inhibiert und es entsteht mehr DA aus Tyrosin. Dies würde bedeuten, dass die aufgefundenen Aggregate nicht zu einem Transporthemnis von DA führen.

In der Parkinson'schen Krankheit führt das Absterben der Hälfte der dopaminergen Neuronen zu einem so geringen DA-Spiegel im Striatum, dass sich die typischen Symptome ausbilden (Deumens *et al.*, 2002). Dies kann zu der Bildung von Lewy Körperchen führen, welche unter anderem α -Synuklein enthalten (Takahashi *et al.*, 2001). Auf diese Weise kann der Verlust dieser Neuronen in der SNpc durch eine erhöhte Dopaminproduktion über einen gewissen Zeitraum kompensiert werden.

4.2. Diskussion der Hefe 2-Hybrid Ergebnisse

Mit Hilfe der Hefe Zwei-Hybrid Methode wurde ein *screening* durchgeführt, welches neue Interaktionspartner von Synphilin-1 identifizieren sollte. Dabei wurde nicht das vollständige Protein verwendet, sondern nur ein Konstrukt, welchem die ersten 176 Aminosäuren und der mittlere Teil mit den Ankyrin-repeats-Domänen, der *Coiled-coil*-Domäne und eine ATP/GTP-Bindungsstelle entfernt wurden. Außerdem wurde in weiteren Experimenten Interaktionen des kompletten Synphilin-1 mit einzelnen Proteinen durchgeführt.

4.2.1. Interaktion mit DUO bzw. HAPIP

Mittels eines Hefe Zwei-Hybrid-Screening konnte ein neuer Interaktionspartner von Synphilin-1 identifiziert werden. Diese Wechselwirkung konnte mittels zweier weitere Methoden (SELDI, Co-Immunopräzipitation durchgeführt von A. Söhn, persönliche Mitteilung) bestätigt werden.

Es handelt sich um eine spezifische Interaktion, da die Ankyrin-like und Coiled-coil-Domänen aus dem Konstrukt entfernt wurden. Proteine mit Wiederholungen von Ankyrin-like Domänen spielen oft eine Rolle im Aufbau des Zytoskeletts verschiedener Organe und haben eine große Anzahl an Interaktionspartnern (Sedgwick and Smerdon, 1999). Auch Coiled-coil-Domänen besitzen viele unspezifische Wechselwirkungspartner, die eine Rolle beim

Transport zwischen Membranen spielen und durch die restliche Aminosäuresequenz der Proteine bestimmt werden (Gillingham and Munro, 2003).

Die Interaktion fand mit dem C-terminalen Ende des Proteins statt (siehe Abb. 3.17.), in dessen Bereich sich auch die R621C-Mutation befindet. In einem quantitativ auswertbaren flüssigen Hefe Zwei-Hybrid Test konnte keine signifikant unterschiedliche Bindung festgestellt werden. Da der Versuch nicht wiederholt werden konnte, ist ein Einfluss auf die Stabilität der Bindung zwischen Synphilin-1 und Duo weiterhin fraglich. Interessanterweise weist der C-terminale Bereich wahrscheinlich eine protektive, anti-apoptotische Funktion auf (Giaime *et al.*, 2006). Inwieweit diese Funktion durch die Bindung an Duo unterbunden wird, ist bisher noch nicht geklärt worden. Dies könnte aber Einfluss auf die Pathogenese sowohl der Parkinson'schen, als auch der Huntington'schen Krankheit haben.

Im weiteren Vorgehen sollte der Bereich von Duo eingegrenzt werden, der mit Synphilin-1 interagiert. Der gefischte Klon des Duo-Konstrukts war nicht vollständig und bestand nur aus den letzten 947 Aminosäuren. Deshalb wurde dieser Bereich in kleinere, sich überlappende Konstrukte eingeteilt. Jedoch interagierte keiner dieser Klone mit dem 3'-Ende von Synphilin-1. Auch größere Konstrukte, die mehr als eine Domäne von DUO abdeckten, halfen nicht weiter. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Interaktion zwischen Synphilin-1 und Duo auf Bereiche von Duo beschränkt ist, die erst durch die Tertiärstruktur des Proteins gebildet werden.

Die Wechselwirkung von Synphilin-1 und DUO bzw. HAPIP legt nahe, dass es eine Verbindung zwischen der Parkinson'schen und der Huntington'schen Krankheit gibt. Schon zwischen der Alzheimer'schen und Parkinson'schen Krankheit gibt es über α -Synuklein eine Verbindung. So wurde humanes α -Synuklein als Vorläuferpeptid (NACP) in den extrazellulären, amyloiden Plaques in Alzheimer-Patienten aufgefunden (Ueda *et al.*, 1993). So stehen jetzt drei bisher einzeln betrachtete neurologische Krankheiten in einer Verbindung zueinander. Inwieweit diese Verbindung bei Morbus Huntington und Morbus Parkinson besteht, muss in weiteren Versuchsreihen bestimmt werden.

4.2.2. Interaktion mit dem Inositol-3-Phosphatrezeptor

Nachdem die Interaktion zwischen DUO bzw. HAPIP mit Synphilin-1 bestätigt werden konnte, wurden weitere Proteine untersucht, die bei der Huntington'schen Krankheit eine Rolle spielen und nach Perez direkt oder indirekt mit Huntingtin interagieren (Tang *et al.*, 2003). Mittels der Hefe Zwei-Hybrid Methode wurde eine Interaktion zwischen dem C-terminalen, zytosolischen Ende des Inositol-3-Phosphatrezeptors (IP3R) nachgewiesen. Dieser Kalzium-

kanal befindet sich vorwiegend in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und setzt bei Stimulation mittels Inositol-3-Phosphat Kalziumionen (Ca^{2+}) ins Zytosol frei (Mikoshiya et al., 1994). Das freigesetzte Kalzium führt in Zellen unter anderem auch zu Apoptose (Marks, 1997). Interessanterweise konnte in Patienten mit spinocerebelläre Degeneration ein Verlust von Purkinje-Zellen nachgewiesen werden, den die Gruppe auf veränderte Expressionsmengen von IP3R zurückführt (Yamada et al., 1994). IP3R wird stark in Purkinje-Zellen exprimiert. Diese Zellschicht verschwand in meinen generierten transgenen Mausmodellen (siehe Abb. 3.7.). So kann man aus diesem Ergebnis rückschließen, dass eine Interaktion von Synphilin-1 mit dem IP3R diesen leichter aktivierbar macht. Auch eine erhöhte Expressionsrate ist möglich. Da diese Interaktion bisher nur im Hefe Zwei-Hybrid Experiment nachgewiesen wurde, muss die Interaktion mit einer weiteren Methode noch verifiziert werden. Bis dahin handelt es sich noch um eine Hypothese.

4.3. Diskussion des Mutations-Screening von SIAH-1

Die E3-Ubiquitin Ligase SIAH-1 spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Parkinson-Modellen, da es sowohl Parkin als auch α -Synuklein ubiquitiniert (Liani et al., 2004). Zusätzlich ist SIAH-1 an der Entstehung von Apoptose verursacht durch Stickoxid und vermittelt über Interaktion mit der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), und dem Transport in den Zellkern beteiligt (Hara et al., 2005; Franck et al., 2006).

Innerhalb der 209 Parkinsonpatienten war es uns nicht möglich, eine Mutation zu finden, die die Aminosäuresequenz von SIAH-1 verändert hätte. Ein Grund dafür liegt in der geringen Anzahl an Parkinson-Patienten. So konnten in α -Synuklein bisher nur drei unterschiedliche Mutationen gefunden (Polymeropoulos et al., 1997; Krüger et al., 1998; Zarranz et al., 2004) werden, obwohl es eine Vielzahl weitere Studien gab (Chan et al., 1998; Berg et al., 2005). Auch weitere Mutationen in anderen Parkinson-relevanten Genen sind sehr selten (Leroy et al., 1998a; Valente et al., 2004; Hedrich et al., 2004). An der Methode der denaturierenden HPLC kann es nicht liegen, da in anderen untersuchten Genen in diesem Patientenkollektiv Mutationen detektiert wurden (Hochstrasser et al., 2004; Strauss et al., 2005). Größere Deletionen sogar von ganzen Exonen können jedoch mit dieser Methode nicht identifiziert werden. SIAH-1 ist ein hochkonserviertes Protein innerhalb des Tierreiches und eine nichtstumme Mutation könnte zu wesentlichen Störungen der biologischen Funktion führen.

5. Zusammenfassung

Die Pathogenese von Morbus Parkinson ist bisher nur ansatzweise verstanden. Das Ziel dieser Dissertation bestand in der Charakterisierung eines der Schlüsselproteine: Synphilin-1. Es konnte in Lewy Körpern nachgewiesen werden (Wakabayashi *et al.*, 2002). Außerdem interagiert es unter anderem mit α -Synuklein, Parkin und SIAH-1.

Bisher standen der Charakterisierung von Synphilin-1 nur Zellkulturen zur Verfügung (Marx *et al.*, 2003). Mit den generierten, transgenen Mauslinien WT621R-Synphilin-1 und mut621C-Synphilin-1 liegt nun ein Modell vor, das *in-vivo* Studien in Wirbeltieren zulässt. Bei der Untersuchung der Motorik der Mäuse im sog. *beam-walking*-Experiment konnte im Vergleich zu Kontrollmäusen ein signifikant schwächeres Abschneiden ermittelt werden. Der Grund dieses Leistungsdefizits liegt im teilweisen Verlust der Purkinje-Zellen. Auch Proteinaggregate in Dendriten der dopaminergen Zellen, die sich mit Hilfe eines anti-Synphilin-1 Antikörpers anfärben ließen, könnten eine Erklärungsmöglichkeit sein.

Die Mausmodelle können nun mit weiteren Mausmodellen aus der Parkinson-Forschung gekreuzt werden. So lässt sich dann die Auswirkung von zwei oder mehreren Proteinen *in-vivo* untersuchen. Ein erster Ansatz liegt mit doppeltransgenen Mäusen vor, die sowohl humanes Wildtyp bzw. mutiertes Synphilin-1 als auch humanes α -Synuklein überexprimieren. Studien mit diesen Mäusen stehen jedoch noch aus.

Ein weiterer Schritt zum Verständnis der molekularen Funktion von Synphilin-1 war das Auffinden neuer Interaktionspartner. Im Hefe Zwei-Hybrid-Screening konnten drei neue Interaktionspartner von Synphilin-1 identifiziert werden: Duo bzw. HAPIP, Periphilin (Söhn, A *et al.*, eingereicht) und die katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase 1. Außerdem konnten Hinweise auf eine Interaktion mit dem ER-Kanal IP3R nachgewiesen werden. Diese neuen Interaktionspartner liefern weitere Puzzlesteine im Verständnis der Funktion von Synphilin-1, insbesondere bei der Pathogenese von Parkinson. Die Verbindung zwischen den Proteinen Synphilin-1 und Huntingtin über DUO und HAP1 wirft neue Fragen auf, in wie weit diese beiden degenerativen Krankheiten miteinander verbunden sind.

Des Weiteren wurde ein Mutations-Screening des Synphilin-1 Interaktors und E3-Ligase SIAH1 durchgeführt. Dabei konnte in dem verwendeten Patientenkollektiv keine sich auf die Aminosäuresequenz auswirkende Mutation gefunden werden. Dies kann aber mehrere Gründe haben und schließt mutiertes SIAH-1 nicht vollständig von der Pathogenese von Morbus Parkinson aus.

6. Literaturliste

- Abeliovich,A., Schmitz,Y., Farinas,I., Choi-Lundberg,D., Ho,W.H., Castillo,P.E., Shinsky,N., Verdugo,J.M., Armanini,M., Ryan,A., Hynes,M., Phillips,H., Sulzer,D., and Rosenthal,A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, **25**, 239-252.
- Abou-Sleiman,P.M., Healy,D.G., and Wood,N.W. (2004). Causes of Parkinson's disease: genetics of DJ-1. *Cell Tissue Res.*, **318**, 185-188.
- Andringa,G., Du,F., Chase,T.N., and Bennett,M.C. (2003). Mapping of rat brain using the Synuclein-1 monoclonal antibody reveals somatodendritic expression of alpha-synuclein in populations of neurons homologous to those vulnerable to Lewy body formation in human synucleopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **62**, 1060-1075.
- Ardley,H.C., Scott,G.B., Rose,S.A., Tan,N.G., and Robinson,P.A. (2004). UCH-L1 aggresome formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **90**, 379-391.
- Avraham,E., Szargel,R., Eyal,A., Rott,R., and Engelender,S. (2005). Glycogen synthase kinase 3beta modulates synphilin-1 ubiquitylation and cellular inclusion formation by SI-AH: implications for proteasomal function and Lewy body formation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 42877-42886.
- Axelsen,K.B. and Palmgren,M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.*, **46**, 84-101.
- Batrukova,M.A., Betin,V.L., Rubtsov,A.M., and Lopina,O.D. (2000). Ankyrin: structure, properties, and functions. *Biochemistry (Mosc.)*, **65**, 395-408.
- Beilina,A., Van Der,B.M., Ahmad,R., Kesavapany,S., Miller,D.W., Petsko,G.A., and Cookson,M.R. (2005). Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 5703-5708.
- Bennett,V. (1989). The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons. *Biochim. Biophys. Acta*, **988**, 107-121.
- Berg,D., Niwar,M., Maass,S., Zimprich,A., Moller,J.C., Wuellner,U., Schmitz-Hubsch,T., Klein,C., Tan,E.K., Schols,L., Marsh,L., Dawson,T.M., Janetzky,B., Muller,T., Woitalla,D., Kostic,V., Pramstaller,P.P., Oertel,W.H., Bauer,P., Krueger,R., Gasser,T., and Riess,O. (2005). Alpha-synuclein and Parkinson's disease: implications from the screening of more than 1,900 patients. *Mov Disord.*, **20**, 1191-1194.
- Berman,S.B. and Hastings,T.G. (1997). Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J. Neurochem.*, **69**, 1185-1195.
- Biskup,S., Moore,D.J., Celsi,F., Higashi,S., West,A.B., Andrabi,S.A., Kurkinen,K., Yu,S.W., Savitt,J.M., Waldvogel,H.J., Faull,R.L., Emson,P.C., Torp,R., Ottersen,O.P., Dawson,T.M., and Dawson,V.L. (2006). Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann. Neurol.*, **60**, 557-569.

- Bito,H., Furuyashiki,T., Ishihara,H., Shibasaki,Y., Ohashi,K., Mizuno,K., Maekawa,M., Ishizaki,T., and Narumiya,S. (2000). A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, **26**, 431-441.
- Bonifati,V., Rizzu,P., van Baren,M.J., Schaap,O., Breedveld,G.J., Krieger,E., Dekker,M.C., Squitieri,F., Ibanez,P., Joosse,M., van Dongen,J.W., Vanacore,N., van Swieten,J.C., Brice,A., Meco,G., van Duijn,C.M., Oostra,B.A., and Heutink,P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, **299**, 256-259.
- Bosgraaf,L. and van Haastert,P.J. (2003). Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1643**, 5-10.
- Boyce,S., Kelly,E., Reavill,C., Jenner,P., and Marsden,C.D. (1984). Repeated administration of N-methyl-4-phenyl 1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurones. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1747-1752.
- Braak,H., Rub,U., Gai,W.P., and Del Tredici,K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm.*, **110**, 517-536.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Burn,D.J., Mark,M.H., Playford,E.D., Maraganore,D.M., Zimmerman,T.R., Jr., Duvoisin,R.C., Harding,A.E., Marsden,C.D., and Brooks,D.J. (1992). Parkinson's disease in twins studied with 18F-dopa and positron emission tomography. *Neurology*, **42**, 1894-1900.
- Burns,R.S., Chiueh,C.C., Markey,S.P., Ebert,M.H., Jacobowitz,D.M., and Kopin,I.J. (1983). A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 4546-4550.
- Cabin,D.E., Gispert-Sanchez,S., Murphy,D., Auburger,G., Myers,R.R., and Nussbaum,R.L. (2005). Exacerbated synucleinopathy in mice expressing A53T SNCA on a Snca null background. *Neurobiol. Aging*, **26**, 25-35.
- Cabin,D.E., Shimazu,K., Murphy,D., Cole,N.B., Gottschalk,W., McIlwain,K.L., Orrison,B., Chen,A., Ellis,C.E., Paylor,R., Lu,B., and Nussbaum,R.L. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J. Neurosci.*, **22**, 8797-8807.
- Cantley,L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, **296**, 1655-1657.
- Cantley,L.C. and Neel,B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 4240-4245.

-
- Carter,R.J., Lione,L.A., Humby,T., Mangiarini,L., Mahal,A., Bates,G.P., Dunnett,S.B., and Morton,A.J. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.*, **19**, 3248-3257.
- Chan,P., DeLanney,L.E., Irwin,I., Langston,J.W., and Di Monte,D. (1991). Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.*, **57**, 348-351.
- Chan,P., Jiang,X., Forno,L.S., Di Monte,D.A., Tanner,C.M., and Langston,J.W. (1998). Absence of mutations in the coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically proven Parkinson's disease. *Neurology*, **50**, 1136-1137.
- Chartier-Harlin,M.C., Kachergus,J., Roumier,C., Mouroux,V., Douay,X., Lincoln,S., Leveque,C., Larvor,L., Andrieux,J., Hulihan,M., Waucquier,N., Defebvre,L., Amouyel,P., Farrer,M., and Destee,A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, **364**, 1167-1169.
- Chen,L., Cagniard,B., Mathews,T., Jones,S., Koh,H.C., Ding,Y., Carvey,P.M., Ling,Z., Kang,U.J., and Zhuang,X. (2005). Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice. *J. Biol. Chem.*, **280**, 21418-21426.
- Chiba,K., Trevor,A.J., and Castagnoli,N., Jr. (1985). Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**, 1228-1232.
- Chung,K.K., Thomas,B., Li,X., Pletnikova,O., Troncoso,J.C., Marsh,L., Dawson,V.L., and Dawson,T.M. (2004). S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*, **304**, 1328-1331.
- Chung,K.K., Zhang,Y., Lim,K.L., Tanaka,Y., Huang,H., Gao,J., Ross,C.A., Dawson,V.L., and Dawson,T.M. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat. Med.*, **7**, 1144-1150.
- Ciechanover,A. (2001). Linking ubiquitin, parkin and synphilin-1. *Nat. Med.*, **7**, 1108-1109.
- Cook,T., Gebelein,B., and Urrutia,R. (1999). Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **880**, 94-102.
- Cuervo,A.M., Stefanis,L., Fredenburg,R., Lansbury,P.T., and Sulzer,D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, **305**, 1292-1295.
- Dauer,W. and Przedborski,S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, **39**, 889-909.
- Davies,M.A., Lu,Y., Sano,T., Fang,X., Tang,P., LaPushin,R., Koul,D., Bookstein,R., Stockoe,D., Yung,W.K., Mills,G.B., and Steck,P.A. (1998). Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res.*, **58**, 5285-5290.
-

- DAVIS,B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Methode and application to human serum preo-
teins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- Dawson,T.M. and Dawson,V.L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkin-
son's disease. *Science*, **302**, 819-822.
- Deumens,R., Blokland,A., and Prickaerts,J. (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an
evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp. Neurol.*, **175**, 303-
317.
- Deveraux,Q.L., Takahashi,R., Salvesen,G.S., and Reed,J.C. (1997). X-linked IAP is a direct
inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, **388**, 300-304.
- Dexter,D.T., Wells,F.R., Lees,A.J., Agid,F., Agid,Y., Jenner,P., and Marsden,C.D. (1989).
Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in
Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **52**, 1830-1836.
- Duvoisin,R.C. (1977). Problems in the treatment of Parkinsonism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **90**,
131-155.
- Eliezer,D., Kutluay,E., Bussell,R., Jr., and Browne,G. (2001). Conformational properties of
alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.*, **307**, 1061-1073.
- Engelender,S., Kaminsky,Z., Guo,X., Sharp,A.H., Amaravi,R.K., Kleiderlein,J.J., Margo-
lis,R.L., Troncoso,J.C., Lanahan,A.A., Worley,P.F., Dawson,V.L., Dawson,T.M., and
Ross,C.A. (1999). Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the for-
mation of cytosolic inclusions. *Nat. Genet.*, **22**, 110-114.
- Eriksen,J.L., Przedborski,S., and Petrucelli,L. (2005). Gene dosage and pathogenesis of Par-
kinson's disease. *Trends Mol. Med.*, **11**, 91-96.
- Eyal,A., Szargel,R., Avraham,E., Liani,E., Haskin,J., Rott,R., and Engelender,S. (2006).
Synphilin-1A: an aggregation-prone isoform of synphilin-1 that causes neuronal death
and is present in aggregates from alpha-synucleinopathy patients. *Proc. Natl. Acad.
Sci. U. S. A.*, **103**, 5917-5922.
- 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., and 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., and Langston,J.W. (2004). Comparison of
kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann. Neu-
rol.*, **55**, 174-179.
- Fields,S. and Song,O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions.
Nature, **340**, 245-246.
- Fleming,S.M., Salcedo,J., Fernagut,P.O., Rockenstein,E., Masliah,E., Levine,M.S., and Ches-
selet,M.F. (2004). Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpres-
sing wild-type human alpha-synuclein. *J. Neurosci.*, **24**, 9434-9440.

-
- Floor,E. and Wetzel,M.G. (1998). Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J. Neurochem.*, **70**, 268-275.
- Franck,T., Krueger,R., Woitalla,D., Muller,T., Engelender,S., and Riess,O. (2006). Mutation analysis of the seven in absentia homolog 1 (SIAH1) gene in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.*
- Fruman,D.A., Meyers,R.E., and Cantley,L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 481-507.
- Funayama,M., Hasegawa,K., Kowa,H., Saito,M., Tsuji,S., and Obata,F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann. Neurol.*, **51**, 296-301.
- Gasser,T., Muller-Myhsok,B., Wszolek,Z.K., Oehlmann,R., Calne,D.B., Bonifati,V., Berez-nai,B., Fabrizio,E., Vieregge,P., and Horstmann,R.D. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat. Genet.*, **18**, 262-265.
- Gatti,R.A. and Vinters,H.V. (1985). Cerebellar pathology in ataxia-telangiectasia: the significance of basket cells. *Kroc. Found. Ser.*, **19**, 225-232.
- Gerlach,M., Ben Shachar,D., Riederer,P., and Youdim,M.B. (1994). Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem.*, **63**, 793-807.
- Gesi,M., Santinami,A., Ruffoli,R., Conti,G., and Fornai,F. (2001). Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties). *Pharmacol. Toxicol.*, **89**, 217-224.
- Giaime,E., Sunyach,C., Herrant,M., Grosso,S., Auberger,P., McLean,P.J., Checler,F., and da Costa,C.A. (2006). Caspase-3-derived C-terminal product of synphilin-1 displays anti-apoptotic function via modulation of the p53-dependent cell death pathway. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11515-11522.
- Giasson,B.I., Duda,J.E., Quinn,S.M., Zhang,B., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, **34**, 521-533.
- Giasson,B.I. and Lee,V.M. (2001). Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron*, **31**, 885-888.
- Gibb,W.R., Narabayashi,H., Yokochi,M., Iizuka,R., and Lees,A.J. (1991). New pathologic observations in juvenile onset parkinsonism with dystonia. *Neurology*, **41**, 820-822.
- Gibb,W.R. and Poewe,W.H. (1986). The centenary of Friederich H. Lewy 1885-1950. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **12**, 217-222.
- Gillingham,A.K. and Munro,S. (2003). Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta*, **1641**, 71-85.
- Goldberg,M.S., Fleming,S.M., Palacino,J.J., Cepeda,C., Lam,H.A., Bhatnagar,A., Meloni,E.G., Wu,N., Ackerson,L.C., Klapstein,G.J., Gajendiran,M., Roth,B.L., Chesse-

- let, M.F., Maidment, N.T., Levine, M.S., and Shen, J. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.*, **278**, 43628-43635.
- Goldberg, M.S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T.A., Kitada, T., Costa, C., Tong, Y., Martella, G., Tschertter, A., Martins, A., Bernardi, G., Roth, B.L., Pothos, E.N., Calabresi, P., and Shen, J. (2005). Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron*, **45**, 489-496.
- Graham, D.G., Tiffany, S.M., Bell, W.R., Jr., and Gutknecht, W.F. (1978). Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol. Pharmacol.*, **14**, 644-653.
- Gray, C.W., Ward, R.V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K.G., West, A., Savopoulos, J., Hassan, N.J., Clinkenbeard, H., Hanning, C., Amegadzie, B., Davis, J.B., Dingwall, C., Livi, G.P., and Creasy, C.L. (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5699-5710.
- Gulbins, E., Dreschers, S., and Bock, J. (2003). Role of mitochondria in apoptosis. *Exp. Physiol.*, **88**, 85-90.
- Hald, A. and Lotharius, J. (2005). Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp. Neurol.*, **193**, 279-290.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., and Sawa, A. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 665-674.
- Harman, D. (2001). Aging: overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **928**, 1-21.
- Hasegawa, E., Kang, D., Sakamoto, K., Mitsumoto, A., Nagano, T., Minakami, S., and Takeshige, K. (1997). A Dual Effect of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-Analogues on the Respiratory Chain of Bovine Heart Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **337**, 69-74.
- Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y., and Minakami, S. (1990). 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 1049-1055.
- Hashimoto, M., Takenouchi, T., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2003). Alpha-synuclein up-regulates expression of caveolin-1 and down-regulates extracellular signal-regulated kinase activity in B103 neuroblastoma cells: role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **85**, 1468-1479.

-
- Hedge, V.L. and Williams, G.T. (2002). Commitment to apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha is dependent on caspase activity. *Apoptosis.*, **7**, 123-132.
- Hedrich, K., Schafer, N., Hering, R., Hagenah, J., Lanthaler, A.J., Schwinger, E., Kramer, P.L., Ozelius, L.J., Bressman, S.B., Abbruzzese, G., Martinelli, P., Kostic, V., Pramstaller, P.P., Vieregge, P., Riess, O., and Klein, C. (2004). The R98Q variation in DJ-1 represents a rare polymorphism. *Ann. Neurol.*, **55**, 145-146.
- Hicks, A.A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H.S., Sainz, J., Frigge, M.L., Kong, A., Gulcher, J.R., Stefansson, K., and Sveinbjornsdottir, S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, **52**, 549-555.
- Hill, W.D., Lee, V.M., Hurtig, H.I., Murray, J.M., and Trojanowski, J.Q. (1991). Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are present in Parkinson's disease Lewy bodies. *J. Comp Neurol.*, **309**, 150-160.
- Hochstrasser, H., Bauer, P., Walter, U., Behnke, S., Spiegel, J., Csoti, I., Zeiler, B., Bornemann, A., Pahnke, J., Becker, G., Riess, O., and Berg, D. (2004). Ceruloplasmin gene variations and substantia nigra hyperechogenicity in Parkinson disease. *Neurology*, **63**, 1912-1917.
- Hofmann, R.M. and Pickart, C.M. (2001). In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27936-27943.
- Honbou, K., Suzuki, N.N., Horiuchi, M., Taira, T., Niki, T., Ariga, H., and Inagaki, F. (2003). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of DJ-1, a protein associated with male fertility and parkinsonism. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **59**, 1502-1503.
- Hsueh, Y.P., Kim, E., and Sheng, M. (1997). Disulfide-linked head-to-head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95. *Neuron*, **18**, 803-814.
- Huber, C.G., Oefner, P.J., Preuss, E., and Bonn, G.K. (1993). High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1061-1066.
- Huttunen, M. (1995). The evolution of the serotonin-dopamine antagonist concept. *J. Clin. Psychopharmacol.*, **15**, 4S-10S.
- Huynh, D.P., Scoles, D.R., Nguyen, D., and 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.
- Ibanez, P., Bonnet, A.M., Debarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Durr, A., and Brice, A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*, **364**, 1169-1171.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., and Takahashi, R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, **105**, 891-902.
-

- Impey,S., Obrietan,K., and Storm,D.R. (1999). Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron*, **23**, 11-14.
- Itier,J.M., Ibanez,P., Mena,M.A., Abbas,N., Cohen-Salmon,C., Bohme,G.A., Laville,M., Pratt,J., Corti,O., Pradier,L., Ret,G., Joubert,C., Periquet,M., Araujo,F., Negroni,J., Casarejos,M.J., Canals,S., Solano,R., Serrano,A., Gallego,E., Sanchez,M., Deneffe,P., Benavides,J., Tremp,G., Rooney,T.A., Brice,A., and Garcia,d.Y. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2277-2291.
- Ito,T., Niwa,J., Hishikawa,N., Ishigaki,S., Doyu,M., and Sobue,G. (2003). Dornin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29106-29114.
- Javitch,J.A., D'Amato,R.J., Strittmatter,S.M., and Snyder,S.H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 2173-2177.
- Jensen,P.H., Nielsen,M.S., Jakes,R., Dotti,C.G., and Goedert,M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26292-26294.
- Kahle,P.J., Haass,C., Kretschmar,H.A., and Neumann,M. (2002). Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J. Neurochem.*, **82**, 449-457.
- Kahle,P.J., Neumann,M., Ozmen,L., Muller,V., Jacobsen,H., Schindzielorz,A., Okochi,M., Leimer,U., van Der,P.H., Probst,A., Kremmer,E., Kretschmar,H.A., and Haass,C. (2000). Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J. Neurosci.*, **20**, 6365-6373.
- Kahle,P.J., Neumann,M., Ozmen,L., Muller,V., Odoy,S., Okamoto,N., Jacobsen,H., Iwatsubo,T., Trojanowski,J.Q., Takahashi,H., Wakabayashi,K., Bogdanovic,N., Riederer,P., Kretschmar,H.A., and Haass,C. (2001). Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am. J. Pathol.*, **159**, 2215-2225.
- Khan,F.H., Saha,M., and Chakrabarti,S. (2001). Dopamine induced protein damage in mitochondrial-synaptosomal fraction of rat brain. *Brain Res.*, **895**, 245-249.
- Kim,R.H., Peters,M., Jang,Y., Shi,W., Pintilie,M., Fletcher,G.C., DeLuca,C., Liepa,J., Zhou,L., Snow,B., Binari,R.C., Manoukian,A.S., Bray,M.R., Liu,F.F., Tsao,M.S., and Mak,T.W. (2005a). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*, **7**, 263-273.
- Kim,R.H., Smith,P.D., Aleyasin,H., Hayley,S., Mount,M.P., Pownall,S., Wakeham,A., You,T., Kalia,S.K., Horne,P., Westaway,D., Lozano,A.M., Anisman,H., Park,D.S., and Mak,T.W. (2005b). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 5215-5220.

-
- Kitada,T., Asakawa,S., Hattori,N., Matsumine,H., Yamamura,Y., Minoshima,S., Yokochi,M., Mizuno,Y., and Shimizu,N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, **392**, 605-608.
- Klaidman,L.K., Adams,J.D., Jr., Leung,A.C., Kim,S.S., and Cadenas,E. (1993). Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 169-179.
- Klein,C., Djarmati,A., Hedrich,K., Schafer,N., Scaglione,C., Marchese,R., Kock,N., Schule,B., Hiller,A., Lohnau,T., Winkler,S., Wiegers,K., Hering,R., Bauer,P., Riess,O., Abbruzzese,G., Martinelli,P., and Pramstaller,P.P. (2005). PINK1, Parkin, and DJ-1 mutations in Italian patients with early-onset parkinsonism. *Eur. J. Hum. Genet.*, **13**, 1086-1093.
- Koeppen,A.H. (2005). The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum.*, **4**, 62-73.
- Kornau,H.C., Schenker,L.T., Kennedy,M.B., and Seeburg,P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, **269**, 1737-1740.
- Kremer,B., Goldberg,P., Andrew,S.E., Theilmann,J., Telenius,H., Zeisler,J., Squitieri,F., Lin,B., Bassett,A., Almqvist,E., and . (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1401-1406.
- Krüger,R., Kuhn,W., Muller,T., Voitalla,D., Graeber,M., Kosel,S., Przuntek,H., Epplen,J.T., Schols,L., and Riess,O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.*, **18**, 106-108.
- Krüger,R. (2004). The role of synphilin-1 in synaptic function and protein degradation. *Cell Tissue Res.*, **318**, 195-199.
- Krüger,R., Fischer,C., Schulte,T., Strauss,K.M., Muller,T., Voitalla,D., Berg,D., Hungs,M., Gobbele,R., Berger,K., Epplen,J.T., Riess,O., and Schols,L. (2003). Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, **351**, 125-129.
- Kuhn,D.M., Arthur,R.E., Jr., Thomas,D.M., and Elferink,L.A. (1999). Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **73**, 1309-1317.
- Kuklin,A., Munson,K., Gjerde,D., Haefele,R., and Taylor,P. (1997). Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. *Genet. Test.*, **1**, 201-206.
- Kuusisto,E., Parkkinen,L., and Alafuzoff,I. (2003). Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **62**, 1241-1253.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
-

- Larsen,C.N., Price,J.S., and Wilkinson,K.D. (1996). Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues. *Biochemistry*, **35**, 6735-6744.
- Lavedan,C., Buchholtz,S., Nussbaum,R.L., Albin,R.L., and Polymeropoulos,M.H. (2002). A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci. Lett.*, **322**, 57-61.
- Le,W.D., Xu,P., Jankovic,J., Jiang,H., Appel,S.H., Smith,R.G., and Vassilatis,D.K. (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat. Genet.*, **33**, 85-89.
- Lee,G., Junn,E., Tanaka,M., Kim,Y.M., and Mouradian,M.M. (2002a). Synphilin-1 degradation by the ubiquitin-proteasome pathway and effects on cell survival. *J. Neurochem.*, **83**, 346-352.
- Lee,G., Tanaka,M., Park,K., Lee,S.S., Kim,Y.M., Junn,E., Lee,S.H., and Mouradian,M.M. (2004). Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6834-6839.
- Lee,M.K., Stirling,W., Xu,Y., Xu,X., Qui,D., Mandir,A.S., Dawson,T.M., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Price,D.L. (2002b). Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 8968-8973.
- Leroy,E., Anastasopoulos,D., Konitsiotis,S., Lavedan,C., and Polymeropoulos,M.H. (1998a). Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum. Genet.*, **103**, 424-427.
- 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., and Polymeropoulos,M.H. (1998b). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, **395**, 451-452.
- Li,J.Y., Henning,J.P., and Dahlstrom,A. (2002). Differential localization of alpha-, beta- and gamma-synucleins in the rat CNS. *Neuroscience*, **113**, 463-478.
- Li,L., He,S., Sun,J.M., and Davie,J.R. (2004). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem. Cell Biol.*, **82**, 460-471.
- Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- Li,X.J., Li,S.H., Sharp,A.H., Nucifora,F.C., Jr., Schilling,G., Lanahan,A., Worley,P., Snyder,S.H., and Ross,C.A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, **378**, 398-402.
- Liani,E., Eyal,A., Avraham,E., Shemer,R., Szargel,R., Berg,D., Bornemann,A., Riess,O., Ross,C.A., Rott,R., and Engelender,S. (2004). Ubiquitylation of synphilin-1 and al-

-
- pha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 5500-5505.
- Lim,K.L., Chew,K.C., Tan,J.M., Wang,C., Chung,K.K., Zhang,Y., Tanaka,Y., Smith,W., Engelender,S., Ross,C.A., Dawson,V.L., and Dawson,T.M. (2005). Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J. Neurosci.*, **25**, 2002-2009.
- Liu,Y., Fallon,L., Lashuel,H.A., Liu,Z., and Lansbury,P.T., Jr. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, **111**, 209-218.
- Liu,Y., Lashuel,H.A., Choi,S., Xing,X., Case,A., Ni,J., Yeh,L.A., Cuny,G.D., Stein,R.L., and Lansbury,P.T., Jr. (2003). Discovery of inhibitors that elucidate the role of UCH-L1 activity in the H1299 lung cancer cell line. *Chem. Biol.*, **10**, 837-846.
- Liu,Y., Peter,D., Roghani,A., Schuldiner,S., Prive,G.G., Eisenberg,D., Brecha,N., and Edwards,R.H. (1992). A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell*, **70**, 539-551.
- Lücking,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., and Brice,A. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.*, **342**, 1560-1567.
- Ma,J. and Ptashne,M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, **51**, 113-119.
- MacLeod,D., Dowman,J., Hammond,R., Leete,T., Inoue,K., and Abeliovich,A. (2006). The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*, **52**, 587-593.
- Maehama,T., Taylor,G.S., Slama,J.T., and Dixon,J.E. (2000). A sensitive assay for phosphoinositide phosphatases. *Anal. Biochem.*, **279**, 248-250.
- Maekawa,M., Ishizaki,T., Boku,S., Watanabe,N., Fujita,A., Iwamatsu,A., Obinata,T., Ohashi,K., Mizuno,K., and Narumiya,S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, **285**, 895-898.
- Maker,H.S., Weiss,C., Silides,D.J., and Cohen,G. (1981). Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J. Neurochem.*, **36**, 589-593.
- Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. Molecular cloning. A laboratory manual. [Cold spring harbor lab (USA)]. 1989.
- Ref Type: Generic
- Maraganore,D.M., Lesnick,T.G., Elbaz,A., Chartier-Harlin,M.C., Gasser,T., Kruger,R., Hattori,N., Mellick,G.D., Quattrone,A., Satoh,J., Toda,T., Wang,J., Ioannidis,J.P., de Andrade,M., and Rocca,W.A. (2004). UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann. Neurol.*, **55**, 512-521.
-

- Markey,S.P., Johannessen,J.N., Chiueh,C.C., Burns,R.S., and Herkenham,M.A. (1984). Intra-neuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*, **311**, 464-467.
- Marks,A.R. (1997). Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am. J. Physiol*, **272**, H597-H605.
- Martin,L.J., Pan,Y., Price,A.C., Sterling,W., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., Price,D.L., and Lee,M.K. (2006). Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J. Neurosci.*, **26**, 41-50.
- Martins,L.M., Iaccarino,I., Tenev,T., Gschmeissner,S., Totty,N.F., Lemoine,N.R., Savopoulos,J., Gray,C.W., Creasy,C.L., Dingwall,C., and Downward,J. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J. Biol. Chem.*, **277**, 439-444.
- Martins,L.M., Morrison,A., Klupsch,K., Fedele,V., Moiso,N., Teismann,P., Abuin,A., Grau,E., Geppert,M., Livi,G.P., Creasy,C.L., Martin,A., Hargreaves,I., Heales,S.J., Okada,H., Brandner,S., Schulz,J.B., Mak,T., and Downward,J. (2004). Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9848-9862.
- Marttila,R.J., Kaprio,J., Koskenvuo,M., and Rinne,U.K. (1988). Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology*, **38**, 1217-1219.
- Marx,F.P., Holzmann,C., Strauss,K.M., Li,L., Eberhardt,O., Gerhardt,E., Cookson,M.R., Hernandez,D., Farrer,M.J., Kachergus,J., Engelender,S., Ross,C.A., Berger,K., Schols,L., Schulz,J.B., Riess,O., and Kruger,R. (2003). Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1223-1231.
- Maskri,L., Zhu,X., Fritzen,S., Kuhn,K., Ullmer,C., Engels,P., Andriske,M., Stichel,C.C., and Lubbert,H. (2004). Influence of different promoters on the expression pattern of mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Neurodegener. Dis.*, **1**, 255-265.
- McNaught,K.S., Belizaire,R., Isacson,O., Jenner,P., and Olanow,C.W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, **179**, 38-46.
- Migaud,M., Charlesworth,P., Dempster,M., Webster,L.C., Watabe,A.M., Makhinson,M., He,Y., Ramsay,M.F., Morris,R.G., Morrison,J.H., O'Dell,T.J., and Grant,S.G. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, **396**, 433-439.
- Mikoshiba,K., Furuichi,T., and Miyawaki,A. (1994). Structure and function of IP3 receptors. *Semin. Cell Biol.*, **5**, 273-281.
- Miller,D.W., Hague,S.M., Clarimon,J., Baptista,M., Gwinn-Hardy,K., Cookson,M.R., and Singleton,A.B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*, **62**, 1835-1838.
- Miller, J. H. Assay of beta-Galactosidase. In: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York , 352-355. 1972.

Ref Type: Generic

- Mitsuzawa,H. and Tamanoi,F. (1995). In vivo assays for farnesyltransferase inhibitors with *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, **250**, 43-51.
- Mizuno,Y., Hattori,N., Kitada,T., Matsumine,H., Mori,H., Shimura,H., Kubo,S., Kobayashi,H., Asakawa,S., Minoshima,S., and Shimizu,N. (2001). Familial Parkinson's disease. Alpha-synuclein and parkin. *Adv. Neurol.*, **86**, 13-21.
- Morens,D.M., Grandinetti,A., Reed,D., White,L.R., and Ross,G.W. (1995). Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology*, **45**, 1041-1051.
- Neystat,M., Rzhetskaya,M., Kholodilov,N., and Burke,R.E. (2002). Analysis of synphilin-1 and synuclein interactions by yeast two-hybrid beta-galactosidase liquid assay. *Neurosci. Lett.*, **325**, 119-123.
- Nicklas,W.J., Vyas,I., and 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.*, **36**, 2503-2508.
- O'Farrell,C., Murphy,D.D., Petrucelli,L., Singleton,A.B., Hussey,J., Farrer,M., Hardy,J., Dickson,D.W., and Cookson,M.R. (2001). Transfected synphilin-1 forms cytoplasmic inclusions in HEK293 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **97**, 94-102.
- Olanow,C.W., Perl,D.P., DeMartino,G.N., and McNaught,K.S. (2004). Lewy-body formation is an aggregates-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol.*, **3**, 496-503.
- ORNSTEIN,L. (1964). DISC ELECTROPHORESIS. I. BACKGROUND AND THEORY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349.
- Osaka,H., Wang,Y.L., Takada,K., Takizawa,S., Setsuie,R., Li,H., Sato,Y., Nishikawa,K., Sun,Y.J., Sakurai,M., Harada,T., Hara,Y., Kimura,I., Chiba,S., Namikawa,K., Kiyanama,H., Noda,M., Aoki,S., and Wada,K. (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 1945-1958.
- Paisan-Ruiz,C., Jain,S., Evans,E.W., Gilks,W.P., Simon,J., Van Der,B.M., Lopez,d.M., Aparicio,S., Gil,A.M., Khan,N., Johnson,J., Martinez,J.R., Nicholl,D., Carrera,I.M., Pena,A.S., de Silva,R., Lees,A., Marti-Masso,J.F., Perez-Tur,J., Wood,N.W., and Singleton,A.B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, **44**, 595-600.
- Paisan-Ruiz,C., Lang,A.E., Kawarai,T., Sato,C., Salehi-Rad,S., Fisman,G.K., Al Khairallah,T., George-Hyslop,P., Singleton,A., and Rogaeva,E. (2005). LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology*, **65**, 696-700.
- Pankratz,N., Nichols,W.C., Uniacke,S.K., Halter,C., Murrell,J., Rudolph,A., Shults,C.W., Conneally,P.M., and Foroud,T. (2003a). Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2599-2608.

- Pankratz,N., Nichols,W.C., Uniacke,S.K., Halter,C., Rudolph,A., Shults,C., Conneally,P.M., and Foroud,T. (2003b). Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 1053-1057.
- Penzes,P., Johnson,R.C., Sattler,R., Zhang,X., Haganir,R.L., Kambampati,V., Mains,R.E., and Eipper,B.A. (2001). The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, **29**, 229-242.
- Perez,F.A. and Palmiter,R.D. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 2174-2179.
- Perez,R.G., Waymire,J.C., Lin,E., Liu,J.J., Guo,F., and Zigmond,M.J. (2002). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.*, **22**, 3090-3099.
- Perez-Olle,R., Lopez-Toledano,M.A., and Liem,R.K. (2004). The G336S variant in the human neurofilament-M gene does not affect its assembly or distribution: importance of the functional analysis of neurofilament variants. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **63**, 759-774.
- Petit,A., Kawarai,T., Paitel,E., Sanjo,N., Maj,M., Scheid,M., Chen,F., Gu,Y., Hasegawa,H., Salehi-Rad,S., Wang,L., Rogaeva,E., Fraser,P., Robinson,B., George-Hyslop,P., and Tandon,A. (2005). Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J. Biol. Chem.*, **280**, 34025-34032.
- Pickart,C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 503-533.
- Pollanen,M.S., Dickson,D.W., and Bergeron,C. (1993). Pathology and biology of the Lewy body. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **52**, 183-191.
- 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., and Nussbaum,R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, **276**, 2045-2047.
- Przedborski,S. and Jackson-Lewis,V. (1998). Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord.*, **13 Suppl 1**, 35-38.
- Raha,S. and Robinson,B.H. (2001). Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am. J. Med. Genet.*, **106**, 62-70.
- Ramirez,A., Heimbach,A., Grundemann,J., Stiller,B., Hampshire,D., Cid,L.P., Goebel,I., Mubaidin,A.F., Wriekat,A.L., Roeper,J., Al Din,A., Hillmer,A.M., Karsak,M., Liss,B., Woods,C.G., Behrens,M.I., and Kubisch,C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat. Genet.*, **38**, 1184-1191.
- Ramsay,R.R., Dadgar,J., Trevor,A., and Singer,T.P. (1986). Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life Sci.*, **39**, 581-588.

-
- Rao,R.V. and Bredesen,D.E. (2004). Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 653-662.
- Reimers,M., Heilig,M., and Sommer,W.H. (2005). Gene discovery in neuropharmacological and behavioral studies using Affymetrix microarray data. *Methods*, **37**, 219-228.
- Ribeiro,C.S., Carneiro,K., Ross,C.A., Menezes,J.R., and Engelender,S. (2002). Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 23927-23933.
- Richfield,E.K., Thiruchelvam,M.J., Cory-Slechta,D.A., Wuertzer,C., Gainetdinov,R.R., Caron,M.G., Di Monte,D.A., and Federoff,H.J. (2002). Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp. Neurol.*, **175**, 35-48.
- Rochet,J.C., Conway,K.A., and Lansbury,P.T., Jr. (2000). Inhibition of fibrillization and accumulation of prefibrillar oligomers in mixtures of human and mouse alpha-synuclein. *Biochemistry*, **39**, 10619-10626.
- Ross,G.W., Abbott,R.D., Petrovitch,H., Morens,D.M., Grandinetti,A., Tung,K.H., Tanner,C.M., Masaki,K.H., Blanchette,P.L., Curb,J.D., Popper,J.S., and White,L.R. (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*, **283**, 2674-2679.
- Rozas,G., Lopez-Martin,E., Guerra,M.J., and Labandeira-Garcia,J.L. (1998). The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. *J. Neurosci. Methods*, **83**, 165-175.
- Rozen,R. (2000). Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin. Thromb. Hemost.*, **26**, 255-261.
- Ruden,D.M. (1992). Activating regions of yeast transcription factors must have both acidic and hydrophobic amino acids. *Chromosoma*, **101**, 342-348.
- Ruden,D.M., Ma,J., Li,Y., Wood,K., and Ptashne,M. (1991). Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature*, **350**, 250-252.
- Sambrook,J. and Gething,M.J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, **342**, 224-225.
- Sanger,F., Coulson,A.R., Barrell,B.G., Smith,A.J., and Roe,B.A. (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.*, **143**, 161-178.
- Schoenberg,B.S., Anderson,D.W., and Haerer,A.F. (1985). Prevalence of Parkinson's disease in the biracial population of Copiah County, Mississippi. *Neurology*, **35**, 841-845.
- Schoenberg,B.S., Osuntokun,B.O., Adeuja,A.O., Bademosi,O., Nottidge,V., Anderson,D.W., and Haerer,A.F. (1988). Comparison of the prevalence of Parkinson's disease in black populations in the rural United States and in rural Nigeria: door-to-door community studies. *Neurology*, **38**, 645-646.
-

- Scott,W.K., Nance,M.A., Watts,R.L., Hubble,J.P., Koller,W.C., Lyons,K., Pahwa,R., Stern,M.B., Colcher,A., Hiner,B.C., Jankovic,J., Ondo,W.G., Allen,F.H., Jr., Goetz,C.G., Small,G.W., Masterman,D., Mastaglia,F., Laing,N.G., Stajich,J.M., Slotterbeck,B., Booze,M.W., Ribble,R.C., Rampersaud,E., West,S.G., Gibson,R.A., Middleton,L.T., Roses,A.D., Haines,J.L., Scott,B.L., Vance,J.M., and Pericak-Vance,M.A. (2001). Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes. *JAMA*, **286**, 2239-2244.
- Sebbagh,M., Renvoize,C., Hamelin,J., Riche,N., Bertoglio,J., and Breard,J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 346-352.
- Sedelis,M., Hofele,K., Auburger,G.W., Morgan,S., Huston,J.P., and Schwarting,R.K. (2000). MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav. Genet.*, **30**, 171-182.
- Sedgwick,S.G. and Smerdon,S.J. (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 311-316.
- Sherwin,B.B. (2003). Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr. Rev.*, **24**, 133-151.
- Shimura,H., Hattori,N., Kubo,S., Mizuno,Y., Asakawa,S., Minoshima,S., Shimizu,N., Iwai,K., Chiba,T., Tanaka,K., and Suzuki,T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.*, **25**, 302-305.
- 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., Muentner,M., Baptista,M., Miller,D., Blancato,J., Hardy,J., and Gwinn-Hardy,K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, **302**, 841.
- Sofic,E., Riederer,P., Heinsen,H., Beckmann,H., Reynolds,G.P., Hebenstreit,G., and Youdim,M.B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J. Neural Transm.*, **74**, 199-205.
- Specht,C.G. and Schoepfer,R. (2001). Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC. Neurosci.*, **2**, 11.
- Stokoe,D., Stephens,L.R., Copeland,T., Gaffney,P.R., Reese,C.B., Painter,G.F., Holmes,A.B., McCormick,F., and Hawkins,P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*, **277**, 567-570.
- Strauss,K.M., Martins,L.M., Plun-Favreau,H., Marx,F.P., Kautzmann,S., Berg,D., Gasser,T., Wszolek,Z., Muller,T., Bornemann,A., Wolburg,H., Downward,J., Riess,O., Schulz,J.B., and Kruger,R. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2099-2111.
- Subramaniam,S., Strelau,J., and Unsicker,K. (2003). Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. *J. Biol. Chem.*, **278**, 8904-8912.

-
- Sulzer,D. and Zecca,L. (2000). Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox. Res.*, **1**, 181-195.
- Suzuki,Y., Imai,Y., Nakayama,H., Takahashi,K., Takio,K., and Takahashi,R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell*, **8**, 613-621.
- Takahashi,H. and Wakabayashi,K. (2001). The cellular pathology of Parkinson's disease. *Neuropathology.*, **21**, 315-322.
- Tanaka,M., Kim,Y.M., Lee,G., Junn,E., Iwatsubo,T., and Mouradian,M.M. (2004). Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J. Biol. Chem.*, **279**, 4625-4631.
- Tang,T.S., Tu,H., Chan,E.Y., Maximov,A., Wang,Z., Wellington,C.L., Hayden,M.R., and Bezprozvanny,I. (2003). Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron*, **39**, 227-239.
- Tanji,K., Tanaka,T., Mori,F., Kito,K., Takahashi,H., Wakabayashi,K., and Kamitani,T. (2006). NUB1 suppresses the formation of Lewy body-like inclusions by proteasomal degradation of synphilin-1. *Am. J. Pathol.*, **169**, 553-565.
- Tanner,C.M. (1989). The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.*, **12**, 49-54.
- Tanner,C.M. and Langston,J.W. (1990). Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology*, **40**, suppl-30.
- Tao,X. and Tong,L. (2003). Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.*, **278**, 31372-31379.
- Thornberry,N.A. and Molineaux,S.M. (1995). Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *Protein Sci.*, **4**, 3-12.
- Twobin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4350-4354. 1979.
- Ref Type: Generic
- Ueda,K., Fukushima,H., Masliah,E., Xia,Y., Iwai,A., Yoshimoto,M., Otero,D.A., Kondo,J., Ihara,Y., and Saitoh,T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **90**, 11282-11286.
- Ungerstedt,U. (1971). Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand. Suppl*, **367**, 69-93.
- Unoki,M. and Nakamura,Y. (2001). Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*, **20**, 4457-4465.
-

- Uversky, V.N. (2003). A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **21**, 211-234.
- Uversky, V.N., Li, J., and Fink, A.L. (2001). Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS Lett.*, **500**, 105-108.
- 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., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G., and Wood, N.W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, **304**, 1158-1160.
- van der Putten, H., Wiederhold, K.H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., Kauffmann, S., Hofele, K., Spooren, W.P., Ruegg, M.A., Lin, S., Caroni, P., Sommer, B., Tolnay, M., and Bilbe, G. (2000). Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J. Neurosci.*, **20**, 6021-6029.
- Van Eyk, J.E., Arrell, D.K., Foster, D.B., Strauss, J.D., Heinonen, T.Y., Furmaniak-Kazmierczak, E., Cote, G.P., and Mak, A.S. (1998). Different molecular mechanisms for Rho family GTPase-dependent, Ca²⁺-independent contraction of smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, **273**, 23433-23439.
- Van Gorp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 487-497.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 535-602.
- von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J.M., Lim, K.L., Sasaki, M., Hess, E.J., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 10744-10749.
- Wakabayashi, K., Engelender, S., Tanaka, Y., Yoshimoto, M., Mori, F., Tsuji, S., Ross, C.A., and Takahashi, H. (2002). Immunocytochemical localization of synphilin-1, an alpha-synuclein-associated protein, in neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol. (Berl)*, **103**, 209-214.
- Wang, J. and Bannon, M.J. (2005). Sp1 and Sp3 activate transcription of the human dopamine transporter gene. *J. Neurochem.*, **93**, 474-482.
- Ward, C.D., Duvoisin, R.C., Ince, S.E., Nutt, J.D., Eldridge, R., and Calne, D.B. (1983). Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology*, **33**, 815-824.
- West, A.B. and Maidment, N.T. (2004). Genetics of parkin-linked disease. *Hum. Genet.*, **114**, 327-336.
- West, A.B., Moore, D.J., Choi, C., Andrabi, S.A., Li, X., Dikeman, D., Biskup, S., Zhang, Z., Lim, K.L., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2007). Parkinson's disease-associated mu-

- tations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 223-232.
- Wilson, M.A., Collins, J.L., Hod, Y., Ringe, D., and 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.
- Wolf, B.B. and Green, D.R. (2002). Apoptosis: letting slip the dogs of war. *Curr. Biol.*, **12**, R177-R179.
- Wong, W.K., Chen, K., and Shih, J.C. (2001). Regulation of human monoamine oxidase B gene by Sp1 and Sp3. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 852-859.
- Yamada, N., Makino, Y., Clark, R.A., Pearson, D.W., Mattei, M.G., Guenet, J.L., Ohama, E., Fujino, I., Miyawaki, A., Furuichi, T., and . (1994). Human inositol 1,4,5-trisphosphate type-1 receptor, InsP3R1: structure, function, regulation of expression and chromosomal localization. *Biochem. J.*, **302 (Pt 3)**, 781-790.
- Yao, D., Gu, Z., Nakamura, T., Shi, Z.Q., Ma, Y., Gaston, B., Palmer, L.A., Rockenstein, E.M., Zhang, Z., Masliah, E., Uehara, T., and Lipton, S.A. (2004). Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 10810-10814.
- Yokota, T., Sugawara, K., Ito, K., Takahashi, R., Ariga, H., and Mizusawa, H. (2003). Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 1342-1348.
- 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., Gomez, T.E., del Ser, T., Munoz, D.G., and de Yebenes, J.G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.*, **55**, 164-173.
- Zetterstrom, R.H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B.J., Olson, L., and Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*, **276**, 248-250.
- Zetterstrom, R.H., Williams, R., Perlmann, T., and Olson, L. (1996). Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **41**, 111-120.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L., and 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.
- Zhou, Q.Y. and Palmiter, R.D. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipic, and aphagic. *Cell*, **83**, 1197-1209.
- Zhou, Q.Y., Quaipe, C.J., and Palmiter, R.D. (1995). Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature*, **374**, 640-643.

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., and Gasser,T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, **44**, 601-607.

Zühlke,C., Riess,O., Schroder,K., Siedlaczek,I., Epplen,J.T., Engel,W., and Thies,U. (1993). Expansion of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in 352 patients of German origin. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 1467-1469.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Thomas Franck

geboren am 10. Dezember 1973 in Freiburg i. Brsg.

Schulbildung:

1984 – 1993 Klettgaugymnasium Tiengen

14. Mai 1993 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1993 – 1995 Zivildienst bei der Caritas Waldshut e.V.

Hochschulausbildung:

1995 – 2001 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

2001 Diplomarbeit im Institut der Neurologischen Immunologie
des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von
Prof. Dr. G. Jung vom Institut der Organischen Chemie der
Universität Tübingen mit dem Thema: „Etablierung stabiler,
rekombinanter T-Zellrezeptor-Transfektanten und Charakterisierung
von T-Zellrezeptor-Transfektanten mittels kombinatorisch
aufgebauter Peptidkolektionen“

17. April 2001 Abschluss als Diplom-Biochemiker

2001 – 2006 Promotion im Institut für Medizinische Genetik des Univer-
sitäts-klinikums Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. O.
Rieß mit dem Thema: „Funktion von Synphilin-1 bei der
Pathogenese des Morbus Parkinson – Charakterisierung im
Mausmodell und Auffinden neuer Interaktionspartner mit-
tels Yeast 2-Hybrid-Technologie“