

Analyse der Expression von *SNCA* im Hinblick auf die molekulare Entstehung der Parkinson-Krankheit

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Julia Sekler
aus Ellwangen (Jagst)

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.05.2024

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Thomas Gasser

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Andreas Nieder

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Zusammenfassung.....	4
1	Einleitung.....	7
1.1	Morbus Parkinson.....	7
1.1.1	Klinische Symptome und Diagnose	8
1.1.2	Genetik der Parkinson-Krankheit	9
1.1.3	Hirnregionen, die mit Parkinson assoziiert sind	12
1.2	Das SNCA Gen	14
1.2.1	Entdeckung, Funktionen und Aufbau von aSyn.....	15
1.2.2	Genetische Varianten des SNCA Gens	18
1.2.3	Aggregate des Proteins alpha-Synuclein	22
1.3	Alternatives Splicing	25
1.3.1	Alternative Spliceformen des SNCA Gens.....	28
1.4	Der SNP rs356219	29
1.5	Allelspezifische Expression von SNCA.....	30
2	Ziele dieser Arbeit	32
2.1	Teilprojekt 1	32
2.2	Teilprojekt 2	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Projektspezifische Methoden	35
3.2	Teilprojekt 1	35
3.2.1	Auswahl der Proben	35
3.2.2	Auswahl des SNPs	36
3.2.3	Isoformspezifisches Primerdesign	36
3.3	Teilprojekt 2	37
3.3.1	Mutationsträger und Kontrollen	37
3.3.2	Zellkultur	39
3.3.3	Restriktionsfragmentlängenanalyse	41
3.3.4	Massenspektrometrische Analyse der allelspezifischen Peptide.....	43
3.4	Allgemeine Methoden	44

3.4.1	Isolation der RNA	44
3.4.2	Qualitätskontrolle der RNA.....	44
3.4.3	Umschrieb der RNA in cDNA.....	45
3.4.4	PCR.....	45
3.4.5	qPCR.....	46
3.4.6	Referenzgene	51
3.4.7	Sequenzierung	52
3.4.8	Statistik	54
4	Ergebnisse	56
4.1	Teilprojekt 1.....	56
4.1.1	Relative Expression der Isoformen von <i>SNCA</i> in Blut.....	56
4.1.2	Einfluss der Isoformen auf klinische Parameter	61
4.1.3	Relative Expression der Isoformen von <i>SNCA</i> in Hirngewebe.....	70
4.2	Teilprojekt 2.....	76
4.2.1	Allelspezifische Expression von <i>SNCA</i> in Lymphoblasten.....	76
4.2.2	Allelspezifische Expression von <i>SNCA</i> in Fibroblasten, iPS-Zellen und mDA-Neuronen.....	82
4.2.3	Allelspezifische Expression von <i>SNCA</i> in humanem post-mortem Hirngewebe.....	86
4.2.4	Massenspektrometrische Analyse der allelspezifischen Peptide.....	89
4.2.5	Interne Kontrollen für die qPCR	92
4.2.6	Validierung der Ergebnisse via RFLP Analyse	94
5	Diskussion.....	96
5.1	Teilprojekt 1.....	96
5.1.1	Relative Expression der Isoformen von <i>SNCA</i> in Blut.....	96
5.1.2	Einfluss der Isoformen auf klinische Parameter	99
5.1.3	Relative Expression der Isoformen von <i>SNCA</i> in Hirngewebe.....	101
5.2	Teilprojekt 2.....	104
5.2.1	Allelspezifische Expression von <i>SNCA</i> in Lymphoblasten.....	104
5.2.2	Allelspezifische Expression von <i>SNCA</i> in Fibroblasten, iPS-Zellen und mDA-Neuronen.....	107

5.2.3	Allelspezifische Expression von <i>SNCA</i> in humanem post-mortem Hirngewebe.....	109
6	Fazit und Perspektiven	112
6.1	Teilprojekt 1	112
6.2	Teilprojekt 2	114
7	Erklärung Eigenanteil.....	116
III.	Abkürzungsverzeichnis	117
IV.	Materialien	119
I.	Verbrauchsmaterialien.....	119
II.	Chemikalien	119
III.	Geräte.....	121
IV.	Software	122
V.	Abbildungsverzeichnis.....	123
VI.	Tabellenverzeichnis	124
VII.	Danksagung	126
VIII.	Literaturverzeichnis.....	128

II. Zusammenfassung

Obwohl Morbus Parkinson durch den demographischen Wandel immer mehr Bedeutung in der Medizin bekommt, ist bisher noch ungeklärt, welche Faktoren oder welches multifaktorielle Geschehen zum Ausbruch der Krankheit führen. In der vorliegenden Dissertation wurden deshalb in zwei Teilprojekten molekulare Mechanismen im *SNCA* Gen untersucht, um ihre Rolle bei der Entstehung der Parkinson-Krankheit näher zu beleuchten. Das *SNCA* Gen kodiert für aSyn, welches die Hauptkomponente der Aggregate im Gehirn von Parkinson Patienten ist. Weiterhin gibt es erbliche Varianten der Parkinson-Krankheit, die durch Punktmutationen im *SNCA* Gen verursacht werden.

Im Teilprojekt 1 wurden die Expressionslevel der alternativ gesplittenen Isoformen des *SNCA* Gens und die Wirkung des SNPs rs356219 auf das alternative Splicing untersucht. Dafür wurden sowohl Studien in Blut von Patienten und Kontrollen als auch in post-mortem Hirngewebe durchgeführt. Es sollte einerseits ein möglicher Biomarker für die Entstehung von Morbus Parkinson gefunden werden, andererseits sollte der Einfluss des alternativen Splittings auf klinische Parameter studiert werden.

Die Isoformen AS-140 und AS-126 waren im Blut in Kontrollen signifikant höher exprimiert als in PD-Patienten. Weiterhin konnte eine signifikant höhere Expression der AS-98 bei Proben mit dem Risikogenotyp CC des rs356219 bei IPS Patienten nachgewiesen werden. Dies könnte auf einen pathogenen Mechanismus der AS-98 in Verbindung mit dem Risikogenotyp CC hinweisen, da die AS-98 in der Literatur als die toxischste aller Isoformen diskutiert wird. Das alternative Splicing von *SNCA* scheint hingegen keinen Einfluss auf das Erkrankungsalter und die kognitive Progression der IPS-Patienten zu haben. Interessanterweise konnte aber ein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der Isoformen und der motorischen Progression gefunden werden. Der Anteil der AS-140 war umso höher, je schneller die motorische Progression voranschritt. Dagegen war der Anteil der AS-126 umso höher, je langsamer die motorische Verschlechterung pro Jahr war. Dies könnte dafür sprechen, dass die AS-126, im Gegensatz zum Gesamttranskript AS-140, einen eher protektive Einfluss hat.

In den verschiedenen Hirngeweben konnte keine relevanten signifikanten Einflüsse der Genotypen von rs356219 auf das alternative Splicing gefunden werden. Die Expression der AS-98 war in Proben der Substantia nigra am höchsten. Dies könnte wiederum ein Hinweis auf den toxischen Effekt der AS-98 sein, der neben den Blutproben nun auch in einem parkinsonrelevanten Hirnareal gefunden wurde.

Im Teilprojekt 2 wurde die Expression des mutierten Allels zweier Punktmutationen im *SNCA* Gen, welche eine autosomal dominant vererbte Parkinsonkrankheit verursachen, untersucht. Da momentan in der Literatur die Rolle des mutierten Allels der A30P und A53T Mutation kontrovers diskutiert wird, wurden in dieser Arbeit das erste Mal die Expression des wild-typ und des mutierten Allels in verschiedenen Geweben und Zelllinien in Mutationsträgern und Kontrollen auf RNA Ebene untersucht. Ferner wurde die Expression des A53T Allels über Massenspektrometrie auf Proteinebene quantifiziert.

In Lymphoblastenzelllinien konnte in A30P Mutationsträgern keine Expression des mutierten Allels gefunden werden. In einer Lymphoblastenzelllinie A53T Mutationsträgers konnte eine minimale Expression des mutierten Allels nachgewiesen werden. Weiterhin war das wild-typ Allel nicht, wie in einer anderen Studie, kompensatorisch hochreguliert. In anderen Zelllinien aber wie Fibroblasten, iPS-Zelllinien und differenzierten mDA Neuronen konnte das mutierte Allel nachgewiesen werden. Auch in verschiedenen Hirngeweben von Mutationsträgern konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, die Expression des mutierten Allels bewiesen werden. Hieraus kann gefolgert werden, dass die kontroversen Ergebnisse vorhergehender Studien, welche allesamt fast ausschließlich an Lymphoblastenzelllinien von Mutationsträgern und Kontrollen durchgeführt worden waren, dadurch zustande kamen, dass die Lymphoblastenzelllinien während der Kultivierung monoklonal werden können. Das mutierte Allel wird offensichtlich durch einen noch nicht bekannten Mechanismus während der Kultivierung herunter reguliert. Da in allen anderen Zelllinien und Gewebearten die Expression beider Allele mit verschiedenen Techniken nachgewiesen werden konnte, müssen die Theorien, welche Rolle das mutierte Allel an der Entstehung von Morbus Parkinson hat, neu überdacht werden.

In weiteren Studien sollte nun der Mechanismus, der zum Ausbruch der Parkinsonkrankheit bei Mutationsträgern führt, genauer untersucht werden. Außerdem sollte die fakultative Monoklonalität in den Lymphoblastenzelllinien, in welcher das mutierte Allel durch einen noch unbekanntem Prozess selektiv herunter reguliert wird, näher untersucht werden.

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson, oder auch die Parkinson'sche Krankheit (PK) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer Krankheit. Von der PK ist rund 1% der Population der über 60-jährigen in Industrienationen betroffen. Aufgrund der stetig steigenden Lebenserwartung wird die Anzahl der an Morbus Parkinson Erkrankten in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen und noch mehr Bedeutung in der Medizin bekommen (de Lau & Breteler, 2006). Durch den demographischen Wandel und die damit immer älter werdende Gesellschaft wird angenommen, dass sich die Anzahl der Erkrankten in den nächsten 20 Jahren verdoppeln könnte. Seltener können auch jüngere Menschen, die einen gewissen genetischen Hintergrund haben, von der PK betroffen sein. Bei diesen kann die Krankheit dann auch schon zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr ausbrechen. Zum heutigen Zeitpunkt kann die Erkrankung nicht geheilt werden. Lediglich die Symptome können durch Medikamente gelindert werden.

Die Erstbeschreibung des Morbus Parkinson geht auf den englischen Arzt James Parkinson zurück, der bereits 1817 in seiner Monographie „An Essay on the Shaking Palsy“ die PK beschrieb.

Morbus Parkinson ist eine progressive neurodegenerative Bewegungsstörung, die mit dem Untergang dopaminerger Neurone in der *Substantia Nigra pars compacta* (SNc) und dem damit verbundenen Mangel von Dopamin im Striatum und dem Ungleichgewicht weiterer Neurotransmitter einhergeht.

Bei der PK werden verschiedene Entstehungsformen unterschieden. So kann eine PK entweder sporadischer, familiärer, monogenetischer oder sekundärer Natur sein. Die Ursachen für das Ausbrechen eines sporadischen, also idiopathischen Parkinsonsyndroms (IPS) sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt, allerdings gilt als gesichert, dass das Alter den bedeutsamsten Risikofaktor darstellt. So steigt die Inzidenzrate bis zum 80. Lebensjahr stetig an und fällt dann wieder ab (Driver et al., 2009). Des Weiteren sind bestimmte Lebensumstände wie zum Beispiel Fettleibigkeit, Bewegungsmangel und Kopfverletzungen mit der PK assoziiert (Elbaz & Tranchant,

2007). Auch der Kontakt mit Pestiziden wie zum Beispiel Rotenon kann möglicherweise eine PK begünstigen (Adam, 2000). Dagegen wurde gezeigt, dass Rauchen möglicherweise eine protektive Wirkung haben kann, da gezeigt wurde, dass Nichtraucher ein höheres Risiko haben, an PK zu erkranken (Hernan et al., 2001), Raucher dagegen ein niedrigeres (Elbaz & Moisan, 2008).

Neben der sporadischen PK und der genetischen Form gibt es auch noch sekundäre Formen, die durch Toxine (z. B. MPTP, Zyanide), Traumata, Tumore, Hypoxien oder postenzephalitische Infektionen ausgelöst werden (Dauer & Przedborski, 2003).

1.1.1 Klinische Symptome und Diagnose

Die klinischen Kardinalsymptome sind Ruhetremor, Rigor, Bradykinese bzw. Akinese und posturale Instabilität (Jankovic, 2008). Tritt das Leitsymptom Bradykinese oder Akinese mit mindestens einem weiteren Kardinalsymptom zusammen in Erscheinung, gilt die Diagnose nach den Richtlinien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank (Hughes et al., 1992) als gesichert. Darüber hinaus treten bei den meisten Patienten noch weitere Symptome zusätzlich zu Störungen der Motorik auf. Dazu gehören beispielsweise Hyposomie, Depressionen, Schlafstörungen, kognitive Defizite, Störungen der Harnblasenfunktion und des Magen-Darm-Traktes, sowie die Entwicklung einer Demenz.

Die Diagnosestellung Parkinson erfolgt leider meistens erst, wenn bereits 60% der dopaminergen Neurone in der SNc zerstört sind und somit bereits 80% weniger Dopamin verfügbar ist (Pakkenberg et al., 1991) anhand oben genannter Kardinalsymptome. Biomarker oder typische Symptome für eine frühere oder vorbeugende Therapie fehlen bislang.

Da bis heute wenig über die Pathogenese der PK bekannt ist, kann sie nicht ursächlich behandelt oder gar geheilt werden. Die Therapien beschränken sich daher weitestgehend auf die Linderung der Symptome und der damit einhergehenden Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten.

Eingesetzt werden vor allem Levodopa (L-Dopa), welches die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und im Gehirn dann zu Dopamin umgewandelt wird, häufig kombiniert mit COMT-Hemmern, die das Enzym Catechol-O-Methyltransferase kompetitiv hemmen, damit das L-Dopa langsamer abgebaut wird. Zudem können durch die tiefe Hirnstimulation (Samii et al., 2004), bei welcher meist der bei der PK überaktive Nucleus subthalamicus stimuliert wird, Verbesserungen bei der Behandlung der motorischen Symptome erzielt werden.

1.1.2 Genetik der Parkinson-Krankheit

Aktuell geht man davon aus, dass 90 – 95% der Parkinsonerkrankungen Folge eines sporadischen und multifaktoriellen Geschehens sind. Bei 5 – 10% der Patienten (Elbaz et al., 1999; Lesage & Brice, 2009) wird aber eine familiäre Belastung mit mindestens einem weiteren betroffenen Familienmitglied, das an Parkinson erkrankt ist, gefunden. Durch genauere Analysen dieser Familien werden immer mehr chromosomale Loci gefunden, die mit der PK assoziiert sind. Diese monogenen Formen werden nach den mendelschen Regeln innerhalb der Familien vererbt. Sie können sowohl autosomal dominant als auch autosomal rezessiv vererbt werden. In Tabelle 1 sind alle, zum heutigen Zeitpunkt bekannten, monogenen Formen in der Reihenfolge ihrer Entdeckung, aufgelistet. Die Klassifikation erfolgt nach dem Zeitpunkt der Entdeckung nach PARK (=Parkinson) Nummerierung. Außerdem werden die Art der Vererbung, der Locus auf dem Chromosom, der Name des Gens, die gefundenen Mutationsarten, die Art des Parkinsonsyndroms und der Erstbeschreiber aufgeführt.

Tabelle 1: Monogene Formen der PK. AD: Autosomal Dominant, AR: Autosomal Rezessiv, PM: Punktmutation, EO: Early Onset PK, LO: Late Onset PK, DP: Dystonie-Parkinson, PPS: parkinsonian-pyramidal syndrome, KRS: Kufor-Rakeb-Syndrom. Alle Loci, die mit einem * gekennzeichnet sind, wurden noch nicht in unabhängigen Studien zweifelsfrei belegt.

Locus	Vererbung	Chromosom	Gen (Protein)	Mutation	Art der PK	Erstbeschreibung
PARK1	AD	4q21-23	SNCA (α -Synuclein)	PM	EO	(Polymeropoulos et al., 1997)
PARK2	AR	6q25.2-27	Parkin	Del/Ins/Dupl/Tripl/PM	EO	(Kitada et al., 1998)
PARK3*	AD	2p13	-	-	LO	(Gasser et al., 1998)
PARK4	AD	4q21-23	SNCA (α -Synuclein)	Dupl, Tripl	EO	(Singleton et al., 2003)
PARK5*	AD	4p14	UCHL1	PM	LO	(Leroy et al., 1998)
PARK6	AR	1p35-36	PINK1	PM	EO	(Valente et al., 2004)
PARK7	AR	1p36	PARK7 (DJ-1)	Del, PM	EO	(Bonifati et al., 2003)
PARK8	AD	12q12	LRRK2	PM	LO	(Zimprich et al., 2004)
PARK9	AR	1p36	ATP13A2	PM	EO, KRS	(Ramirez et al., 2006)
PARK10*	AD	1p32	-	-	LO?	(Hicks et al., 2002)
PARK11*	AD	2q36-37	GIGYF2	PM	LO	(Lautier et al., 2008)
PARK12*	Unklar	Xq21-25	-	-	Unklar	(Pankratz et al., 2003)
PARK13*	AD	2p12	HTRA2 (Omi/HtrA2)	PM	Unklar	(Strauss et al., 2005)
PARK14	AR	22q13	PLA2G6	PM	DP	(Gregory et al., 2008)
PARK15	AR	22q12-13	FBXO7	PM	EO, PPS	(Di Fonzo et al., 2009)
PARK16	AR	1q32	-	-	LO	(Satake et al., 2009)
PARK17	AD	16q13	VPS35	PM	unklar	(Zimprich et al., 2011)
PARK18*	AD	3q27.1	EIF4G1	PM	Unklar	(Chartier-Harlin et al., 2011)
PARK19	AR	1p31.3	DNAJC6	Del, PM	EO	(Edvardson et al., 2012)
PARK20	AR	21q22.11	SYNJ1	PM	EO	(Quadri et al., 2013)
PARK21*	AD	3q22.1	DNAJC13	PM	Unklar	(Vilarino-Guell et al., 2014)

Mutationen im *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) Gen sind verantwortlich für die meisten autosomal dominant vererbten Parkinsonerkrankungen (Berg et al., 2005). Die häufigste Mutation ist die p.G2019S Mutation im *LRRK2* Gen (Deng et al., 2005; Di Fonzo et al., 2005; Nichols et al., 2005; Toft et al., 2005). In Deutschland hat ca. 1% aller Parkinsonpatienten eine p.G2019S Mutation.

Mutationen im *SNCA* Gen kommen sehr viel seltener vor und verursachen ebenfalls eine autosomal dominant vererbte PK. Es sind zum jetzigen Zeitpunkt sechs Punktmutationen in der kodierenden Region von *SNCA* bekannt, die eine PK verursachen. Neben den p.E46K (Zarranz et al., 2004), p.H50Q (Appel-Cresswell et al., 2013), p.G51D (Lesage et al., 2013) und p.A53E (Pasanen et al., 2014) Mutationen sind die zwei bekanntesten die p.A30P (Kruger et al., 1998) und die p.A53T (Polymeropoulos et al., 1997) Mutationen, die noch Gegenstand dieser Arbeit sein werden. Alle Mutationen beeinflussen die Bindungsdomäne der Lipidmembran des Proteins alpha-Synuclein (aSyn) was zu einer modifizierten 3-dimensionalen Sekundärstruktur von aSyn führt. Weiterhin wurden Duplikationen (Chartier-Harlin et al., 2004; Nishioka et al., 2006) und Triplikationen (Singleton et al., 2003) des *SNCA* Gens gefunden, die zu einem „early onset“, also einem frühen Ausbruch der PK führen. Der frühere Ausbruch der PK bei einer Triplikation des *SNCA* Gens im Gegensatz zu einer Duplikation des Gens zeigt, dass eine aSyn-Überexpression dosisabhängig zu einer PK führen kann (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004; Singleton et al., 2003).

In einigen der PARK Loci wurden zusätzlich zu den Mutationen, die eine PK verursachen, auch Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) nachgewiesen, die das Risiko, eine sporadische PK zu bekommen, erhöhen. Beispiele dafür sind Polymorphismen in der Promoterregion und der 3`UTR von *SNCA*, die später noch genauer behandelt werden, und die p.G2385R Mutation in *LRRK2* (Seki et al., 2011; Tan et al., 2010).

Neben den monogenen Formen aus Tabelle 1 gibt es noch Risikogene wie zum Beispiel *MAPT* (Satake et al., 2009; Simon-Sanchez et al., 2009) und *GBA* (Aharon-Peretz et al., 2004; Mitsui et al., 2009; Sidransky et al., 2009), bei welchen eine Mutation zwar ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer PK darstellt, die aber einen geringeren Effekt aufweisen.

1.1.3 Hirnregionen, die mit Parkinson assoziiert sind

Das Absterben der dopaminergen Neuronen in der SNc hat einen direkten Einfluss auf die motorische Dysfunktion bei der PK (Halliday et al., 2006; Jellinger & Paulus, 1992). Die SN liegt im Mesencephalon, dem Mittelhirn und ist durch den hohen Gehalt an Melanin und Eisen schwarz (=nigra) gefärbt. Sie ist Teil der Basalganglien (Hodge & Butcher, 1980), einer Reihe von subkortikalen Kernen, die bei motorischen, kognitiven und limbischen Funktionen eine wichtige Rolle spielen und durch neuronale Feedback-Schleifen mit den motorischen Arealen des Kortex verbunden sind (Doya, 2000). Weiterhin gehören zu den Basalganglien der Nucleus caudatus und das Putamen, welche zytologisch als Striatum zusammengefasst werden, sowie der Globus pallidus und der Subthalamische Nucleus (STh).

Funktionell lassen sich die Basalganglien in die ventrale und dorsale Schleife einteilen (Camara et al., 2009; Wolf, 2002). Die dorsale Schleife ist für die Kontrolle der Bewegung zuständig (Haber et al., 2005; Kreitzer & Malenka, 2008). Die ventrale Schleife, die Teil des limbischen Systems ist, dagegen hat wichtige Funktionen bei Belohnung und Suchtverhalten (Roth & Dicke, 2006).

Das Striatum, welches im Telencephalon liegt, ist die Eingangsstruktur der Basalganglien. Der dorsale Teil des Striatums besteht aus dem dorsalen Nucleus caudatus und Putamen, der ventrale Teil aus dem Nucleus accumbens (Pritzel et al., 2003). Das dorsale Striatum besteht vor allem aus inhibierenden GABAergen Projektionsneuronen, die als Medium Spiny Neuronen (MSNs) bezeichnet werden und in Subgruppen unterteilt werden. Die striatonigralen MSNs haben vor allem D1-Rezeptoren (Fuxe et al., 2012), die striatopallidalen MSNs D2-Rezeptoren (Tozzi et al., 2011). Aus dem IsoCortex und dem intralaminaren Nucleus des Thalamus werden Glutamat, Dopamin aus der SNc (Massey & Bashir, 2007; Parent & Hazrati, 1995) sowie Serotonin aus den Raphe-Kernen (Blomeley & Bracci, 2005; Bonsi et al., 2007; Mori et al., 1985; Steinbusch, 1981) zum Striatum projiziert. Aus der Amygdala, die zum limbischen System gehört, erreichen das Striatum erregende Bahnen (Albin et al., 1992; Hauber, 1998).

Weiterhin bilden der Subthalamische Nucleus und der Globus pallidus, welcher sich wiederum bei Primaten dorsal aus dem Globus pallidus pars interna (GPi), dem externen Globus pallidus (GP) und dem ventralen Pallidum (VP) zusammen setzt (Albin et al., 1989), den Anteil der Basalganglien, die im Diencephalon liegen. Der GPi und die Substantia nigra pars reticulata (SNr) inhibieren den Thalamus, welcher wiederum eine Rückkoppelung zum Kortex sendet, mittels GABAergen Bahnen (Albin et al., 1989) und bilden so die Hauptausgangsstrukturen der dorsalen Basalganglienschleife (Abbildung 1).

Durch Ausschüttung von Dopamin aus der SNc wird über die direkte Schleife und die D1-Rezeptoren zu GABAergen Neuronen im GPi und der SNr projiziert (Überblick in Kreitzer & Malenka, 2008) und striatale Output-Neurone angeregt, was zur Innervation von kortikalen Assoziationsgebieten führt.

Dagegen wirkt Dopamin über die indirekte Basalganglienschleife über die D2-Rezeptoren inhibierend (Surmeier et al., 2007), wodurch kortikale Assoziationsgebiete gehemmt werden, da es durch die Ausschüttung von Acetylcholin und Glutamat zu einer Hemmung striataler Neurone im GP, glutaminergen Neuronen im STh, GABAerger Neurone im GPi und der SNr kommt (Trevitt et al., 2009).

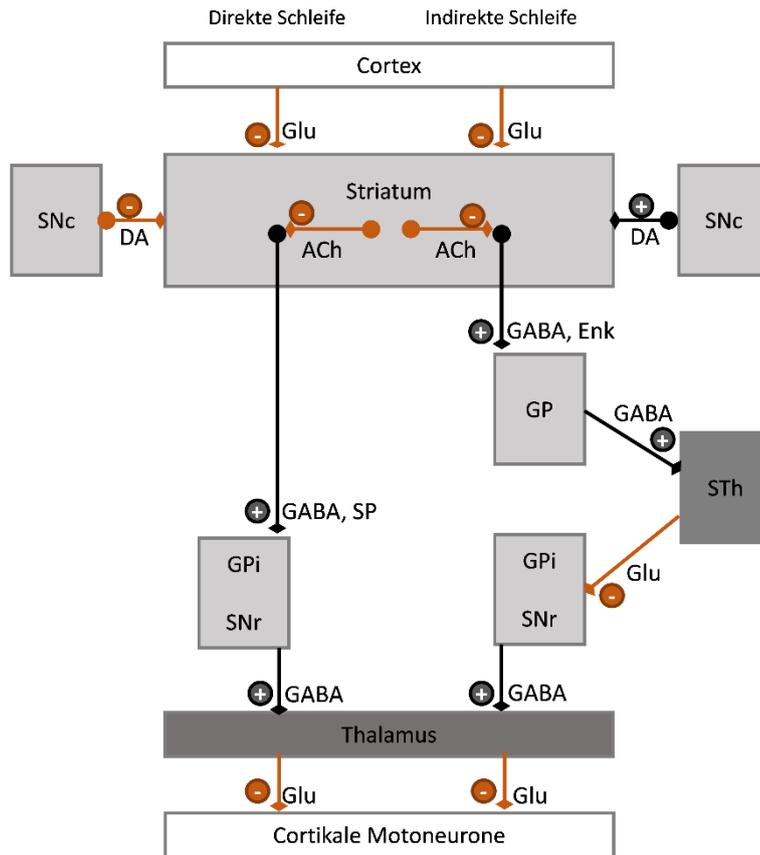


Abbildung 1: Die Verschaltung der Basalganglien mit hemmenden und erregenden Neurotransmittern. Bei der direkten Basalganglienschleife projizieren striatonigrale MSNs direkt über GABAerge Bahnen zum Thalamus. Bei der indirekten Schleife dagegen projizieren MSNs über den GP, dessen GABAerge Bahnen zum STh und dem GPi zum Thalamus. Abkürzungen: Glutamat (Glu), Dopamin (DA), Enkephalin (Enk), Acetylcholin (ACh), Substanz P (SP), Substantia nigra pars compacta (SNc), Substantia nigra pars reticulata (SNr), Globus pallidus (GP), Globus pallidus pars interna (GPI). (Abbildung verändert nach Leisman & Melillo, 2013)

Wenn folglich die dopaminerge Bahn durch das Absterben der dopaminergen Neuronen in der SNc gemindert ist, kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen direkter und indirekter Basalganglienschleife wodurch die indirekte Schleife überaktiviert wird.

1.2 Das SNCA Gen

Das erste Gen, das mit familiärer PK in Verbindung gebracht wurde, war *SNCA* (Polymeropoulos et al., 1997). *SNCA* ist mit sechs Exons ein relativ kleines Gen und kodiert für aSyn, einem azidischen Protein (Maroteaux et al., 1988) bestehend aus 140

Aminosäuren, welches die Hauptkomponente der Lewykörperchen (LK) und Lewyneuriten (LN) ist (Baba et al., 1998; Spillantini et al., 1997). Diese cytoplasmatischen, eosinophilen Einschlüsse bestehen aus einigen aggregierten Proteinen und sind das pathologische Kennzeichen von IPS und familiärer PK sowie anderer Synucleinopathien. Synucleinopathie ist der Oberbegriff für einige neurodegenerative Erkrankungen, denen allen gemeinsam ist, dass sich post-mortem Ablagerungen von unlöslichem, fehlgefalteten aSyn in Zellpopulationen finden lassen. Dazu gehören neben der PK beispielsweise die Lewy-Körper-Demenz, die Multisystematrophie (MSA) und das Hallervorden–Spatz-Syndrom. Bei der PK und der Lewy-Körper-Demenz werden Lewykörperchen hauptsächlich in Neuronen gefunden, bei MSA allerdings sind die Lewykörperchen vor allem in oligodendroglialen Zellen lokalisiert (W. S. Kim et al., 2014).

Zur Familie der Synucleine gehören neben aSyn noch beta- (bSyn) und gamma-Synuclein (gSyn) (Ji et al., 1997; Lavedan, 1998). Obwohl für bSyn keine Assoziation mit der PK nachgewiesen wurde (George, 2002), findet man die höchste Expression dieses Proteins in der SN (Lavedan et al., 1998). Es wird deshalb vermutet, dass bSyn das Gehirn vor den neurotoxischen Effekten von aSyn schützen könnte (Hashimoto et al., 2001). Dagegen findet man gSyn vor allem in Mammakarzinomen (Ji et al., 1997), aber nicht in gesundem Brustgewebe. Bei Brustkrebs ist die Expression von gSyn mit der Prognose der Krebserkrankung assoziiert (Wu et al., 2007).

Alle drei Synucleine haben als charakteristische Gemeinsamkeit (Lavedan, 1998) eine übereinstimmende Sequenz (KTKEGV) in der dritten Domäne. Alle Synucleine sind sehr konserviert und bestehen aus fünf kodierenden Exonen.

1.2.1 Entdeckung, Funktionen und Aufbau von aSyn

Nachdem Maroteaux 1988 (Maroteaux et al., 1988) im elektrischen Organ des kalifornischen Zitterrochens erstmals die Sequenz von aSyn beschrieben hatte, vergingen noch fünf Jahre bis das Protein erstmals in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen gebracht wurde. Zunächst wurde in Alzheimer Plaques in humanen post-mortem Hirngewebe ein Peptid aus 35 Aminosäuren entdeckt (Ueda et al., 1993) und aufgrund der Lokalisation als Non-Amyloid-Beta-

component (NAC) bezeichnet. Das Vorläuferprotein dieses Peptids wurde dann Non-Amyloid-Beta-component precursor (NACP) genannt. Ein weiteres Jahr später fanden Jackes et al. (Jakes et al., 1994) zwei Proteine in humanen Hirngeweben, von denen eines identisch mit dem zuvor beschriebenen NACP Protein war. Das andere Protein war das humane Homolog des zuvor beschriebenen Phosphoneuroprotein-14 aus Rindern (Nakajo et al., 1990; Shibayama-Imazu et al., 1993; Tobe et al., 1992). Durch die Sequenzübereinstimmung von 62% der zwei Proteine wurde die Familie der Synucleine definiert. Das NACP-Protein wurde aSyn und das humane Homolog des Phosphoneuroproteins-14 bSyn genannt. Beide Synucleine sind hauptsächlich im Hirn exprimiert. Hier sind sie in präsynaptischen Synapsen konzentriert (Jakes et al., 1994). Die höchste Expression von aSyn findet man im Hippocampus, Striatum, Neocortex, Thalamus und Cerebellum (Iwai et al., 1995; Nakajo et al., 1994). In der Peripherie wird aSyn vor allem in Thrombozyten (Q. X. Li et al., 2002; Michell et al., 2005), Lymphozyten (S. Kim et al., 2004), in erythroiden Zellen (Barbour et al., 2008; Nakai et al., 2007) und in weiteren peripheren Gewebearten vor allem während der Embryonalentwicklung (Litic et al., 2004) exprimiert.

Auch wenn die Funktion von aSyn zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt werden konnte, so konnten einige Studien zeigen, dass aSyn am Vesikeltransport der Synapse (Cabin et al., 2002; Di Rosa et al., 2003), präziser in der Fusion mit Membranen, beteiligt ist (Surguchov, 2008) und eine Rolle beim Recycling von Vesikeln spielt (Murphy et al., 2000; Scott & Roy, 2012). Außerdem scheint es bei der Synthese und dem Transport von Dopamin in der SNc involviert zu sein (Lotharius & Brundin, 2002; Sidhu et al., 2004; Yavich et al., 2004). Da aSyn über 40% homolog mit 14-3-3 Proteinen ist, einer ubiquitär vorkommenden Chaperonfamilie (Ostrerova et al., 1999) und auch an diese Proteine bindet, könnte es eine Bedeutung in der neuronalen Plastizität haben (Ostrerova et al., 1999; Petersen et al., 1999). Für diese Chaperonaktivität scheint der C-Terminus von aSyn eine zentrale Bedeutung zu haben (Park et al., 2002; Souza et al., 2000). In Hefezellen verhindert aSyn die Wanderung von Vesikeln zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, was darauf hinweist, dass aSyn auch innerhalb der Zelle Abläufe beeinträchtigen kann (Cooper et al., 2006). Dass aSyn in intrazelluläre Abläufe involviert ist, wird auch dadurch unterstützt, dass aSyn-

Knockout-Mäuse resistent gegenüber MPTP sind (Dauer et al., 2002), welches den Komplex I inhibiert und so Symptome der PK auslöst. Das Gehirn dieser Mäuse zeigt zwar einen normalen Aufbau, trotzdem konnten Veränderungen im dopaminergen System nachgewiesen werden (Abeliovich et al., 2000). Weiterhin konnte aSyn zusammen mit dem synaptischen Protein CSPalpha eine neuroprotektive Aufgabe zugeschrieben werden (Chandra et al., 2005).

Als natürlich ungefaltetes Protein bildet aSyn in wässriger Lösung keine definierte Struktur (Weinreb et al., 1996). Die Primärstruktur von aSyn lässt sich weitestgehend in drei Domänen unterteilen (Abbildung 2). Die Aminosäuren (AS) 1-60 umfassen die amphipathische N-terminale Region, welche sechs von sieben unvollständigen Wiederholungen von 11 AS (XKTKEGVXXXX) umfassen. Da es eine Ähnlichkeit zu den Lipidbindungsstellen der Apolipoproteine gibt, wurde postuliert, dass die N-terminale Region für die Bildung von amphiphilen Helixen benötigt wird (Bisaglia et al., 2009; Davidson et al., 1998). Die Ausbildung der alpha-helikalen Sekundärstruktur findet bei der Bindung an Lipide und Interaktion mit anderen Liganden statt (Bartels et al., 2010; Chandra et al., 2003; Perrin et al., 2000; Surguchov, 2008; W. Wang et al., 2011; Weinreb et al., 1996). Alle bisher gefundenen Punktmutationen liegen im N-Terminus. Die zweite Domäne ist die zentrale, hydrophobe NAC-Region, die sich von AS 61 bis AS 95 erstreckt. Diese ist verantwortlich für die Proteinaggregation und die Entstehung des beta-Faltblattes (Giasson et al., 2001; Ueda et al., 1993). Die dritte Domäne, die ungefaltet bleibt, geht von AS 96 bis AS 140 und ist der azidische Carboxylterminus (C-Terminus). Dieser ist im Gegensatz zu den anderen Domänen weniger stark konserviert (Lavedan, 1998) und scheint durch die Negativladung der Aggregation von aSyn entgegenzuwirken. Es wird angenommen, dass der C-Terminus den Kern der aSyn Fibrillen bildet und sowohl die Fibrillisierung als auch die Größe der Fibrillen beeinflusst (Eliezer et al., 2001; Murray et al., 2003).

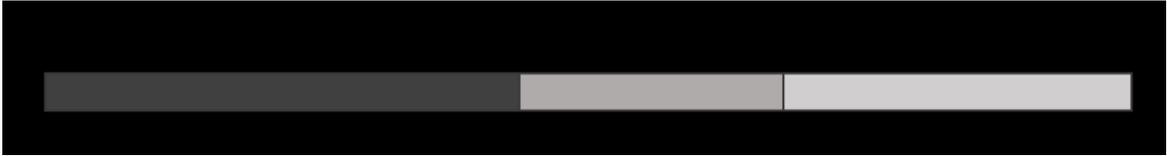


Abbildung 2: Die drei Domänen der Primärstruktur von aSyn. Die amphipathische Region am N-Terminus ist wichtig für die Interaktion von aSyn mit Membranen und Liganden. Die NAC-Region wird für die Ausbildung des Beta-Faltblattes benötigt und der C-Terminus bleibt ungefalt.

1.2.2 Genetische Varianten des *SNCA* Gens

Zu den genetischen Varianten des *SNCA* Gens gehören sowohl die pathogenen Punktmutationen als auch Risikovarianten, wie beispielsweise bestimmte SNPs im *SNCA* Gen. Außerdem können aus den genetischen Varianten auch weitere Risikovarianten, wie Splicevarianten von *SNCA*, entstehen.

1.2.2.1 Pathogene Mutationen

Zum heutigen Zeitpunkt wurden mehrere Punktmutationen im *SNCA* Gen gefunden (Abbildung 3), die autosomal dominant vererbt werden und zu einer PK führen. Dazu gehören p.A53T (Polymeropoulos et al., 1997), p.A30P (Kruger et al., 1998), p.E46K (Zarranz et al., 2004), p.H50Q (Appel-Cresswell et al., 2013) und p.G51D (Lesage et al., 2013).



Abbildung 3: Die pathogenen Punktmutationen von *SNCA* liegen alle in der N-Terminale Region. Die zuletzt entdeckte p.A53E Mutation befindet sich an der gleichen Stelle wie die p.A53T Mutation. Somit beeinflussen alle Mutationen die Membranbindungsdomäne des Proteins aSyn, was zu einer modifizierten dreidimensionalen Sekundärstruktur von aSyn führt. Dadurch kommt es zu veränderten Interaktionen mit Liganden oder Membranen (Dikiy & Eliezer, 2012).

Als erste Mutation wurde die p.A53T Mutation am Locus 4q21-q23 in einer großen italienischen (Golbe et al., 1990) und drei griechischen Familien entdeckt (Polymeropoulos et al., 1997), welche durch den sogenannten Gründereffekt (Athassiadou et al., 1999; Papadimitriou et al., 1999) aufgetreten war und sich dann in der Antike vom Mittelmeerraum über den Rest der Kontinente verbreitet hatte. Wenige Jahre später konnte eine weitere griechische Familie mit dieser Mutation identifiziert werden (Markopoulou et al., 1995). Danach wurde diese Mutation in einer koreanischen Familie mit vererbter PK (Ki et al., 2007) und eine neue p.A53T Mutation bei einer schwedischen Familie (Puschmann et al., 2009) entdeckt. Bei der p.A53T Missens Mutation kommt es zu einer Guanin zu Adenin Basensubstitution in der codierenden Sequenz an Position 209 (c.G209A) und damit zu einem Austausch der AS Alanin zu Threonin im Exon 4 des *SNCA* Gens. Klinisch führt diese Mutation zu einer PK mit frühem Ausbruch, welche durch einen schweren Verlauf und häufige Demenz gekennzeichnet ist (Spira et al., 2001).

Die p.A30P Mutation wurde bei einer deutschen Familie (Abbildung 9) mit autosomal dominant vererbter PK entdeckt (Krüger et al., 1998). Bei dieser Missense Mutation kommt es im Exon 3 von *SNCA* zu einem Austausch der Base Guanin zu Cytosin (c.G88C) und somit zum Austausch der AS Alanin an Position 30 zu Prolin (p.A30P). Dieser Basenaustausch führt in vitro zu vermehrter Oligomerisation, aber nicht zu erhöhter Fibrillisation, da die Membranbindungsfähigkeit von aSyn vermindert wird (Conway et al., 2000; Yonetani et al., 2009). Klinisch kommt es zu einer PK mit spätem Ausbruch.

Die p.E46K Mutation wurde in einer spanischen Familie mit vererbter PK entdeckt (Zarranz et al., 2004). Hier wird die Base G zu A an Position 188 (c.G188A) in einem der unvollständigen Wiederholungen KTKEGV ausgetauscht, was dazu führt, dass anstatt der AS Glutaminsäure die AS Lysin gebildet wird. Klinisch lässt sich der Verlauf der PK mit dieser Mutation mit der der p.A53T Mutation vergleichen (Zarranz et al., 2004). Die Mutation liegt in einer sehr konservierten Region von *SNCA*, welche wichtig für die Proteinfunktion ist. Durch den Basenaustausch kommt es vermehrt zur Oligomerisation und die Wechselwirkung von aSyn mit Phospholipiden wird verändert (Rospigliosi et al., 2009).

Bei diesen drei Mutationen wird die Fehlfaltung in die beta-Faltblattstruktur erleichtert. Dadurch steigt die Fähigkeit des aSyn, Aggregate zu bilden, an (Pieri et al., 2012).

Bei der p.G51D Mutation aggregiert aSyn langsamer als bei den p.A30P, p.A53T und p.E46K Mutationen. Allerdings scheinen die gebildeten Aggregate, verglichen mit den Fibrillen des wild-typ (WT) aSyn toxischer zu sein (Lesage et al., 2013). Weiterhin scheint die Membranbindungsfähigkeit durch die Mutation herabgesetzt zu sein (Fares et al., 2014). Bei dieser Mutation kommt es zu einem Austausch der Basen G und A an Position 152 (c.G152A). Damit wird die AS Glycin durch die AS Asparaginsäure ausgetauscht. Symptomatisch äußert sich die PK mit dieser Mutation als atypische, früh einsetzende, schnell fortschreitende PK, die teilweise neuropathologische Merkmale von MSA zeigt (Kiely et al., 2013; Lesage et al., 2013).

Die p.H50Q Mutation wurde bisher nur in britischen Patienten, davon in einem sporadischen Fall mit PK (Proukakis et al., 2013) und einem Fall mit familiärem Hintergrund (Appel-Cresswell et al., 2013) entdeckt. Da die p.H50Q Mutation zwischen den Mutationen p.E46K und p.A53T liegt, könnte auch diese Mutation die amphipathische Helix von aSyn stören. Durch Austausch der Base T zu G an Position 150 (c.T150G) kommt es zu einer Substitution der AS Histidin zu AS Glutamin. Es wird postuliert, dass durch die p.H50Q Mutation die Aggregationsbereitschaft von aSyn erhöht wird (Khalaf et al., 2014).

Die p.A53E Mutation (Pasanen et al., 2014) liegt genau an der gleichen Stelle wie die p.A53T Mutation. Es wird bei dieser Substitution die AS Glutaminsäure statt der

eigentlichen AS Alanin gebildet, da es zu einem Austausch der Base Cytosin zu Adenin an Position 210 (c.C210A) kommt. Diese Mutation wurde bisher nur in einer finnischen Familie gefunden. Der Indexpatient hatte klinisch eine sehr frühe, atypische PK. Neuropathologisch wurden Aggregate gefunden, die sowohl für MSA, als auch für eine PK sprechen. Die Anwesenheit der p.A53E Mutation führt zu einer verminderten Membranbindungsfähigkeit von aSyn (Ghosh et al., 2014). Außerdem wird die Aggregationsbereitschaft von aSyn abgeschwächt (Rutherford & Giasson, 2015).

Weitere Mutationen, die aber bisher nur in sporadischen Fällen entdeckt wurden, sind die p.A18T und die p.A29S Mutation (Hoffman-Zacharska et al., 2013).

1.2.2.2 Risikovarianten

Da Aggregate von aSyn auch unabhängig von Mutationen im *SNCA* Gen bei der PK auftreten, muss es, neben den pathogenen Mutationen, auch weitere Risikofaktoren geben, die einen Ausbruch der sporadischen PK im multifaktoriellen Geschehen fördern können. Solche Risikofaktoren können beispielsweise molekulare Isoformen von aSyn, die durch posttranslationale Modifizierung, alternatives Splicing oder Trunkierung entstehen, aber auch SNPs in der kodierenden oder nicht kodierenden Region des *SNCA* Gens sein.

Bei Studien mit Parkinson Patienten mit familiärem Hintergrund konnte eine Assoziation zwischen dem Risiko, eine PK zu bekommen und genetischen Varianten im Intron oder in der 5´ oder 3´ Region von *SNCA* nachgewiesen werden (Lesage & Brice, 2009; Pihlstrom & Toft, 2011). Weiterhin wurden die SNPs rs2583988, rs2619364 und rs2619363 in der 5´ Region, sowie rs7684318 im Intron 4 (Mizuta et al., 2006; Yu et al., 2010) und rs356165 und rs356219 in der 3´ Region (Cardo et al., 2012; Mata et al., 2010; Myhre et al., 2008; Rajput et al., 2009; O. A. Ross et al., 2007; Winkler et al., 2007) als Risikofaktoren für eine PK identifiziert. Darüber hinaus konnte das Allel T des rs11931074 in der 3´ Region als Risikofaktor für eine PK ermittelt werden (Hu et al., 2012).

Als weitere genetische Variante wurde der multiallelische REP1 Polymorphismus, ein Mikrosatellit im Promoter von *SNCA* identifiziert, der meist 259, 261 oder 263 bp lang ist. Das 263bp Allel von REP1 ist mit einem erhöhten Risiko, eine PK zu entwickeln, in der kaukasischen Population (Kruger et al., 1999; Tan et al., 2000), nicht aber in der japanischen Bevölkerung (Izumi et al., 2001), assoziiert. Auch der REP1 261/261 Genotyp wurde als Risikofaktor für die Entstehung einer PK postuliert (Mamah et al., 2005), da er und der SNP rs356219 die Expression des Proteins aSyn im Blut und Gehirn beeinflussen konnte (Fuchs et al., 2008; Mata et al., 2010). Eine genetische Variante kann also auch das Risiko für eine PK durch den Einfluss auf die Expression von *SNCA* beeinflussen. Dies wird auch unterstützt durch eine Studie, in welcher eine Assoziation der Genotypen von rs356165 und rs356219 mit der Expression einer bestimmten Isoform von *SNCA* und der PK gefunden wurde (McCarthy et al., 2011).

Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen dem Risikoallel C des rs356165 sowie dem REP1 263 bp Allel und einer schnelleren Verschlechterung der motorischen Symptome in Patienten hergestellt werden (Ritz et al., 2012). Weiterhin wurde berichtet, dass der rs2583988 in der Promoterregion von *SNCA* als Risikofaktor für ein schnelles Fortschreiten der Krankheit (Rajput et al., 2009) von Bedeutung sein kann.

1.2.3 Aggregate des Proteins alpha-Synuclein

Die ersten detaillierten Beschreibungen über LK kamen von Heinrich Lewy, der in Gehirnen von Parkinson Patienten atrophische Zellen mit fibrillärer Veränderung im dorsalen Vagus Kern und dem Nucleus basalis Meynert beschrieb (reviewed in Holdorff, 2002). LK sind intrazytoplasmatische Einschlüsse, die als eosinophile, sphärische Körperchen mit dichtem Kern und einem Durchmesser von 8-30nm durch eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung sichtbar gemacht werden können. Die LK, die man im Hirnstamm findet, haben kleine schwache Halos und eine positive Immunreaktivität für aSyn und Ubiquitin, da dieses an aSyn angehängt wird, um es für den Abbau im Ubiquitin-Proteasomweg zu markieren (Campbell et al., 2001; Kuusisto et al., 2003; Lowe et al., 1988). Dagegen kann in LK im Kortex oft weder Halos noch eine Immunreaktivität für aSyn gezeigt werden (Gomez-Tortosa et al., 2000; Sakamoto et al.,

2002). Genauer betrachtet, bestehen LK aus einem Kern und einer Umrandung (Roy & Wolman, 1969). Der Kern hat einen Durchmesser von ca. 7-20nm und besteht im Kern hauptsächlich aus dicht gepackten Filamenten, die wiederum mit dichtem granulärem Material umrahmt sind. Die Umrandung von ca. 10nm besteht aus symmetrisch angeordneten Filamenten. Neben den LK kann man auch Lewyneuriten (LN) in den betroffenen Neuronen finden. Dies sind aSyn Aggregate, die in den Dendriten und Axonen der Neurone lokalisiert sind.

Bisher ist noch nicht geklärt wie es zur Aggregation von aSyn und damit zur Bildung von LK und LN kommt. Allerdings wurde gezeigt, dass aSyn, welches bei der Bindung an Membranen eine alpha Helix bildet, im aggregierten Zustand eine beta Faltblattstruktur annimmt (El-Agnaf et al., 1998). Bei der Aggregation von aSyn (Abbildung 4) wird aus ungefaltetem aSyn zuerst dimeres aSyn gebildet. Viele Dimere lagern sich dann wiederum zu oligomeren Protofibrillen aneinander, aus denen wiederum die unlöslichen Aggregate entstehen (Conway et al., 1998). Ein Teil der Oligomere und Fibrillen werden durch das Ubiquitin-Proteasom-System und das Autophagie-Lysosom-System wieder abgebaut.

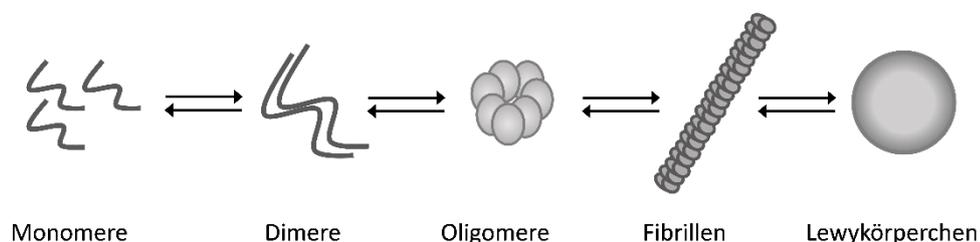


Abbildung 4: Aggregationskaskade von aSyn. Zunächst lagern sich Monomere zu Dimeren und diese dann zu Oligomeren zusammen. Aus diesen wiederum entstehen die Fibrillen, aus welchen sich dann die LK und LN bilden.

Es gibt kontroverse Diskussionen darüber, ob diese Aggregate eine neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung haben. Einerseits wird davon ausgegangen, dass die noch löslichen, oligomeren Protofibrillen eine neurotoxische Wirkung haben (Caughey & Lansbury, 2003; Goldberg & Lansbury, 2000; Tsigelny et al., 2008). Andererseits wird postuliert, dass LK das Ergebnis von Schutzmechanismen der Neuronen sind, um sie vor

fehlgefalteten Proteinen, die ihre natürliche Funktion nicht mehr erfüllen können, zu schützen (Olanow et al., 2004; Shults, 2006; Tanaka et al., 2004; Tompkins & Hill, 1997).

Ausgehend von den Hirnregionen, in denen man LK und LN post-mortem findet und den Krankheitsstadien der PK, in welchen sich die Patienten zum Zeitpunkt des Todes befanden, wurde eine Einteilung der PK in Stadien formuliert (Braak et al., 2004). Diese Stadien geben an, wie sich die LK im Gehirn ausbreiten und in welchem zugehörigen Krankheitsstadium sich die PK befindet (Abbildung 5). In den Stadien 1 und 2 beginnen die ersten pathologischen Veränderungen in Neuronen des dorsalen Vaguskerne, des olfaktorischen Bulbus und dem unteren Hirnstamm, dem der Raphekern angehört. Interessanterweise kann man in diesen frühen Stadien vor allem LN im Hirnstamm finden und nur wenige LK und tote Zellen. Dies deutet darauf hin, dass Axone und Dendriten die ersten betroffenen Strukturen bei der PK sind und es erst mit fortgeschrittener Erkrankung zu Aggregaten innerhalb der Neuronen und damit verbundener neuronaler Degeneration kommt (Dickson et al., 2010; Jellinger, 2003, 2004). Die Verteilung der LN und LK in den Stadien 1 und 2 korreliert mit den frühen Symptomen der PK wie beispielsweise Depression und Hyposmie. Im Stadium 3 erreichen die LK den Hirnstamm, die Amygdala, das basale Mittel- und Vorderhirn, sowie die SN. Das Stadium 4 ist charakterisiert durch die Ausbreitung der LK und LN im limbischen System und dem Meso- und entorhinalen Kortex. Ab Stadium 3 und 4 zeigen Patienten die typischen Symptome der PK. In den letzten Stadien, den Stadien 5 und 6, erreichen die LK schließlich das Telencephalon, dem sensorisch assoziierten Kortex und dem präfrontalen Kortex, wodurch es zu einer Ausbreitung der LK über nahezu den ganzen Neocortex kommt. Die letzten Stadien sind klinisch charakterisiert durch ausgeprägte motorische Defizite, gepaart mit kognitiven und psychischen Problemen.

Präsymptomatische Phase		Symptomatische Phase				Neocortex, primär, sekundär
						Neocortex, höhere Assoziationsareale
						Mesocortex, Thalamus
Schwelle ↑						SN, Amygdala
						„Gain setting nuclei“
						Dorsaler motorischer Vagus Kern
1	2	3	4	5	6	Stadien; Fortschreiten der PK

Abbildung 5: Die Ausbreitung der LK und LN nach Braak (Braak et al., 2004). In der präsymptomatischen Phase (Stadien 1 – 3) findet man LK und LN in post-mortem Hirnen von asymptomatischen Patienten. Die symptomatische Phase beginnt ab Stadium 4, in welcher die neuropathologische Schwelle überschritten wird und sich die LK und LN in immer mehr Hirnregionen ausbreiten. Die schattierten Kästchen stellen die Ausbreitung der LK und LN über die Stadien in die jeweiligen Hirnregionen dar.

In einer neuen Theorie wird davon ausgegangen, dass sich aSyn, ähnlich den Prionen, fehlfaltet und sich die Aggregate dann über die Neuronen verbreiten könnten (Chu & Kordower, 2015; Luk & Lee, 2014).

1.3 Alternatives Splicing

Als Splicing wird das Herausschneiden der Introns bei der Transkription bezeichnet. In Eukaryoten geschieht das Splicing normalerweise im Spliceosom, welches aus verschiedenen RNA- und Proteinmolekülen besteht. Diese werden zusammengefasst als small nuclear ribonucleo-protein particles (snRNPs) bezeichnet. Die snRNPs erkennen durch bestimmte Basenabfolgen den Branch point, die Donor site und die Acceptor site in der mRNA Sequenz. Außerdem katalysieren sie den Prozess des Splicings. Die

essenziell wichtigen snRNPs für das Splicing sind U1, U2, U4, U5 und U6. Das normale Splicing selber läuft in folgenden Schritten (nach House & Lynch, 2008) ab: Zunächst bindet U1 an die Donorsite und ein Proteinheterodimer, das U2AF an die Acceptorsite. Diese formen dann den sogenannten E-Komplex des Spliceosomes, welcher weiter umgeformt wird in einen A-Komplex durch die Anlagerung von U2 an den Branch point. Daraus wiederum wird dann durch den B-Komplex ersetzt, bei dem alle snRNPs im Spliceosom sind. U1 wird dann durch U6 an der Donorsite ersetzt und der C-Komplex wird gebildet, indem U1 und U4 aus dem Spliceosom entfernt werden. Danach wird die mRNA an der Donorsite geschnitten und das 5' Intronende wird an das Adenosin des Branch points angeheftet. Somit formt sich eine lassoartige Struktur, Lariatstruktur genannt. Danach wird die mRNA an der Acceptorsite geschnitten und das 3' Ende an das 5' Ende ligiert.

Durch alternatives Splicing, welches bei mehr als 90% der Gene angewandt wird (Q. Pan et al., 2008; E. T. Wang et al., 2008), werden mehrere Transkripte aus einem einzigen Gen gebildet. So kann ein Gen für mehrere Isoformen eines Proteins kodieren, die teilweise unterschiedliche Funktionen haben.

Es gibt verschiedene Arten des alternativen Splicings. So können entweder Exone übersprungen (Exon skipping), Introne beibehalten (Intron retention), alternative 5' oder 3' splicingsites verwendet werden oder es können sich zwei Exone gegenseitig ausschließen, so dass nur eines nach dem Splicingvorgang erhalten bleibt (Mutually Exclusive Exons) (Abbildung 6). Durch Mutually Exclusive Exons können bei den entstandenen unterschiedlichen Isoformen beispielsweise Membranbindungsstellen eingebaut oder entfernt sein (Xing et al., 2003).

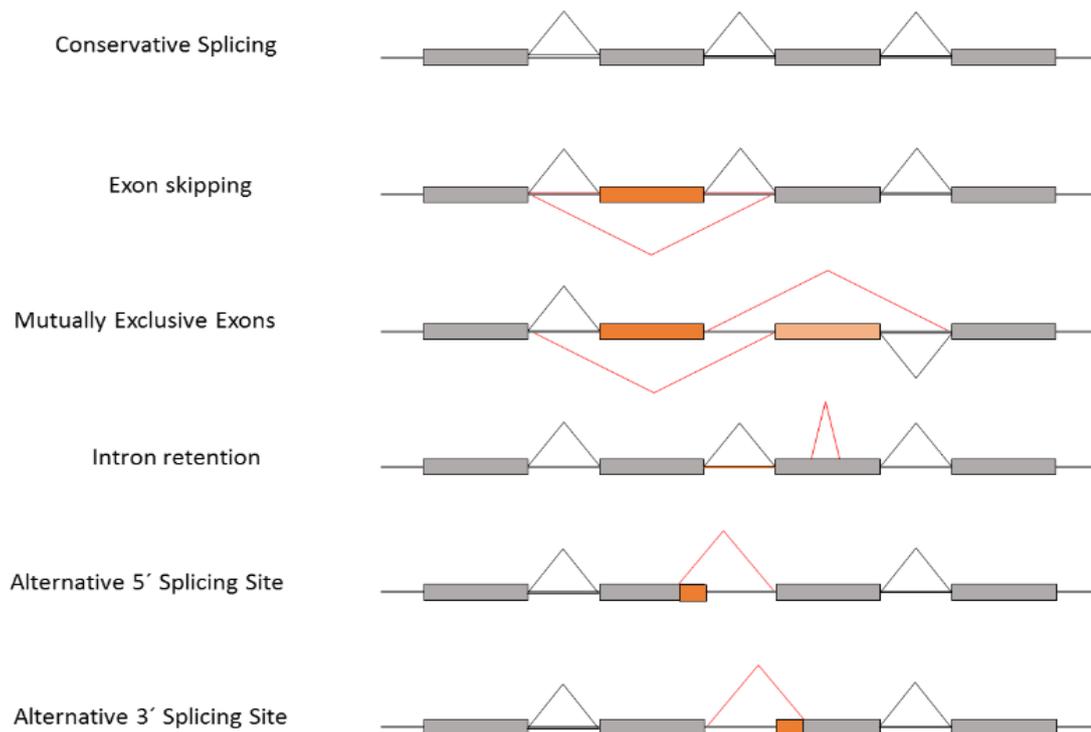


Abbildung 6: Formen des Splicings. Das Conservative Splicing stellt das normale Splicing dar, bei welchem Introne herausgeschnitten werden und die Exone dann zusammengefügt werden. Beim Exon skipping wird ein Exon übersprungen, bei Mutually Exclusive Exons schließen sich zwei Exone gegenseitig aus, so dass immer nur eins von beiden herausgeschnitten wird. Beim Intron retention bleibt ein Intron erhalten. Bei alternativen Splicing sites, entweder auf der 3'Site oder der 5'Site der Exone kommt es zu einer neuen Donor- oder Acceptorsite innerhalb des Exons, so dass ein Teil des Exons herausgeschnitten wird. Graue Exone sind die normal gesplitten Exone, alternativ gesplitten Exone sowie Teile davon sind orange dargestellt. Introne sind als Striche zwischen Exonen dargestellt.

Die Veränderungen von alternativ gesplittenen Isoformen können weitreichend sein. So können beispielsweise die zelluläre Lokalisation, die Membranbindung (Xing et al., 2003) oder Veränderungen in der Zusammensetzung der Domänen des resultierenden Proteins (Kriventseva et al., 2003) verändert sein.

Alternatives Splicing sorgt für eine große Diversität im Transkriptom (Keren et al., 2010) und eine große funktionelle Komplexität in Vertebraten (Modrek & Lee, 2002). Die Änderungen in der codierenden Region eines Gens durch das alternative Splicing führen zu einer großen Veränderung der Proteinsequenz, der Struktur und Funktion des

Proteins. Änderungen in der nichtcodierenden Region eines Gens können regulatorische Modifikationen wie beispielsweise alternatives Splicing zur Folge haben (Liu & Altman, 2003). Die Rate an alternativem Splicing erfolgt gewebsspezifisch. So findet man im Gehirn und in den Hoden die meisten alternativen Splicingevents und das alternative Splicing verändert sich mit dem Alter (Grosso et al., 2008).

1.3.1 Alternative Spliceformen des *SNCA* Gens

Auch das *SNCA* Gen unterliegt alternativem Splicing. Zum heutigen Zeitpunkt sind neben dem vollen Transkript AS-140 noch drei weitere Isoformen (AS-126, AS-112, AS-98) bekannt (Abbildung 7), die durch alternatives Splicing entstehen (Beyer, Domingo-Sabat, Lao, et al., 2008; Campion et al., 1995; Ueda et al., 1994). Die Funktionen der Isoformen, die alle durch das Überspringen von Exonen entstehen, sind allerdings zum heutigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. AS-112, eine Isoform bestehend aus 112 Aminosäuren, entsteht durch das Herausschneiden von Exon 5. Dadurch entsteht eine Variante von *SNCA* mit gekürztem C-Terminus. In einer Expressionsstudie mit humanen post-mortem Hirngewebe von Patienten mit Demenz mit Lewy Körperchen, Alzheimer und neurologisch gesunden Kontrollen konnte eine signifikant höhere Expression der AS-112 in Proben aus Hirngewebe mit Demenz mit Lewy Körperchen, verglichen mit Kontrollhirngewebe, beobachtet werden (Beyer, 2006). AS-126 entsteht durch das Herausschneiden von Exon 3. Da diese Isoform einen verkürzten N-Terminus hat, welcher wichtig für die Membraninteraktionen ist, scheint es eine Isoform ohne Aggregationseigenschaften zu sein (Bartels et al., 2010; Vamvaca et al., 2009). In post-mortem Hirngewebe von neurologisch gesunden Kontrollen wurden mit höherem Alter immer höhere Expressionslevel der AS-126 gefunden (Beyer et al., 2006), was darauf hinweist, dass AS-126 keinen pathologisch relevanten Einfluss auf die PK hat.

Die kürzeste Isoform ist die AS-98 (Beyer, Domingo-Sabat, Lao, et al., 2008). Sie wurde als letztes entdeckt und entsteht durch das Herausschneiden der Exone 3 und 5 was zu einer Isoform führt, die weiterhin eine Region mit hoher Aggregationsbereitschaft (AS 71 – 82) sowie Regionen, die toxische Eigenschaften haben könnten (AS 67 – 82, 72 –

82), enthält. Deshalb wurde vermutet, dass sie die Isoform mit den toxischsten Eigenschaften sein könnte (Surguchov, 2008).

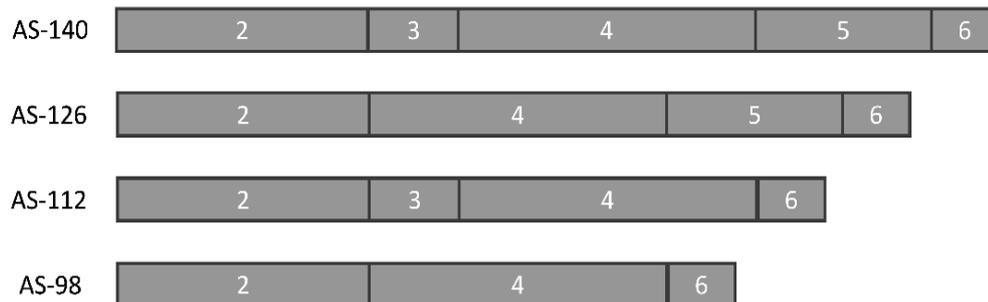


Abbildung 7: Die bis heute bekannten durch alternatives Slicing entstandenen Isoformen von *SNCA*. Die Zahlen geben jeweils das Exon an. Die AS-140 stellt das komplette Transkript von *SNCA* dar, bei AS-126 wird Exon 3 herausgeschnitten, bei AS-112 Exon 5 und bei AS-98 die Exone 3 und 5.

1.4 Der SNP rs356219

Als Einzelnucleotidpolymorphismen (single nucleodid polymorphism = SNP) werden Einzelbasenmutationen bezeichnet, die mit einer Allelfrequenz von mehr als 1% in einer Population auftreten. Dass manche SNPs das Risiko, eine bestimmte Erkrankung zu entwickeln, steigern können, indem sie beispielsweise eine Auswirkung auf die Expression eines Gens oder andere regulatorische Funktionen haben, wurde bereits in Kapitel 1.2.2.2 beschrieben.

Die Tatsache, dass bestimmte SNPs und die PK miteinander assoziiert sind, wurde durch diverse GWAS-Studien entdeckt (Pankratz, Wilk, et al., 2009) und durch funktionelle Studien bestätigt (Fuchs et al., 2008). Dabei wurden vor allem SNPs in der 3' Region des *SNCA* Gens als Risikofaktor für die Entwicklung einer PK entdeckt (Han et al., 2015; N. N. Li et al., 2013; Mata et al., 2010; Myhre et al., 2008; F. Pan et al., 2012). Die SNPs waren in hohem Kopplungsungleichgewicht (engl. Linkage disequilibrium, LD) (Abbildung 8). LD bezeichnet den Zustand, wenn zwei Allele nicht unabhängig voneinander vererbt werden und sehr selten durch Rekombinationsereignisse getrennt werden. Ein hohes LD ist daher häufig zwischen SNPs zu finden, die physisch nahe beieinander auf einem

Chromosom liegen. Der SNP in der 3' Region, der am häufigsten in GWAS-Studien als mit der PK assoziiert gefunden wurde, ist der rs356219, bei welchem das Allel T als protektiv und das Allel C als Risikoallel mit einer Minor Allele frequency (MAF) von 0,49 gilt. In einer Studie mit Parkinson Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen dem rs356219 in der 3' Region und einer höheren Konzentration von aSyn im Serum gefunden werden (Mata et al., 2010). Weiterhin konnte ein Einfluss des rs356219 auf die Expression der mRNA des ganzen Transkripts AS-140 in manchen port-mortem Hirnarealen gefunden werden (Fuchs et al., 2008). In einer weiteren Studie mit neurologisch gesunden Kontrollen (McCarthy et al., 2011), in welcher der Fokus auf der AS-112 lag, der Isoform, die am längsten bekannt ist und als aggregationsfördernd gilt, zeigte, dass Risikoallele verschiedener SNPs mit höheren Expressionsleveln der AS-112 assoziiert sind.

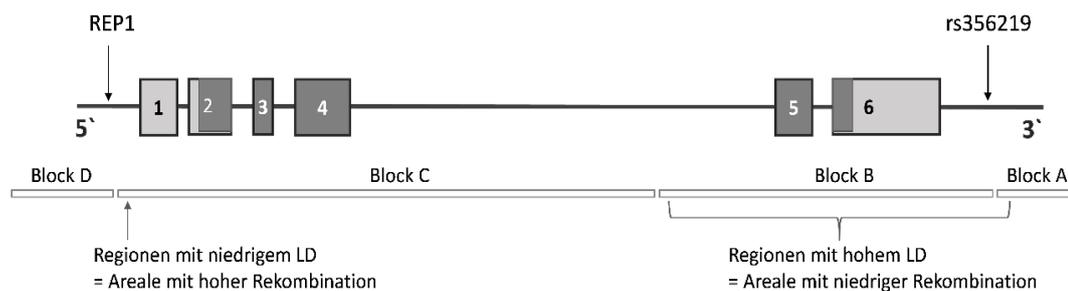


Abbildung 8: Schematische Darstellung von *SNCA*. Hellgraue Boxen stellen die nicht kodierenden Exone, dunkelgraue Boxen kodierende Exone dar. In der 5' Region ist der REP1 Polymorphismus, in der 3' Region der SNP rs356219 eingezeichnet. Die Blöcke A bis D stellen die LD-Blöcke dar. Block B ist signifikant mit der PK assoziiert.

1.5 Allelspezifische Expression von *SNCA*

Mutationen im *SNCA* Gen weisen darauf hin, dass aSyn eine bedeutende Rolle in der Entstehung der PK spielt. Studien an Mutationsträgern könnten die Bedeutung von aSyn bei der Entstehung der PK aufklären. Der Krankheitsverlauf von Patienten mit der A30P Mutation ist vergleichbar mit dem von IPS Patienten (Kruger et al., 2001). Leider konnte trotz diverser Studien an Mutationsträgern noch nicht geklärt werden, ob das mutierte

Allel überhaupt exprimiert wird und ob und inwiefern sich das mutierte und das WT Allel gegenseitig beeinflussen. Die erste Studie (Markopoulou et al., 1999), die diese Fragestellung bearbeitete, fand heraus, dass während die A53T Mutation auf DNA-Level im Blut nachweisbar war, auf RNA-Level in Lymphoblasten allerdings bei manchen Mutationsträgern eine signifikant niedrigere Expression von *SNCA*, verglichen mit dem WT Allel, nachweisbar war. Bei manchen Mutationsträgern konnte gar keine Expression des mutierten Allels nachgewiesen werden. Daher wurde vermutet, dass die molekulare Ursache der Entstehung der PK mit der Expression des mutierten Allels korreliert und die Frage aufgeworfen, ob Haploinsuffizienz die Ursache sein könnte. In einer weiteren Studie (Kobayashi et al., 2003) wurden Blutproben und Lymphoblasten von A30P und A53T Mutationsträgern und Kontrollen untersucht. In Blutzellen konnte die Expression der mutierten Allele nachgewiesen werden. In Lymphoblastenzelllinien beider Mutationsträger auf RNA-Ebene allerdings konnte in manchen Proben eine erhöhte, in manchen eine niedrigere Expression des mutierten Allels, verglichen mit dem WT Allel, nachgewiesen werden. Wieder wurde die Vermutung geäußert, dass Haploinsuffizienz eine Rolle spielen könnte. In einer nachfolgenden Studie (Voutsinas et al., 2010) wurde die Expression der Lymphoblastenzelllinie eines einzelnen A53T Mutationsträgers mit einer Kontrolle verglichen. Es konnte keine Expression des mutierten Allels nachgewiesen werden. Allerdings schien das WT Allel des Mutationsträgers, verglichen mit dem der Kontrolle, kompensatorisch hochreguliert. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde ein epigenetischer Mechanismus vermutet, der zu einem Silencing des mutierten Allels und einer damit einhergehenden Hochregulation des WT Allels führt. Diese Hochregulation wurde hierbei als der pathogene Mechanismus vermutet.

2 Ziele dieser Arbeit

Im Folgenden wird die Zielsetzung dieser Dissertation dargestellt. Da die Arbeit aus zwei Teilbereichen besteht, werden die Kernziele jedes Teilprojektes gesondert behandelt. Insgesamt soll in dieser Arbeit näher erörtert werden, inwiefern die Expression von *SNCA* durch Risikovarianten von *SNCA* oder monogene Mutationen beeinflusst wird und welche Auswirkungen das auf die Entstehung der PK haben kann.

2.1 Teilprojekt 1 – Analyse der Expression der Isoformen des *SNCA* Gens in Korrelation mit dem protektiven oder Risikoallel des SNPs rs356219

Viele vorhergehende Studien (Fuchs et al., 2008; Kobayashi et al., 2006; Mizuta et al., 2006; Pankratz, Wilk, et al., 2009; Simon-Sanchez et al., 2009) zeigen, dass das Risiko, eine sporadische PK zu entwickeln durch einige Haplotypen im *SNCA* Locus moduliert werden kann. Vor allem SNPs in der 3´Region (Mueller et al., 2005; Sotiriou et al., 2009) und in geringerem Ausmaß auch SNPs in der 5´Region oder der Promoterregion (Maraganore et al., 2006; Pals et al., 2004) sind mit der PK assoziiert. Einer der SNPs, der in vielen GWAS Studien am stärksten mit einem höheren Risiko für eine PK in Verbindung gebracht wurden konnte, ist der rs356219. In einer Pilotstudie (Fuchs et al., 2008) wurde der Einfluss von SNPs in der Promoterregion und der 3´Region von *SNCA* auf die mRNA Level und Proteinlevel von AS-140, dem vollen Transkript von aSyn in humanem Blut und humanen post-mortem Hirngewebe, untersucht. Hier wurde gefunden, dass der rs356219 einen signifikanten Effekt auf die Expression von AS-140 in manchen Hirnarealen hat. Die anderen Isoformen von *SNCA* wurden bisher in keiner Studie auf ihren Einfluss auf die PK untersucht. Lediglich Studien zur Expression der Isoformen in post-mortem Gehirnen von Alzheimerpatienten, Patienten mit Lewykörperchendemenz und Kontrollen (Beyer, Domingo-Sabat, Lao, et al., 2008; Beyer et al., 2006; Beyer et al., 2004) gaben Aufschluss über mögliche Toxizität oder Neuroprotektivität der einzelnen Isoformen.

Basierend auf all diesen Studien soll heraus gefunden werden, ob die Expressionslevel einzelner Isoformen in der mRNA im Blut und verschiedenen post-mortem Hirngeweben von Patienten und Kontrollen durch den rs356219 beeinflusst werden, ob also die genetische Variabilität von *SNCA* einen Einfluss auf alternatives Splicing des Gens hat und damit das Risiko, eine PK zu entwickeln, moduliert. Vor allem die AS-126 und AS-98 sollen aufgrund ihrer interessanten Struktur näher betrachtet werden, da bisher sehr wenig darüber bekannt ist, inwiefern sie einen toxischen oder gar protektiven Einfluss auf die Entstehung einer PK haben könnten. Speziell im Hinblick auf die Expressionslevel im Blut soll herausgefunden werden, ob die Expressionslevel bestimmter Isoformen in Korrelation mit dem rs356219 als potentieller Biomarker für die Beurteilung, ob jemand in naher Zukunft eine sporadische PK entwickeln könnte, dienen kann. Weiterhin soll die Expression der einzelnen Isoformen im Hinblick auf klinische Parameter wie dem Erkrankungsalter und der motorischen und kognitiven Progression erörtert werden, um herauszufinden, ob einzelne Isoformen einen Einfluss auf diese Parameter haben. Diese könnten dann als Biomarker für den klinischen Verlauf der PK genutzt werden. Dies könnte bei der Entwicklung neuer Ansätze Anwendung finden. Frühzeitig angewandte neuroprotektive Strategien könnten den Ausbruch der PK hinauszögern.

2.2 Teilprojekt 2 – Analyse der allelspezifischen Expressionen bei A30P und A53T Mutationsträgern

Zum jetzigen Zeitpunkt sind fünf Mutationen in der kodierenden Region von *SNCA* bekannt, die zu vererbten Formen der PK führen. Neben der E46K, der H50Q, der A53E und der G51D Mutation sind die A30P und die A53T Mutationen die relevantesten hinsichtlich der Anzahl der betroffenen Patienten weltweit.

Alle Mutationen beeinflussen die Membranbindungsdomäne von aSyn, was zu einer veränderten dreidimensionalen Sekundärstruktur führt. Es wird vermutet, dass dies wiederum die Interaktion mit Membranen oder anderen Bindungspartnern von aSyn beeinflusst, was wiederum mit dem Abbau von dopaminergen Neuronen assoziiert sein könnte.

Noch ist unklar, inwiefern diese Mutationen die Entstehung der PK triggern können. Vorhergehende kontroverse Studien an Proben von Patienten mit einer A30P oder A53T Mutation lassen auf verschiedene Mechanismen schließen. So wurde über Silencing des mutierten Allels in einigen Fällen oder eine geringere Expression verglichen mit dem WT Allel in anderen Fällen berichtet. Manche Autoren kamen zu dem Schluss, dass eine Haploinsuffizienz des mutierten Allels mit der Progression (Kobayashi et al., 2003) oder dem Ausbruch der Krankheit (Markopoulou et al., 1999) assoziiert ist. In einer anderen Studie wiederum wurde über eine kompensatorische Hochregulation des WT Allels in einem Patienten mit einer A53T Mutation berichtet, was die Autoren vermuten ließ, dass epigenetische Mechanismen für ein Silencing des mutierten und eine Überexpression des WT Allels verantwortlich sein könnten (Voutsinas et al., 2010).

Alle diese Studien wurden ausschließlich an immortalisierten Lymphoblastenzelllinien durchgeführt.

Um die Expression des mutierten und des WT Allels in Mutationsträgern und deren Einfluss auf die Entstehung der PK besser verstehen zu können, sollen in dieser Arbeit zum ersten Mal die allelspezifische Expression von *SNCA* in den Mutationen A30P und A53T in unterschiedlichen, patientenmaterialbasierten, Zelllinien und Patientenproben auf RNA-Ebene gemessen und verglichen werden. Weiterhin soll erstmals die allelspezifische Expression der Proteinlevel mittels Massenspektrometrie auch in denselben Patientenproben gemessen und anschließend mit den Ergebnissen der Untersuchungen der RNA verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Projektspezifische Methoden

Zunächst werden Methoden erläutert, die speziell für eines der beiden Teilprojekte zum Einsatz kamen. Anschließend werden allgemeine Methoden beschrieben, die bei beiden Teilprojekten genutzt wurden.

3.2 Teilprojekt 1

3.2.1 Auswahl der Proben

Für den ersten Teil des Projekts wurden zwei verschiedene Kohorten verwendet. Zum einen Hirnproben, zum anderen Blutproben. Für die Blutproben wurden 55 Patienten mit sporadischem Parkinson, (davon 25 weibliche und 30 männliche) und 61 neurologisch gesunde Kontrollpersonen (davon 28 weibliche und 33 männliche) aus der neurologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen nach spezifischen Kriterien ausgewählt. Alle Probanden hatten nach vorheriger Aufklärung ihr Einverständnis zur Verwendung ihres Blutes für die Forschung gegeben und einen Mini Mental Test (MMST) (Folstein et al., 1975) absolviert. IPS wurde von erfahrenen Neurologen des Universitätsklinikums Tübingen aufgrund von standardisierten klinischen Tests diagnostiziert. Zusätzlich wurden die IPS-Patienten nach der Hoehn und Yahr (H&Y) Skala (Hoehn & Yahr, 1967) klassifiziert. Nur Probanden ohne bekannte pathogene Parkinson Mutation wurden eingeschlossen.

Für den zweiten Teil des Projekts wurden post-mortem Hirnproben von Probanden mit der Diagnose IPS und neurologisch gesunder Menschen verwendet. Diese waren bereits im Jahre 2005 von verschiedenen Hirnbanken angefordert worden und daraus RNA isoliert worden. Es wurden vier Hirnbereiche analysiert: 33 Proben aus Gyrus Cingulus (GC), 40 Proben aus Cerebellum (CE), 36 Proben aus Medulla Oblongata (MO) und 20 Proben von Substantia Nigra (SN). Eine Zustimmung der EU für die Verwendung der Proben liegt vor.

3.2.2 Auswahl des SNPs

Da bei GWAS Analysen zur PK der rs356219 in der 3'UTR des *SNCA* Gens das stärkste Assoziationssignal gab, wurde dieser SNP für diese Studie ausgewählt.

3.2.2.1 Genotypisierung mit SNaPshot

DNA von allen Probanden war bereits in der internen Biobank des Hertie Instituts für Klinische Hirnforschung in Tübingen vorhanden. Die Genotypisierung für den SNP rs356219 wurde mit der SNaPshot-Methode (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) realisiert. Diese Methode basiert auf einer di-deoxy Einzelbasenverlängerung eines spezifischen Primers, welcher genau eine Base vor der Position endet, welche genotypisiert werden soll. Nach der Amplifikation werden 15µl des PCR Produkts mit 3µl Shrimp alkaline Phosphatase (SAP, 1U/µl) und 1µl Exonuclease I (ExoI, 2U/µl) für 1h bei 37°C aufgereinigt. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 75°C für 15min gestoppt. Danach wird die SNaPshot PCR in einem Volumen von 10µl, welches aus 2µl SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 3µl des aufgereinigten PCR Produktes, 0,5µl Primer (10µM) (Metabion international AG, Steinkirchen, Deutschland) und Nucleasefreiem Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) nach Anweisung des Protokolls in einem Thermocycler (T100™) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Das SNaPshot PCR Produkt wurde dann wiederum mit 1µl SAP (1U/µl) bei 37°C für 1h, gefolgt von 75°C für 15min für die Enzyminaktivierung, aufgereinigt. Anschließend wurde der SNP im Sequenzer ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Ambio, Austin, USA) nach Anweisung des Kits genotypisiert und anschließend mit Staden Package (Freeware) analysiert.

3.2.3 Isoformspezifisches Primerdesign

Für jede Isoform von *SNCA* wurden isoformspezifische Primer (Beyer, Domingo-Sabat, Lao, et al., 2008; Beyer et al., 2006; Beyer et al., 2004) benutzt. Diese Primer waren so konstruiert, dass jeweils der forward Primer in den durch das Herausschneiden eines Exons neu zusammengefügt Splicingsites liegt. Nur der forward Primer für das

gesamte Transkript, der AS-140, überspannt lediglich das Intron zwischen Exon 4 und 5. Als reverse Primer wird, außer bei AS-98, bei der auch dieser ein herausgeschnittenes Exon überspannt, immer ein Primer benutzt, der im letzten Exon, dem Exon 6, liegt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Isoformspezifische Primer, ihre Lage im *SNCA* Gen, die Sequenz und die jeweilige Verwendung

Codierung Primer	Lage Exone	Überspannt Exon	Sequenz	Verwendung
4/5U	4, 5	-	5'- CCAGTTGGGCAAGAATGAAG -3'	Forward AS-140
2/4U	2, 4	3	5'- CTCTATGTAGTGGCTGAGAA -3'	Forward AS-126, AS-98
4/6U	4, 6	5	5'- GTTGGGCAAGGAAGGGTAT -3'	Forward AS-112
4/6L	4, 6	5	5'- ATACCCTTCCTTGCCCAAC -3'	Reverse AS-98
6L	6	-	5'- GAGCACTTGTACAGGATGG -3'	Reverse AS-140, AS-126, AS-98

3.3 Teilprojekt 2

3.3.1 Mutationsträger und Kontrollen

Für dieses Teilprojekt waren mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells = PBMCs) und Fibroblasten von fünf Mitgliedern einer deutschen Familie bereits vorhanden (Kruger et al., 1998). Sieben Personen dieser Familie hatten eine A30P Mutation, die anderen Familienmitglieder wurden als Kontrollen mitgeführt (Abbildung 9). Zusätzlich wurde einem A53T Mutationsträger PBMCs und Fibroblasten entnommen.

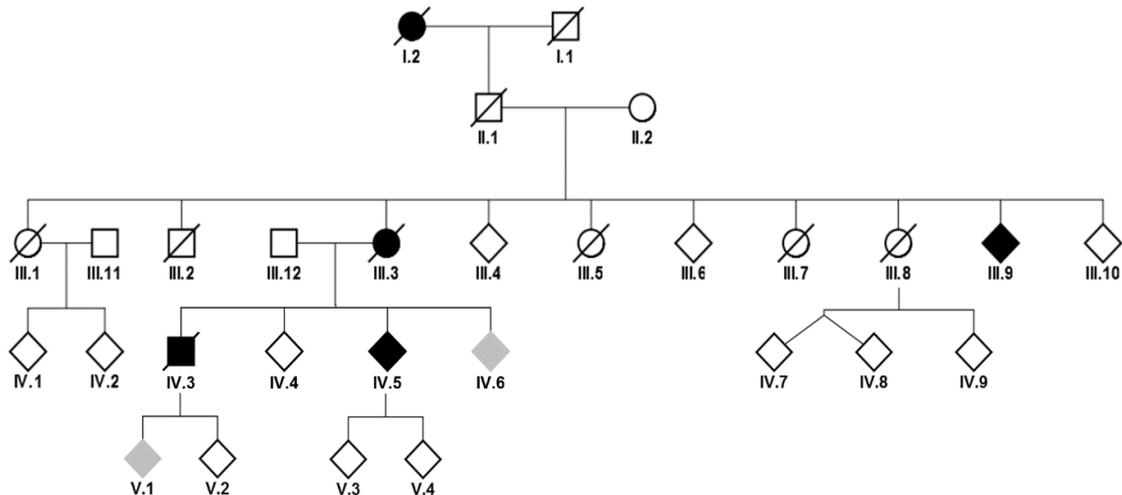


Abbildung 9: Die deutsche A30P Familie. Kreise stellen weibliche Personen, Quadrate männliche dar. Rauten stehen für Personen, deren Geschlecht nicht preisgegeben werden soll. Durchgestrichene Personen sind bereits verstorben. Schwarz markierte Personen sind Personen, die eine Parkinsonerkrankung haben oder hatten. Bei den Individuen III.3, IV.4, IV.5 ist gesichert, dass diese symptomatische Mutationsträger A30P sind. Individuen mit grauen Rauten sind asymptomatische Mutationsträger selbiger Mutation. Individuum IV.3 ist der Indexpatient.

Des Weiteren waren für die Studien an Hirngewebe von einem verstorbenen Familienmitglied (Individual IV.3, Indexpatient) der A30P Familie Stücke von frontalem und entorhinalem Kortex, sowie Putamen verfügbar. Die pathologischen Eigenschaften des Gehirns wurde bereits publiziert (Seidel et al., 2010). Außerdem wurden Proben von frontalem und entorhinalem Kortex von einem A53T Mutationsträger und eine Gewebeprobe von Putamen von einem anderen A53T Mutationsträger benutzt. Als Kontrollen dienten eine Probe von frontalem Kortex und zwei Proben von Putamen von neurologisch gesunden Individuen, die aufgrund von Alter und Geschlecht zu den Mutationsträgern passen.

Alle Mutationsträger und deren Charakteristik werden in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Alle Mutationsträger mit den jeweiligen Gewebearten, die für die Studie genutzt wurden. Die Gewebeart, die vom jeweiligen Patienten genutzt wurde, ist mit einem x gekennzeichnet.

Stammbaum ID	V.1	III.9	IV.6	IV.5	IV.3			
	A30P	A30P	A30P	A30P	A30P	A53T	A53T	A53T
Mutation								
PBMC	x	x	x	X	x			x
Putamen					x	x		
Frontaler Kortex					x		x	
Entorhinaler Kortex					x		x	
Fibroblasten					x			x
iPSC					x			x
mDA					x			x

3.3.2 Zellkultur

Zellen und Zelllinien wurden nur mit vorheriger Einverständniserklärung der Probanden kultiviert. Alle Lymphoblastenzelllinien (LZL) bis auf die des A53T Patienten stammten aus dem Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum. Sie wurden dort aus PBMCs nach einem Standardprotokoll (Neitzel, 1986) generiert und dann über neun Jahre in Stickstoff gelagert und nach Versand auf Trockeneis in Tübingen aufgetaut und kultiviert. Die LZL des A53T Patienten wurde im Rahmen dieser Dissertation aus PBMCs in Tübingen neu generiert. Auch hierfür liegt der Biobank ein positives Votum der EU vor.

3.3.2.1 Generation und Kultivierung von Lymphoblasten

Zunächst werden die PBMCs mittels Ficollgradientenzentrifugation (Biocoll, Millipore Corporation, Darmstadt, Deutschland) vom Rest der Blutbestandteile in der Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1,0R (Thermo Fisher Heraeus, Hanau, Deutschland)) bei 1200g für 20min getrennt. Nach der Zentrifugation kann der Lymphozytenring, der sich in der Mitte des Ficollgradienten gebildet hat, in ein Falcon überführt und anschließend zweimal mit PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen und anschließend in PBS gelöst werden.

Anschließend wurde das Lymphozytenpellet im EBV-Aliquot (siehe 3.3.2.2) resuspendiert und mindestens 30min bei 40°C in einem Wasserbad (VWR VWB 6, VWR

International, Pennsylvania, USA) inkubiert. Anschließend wurden der Zell-Virus-Mix in eine Zellkulturflasche (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Medium überführt, im Brutkasten (SANYO Electric Biomedical Co, Ltd., Osaka, Japan) inkubiert und nach visueller Inspektion unter dem Mikroskop (Nikon eclipse TS100, Düsseldorf, Deutschland) wöchentlich gesplittet.

Die Zellen wurden mit RPMI Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 20% Fötalem Kälberserum (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), 1% Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 1,1% Natriumpyruvat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), 10ml HEPES (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), 5ml Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und Cyclosporin A (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gefüttert und bei 37°C in 5-6% CO₂ im Brutkasten (SANYO Electric Biomedical Co, Ltd., Osaka, Japan) kultiviert.

3.3.2.2 Herstellung von Virusaliquots

Die EBV-Aliquots wurden aus den mit EBV infizierten Lymphozyten der Affenzelllinie B95-8 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hergestellt, indem eine Zellkulturflasche mit Lymphozyten so lange ungefüttert inkubiert wurde, bis alle Zellen abgestorben waren. Dann konnten die toten Zellen durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1,0R (Thermo Fisher Heraeus, Hanau, Deutschland)) bei 600g für 30min vom Überstand, welcher den Virus enthält, getrennt und anschließend mit Filtern (Thermo Fisher Scientific, Hamburg, Deutschland) steril filtriert werden. Die Aliquots von 2ml wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um zu gewährleisten, dass keine lebenden B95-8 Zellen mehr vorhanden sind und anschließend bei -80°C gelagert.

3.3.2.3 Lymphoblasten splitten und weg frieren

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich gesplittet, also in mehrere neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt oder in Einfriermedium, bestehend aus 90% Fötalem Kälberserum (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und

10% DMSO (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in Aliquots von 2ml in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.2.4 Generation von iPSCs und mDA Neuronen

Die Generation von induzierten pluripotenten Stammzellen (induced pluripotent stem cells = iPSCs eines A30P (Individual IV.3), eines A53T Patienten und einer bereits publizierten Kontrolle (Schondorf et al., 2014) erfolgte aus kultivierten Fibroblasten, welche reprogrammiert wurden. Aus den iPSCs wiederum wurden die mDA Neuronen differenziert.

Die Differenzierung von mDA Neuronen aus iPSCs wurden von Benjamin Schmid (HIH Tübingen, AG Gasser) (A30P Patient und Kontrolle) und Carolin Obermaier (DZNE Tübingen, AG Krüger) (A53T Patient und Kontrolle) im Hertie Institut Tübingen nach einem bereits publizierten Protokoll (Reinhardt et al., 2013) durchgeführt.

3.3.3 Restriktionsfragmentlängenanalyse

Um die Ergebnisse der qPCR zu validieren, wurde für einige Proben noch eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) gemacht. Dafür wurde die gleiche cDNA wie für die qPCR Experimente benutzt.

3.3.3.1 Klonierung

Für die Klonierung wurde zunächst mit dieser cDNA mittels PCR ein ca. 150bp langes PCR-Produkt generiert, bei welcher die Mutationsstelle ungefähr in der Mitte des PCR-Produktes lag. Nachdem die richtige Bandenlänge auf einem 2%igen Agarosegel (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) verifiziert wurde, wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration am Nanodrop (ND1000) (Pepqab, Erlangen, Deutschland) wurde das PCR-Produkt mit 1µl Vektor (pGEM[®]-T Easy (50ng), Promega, Mannheim, Deutschland), 5µl 2x Rapid Ligation Puffer (Promega, Mannheim,

Deutschland), 1µl Enzym T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl) (Promega, Mannheim, Deutschland) und Nuclease freiem Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in einem Volumen von 10µl bei 4°C über Nacht inkubiert.

Die Menge von eingesetztem PCR-Produkt und Wasser wurde als Ratio von Vektor zu Insert für jede Reaktion berechnet:

$$(x \text{ bp Insert} * 50\text{ng Vektor})/y \text{ bp Vektor} = x \text{ ng Insert}$$

3.3.3.2 Transformations-PCR

Nach der Inkubation wurde dieses Konstrukt in One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) nach Anleitung des Kits transformiert. Nach dem Ausplattieren der Transformation in Petrischalen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit LB-Medium, welches das Antibiotikum Ampicillin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) enthielt, wuchsen die Bakterien über Nacht im Brutschrank (Binder Multimed, Tuttlingen, Deutschland) bei 37°C.

3.3.3.3 Kolonie-PCR und Verdau

Für die Kolonie-PCR wurden so viele Einzelklone wie möglich gepickt. Nach der PCR wurden die einzelnen Produkte auf ein 2% Agarosegel (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) aufgetragen, um fest zu stellen, ob das richtige Amplifikat in den Vektor ligiert wurde. Die positiven PCR-Produkte wurden dann nach Ethanolpräzipitation (3.4.7.1) mit dem passenden Restriktionsenzym bei 37°C für 4h in einem Thermocycler (T100™) (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verdaut. Die Reaktion wurde durch eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 5min gestoppt. Bei Anwesenheit der A30P Mutation wird eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym *MVAI* (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland), bei Vorhandensein der A53T Mutation wird eine Schnittstelle für das Enzym *TSP45I* (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland), gebildet. Nachdem die Produkte des Verdau auf ein 2% Agarosegel (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

aufgetragen waren, konnte man anhand der Produktlänge auszählen, wie viele Klone mit mutiertem und mit WT Allel vorhanden waren.

3.3.4 Massenspektrometrische Analyse der allelspezifischen Peptide

Die Analyse der allelspezifischen Expression des Proteins aSyn wurde in Kooperation im Rahmen der Doktorarbeit von Parabal Subedi (Subedi, 2016) am Medizinischen Proteom-Center an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Zur Durchführung wurde eine Massenspektrometrie-basierte Methode angewandt, mit welcher Proteine identifiziert und anschließend quantifiziert werden können. Die ausführliche Methodik und Analyse ist in der Doktorarbeit von P. Subedi (2016) genau beschrieben. Hier soll deshalb nur eine kurze Zusammenfassung dessen gegeben werden:

Die Proben wurden zunächst lysiert und anschließend wurden dann die Proteine im Lysat mittels einer Protease verdaut. So entstanden proteolytische Peptide, welche dann über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt und anschließend über das Massenspektrometer vermessen werden konnten.

Da für jedes Protein spezifische Peptide entstehen, konnten diese bei der nachfolgenden bioinformatischen Datenanalyse als Grundlage für die Identifizierung der Proteine genutzt werden. Das aSyn Peptid für das wild-typ Protein unterscheidet sich von dem der Peptide, welche durch die A30P und die A53T Mutation entstehen. Somit konnten die Proteine beider Mutationen theoretisch vom wild-typ Protein mittels Massenspektrometrie unterschieden und quantifiziert werden. Allerdings konnte das A30P Peptid aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften nicht identifiziert werden. Die Peptide für aSyn wild-typ (EGVVHGVATVAEK) und die A53T Mutation (EGVVHGVTTVAEK) wurden durch die quantitative massenspektrometrische Technik der Parallel Reaction Monitoring (PRM), gezielt analysiert (Gallien et al., 2012; Peterson et al., 2012)

3.4 Allgemeine Methoden

3.4.1 Isolation der RNA

RNA wurde aus verschiedenen Geweben isoliert, um Expressionsanalysen mit qPCR oder RFLP durchzuführen. Das mit dem PAX Gene System abgenommene Blut wurde zunächst für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die RNA mit dem zugehörigen PAX Gene Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach dessen Protokoll über Silikagelsäulen isoliert.

Die RNA aus den humanen Hirnproben, den Lymphoblasten, den iPS-Zellen und den mDA-Neuronen wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach dessen Protokoll auch über Silikagelsäulen aufgereinigt. Die Hirnproben wurden vor der Aufreinigung mit einem Homogenisator nach Dounce (Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden) homogenisiert. Adhärenente Zellen wurden nach der enzymatischen Ablösung zweimal mit PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gewaschen und danach mit Lysepuffer homogenisiert. Die fertig isolierte RNA wurde in 30µl RNase freiem Wasser eluiert. Alle RNA Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.4.2 Qualitätskontrolle der RNA

Die RNA Konzentration und die Reinheit wurden am Nanodrop (ND1000) (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Dabei wird die Konzentration in ng/µl bestimmt, der Absorptionsquotient 260 nm zu 280 nm sollte bei reiner RNA zwischen 2,0 und 2,2 sein.

Stichprobenartig wurde bei einigen RNA Proben dann noch die RNA Integrität (RIN) bei den Firmen CeGaT (Tübingen, Deutschland) oder MFT Services (Tübingen, Deutschland) mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) bestimmt. Dieses Kapillarelektrophoresesystem gibt Aufschluss über die Qualität der RNA, insbesondere der Grad der Fragmentierung. Die RIN Werte reichen von 0 bis 10, wobei bei RIN Werten von 0 – 5 eine stark fragmentierte RNA vorliegt. Alle getesteten Proben hatten RIN Werte zwischen 8,0 und 10 und waren somit von sehr guter Qualität.

3.4.3 Umschrieb der RNA in cDNA

Die reverse Transkription für die anschließende quantitative PCR (qPCR) erfolgte mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) mit Random Hexamer Primern nach dessen Protokoll. Es wurden 50 – 200ng RNA für den Umschrieb eingesetzt. Als Kontrolle wurde bei jedem Umschrieb eine Reaktion ohne die Reverse Transkriptase (= RT-) mitgeführt. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.4.4 PCR

Die Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden in einem 20µl Ansatz, bestehend aus 40ng DNA, 0,8 µl Primer (10µM) (Metabion international AG, Steinkirchen, Deutschland), 0,4 µl dNTP Mix (2mM) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 2,4 µl MgCl (25mM) (Promega, Mannheim, Deutschland), 4,0 µl 5x GoTaq Reaction Puffer (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,1 µl Taq-Polymerase (5U/µl) (Promega, Mannheim, Deutschland) und 8,3 µl Nuclease freies Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in einem Thermocycler (T100™ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)) durchgeführt. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle für jedes Primerpaar, bei welcher die DNA durch Nuclease freies Wasser ersetzt wurde, mitgeführt. Ein typisches PCR-Programm ist in Tabelle 4 aufgeführt, wobei die Temperatur für die Primeranlagerung jeweils den optimalen Schmelzpunkten der jeweiligen Primer angepasst wurde. Alle Primer wurden mit der frei zugänglichen Primer3Plus Software designet. Die Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 4: Typisches Programm für eine Standard-PCR

Ablauf	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5min	1
Denaturierung	95°C	30sec	35
Primeranlagerung	55°C – 62°C	30sec	
Extension	72°C	30sec	
Terminale Extension	72°C	3min	1
Kühlen	12°C	∞	

Die PCR Produkte, sowie die Negativkontrollen, wurden in einem 2%igen Agarose Gel (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 6µl/100ml Midori Green Advance DNA Stain (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) visualisiert. Um die Bandengröße abzulesen, wurde eine DNA Leiter (GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder von Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) bei jedem Lauf mit aufgetragen.

3.4.5 qPCR

Alle relativen Quantifizierungen wurden mit dem LightCycler 480 I (LC480) System (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) mit der SybrGreen (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) Technologie durchgeführt. Die Effizienz der Primer wurde mit einer Standardkurve bestimmt. Die Standards mit den Konzentrationen 0,2; 0,04; 0,008 und 0,0016 bestanden aus dem Mix aller cDNAs, welche in einem Experiment eingesetzt wurden (Abbildung 10). Eine Effizienz von 2,0 bedeutet eine theoretische Verdopplung der cDNA Menge in jedem qPCR Zyklus und damit eine 100%ige Effizienz.

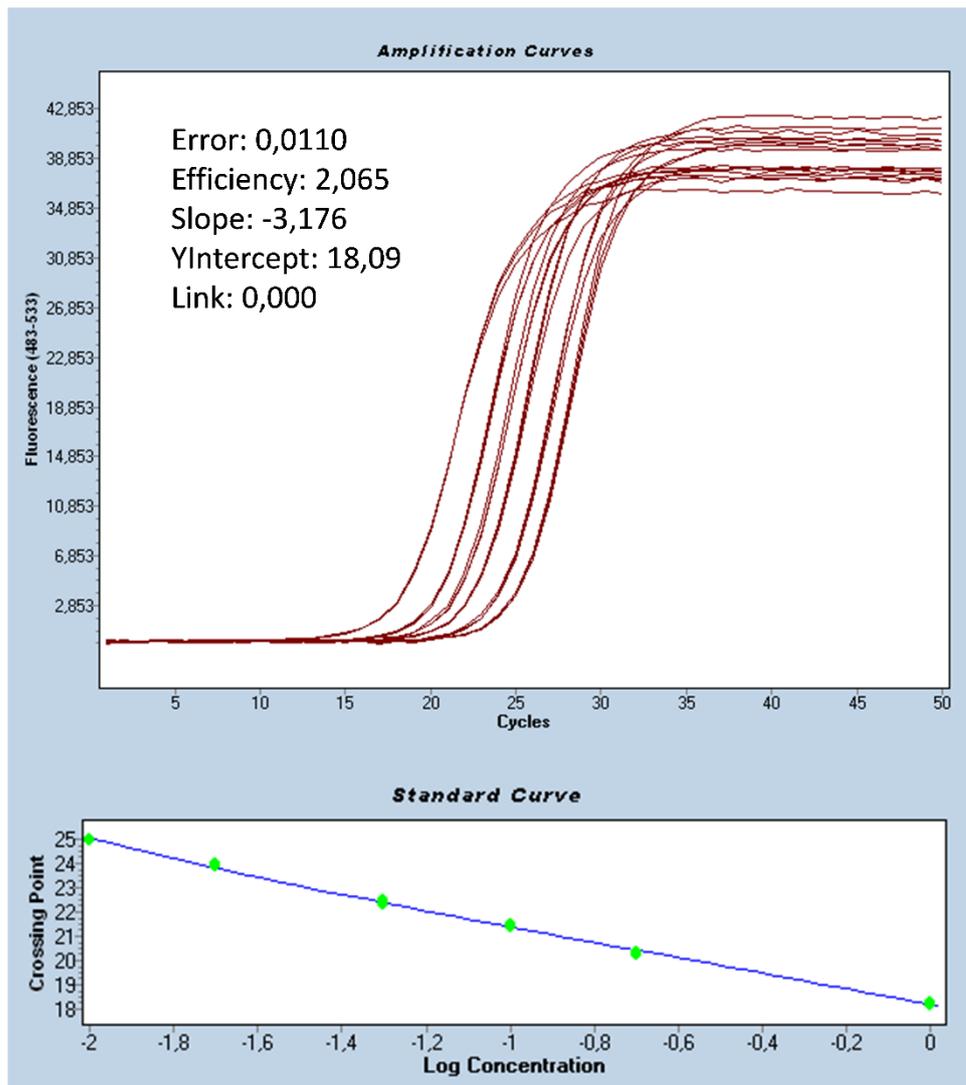


Abbildung 10: Beispielhafte Standardkurve eines Experiments.

Die obere Abbildung zeigt die Crossing Points der Duplikate jedes Standards mit den Konzentrationen 0,2 0,04 0,008 und 0,0016. Auf der y-Achse ist die Fluoreszenz-Intensität, auf der x-Achse die Anzahl der PCR-Zyklen dargestellt. Die Effizienz berechnet sich aus der Steigung (Slope) der Standardkurve mit der Formel $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Das Yintercept gibt das theoretische Detektionslimit an und die Sensitivität der Reaktion zeigen die Crossing Points. Der Fehler (Error) zeigt die Abweichung der Standards von der Standardkurve.

Die untere Abbildung zeigt die Standardkurve, die sich aus den logarithmischen Konzentrationen der Standards auf der x-Achse und die Crossing Points auf der y-Achse ergibt.

Der Mastermix für alle qPCR Experimente bestand aus 5 µl SybrGreen (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland), 1 µl Primermix (Metabion international AG,

Steinkirchen, Deutschland) und 1,5 µl RNase freiem Wasser (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland). Zum Mastermix wurde noch jeweils 2,5 µl cDNA, die zuvor mit RNasefreiem Wasser (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) 1:5 verdünnt wurde, zugegeben. Alle Proben wurden in Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Jedes Experiment wurde drei Mal durchgeführt. Für jedes Teilprojekt wurde ein spezielles PCR Programm auf dem LC480 etabliert, um optimale Bedingungen für jedes Experiment zu schaffen. Die spezifischen LC480 Programme sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Auf jeder Platte wurden als Negativkontrollen Wasserkontrollen und RT- Kontrollen für jedes Primerpaar mitgeführt. Mit der RT- Probe kann kontrolliert werden, dass nur RNA und keine DNA amplifiziert wird.

Alle Primerpaare, ihre Verwendung und die Sequenz sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Die relative Expression wurde mittels MS Excel (Microsoft, USA) mit der Delta-CT-Methode: $\text{Effizienz}^{-(\text{Crossingpoint}(\text{Gen}) - \text{Crossingpoint}(\text{geometrischer Mittelwert der Referenzgene}))}$ ermittelt. Als Crossingpoint (CP) wird der Zyklus der qPCR, in welcher die PCR Produktmenge das erste Mal signifikant vermehrt wird, definiert.

Für jedes qPCR-Protokoll wurde bei jedem Lauf eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Diese bestand zum einen im Mitführen und der Kontrolle der Effizienz aller Primerpaare. Wichtig war dabei, dass die Effizienz der Primerpaare einerseits nicht zwischen den qPCR-Läufen abwich, weiterhin sollten die Effizienzen der Primerpaare einer einzelnen qPCR nahezu gleich sein. Nur so sind die Produkte der verschiedenen Primer miteinander vergleichbar und die Ergebnisse können nicht durch eine abweichende Effizienz der Referenzgene verfälscht werden. Zum anderen wurden die Standardabweichungen zwischen den Duplikaten oder Triplikaten der einzelnen Proben kontrolliert. Diese sollten im besten Fall gar nicht voneinander abweichen. Größere Ausreißer, die beispielsweise durch nicht exaktes Pipettieren entstanden waren, wurden aussortiert oder die Probe wurde noch einmal vermessen.

Die Spezifität der einzelnen qPCR Produkte wurde mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft (Abbildung 11). Ein einzelner Peak zeigt ein spezifisches Produkt an. Alle

Produkte, die mit den gleichen Primerpaaren amplifiziert wurden, haben den gleichen Schmelzpunkt. Außerdem wurden bei jeder Etablierung noch stichprobenartig einzelne Proben auf ein Agarosegel (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) aufgetragen, um hier die richtige Bandenlänge zu verifizieren.

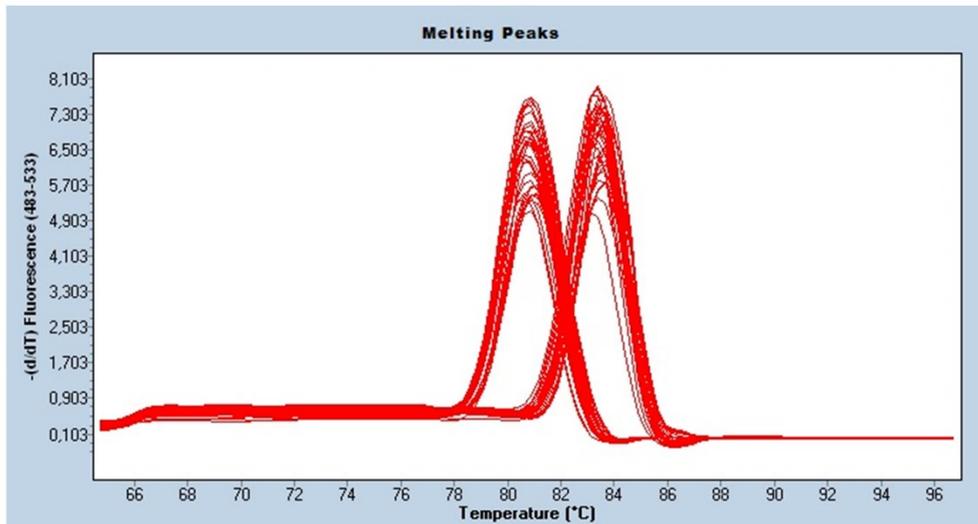


Abbildung 11: Beispielhafte Schmelzkurvenanalyse von zwei Primerpaaren. Jedes Produkt zeigt einen spezifischen Peak, was beweist, dass ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Die zwei Primerpaare lassen sich gut anhand der zwei Peakgrößen unterscheiden.

Tabelle 5: Programmspezifikationen für die qPCR beider Teilprojekte.

Projekt	Produkt	Ablauf	Dauer	Temperatur	Heiz-/Kühlgeschwindigkeit	Zyklen
Teilprojekt 1	AS-140, AS-112	Initiale Denaturierung	9min	95°C	4,8°C/sec	1
		Amplifikation	10sec	95°C	4,8°C/sec	50
			15sec	55°C	2,5°C/sec	
	10sec		72°C	4,8°C/sec		
	Schmelzkurve	5sec	95°C	4,8°C/sec	1	
		1min	65°C	2,5°C/sec		
fortlaufend		97°C	0,11°C/sec			
AS-126, AS-98	Initiale Denaturierung	9min	95°C	4,8°C/sec	1	
	Amplifikation	10sec	95°C	4,8°C/sec	50	
		15sec	53°C	2,5°C/sec		
20sec (AS-126)/ 10sec (AS-98)		72°C	4,8°C/sec			
Schmelzkurve	5sec	95°C	4,8°C/sec	1		
	1min	65°C	2,5°C/sec			
	fortlaufend	97°C	0,11°C/sec			
Teilprojekt 2	A30P, A53T	Initiale Denaturierung	9min	95°C	4,8°C/sec	1
		Amplifikation	10sec	95°C	4,8°C/sec	50
			15sec	60°C	2,5°C/sec	
10sec	72°C		4,8°C/sec			
Schmelzkurve	5sec	95°C	4,8°C/sec	1		
	1min	65°C	2,5°C/sec			
	fortlaufend	97°C	0,11°C/sec			

Tabelle 6: Primerpaare, die für die qPCR und die PCR benutzt wurden, ihre Sequenz, ihre Annealingtemperatur und der Hersteller. Forward Primer (fw), Reverse Primer (rv)

Projekt	Name	fw /rv	Produkt	Sequenz	Annealing	Hersteller
Teilprojekt 1	4/5U	Fw	AS-140	5'-CCAGTTGGG CAAGAATGAG -3'	55°C	Metabion international AG, Steinkirchen, Deutschland
	6L	Rv		5'- GAGCACTTGT ACAGGATGG -3'		
	2/4U	Fw	AS-126	5'- CTCTATGTAGTG GCTGAGAA -3'	53°C	
	6L	Rv		5'- GAGCACTTGTA CAGGATGG -3'		
	4/6U	Fw	AS-112	5'- GTTGGGCAAGG AAGGGTAT -3'	55°C	
	6L	Rv		5'- GAGCACTTGTA CAGGATGG -3'		
	2/4U	Fw	AS-98	5'- CTCTATGTAGT GGCTGAGAA -3'	53°C	
	4/6L	Rv		5'- ATACCCTTCCTT GCCCAAC -3'		
Teilprojekt 2	G88WT fw	Fw	A30P WT	5'- AAGGACTTTCAAA GGCCAAGG -3'	60°C	
	G88WT rv	Rv		5'- CACCCTCTTTTGT CTTTCCTGC -3'		
	G88WT fw	Fw	A30P Mut	5'- AAGGACTTTCAA AGGCCAAGG -3'	60°C	
	G88C rv	Rv		5'- CACCCTCTTTTG TCTTTCCTGG -3'		
	G209WT fw	Fw	A53T WT	5'- TATTCATGAAA GGACTTTCAAAGG -3'	60°C	
	G209WT rv	Rv		5'- GGTCTTCTCAG CCACTGTTGCT -3'		
	G209WT fw	Fw	A53T Mut	5'- TATTCATGAAA GGACTTTCAAAGG -3'	60°C	
	G209A rv	Rv		5'- GGTCTTCTCA GCCACTGTTGTT -3'		

3.4.6 Referenzgene

Die Referenzgene für die interne Normalisierung wurden für jedes Gewebe mit dem Programm geNorm (Vandesompele et al., 2002) ausgewählt. Dazu liefen zunächst zehn mögliche Referenzgene für jedes Gewebe mit dem für das Projekt etablierten Programm auf dem LC480 und wurden anschließend mit dem Programm geNorm nach dessen Protokoll analysiert. Für jedes Gewebe wurden die mindestens zwei stabilsten

Referenzgene ausgewählt und der geometrische Mittelwert aus den Crossingpoints der Referenzgene für die Auswertung gebildet. Die Referenzgene und ihre Verwendung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Referenzgene, ihre Anwendung für die Gewebearten und die Herstellerfirma bei beiden Teilprojekten. Im Teilprojekt 1 reichten für Blut und Hirn jeweils zwei Referenzgene. Im Teilprojekt 2 wurden für LZLs zwei, für Hirn, iPS-Zellen und mDA-Neuronen vier Referenzgene benötigt.

Projekt	Gen	Gewebeart	Firma
Teilprojekt 1	SDHA	Blut, Hirn	Quantitect, Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
	ACTB	Blut	
	HMBS	Hirn	
Teilprojekt 1	UBC	LZL, Hirn, iPS, mDA	
	HMBS	LZL, Hirn, iPS, mDA	
	ACTB	Hirn, iPS, mDA	
	HPRT1	Hirn, iPS, mDA	

3.4.7 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden mit der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977) auf dem ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Ambio, Austin, USA) durchgeführt. Für die Sequenzierungen wurde das BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerprotokoll benutzt. Das Programm für die Sequenzier-PCR ist in Tabelle 8 dargestellt und die genutzten Primer in

Tabelle 9. Der T7 Primer (Metabion international AG, Steinkirchen, Deutschland) wurde benutzt, um sicher zu stellen, dass eine korrekte und mutationsfreie Integration des Produktes in einen Vektor stattgefunden hat.

Tabelle 8: Programm für die Sequenzier-PCR

Ablauf	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	1min	1
Denaturierung	94°C	10sec	29
Primeranlagerung und Extension	60°C	4min	
Kühlen	12°C	∞	

Tabelle 9: Primer, die für die Sequenzierung benutzt wurden, ihre Sequenz sowie die Herstellerfirma

Name	Produkt	Sequenz	Firma
T7	Integration in pGEM®-T Easy Vektor	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'	Metabion international AG, Steinkirchen, Deutschland
G88WT fw	A30P	5'- AAGGACTTTCAAAGGCCAAGG -3'	
G88WT rv	A30P	5'- CACCCTCTTTGTCTTCCTGC -3'	
G88C rv	A30P	5'- CACCCTCTTTGTCTTCCTGG -3'	
G209WT fw	A53T	5'- TATTCATGAAAGGACTTTCAAAGG -3'	
G209WT rv	A53T	5'- GGTCTTCTCAGCCACTGTTGCT -3'	
G209A rv	A53T	5'- GGTCTTCTCAGCCACTGTTGTT -3'	

Alle Sequenzierungen wurden mit der frei erhältlichen Software Staden package ausgewertet.

3.4.7.1 Ethanolpräzipitation

Um PCR-Produkte für eine weiterführende Verwendung wie beispielsweise eine Sequenzierung, eine weitere PCR oder einen Verdau aufzureinigen, wurde die Methode der Ethanolpräzipitation benutzt. Zum PCR-Produkt wurde die 2,5fache Menge an 3M Natriumacetat (pH 5,2) gegeben um den pH-Wert zu senken, da die DNA bei niedrigerem pH in einen polaren Zustand übergeht und somit eine geringere Löslichkeit besitzt. Unter Zugabe von Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), welcher die Löslichkeit noch einmal weiter verringert, kann die DNA dann gefällt und gewaschen werden. Das Protokoll der Ethanolpräzipitation ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Protokoll der Ethanolpräzipitation. Nach jedem Zentrifugationsschritt wird die Flüssigkeit entfernt.

Zugabe	Menge	Zentrifugation
Natriumacetat 3M (pH 5,2)	2,5x PCR-Produkt	3220g / 45min
Ethanol 70%	100µl	3220g / 20min
Ethanol 70%	100µl	3220g / 20min
-	-	Umgedreht 600g / 1min
Nuclease freies Wasser	15µl	-

3.4.8 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden entweder mit JMP 11 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) oder mit IBM SPSS Statistics 25 (IBM Corp., Released 2017, IBMSPSS Statistics for Windows, Version 25.0, Armonk, NY, USA) oder mit R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Core Team, 2021, Wien, Österreich) durchgeführt.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit in Kapitel 4.1 wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SF) dargestellt, in Kapitel 4.2 als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SA).

Folgende statistische Tests wurden durchgeführt:

- Wilcoxon-Rangsummentest oder Mann-Whitney-U Test
- Multiple Regressionsanalyse
- Kruskal-Wallis Test
- Lineare Regressionsanalyse
- t-Test

Für die Analyse zweier unabhängigen, nicht normalverteilten Gruppen wurde der Wilcoxon Rangsummentest oder der Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

Für die statistische Analyse zweier unabhängiger Stichproben und einer abhängigen Variablen, bei welchen für diese Variable (zum Beispiel das Alter) korrigiert werden musste, wurde eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt.

Für die Analyse des Einflusses des Genotyps des SNPs rs356219 auf die Expressionslevel der Isoformen und der Analyse der Expression aller Isoformen innerhalb der Hirnregionen wurde der Kruskal-Wallis Test angewandt, da es sich hier um einen Vergleich von mehr als zwei unverbundenen, nicht normalverteilten Wertegruppen handelt. Bei Werten knapp über einem p-Wert von 0,05 wurden Teilergebnisse zusätzlich mit einem Mann-Whitney-U Test überprüft.

Für die Analyse des Einflusses der einzelnen Allele des SNPs rs356219 auf die Expressionslevel der Isoformen wurde wieder der Gruppenvergleich mittels Mann-Whitney U Test oder der Wilcoxon-Rangsummentest angewandt, da es sich hier um zwei unabhängige, nicht normalverteilte Gruppen handelt.

Für die Analyse einer unabhängigen, einflussbaren und einer abhängigen Variablen wurde die lineare Regression angewandt.

Zur statistischen Analyse zweier sich nicht beeinflussender Stichproben wurde ein einseitiger oder zweiseitiger t-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Für die Analyse der Fibroblasten, iPS-Zellen und mDA-Neuronen wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt, da es sich hier um abhängige Gruppen handelt.

Bei allen Testarten wurden p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant bewertet. Die genaue Differenzierung erfolgte zwischen $*p<0,05$, $**p<0,01$ und $***p<0,001$.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse von beiden Teilprojekten dargestellt.

4.1 Teilprojekt 1

Im Teilprojekt 1 wurde die relative Expression der drei alternativ gesplitten Isoformen von *SNCA* und des Gesamttranskripts und der Einfluss des SNPs rs356219 auf diese Expression untersucht. Dazu wurde die RNA aus Blut und aus vier verschiedenen Hirnarealen von PD-Patienten und Kontrollen mittels quantitativer PCR analysiert.

4.1.1 Relative Expression der Isoformen von *SNCA* in Blut

Für die weiteren Analysen wurde zunächst getestet, ob sich die demografischen Daten zwischen Patienten und Kontrollen signifikant unterscheiden, da dies dann in bestimmten weiteren Auswertungen korrigiert werden muss. Deshalb wurde mittels des Wilcoxon Rangsummentests auf signifikante Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung getestet. Weiterhin wurde getestet, ob sich das Alter bei Kontrollen und PD-Patienten signifikant unterscheidet. Da das Alter bei Patienten und Kontrollen signifikant unterschiedlich war, musste bei manchen statistischen Berechnungen für das Alter korrigiert werden.

Zusätzlich wurden klinische Parameter der Patienten zusammengetragen und das Alter bei Beginn der Krankheit dokumentiert. Des Weiteren wurden alle PD-Patienten zur Dokumentation der motorischen Schwere der Erkrankung bei der Blutabnahme nach H&Y beurteilt. Außerdem hatten alle Patienten zum Abnahmezeitpunkt einen MMST zur Beurteilung ihrer kognitiven Fähigkeiten absolviert. Die Erkrankungsdauer konnte durch die Berechnung Alter - Erkrankungsalter ermittelt werden. Durch Korrelation der Werte der H&Y Skala oder die des MMST mit der Erkrankungsdauer konnte das Fortschreiten der motorischen und kognitiven Problematik pro Jahr ermittelt werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Demografische und klinische Daten aller Blutproben. Das Alter unterschied sich signifikant zwischen IPS-Patienten und Kontrollen. (* $p \leq 0,05$, Wilcoxon-Rangsummentest)

	IPS	Kontrollen	p-Wert
Probanden	55	61	0,58
Geschlecht w/m (%)	45,45 / 54,55	45,9 / 54,1	0,54
Mittelwert Alter (Jahre)	69	64	0,0453*
Bereich (Jahre)	47-83	27-78	
Mittelwert Beginn der PK (Jahre)	63		
Bereich (Jahre)	35-76		
Mittelwert Beginn der Demenz (Jahre)	74-76		
Bereich (Jahre)	75		
Anzahl Demenzkranker	5		
Progression motorischer Problematik (pro Jahr)	0,6		
Bereich (pro Jahr)	0,2-2		
Progression kognitiver Problematik (pro Jahr)	0,5		
Bereich (pro Jahr)	0-2,2		

Für die Analyse wurde zunächst die relative Expression aller Isoformen im Blut bestimmt. Dann wurde mittels einer multiplen Regressionsanalyse, in welchem für das Alter korrigiert wurde ermittelt, ob sich die Expressionen aller Isoformen zwischen Patienten und Kontrollen signifikant unterscheiden. Bei AS-140 und AS-126 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt werden. Für AS-112 und AS-98 wurden ähnliche Expressionslevel zwischen Patienten und Kontrollen ermittelt. Alle p – Werte sind in Tabelle 12 dargestellt.

Es kristallisierte sich ein Expressionsmuster für alle Isoformen heraus, das sich auch in folgenden Analysen als nahezu konstant herausstellte. Dabei wird die AS-140 am

höchsten exprimiert, gefolgt von der AS-126 und der AS-98. Am niedrigsten war die Expression bei der AS-112 (Abbildung 12).

Tabelle 12: Vergleich der relativen Expressionslevel der vier Isoformen zwischen Patienten und Kontrollen. Die Expression der AS-140 und AS-126 war bei den Patienten (IPS) signifikant niedriger als bei den Kontrollen. (IPS: n=55, Kontrollen: n=61, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, multiple Regressionsanalyse mit Korrektur für das Alter) Mittelwert = MW, SF = Standardfehler.

Isoform		IPS	Kontrollen	p-Werte
AS-140	MW	0,399797	0,640689	0,008**
	SF	0,06230342	0,05903918	
AS-126	MW	0,196622	0,318061	0,006**
	SF	0,03198223	0,03030659	
AS-112	MW	0,019290	0,020045	0,7324
	SF	0,00176270	0,00167035	
AS-98	MW	0,045816	0,049148	0,6712
	SF	0,00596735	0,00565470	

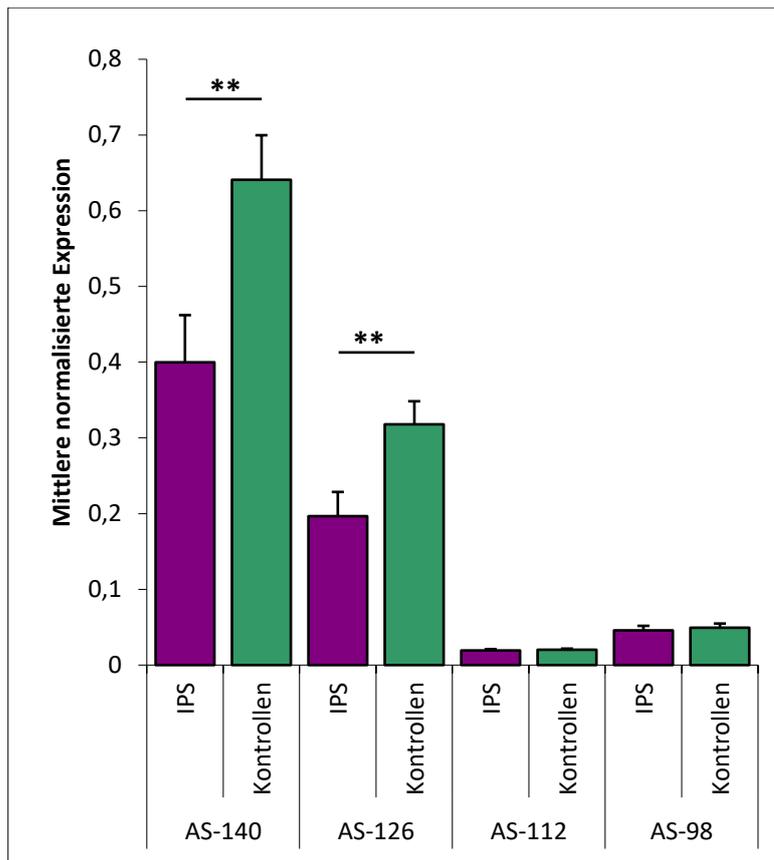


Abbildung 12: Vergleich der mittleren normalisierten Expression aller Isoformen von *SNCA* zwischen Kontrollen und PD-Patienten. IPS Patienten zeigen eine signifikant geringere Expression von AS-140 und AS-126. Die Werte stellen den MW + SF dar. Die mittlere normalisierte Expression ergibt sich aus der Delta-CT-Methode: $\text{Effizienz}^{-(\text{Crossingpoint (Gen)} - \text{Crossingpoint (geometrischer Mittelwert der Referenzgene)})}$. (IPS: n=55, Kontrollen: n=61, ** $p \leq 0,01$, multiple Regressionsanalyse mit Korrektur für das Alter)

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Genotyps des SNPs rs356219 auf die Expressionslevel der Isoformen im Blut untersucht. Dafür wurden die Proben von Patienten und Kontrollen für den SNP genotypisiert und dann die Expressionen der verschiedenen Genotypen für jede Isoform miteinander verglichen. In Kontrollen konnte kein signifikanter Einfluss eines Genotyps auf die Expression einer Isoform festgestellt werden (Abbildung 13 A). In IPS-Patienten wurde eine signifikant höhere Expression der Patienten mit CC Genotyp, welcher der Risikogenotyp ist, bei AS-98 ermittelt (Abbildung 13 B).

Anschließend wurde noch der Einfluss der Allele C (risiko) und T (protektiv) auf die Expression ermittelt. Dafür wurden Proben mit heterozygotem Genotyp (CT) einzeln,

Proben mit homozygotem Genotyp (CC oder TT) doppelt in die Berechnung einbezogen. Die Analyse für die Allele C und T wurden jeweils getrennt voneinander durchgeführt. Weder für das Risikoallel C noch für das protektive Allel T konnte ein signifikanter Einfluss auf die Expression von einer Isoform ausgemacht werden (Abbildung 14 A, B).

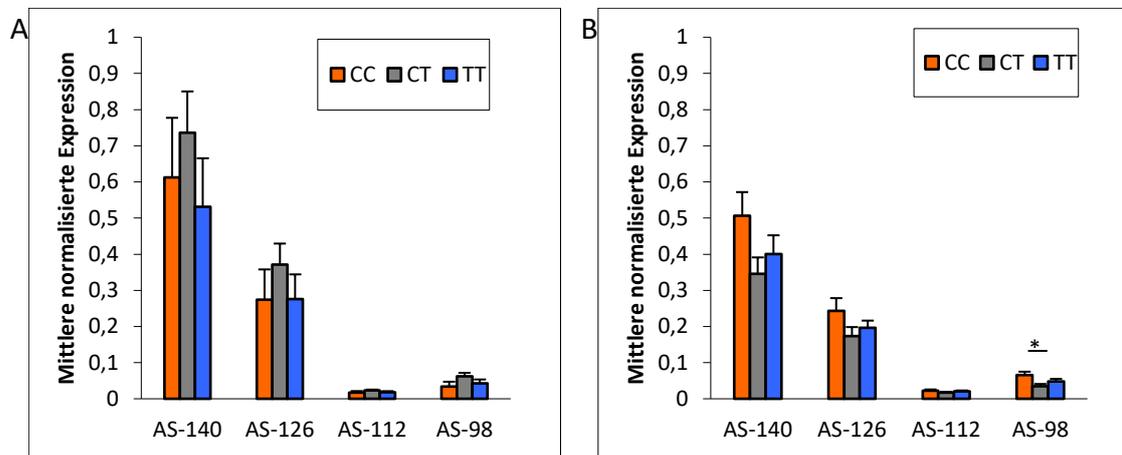


Abbildung 13: Korrelation der Expressionslevel der Isoformen mit den Genotypen des SNPs rs356219 in Kontrollen (A) und IPS Patienten (B). In Kontrollen hatte kein Genotyp des rs356219 einen signifikanten Einfluss auf die Expression einer Isoform. In IPS Patienten war der Risikogenotyp CC bei der Isoform AS-98 signifikant höher exprimiert als der heterozygote Genotyp CT. Die Werte stellen den MW + SF dar. A (CC: n=14, CT: n=27, TT: n=20, Kruskal-Wallis Test); B (CC: n=12, CT: n=24, TT: n=19, * $p \leq 0,05$, Kuskal-Wallis Test gefolgt von Mann-Whitney-U Test für (B) AS-98)

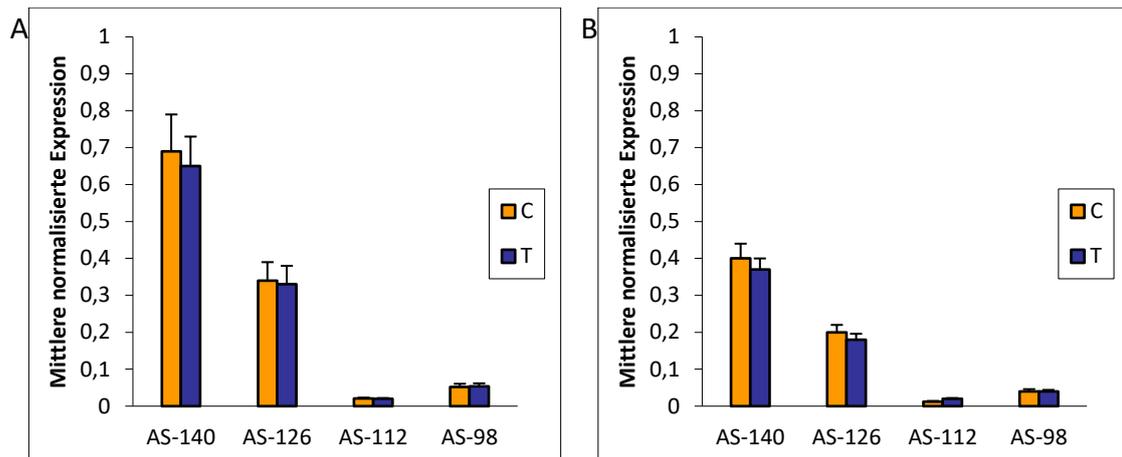


Abbildung 14: Allelspezifische Auswertung und Korrelation dieser mit der Expression der Isoformen in Kontrollen (A) und IPS Patienten (B). Weder in IPS Patienten noch Kontrollen hatte ein Allel des rs356219 einen signifikanten Einfluss auf die Expression einer Isoform. Die Werte stellen den MW + SF dar. C = Risikogenotyp, T = protektiver Genotyp. A (C: n=41, T: n=73); B (C: n=36, T: n=42), Mann-Whitney-U Test)

4.1.2 Einfluss der Isoformen auf klinische Parameter

Der Einfluss aller Isoformen auf einige klinische Parameter im Blut in IPS Patienten wurde ermittelt, um Informationen über die Progression der Krankheit in Bezug auf die Expression der Isoformen zu bekommen. Eine höhere Expression einer bestimmten Isoform könnte einen positiven oder negativen Einfluss auf das Erkrankungsalter, motorische oder kognitive Parameter haben. Dies wiederum könnte in Zukunft als molekularer Biomarker, um eine Aussage über den Verlauf der PK machen zu können, in der Klinik von Nutzen sein. Weiterhin könnte die Vorhersage der Progression einer PK in früheren Stadien erleichtert werden. Neben der relativen Expression der Isoformen wurde auch jeweils der prozentuale Anteil der Isoformen an der Gesamtexpression von SNCA ermittelt. Alle Berechnungen erfolgten mit einer linearen Regressionsanalyse.

Weder die relative Expression noch der prozentuale Anteil einer Isoform hat einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter (Abbildung 15, Abbildung 16). Gäbe es hier eine signifikante Abhängigkeit, könnte bei Kenntnis des Erkrankungsalters eine Aussage darüber gemacht werden, wie sich die Expression der Isoformen mit zunehmendem Alter verändert. Das Modell beschreibt lediglich eine Tendenz. Bei einem

höheren Erkrankungsalter werden die Isoformen AS-140 und AS-126 etwas mehr exprimiert. Allerdings gibt es große individuelle Unterschiede. Zwei Patienten mit sehr jungem Erkrankungsalter (35 und 40 Jahre) wurden für eine bessere Darstellbarkeit der Regressionsanalyse bei dieser Auswertung exkludiert. Alle Werte der statistischen Analyse werden noch einmal in Tabelle 13 zusammengefasst.

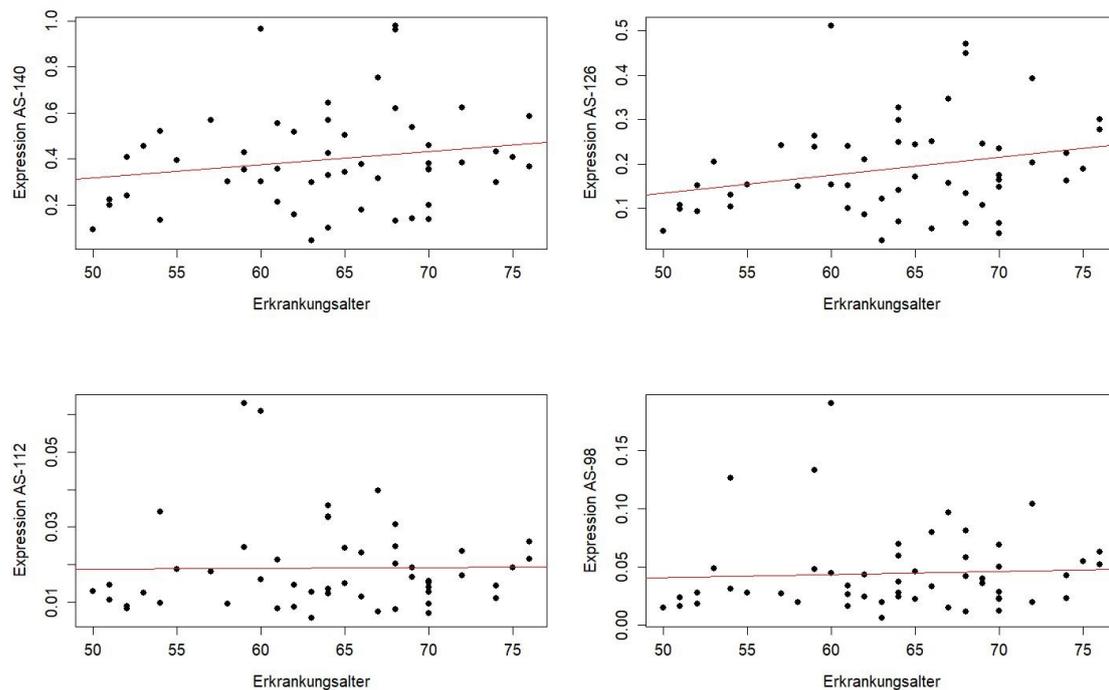


Abbildung 15: Korrelation der relativen Expression der Isoformen mit dem Erkrankungsalter. A Die Isoform AS-140 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. B Die Isoform AS-126 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. C Die Isoform AS-112 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. D Die Isoform AS-98 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. (n=53, lineare Regressionsanalyse, Steigungskoeffizienten: A 0,00571, B 0,00403, C 0,00020, D 0,00286)

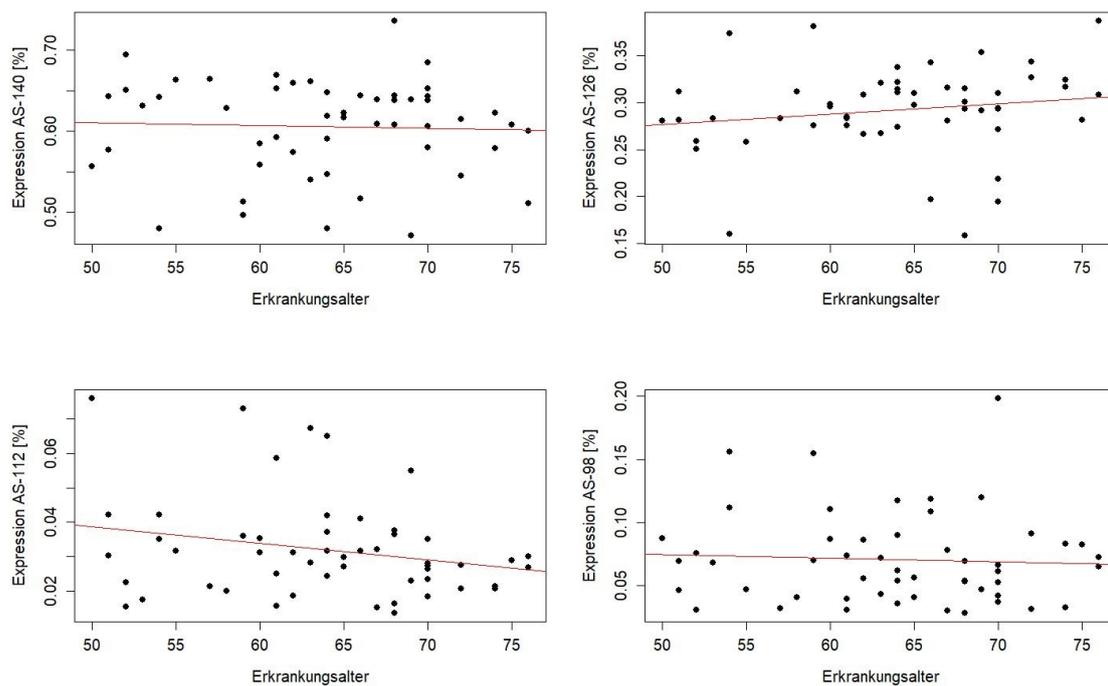


Abbildung 16: Korrelation des prozentualen Anteils der Isoformen mit dem Erkrankungsalter. A Der prozentuale Anteil der Isoform AS-140 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. B Der prozentuale Anteil der Isoform AS-126 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. C Der prozentuale Anteil der Isoform AS-112 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. D Der prozentuale Anteil der Isoform AS-98 korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. (n=53, lineare Regressionsanalyse, Steigungskoeffizienten: A $-0,00034$, B $0,00111$, C $-0,00048$, D $-0,00029$)

In der Tabelle 13 sind die statistischen Auswertungen für alle Korrelationen mit dem Erkrankungsalter dargestellt. Der Steigungskoeffizient, welcher mit dem dazugehörigen p-Wert die Abhängigkeit der Expression der Isoformen vom Erkrankungsalter beschreibt, ist bei allen Korrelationen niedrig. Dies zeigt, dass entweder keine oder nur eine geringe Abhängigkeit zwischen diesen Parametern besteht. Die niedrigen R-Quadrat-Werte verdeutlichen weiterhin, dass es große individuelle Unterschiede in der Expression der Isoformen zum Zeitpunkt des Erkrankungsalters gibt.

Tabelle 13: Alle Werte der statistischen Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse für die Korrelation der Isoformen mit dem Erkrankungsalter

	Steigungs- koeffizient	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	R-Quadrat
Erkrankungsalter / Expression AS-140	0,00571	0,00425	1,34269	0,1854	0,03480
Erkrankungsalter / Expression AS-126	0,00403	0,00213	1,89591	0,0638	0,06707
Erkrankungsalter / Expression AS-112	0,00002	0,00024	0,09982	0,9209	0,00020
Erkrankungsalter / Expression AS-98	0,00027	0,00070	0,37876	0,7065	0,00286
Erkrankungsalter / Expression AS-140 [%]	-0,00034	0,00118	-0,2838	0,7777	0,00161
Erkrankungsalter / Expression AS-126 [%]	0,00111	0,00092	1,20748	0,2329	0,02833
Erkrankungsalter / Expression AS-112 [%]	-0,00048	0,00029	-1,6888	0,0975	0,05396
Erkrankungsalter / Expression AS-98 [%]	-0,00029	0,00072	-0,4083	0,6848	0,00332

Die motorische Progression eines Patienten ist abhängig von der Erkrankungsdauer und dem H&Y Score ($H\&Y / \text{Erkrankungsdauer} = \text{Motorische Progression}$). Das bedeutet, dass ein höherer Wert für die motorische Progression für ein schnelleres Fortschreiten der motorischen Problematik bei der PK steht.

Da die motorische Progression sehr schief verteilt ist, wurden sie für die statistische Auswertung mittels linearer Regression logarithmiert. Die relative Expression der Isoformen (Abbildung 17) korreliert nicht mit der motorischen Progression. Allerdings ist der prozentuale Anteil der Isoform AS-126 am Gesamtanteil aller Isoformen signifikant höher, je langsamer die motorische Problematik fortschreitet (Abbildung 18 B). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die AS-126 weniger toxische Eigenschaften aufweist.

Auch bei der AS-140 ist ein leichter Trend erkennbar. Der prozentuale Anteil dieser Isoform steigt an, je schneller die motorischen Probleme zunehmen (Abbildung 18 A). Der Anteil der kleineren Isoformen AS-112 und AS-98 scheinen keine Rolle bei der motorischen Progression zu spielen (Abbildung 18 C – D).

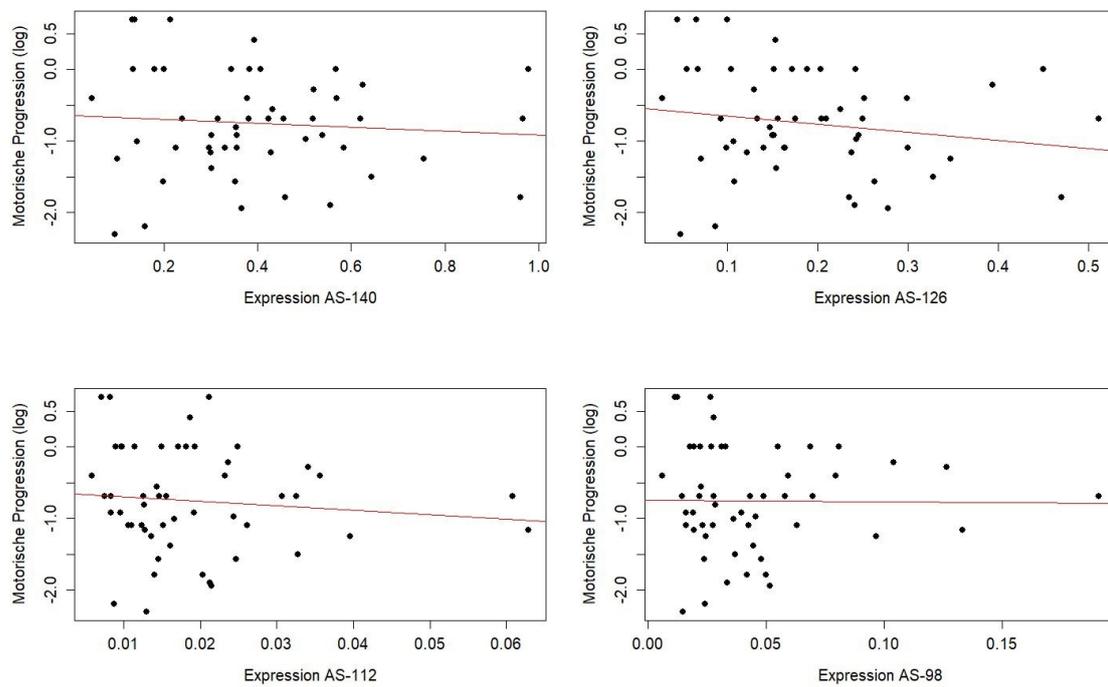


Abbildung 17: Korrelation der relativen Expression der Isoformen mit der motorischen Progression pro Jahr. A - D Die relative Expression der Isoformen AS-140, AS-126, AS-112 und AS-98 korreliert nicht mit der motorischen Progression pro Jahr. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. (n=55, lineare Regressionsanalyse, Steigungskoeffizienten: A 0,27517, B -1,12619, C -6,28206, D -0,22013)

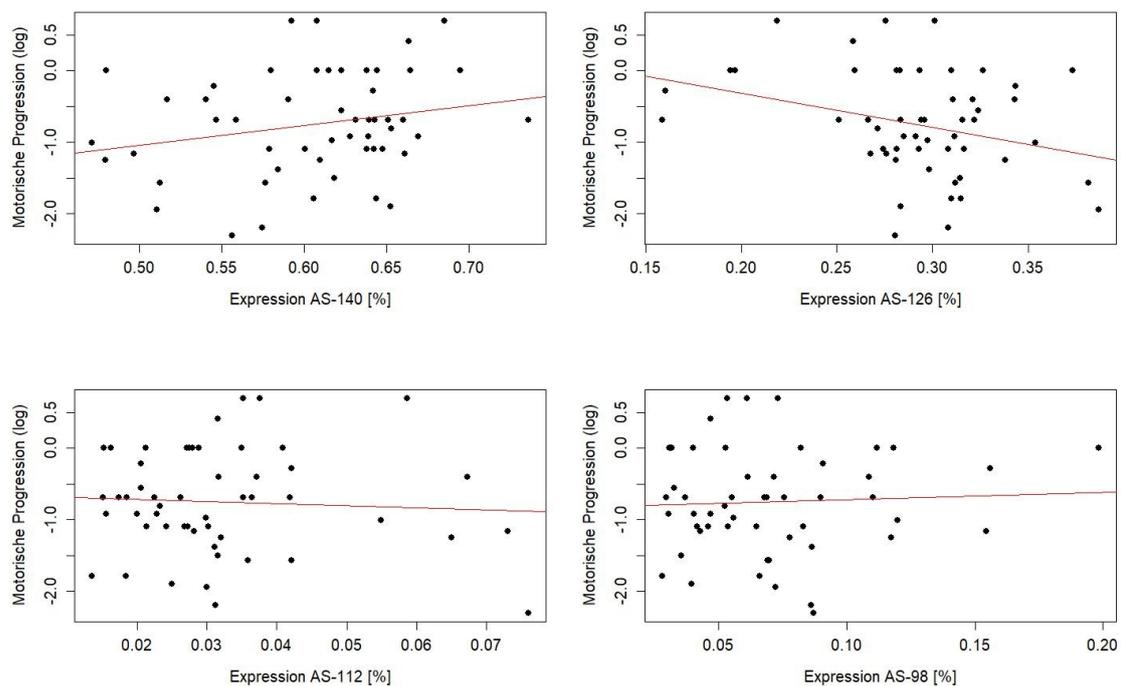


Abbildung 18: Korrelation des prozentualen Anteils der Isoformen mit der motorischen Progression pro Jahr. A Es ist ein leichter Trend erkennbar. Der prozentuale Anteil der Isoform AS-140 steigt tendenziell mit zunehmender Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten. **B** Der prozentuale Anteil der Isoform AS-126 ist signifikant höher ($*p \leq 0,05$), je langsamer die motorischen Probleme zunehmen (siehe Tabelle 14). **C –D** Der prozentuale Anteil der Isoformen AS-112 und AS-98 korreliert nicht mit der motorischen Progression. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. ($n=55$, lineare Regressionsanalyse, Steigungskoeffizienten: A 2,76955, B -4,78159, C -2,94070, D 1,03068)

In der Tabelle 14 sind die statistischen Auswertungen für alle Korrelationen mit der motorischen Progression dargestellt. Der prozentuale Anteil der Isoform 126 korreliert signifikant mit der motorischen Progression. Die niedrigen R-Quadrat-Werte zeigen allerdings auch, dass es große individuelle Unterschiede in der Expression der Isoformen und dem prozentualen Anteil der Isoformen bei der motorischen Progression gibt.

Tabelle 14: Alle Werte der statistischen Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse für die Korrelation der Isoformen mit der motorischen Progression. Der prozentuale Anteil der AS-126 korreliert signifikant mit der motorischen Progression pro Jahr.

	Steigungs- koeffizient	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	R-Quadrat
Motorische Progression / Expression AS-140	-0,27517	0,47626	-0,5778	0,566	0,00663
Motorische Progression / Expression AS-126	-1,12619	0,92558	-1,2167	0,2294	0,02876
Motorische Progression / Expression AS-112	-6,28206	8,64045	-0,7271	0,4706	0,01046
Motorische Progression / Expression AS-98	-0,22013	2,94867	-0,0747	0,9408	0,00011
Motorische Progression / Expression AS-140 [%]	2,76955	1,70021	1,62895	0,1096	0,05040
Motorische Progression / Expression AS-126 [%]	-4,78159	2,10710	-2,2693	0,0276 *	0,09338
Motorische Progression / Expression AS-112 [%]	-2,94070	7,03911	-0,4178	0,6779	0,00348
Motorische Progression / Expression AS-98 [%]	1,03068	2,85928	0,36047	0,72	0,00259

Die kognitive Progression eines Patienten ist abhängig von der Erkrankungsdauer und kann mit dem MMST Test bewertet werden ($30 - \text{MMST} / \text{Erkrankungsdauer} = \text{Kognitive Progression}$). Die höchste Punktzahl im MMST Test ist 30, welche zeigt, dass der Patient noch die volle kognitive Leistung erbringen kann. Ein niedriger Wert für die kognitive Progression sagt also aus, dass die kognitiven Fähigkeiten über die Erkrankungszeit länger erhalten bleiben. Die relativen Expressionen der Isoformen (Abbildung 19), sowie die prozentualen Anteile der Isoformen (Abbildung 20) korrelieren nicht mit der kognitiven Progression pro Jahr.

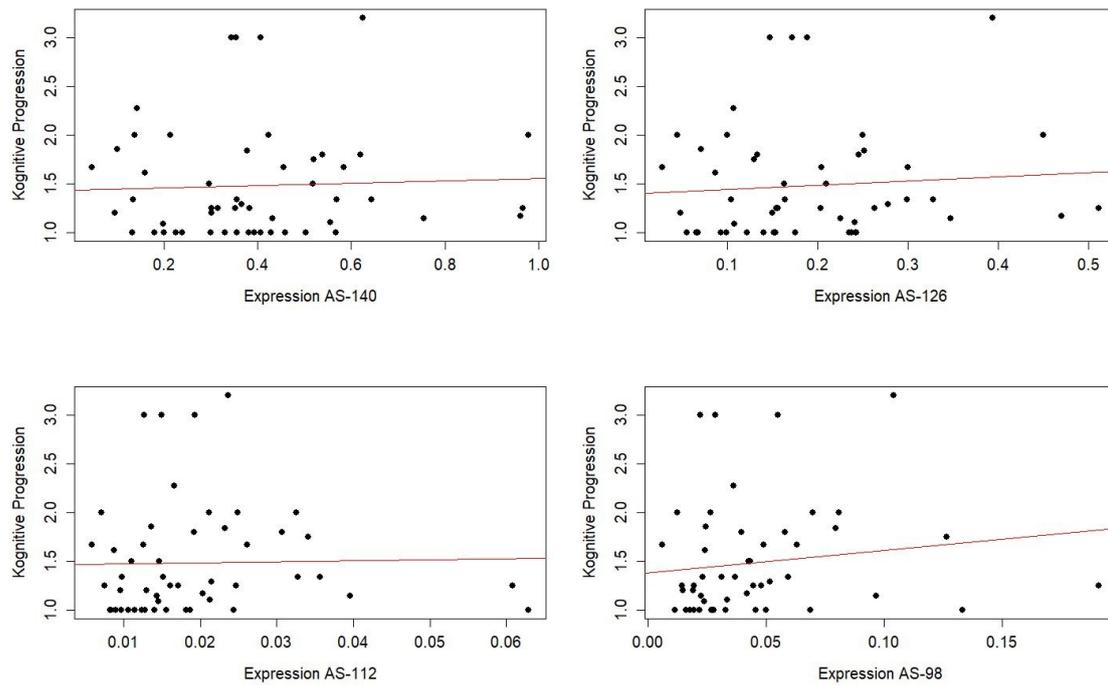


Abbildung 19: Korrelation der relativen Expression der Isoformen mit der kognitiven Progression pro Jahr. A - D Die relative Expression der Isoformen AS-140, AS-126, AS-112 und AS-98 korreliert nicht mit der kognitiven Progression pro Jahr. Die Punkte stellen jeden Patienten dar. (n=55, lineare Regressionsanalyse, Steigungskoeffizienten: A 0,11388, B 0,43679, C 1,11472, D 2,29182)

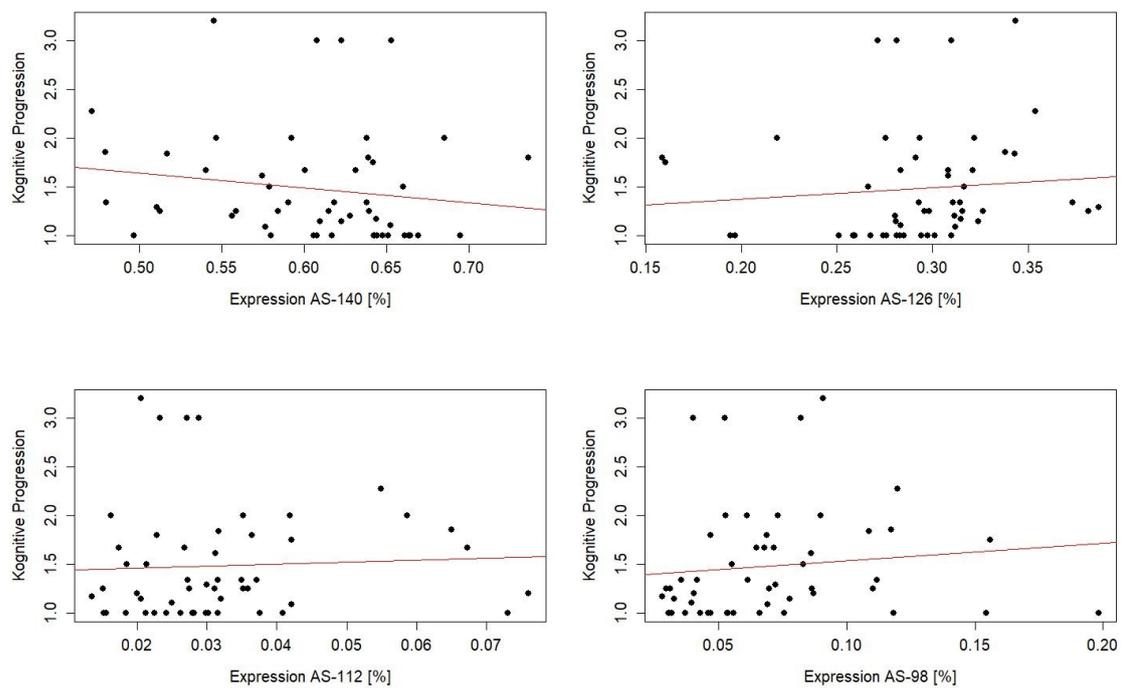


Abbildung 20: Korrelation des prozentualen Anteils der Isoformen mit der kognitiven Progression pro Jahr. A –D Der prozentuale Anteil der Isoformen korreliert nicht mit der kognitiven Progression. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. (n=55, lineare Regressionsanalyse, Steigungskoeffizienten: A -1,52116, B 1,15585, C 2,02790, D 1,82702)

In Tabelle 15 sind die statistischen Auswertungen für alle Korrelationen mit der kognitiven Progression dargestellt. Die niedrigen Steigungskoeffizienten und die hohen Standardabweichungen, sowie die niedrigen R-Quadrat-Werte zeigen, dass es große individuelle Unterschiede in der Expression der Isoformen während der kognitiven Progression gibt.

Tabelle 15: Alle Werte der statistischen Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse für die Korrelation der Isoformen mit der kognitiven Progression.

	Steigungs- koeffizient	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	R-Quadrat
Motorische Progression / Expression AS-140	0,11388	0,37798	0,30128	0,7645	0,00181
Motorische Progression / Expression AS-126	0,43679	0,74101	0,58946	0,5582	0,00690
Motorische Progression / Expression AS-112	1,11472	6,87519	0,16214	0,8719	0,00053
Motorische Progression / Expression AS-98	2,29182	2,31208	0,99124	0,3263	0,01927
Motorische Progression / Expression AS-140 [%]	-1,52116	1,36451	-1,1148	0,2703	0,02425
Motorische Progression / Expression AS-126 [%]	1,15585	1,74442	0,66260	0,5106	0,00870
Motorische Progression / Expression AS-112 [%]	2,02790	5,57545	0,36372	0,7176	0,00264
Motorische Progression / Expression AS-98 [%]	1,82702	2,25195	0,81130	0,421	0,01299

4.1.3 Relative Expression der Isoformen von *SNCA* in Hirngewebe

Für die Studie an Hirngewebe wurden post-mortem Proben von vier verschiedene Hirnarealen, die bereits im Jahr 2005 von Frau Dr. Julia Fuchs für eine vorhergehende Studie (Fuchs et al., 2008) von unterschiedlichen Hirnbanken angefordert wurden, benutzt. Die Hirnareale, die sowohl von IPS-Patienten als auch von Kontrollen stammten, waren Gyrus cinguli (GC), Cerebellum (CE), Medulla oblongata (MO) und Substantia nigra (SN). Die Anzahl der Proben variierte zwischen den einzelnen Hirnarealen (Tabelle 16). Da ausschließlich der Einfluss des Genotyps des SNPs rs356219 auf die Expression der Isoformen studiert werden sollte, wurden Proben von Patienten und Kontrollen nicht getrennt.

Tabelle 16: Anzahl der Proben je Genotyp des SNPs rs356219 pro Hirnregion.

Hirnregion	Anzahl der Proben mit CC	Anzahl der Proben mit CT	Anzahl der Proben mit TT	Gesamt
GC	9	14	10	33
CE	9	18	13	40
MO	8	17	11	36
SN	3	9	8	20

Wie bereits bei den Analysen der Blutproben erläutert, wurde wieder zunächst getestet, ob sich Alter und Geschlecht der Proben der Hirnregionen signifikant unterschied. Weiterhin wurde getestet, ob sich die Anzahl der Proben und das Post-mortem-Intervall (PMI) zwischen den einzelnen Hirnarealen signifikant unterschieden. Die Analysen erfolgten gleich wie für die Blutproben. Alle demographischen und klinischen Daten sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Demografische und klinische Daten aller Hirnproben. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. (Wilcoxon-Rangsummentest).

	GC	CE	MO	SN	p-Wert
Geschlecht w/m	12/21	14/26	14/22	8/12	0,9770
PMI (MW in Stunden) Bereich (Jahre)	17,6 3,5-48	20 3,5-72	20,2 3,5-72	26,7 7-72	0,1532
Diagnose K/IPS	18/15	23/17	20/16	14/6	0,6970
Alter (MW in Jahre) Bereich (Jahre)	71,6 44-96	71,6 42-100	70,7 42-96	73,6 53-100	0,9554

Zunächst wurden wieder die relative Expressionslevel der vier Isoformen in allen vier Hirnregionen bestimmt (Abbildung 21). In der Region GC wurden AS-140 und AS-126 signifikant am höchsten exprimiert. Auch im CE konnte eine signifikant höhere Expression von AS-140, verglichen mit MO und SN, festgestellt werden. Bei MO wurde AS-112 signifikant am niedrigsten, verglichen mit allen anderen Hirnregionen, exprimiert. Die Expression von AS-98 war bei SN signifikant am höchsten. Die Analyse wurde mit dem Kruskal-Wallis Test durchgeführt, da es sich hier um einen Vergleich von mehr als zwei unverbundenen, nicht normalverteilten Wertegruppen handelt. Bei Werten knapp über einem p-Wert von 0,05 wurden Teilergebnisse zusätzlich mit einem Mann-Whitney-U Test überprüft. Die p-Werte sind in Tabelle 18 aufgeführt.

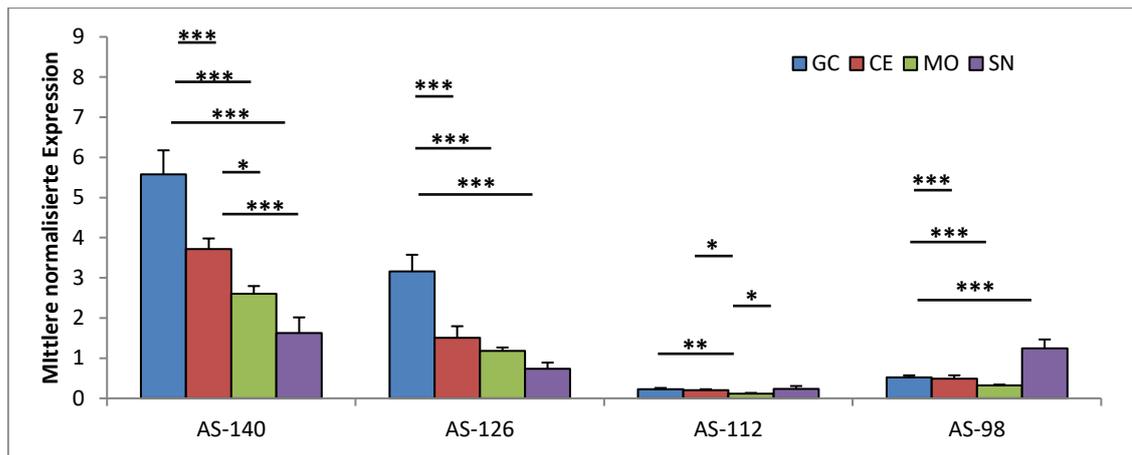


Abbildung 21: Relative Expressionen der Isoformen in allen Hirnarealen. Fehlerbalken repräsentieren den SF. (GC: n=33, CE: n=40, MO: n=36, SN: n=20, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$, Kruskal-Wallis Test gefolgt von Mann-Whitney-U Test)**

Das Expressionsmuster der Isoformen, welches sich bereits in der Studie mit Blutproben herauskristallisiert hatte, war in allen Hirnarealen, außer im Hirnareal SN, konstant vorhanden. Die AS-140 war am höchsten exprimiert, gefolgt von AS-126 und AS-98. Die Expression von AS-112 war am niedrigsten. In der SN dagegen folgte auf die AS-140, welche am höchsten exprimiert wurde, die AS-98. Am dritthöchsten wurde die AS-126 und am niedrigsten die AS-112 exprimiert.

Tabelle 18: P-Werte des Vergleichs der relativen Expressionen zwischen den vier Hirnarealen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis Test gefolgt von Mann-Whitney-U Test.

AS-140	CE	MO	SN	AS-126	CE	MO	SN
GC	0,0004***	>0,0001***	>0,0001***	GC	>0,0001***	>0,0001***	>0,0001***
CE		0,0248*	0,0006***	CE		0,3656	0,1142
MO			0,1094	MO			0,4104

AS-112	CE	MO	SN	AS-98	CE	MO	SN
GC	0,4408	0,0029**	0,7546	GC	0,7011	0,0778	>0,0001***
CE		0,0177*	0,7439	CE		0,1429	>0,0001***
MO			0,0251*	MO			>0,0001***

Im nächsten Schritt wurden wieder die Expressionslevel der Isoformen mit den Genotypen von rs356219 korreliert. Im Hirnareal GC konnte kein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke der Isoformen und eines Genotyps von rs356219 festgestellt werden (Abbildung 22 A).

Im Cerebellum konnte ein signifikanter Einfluss des Risikogenotyps CC auf die Expression der AS-140 gefunden werden (Abbildung 22 B). Die Expression von AS-140 in Proben mit dem Risikogenotyp CC war signifikant niedriger als bei Proben mit dem heterozygoten Genotyp CT. Dies soll, insbesondere im Hinblick auf die unterschiedlichen Stichproben bei CC (n = 9) und CT (n = 18), durch die Analyse des allelspezifischen Einflusses, noch einmal genauer betrachtet werden.

In MO konnte kein Einfluss des SNPs auf die Expression einer Isoform ermittelt werden (Abbildung 22 C).

In SN konnte ein signifikanter Unterschied des heterozygoten Genotyps CT und des protektiven Genotyps TT bei AS-140 festgestellt werden (Abbildung 22 D). Die Expression der AS-140 war beim heterozygoten Genotyp CT signifikant höher als beim protektiven Genotyp TT. Auch dies soll noch einmal genauer mittels der allelspezifischen Auswertung betrachtet werden.

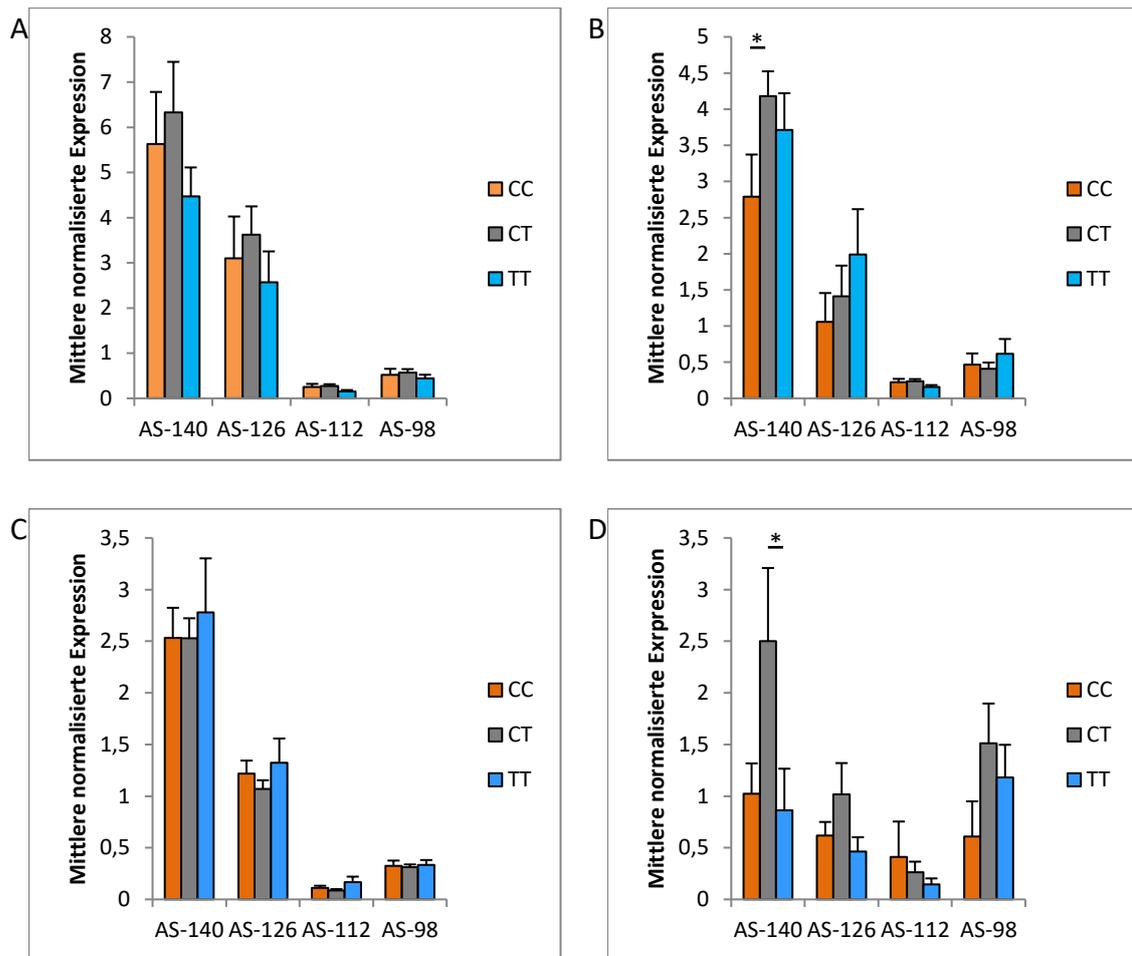


Abbildung 22: Korrelation der Expressionslevel der Isoformen mit den Genotypen des SNPS rs356219 in (A) GC, (B) CE, (C) MO und (D) SN. CC Risikogenotyp, CT heterozygoter Genotyp, TT protektiver Genotyp. Fehlerbalken repräsentieren den SF. (GC: n=33 (CC: n=9, CT: n=14, TT: n=10), CE: n=40 (CC: n=9, CT: n=18, TT: n=13), MO: n=36 (CC: n=8, CT: n=17, TT: n=11), SN: n=20 (CC: n=3, CT: n=9, TT: n=8), * $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis Test gefolgt von Mann-Whitney-U Test für (B) und (D) AS-140)

Anschließend wurde wieder der Einfluss der Allele C (risiko) und T (protektiv) auf die Expression für jedes Hirnareal ermittelt. Weder für das Risikoallel C noch für das protektive Allel T konnte ein signifikanter Einfluss auf die Expression von einer Isoform ausgemacht werden (Abbildung 23). Dies zeigt, dass die signifikanten Ergebnisse in der Genotyp-spezifischen Auswertung nicht auf die einzelnen Allele zurückzuführen sind.

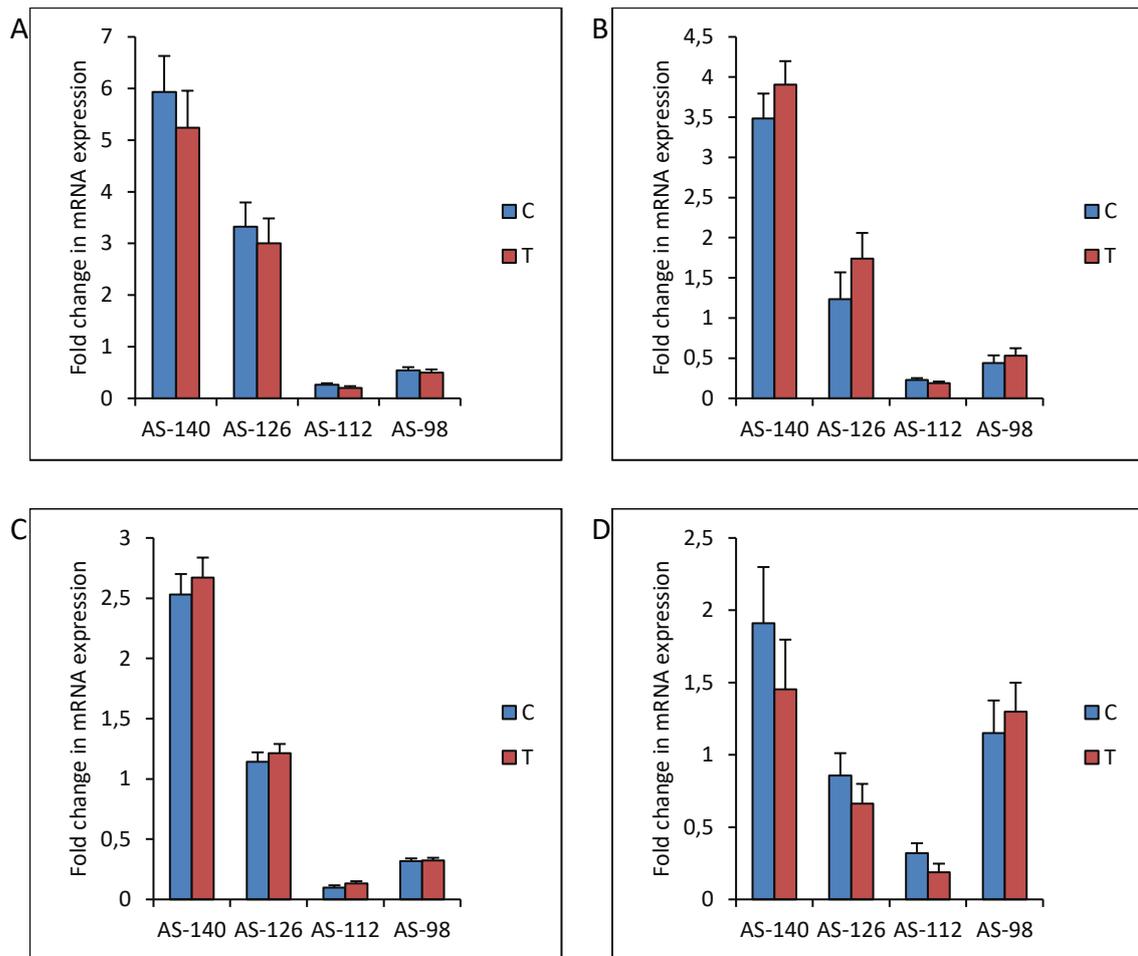


Abbildung 23: Allelspezifische Auswertung und Korrelation dessen mit der Expression der Isoformen in (A) GC, (B) CE, (C) MO und (D) SN.. Fehlerbalken repräsentieren den SF. C = Risikoallel, T = protektives Allel. (GC: n=33 (C: n=23, T: n=24), CE: n=40 (C: n=27, T: n=31), MO: n=36 (C: n=25, T: n=28), SN: n=20 (C: n=12, T: n=17), Mann-Whitney-U Test)

4.2 Teilprojekt 2

Im Teilprojekt 2 wurde die allelspezifische Expression von A30P und A53T Mutationsträgern untersucht. Dazu wurden verschiedene Gewebeproben von Mutationsträgern und Kontrollen mittels qPCR, RFLP Analyse und Massenspektrometrie analysiert.

4.2.1 Allelspezifische Expression von *SNCA* in Lymphoblasten

Es wurden Lymphoblastenzelllinien (LZL) von den Mitgliedern der A30P Familie und einem zusätzlichen A53T Mutationsträger für diesen Teil der Studie generiert. Da es durch frühere Studien kontroverse Diskussionen darüber gab inwiefern das mutierte Allel in Mutationsträgern exprimiert wird, war es das Ziel dieser Teilstudie festzustellen, ob und wie stark das mutierte Allel in den LZL exprimiert wird.

Außerdem wurden von je einem A30P und einem A53T Mutationsträger untransfizierte Lymphozyten gemessen, um heraus zu finden, ob es eine Veränderung in der Expression durch die EBV-Transfektion und die anschließende Kultivierung der LZL gibt.

In den Abbildung 24 A - C sind die Ergebnisse der qPCR aus der LZL der A30P Familie und des A53T Mutationsträgers und den untransfizierten Lymphozyten mit Standardabweichungen (SA) dargestellt. Die Mitglieder der A30P Familie ohne Mutation fungierten als Kontrollen.

In allen EBV-transformierten LZL der A30P Familie war keine Expression des mutierten Allels nachweisbar. Es wurde aber eine sehr variable Expression des WT Allels in Mutationsträgern und Kontrollen beobachtet. Interessanterweise hatten manche Kontrollen eine sehr viel höhere Expression von *SNCA* als Patienten. Die Höhe der Expression korrelierte nicht mit dem Alter der Probanden. Die hohen Standardabweichungen und die minimalen Artefakte in der Darstellung des mutierten Allels sind durch die Lagerbedingungen und die Primergestaltung verursacht und werden in der Diskussion dieser Arbeit noch ausführlicher erörtert werden.

In der LZL des A53T Mutationsträgers konnte eine minimale Expression des mutierten Allels nachgewiesen werden.

Außerdem konnten in allen untransfizierten Lymphozyten eine nahezu gleich hohe Expression des WT- und des mutierten Allels nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass sich eine monoallelische Expression auf LZLs beschränken könnte.

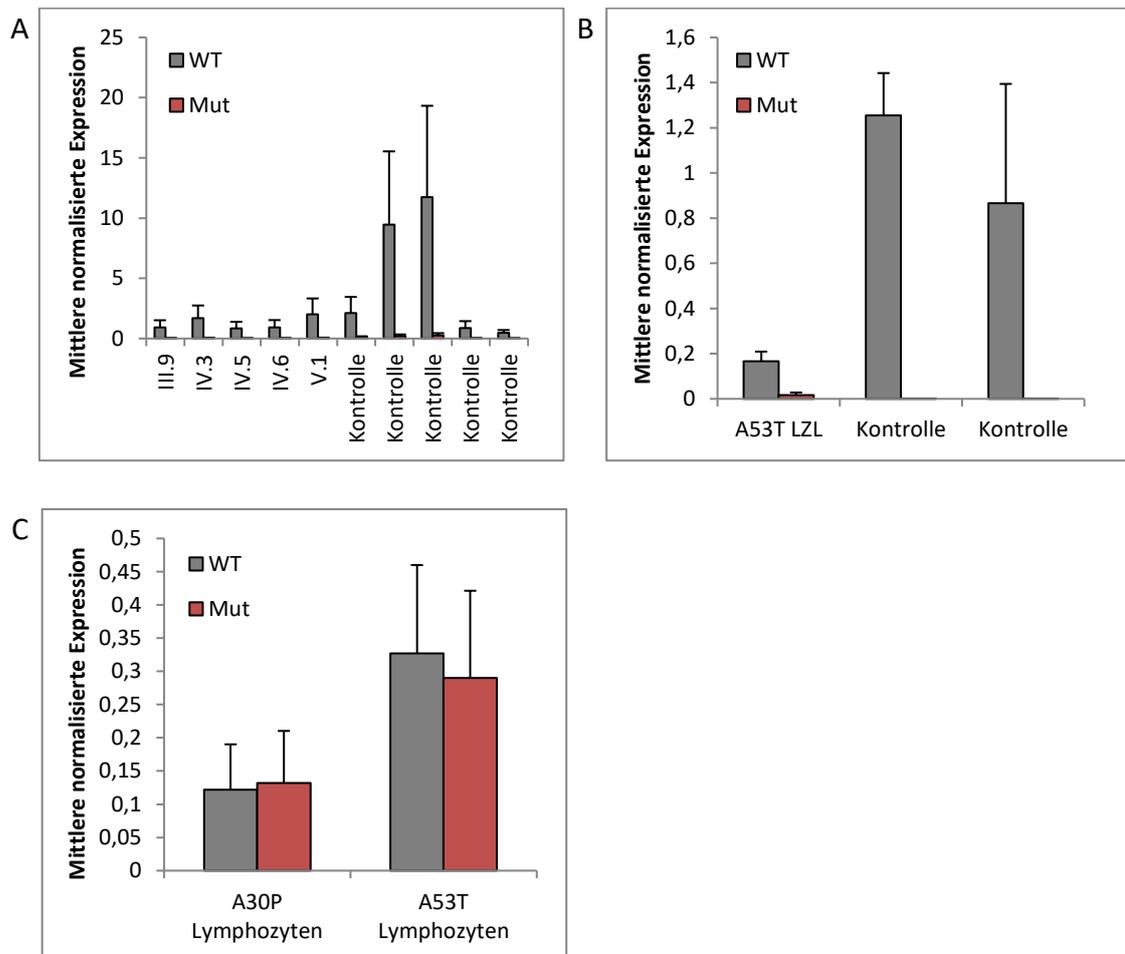


Abbildung 24: Allelspezifische Expression in LZL der A30P Familie (A) und einem A53T Mutationsträger (B), gemessen mit RT-qPCR. C Allelspezifische Expression in untransfizierten Lymphozyten des A30P Patienten (IV.3) und des A53T Patienten. Die Fehlerbalken stellen die SA dar.

Da die Höhe der Expression von *SNCA* bei Menschen sehr individuell ist und es außerdem Artefaktmessungen für das mutierte Allel auch bei den Kontrollen gab, wurden für die statistische Auswertung dieser Ergebnisse zunächst die Werte von Mut ins Verhältnis zum Wert von WT mit folgender Formel gesetzt:

$$\text{relExpr}_j = \frac{\text{Mut}_j}{\text{WT}_j}$$

Dies ergab einen homogenen Datensatz (Tabelle 20), mit welchem zunächst ein Schwellenwert (= Prediction Interval) ermittelt werden konnte. Mithilfe dessen konnte dann mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% vorhergesagt werden, bis zu welchem Wert eine Messung der relativen Expression des mutierten Allels als Artefakt auch in Kontrollproben vorkommen kann.

Hierzu wurde zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung aller Kontrollmessungen dieses Kapitels ermittelt (Tabelle 19) und dann ein einseitiges 99%iges Prediction Intervall mit folgender Formel berechnet:

$$99\% \text{ Obergrenze} = \text{Mittelwert} + 2.326 * \text{Standardabweichung} \approx \mathbf{0.030}$$

Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung aus allen Kontrollen (LZL=7, Fib=2, iPS=2, mDA=2, FK=1, Putamen=2). Mithilfe dieser Werte konnte ein 99% Prediction Intervall (= Schwellenwert) berechnet werden.

Art der Proben	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	16	0,01018782	0,008678261

Wird also kein mutiertes Allel exprimiert und es handelt sich demnach nur um eine Artefaktmessung, die sowohl technischer Natur aufgrund der Primergestaltung als auch aufgrund der Kultivierungsbedingungen auftreten kann, liegt die gemessene relative Expression mit 99%iger Sicherheit im Bereich zwischen 0 und 0,030. Alle Werte über dem Schwellenwert von 0,030 zeigen also mit 99%iger Wahrscheinlichkeit, dass tatsächlich eine entsprechende Expression vorhanden ist. Dies ist nachfolgend in Tabelle 20 für die Ergebnisse der Messung der LZL der A30P Familie aus Abbildung 24 A als

Indikator dargestellt. Ein Indikator von 0 bedeutet, dass der gemessene Wert unter dem Schwellenwert von 0,030 liegt. Ein Indikator von 1 zeigt an, dass der Schwellenwert überschritten wurde und das Allel exprimiert wird. Hier zeigt sich, dass alle Werte aller Patienten und Kontrollen für das mutierte Allel unterhalb des Schwellenwertes liegen.

Tabelle 20: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression der LZL bei allen A30P Trägern und Kontrollen für den Datensatz aus Abbildung 24 A. Alle Werte liegen unterhalb des Schwellenwertes von 0,30. (Indikator = 0: rel. Expression \leq 0,30, Indikator = 1: rel. Expression \geq 0,30)

Art der Proben	Verhältnis relative Expression Mut:WT	Indikator
III.9	0,02964197	0
IV.3	0,01632097	0
IV.5	0,01629844	0
IV.6	0,01950935	0
V.1	0,01624491	0
Kontrolle	0,02931189	0
Kontrolle	0,01883593	0
Kontrolle	0,01612399	0
Kontrolle	0,01729571	0
Kontrolle	0,01498412	0

Um zu prüfen ob die relative Expression bei den A30P Trägern signifikant unter dem Schwellenwert liegt, wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt. Dieser zeigt, dass die Werte der relativen Expression bei den A30P Trägern hochsignifikant niedriger als der Schwellenwert von 0,30 ist. Zusätzlich wurde noch ein zweiseitiger t-Test berechnet, der zeigt, dass es zwischen den A30P Trägern und den Kontrollen keinen Unterschied in der Expression des mutierten Allels gibt. Die Ergebnisse der t-Tests sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Ergebnisse der t-Tests der relativen Expression der LZL für alle A30P Träger und Kontrollen aus Abbildung 24 A. Mut wurde ins Verhältnis zu WT gesetzt. A Die relative Expression von Mut liegt signifikant unterhalb des Schwellenwerts von 0,30. B Die relative Expression von Mut unterscheidet sich nicht zwischen A30P Trägern und Kontrollen. (p≤0,01, A einseitiger ungepaarter t-Test, B zweiseitiger ungepaarter t-Test)**

	Art der Proben	Anzahl	Mittelwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
A	A30P Träger	5	0,01960313	0,0025861	-4,0203	0,00793**
B	A30P Träger	5	0,01960313	0,005782695	0,080145	0,9381
	Kontrollen	5	0,01931033	0,005770263		

Auch für die Messungen der LZL des A53T Trägers und den Kontrollen aus Abbildung 24 B, sowie für die untransfizierten Lymphozyten aus C, wurde die Expression des mutierten Allels ins Verhältnis zur Expression des WT-Allels gesetzt und der Schwellenwert von 0,30 angewandt. Hier zeigt sich, dass die Expression der LZL bei A53T über dem Schwellenwert liegt, wohingegen die Messungen in den Kontrollen unterhalb des Schwellenwertes liegen (Tabelle 22). Es wurde also bei den LZL bei A53T mit hoher Wahrscheinlichkeit eine geringe Expression des mutierten Allels gemessen.

Tabelle 22: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression der LZL des A53T Trägers und Kontrollen für den Datensatz aus Abbildung 24 B. Alle Werte der Kontrollen liegen unterhalb des Schwellenwertes von 0,30. Der Wert des A53T Trägers liegt über dem Schwellenwert. (Indikator = 0: rel. Expression ≤ 0,30, Indikator = 1: rel. Expression ≥ 0,30)

Art der Proben	Verhältnis relative Expression Mut:WT	Indikator
A53T LCL	0,11588915	1
LCL Kontrolle 1	0,00033959	0
LCL Kontrolle 2	0,00226104	0

Bei den untransfizierten Lymphozyten zeigt sich (Abbildung 24 C), dass sowohl bei A30P als auch bei A53T die Schwellenwerte überschritten werden (Tabelle 23). Dies beweist, dass das mutierte Allel in untransfizierten Lymphozyten bei beiden Mutationsträgern exprimiert wird.

Tabelle 23: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression der untransfizierten Lymphozyten eines A30P (IV.3) und eines A53T Trägers für den Datensatz aus Abbildung 24 C. Alle Werte liegen über dem Schwellenwert. (Indikator = 0: rel. Expression \leq 0,30, Indikator = 1: rel. Expression \geq 0,30)

Art der Proben	Verhältnis relative Expression Mut:WT	Indikator
A30P Lymphozyten	1,06224842	1
A53T Lymphozyten	0,8684965	1

Im Folgenden wurde ein t-Test für die untransfizierten Lymphozyten beider Mutationen berechnet (Tabelle 24), der beweist, dass die relative Expression des mutierten Allels beider Mutationen signifikant über dem 99%igen Schwellenwert liegt.

Tabelle 24: Ergebnisse des einseitigen t-Tests der relativen Expression der untransfizierten Lymphozyten der A30P und der A53T Mutation aus Abbildung 24 C. Mut wurde ins Verhältnis zu WT gesetzt. Die relative Expression von Mut liegt signifikant oberhalb des Schwellenwerts von 0,30. (* $p \leq 0,05$, einseitiger, ungepaarter t-Test)

Art der Proben	Anzahl	Mittelwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
Lymphozyten	2	0,9653725	0,09687596	9,6554	0,03285*

4.2.2 Allelspezifische Expression von *SNCA* in Fibroblasten, iPS-Zellen und mDA-Neuronen

Da bereits berichtet wurde, dass LZLs während der Kultivierung monoklonal werden können (Plagnol et al., 2008), wurden weitere Zelllinien aus Biomaterial des Indexpatienten IV.3 der A30P Familie (siehe Stammbaum Abbildung 9) und des A53T Mutationsträgers generiert. Zunächst wurden iPSCs aus Fibroblasten der Mutationsträger hergestellt, welche dann weiter zu mDA Neuronen differenziert wurden. Eine interne Kontrolle (siehe 0) wurde jederzeit mitgeführt (Kobayashi et al., 2003).

Um die sehr niedrigen Expressionslevel der Fibroblasten, verglichen mit den sehr viel höheren Expressionslevel der iPS-Zellen und mDA Neuronen besser illustrieren zu können, werden alle Abbildungen zunächst einzeln (Abbildung 25 A - F) und anschließend in einer Grafik (Abbildung 26 A - B) zusammengefasst dargestellt.

In Fibroblasten konnte nur eine sehr geringe Expression des mutierten Allels nachgewiesen werden, wobei diese in Fibroblasten mit der A30P Mutation kaum vorhanden war, im Gegensatz zu Fibroblasten mit der A53T Mutation. In der weiteren Reprogrammierung zu iPS-Zellen stieg die Expression beider Allele aber an und war nach der Differenzierung zu mDA-Neuronen am höchsten. Interessanterweise gab es einen Unterschied zwischen der Expression des mutierten Allels in A30P und A53T iPS-Zellen und mDA-Neuronen, verglichen mit dem Unterschied in der Expression des mutierten Allels in Fibroblasten. Die Expression des mutierten Allels war sowohl in iPS-Zellen als auch in mDA-Neuronen mit der A53T Mutation niedriger als in denen der A30P Mutation, bei welcher die Expression des WT Allels und des mutierten Allels nahezu gleich hoch war.

In der Kontrolle konnte durchweg eine sehr hohe Expression von *SNCA* gemessen werden. Da bereits in den LZLs eine sehr variable Expression beobachtet werden konnte, sollte die Expression der Kontrolle auf diese Varianz zwischen verschiedenen Individuen zurückzuführen sein.

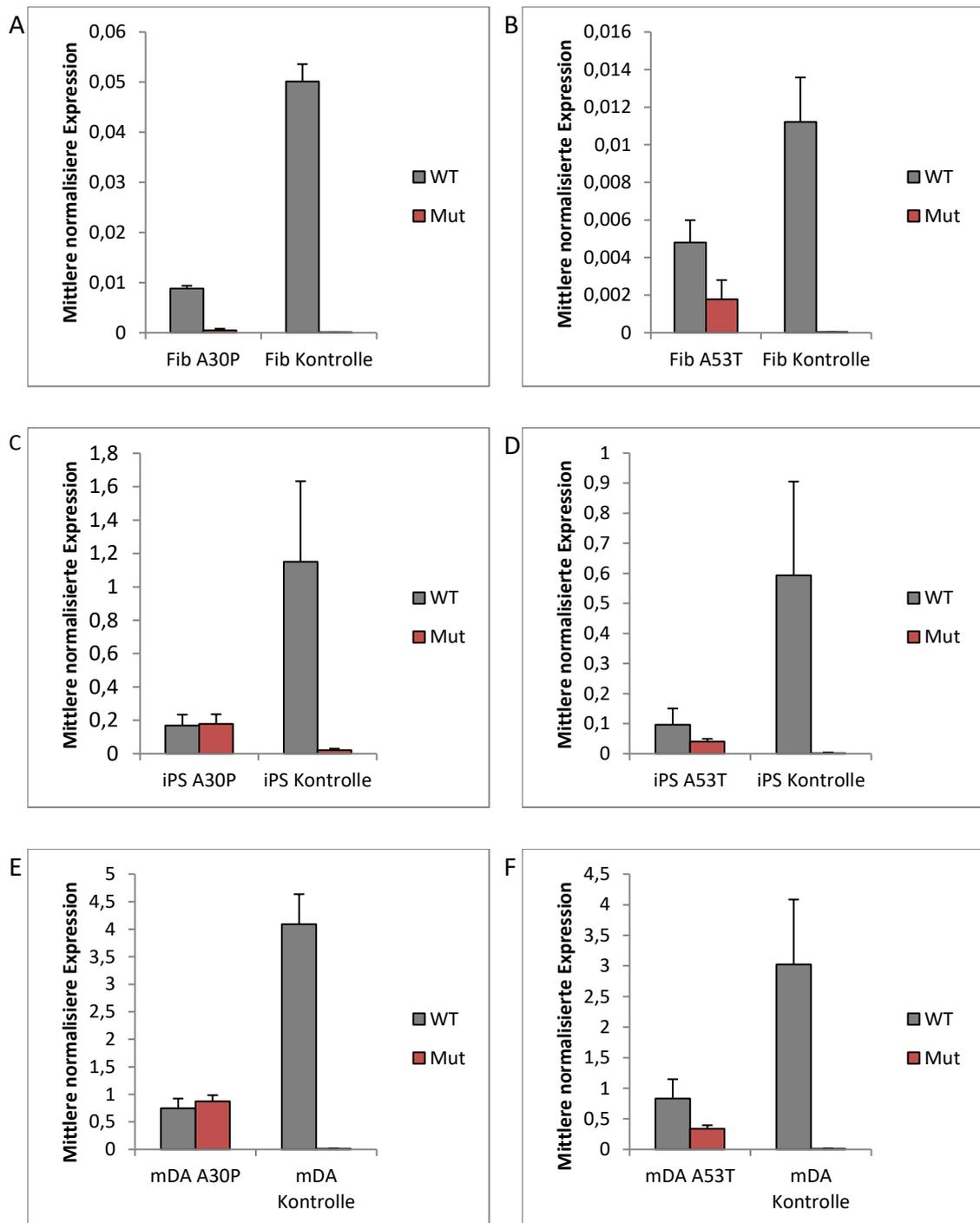


Abbildung 25: Vergleich der allelspezifischen Expressionen in Fibroblasten, iPS-Zelllinien und mDA Neuronen bei Zellen des A30P (Individual IV.3) (A, C, E) und A53T (B, D, F) Mutationsträger, gemessen mit RT-qPCR. Da die Expression von *SNCA* in Fibroblasten sehr niedrig ist, werden zunächst alle Zelllinien extra dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

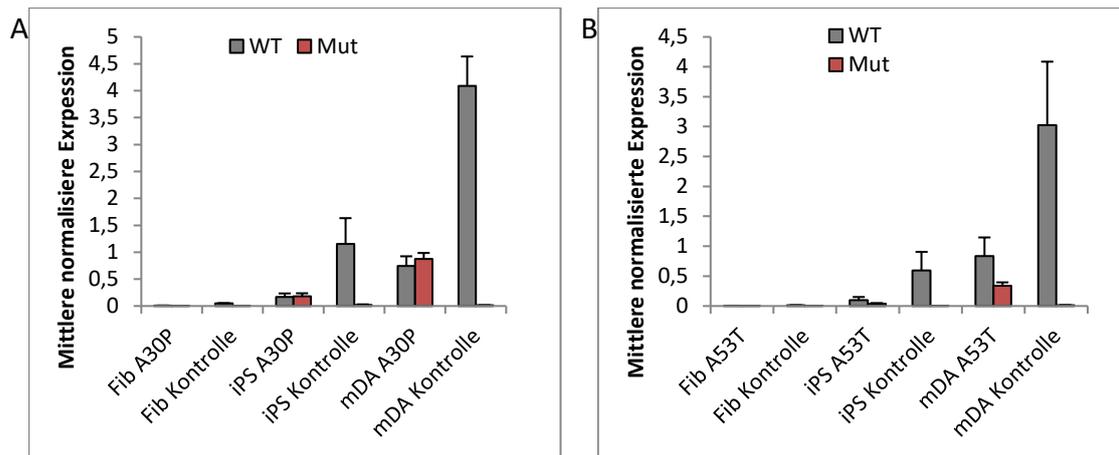


Abbildung 26: Darstellung der allelspezifischen Expressionen von Fibroblasten, iPS-Zelllinie und mDA-Neuronen aus Abbildung 25 in einer Abbildung zum Vergleich. Die Stärke der Expression nimmt mit zunehmender Differenzierung Richtung Neuronen stetig zu. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

Für die statistische Auswertung wurde wieder die relative Expression des mutierten Allels ins Verhältnis zur Expression des WT-Allels gesetzt und der ermittelte Schwellenwert von 0,30 angewandt. Alle Ergebnisse für A30P und A53T inklusive des Indikators sind in Abbildung (Tabelle 25) dargestellt. Es zeigt sich, dass bei allen Mutationsträgern die Messungen oberhalb des 99%igen Schwellenwertes liegen, so dass jeweils mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine tatsächliche Expression des mutierten Allels vorliegt. Bei allen Messungen von Kontrollen liegen die Werte unterhalb des Schwellenwertes.

Tabelle 25: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression aller Proben aus Abbildung 26. Alle Werte der Mutationsträger liegen über dem Schwellenwert. Alle Werte der Kontrollen liegen unterhalb des Schwellenwerts. (Indikator = 0: rel. Expression \leq 0,30, Indikator = 1: rel. Expression \geq 0,30)

	Art der Proben	Verhältnis relative Expression Mut:WT	Indikator
A	Fib A30P	0,05412104	1
	Fib Kontrolle	0,00022558	0
	iPS A30P	1,10154214	1
	iPS Kontrolle	0,01964647	0
	mDA A30P	1,19762872	1
	mDA Kontrolle	0,00322779	0

	Art der Proben	Verhältnis relative Expression Mut:WT	Indikator
B	Fib A53T	0,44958655	1
	Fib Kontrolle	0,00372753	0
	iPS A53T	0,5401875	1
	iPS Kontrolle	0,00466841	0
	mDA A53T	0,44824447	1
	mDA Kontrolle	0,0045527	0

Zusätzlich wurde ein t-Test berechnet, um zu untersuchen ob die Unterschiede der Expression des Mut Allels zwischen den Mutationsträgern und den Kontrollen statistisch signifikant sind (Tabelle 26). Im Falle von A30P gibt es keinen signifikanten Unterschied. Im Falle von A53T zeigt sich allerdings ein hochsignifikanter Unterschied.

Tabelle 26: Ergebnisse der t-Tests für alle Daten aus Abbildung 26. Mut wurde ins Verhältnis zu WT gesetzt. Bei Zellen des A30P Trägers gibt es keinen signifikanten Unterschied in der relativen Expression von Mut zu den Kontrollen. Bei Zellen des A53T Trägers gibt es einen hochsignifikanten Unterschied in der relativen Expression von Mut zu den Kontrollen. (p \leq 0,01, gepaarter zweiseitiger t-Test)**

Art der Proben	Anzahl	Mittelwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
A30P / Kontrollen Fib, iPS, mDA	3	0,7767307	0,3628739	2,1405	0,1657
A53T / Kontrollen Fib, iPS, mDA	3	0,4750233	0,03025437	15,701	0,004032**

4.2.3 Allelspezifische Expression von *SNCA* in humanem post-mortem Hirngewebe

Da demonstriert werden konnte, dass das mutierte Allel im Gegensatz zu LZLs sowohl in untransfizierten Lymphozyten, also auch in Fibroblasten, iPS-Zellen und mDA-Neuronen exprimiert wird, wurden noch Messungen an verschiedenen post-mortem Hirngeweben durchgeführt, da bewiesen werden sollte, dass die monoklonale Expression in LZLs und die biallelische Expression in den anderen Zellsystemen nicht auf methodische Artefakte in der Zellkultur zurückzuführen sind.

Die Hirnproben stammten vom Indexpatienten der A30P Familie und von zwei unabhängigen A53T Mutationsträgern, wobei frontaler und entorhinaler Kortex von einem A53T Träger, das Putamen aber von einem anderen Mutationsträger stammte.

In Abbildung 27 A sind die allelspezifischen Expressionen von *SNCA* in frontalen und entorhinalen Kortexen beider Mutationsträger aufgezeigt. Das mutierte und das WT Allel sind annähernd gleich hoch exprimiert. In Putamen (Abbildung 27 B) war bei der A30P Mutation eine nahezu gleich hohe Expression von mutiertem und WT Allel messbar, bei der A53T Mutation war die Expression des mutierten Allels aber niedriger als die des WT Allels.

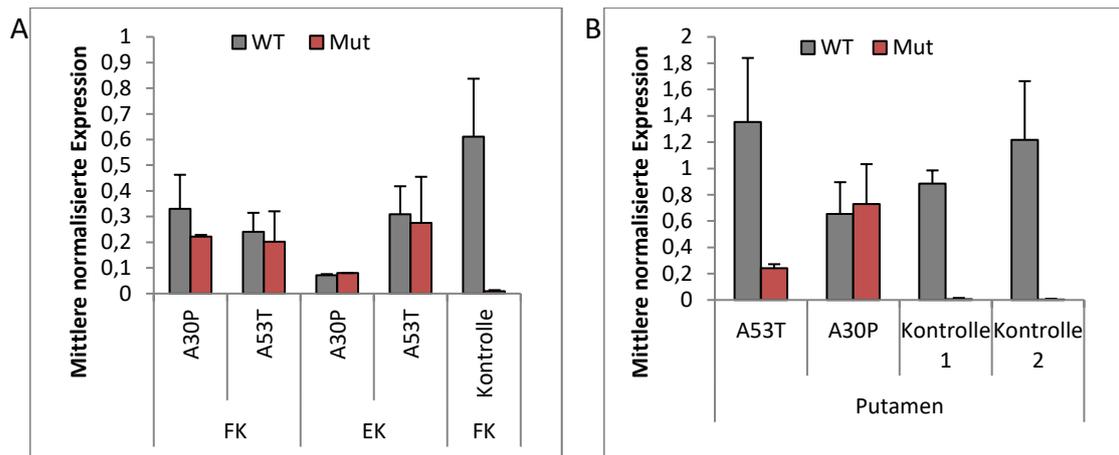


Abbildung 27: Allelspezifische Expression von *SNCA* in verschiedenen Hirnregionen in A30P (Individual IV.3) und A53T Mutationsträgern, gemessen mit RT-qPCR. A Allelspezifische Expression in frontalem und entorhinalem Kortex des Patienten IV.3 der A30P Familie und einem A53T Mutationsträger. B Allelspezifische Expression in Putamen des gleichen Patienten der A30P Familie und einem anderen A53T Mutationsträger. Fehlerbalken repräsentieren die SA.

Für die statistische Auswertung wurden auch hier die Messungen des Mut-Allels ins Verhältnis zum WT-Allel gesetzt und wieder der Schwellenwert von 0,30 angewandt. Es zeigt sich, dass bei allen Mutationsträgern der Schwellenwert überschritten wird, so dass jeweils mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine tatsächliche Expression des mutierten Allels vorliegt. Bei allen Kontrollen liegt die relative Expression des mutierten Allels unter dem 99%igen Schwellenwert. Dies zeigt, dass hier mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit kein mutiertes Allel, sondern nur Artefakte gemessen wurden (Tabelle 27).

Tabelle 27: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression aller Hirnproben aus Abbildung 27. Alle Werte der Mutationsträger liegen über dem Schwellenwert. Alle Werte der Kontrollen liegen unterhalb des Schwellenwerts. (Indikator = 0: rel. Expression \leq 0,30, Indikator = 1: rel. Expression \geq 0,30)

	Art der Proben	Verhältnis relative Expression Mut:WT	Indikator
A	EK A30P	0,72622697	1
	EK A53T	1,19801255	1
	FK A30P	1,11286922	1
	FK A53T	1,3332054	1
	FK Kontrolle	0,01539556	0

	Art der Proben	Verhältnis relative Expression Mut:WT	Indikator
B	Putamen A30P	1,12117785	1
	Putamen A53T	0,21488434	1
	Putamen Kontrolle 1	0,0094148	0
	Putamen Kontrolle 2	0,00299401	0

Weiterhin wurde ein t-Test berechnet, um zu prüfen ob die relative Expression des mutierten Allels bei den Mutationsträgern signifikant über dem Schwellenwert liegt (Tabelle 28). Bei den Hirnproben FK und EK konnte im Falle der Mutationsträger kein signifikanter Unterschied zum Schwellenwert festgestellt werden, wohingegen die Expression des mutierten Allels im Putamen hochsignifikant höher als der Schwellenwert ist.

Tabelle 28: Ergebnisse der einseitigen t-Tests für alle Hirnproben mit A30P oder A53T Mutation aus Abbildung 27. Mut wurde ins Verhältnis zu WT gesetzt. Bei Hirnproben aus FK und EK von Probanden mit der A30P oder A53T Mutation gab es keinen signifikanten Unterschied zum Schwellenwert von 0,30 in der Expression des mutierten Allels. Bei Hirnproben aus Putamen von Probanden mit der A30P oder A53T Mutation gab es einen hochsignifikanten Unterschied zum Schwellenwert in der Expression des mutierten Allels. (p≤0,01, ungepaarter, einseitiger t-Test)**

Art der Proben	Anzahl	Mittelwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
FK / EK	4	1,092579	0,1302698	8,1567	0,001927**
Putamen	2	0,6680311	0,4531468	1,408	0,1966

Zusätzlich wurde für die Daten aus Putamen ein t-Test berechnet um zu analysieren ob es zwischen den Mutationsträgern und den Kontrollen einen signifikanten Unterschied bei der Expression des mutierten Allels gibt (Tabelle 29). Hier konnte, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 29: Ergebnisse der zweiseitigen t-Tests für alle Hirnproben aus Putamen aus Abbildung 27 B. Mut wurde ins Verhältnis zu WT gesetzt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression des mutierten Allels zwischen Proben von Mutationsträgern und Kontrollen gefunden werden. (ungepaarter, einseitiger t-Test)

Art der Proben	Anzahl	Mittelwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
A30P / A53T	2	0,668031094	0,6408463	1,4605	0,3822
Kontrollen	2	0,006204407	0,004540186		

4.2.4 Massenspektrometrische Analyse der allelspezifischen Peptide

Die allelspezifische Expression des Proteins aSyn wurde im Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum im Rahmen der Etablierung dieser Methodik für eine Doktorarbeit (Subedi, 2016) gemessen.

Ziel dieser Analysen war es, die relative Verteilung von wild-typ aSyn Proteinen zu mutiertem A30P Protein in frontalem und entorhinalem Kortex zu bestimmen.

Zunächst wurden rekombinante Proteine im Verhältnis 1:1 vermessen, um die Area under the peak der jeweils spezifischen Peptide (EGVVHGVATVAEK für wild-typ und EGVVHGVTTVAEK für A53T) zu ermitteln. Diese konnten dann als Grundlage zur Quantifizierung der aSyn Verteilung in beiden Hirngewebearten genutzt werden (Abbildung 28 A). Die Area under the peak des mutierten A53T Peptids war mit 1072859 bei gleicher Proteinkonzentration um den Faktor 1,8 höher als der des wild-typ-Peptids, für welches eine Area under the peak von 580114 ermittelt wurde.

Im Vergleich dazu ergab sich für das WT Peptid in frontalem Kortex eine Area under the Peak von 534162 und für das A53T Peptid von 484646 (Abbildung 28 B). In entorhinalen Kortex waren die Konzentrationen beider aSyn Varianten um den Faktor 5 (2819878 für WT und 2649629 für A53T) höher als im frontalen Kortex. Anschließend wurde die Abundanz beider Peptide unter Einbezug des ermittelten Faktors von 1,8 für die Vergleichbarkeit der beiden Peptide dargestellt (Abbildung 28 C). Hier zeigte sich, dass die Abundanz des A53T Proteins im frontalen Kortex um die Hälfte geringer ist als die des wild-typ Proteins. Das gleiche Verhältnis konnte auch für den entorhinalen Kortex ermittelt werden.

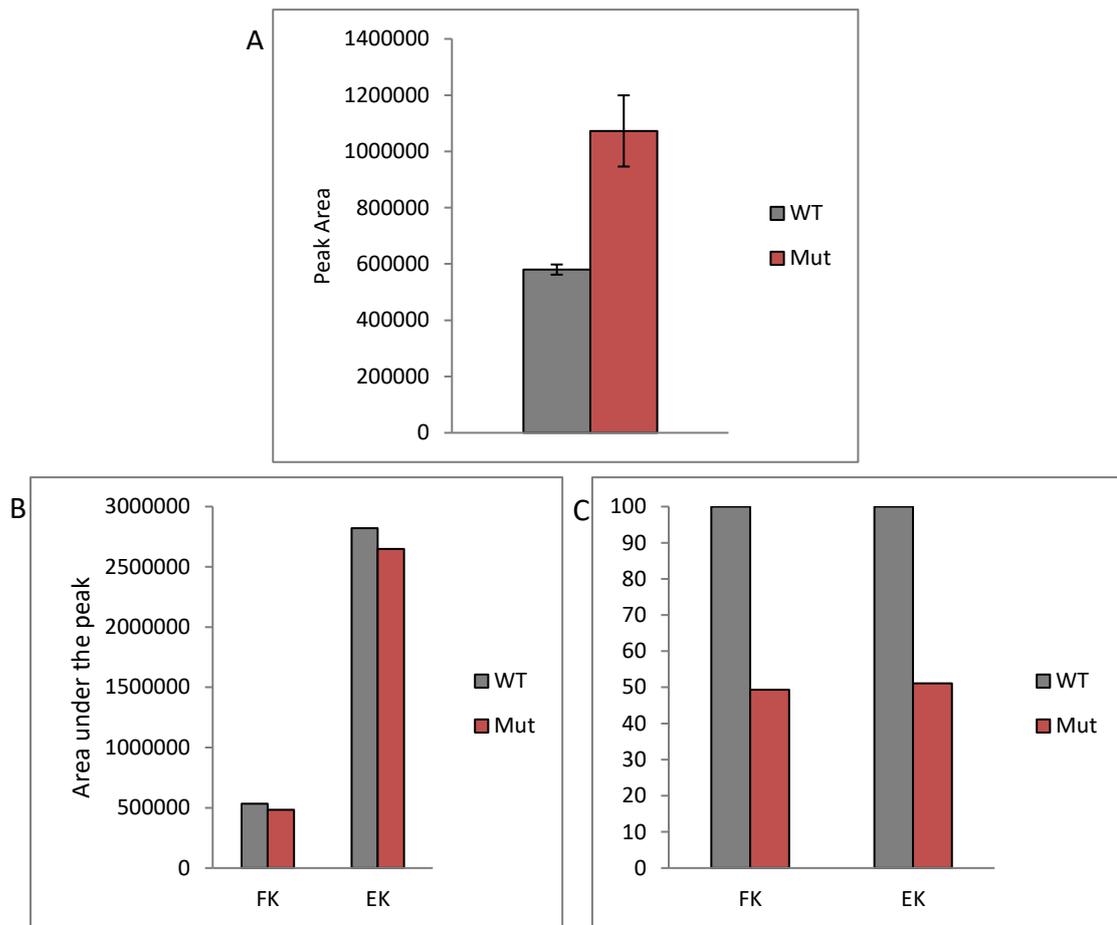


Abbildung 28: Allelspezifische Expression des *SNCA* Proteins in frontalem und entorhinalem Kortex eines A53T Mutationsträgers, gemessen mit PRM. A) Ermittelte Area under the peak zweier prädefinierter Peptide (EGVVHGVATVAEK WT und EGVVHGVTTVAEK A53T) von rekombinantem WT und A53T aSyn Protein im Verhältnis 1:1. B) Allelspezifische Proteinabundanz in frontalem und entorhinalem Kortex des A53T Mutationsträgers. C) Allelspezifische Protein Verteilung in frontalem und entorhinalem Cortex des A53T Mutationsträgers in Prozent.

4.2.5 Interne Kontrollen für die qPCR

Um zu gewährleisten, dass die Primer für das mutierte und das WT Allel auch wirklich allelspezifisch binden, wurden bereits publizierte Konstrukte (Kobayashi et al., 2003) als Kontrolle in der qPCR benutzt. Um die Spezifität der allelspezifischen Primer zu testen, wurden das WT Konstrukt und das Konstrukt mit der Mutation jeweils mit beiden Primerpaaren (Mut und WT) verwendet. Es wurde ein sehr niedriger Crossing Point für die Fälle WT Konstrukt mit WT Primer und Mut Konstrukt mit Mut Primer und ein Crossing Point mindestens 10 Zyklen später für die Fälle WT Konstrukt mit Mut Primer und Mut Konstrukt mit WT Primer erwartet. Beispielhafte Amplifikationskurven beider Konstrukte sind in Abbildung 29 A - B dargestellt. Abbildung 29 A zeigt die Amplifikationskurven des WT Konstrukts. Mit den WT spezifischen Primern steigt die Amplifikationskurve bei Crossing Point 5,0 schon signifikant nach oben, mit den spezifischen Primern für das mutierte Allel dagegen erst über 10 Zyklen später bei Crossing Point 16,63. Die Amplifikationskurve mit dem Mut Konstrukt (Abbildung 29 B) steigt mit den mutationsspezifischen Primern ebenfalls bei Crossing Point 5,0 und mit den allelspezifischen Primern für WT erst bei Crossing Point 24,03 signifikant an. So konnte die Spezifität der allelspezifischen Primer, die sich ja nur um eine Base unterschieden, bewiesen werden.

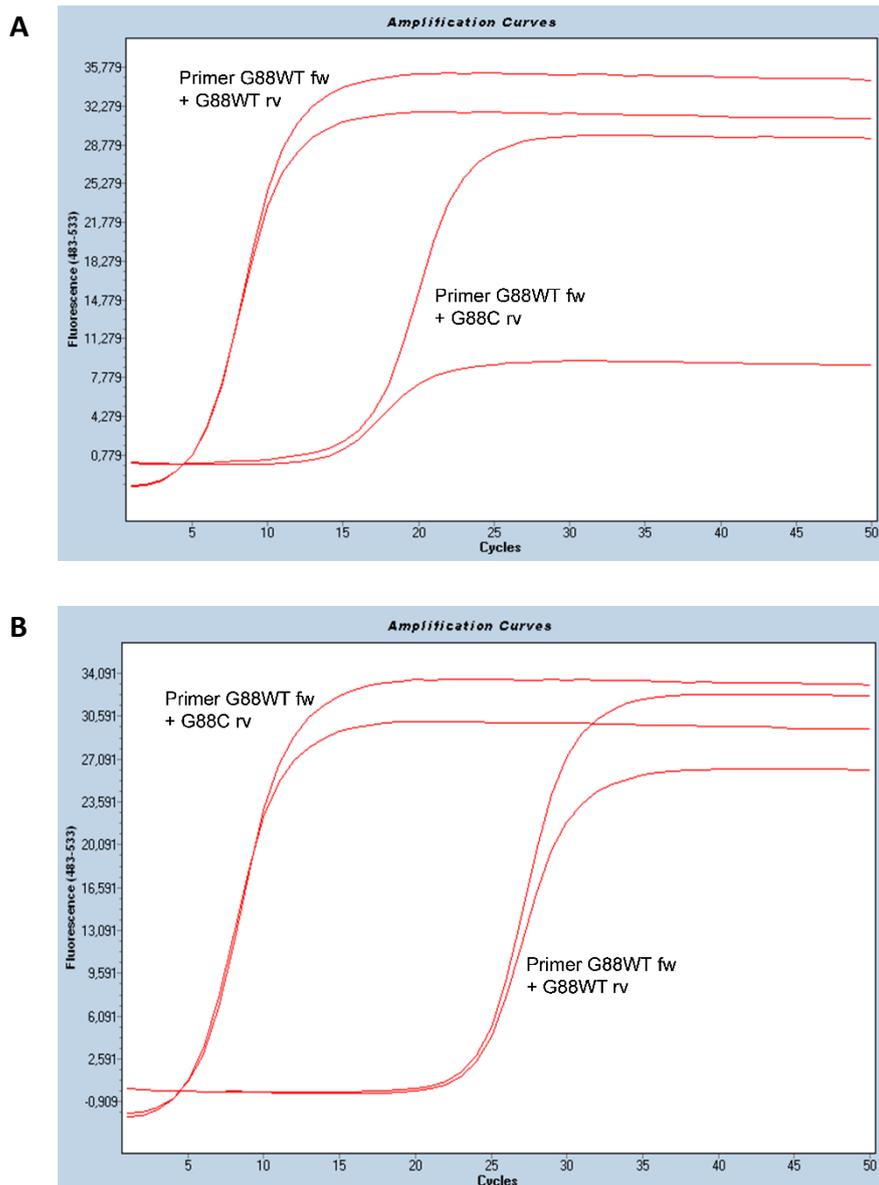


Abbildung 29: Amplifikationskurven der qPCR beider Konstrukte mit jeweils den Primerpaaren für das WT Allel und das Mut Allel. Auf der y-Achse ist jeweils die Fluoreszenz, auf der x-Achse die Zyklen dargestellt. A Amplifikationskurven des WT Konstrukts. Mit den WT Primern (G88WT fw + G88WT rv) ergibt sich ein Crossing Point von 5,0, mit den Mut-Primern (G88WT fw + G88C rv) von 16,63. B Amplifikationskurven des Mut Konstrukts. Mit den Mut Primern (G88WT fw – G88C rv) ergibt sich ein Crossing Point von 5,0 und mit den WT Primern G88WT fw + G88WT rv) ein Crossing Point von 24,03.

4.2.6 Validierung der Ergebnisse via RFLP Analyse

Um Artefakte in der qPCR bei der Messung der allelspezifischen Expression auszuschließen, wurden einige Ergebnisse aus verschiedenen Gewebearten noch mit einer RFLP Analyse validiert. Da in Anwesenheit der Punktmutationen A30P und A53T jeweils eine neue Schnittstelle für ein Restriktionsenzym gebildet wird, können Einzelklone aus einem PCR-Produkt mit Mutation, welches zunächst in ein Plasmid kloniert und anschließend durch eine Kolonie-PCR vereinzelt wurde, in einem Verdau mit dem spezifischen Restriktionsenzym geschnitten werden. Dann konnten die Einzelklone mit Mutation und die ohne ausgezählt werden sowie der prozentuelle Anteil der mutierten Klone berechnet werden (Tabelle 30).

Wie erwartet wurden keine mutierten Klone in LZLs der A30P Familie und in Kontrollen gefunden. Außerdem konnten die Ergebnisse aus den qPCR Messungen in post-mortem Hirngeweben bestätigt werden. Bei A30P Proben (Individual IV.3) hatten mit 43% und 40% der Klone nahezu die Hälfte das mutierte Allel. Bei den A53T Proben waren die WT-Klone signifikant mehr vertreten als Klone mit dem mutierten Allel.

Tabelle 30: Ergebnisse der RFLP Analyse einiger Gewebearten von A30P und A53T Proben. Es wurde die gleiche cDNA wie für die qPCR Analysen benutzt.

Mutation	Gewebeart	Klone mit Mutation	wild-typ Klone	% mutierter Klone
A30P	Lymphoblasten	0	31	0
	mDA Neurone	9	11	45
	Frontaler Kortex	12	16	43
	Entorhinaler Kortex	26	39	40
A53T	Frontaler Kortex	16	55	22
	Entorhinaler Kortex	28	63	31

Mit den prozentualen Werten der mutierten Klone wurde ein t-Test berechnet, der zeigt, dass der Mittelwert der mutierten Klone hochsignifikant größer als 0 ist, was das tatsächliche Vorhandensein der mutierten Klone beweist (Tabelle 31).

Tabelle 31: Ergebnisse des einseitigen t-Tests für die %-Werte der mutierten Klone aller Gewebearten aus Tabelle 30. Der Mittelwert aller mutierten Klone liegt signifikant über 0. (p<0,001, einseitiger ungepaarter t-Test)**

% - Werte	Anzahl	Mittelwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert
Mutierte Klone aller Gewebearten	5	36,2	4,282523	8,453	0,0005366***

5 Diskussion

5.1 Teilprojekt 1

5.1.1 Relative Expression der Isoformen von *SNCA* in Blut

Blut ist ein Biomaterial, welches im Gegensatz zu beispielsweise Liquor schnell und unkompliziert von Probanden zu sammeln ist. Deshalb wäre ein Faktor, den man im Blut bestimmen könnte, um eine Aussage über die Entstehung oder den Verlauf der PK treffen zu können, für die Diagnostik von großem Vorteil.

Es war bisher unklar, inwiefern die vier Isoformen von *SNCA* in PK Patienten und Kontrollen exprimiert werden und ob die Expression einer bestimmten Isoform oder ein bestimmtes Expressionsmuster Einfluss auf die Entstehung der PK hat. Sowohl bei IPS Patienten als auch bei Kontrollen konnte ein einheitliches Expressionsmuster der Isoformen festgestellt werden. Die AS-140, also das volle Transkript von *SNCA*, wird am höchsten exprimiert, gefolgt von der AS-126, AS-98 und der AS-112.

Die Isoformen AS-140 und AS-126 werden im Blut in Kontrollen signifikant höher exprimiert als in IPS Patienten. In vorhergehenden Studien wurden primär die Proteinlevel der AS-140 von aSyn im Blut untersucht (El-Agnaf et al., 2003), da die anderen Isoformen aufgrund fehlender Antikörper nicht auf Proteinlevel gefunden werden können. Dabei wurde in manchen Studien ebenfalls gefunden, dass die AS-140 in Kontrollen höher exprimiert wird als in Patienten (Ishii et al., 2015; Q. X. Li et al., 2007). Andere Studien, deren Kohorten zwischen rund 50 und 150 PD-Patienten und Kontrollen schwankten, fanden dagegen eine höhere Expression von aSyn in Patienten (Duran et al., 2010; S. Kim et al., 2004; P. H. Lee et al., 2006) oder keinen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (Tan, Shen, et al., 2005). Mit 55 PD-Patienten und 61 Kontrollen hat die Kohorte dieser Studie somit genug Power, um den Effekt anderer Studien zu reproduzieren oder zu widerlegen. Auch in Expressionsstudien an post-mortem Hirngewebe gibt es kontroverse Studien. In der SN wurde eine niedrigere Expression des Proteins aSyn in Patienten als in Kontrollen gefunden (Kingsbury et al., 2004; Neystat et al., 1999), im GC dagegen konnte kein Unterschied zwischen der

Expression in Kontrollen und in Patienten gefunden werden (Wirdefeldt et al., 2001). Bei der Analyse der mRNA wiederum wurde in der SN eine höhere Expression von *SNCA* in Patienten als in Kontrollen gefunden. Die Expressionslevel im Kortex allerdings unterschieden sich nicht (Chiba-Falek et al., 2006).

Die Isoformen AS-112 und AS-98 unterschieden sich in dieser Arbeit kaum zwischen IPS Patienten und Kontrollen.

Mehr als 95% des aSyn im Blut findet sich in den Erythrozyten (Shi et al., 2010). Somit wird das Level von aSyn im Blut schon durch minimale Prozesse in der Hämolyse beeinflusst. So lassen sich möglicherweise auch die unterschiedlichen Ergebnisse aus Studien mit aSyn im Blut erklären.

Um einen Biomarker für die PK zu etablieren, wurden auch Messungen in weiteren biologischen Proben gemacht. Studien mit Liquor fanden eine niedrigere Expression von aSyn in Patienten, verglichen mit Kontrollen (Hong et al., 2010; Mollenhauer et al., 2011). Der Vorteil an Messungen im Liquor ist, dass dieses keine oder kaum Erythrozyten enthält. Trotzdem kann die Messung durch die Hämolyse beeinflusst werden oder der Liquor kann bei der Abnahme mit Blut verunreinigt werden, was sich dann wiederum vor allem auf sensitive Messmethoden auswirken kann. Im Gegensatz zu Blut ist Liquor auch in der Routine schwieriger zugänglich. Da die Oligomere von aSyn als toxischer gelten als die Monomere, wurden die Anteile dieser auch im Liquor bestimmt. Es konnten in Patienten mehr Oligomere als in Kontrollen gefunden werden (Tokuda et al., 2010), obwohl dass der Gesamtanteil von aSyn in Patienten niedriger war als in Kontrollen. In weiteren biologischen Proben wie Speichelflüssigkeit (Devic et al., 2011), Biopsien der Speicheldrüsen (Cersosimo et al., 2011; Del Tredici et al., 2010), Hautbiopsien (Ikemura et al., 2008; Miki et al., 2010), Fibroblasten (Hoepken et al., 2008), Magenbiopsien (Pouclet et al., 2012) und Darmbiopsien (Shannon et al., 2012) von Patienten konnte eine höhere Expression von aSyn nachgewiesen werden. Die kontroversen Ergebnisse im Blut und die weniger kontroversen, aber doch bisher sehr wenigen Messungen in anderen biologischen Proben zeigen, dass noch viele weitere Studien nötig sind, um das geeignetste Material und die beste Methode für die Etablierung eines Biomarkers für die PK zu bestimmen. Blut ist zwar sehr leicht

zugänglich, hat aber wohl eine zu hohe Varianz bei der Bestimmung von aSyn als Biomarker.

5.1.1.1 Einfluss des SNPs rs356219 auf die Expression der Isoformen im Blut

Eine weitere Möglichkeit für einen Biomarker könnten Polymorphismen sein, die die Expression von aSyn im Blut beeinflussen können.

Polymorphismen im Genom können das Risiko, eine bestimmte Krankheit zu bekommen, erhöhen. Für den SNP rs356219 konnte in diversen genetischen und funktionellen Studien eine starke Assoziation mit der PK gefunden werden. Die funktionellen Studien zeigten allerdings lediglich, dass der risiko-Genotyp des SNPs mit erhöhter a-Syn Expression im Hirn korreliert (Fuchs et al., 2008; Linnertz et al., 2009). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob man diese erhöhten Expressionslevel im risiko-Genotyp auch im Blut wiederfindet und somit eine Art funktioneller Biomarker als Diagnostikhilfe generieren könnte. Mit Bezug auf den SNP sollte ermittelt werden, ob ein bestimmter Genotyp signifikant mit einer höheren oder niedrigeren Expression einer bestimmten Isoform korreliert.

In Kontrollen hat kein Genotyp des *SNCA* Gens einen Einfluss auf die Expression einer Isoform. In IPS Patienten dagegen wird die Expression der AS-98 durch den Risikogenotyp signifikant beeinflusst. Die AS-98 wird als die Isoform mit dem höchsten Aggregationspotential beschrieben, da ihr durch das Herausschneiden der Exone 3 und 5 Teile des N-Terminus sowie des C-Terminus fehlen. Trotzdem bleiben Regionen mit hoher Aggregationsbereitschaft und Regionen, die im Verdacht stehen, toxische Eigenschaften zu haben, bestehen (Surguchov, 2008). Allerdings wurde bereits in einer Studie (Ma et al., 2011) mit PC12-Zellen diese Hypothese widerlegt. Es kam zu keinem erhöhten Absterben der Zellen allein durch Überexpression von AS-98. Erst durch das Hinzufügen von oxidativem Stress konnte ein erhöhtes Zellsterben nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Isoform AS-98 im Blut keine Relevanz für die Entstehung der PK hat. Lediglich gewebsspezifisch im Gehirn und getriggert durch oxidativen Stress könnte das toxische Potential der AS-98 dopaminerge Neurone schädigen. In weiteren Experimenten sollte deshalb zunächst untersucht werden, ob die AS-98 durch verschiedene Einflüsse wie zum Beispiel oxidativem Stress

vermehrt zum Absterben von Neuronen oder zur Aggregation von aSyn führt. Dies könnte beispielsweise in differenzierten mDA Neuronen getestet werden. Der Vorteil gegenüber PC12-Zellen, welche aus einem Phäochromozytom der Ratte abstammen (Greene & Tischler, 1976), ist, dass das Zellkulturmaterial nicht artenfremd ist und somit auch den genetischen Hintergrund des Patienten behält (Takahashi et al., 2007).

Neben den Genotypen wurde auch der Einfluss des Risikoallels und des protektiven Allels auf die Expression der Isoformen getestet. Die einzelnen Allele allerdings haben weder in Kontrollen noch in IPS Patienten einen Einfluss auf die Expression der Isoformen. Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit das erste Mal überhaupt getestet. In vorhergehenden Studien wurde immer nur der Effekt der Genotypen getestet. Da die Einzelallele des SNPs rs356219 selbst keinen Einfluss haben, kann davon ausgegangen werden, dass die Einzelallele einen rezessiven Effekt haben.

5.1.2 Einfluss der Isoformen auf klinische Parameter

Die klinischen Parameter der Patienten geben Auskunft über die Schwere der PK. Bislang ist unklar, wie es dazu kommt, dass bei manchen Patienten die kognitiven und/oder motorischen Fähigkeiten schneller verloren gehen als bei anderen. Deshalb ist es wichtig, die Einflüsse zu identifizieren. So können molekulare Biomarker für die Klinik entwickelt werden, die es zusammen mit den funktionellen Biomarkern in Zukunft leichter machen, den Verlauf einer PK besser einzuschätzen. Noch nie vorher wurde untersucht, ob eine oder mehrere der vier Splicingvarianten von *SNCA* einen Einfluss auf die kognitive oder motorische Entwicklung und auf das Erkrankungsalter haben.

Bei einigen Erkrankungen (Taubert et al., 2008) wie auch zum Beispiel der Alzheimer Erkrankung (Düering et al., 2005) gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression eines Gens und dem Zeitpunkt für den Ausbruch der Krankheit. Auch bei der PK gibt es Studien, bei welchen ein Zusammenhang zwischen der Expression von *SNCA* und dem Erkrankungsalter gefunden werden (L. Greenbaum et al., 2013; Latourelle et al., 2009). In einer deutschen Kohorte wurde herausgefunden, dass das Risikoallel des SNPs rs356219 zu einem früherem Erkrankungsalter führt (Brockmann et al., 2013). Diese

Assoziation konnte in vorhergehenden Studien allerdings nicht hergestellt werden (Pankratz, Nichols, et al., 2009; Rajput et al., 2009). In folgenden Studien konnten weitere Varianten von *SNCA* in weiteren Kohorten mit dem Erkrankungsalter assoziiert (Cardo et al., 2012; Elbaz et al., 2011; Hadjigeorgiou et al., 2006; Pankratz, Nichols, et al., 2009) oder nicht assoziiert werden (Maraganore et al., 2006). Auch in *LRRK2* Mutationsträgern wurde dieser SNP als beeinflussende Variable des Erkrankungsalters gefunden (Botta-Orfila et al., 2012).

In dieser Arbeit konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter und der Expression bestimmter Isoformen von *SNCA* ermittelt werden. Auch der prozentuale Anteil der einzelnen Isoformen korreliert nicht mit dem Erkrankungsalter. Somit ist die Expression von *SNCA* im Blut kein Indikator für das Erkrankungsalter bei der PK, da die Datenlage zu kontrovers ist.

Den vier Isoformen werden unterschiedliche Eigenschaften zugesprochen. Somit kann auch die höhere oder niedrigere Expression einer einzelnen Isoform eine Auswirkung auf den Verlauf der PK haben. Bisher ist wenig über die Faktoren bekannt, die Auswirkung auf die Verschlechterung der motorischen und kognitiven Fähigkeiten bei der PK haben. Einige Studien beschäftigten sich mit genetischen Faktoren, die einen Einfluss auf diese Fähigkeiten haben können (Chung et al., 2012). In einer australischen Kohorte wurde der Mikrosatellit REP1 von *SNCA* und ein SNP des *MAPT* Gens analysiert und gefunden, dass diese zusammen den Krankheitsverlauf der PK beeinflussen können (Huang et al., 2011). In einer weitere Studie konnten Varianten von *SNCA* identifiziert werden, die mit einer schnelleren motorischen Progression assoziiert sind (Ritz et al., 2012). Weiterhin wurde das ApoE4 Allel mit einer schlechteren kognitiven Leistung bei PD-Patienten in Verbindung gebracht (Mata et al., 2014). In dieser Arbeit wurde das erste Mal auf funktioneller Ebene getestet, inwiefern die Expression von *SNCA* und seiner Isoformen mit dem Verlust der motorischen und kognitiven Fähigkeiten assoziiert sind. Die relative Expression der Isoformen zeigte sich hierbei nicht als Biomarker für die motorische oder kognitive Progression pro Jahr. Anders sieht es aus, wenn die prozentualen Anteile der Isoformen an der Gesamtexpression aller betrachtet werden. Der prozentuale Anteil der Isoform AS-126 ist umso höher, je langsamer sich die motorischen Symptome verschlechtern. Durch das Herausschneiden von Exon 3 bei

dieser Isoform kommt es zur Unterbrechung der Protein-Membran Bindungsdomäne im N-Terminus (Beyer, 2006). Für die Membraninteraktion von aSyn wird der ganze N-Terminus benötigt (Bisaglia et al., 2006). Es wird angenommen, dass der N-Terminus wichtig für die Aggregation von aSyn ist (Bertoncini et al., 2005; Bisaglia et al., 2006), da die Membraninteraktion von aSyn der Aggregation voraus geht (H. J. Lee et al., 2002) und zur Akkumulation des vielfach häufigerem zytostolischen aSyn führt (Jao et al., 2004). Unterstützt wird diese Annahme durch Studien der E46K Mutation, da diese im Exon 3 liegt (E. A. Greenbaum et al., 2005). In Expressionsstudien in post-mortem Gehirnen von Patienten mit Demenz mit Lewykörperchen, Alzheimer und einer Variante der Alzheimererkrankung mit Lewykörperchen wurde eine signifikant niedrigere Expression der AS-126 in Patienten, verglichen mit Gehirnen von Kontrollen, gefunden (Beyer et al., 2006). Zusammenfassend lassen diese Resultate darauf schließen, dass die AS-126 eine protektive Wirkung gegen die Aggregation von aSyn hat. Dies bestätigt sich nun auch in dieser Studie. Eine höhere Expression der AS-126 scheint eine protektive Wirkung auf die motorischen Fähigkeiten in der PK zu haben.

Die Ergebnisse für die AS-140 zeigen eine konträre Wirkung zu der Splicingvarianten AS-126 auf die motorische Progression. In den meisten Studien wurde lediglich das Gesamttranskript AS-140 untersucht. Somit ist bekannt, dass die Aggregation von AS-140 eine zentrale Rolle in der Pathogenese der PK spielt (Uversky, 2007). In dieser Studie zeigte sich, dass je höher der prozentuale Anteil von AS-140, desto schneller verschlechtern sich die motorischen Fähigkeiten eines Patienten. Der Anteil der Isoformen AS-112 und AS-98 zeigten keinen Einfluss auf die motorische oder kognitive Progression. Eventuell werden diese kleineren Isoformen schneller abgebaut. Weiterhin konnte keine Assoziation der AS-140 und AS-126 mit der kognitiven Progression nachgewiesen werden.

5.1.3 Relative Expression der Isoformen von *SNCA* in Hirngewebe

Da sich die pathologischen Ursachen der PK im Gehirn abspielen, ist es wichtig zu wissen, ob und wie die verschiedenen Isoformen von aSyn in diesem exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde das erste Mal die Expression der vier Isoformen des *SNCA* Gens in

vier verschiedenen Hirnarealen untersucht. Den unterschiedlichen Isoformen werden aufgrund ihrer verschiedenen Beschaffenheiten unterschiedliche Eigenschaften zugesprochen. Bisher ist unbekannt, durch welche Mechanismen das alternative Splicing von *SNCA* getriggert wird und ob Varianten im *SNCA* Gen die Expression der Isoformen beeinflussen und ob dies einen Einfluss auf die Entstehung der PK hat. Hierzu wurde ein SNP ausgewählt, welcher bereits in vielen Studien mit der PK assoziiert wurde.

Die höchste Expression der Isoformen AS-140 und AS-126 konnte im GC gemessen werden. Im CE war die Expression dieser Isoformen am zweithöchsten, gefolgt von MO und SN. Die Isoform AS-112 wurde in der MO am niedrigsten exprimiert, die AS-98 allerdings wurde überraschenderweise in der SN am höchsten exprimiert. Außer in der SN konnte in allen anderen Hirnarealen das Expressionsmuster, welches auch im Blut gefunden wurde, bestätigt werden. Aggregate von aSyn findet man neben der SN im basalen Vorderhirn, Hippocampus, frontaler Kortex, GC, Gyrus temporalis und der MO und dem Pons (Jellinger, 2012), so dass lediglich das CE nicht von der Pathologie der PK betroffen ist.

Noch ist unklar, welche biologische Aufgabe die alternativ gesplittenen Isoformen von aSyn haben und wie viel sie zur Aggregation von aSyn beitragen. Da sie sowohl in Kontrollen, als auch in Patienten mit dem gleichen Expressionsmuster im Blut und in verschiedenen Hirnregionen vorkommen, kann davon ausgegangen werden, dass sie auch eine biologische Funktion innehaben und nicht nur an der Pathologie der PK beteiligt sind. Änderungen in der Stöchiometrie von aSyn wurden bereits mit intrazellulärer Aggregation in Verbindung gebracht (McLean & Hyman, 2002). Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass oxidativer Stress zur Entstehung einer PK beiträgt (Hwang, 2013). Auch die Entstehung der Isoform AS-112 wurde mit oxidativem Stress assoziiert und die Überexpression derer führte zu einem vermehrten Absterben dopaminerger Neurone in einer humanen dopaminergen Zelllinie, verglichen mit der Isoform AS-140 (Kalivendi et al., 2010). Weiterhin wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass die Isoformen in Synucleinopathien unterschiedlich exprimiert werden (Beyer, Domingo-Sabat, Humbert, et al., 2008; Neystat et al., 1999), was darauf schließen lässt, dass die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Auswirkungen auf die Pathologie der Synucleinopathien haben könnten. In einem Zellkultursystem konnte

weiterhin gezeigt werden, dass die drei alternativ gespliceten Isoformen alle weniger Aggregate bildeten als die AS-140. Außerdem unterschieden sich die Aggregate. So bildete die AS-98 beispielsweise Aggregate, die mit Oligomeren von aSyn vergleichbar sind (Bungeroth et al., 2014). Somit könnte der Befund dieser Arbeit, dass die Expression von AS-98 in der SN signifikant höher exprimiert war als in allen anderen gemessenen Hirnarealen, auch eine Relevanz für die Entstehung der PK haben.

In diesem Teilprojekt dieser Arbeit wurde im Speziellen der Einfluss des SNPs rs356219, einer Variante in der 3'UTR, auf die Expression der alternativ gespliceten Isoformen von *SNCA* untersucht. Ein bestimmter Genotyp dieses SNPs könnte regulatorische Regionen, die für das Splicing von Bedeutung sind, beeinflussen. In den Hirnarealen GC und MO konnte keine Assoziation zwischen einem Genotyp des SNPs und der Expression einer Isoform hergestellt werden. Im CE wurde bei der Isoform AS-140 eine signifikant niedrigere Expression der Proben mit dem Risikogenotyp CC gegenüber dem heterozygoten CT gemessen. Dieser Einfluss war allerdings nicht alleldosisabhängig. So war die Expression in der Probengruppe mit dem heterozygoten Genotyp CT nicht niedriger und in der Gruppe mit dem protektiven homozygoten Genotyp TT am niedrigsten. Weiterhin konnte in der SN ein signifikanter Unterschied des heterozygoten Genotyps CT und des protektiven Genotyps TT bei AS-140 nachgewiesen werden. Allerdings war auch dies nicht alleldosisabhängig. In einer Studie, in welcher in post-mortem Proben aus frontalem Kortex von neurologisch gesunden Kontrollen und der Einfluss des SNPs rs356219 auf die Expression der Isoform AS-112 untersucht wurden, konnte dagegen eine dosisabhängige Expression von AS-112 gemessen werden (McCarthy et al., 2011). In den in dieser Arbeit untersuchten vier Hirnregionen war der Einfluss des SNPs nicht in jedem Hirnareal gleich. Daher könnten die von den Autoren McCarthy gefundenen Resultate auch spezifisch für den frontalen Kortex sein, welcher in dieser Arbeit kein Bestandteil der Messungen war. Ein weiterer Unterschied ist technischer Natur. In der Studie von McCarthy wurde ausschließlich der Anteil der AS-112 am Gesamtanteil von aSyn berechnet. Dagegen wurde in dieser Arbeit die relative Expression von allen Isoformen einzeln analysiert und dargestellt. In einer anderen Studie (Cardo et al., 2014), in der auch die Expression der vier Isoformen in verschiedenen Hirnregionen untersucht wurde, konnten ebenfalls die Ergebnisse von

McCarthy nicht bestätigt werden. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Genotypen der in dieser Studie untersuchten SNPs keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Isoformen haben. Einer der dort untersuchten SNPs war der rs356165, welcher mit dem in dieser Arbeit hier untersuchten SNP rs356219 im hohen LD ist und auch in der 3'Region von *SNCA* liegt.

5.2 Teilprojekt 2

5.2.1 Allelspezifische Expression von *SNCA* in Lymphoblasten

Obwohl sicher ist, dass Punktmutationen im *SNCA* Gen ein Auslöser für die PK sind, sind die Mechanismen, warum solche Mutationen zum Ausbruch der Krankheit führen, immer noch unklar. Um dies aufzuklären, wurden einige Studien an Lymphoblastenzelllinien oder Patientenmaterial durchgeführt, die eine kontroverse Diskussion über die allelspezifische Expression des mutierten und des WT Allels auslösten. Es stehen sowohl Haploinsuffizienz also auch eine konsekutive Hochregulation des WT Allels zur Diskussion. In dieser Arbeit sollten die allelspezifische Expression der A30P und A53T Mutationen umfangreich in verschiedenen Zelllinien und Geweben untersucht werden.

Wie auch in vorherigen Studien (Kobayashi et al., 2003; Markopoulou et al., 1999; Voutsinas et al., 2010) war die Expression des mutierten Allels in LZLs der A30P Familie nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis konnte durch die Berechnung eines Schwellenwertes, unter welchem eine Messung der Expression des mutierten Allels zu 99% als Artefakt gewertet werden konnte, gesichert werden. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das mutierte Allel bei allen A30P Trägern in LZL signifikant unterhalb des Schwellenwertes liegen und es keinen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen gibt. Da das Ergebnis aus der qPCR mit Hilfe eines RFLPs bestätigt wurde, und die Expression des mutierten Allels auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, kann ein technisches Problem ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass Lymphoblasten während der Kultivierung monoklonal werden können (Plagnol et al., 2008). Während der Kultivierung gewinnen dann einzelne oder auch mehrere Klone die

Überhand. Somit könnten sich die Ergebnisse der vorherigen Studien erklären. Die Tatsache, dass die Lymphoblasten der A30P Familie, welche in dieser Arbeit benutzt wurden, bereits vor 9 Jahren angelegt und kultiviert wurden und jetzt wieder aufgetaut und noch einmal kultiviert wurden, könnte eine Erklärung dafür sein, warum die Monoklonalität in diesen Kulturen weiter fortgeschritten war als in der A53T Kultur. Denn eine längere Kultivierung bedeutet auch, dass die Zellen öfters passagiert wurden. Die A53T Kultur wurde frisch angelegt und nur kurze Zeit kultiviert und somit auch nur wenige Male passagiert. In dieser konnte in der qPCR noch eine minimale Expression des mutierten Allels nachgewiesen werden. Da der Schwellenwert hier überschritten wurde, konnte eine Artefaktmessung zu 99% ausgeschlossen werden. Artefaktmessungen können durch das Primerdesign hervorgerufen werden. Die Primer wurden so konstruiert, dass sich die reversen Primer für das WT Allel und das mutierte Allel nur in einer Base, der mutierten Base, unterscheiden. Somit kommt es natürlich vor, dass der Primer für das mutierte Allel irgendwann im Laufe der qPCR an das WT Allel bindet. So lassen sich auch die minimalen Artefakte für das mutierte Allel auch bei der A30P Familie, die nachweislich unterhalb des Schwellenwertes lagen, erklären. Dafür spricht auch, dass die Artefakte in der A30P Familie nur dann sichtbar werden, wenn die Expression von aSyn sehr hoch ist. Dass die Primer, wenn das richtige Allel vorhanden ist, sehr spezifisch binden, wurde mit Hilfe der internen Kontrollen in 4.2.3 nachgewiesen. Auch in der RFLP-Validierungsanalyse konnten keine Klone mit dem Mut Allel bei LZL gefunden werden. Die sehr hohen Standardabweichungen in der qPCR der LZLs der A30P Familie haben verschiedene Ursachen. Zunächst wurden die Zelllinien, wie bereits erwähnt, bereits viele Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert. Auch wenn auf diese Weise Zellen über mehrere Jahre konserviert werden können, gehen sie trotzdem nach einer gewissen Zeit zugrunde. Viele Zellen waren nach dem Auftauen tot und die Linien waren nach dem Auftauen nur sehr schwer wieder in Kultur zu bekommen. Weiterhin war aSyn in LZLs sehr niedrig exprimiert wird. Dadurch kann es durch kleinste Unterschiede in der Molekülmenge der Proben zu stärkeren Schwankungen innerhalb der einzelnen qPCR-Läufe kommen, denn bereits ein Crossing Point weniger steht für die doppelte Menge an cDNA. Bei gering exprimierten Genen können so bereits durch

minimale Unterschiede in der Menge der cDNA, schon größere Schwankungen zwischen den einzelnen qPCR-Läufen entstehen.

Bei allen bisherigen Studien in Lymphoblasten konnte eine Neigung zugunsten des WT Allels gefunden werden. So auch in dieser Arbeit. Es ist noch nicht geklärt, warum es zu dieser selektiven Dominanz des WT Allels kommen kann. Es könnte sich um eine Form der „skewed monoallelic expression“ handeln, die bereits in Mäusen beschrieben wurde (Zwemer et al., 2012). Dabei kommt es aufgrund bisher unbekannter epigenetischer Mechanismen zu einer bevorzugten Auswahl eines bestimmten Allels, welches dann natürlich innerhalb der Kultur dominant wird. Eine weitere Erklärung wäre ein natürlicher Selektionsvorteil des WT Allels. Klone mit dem WT Allel würden durch einen noch nicht bekannten Grund mit zunehmender Kultivierung die Überhand gewinnen.

LZLs sind eine weit verbreitete, standardisierte Technik, die es ermöglicht, vor allem seltenes Patientenmaterial lange zu konservieren und damit wichtige Forschung zu betreiben. Allerdings gibt es neben der bereits oben beschriebenen Problematik noch einen weiteren negativen Aspekt dieser Zelllinie, welcher zu nicht realistischen Ergebnissen führen kann. So kann die Expression mancher Gene auch durch die Generation der Tumorzelllinie geändert werden (Carter et al., 2002).

Interessanterweise konnten in der aktuellen Arbeit eine große Variabilität der Expression des WT Allels in Mutationsträgern und Kontrollen bei nahezu allen Zelllinien oder Gewebearten gefunden werden. Es ist bekannt, dass die Expressionslevel von Genen sehr individuell sind (Cheung, Conlin, et al., 2003) und auch vererbt werden können (Cheung, Jen, et al., 2003; Schadt et al., 2003). Dies ist auch in weiteren Organismen wie Hefe (Brem et al., 2002), Maus (Schadt et al., 2003) und Ratte (Petretto et al., 2006) bekannt. Diese natürlichen Schwankungen in der Expression von Genen werden verursacht durch komplexe Interaktionen zwischen genetischen Varianten und Umweltfaktoren. Auch auf Proteinebene konnte eine solch große individuelle Variabilität in der Konzentration von aSyn in Hirnlysaten festgestellt werden (Subedi, 2016). Eine wesentliche Frage ist daher, wie viel der Variabilität in der Genexpression rein genetischen Faktoren zugeordnet werden kann. Einige der Kontrollen in dieser Arbeit zeigen eine exorbitant hohe Expression des WT Allels, verglichen mit denen der

Mutationsträger. Dies könnte erklären, warum in der Studie von Voutsinas et al. (Voutsinas et al., 2010) das WT Allel als kompensatorisch hochreguliert im Mutationsträger gefunden wurde. In dieser Studie wurde lediglich ein Mutationsträger mit einer Kontrolle verglichen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die großen Unterschiede in den Expressionsleveln des Mutationsträgers und der Kontrolle einfach der natürlichen Variabilität unterliegen.

Andere Autoren (Markopoulou et al., 1999) postulierten in einer A53T Familie eine Altersabhängigkeit. In dieser Studie schien es so, als ob die Expression des A53T Allels altersabhängig ist, wobei das Expressionslevel des mutierten Allels in älteren asymptomatischen Mutationsträgern signifikant reduziert erschien. Die Variabilität in der Expression des WT Allels der A30P Familie in den LZLs ist in dieser Arbeit hingegen nicht altersabhängig.

Um herauszufinden, ob das mutierte Allel wirklich nicht exprimiert wird, wurde in dieser Arbeit das erste Mal die Expression in Lymphoblastenzelllinien mit frischen, nicht transformierten Lymphozyten beider Mutationsträger und Kontrollen verglichen. Wie erwartet, wurden nahezu gleiche Expressionslevel von mutiertem und WT Allel in den Mutationsträgern, aber keine Expression des mutierten Allels in den Kontrollen, gefunden. Es konnte bewiesen werden, dass das mutierte Allel signifikant über dem Schwellenwert in den Mutationsträgern exprimiert wird. Die Abwesenheit der Expression in LZL kann somit auf eine oder eine Kombination der oben beschriebenen Mechanismen zurückgeführt werden. Welcher Mechanismus die Ursache ist, sollte in weiteren Studien genauer untersucht werden.

5.2.2 Allelspezifische Expression von *SNCA* in Fibroblasten, iPS-Zellen und mDA-Neuronen

Im Hinblick auf die längerfristige Verfügbarkeit von seltenen Bioproben ist es von Vorteil, daraus eine Zelllinie generieren zu können. Dabei ist es wichtig, dass der genetische Hintergrund konserviert wird, aber gleichzeitig keine monoklonalen Kulturen, wie es bei Lymphoblastenzelllinien passieren kann, entstehen. Außerdem sollte die Zelllinie

gefroren und wieder aufgetaut werden können, um sie so für längere Zeit zu konservieren. Diese Voraussetzungen erfüllen iPS Zelllinien (Takahashi et al., 2007), welche aus Fibroblasten von Probanden generiert werden können. Diese ermöglichen, eine Krankheit auf endogenem Level zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil ist, dass diese dann zu mittelhirnspezifischen dopaminergen Neuronen weiter differenziert werden können, was gerade bei Studien der PK das bessere Modell sein könnte (C. A. Ross & Akimov, 2014), da die PK im Gehirn ihren Ursprung hat. Auch Fibroblastenkulturen von Probanden ermöglichen es, ein Gen auf endogenem Level zu untersuchen. Die Krankheitsmechanismen können auch hier in einem *in vitro* System, welches die *in vivo* Situation widerspiegelt, studiert werden. Allerdings sind diese Zellen nicht neuronaler Natur und können nur bis zu einem gewissen Alter kultiviert werden. Weiterhin sind Fibroblasten speziell für Fragestellungen, bei denen aSyn untersucht werden soll, nur bedingt geeignet, da aSyn in diesen Zellen nur sehr schwach exprimiert wird.

Es konnten sowohl im direkten Patientenmaterial Fibroblasten, als auch in iPS Zellen und den differenzierten Neuronen die Expression des mutierten und des WT Allels nachgewiesen werden. Bei allen Zellen aus Mutationsträgern wurde das mutierte Allel über dem 99%igen Schwellenwert exprimiert, bei allen Zelllinien der Kontrollen unterhalb des Schwellenwerts. Dies beweist die Anwesenheit oder Abwesenheit des mutierten Allels. Leider konnte im Falle von A30P, vermutlich aufgrund der geringen Stichprobenanzahl, kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in Zelllinien von Mutationsträgern und Kontrollen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu war der Unterschied der Expression des mutierten Allels bei Zelllinien mit der A53T Mutation zu Kontrollzelllinien signifikant. Dies zeigt, dass die Expression des mutierten Allels in Zelllinien von Mutationsträgern zu 99% tatsächlich vorhanden ist.

Die Expression des mutierten Allels in Fibroblasten ist in allen Zellen, verglichen mit dem WT Allel, sehr niedrig. In iPS Zelllinien und mDA Neuronen wurden bei Zellen der A30P Mutation nahezu gleich hohe Expressionslevel von mutiertem und WT Allel gemessen. Dies konnte auch durch die RFLP Analyse bestätigt werden. In Zellen der A53T Mutation allerdings war die Expression des mutierten Allels in iPS Zellen und mDA Neuronen niedriger als das des WT Allels. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die allelspezifischen relativen Expressionslevel von Fibroblasten, iPS Zellen und mDA

Neuronen zweier Mutationen, die die PK auslösen, verglichen. Wie erwartet stieg die Expression von α Syn generell, von Fibroblasten über iPS Zellen bis zu mDA Neuronen an. Die Expression von α Syn ist im Gehirn, insbesondere in den Regionen Hippocampus, Olfaktorischer Bulbus, Striatum und Cerebellum am höchsten (Iwai et al., 1995; Maroteaux et al., 1988; Ueda et al., 1993).

5.2.3 Allelspezifische Expression von SNCA in humanem post-mortem Hirngewebe

Unabhängig von den Zelllinien, mit welchen wertvolles Material über längere Zeit konserviert werden kann, ist es wichtig zu wissen, wie die beiden Allele bei Mutationsträgern von *SNCA* im Gehirn von Patienten exprimiert werden. Um dies zu untersuchen, wurden von jeder Mutation jeweils drei verschiedene Hirnregionen analysiert. So konnten auch Unterschiede zwischen den Hirnarealen festgestellt werden. In jeder Hirnregion wird das mutierte Allel exprimiert, allerdings nicht in gleicher Höhe. Im Putamen des A53T Mutationsträgers wird das mutierte Allel sehr viel niedriger exprimiert als das WT Allel. Im Putamen des A30P Mutationsträgers dagegen wurden nahezu gleich hohe Level von mutiertem und WT Allel gemessen. Da bei allen Hirnproben von Mutationsträgern die Expression des mutierten Allels über dem 99%igen Schwellenwert lag, konnte das Vorhandensein des mutierten Allels bewiesen werden. Leider konnte, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahl, bei den Putamenproben kein zum Schwellenwert oder zu den Proben aus Kontrollen signifikanter Unterschied bewiesen werden. Da Mutationen im *SNCA* Gen selten sind, gibt es wenige Hirnproben von Mutationsträgern. Insofern ist es schwierig, hier die Fallzahl zu erhöhen. Hier sollte das Augenmerk vor allem auf die Berechnung des Schwellenwertes gelegt werden. Dieser zeigt mit 99%iger Sicherheit, ob eine tatsächliche Expression des mutierten Allels vorliegt. Im Falle der frontalen und entorhinalen Kortizes von Mutationsträgern lagen die Werte sogar hochsignifikant über dem Schwellenwert. Hier war die Stichprobe höher als bei Putamen.

In allen anderen Hirngeweben waren in der qPCR die Expressionslevel des mutierten und des WT Allels nahezu gleich und nur leichten Schwankungen unterworfen. Diese Schwankungen und die Expressionsunterschiede im Putamen könnten durch die Größe der Gewebstücke erklärt werden. Da *SNCA* zu den wenigen autosomalen Genen gehört,

die fakultativ monoallelisch exprimiert werden (Gimelbrant et al., 2007), wird in jeder Zelle zufällig ein Allel inaktiviert (siehe Abbildung 30). Das bedeutet, dass in sehr kleinen Gewebestücken davon ausgegangen werden kann, dass alle Zellen von einer Vorläuferzelle abstammen und damit dann auch deren Expressionsmuster vererbt bekommen haben. Somit würde sich in der Expressionsanalyse in solchen kleinen Gewebestücken eine monoallelische Expression zeigen. In größeren Gewebestücken dagegen stammen die Zellen von mehreren Vorläuferzellen ab, was zu einem biallelischen Expressionsmuster in der qPCR führen würde (Gimelbrant et al., 2007). Da nicht alle Gewebestücke exakt gleich waren und von Putamen weitaus kleinere Stücke verwendet wurden als von den Cortices, könnte zufällig im Falle des Putamen des A53T Mutationsträgers das Gewebestück aus mehr Zellvorläufern bestehen, die das WT Allel exprimieren. In größeren Gewebestücken, wie sie für die Analyse der Kortizes verfügbar waren, vermischt sich das Expressionsmuster von Zellen mit mutiertem und WT Allel möglicherweise besser.

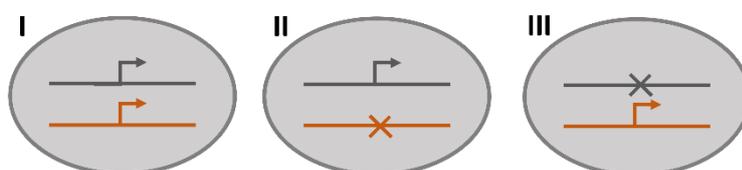


Abbildung 30: Schematische Darstellung der fakultativen monoallelischen Expression von Genen. Es gibt drei Möglichkeiten der Genexpression in einer Zelle: I Beide Allele werden exprimiert. II Nur das väterliche Allel wird exprimiert, das mütterliche ist in dieser Zelle stillgelegt. III Nur das mütterliche Allel wird exprimiert, das väterliche ist in dieser Zelle still gelegt (Abbildung verändert nach Chess, 2012).

In der RFLP Analyse allerdings wurden bei der Auswertung des frontalen und entorhinalen Kortex eine niedrigere Expression des mutierten Allels ermittelt. Auch in der massenspektrometrischen Analyse der allelspezifischen Proteine von aSyn wurde eine doppelt so hohe Konzentration des WT Allels im Vergleich zum A53T Allel gefunden (Subedi, 2016). Beide Analysen wurden bisher nur mit einem Patienten durchgeführt. Um eine verlässliche statistische Analyse durchführen zu können, bedarf es mehrerer Patienten und Kontrollen. Diese werden sich dann auch, wie bereits diskutiert, eine individuelle Variabilität in der Menge der aSyn haben.

Weiterhin ist die Auswahl der Klone bei der RFLP-Methode dadurch begrenzt, dass nur Einzelklone gepickt werden können. Die Klone wurden also jeweils nach Sichtkontrolle ausgewählt. Dabei könnte es sein, dass zufällig mehr WT Klone ausgewählt wurden als Klone mit dem mutierten Allel. Bei allen anderen Proben mit der A53T Mutation wird das mutierte Allel niedriger exprimiert als das WT Allel. Allerdings konnte auch mit dieser Technik die Expression des mutierten Allels in allen Gewebearten von Mutationsträgern, außer den LZL, bestätigt werden.

Die Expressionsunterschiede zwischen den Kortex und Putamen bei A53T können auch auf die zwei unterschiedlichen Patienten zurückgeführt werden. Wie bereits in 5.2.1 genauer erläutert wurde, sind Expressionen von Genen zwischen Menschen variabel. Inwiefern sich die höhere Expression des mutierten Allels auf den Krankheitsverlauf auswirkt, muss noch genauer untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal in verschiedenen Gewebearten und Zelllinien nachgewiesen werden, dass die mutierten Allele A30P und A53T in entsprechenden Mutationsträgern exprimiert werden. Damit können die Theorien vorheriger Studien wie epigenetisches Silencing oder Haploinsuffizienz des mutierten Allels, welche auf der Vermutung fußen, dass das mutierte Allel nicht oder nur manchmal exprimiert wird, widerlegt werden (Kobayashi et al., 2003; Markopoulou et al., 1999; Voutsinas et al., 2010). Da das mutierte Allel A53T zusätzlich auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, kann seine Expression hier eindeutig bewiesen werden. Dies ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Entstehung der PK, da bereits nachgewiesen wurde, dass es bei Patienten mit einer A53T Mutation zu einem früheren Ausbruch der Krankheit kommt (Spira et al., 2001). Dies könnte durch bereits beschriebene Mechanismen, wie beispielsweise die schnellere Aggregation von aSyn mit der A53T Mutation im Vergleich zum WT oder dem mit der A30P Mutation (Xu et al., 2002) und der Induktion von neuronalem Zelltod (Choubey et al., 2011) durch die Anwesenheit der A53T Mutation, erklärt werden.

6 Fazit und Perspektiven

Im Folgenden werden für beide Teilbereiche dieser Arbeit die Ergebnisse geschlussfolgert und Perspektiven diskutiert, mit denen aufbauend auf dieser Arbeit weiter geforscht werden kann.

6.1 Teilprojekt 1 – Untersuchung der Expression der verschiedenen Spliceformen des *SNCA* Gens in Korrelation mit dem protektiven oder Risikoallel des SNPs rs356219

Im Teilprojekt 1 konnte gezeigt werden, dass die Expression der Isoformen AS-140 und AS-126 im Blut von Kontrollen signifikant höher exprimiert waren als in IPS-Patienten. Weiterhin wurde ein einheitliches Expressionsmuster der Isoformen in nahezu allen Geweben in PD-Patienten und Kontrollen gefunden. Daher wäre es interessant zu erfahren, welche funktionellen Eigenschaften die verschiedenen Isoformen haben. Somit könnte dann die Frage nach der Pathogenität der einzelnen Isoformen beantwortet werden. Hier sind vor allem die Isoformen AS-126 und AS-98 interessant, da über diese bisher am wenigsten bekannt ist. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit die Theorie, dass die AS-126 einen eher protektiven Effekt haben könnte und die AS-98 einen eher toxischen, bestätigt. Im Blut von IPS Patienten konnte eine signifikant erhöhte Expression der AS-98 mit dem Risikogenotyp CC des SNPs rs356219 assoziiert werden. Weiterhin war in Proben der Substantia nigra die AS-98 am höchsten exprimiert. In einer ersten Studie (Ma et al., 2011) konnte zwar bisher nicht bewiesen werden, dass eine Überexpression der AS-98 allein zu einem erhöhtem Zellsterben führt. Allerdings wurden in dieser Studie auch PC12-Zellen, die aus einem Phäochromozytom der Ratte stammen, benutzt. Interessant wäre nun, wie sich eine Überexpression der AS-98 auf mDA-Neuronen auswirkt. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass die Aggregate der AS-98 Oligomeren ähneln (Bungeroth et al., 2014), die als toxischer gelten als Monomere von aSyn. Daher wäre es interessant herauszufinden, inwiefern die Aggregate der AS-98 ähnlich toxische Eigenschaften haben wie Oligomere von aSyn. Der protektive Effekt der AS-126, der bereits in einer anderen Studie (Beyer et al., 2006) postuliert wurde, wurde auch in dieser Arbeit bestätigt. Der Anteil der AS-126 an den Isoformen war umso höher, je länger die motorischen Fähigkeiten erhalten blieben. Die

AS-126 soll laut ihren stöchiometrischen Eigenschaften einen eher protektiven Einfluss haben, da ihr das Exon 3 fehlt, in welchem ein Teil des für die Membraninteraktion benötigten N-Terminus liegt (Beyer, 2006; Bisaglia et al., 2006). Da die Membraninteraktion der Aggregation voraus geht (H. J. Lee et al., 2002), wird vermutet, dass die AS-126 keine Aggregate bilden kann. So sollte geklärt werden, ob die AS-126 überhaupt Aggregate bilden kann, oder ob diese sofort wieder abgebaut werden und deshalb keine toxischen Eigenschaften haben. Ein weiterer interessanter Punkt wäre, ob die AS-126 ganz unabhängig von Aggregatbildung einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von Synucleinopathien haben kann.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, scheint Blut als Biomarker, bei welchem Expressionsunterschiede im *SNCA* Gen ein wichtiger Parameter sind, nicht das geeignetste Biomaterial zu sein. Es weist eine hohe Variabilität in der Expression von *SNCA* auf. So sind auch die in der Literatur kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Expression von *SNCA* im Blut erklärbar (Duran et al., 2010; El-Agnaf et al., 2003; Ishii et al., 2015; S. Kim et al., 2004; P. H. Lee et al., 2006; Q. X. Li et al., 2007; Tan, Chandran, et al., 2005). Deshalb sollte ein anderes, ebenfalls leicht zugängliches Biomaterial gefunden werden, in welchem die Expression von *SNCA* nicht so stark reguliert wird.

In der SN war die Isoform AS-98 in dieser Arbeit signifikant am höchsten exprimiert. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem Risikogenotyp CC und der AS-98 hergestellt werden. Die SNc, speziell von PD-Patienten, ist ein sehr heterogenes Gewebe, da durch das Absterben der dopaminergen Neurone in dieser Region nur noch wenige dopaminerge Neurone zu erwarten sind und der Zellmix, den man bei einer gewöhnlichen Isolation der RNA aus dieser Region erhält, sich bei dann Kontrollen und PD-Patienten somit erheblich unterscheiden kann. Deshalb könnten für weiteren Studien intakte dopaminerge Neurone mittels Lasermicrodissection aus dem Gewebe herausgeschnitten werden. So könnten genauere Ergebnisse erzielt werden. Es wäre dann interessant, ob die AS-98 in IPS Patienten signifikant höher exprimiert ist als in Kontrollen. Außerdem wäre interessant, ob die Genotypen des SNPs rs356219 einen Einfluss auf das alternative Splicing hat.

6.2 Teilprojekt 2 – Untersuchung der allelspezifischen Expressionen bei A30P und A53T Mutationsträgern

Im Teilprojekt 2 wurde die allelspezifische Expression von *SNCA* bei den zwei Punktmutationen A30P und A53T untersucht. Es konnte bewiesen werden, dass das mutierte Allel in LZLs der A30P Familie nicht exprimiert wird. In einer LZL-Kultur eines Trägers der A53T Mutation wurde das mutierte Allel nur in ganz geringem Umfang exprimiert. Damit konnten Ergebnisse aus vorhergehenden Studien bestätigt werden, in denen das mutierte Allel in Lymphoblastenzelllinien entweder exprimiert, unterexprimiert oder auch teilweise als nicht exprimiert gefunden wurde. Es ist bekannt, dass LZLs während der Kultivierung fakultativ monoklonal werden können (Plagnol et al., 2008). Allerdings ist nicht bekannt, ob dies in speziell diesem Fall tatsächlich dazu führt, dass die mutierten Allele in den LZLs nicht exprimiert werden. Diese sollte zunächst weiter untersucht werden. Denn LZLs sind ein Zellsystem, das es ermöglicht, wertvolles Biomaterial von seltenen Proben über einen langen Zeitraum zu konservieren. Darauf aufbauend sollte dann geklärt werden, warum im Fall der LZL-Kulturen der Mutationsträger von *SNCA* das mutierte Allel nicht exprimiert wird. Dass das mutierte Allel durch irgendeinen bisher unbekanntem Mechanismus in LZLs ausgeschaltet wird, konnte durch den Nachweis des mutierten Allels in frischen Lymphozyten und verschiedenen weiteren Gewebearten in dieser Arbeit bereits bewiesen werden. Daher wäre es wichtig zu untersuchen, wie diese Selektion zustande kommt oder ob Klone mit dem WT Allel einfach einen natürlichen Selektionsvorteil haben. Eventuell könnte das auch interessante Einblicke in den Pathomechanismus der Punktmutationen von *SNCA* geben.

Weiterhin wurde bewiesen, dass das mutierte und das WT Allel in anderen Zelllinien von Mutationsträgern, sowie in verschiedenen Hirnarealen exprimiert werden. Allerdings war das mutierte Allel der A53T Mutation in iPS-Zellen und mDA-Neuronen niedriger exprimiert als das WT Allel. Dagegen waren mutiertes und WT Allel in iPS-Zellen und mDA-Neuronen mit der A30P Mutation nahezu gleich hoch exprimiert. Noch ist unklar, ob das Verhältnis zwischen der Expression des mutierten und WT Allels einen Einfluss auf den Ausbruch der PK hat. Auch dies sollte genauer untersucht werden.

Die Expression des mutierten Allels der Probe aus Putamen mit der A53T Mutation war sehr viel niedriger als die des WT Allels. Auch auf Proteinebene wurde ein doppelt so hoher Anteil an WT Allel zum A53T Allel gemessen. Es ist bekannt, dass *SNCA* zu den Genen gehört, die fakultativ monoallelisch exprimiert werden (Gimelbrant et al., 2007). Bei einer fakultativ monoallelischen Expression eines Gens spielt die Größe des Gewebestücks eine Rolle, um eine gleichmäßige Verteilung von beiden Allelen zu erreichen (Gimelbrant et al., 2007). Daher sollte untersucht werden, ob ab einer bestimmten Größe von Gewebestücken die Expression beider Allele gleich sind oder ob es vielleicht eine individuelle Expression der Mutationsträger gibt, die dann eventuell Einfluss auf die Penetranz oder das Erkrankungsalter hat. Weiterhin sollte die Expression von mutiertem und wt-aSyn auf Proteinebene in mehreren Patienten und auch Kontrollen gemessen werden. So könnte herausgefunden werden, ob das WT Allel bei allen Patienten höher exprimiert ist oder ob dies anderen Mechanismen geschuldet ist.

Die lange kontroverse Diskussion in der Literatur über die Existenz oder Nichtexistenz des mutierten Allels von aSyn und das Verhältnis dessen zum WT Allel bei vorhandener Expression konnte in der vorliegenden Arbeit zweifelsfrei zum ersten Mal beendet werden. Die Expression des mutierten Allels wurde in beiden Mutationsträgern der A30P und A53T Mutationen für drei Zelllinien und post-mortem Hirngewebe bewiesen. Weiterhin konnte die Existenz des A53T Allels auch auf Proteinebene gesichert werden. Folglich sollten jetzt die Mechanismen, die für die Entstehung der Parkinsonkrankheit bei Mutationsträgern verantwortlich sind, untersucht werden.

Da das Peptid für die A30P Mutation mit der bei der Massenspektrometrie genutzten Technik nicht dargestellt werden konnte, sollte eine andere Technik etabliert werden, mit Hilfe derer auch das A30P Peptid quantifiziert werden kann. Nächste Schritte sollten außerdem auch auf Proteinebene die Quantifizierung der A30P und A53T Mutation in weiteren Gewebearten beinhalten.

7 Erklärung Eigenanteil

Sämtliche aufgeführten Versuche wurden von mir eigenständig etabliert und durchgeführt. Als Basis für meine Etablierungen und Messungen an Fibroblasen, iPS-Zellen und mDA-Neuronen wurden Zellen genutzt, die schon in der Zellkultur durch Herrn Dr. Benjamin Schmid und Frau Dr. Carolin Obermaier kultiviert wurden. Lediglich die Methode der massenspektrometrischen Analyse der allelspezifischen Peptide (siehe Kapitel 4.2.4) wurde in Kooperation mit dem Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum im Rahmen der Etablierung dieser Methodik für eine Dissertation (Subedi, 2016) in Bochum durchgeführt, da die Gegebenheiten für solche Untersuchungen nur dort vorhanden waren. Die Messung wurde explizit für diese Dissertation durchgeführt und in keiner anderen Arbeit veröffentlicht. Die statistische Auswertung und Interpretation erfolgte nach Beratung durch Herrn Dr. habil. Robert Hable durch mich.

Das gesamte Manuskript, inklusive aller Abbildungen und Tabellen wurde selbständig von mir verfasst.

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A30P	Alanin30Prolin
A53E	Alanin53Glutaminsäure
A53T	Alanin53Threonin
Ach	Acetylcholin
AD	autosomal dominant
aSyn	Alpha-Synuclein
bp	Basenpaare
bSyn	Beta-Synuclein
cDNA	komplementäre DNA
CE	Cerebellum
CP	Crossingpoint
C-Terminus	Carboxylterminus
DA	Dopamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Linkage Disequilibrium
E46K	Glutaminsäure46Lysin
EBV	Epstein-Barr-Virus
Enk	Enkephalin
EO "early onset"	früher Beginn
ET	Essentieller Tremor
ExoI	Exonuklease I
ExoI	Exonuclease
G51D	Glycin51Asparaginsäure
GC	Gyrus Cingulus
Glu	Glutamat
GP	Globus pallidus
GPi	Globus pallidus pars interna
gSyn	Gamma-Synuclein
H&Y	Höhn und Yahr Skala
H50Q	Histidin50Glutamin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPS	idiopathisches Parkinsonsyndrom
iPS Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
KRS	Kufor-Rakeb-Syndrom
LC480	LightCycler 480
L-Dopa	Levodopa
LO "late onset"	später Beginn
LZL	Lymphoblastenzelllinie
MAF	Minor Allele Frequency
MMST	Mini Mental State Test
MO	Medulla Oblongata
MS ...	Microsoft...

MSA	Multisystematrophie
MSNs	Medium Spiny Neuronen
Mut	Mutiert
NAC	Non-Amyloid-Beta-component
N-Terminus	Aminoterminus
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PK	Parkinson´sche Krankheit
PM	Punktmutation
PMI	Post-Mortem-Intervall
PPS	Parkinsonian-pyramidal Syndrome
PRM	Parallel Reaction Monitoring
PSP	Progressive Supranukleäre Blickparese
qPCR	quantitative Polymerasen-Kettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RIN	RNA Integrität
RNA	Ribonukleinsäure
RT-	Minus reverse Transkriptase
SA	Standardabweichung
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SAP	Shrimp alkaline Phosphatase
SF	Standardfehler
SN	Substantia Nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SNr	Substantia nigra pars reticulata
snRNPs	small nuclear ribonucleo-protein particles
SP	Substanz P
STh	Subthalamische Nucleus
VP	ventrales Pallidum
WT	Wild-typ

IV. Materialien

I. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 32: Benutzte Verbrauchsmaterialien. In der Tabelle sind die Verbrauchsmaterialien und der Hersteller aufgeführt.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zellkultur Verbrauchsmaterial	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Corning (Kaiserslautern, Deutschland), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland)
Einwegpipetten	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
Light Cycler 384 well Platten	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
PCR Reaktionsgefäße	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstett (Nürnberg, Deutschland) Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Skalpell	Braun (Melsungen, Deutschland)
Syringe filter (0.45 µm)	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Germany)

II. Chemikalien

Tabelle 33: Benutzte Chemikalien. In der Tabelle sind die Chemikalien und der Hersteller aufgeführt.

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
2-propanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Agar	Fluka Analytical (München, Deutschland)
Agarose	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Germany)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) -high glucose	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
dNTPs	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
GoTaq Polymerase Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega (Mannheim, Deutschland)
Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Potassium Chloride (KCl)	Merck KGaA (Darmstadt, Germany)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
QIA blood and tissue DNA kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Restriktionsenzyme und Puffer	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland)
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Fermentas GmbH (St Leon-Rot, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
LightCycler® 480 SybrGreen I Master	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Ethidiumbromid (1% in water)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
BigDye	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
DNA Ladepuffer (6x)	Fermentas GmbH (St Leon-Rot, Deutschland)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
RNAse freiem Wasser	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
PAX Gene Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Biocoll	Millipore Corporation (Darmstadt, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Germany)
2—ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco, Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Glutamin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Cyclosporin A	Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Germany)

Affenzelllinie B95-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Germany)
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH (München, Germany)
pGEM®-T Easy Vektor Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)
Nuklease freies Wasser	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
One Shot® TOP10 Chemically Competent E.coli	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Primer	Metabion international AG (Steinkirchen, Deutschland)
Midori Green Advance DNA Stain	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
DNA Leiter (GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder)	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland)

III. Geräte

Tabelle 34: Benutzte Geräte. In der Tabelle sind das Equipment und der jeweilige Hersteller aufgeführt.

Equipment	Hersteller
Agarose Gelkammer	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1,0R	Thermo Fisher Heraeus (Hanau, Deutschland)
Autoclav (VX-150)	Systec (Wettenberg, Deutschland)
Wasserbad VWR VWB 6	VWR International (Pennsylvania, USA)
Bakterieninkubator	Binder (Multimed) (Tuttlingen, Deutschland)
Brutschrank SANYO	SANYO Electric Biomedical Co, Ltd. (Osaka, Japan)
Zellinkubator (Heracell 240)	Thermo Fisher Hereaus (Hamburg, Deutschland)
Brutschrank	Binder Multimed (Tuttlingen, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Light cycler 480	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Mikrowelle	Panasonic (Hamburg, Deutschland)
Nanodrop (ND1000)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Pipetboy Integra	Bioscience (Fernwald, Deutschland)
Sequenzier (ABI 3100 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems/Ambio (Austin, Tx, USA)
Stereo Mikroskop MZ7	Leica (Solms, Deutschland)
Sterilbank (Herasafe)	Thermo Fisher Heraeus (Hanau, Deutschland)
Nikon eclipse TS100 Mikroskop	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Thermocycler T100™	Biorad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
Thermomixer (Comfort)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Homogenisator nach Dounce	Kleinfeld Labortechnik GmbH (Gehrden, Deutschland)
LightCycler 480 I (LC480) System	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)

IV. Software

Tabelle 35: Genutzte Software. In der Tabelle sind die Software, ihre Anwendung und die Firma aufgeführt.

Software	Anwendung	Firma
HaploPainter 1.043	Stammbaum	Freeware
EndNote X7	Reference Manager	EndNote
Primer3Plus	Primer Design	Freeware
Staden package	Analyse der Sequenzen	Freeware
Light Cycler 480 Software	qRT-PCR Analyse	Idaho Technology Inc.
Microsoft Excel 2010	Datenanalyse	Microsoft Corp.
JMP 11	Statistik	SAS Institute Inc, Cary, NC, USA
IBM SPSS Statistics 25	Statistik	IBM Corp., Released 2017, IBMSPSS Statistics for Windows, Version 25.0, Armonk, NY, USA
R: A Language and Environment for Statistical Computing	Statistik	R Core Team, 2021, Wien, Österreich

V. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Verschaltung der Basalganglien mit hemmenden und erregenden Neurotransmittern...	14
Abbildung 2: Die drei Domänen der Primärstruktur von aSyn.	18
Abbildung 3: Die pathogenen Punktmutationen von <i>SNCA</i> liegen alle in der N-Terminalen Region.	19
Abbildung 4: Aggregationskaskade von aSyn.....	23
Abbildung 5: Die Ausbreitung der LK und LN nach Braak (Braak et al., 2004).	25
Abbildung 6: Formen des Splicings.	27
Abbildung 7: Die bis heute bekannten durch alternatives Splicing entstandenen Isoformen von <i>SNCA</i>	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung von <i>SNCA</i>	30
Abbildung 9: Die deutsche A30P Familie.	38
Abbildung 10: Beispielhafte Standardkurve eines Experiments.	47
Abbildung 11: Beispielhafte Schmelzkurvenanalyse von zwei Primerpaaren.....	49
Abbildung 12: Vergleich der mittleren normalisierten Expression aller Isoformen von <i>SNCA</i> zwischen Kontrollen und PD-Patienten.....	59
Abbildung 13: Korrelation der Expressionslevel der Isoformen mit den Genotypen des SNPs rs356219 in Kontrollen (A) und IPS Patienten (B).....	60
Abbildung 14: Allelspezifische Auswertung und Korrelation dieser mit der Expression der Isoformen in Kontrollen (A) und IPS Patienten (B).....	61
Abbildung 15: Korrelation der relativen Expression der Isoformen mit dem Erkrankungsalter.	62
Abbildung 16: Korrelation des prozentualen Anteils der Isoformen mit dem Erkrankungsalter.	63
Abbildung 17: Korrelation der relativen Expression der Isoformen mit der motorischen Progression pro Jahr.	65
Abbildung 18: Korrelation des prozentualen Anteils der Isoformen mit der motorischen Progression pro Jahr.	66
Abbildung 19: Korrelation der relativen Expression der Isoformen mit der kognitiven Progression pro Jahr.	68
Abbildung 20: Korrelation des prozentualen Anteils der Isoformen mit der kognitiven Progression pro Jahr.	69
Abbildung 22: Relative Expressionen der Isoformen in allen Hirnarealen.....	72
Abbildung 23: Korrelation der Expressionslevel der Isoformen mit den Genotypen des SNPS rs356219 in (A) GC, (B) CE, (C) MO und (D) SN.	74
Abbildung 24: Allelspezifische Auswertung und Korrelation dessen mit der Expression der Isoformen in (A) GC, (B) CE, (C) MO und (D) SN.	75
Abbildung 25: Allelspezifische Expression in LZL der A30P Familie (A) und einem A53T Mutationsträger (B), gemessen mit RT-qPCR. C Allelspezifische Expression in untransfizierten Lymphozyten des A30P Patienten (IV.3) und des A53T Patienten.	77

Abbildung 26: Vergleich der allelspezifischen Expressionen in Fibroblasten, iPS-Zelllinien und mDA Neuronen bei Zellen des A30P (Individual IV.3) (A, C, E) und A53T (B, D, F) Mutationsträger, gemessen mit RT-qPCR.....	83
Abbildung 27: Darstellung der allelspezifischen Expressionen von Fibroblasten, iPS-Zelllinie und mDA-Neuronen aus Abbildung 26 in einer Abbildung zum Vergleich.	84
Abbildung 28: Allelspezifische Expression von SNCA in verschiedenen Hirnregionen in A30P (Individual IV.3) und A53T Mutationsträgern, gemessen mit RT-qPCR.....	87
Abbildung 29: Allelspezifische Expression des SNCA Proteins in frontalem und entorhinalem Kortex eines A53T Mutationsträgers, gemessen mit PRM.	91
Abbildung 30: Amplifikationskurven der qPCR beider Konstrukte mit jeweils den Primerpaaren für das WT Allel und das Mut Allel.....	93
Abbildung 31: Schematische Darstellung der fakultativen monoallelischen Expression von Genen.	110

VI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Monogene Formen der PK.....	10
Tabelle 2: Isoformspezifische Primer, ihre Lage im SNCA Gen, die Sequenz und die jeweilige Verwendung.....	37
Tabelle 3: Alle Mutationsträger mit den jeweiligen Gewebearten, die für die Studie genutzt wurden.	39
Tabelle 4: Typisches Programm für eine Standard-PCR.....	45
Tabelle 5: Programmspezifikationen für die qPCR beider Teilprojekte.	50
Tabelle 6: Primerpaare, die für die qPCR und die PCR benutzt wurden, ihre Sequenz, ihre Annealingtemperatur und der Hersteller.	51
Tabelle 7: Referenzgene, ihre Anwendung für die Gewebearten und die Herstellerfirma bei beiden Teilprojekten.....	52
Tabelle 8: Programm für die Sequenzier-PCR.....	52
Tabelle 9: Primer, die für die Sequenzierung benutzt wurden, ihre Sequenz sowie die Herstellerfirma	53
Tabelle 10: Protokoll der Ethanolpräzipitation.	53
Tabelle 11: Demografische und klinische Daten aller Blutproben.	57
Tabelle 12: Vergleich der relativen Expressionslevel der vier Isoformen zwischen Patienten und Kontrollen.	58
Tabelle 13: Alle Werte der statistischen Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse für die Korrelation der Isoformen mit dem Erkrankungsalter	64
Tabelle 14: Alle Werte der statistischen Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse für die Korrelation der Isoformen mit der motorischen Progression.	67
Tabelle 15: Alle Werte der statistischen Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse für die Korrelation der Isoformen mit der kognitiven Progression.....	70
Tabelle 16: Anzahl der Proben je Genotyp des SNPs rs356219 pro Hirnregion.....	70

Tabelle 17: Demografische und klinische Daten aller Hirnproben.....	71
Tabelle 18: P-Werte des Vergleichs der relativen Expressionen zwischen den vier Hirnarealen.	72
Tabelle 19: Mittelwert und Standardabweichung aus allen Kontrollen.....	78
Tabelle 20: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression der LZL bei allen A30P Trägern und Kontrollen für den Datensatz aus Abbildung 24 A.	79
Tabelle 21: Ergebnisse der t-Tests der relativen Expression der LZL für alle A30P Träger und Kontrollen aus Abbildung 24 A.	80
Tabelle 22: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression der LZL des A53T Trägers und Kontrollen für den Datensatz aus Abbildung 24 B.	80
Tabelle 23: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression der untransfizierten Lymphozyten eines A30P (IV.3) und eines A53T Trägers für den Datensatz aus Abbildung 24 C.....	81
Tabelle 24: Ergebnisse des t-Tests der relativen Expression der untransfizierten Lymphozyten der A30P und der A53T Mutation aus Abbildung 24 C.....	81
Tabelle 25: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression aller Proben aus Abbildung 26.....	85
Tabelle 26: Ergebnisse der t-Tests für alle Daten aus Abbildung 26.	85
Tabelle 27: Ergebnisse der Berechnung des Verhältnisses von Mut zu WT für die relative Expression aller Hirnproben aus Abbildung 27.	88
Tabelle 28: Ergebnisse der t-Tests für alle Hirnproben mit A30P oder A53T Mutation aus Abbildung 27. ..	89
Tabelle 29: Ergebnisse der t-Tests für alle Hirnproben aus Putamen aus Abbildung 27 B.	89
Tabelle 30: Ergebnisse der RFLP Analyse einiger Gewebearten von A30P und A53T Proben..	94
Tabelle 31: Ergebnisse des t-Tests für die % -Werte der mutierten Klone aller Gewebearten aus Tabelle 27.	95
Tabelle 32: Benutzte Verbrauchsmaterialien.....	119
Tabelle 33: Benutzte Chemikalien.....	119
Tabelle 34: Benutzte Geräte.	121
Tabelle 35: Genutzte Software.....	122

VII. Danksagung

Die folgende Arbeit konnte nur durch die Mitarbeit, Anregung und Unterstützung anderer Personen entstehen. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Gasser bedanken, der mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Weiterhin danke ich für die vielen guten Ratschläge und Diskussionen meiner Ergebnisse. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Andreas Nieder für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Ein spezieller Dank gilt Prof. Dr. Rejko Krüger, der mir ermöglichte, das äußerst interessante Teilprojekt 2 zu bearbeiten, für seine Diskussionsbereitschaft, seine Anregungen und Hilfe.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Dr. Saskia Biskup, die es mir ermöglichte, die RIN-Messungen in ihrer Firma Cegat durchzuführen.

Ferner danke ich dem Medizinischen Proteom-Center aus Bochum für die Kollaboration und den steten Wissensaustausch.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an Dr. Carolin Obermaier und Dr. Benjamin Schmid, die mich mit iPS-Zellen und mDA-Neuronen für diese Arbeit versorgten und an Susanna Hoffmann für die tolle Hilfe bei der Lymphoblastenzellkultur.

Vielen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme, ständige Unterstützung, Diskussions- und Hilfsbereitschaft! Danke vor allem an Kathrin, Claudi S., Claudi F., Petra, Christian E., Christian D., Nadine, Angelika, Benni, David, Tine, Susanna, Maik und den Rest der AG Gasser. Ein besonderes dickes Danke an Claudi S. für das Lesen dieser Dissertation.

Danke auch an die AG Schöls, bei denen immer ein Platz in der Zellkultur für mich frei war. Danke hier an Yvonne, Stefan und Jenny. Außerdem möchte ich Caro aus der AG Krüger und Catha aus der AG Kahle für die vielen tollen fachlichen Diskussionen danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann Steffen, meinen Eltern Roland und Andrea, meinem Bruder Mario und meinen Schwiegereltern Hilde und Gregor, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

VIII. Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., . . . Rosenthal, A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, *25*(1), 239-252.
- Adam, D. (2000). Pesticide use linked to Parkinson's disease. *Nature*, *408*(6809), 125. doi: 10.1038/35041740
- Aharon-Peretz, J., Rosenbaum, H., & Gershoni-Baruch, R. (2004). Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, *351*(19), 1972-1977. doi: 10.1056/NEJMoa033277
- Albin, R. L., Makowiec, R. L., Hollingsworth, Z. R., Dure, L. S. t., Penney, J. B., & Young, A. B. (1992). Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*, *46*(1), 35-48.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, *12*(10), 366-375.
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., . . . Farrer, M. J. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord*, *28*(6), 811-813. doi: 10.1002/mds.25421
- Athanassiadou, A., Voutsinas, G., Psiouri, L., Leroy, E., Polymeropoulos, M. H., Ilias, A., . . . Papapetropoulos, T. (1999). Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. *Am J Hum Genet*, *65*(2), 555-558. doi: 10.1086/302486
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., . . . Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*, *152*(4), 879-884.
- Barbour, R., Kling, K., Anderson, J. P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., . . . Chilcote, T. J. (2008). Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis*, *5*(2), 55-59. doi: 10.1159/000112832
- Bartels, T., Ahlstrom, L. S., Leftin, A., Kamp, F., Haass, C., Brown, M. F., & Beyer, K. (2010). The N-terminus of the intrinsically disordered protein alpha-synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys J*, *99*(7), 2116-2124. doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.035
- Berg, D., Schweitzer, K. J., Leitner, P., Zimprich, A., Lichtner, P., Belcredi, P., . . . Gasser, T. (2005). Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. *Brain*, *128*(Pt 12), 3000-3011. doi: 10.1093/brain/awh666
- Bertoncini, C. W., Jung, Y. S., Fernandez, C. O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T. M., & Zweckstetter, M. (2005). Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(5), 1430-1435. doi: 10.1073/pnas.0407146102
- Beyer, K. (2006). Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol*, *112*(3), 237-251. doi: 10.1007/s00401-006-0104-6
- Beyer, K., Domingo-Sabat, M., Humbert, J., Carrato, C., Ferrer, I., & Ariza, A. (2008). Differential expression of alpha-synuclein, parkin, and synphilin-1 isoforms in Lewy body disease. *Neurogenetics*, *9*(3), 163-172. doi: 10.1007/s10048-008-0124-6

- Beyer, K., Domingo-Sabat, M., Lao, J. I., Carrato, C., Ferrer, I., & Ariza, A. (2008). Identification and characterization of a new alpha-synuclein isoform and its role in Lewy body diseases. *Neurogenetics*, *9*(1), 15-23. doi: 10.1007/s10048-007-0106-0
- Beyer, K., Humbert, J., Ferrer, A., Lao, J. I., Carrato, C., Lopez, D., . . . Ariza, A. (2006). Low alpha-synuclein 126 mRNA levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease. *Neuroreport*, *17*(12), 1327-1330. doi: 10.1097/01.wnr.0000224773.66904.e7
- Beyer, K., Lao, J. I., Carrato, C., Mate, J. L., Lopez, D., Ferrer, I., & Ariza, A. (2004). Differential expression of alpha-synuclein isoforms in dementia with Lewy bodies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *30*(6), 601-607. doi: 10.1111/j.1365-2990.2004.00572.x
- Bisaglia, M., Mammi, S., & Bubacco, L. (2009). Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB J*, *23*(2), 329-340. doi: 10.1096/fj.08-119784
- Bisaglia, M., Schievano, E., Caporale, A., Peggion, E., & Mammi, S. (2006). The 11-mer repeats of human alpha-synuclein in vesicle interactions and lipid composition discrimination: a cooperative role. *Biopolymers*, *84*(3), 310-316. doi: 10.1002/bip.20440
- Blomeley, C., & Bracci, E. (2005). Excitatory effects of serotonin on rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol*, *569*(Pt 3), 715-721. doi: 10.1113/jphysiol.2005.098269
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., . . . Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, *299*(5604), 256-259. doi: 10.1126/science.1077209
- Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Tscherter, A., . . . Pisani, A. (2007). Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT_{2C}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonin receptors: implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychopharmacology*, *32*(8), 1840-1854. doi: 10.1038/sj.npp.1301294
- Botta-Orfila, T., Ezquerra, M., Pastor, P., Fernandez-Santiago, R., Pont-Sunyer, C., Compta, Y., . . . Tolosa, E. (2012). Age at onset in LRRK2-associated PD is modified by SNCA variants. *J Mol Neurosci*, *48*(1), 245-247. doi: 10.1007/s12031-012-9820-7
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res*, *318*(1), 121-134. doi: 10.1007/s00441-004-0956-9
- Brem, R. B., Yvert, G., Clinton, R., & Kruglyak, L. (2002). Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science*, *296*(5568), 752-755. doi: 10.1126/science.1069516
- Brockmann, K., Schulte, C., Hauser, A. K., Lichtner, P., Huber, H., Maetzler, W., . . . Gasser, T. (2013). SNCA: major genetic modifier of age at onset of Parkinson's disease. *Mov Disord*, *28*(9), 1217-1221. doi: 10.1002/mds.25469
- Bungeroth, M., Appenzeller, S., Regulin, A., Volker, W., Lorenzen, I., Grotzinger, J., . . . Kühlenbaumer, G. (2014). Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms. *Neurobiol Aging*, *35*(8), 1913-1919. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.009
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., . . . Nussbaum, R. L. (2002). Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated

- synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*, 22(20), 8797-8807.
- Camara, E., Rodriguez-Fornells, A., Ye, Z., & Munte, T. F. (2009). Reward networks in the brain as captured by connectivity measures. *Front Neurosci*, 3(3), 350-362. doi: 10.3389/neuro.01.034.2009
- Campbell, B. C., McLean, C. A., Culvenor, J. G., Gai, W. P., Blumbergs, P. C., Jakala, P., . . . Li, Q. X. (2001). The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *J Neurochem*, 76(1), 87-96.
- Campion, D., Martin, C., Heilig, R., Charbonnier, F., Moreau, V., Flaman, J. M., . . . Frebourg, T. (1995). The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease. *Genomics*, 26(2), 254-257.
- Cardo, L. F., Coto, E., de Mena, L., Ribacoba, R., Lorenzo-Betancor, O., Pastor, P., . . . Alvarez, V. (2012). A search for SNCA 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*, 47(3), 425-430. doi: 10.1007/s12031-011-9669-1
- Cardo, L. F., Coto, E., de Mena, L., Ribacoba, R., Mata, I. F., Menendez, M., . . . Alvarez, V. (2014). Alpha-synuclein transcript isoforms in three different brain regions from Parkinson's disease and healthy subjects in relation to the SNCA rs356165/rs11931074 polymorphisms. *Neurosci Lett*, 562, 45-49. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.009
- Carter, K. L., Cahir-McFarland, E., & Kieff, E. (2002). Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *J Virol*, 76(20), 10427-10436.
- Caughey, B., & Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, 26, 267-298. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.010302.081142
- Cersosimo, M. G., Perandones, C., Micheli, F. E., Raina, G. B., Beron, A. M., Nasswetter, G., . . . Benarroch, E. E. (2011). Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients. *Mov Disord*, 26(1), 188-190. doi: 10.1002/mds.23344
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., & Sudhof, T. C. (2003). A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein. *J Biol Chem*, 278(17), 15313-15318. doi: 10.1074/jbc.M213128200
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O. M., & Sudhof, T. C. (2005). Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, 123(3), 383-396. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.028
- Chartier-Harlin, M. C., Dachsel, J. C., Vilarino-Guell, C., Lincoln, S. J., LePrete, F., Hulihan, M. M., . . . Farrer, M. J. (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89(3), 398-406. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.08.009
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., . . . Destee, A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, 364(9440), 1167-1169. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17103-1
- Chess, A. (2012). Mechanisms and consequences of widespread random monoallelic expression. *Nat Rev Genet*, 13(6), 421-428. doi: 10.1038/nrg3239

- Cheung, V. G., Conlin, L. K., Weber, T. M., Arcaro, M., Jen, K. Y., Morley, M., & Spielman, R. S. (2003). Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nat Genet*, *33*(3), 422-425. doi: 10.1038/ng1094
- Cheung, V. G., Jen, K. Y., Weber, T., Morley, M., Devlin, J. L., Ewens, K. G., & Spielman, R. S. (2003). Genetics of quantitative variation in human gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *68*, 403-407.
- Chiba-Falek, O., Lopez, G. J., & Nussbaum, R. L. (2006). Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients. *Mov Disord*, *21*(10), 1703-1708. doi: 10.1002/mds.21007
- Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., . . . Kaasik, A. (2011). Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J Biol Chem*, *286*(12), 10814-10824. doi: 10.1074/jbc.M110.132514
- Chu, Y., & Kordower, J. H. (2015). The prion hypothesis of Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, *15*(5), 28. doi: 10.1007/s11910-015-0549-x
- Chung, S. J., Armasu, S. M., Biernacka, J. M., Anderson, K. J., Lesnick, T. G., Rider, D. N., . . . Maraganore, D. M. (2012). Genomic determinants of motor and cognitive outcomes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *18*(7), 881-886. doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.04.025
- Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med*, *4*(11), 1318-1320. doi: 10.1038/3311
- Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., & Lansbury, P. T., Jr. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(2), 571-576.
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., . . . Lindquist, S. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, *313*(5785), 324-328. doi: 10.1126/science.1129462
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A. C., Goodchild, R., Larsen, K. E., . . . Hen, R. (2002). Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(22), 14524-14529. doi: 10.1073/pnas.172514599
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, *39*(6), 889-909.
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, *273*(16), 9443-9449.
- de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, *5*(6), 525-535. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9
- Del Tredici, K., Hawkes, C. H., Ghebremedhin, E., & Braak, H. (2010). Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, *119*(6), 703-713. doi: 10.1007/s00401-010-0665-2

- Deng, H., Le, W., Guo, Y., Hunter, C. B., Xie, W., & Jankovic, J. (2005). Genetic and clinical identification of Parkinson's disease patients with LRRK2 G2019S mutation. *Ann Neurol*, *57*(6), 933-934. doi: 10.1002/ana.20510
- Devic, I., Hwang, H., Edgar, J. S., Izutsu, K., Presland, R., Pan, C., . . . Zhang, J. (2011). Salivary alpha-synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain*, *134*(Pt 7), e178. doi: 10.1093/brain/awr015
- Di Fonzo, A., Dekker, M. C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Correia Guedes, L., . . . Bonifati, V. (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, *72*(3), 240-245. doi: 10.1212/01.wnl.0000338144.10967.2b
- Di Fonzo, A., Rohe, C. F., Ferreira, J., Chien, H. F., Vacca, L., Stocchi, F., . . . Italian Parkinson Genetics, N. (2005). A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet*, *365*(9457), 412-415. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17829-5
- Di Rosa, G., Puzzo, D., Sant'Angelo, A., Trinchese, F., & Arancio, O. (2003). Alpha-synuclein: between synaptic function and dysfunction. *Histol Histopathol*, *18*(4), 1257-1266.
- Dickson, D. W., Uchikado, H., Fujishiro, H., & Tsuboi, Y. (2010). Evidence in favor of Braak staging of Parkinson's disease. *Mov Disord*, *25 Suppl 1*, S78-82. doi: 10.1002/mds.22637
- Dikiy, I., & Eliezer, D. (2012). Folding and misfolding of alpha-synuclein on membranes. *Biochim Biophys Acta*, *1818*(4), 1013-1018. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.09.008
- Doya, K. (2000). Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control. *Curr Opin Neurobiol*, *10*(6), 732-739.
- Driver, J. A., Logroscino, G., Gaziano, J. M., & Kurth, T. (2009). Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology*, *72*(5), 432-438. doi: 10.1212/01.wnl.0000341769.50075.bb
- During, M., Grimm, M. O., Grimm, H. S., Schroder, J., & Hartmann, T. (2005). Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiol Aging*, *26*(6), 785-788. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.002
- Duran, R., Barrero, F. J., Morales, B., Luna, J. D., Ramirez, M., & Vives, F. (2010). Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment. *Mov Disord*, *25*(4), 489-493. doi: 10.1002/mds.22928
- Edvardson, S., Cinnamon, Y., Ta-Shma, A., Shaag, A., Yim, Y. I., Zenvirt, S., . . . Elpeleg, O. (2012). A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One*, *7*(5), e36458. doi: 10.1371/journal.pone.0036458
- El-Agnaf, O. M., Jakes, R., Curran, M. D., Middleton, D., Ingenito, R., Bianchi, E., . . . Wallace, A. (1998). Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett*, *440*(1-2), 71-75.
- El-Agnaf, O. M., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Gibson, M. J., . . . Allsop, D. (2003). Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J*, *17*(13), 1945-1947. doi: 10.1096/fj.03-0098fje
- Elbaz, A., Grigoletto, F., Baldereschi, M., Breteler, M. M., Manubens-Bertran, J. M., Lopez-Pousa, S., . . . Rocca, W. A. (1999). Familial aggregation of Parkinson's disease: a

- population-based case-control study in Europe. EUROPARKINSON Study Group. *Neurology*, 52(9), 1876-1882.
- Elbaz, A., & Moisan, F. (2008). Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 21(4), 454-460. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283050461
- Elbaz, A., Ross, O. A., Ioannidis, J. P., Soto-Ortolaza, A. I., Moisan, F., Aasly, J., . . . Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease, C. (2011). Independent and joint effects of the MAPT and SNCA genes in Parkinson disease. *Ann Neurol*, 69(5), 778-792. doi: 10.1002/ana.22321
- Elbaz, A., & Tranchant, C. (2007). Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 262(1-2), 37-44. doi: 10.1016/j.jns.2007.06.024
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., Jr., & Browne, G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol*, 307(4), 1061-1073. doi: 10.1006/jmbi.2001.4538
- Fares, M. B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M. K., Jovicic, A., Kiely, A., . . . Lashuel, H. A. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of alpha-synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Hum Mol Genet*, 23(17), 4491-4509. doi: 10.1093/hmg/ddu165
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12(3), 189-198.
- Fuchs, J., Tichopad, A., Golub, Y., Munz, M., Schweitzer, K. J., Wolf, B., . . . Gasser, T. (2008). Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J*, 22(5), 1327-1334. doi: 10.1096/fj.07-9348com
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Diaz-Cabiale, Z., Rivera, A., Ferraro, L., . . . Agnati, L. F. (2012). Extrasynaptic neurotransmission in the modulation of brain function. Focus on the striatal neuronal-glia networks. *Front Physiol*, 3, 136. doi: 10.3389/fphys.2012.00136
- Gallien, S., Duriez, E., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T., & Domon, B. (2012). Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 11(12), 1709-1723. doi: 10.1074/mcp.O112.019802
- Gasser, T., Muller-Myhsok, B., Wszolek, Z. K., Oehlmann, R., Calne, D. B., Bonifati, V., . . . Horstmann, R. D. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet*, 18(3), 262-265. doi: 10.1038/ng0398-262
- George, J. M. (2002). The synucleins. *Genome Biol*, 3(1), REVIEWS3002.
- Ghosh, D., Sahay, S., Ranjan, P., Salot, S., Mohite, G. M., Singh, P. K., . . . Maji, S. K. (2014). The newly discovered Parkinson's disease associated Finnish mutation (A53E) attenuates alpha-synuclein aggregation and membrane binding. *Biochemistry*, 53(41), 6419-6421. doi: 10.1021/bi5010365
- Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem*, 276(4), 2380-2386. doi: 10.1074/jbc.M008919200
- Gimelbrant, A., Hutchinson, J. N., Thompson, B. R., & Chess, A. (2007). Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science*, 318(5853), 1136-1140. doi: 10.1126/science.1148910

- Golbe, L. I., Di Iorio, G., Bonavita, V., Miller, D. C., & Duvoisin, R. C. (1990). A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *27*(3), 276-282. doi: 10.1002/ana.410270309
- Goldberg, M. S., & Lansbury, P. T., Jr. (2000). Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol*, *2*(7), E115-119. doi: 10.1038/35017124
- Gomez-Tortosa, E., Newell, K., Irizarry, M. C., Sanders, J. L., & Hyman, B. T. (2000). alpha-Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol*, *99*(4), 352-357.
- Greenbaum, E. A., Graves, C. L., Mishizen-Eberz, A. J., Lupoli, M. A., Lynch, D. R., Englander, S. W., . . . Giasson, B. I. (2005). The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J Biol Chem*, *280*(9), 7800-7807. doi: 10.1074/jbc.M411638200
- Greenbaum, L., Rigbi, A., Lipshtat, N., Cilia, R., Tesei, S., Asselta, R., . . . Lerer, B. (2013). Association of nicotine dependence susceptibility gene, CHRNA5, with Parkinson's disease age at onset: gene and smoking status interaction. *Parkinsonism Relat Disord*, *19*(1), 72-76. doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.07.007
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *73*(7), 2424-2428.
- Gregory, A., Westaway, S. K., Holm, I. E., Kotzbauer, P. T., Hogarth, P., Sonek, S., . . . Hayflick, S. J. (2008). Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2). *Neurology*, *71*(18), 1402-1409. doi: 10.1212/01.wnl.0000327094.67726.28
- Grosso, A. R., Gomes, A. Q., Barbosa-Morais, N. L., Caldeira, S., Thorne, N. P., Grech, G., . . . Carmo-Fonseca, M. (2008). Tissue-specific splicing factor gene expression signatures. *Nucleic Acids Res*, *36*(15), 4823-4832. doi: 10.1093/nar/gkn463
- Haber, S., Deniau, J.-M., Groenewegen, H., O'Donnell, P., McGinty, J., & Baunez, C. (2005). The Ventral/Dorsal Divide: To Integrate or Separate. In J. P. Bolam, C. Ingham & P. Magill (Eds.), *The Basal Ganglia VIII* (Vol. 56, pp. 437-456): Springer US.
- Hadjigeorgiou, G. M., Xiromerisiou, G., Gourbali, V., Aggelakis, K., Scarmeas, N., Papadimitriou, A., & Singleton, A. (2006). Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset. *Mov Disord*, *21*(4), 534-539. doi: 10.1002/mds.20752
- Halliday, G. M., Del Tredici, K., & Braak, H. (2006). Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*(70), 99-103.
- Han, W., Liu, Y., Mi, Y., Zhao, J., Liu, D., & Tian, Q. (2015). Alpha-synuclein (SNCA) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *168B*(2), 123-134. doi: 10.1002/ajmg.b.32288
- Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M., & Masliah, E. (2001). beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron*, *32*(2), 213-223.
- Hauber, W. (1998). Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Prog Neurobiol*, *56*(5), 507-540.

- Hernan, M. A., Zhang, S. M., Rueda-deCastro, A. M., Colditz, G. A., Speizer, F. E., & Ascherio, A. (2001). Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol*, *50*(6), 780-786.
- Hicks, A. A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H. S., Sainz, J., . . . Sveinbjornsdottir, S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *52*(5), 549-555. doi: 10.1002/ana.10324
- Hodge, G. K., & Butcher, L. L. (1980). Pars compacta of the substantia nigra modulates motor activity but is not involved importantly in regulating food and water intake. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *313*(1), 51-67.
- Hoehn, M. M., & Yahr, M. D. (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, *17*(5), 427-442.
- Hoepken, H. H., Gispert, S., Azizov, M., Klinkenberg, M., Ricciardi, F., Kurz, A., . . . Auburger, G. (2008). Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression. *Exp Neurol*, *212*(2), 307-313. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.04.004
- Hoffman-Zacharska, D., Kozirowski, D., Ross, O. A., Milewski, M., Poznanski, J., Jurek, M., . . . Friedman, A. (2013). Novel A18T and pA29S substitutions in alpha-synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *19*(11), 1057-1060. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.07.011
- Holdorff, B. (2002). Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci*, *11*(1), 19-28. doi: 10.1076/jhin.11.1.19.9106
- Hong, Z., Shi, M., Chung, K. A., Quinn, J. F., Peskind, E. R., Galasko, D., . . . Zhang, J. (2010). DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain*, *133*(Pt 3), 713-726. doi: 10.1093/brain/awq008
- House, A. E., & Lynch, K. W. (2008). Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *J Biol Chem*, *283*(3), 1217-1221. doi: 10.1074/jbc.R700031200
- Hu, Y., Tang, B., Guo, J., Wu, X., Sun, Q., Shi, C., . . . Zhang, H. (2012). Variant in the 3' region of SNCA associated with Parkinson's disease and serum alpha-synuclein levels. *J Neurol*, *259*(3), 497-504. doi: 10.1007/s00415-011-6209-4
- Huang, Y., Rowe, D. B., & Halliday, G. M. (2011). Interaction between alpha-synuclein and tau genotypes and the progression of Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, *1*(3), 271-276. doi: 10.3233/JPD-2011-11027
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L., & Lees, A. J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *55*(3), 181-184.
- Hwang, O. (2013). Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol*, *22*(1), 11-17. doi: 10.5607/en.2013.22.1.11
- Ibanez, P., Bonnet, A. M., Debarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., . . . Brice, A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*, *364*(9440), 1169-1171. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17104-3
- Ikemura, M., Saito, Y., Sengoku, R., Sakiyama, Y., Hatsuta, H., Kanemaru, K., . . . Murayama, S. (2008). Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*, *67*(10), 945-953. doi: 10.1097/NEN.0b013e318186de48
- Ishii, R., Tokuda, T., Tatebe, H., Ohmichi, T., Kasai, T., Nakagawa, M., . . . El-Agnaf, O. M. (2015). Decrease in plasma levels of alpha-synuclein is evident in patients with Parkinson's disease after elimination of heterophilic antibody interference. *PLoS One*, *10*(4), e0123162. doi: 10.1371/journal.pone.0123162

- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H. A., . . . Saitoh, T. (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron*, *14*(2), 467-475.
- Izumi, Y., Morino, H., Oda, M., Maruyama, H., Udaka, F., Kameyama, M., . . . Kawakami, H. (2001). Genetic studies in Parkinson's disease with an alpha-synuclein/NACP gene polymorphism in Japan. *Neurosci Lett*, *300*(2), 125-127.
- Jakes, R., Spillantini, M. G., & Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*, *345*(1), 27-32.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *79*(4), 368-376. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045
- Jao, C. C., Der-Sarkissian, A., Chen, J., & Langen, R. (2004). Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(22), 8331-8336. doi: 10.1073/pnas.0400553101
- Jellinger, K. A. (2003). Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution--a pilot study. *Acta Neuropathol*, *106*(3), 191-201. doi: 10.1007/s00401-003-0725-y
- Jellinger, K. A. (2004). Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm*, *111*(10-11), 1219-1235. doi: 10.1007/s00702-004-0138-7
- Jellinger, K. A. (2012). Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov Disord*, *27*(1), 8-30. doi: 10.1002/mds.23795
- Jellinger, K. A., & Paulus, W. (1992). Clinico-pathological correlations in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg*, *94 Suppl*, S86-88.
- Ji, H., Liu, Y. E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., . . . Shi, Y. E. (1997). Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res*, *57*(4), 759-764.
- Kalivendi, S. V., Yedlapudi, D., Hillard, C. J., & Kalyanaraman, B. (2010). Oxidants induce alternative splicing of alpha-synuclein: Implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, *48*(3), 377-383. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.045
- Keren, H., Lev-Maor, G., & Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet*, *11*(5), 345-355. doi: 10.1038/nrg2776
- Khalaf, O., Fauvet, B., Oueslati, A., Dikiy, I., Mahul-Mellier, A. L., Ruggeri, F. S., . . . Lashuel, H. A. (2014). The H50Q mutation enhances alpha-synuclein aggregation, secretion, and toxicity. *J Biol Chem*, *289*(32), 21856-21876. doi: 10.1074/jbc.M114.553297
- Ki, C. S., Stavrou, E. F., Davanos, N., Lee, W. Y., Chung, E. J., Kim, J. Y., & Athanassiadou, A. (2007). The Ala53Thr mutation in the alpha-synuclein gene in a Korean family with Parkinson disease. *Clin Genet*, *71*(5), 471-473. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00781.x
- Kiely, A. P., Asi, Y. T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., . . . Holton, J. L. (2013). alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol*, *125*(5), 753-769. doi: 10.1007/s00401-013-1096-7
- Kim, S., Jeon, B. S., Heo, C., Im, P. S., Ahn, T. B., Seo, J. H., . . . Suh, Y. H. (2004). Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J*, *18*(13), 1615-1617. doi: 10.1096/fj.04-1917fje

- Kim, W. S., Kagedal, K., & Halliday, G. M. (2014). Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimers Res Ther*, *6*(5), 73. doi: 10.1186/s13195-014-0073-2
- Kingsbury, A. E., Daniel, S. E., Sangha, H., Eisen, S., Lees, A. J., & Foster, O. J. (2004). Alteration in alpha-synuclein mRNA expression in Parkinson's disease. *Mov Disord*, *19*(2), 162-170. doi: 10.1002/mds.10683
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., . . . Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*(6676), 605-608. doi: 10.1038/33416
- Kobayashi, H., Kruger, R., Markopoulou, K., Wszolek, Z., Chase, B., Taka, H., . . . Hattori, N. (2003). Haploinsufficiency at the alpha-synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain*, *126*(Pt 1), 32-42.
- Kobayashi, H., Ujike, H., Hasegawa, J., Yamamoto, M., Kanzaki, A., & Sora, I. (2006). Identification of a risk haplotype of the alpha-synuclein gene in Japanese with sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord*, *21*(12), 2157-2164. doi: 10.1002/mds.21142
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, *60*(4), 543-554. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005
- Kriventseva, E. V., Koch, I., Apweiler, R., Vingron, M., Bork, P., Gelfand, M. S., & Sunyaev, S. (2003). Increase of functional diversity by alternative splicing. *Trends Genet*, *19*(3), 124-128. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00023-4
- Kruger, R., Kuhn, W., Leenders, K. L., Sprengelmeyer, R., Muller, T., Woitalla, D., . . . Przuntek, H. (2001). Familial parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology*, *56*(10), 1355-1362.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., . . . Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, *18*(2), 106-108. doi: 10.1038/ng0298-106
- Kruger, R., Vieira-Saecker, A. M., Kuhn, W., Berg, D., Muller, T., Kuhl, N., . . . Riess, O. (1999). Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol*, *45*(5), 611-617.
- Kuusisto, E., Parkkinen, L., & Alafuzoff, I. (2003). Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *J Neuropathol Exp Neurol*, *62*(12), 1241-1253.
- Latourelle, J. C., Pankratz, N., Dumitriu, A., Wilk, J. B., Goldwurm, S., Pezzoli, G., . . . Molecular Genetic, L. (2009). Genomewide association study for onset age in Parkinson disease. *BMC Med Genet*, *10*, 98. doi: 10.1186/1471-2350-10-98
- Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., Tsiaras, W. G., Pezzoli, G., . . . Smith, R. J. (2008). Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, *82*(4), 822-833. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.01.015
- Lavedan, C. (1998). The synuclein family. *Genome Res*, *8*(9), 871-880.
- Lavedan, C., Leroy, E., Torres, R., Dehejia, A., Dutra, A., Buchholtz, S., . . . Polymeropoulos, M. H. (1998). Genomic organization and expression of the human beta-synuclein gene (SNCB). *Genomics*, *54*(1), 173-175. doi: 10.1006/geno.1998.5556
- Lee, H. J., Choi, C., & Lee, S. J. (2002). Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem*, *277*(1), 671-678. doi: 10.1074/jbc.M107045200

- Lee, P. H., Lee, G., Park, H. J., Bang, O. Y., Joo, I. S., & Huh, K. (2006). The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm*, *113*(10), 1435-1439. doi: 10.1007/s00702-005-0427-9
- Leisman, G., & Melillo, R. (2013). The basal ganglia: motor and cognitive relationships in a clinical neurobehavioral context. *Rev Neurosci*, *24*(1), 9-25. doi: 10.1515/revneuro-2012-0067
- Leroy, E., Boyer, R., & Polymeropoulos, M. H. (1998). Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1. *DNA Res*, *5*(6), 397-400.
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honore, A., Rozas, N., . . . French Parkinson's Disease Genetics Study, G. (2013). G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol*, *73*(4), 459-471. doi: 10.1002/ana.23894
- Lesage, S., & Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*, *18*(R1), R48-59. doi: 10.1093/hmg/ddp012
- Li, N. N., Mao, X. Y., Chang, X. L., Zhao, D. M., Zhang, J. H., Liao, Q., . . . Peng, R. (2013). SNCA rs356219 variant increases risk of sporadic Parkinson's disease in ethnic Chinese. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *162B*(5), 452-456. doi: 10.1002/ajmg.b.32143
- Li, Q. X., Campbell, B. C., McLean, C. A., Thyagarajan, D., Gai, W. P., Kapsa, R. M., . . . Culvenor, J. G. (2002). Platelet alpha- and gamma-synucleins in Parkinson's disease and normal control subjects. *J Alzheimers Dis*, *4*(4), 309-315.
- Li, Q. X., Mok, S. S., Loughton, K. M., McLean, C. A., Cappai, R., Masters, C. L., . . . Horne, M. K. (2007). Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol*, *204*(2), 583-588. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.12.006
- Linnertz, C., Saucier, L., Ge, D., Cronin, K. D., Burke, J. R., Browndyke, J. N., . . . Chiba-Falek, O. (2009). Genetic regulation of alpha-synuclein mRNA expression in various human brain tissues. *PLoS One*, *4*(10), e7480. doi: 10.1371/journal.pone.0007480
- Liu, S., & Altman, R. B. (2003). Large scale study of protein domain distribution in the context of alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, *31*(16), 4828-4835.
- Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, *11*(20), 2395-2407.
- Lowe, J., Blanchard, A., Morrell, K., Lennox, G., Reynolds, L., Billett, M., . . . Mayer, R. J. (1988). Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol*, *155*(1), 9-15. doi: 10.1002/path.1711550105
- Ltic, S., Perovic, M., Mladenovic, A., Raicevic, N., Ruzdijic, S., Rakic, L., & Kanazir, S. (2004). Alpha-synuclein is expressed in different tissues during human fetal development. *J Mol Neurosci*, *22*(3), 199-204.
- Luk, K. C., & Lee, V. M. (2014). Modeling Lewy pathology propagation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *20 Suppl 1*, S85-87. doi: 10.1016/S1353-8020(13)70022-1
- Ma, K. L., Yuan, Y. H., Song, L. K., Han, N., & Chen, N. H. (2011). Over-expression of alpha-synuclein 98 triggers intracellular oxidative stress and enhances susceptibility to rotenone. *Neurosci Lett*, *491*(2), 148-152. doi: 10.1016/j.neulet.2011.01.026

- Mamah, C. E., Lesnick, T. G., Lincoln, S. J., Strain, K. J., de Andrade, M., Bower, J. H., . . . Maraganore, D. M. (2005). Interaction of alpha-synuclein and tau genotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *57*(3), 439-443. doi: 10.1002/ana.20387
- Maraganore, D. M., de Andrade, M., Elbaz, A., Farrer, M. J., Ioannidis, J. P., Kruger, R., . . . Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease, C. (2006). Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA*, *296*(6), 661-670. doi: 10.1001/jama.296.6.661
- Markopoulou, K., Wszolek, Z. K., & Pfeiffer, R. F. (1995). A Greek-American kindred with autosomal dominant, levodopa-responsive parkinsonism and anticipation. *Ann Neurol*, *38*(3), 373-378. doi: 10.1002/ana.410380306
- Markopoulou, K., Wszolek, Z. K., Pfeiffer, R. F., & Chase, B. A. (1999). Reduced expression of the G209A alpha-synuclein allele in familial Parkinsonism. *Ann Neurol*, *46*(3), 374-381.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, *8*(8), 2804-2815.
- Massey, P. V., & Bashir, Z. I. (2007). Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci*, *30*(4), 176-184. doi: 10.1016/j.tins.2007.02.005
- Mata, I. F., Leverenz, J. B., Weintraub, D., Trojanowski, J. Q., Hurtig, H. I., Van Deerlin, V. M., . . . Zabetian, C. P. (2014). APOE, MAPT, and SNCA genes and cognitive performance in Parkinson disease. *JAMA Neurol*, *71*(11), 1405-1412. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1455
- Mata, I. F., Shi, M., Agarwal, P., Chung, K. A., Edwards, K. L., Factor, S. A., . . . Zabetian, C. P. (2010). SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol*, *67*(11), 1350-1356. doi: 10.1001/archneurol.2010.279
- McCarthy, J. J., Linnertz, C., Saucier, L., Burke, J. R., Hulette, C. M., Welsh-Bohmer, K. A., & Chiba-Falek, O. (2011). The effect of SNCA 3' region on the levels of SNCA-112 splicing variant. *Neurogenetics*, *12*(1), 59-64. doi: 10.1007/s10048-010-0263-4
- McLean, P. J., & Hyman, B. T. (2002). An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation. *Neurosci Lett*, *323*(3), 219-223.
- Michell, A. W., Luheshi, L. M., & Barker, R. A. (2005). Skin and platelet alpha-synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *381*(3), 294-298. doi: 10.1016/j.neulet.2005.02.030
- Miki, Y., Tomiyama, M., Ueno, T., Haga, R., Nishijima, H., Suzuki, C., . . . Wakabayashi, K. (2010). Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *469*(3), 357-359. doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.027
- Milber, J. M., Noorigian, J. V., Morley, J. F., Petrovitch, H., White, L., Ross, G. W., & Duda, J. E. (2012). Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease. *Neurology*, *79*(24), 2307-2314. doi: 10.1212/WNL.0b013e318278fe32
- Mitsui, J., Mizuta, I., Toyoda, A., Ashida, R., Takahashi, Y., Goto, J., . . . Tsuji, S. (2009). Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol*, *66*(5), 571-576. doi: 10.1001/archneurol.2009.72

- Mizuta, I., Satake, W., Nakabayashi, Y., Ito, C., Suzuki, S., Momose, Y., . . . Toda, T. (2006). Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, *15*(7), 1151-1158. doi: 10.1093/hmg/ddl030
- Modrek, B., & Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet*, *30*(1), 13-19. doi: 10.1038/ng0102-13
- Mollenhauer, B., Locascio, J. J., Schulz-Schaeffer, W., Sixel-Doring, F., Trenkwalder, C., & Schlossmacher, M. G. (2011). alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol*, *10*(3), 230-240. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70014-X
- Mori, S., Ueda, S., Yamada, H., Takino, T., & Sano, Y. (1985). Immunohistochemical demonstration of serotonin nerve fibers in the corpus striatum of the rat, cat and monkey. *Anat Embryol (Berl)*, *173*(1), 1-5.
- Mueller, J. C., Fuchs, J., Hofer, A., Zimprich, A., Lichtner, P., Illig, T., . . . Gasser, T. (2005). Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *57*(4), 535-541. doi: 10.1002/ana.20438
- Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci*, *20*(9), 3214-3220.
- Murray, I. V., Giasson, B. I., Quinn, S. M., Koppaka, V., Axelsen, P. H., Ischiropoulos, H., . . . Lee, V. M. (2003). Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry*, *42*(28), 8530-8540. doi: 10.1021/bi027363r
- Myhre, R., Toft, M., Kachergus, J., Hulihan, M. M., Aasly, J. O., Klungland, H., & Farrer, M. J. (2008). Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta Neurol Scand*, *118*(5), 320-327. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01019.x
- Nakai, M., Fujita, M., Waragai, M., Sugama, S., Wei, J., Akatsu, H., . . . Hashimoto, M. (2007). Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*, *358*(1), 104-110. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.108
- Nakajo, S., Omata, K., Aiuchi, T., Shibayama, T., Okahashi, I., Ochiai, H., . . . Nakamura, Y. (1990). Purification and characterization of a novel brain-specific 14-kDa protein. *J Neurochem*, *55*(6), 2031-2038.
- Nakajo, S., Shioda, S., Nakai, Y., & Nakaya, K. (1994). Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res*, *27*(1), 81-86.
- Neitzel, H. (1986). A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet*, *73*(4), 320-326.
- Neystat, M., Lynch, T., Przedborski, S., Kholodilov, N., Rzhetskaya, M., & Burke, R. E. (1999). Alpha-synuclein expression in substantia nigra and cortex in Parkinson's disease. *Mov Disord*, *14*(3), 417-422.
- Nichols, W. C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Halter, C. A., . . . Parkinson Study Group, P. i. (2005). Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet*, *365*(9457), 410-412. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17828-3

- Nishioka, K., Hayashi, S., Farrer, M. J., Singleton, A. B., Yoshino, H., Imai, H., . . . Hattori, N. (2006). Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *59*(2), 298-309. doi: 10.1002/ana.20753
- Olanow, C. W., Perl, D. P., DeMartino, G. N., & McNaught, K. S. (2004). Lewy-body formation is an aggregates-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol*, *3*(8), 496-503. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00827-0
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., & Wolozin, B. (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci*, *19*(14), 5782-5791.
- Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H. J., Mouritzen Dam, A., & Pakkenberg, H. (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *54*(1), 30-33.
- Pals, P., Lincoln, S., Manning, J., Heckman, M., Skipper, L., Hulihan, M., . . . Farrer, M. J. (2004). alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *56*(4), 591-595. doi: 10.1002/ana.20268
- Pan, F., Dong, H., Ding, H., Ye, M., Liu, W., Wu, Y., . . . Ding, X. (2012). SNP rs356219 of the alpha-synuclein (SNCA) gene is associated with Parkinson's disease in a Chinese Han population. *Parkinsonism Relat Disord*, *18*(5), 632-634. doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.01.025
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J., & Blencowe, B. J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, *40*(12), 1413-1415. doi: 10.1038/ng.259
- Pankratz, N., Nichols, W. C., Elsaesser, V. E., Pauciulo, M. W., Marek, D. K., Halter, C. A., . . . Parkinson Study Group, P. I. (2009). Alpha-synuclein and familial Parkinson's disease. *Mov Disord*, *24*(8), 1125-1131. doi: 10.1002/mds.22524
- Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Murrell, J., Rudolph, A., . . . Parkinson Study, G. (2003). Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet*, *12*(20), 2599-2608. doi: 10.1093/hmg/ddg270
- Pankratz, N., Wilk, J. B., Latourelle, J. C., DeStefano, A. L., Halter, C., Pugh, E. W., . . . Molecular Genetic, L. (2009). Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum Genet*, *124*(6), 593-605. doi: 10.1007/s00439-008-0582-9
- Papadimitriou, A., Veletza, V., Hadjigeorgiou, G. M., Patrikiou, A., Hirano, M., & Anastasopoulos, I. (1999). Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology*, *52*(3), 651-654.
- Parent, A., & Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev*, *20*(1), 91-127.
- Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, T. D., Park, J. H., Yang, C. H., & Kim, J. (2002). Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem*, *277*(32), 28512-28520. doi: 10.1074/jbc.M111971200
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., . . . Paetau, A. (2014). Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging*, *35*(9), 2180 e2181-2185. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024

- Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., & George, J. M. (2000). Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, *275*(44), 34393-34398. doi: 10.1074/jbc.M004851200
- Petersen, K., Olesen, O. F., & Mikkelsen, J. D. (1999). Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience*, *91*(2), 651-659.
- Peterson, A. C., Russell, J. D., Bailey, D. J., Westphall, M. S., & Coon, J. J. (2012). Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol Cell Proteomics*, *11*(11), 1475-1488. doi: 10.1074/mcp.O112.020131
- Petretto, E., Mangion, J., Pravanec, M., Hubner, N., & Aitman, T. J. (2006). Integrated gene expression profiling and linkage analysis in the rat. *Mamm Genome*, *17*(6), 480-489. doi: 10.1007/s00335-005-0181-1
- Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L., & Melki, R. (2012). Fibrillar alpha-synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells. *Biophys J*, *102*(12), 2894-2905. doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.050
- Pihlstrom, L., & Toft, M. (2011). Genetic variability in SNCA and Parkinson's disease. *Neurogenetics*, *12*(4), 283-293. doi: 10.1007/s10048-011-0292-7
- Plagnol, V., Uz, E., Wallace, C., Stevens, H., Clayton, D., Ozelik, T., & Todd, J. A. (2008). Extreme clonality in lymphoblastoid cell lines with implications for allele specific expression analyses. *PLoS One*, *3*(8), e2966. doi: 10.1371/journal.pone.0002966
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., . . . Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*(5321), 2045-2047.
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2012). Lewy pathology in gastric and duodenal biopsies in Parkinson's Disease. *Mov Disord*, *27*(6), 708. doi: 10.1002/mds.24993
- Pritzel, M., Brand, M., & Markowitsch, H. (2003). *Motorik Gehirn und Verhalten* (pp. 245-290): Spektrum Akademischer Verlag.
- Proukakis, C., Dudzik, C. G., Brier, T., MacKay, D. S., Cooper, J. M., Millhauser, G. L., . . . Schapira, A. H. (2013). A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*, *80*(11), 1062-1064. doi: 10.1212/WNL.0b013e31828727ba
- Puschmann, A., Wszolek, Z. K., Farrer, M., Gustafson, L., Widner, H., & Nilsson, C. (2009). Alpha-synuclein multiplications with parkinsonism, dementia or progressive myoclonus? *Parkinsonism Relat Disord*, *15*(5), 390-392. doi: 10.1016/j.parkreldis.2008.08.002
- Quadri, M., Fang, M., Picillo, M., Olgiati, S., Breedveld, G. J., Graafland, J., . . . Bonifati, V. (2013). Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat*, *34*(9), 1208-1215. doi: 10.1002/humu.22373
- Rajput, A., Vilarino-Guell, C., Rajput, M. L., Ross, O. A., Soto-Ortolaza, A. I., Lincoln, S. J., . . . Rajput, A. (2009). Alpha-synuclein polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Saskatchewan population. *Mov Disord*, *24*(16), 2411-2414. doi: 10.1002/mds.22795
- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., . . . Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, *38*(10), 1184-1191. doi: 10.1038/ng1884

- Reinhardt, P., Schmid, B., Burbulla, L. F., Schondorf, D. C., Wagner, L., Glatza, M., . . . Sterneckert, J. (2013). Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell*, *12*(3), 354-367. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.008
- Ritz, B., Rhodes, S. L., Bordelon, Y., & Bronstein, J. (2012). alpha-Synuclein genetic variants predict faster motor symptom progression in idiopathic Parkinson disease. *PLoS One*, *7*(5), e36199. doi: 10.1371/journal.pone.0036199
- Rospigliosi, C. C., McClendon, S., Schmid, A. W., Ramlall, T. F., Barre, P., Lashuel, H. A., & Eliezer, D. (2009). E46K Parkinson's-linked mutation enhances C-terminal-to-N-terminal contacts in alpha-synuclein. *J Mol Biol*, *388*(5), 1022-1032. doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.065
- Ross, C. A., & Akimov, S. S. (2014). Human-induced pluripotent stem cells: potential for neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, *23*(R1), R17-26. doi: 10.1093/hmg/ddu204
- Ross, O. A., Gosal, D., Stone, J. T., Lincoln, S. J., Heckman, M. G., Irvine, G. B., . . . Lynch, T. (2007). Familial genes in sporadic disease: common variants of alpha-synuclein gene associate with Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev*, *128*(5-6), 378-382. doi: 10.1016/j.mad.2007.04.002
- Roth, G., & Dicke, U. (2006). Funktionelle Neuroanatomie des limbischen Systems. In H. Förstl, M. Hautzinger & G. Roth (Eds.), *Neurobiologie psychischer Störungen* (pp. 1-74): Springer Berlin Heidelberg.
- Roy, S., & Wolman, L. (1969). Ultrastructural observations in Parkinsonism. *J Pathol*, *99*(1), 39-44. doi: 10.1002/path.1710990106
- Rutherford, N. J., & Giasson, B. I. (2015). The A53E alpha-synuclein pathological mutation demonstrates reduced aggregation propensity in vitro and in cell culture. *Neurosci Lett*, *597*, 43-48. doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.022
- Sakamoto, M., Uchihara, T., Hayashi, M., Nakamura, A., Kikuchi, E., Mizutani, T., . . . Hirai, S. (2002). Heterogeneity of nigral and cortical Lewy bodies differentiated by amplified triple-labeling for alpha-synuclein, ubiquitin, and thiazin red. *Exp Neurol*, *177*(1), 88-94.
- Samii, A., Nutt, J. G., & Ransom, B. R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet*, *363*(9423), 1783-1793. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16305-8
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(12), 5463-5467.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., . . . Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*, *41*(12), 1303-1307. doi: 10.1038/ng.485
- Schadt, E. E., Monks, S. A., Drake, T. A., Lusk, A. J., Che, N., Colino, V., . . . Friend, S. H. (2003). Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature*, *422*(6929), 297-302. doi: 10.1038/nature01434
- Schondorf, D. C., Aureli, M., McAllister, F. E., Hindley, C. J., Mayer, F., Schmid, B., . . . Deleidi, M. (2014). iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat Commun*, *5*, 4028. doi: 10.1038/ncomms5028

- Scott, D., & Roy, S. (2012). alpha-Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *J Neurosci*, *32*(30), 10129-10135. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0535-12.2012
- Seidel, K., Schols, L., Nuber, S., Petrasch-Parwez, E., Gierga, K., Wszolek, Z., . . . Kruger, R. (2010). First appraisal of brain pathology owing to A30P mutant alpha-synuclein. *Ann Neurol*, *67*(5), 684-689. doi: 10.1002/ana.21966
- Seki, N., Takahashi, Y., Tomiyama, H., Rogaeva, E., Murayama, S., Mizuno, Y., . . . Tsuji, S. (2011). Comprehensive mutational analysis of LRRK2 reveals variants supporting association with autosomal dominant Parkinson's disease. *J Hum Genet*, *56*(9), 671-675. doi: 10.1038/jhg.2011.79
- Shannon, K. M., Keshavarzian, A., Dodiya, H. B., Jakate, S., & Kordower, J. H. (2012). Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Mov Disord*, *27*(6), 716-719. doi: 10.1002/mds.25020
- Shi, M., Zabetian, C. P., Hancock, A. M., Ghingina, C., Hong, Z., Yearout, D., . . . Zhang, J. (2010). Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *480*(1), 78-82. doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.009
- Shibayama-Imazu, T., Okahashi, I., Omata, K., Nakajo, S., Ochiai, H., Nakai, Y., . . . Nakaya, K. (1993). Cell and tissue distribution and developmental change of neuron specific 14 kDa protein (phosphoneuroprotein 14). *Brain Res*, *622*(1-2), 17-25.
- Shults, C. W. (2006). Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(6), 1661-1668. doi: 10.1073/pnas.0509567103
- Sidhu, A., Wersinger, C., Moussa, C. E., & Vernier, P. (2004). The role of alpha-synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, *1035*, 250-270. doi: 10.1196/annals.1332.016
- Sidransky, E., Nalls, M. A., Aasly, J. O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E. R., . . . Ziegler, S. G. (2009). Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med*, *361*(17), 1651-1661. doi: 10.1056/NEJMoa0901281
- Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., . . . Gasser, T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*, *41*(12), 1308-1312. doi: 10.1038/ng.487
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., . . . Gwinn-Hardy, K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, *302*(5646), 841. doi: 10.1126/science.1090278
- Sotiriou, S., Gibney, G., Baxevanis, A. D., & Nussbaum, R. L. (2009). A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci Lett*, *461*(2), 196-201. doi: 10.1016/j.neulet.2009.06.034
- Souza, J. M., Giasson, B. I., Lee, V. M., & Ischiropoulos, H. (2000). Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Lett*, *474*(1), 116-119.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, *388*(6645), 839-840. doi: 10.1038/42166
- Spira, P. J., Sharpe, D. M., Halliday, G., Cavanagh, J., & Nicholson, G. A. (2001). Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr alpha-synuclein mutation. *Ann Neurol*, *49*(3), 313-319.

- Steinbusch, H. W. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, *6*(4), 557-618.
- Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D., . . . Kruger, R. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, *14*(15), 2099-2111. doi: 10.1093/hmg/ddi215
- Subedi, P. (2016). *Verwendung von molekular geprägten Polymeren für die Anreicherung von Phosphopeptiden und alpha-Synuclein sowie eine post-mortem Analyse des alpha-Synucleins in humanem Gehirn mittels Massenspektrometrie*. (Doktor der Naturwissenschaften Dissertation), Ruhr-Universität Bochum, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsbibliothek.
- Surguchov, A. (2008). Molecular and cellular biology of synucleins. *Int Rev Cell Mol Biol*, *270*, 225-317. doi: 10.1016/S1937-6448(08)01406-8
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*, *30*(5), 228-235. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.008
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Tan, E. K., Chandran, V. R., Fook-Chong, S., Shen, H., Yew, K., Teoh, M. L., . . . Zhao, Y. (2005). Alpha-synuclein mRNA expression in sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord*, *20*(5), 620-623. doi: 10.1002/mds.20391
- Tan, E. K., Matsuura, T., Nagamitsu, S., Khajavi, M., Jankovic, J., & Ashizawa, T. (2000). Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: an etiologic link with essential tremor? *Neurology*, *54*(5), 1195-1198.
- Tan, E. K., Peng, R., Teo, Y. Y., Tan, L. C., Angeles, D., Ho, P., . . . Wu, R. M. (2010). Multiple LRRK2 variants modulate risk of Parkinson disease: a Chinese multicenter study. *Hum Mutat*, *31*(5), 561-568. doi: 10.1002/humu.21225
- Tan, E. K., Shen, H., Tan, J. M., Lim, K. L., Fook-Chong, S., Hu, W. P., . . . Zhao, Y. (2005). Differential expression of splice variant and wild-type parkin in sporadic Parkinson's disease. *Neurogenetics*, *6*(4), 179-184. doi: 10.1007/s10048-005-0001-5
- Tanaka, M., Kim, Y. M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., & Mouradian, M. M. (2004). Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem*, *279*(6), 4625-4631. doi: 10.1074/jbc.M310994200
- Taubert, H., Bartel, F., Greither, T., Bache, M., Kappler, M., Kohler, T., . . . Wurl, P. (2008). Association of HDM2 transcript levels with age of onset and prognosis in soft tissue sarcomas. *Mol Cancer Res*, *6*(10), 1575-1581. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2150
- Tobe, T., Nakajo, S., Tanaka, A., Mitoya, A., Omata, K., Nakaya, K., . . . Nakamura, Y. (1992). Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel brain-specific 14-kDa protein. *J Neurochem*, *59*(5), 1624-1629.
- Toft, M., Mata, I. F., Kachergus, J. M., Ross, O. A., & Farrer, M. J. (2005). LRRK2 mutations and Parkinsonism. *Lancet*, *365*(9466), 1229-1230. doi: 10.1016/S0140-6736(05)74809-1
- Tokuda, T., Qureshi, M. M., Ardah, M. T., Varghese, S., Shehab, S. A., Kasai, T., . . . El-Agnaf, O. M. (2010). Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from

- patients with Parkinson disease. *Neurology*, 75(20), 1766-1772. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181fd613b
- Tompkins, M. M., & Hill, W. D. (1997). Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res*, 775(1-2), 24-29.
- Tozzi, A., de Iure, A., Di Filippo, M., Tantucci, M., Costa, C., Borsini, F., . . . Calabresi, P. (2011). The distinct role of medium spiny neurons and cholinergic interneurons in the D(2)/A(2)A receptor interaction in the striatum: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci*, 31(5), 1850-1862. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4082-10.2011
- Trevitt, J., Kawa, K., Jalali, A., & Larsen, C. (2009). Differential effects of adenosine antagonists in two models of parkinsonian tremor. *Pharmacol Biochem Behav*, 94(1), 24-29. doi: 10.1016/j.pbb.2009.07.001
- Tsigelny, I. F., Crews, L., Desplats, P., Shaked, G. M., Sharikov, Y., Mizuno, H., . . . Masliah, E. (2008). Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS One*, 3(9), e3135. doi: 10.1371/journal.pone.0003135
- Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., . . . Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 11282-11286.
- Ueda, K., Saitoh, T., & Mori, H. (1994). Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(2), 1366-1372. doi: 10.1006/bbrc.1994.2816
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem*, 103(1), 17-37. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04764.x
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., . . . Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158-1160. doi: 10.1126/science.1096284
- Vamvaca, K., Volles, M. J., & Lansbury, P. T., Jr. (2009). The first N-terminal amino acids of alpha-synuclein are essential for alpha-helical structure formation in vitro and membrane binding in yeast. *J Mol Biol*, 389(2), 413-424. doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.021
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7), RESEARCH0034.
- Vilarino-Guell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., . . . Farrer, M. J. (2014). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 23(7), 1794-1801. doi: 10.1093/hmg/ddt570
- Voutsinas, G. E., Stavrou, E. F., Karousos, G., Dasoula, A., Papachatzopoulou, A., Syrrou, M., . . . Athanassiadou, A. (2010). Allelic imbalance of expression and epigenetic regulation within the alpha-synuclein wild-type and p.Ala53Thr alleles in Parkinson disease. *Hum Mutat*, 31(6), 685-691. doi: 10.1002/humu.21248
- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., . . . Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456(7221), 470-476. doi: 10.1038/nature07509
- Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L. T., Liao, J., . . . Hoang, Q. Q. (2011). A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(43), 17797-17802. doi: 10.1073/pnas.1113260108

- Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., & Lansbury, P. T., Jr. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, *35*(43), 13709-13715. doi: 10.1021/bi961799n
- Winkler, S., Hagenah, J., Lincoln, S., Heckman, M., Haugarvoll, K., Lohmann-Hedrich, K., . . . Klein, C. (2007). alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility. *Neurology*, *69*(18), 1745-1750. doi: 10.1212/01.wnl.0000275524.15125.f4
- Wirdefeldt, K., Bogdanovic, N., Westerberg, L., Payami, H., Schalling, M., & Murdoch, G. (2001). Expression of alpha-synuclein in the human brain: relation to Lewy body disease. *Brain Res Mol Brain Res*, *92*(1-2), 58-65.
- Wolf, M. E. (2002). Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Mol Interv*, *2*(3), 146-157. doi: 10.1124/mi.2.3.146
- Wu, K., Quan, Z., Weng, Z., Li, F., Zhang, Y., Yao, X., . . . Shi, Y. E. (2007). Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat*, *101*(3), 259-267. doi: 10.1007/s10549-006-9296-7
- Xing, Y., Xu, Q., & Lee, C. (2003). Widespread production of novel soluble protein isoforms by alternative splicing removal of transmembrane anchoring domains. *FEBS Lett*, *555*(3), 572-578.
- Xu, J., Kao, S. Y., Lee, F. J., Song, W., Jin, L. W., & Yankner, B. A. (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med*, *8*(6), 600-606. doi: 10.1038/nm0602-600
- Yavich, L., Tanila, H., Vepsalainen, S., & Jakala, P. (2004). Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci*, *24*(49), 11165-11170. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2559-04.2004
- Yonetani, M., Nonaka, T., Masuda, M., Inukai, Y., Oikawa, T., Hisanaga, S., & Hasegawa, M. (2009). Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem*, *284*(12), 7940-7950. doi: 10.1074/jbc.M807482200
- Yu, L., Xu, P., He, X., Hu, F., Lin, Z., Zhu, M., . . . Xu, Y. (2010). SNP rs7684318 of the alpha-synuclein gene is associated with Parkinson's disease in the Han Chinese population. *Brain Res*, *1346*, 262-265. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.069
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., . . . de Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*, *55*(2), 164-173. doi: 10.1002/ana.10795
- Zimprich, A., Benet-Pages, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S. H., Offman, M. N., . . . Strom, T. M. (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, *89*(1), 168-175. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.008
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., . . . Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, *44*(4), 601-607. doi: 10.1016/j.neuron.2004.11.005
- Zwemer, L. M., Zak, A., Thompson, B. R., Kirby, A., Daly, M. J., Chess, A., & Gimelbrant, A. A. (2012). Autosomal monoallelic expression in the mouse. *Genome Biol*, *13*(2), R10. doi: 10.1186/gb-2012-13-2-r10