Funktionelle Charakterisierung von Mutationen im *Synphilin-1*- und *Parkin*-Gen bei der Parkinson-Krankheit

Bedeutung von Proteinaggregation und des Ubiquitin-Proteasomen-Systems für die Pathogenese der Parkinson-Krankheit

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

Frank Peter Marx

Tag der mündlichen Prüfung:	10.12.2004
Dekan:	Prof. Dr. S. Laufer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Schwarz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Rieß

Meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2001 bis Oktober 2004 im Neurodegenerationslabor der Neurologischen Klinik der Universität Tübingen und am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. M. Schwarz am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen durchgeführt.

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. M. Schwarz** danke ich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zu vertreten.

Herrn **Dr. R. Krüger** danke ich für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, für seine hervorragende Unterstützung und Betreuung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn **Prof. Dr. O. Rieß** danke ich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Dissertation zu erstellen, sowie für die interessanten, wissenschaftlichen Diskussionen.

Bei Herrn **Prof. Dr. J. B. Schulz** möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau **S. Kautzmann** für die ausgezeichnete, technische Unterstützung, ihre immer gute Laune im Laboralltag und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Bei den Kooperationspartnern Frau **Dr. D. Berg**, Herrn **Dr. M. Bonin**, Frau **Dr. E. Gerhardt** und Herrn **Dr. C. Holzmann** möchte ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, **Mathilde und Karl Josef Marx**, für das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben, und für ihre große, uneingeschränkte Unterstützung.

Sabine danke ich dafür, dass sie immer für mich da war und mir immer zur Seite stand, ganz besonders, wenn es mal nicht so gut lief.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wissenschaftliche Publikation:

Marx, F. P., Holzmann, C., Strauss, K. M., Li, L., Eberhardt, O., Gerhardt, E., Cookson, M. R., Hernandez, D., Farrer, M. J., Kachergus, J., Engelender, S., Ross, C. A., Berger, K., Schöls, L., Schulz, J. B., Rieß, O. und Krüger, R. (2003). Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. Hum. Mol. Genet. *12*, 1223-1231.

Tagungsbeiträge:

Poster:

Marx, F. P., Holzmann, C., Strauss, K. M., Li, L., Cookson, M. R., Farrer, M. J., Schulz, J. B., Rieß, O. und Krüger, R.
Identification and functional characterization of an R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease.
Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orlando 2002

Marx, F. P., Berg, D., Strauss, K. M., Dawson, S., Rieß, O., Schulz, J. B. und Krüger, R.
Identification of the proteasomal subunit S6-ATPase as a novel synphilin-1 interacting protein.
9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogenetik, Tübingen 2003

Marx, F. P., Holzmann, C., Strauss, K. M., Li, L., Eberhardt, O., Cookson, M. R., Hernandez, D., Farrer, M. J., Kachergus, J., Engelender, S., Ross, C. A., Berger, K., Schöls, L., Schulz, J. B., Rieß, O. und Krüger, R.
Functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease.
9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogenetik, Tübingen 2003
(Ausgezeichnet mit einem Posterpreis)

Marx, F. P., Berg, D., Dawson, S., Rieß, O., Schulz, J. B. und Krüger, R.
Parkinson's disease-associated mutant synphilin-1 mediates proteasomal inhibition and interacts with regulatory proteasomal protein S6.
The Movement Disorder Society's 8th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Rom 2004

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Prävalenz 1

1.2 Neuropathologie der Parkinson-Krankheit 1

1.3 Ätiologie der Parkinson-Krankheit 3

1.3.1 Umweltfaktoren 4

1.3.2 Mitochondriale Defekte 6

1.3.3 Oxidativer Stress 6

1.3.4 Genetische Faktoren 7

1.3.4.1 Gene beim familiären Parkinson-Syndrom und ihre Rolle bei der sporadischen Parkinson-Krankheit 7

1.3.4.2 Suszeptibilitäts- und Kandidatengene für die Parkinson-Krankheit 13

1.4 Molekulare Pathogenese der Parkinson-Krankheit 15

1.4.1 Proteinaggregation und Störungen des Ubiquitin-Proteasomen-Systems 15

1.5 Zielsetzung 21

2 MATERIAL UND METHODEN 23

2.1 Material 23

2.1.1 Geräte 23

2.1.2 Verbrauchsmaterial 25

2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien 26

2.1.4 Reagenziensets (*Kits*) 28

2.1.5 Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie 28

2.1.6 Lösungen und Puffer 29

2.1.6.1 SDS-PAGE und Western-Blotting 29

2.1.6.2 Agarose-Gelelektrophorese 31

2.1.6.3 RT-PCR 32
2.1.6.4 Zelllyse 32
2.1.6.5 Immunpräzipitation und His-*Pull-down* 32
2.1.6.6 Immunzytochemie 33
2.1.6.7 Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflusszytometrie 33
2.1.6.8 Proteasomen-Aktivitäts-Test 33
2.1.7 Kultivierung von Zellen 34
2.1.7.1 Zelllinien 34
2.1.7.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur 34
2.1.8 Kultivierung von Bakterien 35
2.1.8.1 Bakterienstämme 35
2.1.8.2 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien 35
2.1.9 Primer 36
2.1.9.1 PCR-Primer 36
2.1.9.2 Primer für die *in vitro*-Mutagenese 38
2.1.9.3 Sequenzierprimer 38
2.1.10 Plasmide 39
2.1.10.1 Expressions- und Klonierungsvektoren 39
2.1.10.2 Plasmid-Konstrukte 40
2.1.11 Antikörper 43

2.2 Methoden 44
2.2.1 Zellkultur, Transfektionen und Infektionen 44
2.2.1.1 Zellkultivierung 44
2.2.1.2 Teilen und Passagieren von Zellen 44
2.2.1.3 Steriles Einfrieren von Zellen 45
2.2.1.4 Steriles Auftauen von Zellen 45
2.2.1.5 Zellzahl-Bestimmung 45
2.2.1.6 Behandlung 46
2.2.1.7 Liposomen-vermittelte Transfektionen 46
2.2.1.8 Infektionen mit rekombinanten Adenoviren 46
2.2.2 Biochemische Methoden 47
2.2.2.1 Western-Blotting 47

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford 49
2.2.2.3 Immunpräzipitation 49
2.2.2.4 His-*Pull-down*-Assay 50
2.2.3 Molekularbiologische Methoden 50
2.2.3.1 Vermehrung und Präparation von Plasmiden 50
2.2.3.2 RT-PCR 53
2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 54
2.2.3.4 Klonierung 55
2.2.3.5 *In vitro*-Mutagenese 57
2.2.3.6 Herstellung rekombinanter Adenoviren nach dem AdEasy-System 58
2.2.3.7 Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix-Microarray-Technologie 60
2.2.4 Zellbiologische Methoden 62
2.2.4.1 Immunzytochemie 62
2.2.4.2 Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflusszytometrie 62
2.2.4.3 Proteasomen-Aktivitäts-Test 64
2.2.4.4 Bestimmung des *Steady-State-Levels* von Synphilin-1 65

3 ERGEBNISSE 66

3.1 Funktionelle Charakterisierung einer neuen R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen 66
3.1.1 Überexpression von Synphilin-1-EGFP-Fusionsprotein in HEK 293- und SH-SY5Y-Zellen 68
3.1.2 Einfluss proteasomaler Hemmung auf die Bildung der zytoplasmatischen Synphilin-1-Einschlüsse 70
3.1.3 Einfluss der Synphilin-1-Expression auf die Zell-Vitalität 72
3.1.4 Interaktion von Wt- und C621-Synphilin-1 mit α-Synuklein und Parkin 74
3.1.5 Charakterisierung der intrazytoplasmatischen Synphilin-1-Einschlüsse 76

3.1.6 Analyse der differentiellen Genexpression in Wt- und C621-Synphilin-1-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen 78
3.1.6.1 Ergebnisse der Microarray-Analyse 80
3.1.7 Zusammenfassung 84

3.2 Identifizierung der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase als neuen Interaktionspartner von Synphilin-1 84
3.2.1 Interaktion von Synphilin-1 mit der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase 85
3.2.2 Co-Lokalisation von Synphilin-1 und S6-ATPase 87
3.2.3 Identifizierung der S6-ATPase als Bestandteil von Lewy-Körpern in Gehirnen von Parkinson-Patienten 90
3.2.4 Einfluss der Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase auf die Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen 91
3.2.5 Einfluss der Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase auf die Proteasomen-Funktion und den Gehalt an Synphilin-1-Protein 92
3.2.6 Zusammenfassung 93

3.3 Charakterisierung einer neuen P159L-Mutation im *Parkin*-Gen 94
3.3.1 Einfluss der Überexpression von Wt- und mutiertem Parkin in HEK 293-Zellen 95
3.3.2 Zusammenfassung 97

4 DISKUSSION 98

4.1 Funktionelle Charakterisierung einer neuen R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen 98
4.1.1 Analyse der differentiellen Genexpression in Wt- und C621-Synphilin-1-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen 103

4.2 Identifizierung der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase als neuen Interaktionspartner von Synphilin-1 105

4.3 Charakterisierung einer neuen P159L-Mutation im *Parkin*-Gen 108

5 ZUSAMMENFASSUNG 110

6 LITERATURVERZEICHNIS 112

7 ANHANG 127

8 AKADEMISCHE LEHRER 131

9 LEBENSLAUF 132

Abkürzungen

AK	Alzheimer-Krankheit
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CDCrel-1	*Cell division control-related protein 1*
cDNA	*Complementary*-Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Transporter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFM	Einfriermedium
EGFP	*Enhanced green fluorescent protein*
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FBS	Fötales Rinderserum
g	Gravitationskonstante
GFP	*Green fluorescent protein*
HA	Hämagglutinin
HAc	Essigsäure
HK	Huntington-Krankheit
HRP	*Horseradish*-Peroxidase
Hsp70	*Heat shock protein* 70
IBR	*In-between* RING-Finger-Domäne

Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
ITR	*Inverted terminal repeat*
IZC	Immunzytochemie
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LK	Lewy-Körper
MAO-B	Monoaminooxidase-B
MOI	*Multiplicity of infection*
$MPDP^+$	1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion
MPP^+	1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	*Messenger*-RNA
Pael-Rezeptor	*Parkin-associated endothelin-like*-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Spektroskopie
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PINK1	PTEN-*induced putative kinase* 1
PK	Parkinson-Krankheit
PS	Parkinson-Syndrom
PT-Puffer	Proteasomen-Test-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase

SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLR	*Signal Log Ratio*
SNpc	*Substantia nigra pars compacta*
SSCP	*Single strand conformation polymorphism analysis*
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
UCH-L1	Ubiquitin-C-terminale Hydrolase-L1
UpM	Umdrehungen pro Minute
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
v/v	Volumenprozent (*volume per volume*)
VMAT2	Vesikulärer Monoamin-Transporter-2
w/v	Gewichtsprozent (*weight per volume*)
WB	Western-Blotting
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungen für Nukleoside bzw. Nukleotide:

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

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

1 Einleitung

Bei der Parkinson-Krankheit (PK), die auch als idiopatisches Parkinson-Syndrom (IPS) oder *Morbus Parkinson* bezeichnet wird, handelt es sich um eine chronisch progrediente, neurodegenerative Bewegungsstörung. Das schon seit dem Altertum unter dem Namen „Schüttellähmung" bekannte Krankheitsbild wurde erstmals 1817 von dem englischen Arzt James Parkinson (1755-1824) in der Monographie mit dem Titel „*An Essay on the Shaking Palsy*" detailliert beschrieben. Die PK ist durch die folgenden vier Kardinalsymptome gekennzeichnet: i) Verlangsamung der Bewegung bis hin zur Bewegungsunfähigkeit (*Bradykinese*, *Akinese*); ii) Zittern im Ruhezustand (Ruhe-*Tremor*); iii) Erhöhung des Muskeltonus (*Rigor*); iv) Reduzierte Stellreflexe (posturale Instabilität).

Vom IPS, dessen Ursachen noch weitgehend unbekannt sind, werden sogenannte sekundäre oder symptomatische Parkinson-Syndrome, die durch Medikamente (z.B. Neuroleptika), Gifte (z.B. Verunreinigungen synthetischer Drogen), Gefäßerkrankungen oder Entzündungen hervorgerufen werden, unterschieden.

1.1 Prävalenz

Nach der Alzheimer-Krankheit (AK) ist das IPS die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, wobei die Häufigkeit altersabhängig ist und zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr von 1,4 bis auf 3,4% zunimmt (de Rijk *et al.*, 1997). Die Mehrzahl der Fälle gilt als sporadisch. Bei ca. 10% der Betroffenen liegt jedoch eine positive Familienanamnese für ein IPS vor (familiäre Form des Parkinson-Syndroms; PS). In der Bundesrepublik Deutschland sind etwa 0,1% der Gesamtbevölkerung erkrankt.

1.2 Neuropathologie der Parkinson-Krankheit

Neuropathologisch ist die PK durch den Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) im Mittelhirn gekennzeichnet (Abbildung 1-1). Des weiteren findet man sogenannte Lewy-Körper (LK) in Neuronen der *Substantia nigra*, aber auch in anderen Regionen des Nervensystems (Gibb, 1986).

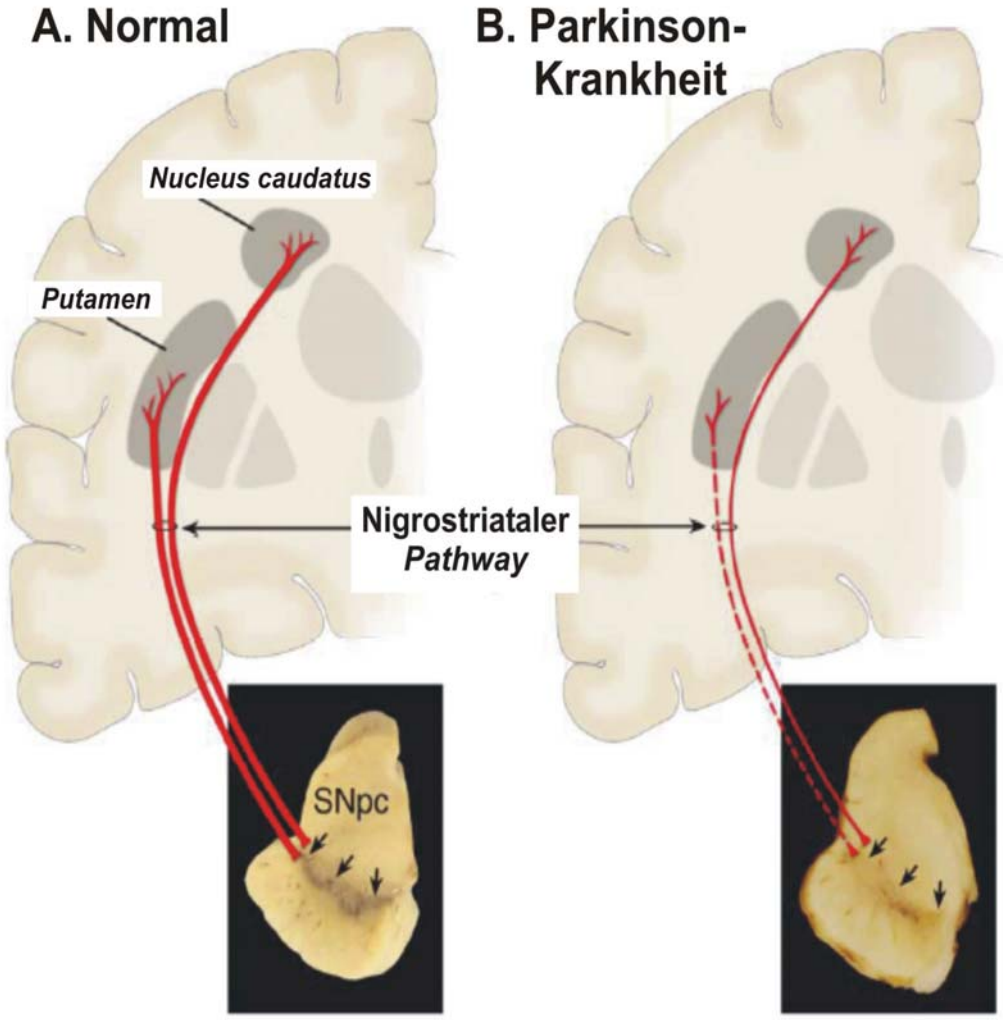


Abbildung 1-1: Neuropathologie der PK (modifiziert nach Dauer und Przedborski, 2003). **(A)** Schematische Darstellung der normalen striatalen Verschaltung (in rot). Die Zellkörper der dopaminergen Neurone befinden sich in der SNpc (siehe Pfeile). Diese Neurone projizieren (dicke rote Linien) in die Basalganglien und bilden Synapsen im *Striatum* (z.B. im *Putamen* und *Nucleus caudatus*). Die normale Pigmentierung der SNpc, die durch Neuromelanin in den dopaminergen Neuronen hervorgerufen wird, ist durch Pfeile gekennzeichnet. **(B)** Pathologisches Bild. Bei der PK kommt es zu einem starken Verlust an dopaminergen Neuronen, die ins *Putamen* projizieren (gestrichelte rote Linie). Der Verlust dopaminerger Neurone, die in den *Nucleus caudatus* projizieren, ist weniger stark ausgeprägt (dünne rote Linie). Durch den Verlust der dopaminergen Neurone kommt es zu einer Depigmentierung der SNpc (siehe Pfeile).

LK wurden erstmals 1912 von ihrem Namensgeber Friedrich Lewy beschrieben. Es handelt sich hierbei um intraneuronale, proteinhaltige, zytoplasmatische Einschlüsse mit dichtem, eosinophilen Kernbereich und hellem Randbereich (Abbildung 1-2). In Gehirnen von Parkinson-Patienten werden LK hauptsächlich in der SNpc und im *Locus coeruleus* gefunden (Gibb, 1986; Pollanen *et al.*, 1993).

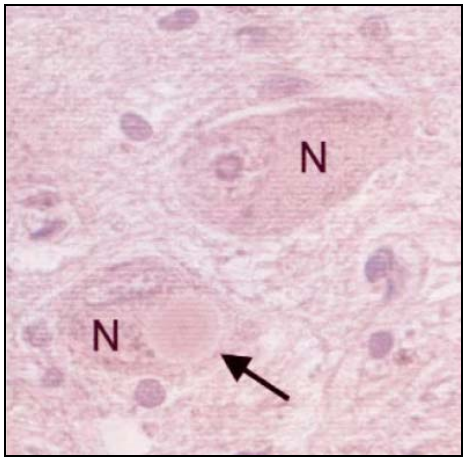


Abbildung 1-2: Hämatoxilin-Eosin-Färbung eines LK (Pfeil) in der *Substantia nigra* eines Patienten mit IPS (aus Rieß *et al.*, 1999). Zellkerne sind blau gefärbt.

Das Absterben der dopaminergen Neurone führt letztendlich zu einem Mangel an Dopamin (DA) in der SNpc und im *Striatum*. Dieser Mangel führt zu der für die PK typischen, motorischen Symptomatik, die durch die Gabe von L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) gemildert werden kann. L-DOPA ist eine DA-Vorläufersubstanz, die im Gegensatz zu DA die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Durch Decarboxylierung wird L-DOPA zu DA umgewandelt. Die Therapien mit L-DOPA und anderen Dopaminagonisten sind symptomatisch und können das Absterben der dopaminergen Neurone und damit das Fortschreiten der Krankheit nicht aufhalten. Zur Entwicklung neuroprotektiver Therapien müssen die Ursachen der PK und ihre molekulare Pathogenese besser verstanden werden.

1.3 Ätiologie der Parkinson-Krankheit

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie der PK noch nicht geklärt. Diskutiert werden Umweltfaktoren, mitochondriale Defekte, oxidativer Stress und genetische Faktoren, die alleine oder in Kombination für die Symptomatik der PK verantwortlich sein können.

1.3.1 Umweltfaktoren

Epidemiologische Studien deuten auf eine Vielzahl von Faktoren hin, die das Risiko, an der PK zu erkranken, erhöhen können. Dazu zählen unter anderem der Konsum von Brunnenwasser (Nitrate), Pestizid- und Herbizidexposition, das Arbeiten in der Landwirtschaft oder der holzverarbeitenden Industrie und das Leben in ländlichen Regionen (Olanow und Tatton, 1999).

Die Hypothese, dass Umweltgifte eine Rolle bei der Entstehung der PK spielen, wird durch die Beobachtung gestützt, dass das Toxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) schwere Parkinson-ähnliche Störungen hervorruft. MPTP tritt als Nebenprodukt bei der Synthese des Meperidin-Analogs 1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidin (MPPP), das in den frühen 80er Jahren in Nord-Kalifornien als synthetische Droge gehandelt wurde (Langston *et al.*, 1983). Die intravenöse Injektion der mit MPTP verunreinigten synthetischen Droge führte bei jungen Drogenabhängigen zu einer schweren Parkinson-ähnlichen Symptomatik.

Das lipophile MPTP kann die Blut-Hirn-Schranke passieren (Markey *et al.*, 1984). Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird es zunächst in Gliazellen und serotonergen Neuronen durch die Monoaminooxidase-B (MAO-B) zum 1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion ($MPDP^+$) oxidiert, welches dann wahrscheinlich spontan zum toxischen Agens 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion (MPP^+) oxidiert. Über einen noch unbekannten Mechanismus wird MPP^+ in den Extrazellulärraum freigesetzt. Über den Dopamin-Transporter (DAT) kann es dann von dopaminergen Neuronen aufgenommen werden (Chiba *et al.*, 1985; Javitch *et al.*, 1985). In den Neuronen kann MPP^+ mit zytosolischen Enzymen interagieren (Klaidman *et al.*, 1993), sich in Mitochondrien anreichern (Ramsay und Singer, 1986) oder über den vesikulären Monoamin-Transporter-2 (VMAT2) in synaptischen Vesikeln aufgenommen werden (Liu *et al.*, 1992). Dabei scheint die Aufnahme in Vesikel protektiv zu sein. In den Mitochondrien hemmt MPP^+ den Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette (Nicklas *et al.*, 1985). Diese Hemmung führt zu einem ATP-Mangel im Gewebe (Chan *et al.*, 1991), der zur Neurodegeneration führt. Des weiteren kann die Hemmung des Komplex I über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu oxidativem Stress führen

(Hasegawa *et al.*, 1990, 1997), über den sich die neurotoxische Wirkung von MPP^+ erklären lässt.

Aus epidemiologischen Studien gibt es Hinweise, dass Pestizid- und Herbizidexposition Risikofaktoren für die PK darstellen können. In diesem Zusammenhang ist das Herbizid Paraquat zu erwähnen, das eine strukturelle Ähnlichkeit zu MPP^+, dem toxischen Metoboliten von MPTP, aufweist (Abbildung 1-1). Das Insektizid Rotenon wirkt wie MPP^+ durch die Hemmung von Komplex I der Atmungskette als Mitochondrien-Gift.

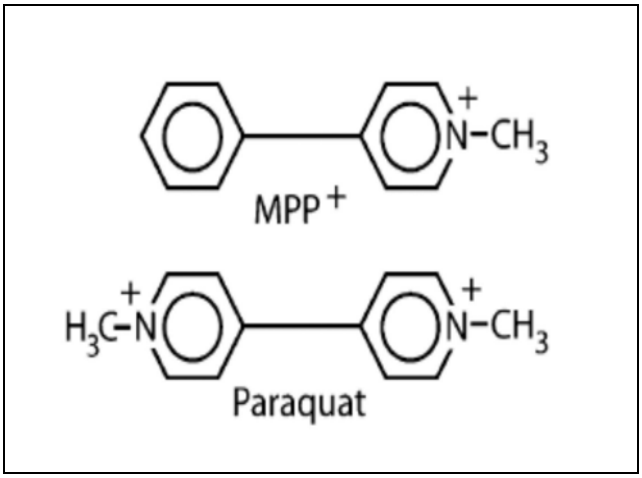


Abbildung 1-3: Strukturelle Ähnlichkeit von MPP^+ und Paraquat (aus Dauer und Przedborski, 2003). Der einzige Unterschied zwischen den beiden Molekülen besteht darin, dass Paraquat anstelle der Phenylgruppe eine zweite N-Methyl-pyridinium-Gruppe trägt.

Theoretisch könnte eine Langzeitexposition mit geringen Dosen MPTP-ähnlicher Stoffe zu Neurodegeneration führen. Bis jetzt konnte jedoch keine derartige Substanz in Gehirnen von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden. Es erscheint auch unwahrscheinlich, dass eine chronische Paraquat- oder Rotenon-Exposition zur PK führen, da Paraquat die Blut-Hirn-Schranke nicht leicht passieren kann und Rotenon in Lösung relativ instabil ist (Dauer und Przedborski., 2003; Übersichtsartikel).

Aus den genannten Gründen wird zur Zeit davon ausgegangen, dass nicht ein bestimmtes Umweltgift als alleiniger Auslöser für die PK in Frage kommt. Es wird angenommen, dass eine Kombination aus Umwelteinflüssen und anderen Faktoren wie z.B. einer genetischen Prädisposition das Risiko, an der PK zu erkranken, erhöhen kann.

1.3.2 Mitochondriale Defekte

Neben der Beobachtung, dass der Komplex I-Inhibitor MPP^+ zu Neurodegeneration und einer Parkinson-ähnlichen Symptomatik führt, gibt es weitere Hinweise für eine Dysfunktion der Mitochondrien bei der Entstehung der PK (Dawson und Dawson, 2003; Übersichtsartikel). In *Postmortem*-Studien konnten oxidative Schädigungen in Gehirnen von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Komplex I-Aktivität in der SNpc von Parkinson-Patienten vermindert ist (Schapira *et al.*, 1990). In Thrombozyten von Parkinson-Patienten konnte ebenfalls eine verminderte Komplex I-Aktivität nachgewiesen werden (Parker *et al.,* 1989). Es wird spekuliert, dass möglicherweise Defekte im mitochondrialen Genom für die verminderte Komplex I-Aktivität verantwortlich sind. Dies können Mutationen oder durch oxidativen Stress hervorgerufene Defekte in der mitochondrialen DNA sein. Bis jetzt konnte jedoch keine Mutation in einem mitochondrialen Gen identifiziert werden. Allerdings wurden kürzlich Mutationen im *PINK1*-Gen, das für das mitochondrial lokalisierte Protein PTEN-*induced putative kinase* 1 (PINK1) kodiert, bei einer familiären Form des PS identifiziert (Valente *et al.*, 2004; siehe unten).

1.3.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung und Entgiftung von ROS in der Zelle kommt. ROS können mit nahezu allen wichtigen Molekülen in der Zelle reagieren und diese schädigen. Die *Substantia nigra*, die bei der PK primär geschädigt ist, ist für oxidativen Stress prädisponiert. Beim Dopamin-Metabolismus kommt es zur Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und anderer ROS (Olanow und Tatton, 1999; Übersichtsartikel). In verschiedenen Studien konnten erhöhte Eisen-Konzentrationen in der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Olanow und Youdim, 1996). Reaktives Eisen (Fe^{2+}) katalysiert in der nicht-enzymatischen Fenton-Reaktion die Bildung des hoch-reaktiven Hydroxylradikals aus Wasserstoffperoxid.

Für eine Rolle von oxidativem Stress bei der Pathogenese der PK spricht, dass in der SNpc von Parkinson-Patienten eine verstärkte Lipidperoxidation nachgewiesen werden konnte. Ferner wurden oxidative DNA- und Protein-Schädigungen in der SNpc sowie in anderen Gehirnregionen beobachtet (Olanow und Tatton, 1999; Übersichtsartikel). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die beobachteten oxidativen Schädigungen einen Auslöser für die Neurodegeneration darstellen oder ob es sich dabei nur um einen Sekundäreffekt handelt.

1.3.4 Genetische Faktoren

Die Beteiligung genetischer Faktoren an der Entstehung der PK war lange Zeit umstritten. Erste Zwillingsstudien sprachen eher dagegen, da monozygote Zwillinge im Vergleich zu dizygoten Zwillingen keine erhöhte Konkordanz für die PK aufwiesen (Duvoisin *et al.*, 1981; Ward *et al.*, 1983; Marttila *et al.*, 1988; Vieregge *et al.*, 1992; Tanner *et al.*, 1999; Vieregge *et al.*, 1999). Ein Problem bei diesen Querschnittstudien war jedoch, dass subklinische PS nicht erfasst wurden. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Konkordanzraten bei diesen Studien generell zu niedrig bewertet wurden. In longitudinalen Studien, bei denen eine dopaminerge Dysfunktion mittels Positronen-Emissions-Spektroskopie (PET) unter Verwendung von [^{18}F]-DOPA bestimmt wurde, konnten bei monozygoten Zwillingen eine im Vergleich zu dizygoten Zwillingen signifikant höhere Konkordanzrate festgestellt werden (Piccini *et al.*, 1999), was für eine Beteiligung genetischer Faktoren spricht.

1.3.4.1 Gene beim familiären Parkinson-Syndrom und ihre Rolle bei der sporadischen Parkinson-Krankheit

In genetischen Untersuchungen bei Familien, in denen das PS als ein autosomal-dominantes oder autosomal-rezessives Merkmal vererbt wird, konnten 11 Genorte (Loci) definiert werden, die Krankheitsgene für das PS enthalten. Fünf Gene, die mit einem familiären PS assoziiert sind, konnten mittlerweile identifiziert werden (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1998; Bonifati *et al.*, 2003; Valente *et al.*, 2004). Somit gilt die Beteiligung genetischer Faktoren an der Entstehung der PK mittlerweile als gesichert. Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die bis heute bekannten Loci und Gene bei familiären Formen des PS. Es

gibt mittlerweile vermehrt Hinweise dafür, dass einige dieser Gene, die eine Rolle bei den erblichen Formen der PK spielen, auch bei den häufigeren sporadischen Formen der PK als Suszeptibilitätsfaktoren wirken können. Im folgenden wird näher auf die identifizierten Gene eingegangen.

Tabelle 1-1: Gene und Loci bei familiären Formen des PS.

Lokus	**Gen**	**Chromosomale Lokalisation**	**Vererbungsmodus**
PARK1	*α-Synuklein*	4q21-23	autosomal-dominant
PARK2	*Parkin*	6q25.2-27	autosomal-rezessiv
PARK3	unbekannt	2p13	autosomal-dominant
PARK4	*α-Synuklein*	4p15	autosomal-dominant
PARK5	*UCH-L1*	4p14	autosomal-dominant
PARK6	*PINK1*	1p35-p36	autosomal-rezessiv
PARK7	*DJ-1*	1p36	autosomal-rezessiv
PARK8	unbekannt	12p11-q13.1	autosomal-dominant
PARK9	unbekannt	1p36	autosomal-rezessiv
PARK10	unbekannt	1p32	autosomal-dominant
PARK11	unbekannt	2q36-37	autosomal-dominant

- ***PARK1 - α-Synuklein***

1996 konnte von Polymeropoulos und Mitarbeitern der erste Krankheitslokus (*PARK1*) für eine autosomal-dominant vererbte Form des PS in einer großen Familie italienischen Ursprungs auf den langen Arm von Chromosom 4 kartiert werden (Polymeropoulos *et al.*, 1996). Die Kandidatenregion enthielt das *α-Synuklein*-Gen, das für ein Protein mit noch weitgehend unbekannter Funktion kodiert. In derselben Familie konnte eine krankheitsauslösende Mutation im *α-Synuklein*-Gen identifiziert werden, die zu einem Aminosäure (AS)-Austausch von Alanin zu Threonin in Position 53 (A53T) des α-Synuklein-Proteins führt (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Mittlerweile konnten zwei weitere *Missense*-Mutationen im *α-Synuklein*-Gen identifiziert werden, eine A30P-Mutation bei einer deutschen Familie (Krüger *et al.*, 1998) und eine E46K-Mutation in einer spanischen Familie (Zarranz *et al.*, 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in einer Familie mit autosomal-dominant vererbtem PS eine Triplikation des *α-Synuklein*-Gens krankheitsauslösend ist (Singleton *et al.*, 2003). Wie auch bei weiteren Familien konnte nachgewiesen werden, dass die Triplikation des *α-Synuklein*-Gens zu einer Verdopplung der Expressionsrate des α-Synuklein-Proteins führt (Farrer *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004). Neben Punktmutationen scheint demnach die Dosis von Wildtyp (Wt)-α-Synuklein ein kritischer Faktor für die Entstehung des PS zu sein. Möglicherweise führen erhöhte Proteinkonzentrationen der Wt-Form von α-Synuklein zu einer Störung der Proteindegradation sowie zu einer vermehrten Akkumulation und Aggregation von α-Synuklein und damit zur Neurodegeneration.

α-Synuklein ist ein wesentlicher Bestandteil von LK nicht nur in Gehirnen von Mutationsträgern sondern auch in Gehirnen sporadischer Parkinson-Patienten (Spillantini *et al.*, 1998). In umfassenden Mutations-Analysen bei einer großen Anzahl von Patienten mit sporadischer PK konnten allerdings keine Mutationen in der kodierenden Sequenz und in angrenzenden intronischen Sequenzen des *α-Synuklein*-Gens gefunden werden (Krüger *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 1998). Es konnte jedoch ein Dinukleotid-*Repeat*-Polymorphismus in der Promotorregion des *α-Synuklein*-Gens identifiziert werden, der mit der sporadischen Form der PK

assoziiert ist (Krüger *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2000). Für dieses Suszeptibilitäts-Allel konnte ein regulatorischer Einfluss auf die Expression des *α-Synuklein*-Gens nachgewiesen werden (Touchman *et al.*, 2001).

Die Bedeutung von α-Synuklein im Rahmen der Pathogenese der PK konnte auch in transgenen Tiermodellen (Drosophila- und Mausmodell) mit Überexpression von Wt-, A30P- und A53T-α-Synuklein durch den Nachweis altersabhängiger, progressiver Bewegungsstörungen und einer selektiven Degeneration dopaminerger Neurone bestätigt werden (Feany und Bender, 2000; Masliah *et al.*; 2000). Im Drosophila-Modell konnten zusätzlich intrazytoplasmatische α-Synuklein-positive Proteineinschlüsse nachgewiesen werden (Feany und Bender, 2000).

Die normale physiologische Funktion von α-Synuklein ist noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass dieses Protein an der Modulation der synaptischen Plastizität und der Regulation der dopaminergen Neurotransmission beteiligt ist (Mouradian, 2002).

- ***PARK2 - Parkin***

Von Kitada und Mitarbeitern konnte erstmals gezeigt werden, dass Deletionen im *Parkin*-Gen ursächlich für ein früh beginnendes, autosomal-rezessiv vererbtes PS sind (Kitada *et al.*, 1998). Mittlerweile sind eine Vielzahl verschiedener *Parkin*-Mutationen, darunter Deletionen, Duplikationen und Punktmutationen, identifiziert worden (Mata *et al.*, 2004; Übersichtsartikel). Klinisch hat das *Parkin*-Gen die größte Bedeutung aller bisher identifizierten Gene, da für ca. 49% aller familiären und ca. 19% der sporadischen Parkinson-Fälle mit frühem Krankheitsbeginn (Durchschnittsalter bei Krankheitsbeginn < 45 Jahre) *Parkin*-Mutationen verantwortlich sind (Lücking *et al.*, 2000). Dabei ist neuropathologisch die Degeneration dopaminerger Neurone in der SNpc charakteristisch. Mit Ausnahme einer Familie konnten bei Mutationsträgern keine LK in krankheitsrelevanten Hirnregionen nachgewiesen werden (Farrer *et al.*, 2001).

Das Parkin-Protein enthält eine Ubiquitin-ähnliche Domäne im N-terminalen Bereich und zwei RING-Finger-Motive sowie eine sogenannte *In-between* RING-

Finger-Domäne (IBR) im C-terminalen Bereich (Morett und Bork, 1999). Wie andere Proteine mit RING-Finger-Motiven weist auch Parkin eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität auf (Shimura *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). E3-Ubiquitin-Protein-Ligasen sind Bestandteile des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS) und im Zusammenspiel mit Ubiquitin-aktivierenden E1- und Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzymen an der Polyubiquitinierung von Proteinen beteiligt. Sie vermitteln dabei die Substratspezifität (Pickart, 2001; Übersichtsartikel). Polyubiquitinierte Proteine werden vom 26S-Proteasom erkannt und degradiert. Die meisten der identifizierten Mutationen im *Parkin*-Gen führen zum Verlust der E3-Ligase-Aktivität von Parkin (*loss of function*-Mutationen), so dass eine Störung der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation als ursächlich für die Neurodegeneration angenommen wird (Shimura *et al.*, 2000). Es konnten jedoch auch einige heterozygote Mutationen im *Parkin*-Gen bei Patienten mit späterem Krankheitsbeginn identifiziert werden (Foroud *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003). Von diesen möglichen Suszeptibilitäts-Allelen für ein spät beginnendes PS wurde die R275W-Mutation bereits *in vitro* funktionell charakterisiert, wobei sich Hinweise auf einen *toxic gain of function* als pathogenetisches Merkmal ergaben (Cookson *et al.*, 2003).

- ***PARK5 - UCH-L1***

Ausgehend von der Hypothese einer gesteigerten Proteinaggregation bzw. eines gestörten Proteinabbaus bei der Pathogenese des IPS gelang Leroy und Kollegen die Identifikation der I93M-Mutation im Gen, das für die Ubiquitin-C-terminale Hydrolase-L1 (UCH-L1) kodiert, in einer deutschen Familie mit autosomal-dominant vererbtem PS (Leroy *et al.*, 1998). UCH-L1 katalysiert die Spaltung von Polyubiquitin-Ketten und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Wiedergewinnung von Ubiquitinmonomeren im Rahmen der Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Degradation von Proteinen. UCH-L1 konnte auch als Bestandteil von LK in Gehirnen von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden. Bis jetzt konnte keine weitere krankheitsauslösende Mutation im *UCH-L1*-Gen gefunden werden. Aus Assoziations-Studien gibt es jedoch Hinweise für eine Rolle des *UCH-L1*-Gens bei der sporadischen Form der PK. Es konnte ein S18Y-

Polymorphismus identifiziert werden, der mit einem verminderten PK-Risiko assoziiert ist (Wintermeyer *et al.*, 2000). UCH-L1 besitzt eine Hydrolase- und eine Ligase-Funktion. In funktionellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei der I93M-UCH-L1-Variante die Ligase-Funktion überwiegt. Dies führt *in vitro* zu einer vermehrten α-Synuklein-Akkumulation (Liu *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu scheint das verminderte PS-Risiko im Falle der S18Y-Variante des UCH-L1-Proteins auf einer verminderten Ligase-Funktion bei gleichbleibender Hydrolase-Funktion zu beruhen (Liu *et al.*, 2002).

- ***PARK6 - PINK1***

Kürzlich konnten Mutationen im *PINK1*-Gen als ursächlich für eine autosomal-rezessive Form des PS identifiziert werden (Valente *et al.*, 2004). *PINK1* kodiert für ein in den Mitochondrien lokalisiertes Protein. Die Wt-Form des Proteins schützt im Gegensatz zu den mutierten Formen gegen Stress-induzierte mitochondriale Dysfunktion und Apoptose, so dass von einem pathologischen *loss of function* ausgegangen wird (Valente *et al.*, 2004). Die Entdeckung dieses Gens stellt erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen mitochondrialen Defekten, wie sie beim IPS beobachtet werden, und einem mitochondrial lokalisierten Protein her.

- ***PARK7 - DJ-1***

Von Bonifati und Kollegen konnten zwei Mutationen, eine große, homozygote genomische Deletion und eine Punktmutation, die zum Austausch der AS Leucin durch Prolin in Position 166 (L166P) der DJ-1-AS-Sequenz führt, im *DJ-1*-Gen als ursächlich für eine autosomal-rezessiv vererbte Form des PS identifiziert werden (Bonifati *et al.*, 2003). Die physiologische Funktion von DJ-1 ist unbekannt. Es wird angenommen, dass dieses Protein eine Rolle bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress spielt (Mitsumoto und Nakagawa, 2001; Canet-Aviles *et al.*, 2004). In Strukturuntersuchungen konnten Ähnlichkeiten zwischen DJ-1 und bakteriellen HSP31-Homologen festgestellt werden. Dies deutet auf eine mögliche Chaperon-Funktion von DJ-1 hin (Quigley *et al.*, 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass unter oxidativen Bedingungen ein Cystein-Rest in

Position 106 von DJ-1 zu Cysteinsulfinsäure oxidiert wird (Canet-Aviles *et al.*, 2004). Dies hat den Import von DJ-1 in Mitochondrien zur Folge und schützt *in vitro* gegen das Mitochondrien-Gift MPP^+ (Canet-Aviles *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass DJ-1 ein zellulärer Sensor für oxidativen Stress ist und protektiv wirkt. Erste Studien weisen darauf hin, dass *DJ-1*-Mutationen eine seltene Ursache für das PS sind (Lockhart *et al.*, 2004).

1.3.4.2 Suszeptibilitäts- und Kandidatengene für die Parkinson-Krankheit

In Kandidatengen-Ansätzen, bei denen Gene aufgrund ihrer Funktion für ein Mutations-*Screening* ausgewählt wurden, konnten Mutationen im *Nurr1*- und *Neurofilament M*-Gen identifiziert werden, die mit der PK assoziiert sind. Synphilin-1, ein Protein mit noch weitgehend unbekannter Funktion, wurde in einem *Yeast-two-hybrid-screen* als α-Synuklein-interagierendes Protein identifiziert (Engelender *et al.*, 1999). Hinweise für eine mögliche Rolle von Synphilin-1 bei der Pathogenese der PK kommen aus Untersuchungen in Zellkultur-Modellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression von Synphilin-1 und NAC, einem α-Synuklein-Fragment, zu LK-ähnlichen, eosinophilen, intrazytoplasmatischen Aggregaten in HEK 293-Zellen führt (Engelender *et al.*, 1999). Daher ist das *Synphilin-1*-Gen ein guter Kandidat für ein Mutations-*Screening* bei Patienten mit familiärem und sporadischem PS.

- ***Nurr1 (nuclear receptor-related 1)***

Das *Nurr1*-Gen, auch als *NR4A2*-Gen bezeichnet, kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung und das Überleben dopaminerger Neurone essentiell ist (Zetterström *et al.*, 1997; Saucedo-Cardenas *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 1998). Aufgrund seiner Funktion kam *Nurr1* als Kandidatengen für die PK in Frage. Von Le und Mitarbeitern konnten zwei Mutationen im *Nurr1*-Gen bei 10 von 107 Patienten mit familiärem PS gefunden werden (Le *et al.*, 2003). Beide Mutationen führen in transfizierten Zelllinien sowie in Lymphozyten von Mutationsträgern zu einer verminderten Nurr1-mRNA-Konzentration (Le *et al.*, 2003).

- ***Neurofilament M***

Neurofilamente gehören zu den Intermediärfilamenten und sind eine Hauptkomponente des Zytoskeletts von Neuronen (Al-Chalabi und Miller, 2003; Übersichtsartikel). Aus immunhistochemischen Untersuchungen ist bekannt, dass Neurofilamente ein Hauptbestandteil von LK sind. Bei transgenen Mäusen führt die Überexpression von Neurofilamenten zur Bildung LK-ähnlicher Aggregate und zum Absterben von Neuronen (Tu *et al.*, 1997). Es gibt drei Neurofilament-Untereinheiten: Neurofilament H (115 kDa), Neurofilament M (95 kDa) und Neurofilament L (68 kDa). Epitope aller drei Neurofilament-Untereinheiten konnten in LK identifiziert werden (Hill *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 1991). Erste Hinweise für eine Rolle von Neurofilament M kamen aus genetischen Untersuchungen von Lavedan und Mitarbeitern (2002). Hierbei konnte eine Punktmutation im *Neurofilament M*-Gen, die zum Austausch der AS Glycin durch Serin in Position 336 der AS-Sequenz führt, bei einem Parkinson-Patienten identifiziert werden. In der Zwischenzeit konnten zwei weitere Mutationen (P725E und delVal380) bei Patienten mit IPS identifiziert werden (Krüger *et al.*, 2003).

- ***Synphilin-1***

Durch die Identifikation des α-Synuklein- und Parkin-interagierenden Proteins Synphilin-1 konnte erstmals eine funktionelle Verbindung zwischen zwei bekannten Parkinson-Genen hergestellt werden (Engelender *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2001). Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa wird vorwiegend neuronal exprimiert und co-lokalisiert mit Parkin und α-Synuklein in der Zelle (Ribeiro *et al.*, 2002). Synphilin-1 konnte auch als Bestandteil von LK in Gehirnen von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Wakabayashi *et al.*, 2000). Aus *in vitro*-Untersuchungen ist bekannt, dass Synphilin-1 durch Parkin ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut wird (Chung *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Synphilin-1 durch die E3-Ubiquitin-Ligasen Siah-1 und Siah-2 sowie Dorfin ubiquitiniert wird (Nagano *et al.*, 2003; Liani *et al.*, 2004, Ito *et al.*, 2003). Funktionelle Analysen zeigen, dass die Überexpression von Synphilin-1 in Zellkultur zur Ausbildung von

intrazytoplasmatischen Einschlüssen führt (O'Farrell, *et al.*, 2001). Insgesamt deuten diese Beobachtungen auf eine mögliche Rolle von Synphilin-1 bei der Pathogenese der PK hin und machen das *Synphilin-1*-Gen zu einem guten Kandidaten für ein Mutations-*Screening*. Bei ersten Mutations-Analysen bei Patienten mit familiärem PS konnten jedoch noch keine pathogenen Mutationen im *Synphilin-1*-Gen identifiziert werden (Bandopadhyay *et al.*, 2001).

Über die physiologische Funktion von Synphilin-1 ist noch sehr wenig bekannt. Das Synphilin-1-Protein enthält verschiedene Motive (*coiled-coil*-, Ankyrin-ähnliche Domäne), von denen bekannt ist, dass sie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, sowie eine ATP/GTP-Bindedomäne. Es wird spekuliert, dass Synphilin-1 als Adapter-Protein zwischen α-Synuklein und Proteinen, die eine Rolle beim Vesikeltransport spielen, wirken könnte.

1.4 Molekulare Pathogenese der Parkinson-Krankheit

Die Entdeckung von krankheitsauslösenden Mutationen bei familiären Formen des PS hat neue Einblicke in die molekulare Pathogenese der PK gebracht. Einige der identifizierten Krankheitsgene kodieren für Proteine, die auch bei sporadischen IPS-Patienten in LK aggregieren (α-Synuklein, Parkin, UCH-L1; Spillantini *et al.*, 1998; Schlossmacher *et al.*, 2002; Lowe *et al.*, 1990). Parkin und UCH-L1 sind an der Degradation von Proteinen über das UPS beteiligt. Genetische Varianten in diesen Genen konnten als krankheitsmodulierende Faktoren identifiziert werden. Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen sowie Störungen des UPS eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der PK spielen.

1.4.1 Proteinaggregation und Störungen des Ubiquitin-Proteasomen-Systems

Ein gemeinsames Merkmal verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen ist die Aggregation und Ablagerung von Proteinen im Gehirn. Typische Beispiele hierfür sind neben der PK, die AK und die Huntington-Krankheit (HK). Unterschiede bestehen in der Lokalisation der Proteinaggregate. Diese können intrazellulär (zytoplasmatische LK bei der PK, intranukleäre und zytoplasmatische Einschlüsse bei der HK) oder extrazellulär (Alzheimer-Plaques)

lokalisiert sein. Eine mögliche Ursache für die Bildung dieser Protein-Einschlüsse wird in der Fehlfaltung von Proteinen gesehen (Lansbury, 1999). Die korrekte Faltung eines Proteins, d.h. die Ausbildung seiner Tertiärstruktur, ist essentiell für die Proteinfunktion. Fehlfaltung kann zum Funktionsverlust führen und macht Proteine anfällig für Aggregation. Ein Schutzmechanismus der Zelle besteht in der Expression von Chaperonen, welche die korrekte Faltung von Proteinen unterstützen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Ferner kann die Aggregation fehlgefalteter Proteine durch deren Abbau über das UPS verhindert werden (Weissman, 2001). Die bei neurodegenerativen Erkrankungen beobachtete Aggregation von Proteinen lässt sich daher durch Störungen dieser protektiven Mechanismen und/oder durch eine aufgrund von Mutationen hervorgerufene verstärkte Aggregationsneigung von Proteinen erklären.

Das UPS ist das wichtigste zelluläre System zum Abbau kurzlebiger, fehlgefalteter, mutierter oder geschädigter Proteine (Pickart, 2001; Voges *et al.*, 1999). Beim Ubiquitin-vermittelten Abbau von Proteinen werden die zur Degradation durch das Proteasom bestimmten Proteine zunächst markiert, indem sie kovalent mit Polyubiquitin-Ketten verknüpft werden (Pickart, 2001). An diesem Prozess sind mehrere Enzyme beteiligt (Abbildung 1-4). Ubiquitin-Monomere werden zunächst in einer ATP-abhängigen Reaktion von einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) aktiviert. Aktiviertes Ubiquitin wird auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen und schließlich kovalent an das zum Abbau bestimmte Protein gebunden. Diese Reaktion wird von einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) katalysiert. Anschließend werden sequentiell weitere Ubiquitin-Monomere unter Bildung einer Polyubiquitin-Kette angehängt. In Säugerzellen wurden ein E1-Enzym, mehr als 20 E2-Enzyme und mehrere hundert E3-Enzyme identifiziert (Pickart, 2001). Dabei vermittelt jedes einzelne E3-Enzym die Ubiquitinierung von nur einem oder sehr wenigen spezifischen Proteinen.

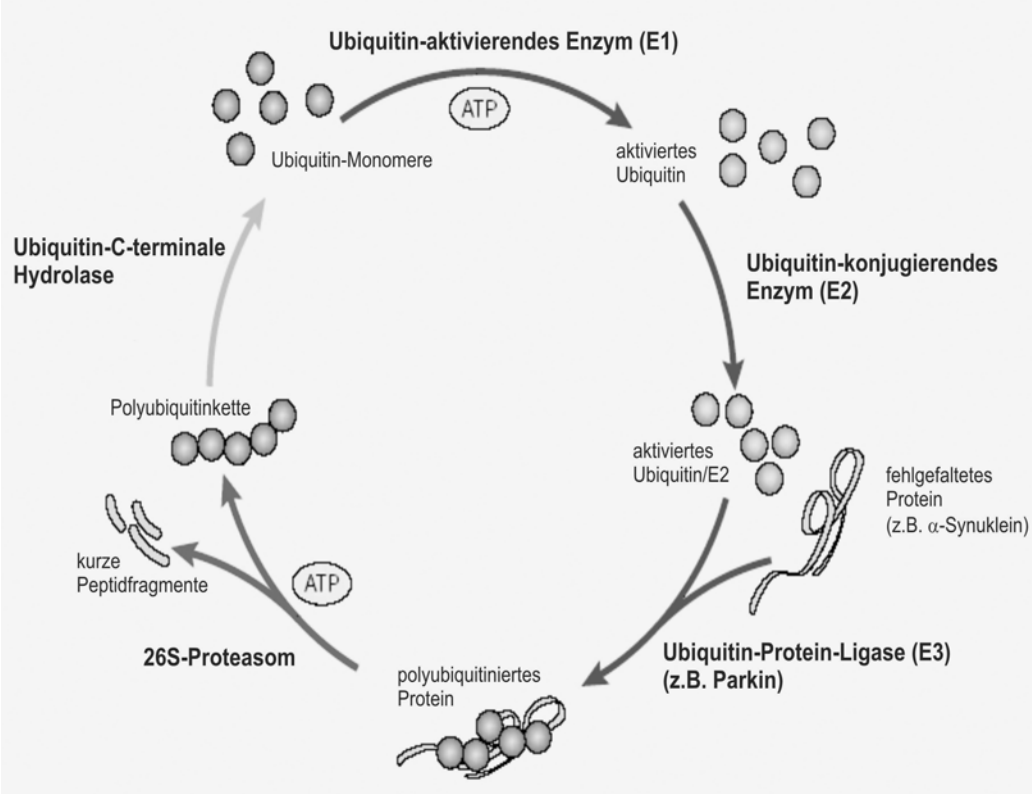


Abbildung 1-4: Degradation fehlgefalteter, geschädigter und mutierter Proteine über das UPS (modifiziert nach McNaught *et al.*, 2001). Für Erläuterungen siehe Text.

Die polyubiquitinierten Proteine werden über das 26S-Proteasom abgebaut, wohingegen nicht-ubiquitinierte Proteine über das 20S-Proteasom abgebaut werden (Voges *et al.*, 1999). Diese multikatalytischen Proteasen sind im Zytoplasma, im Endoplasmatischen Retikulum, in der perinukleären Region und im Zellkern eukaryontischer Zellen lokalisiert. Ihre Struktur ist in Abbildung 1-5 schematisch dargestellt.

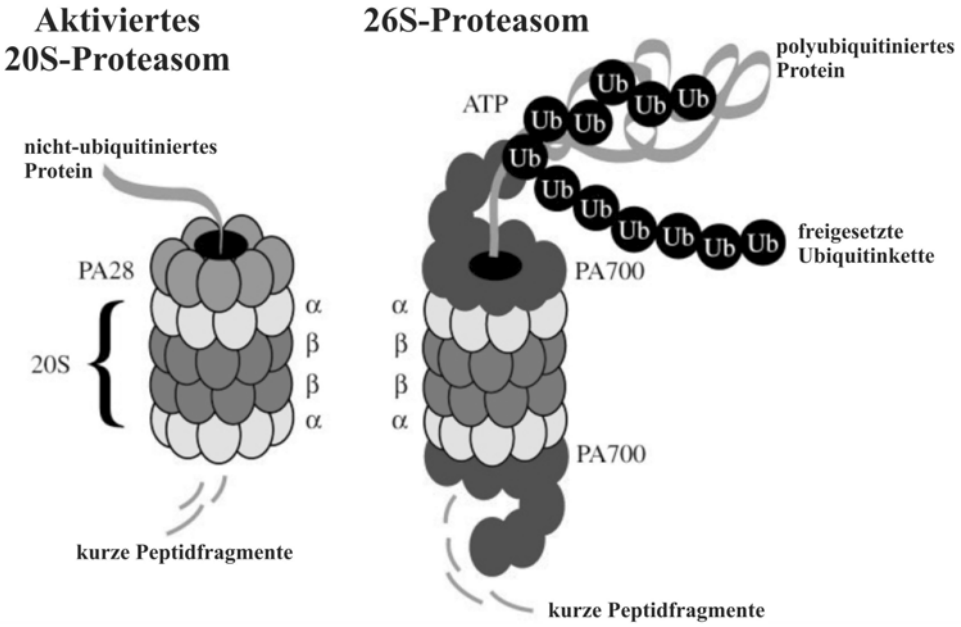


Abbildung 1-5: Struktur des 20S- und des 26S-Proteasoms (modifiziert nach McNaught und Olanow, 2003). Das 20S-Proteasom besteht aus zwei äußeren, heptameren Ringen, die aus sieben verschiedenen α-Untereinheiten zusammengesetzt sind, und zwei inneren, heptameren Ringen, die aus sieben verschiedenen β-Untereinheiten zusammengesetzt sind. Alle Ringe zusammen bilden einen Zylinder, in dessen Inneren die Proteolyse erfolgt. Die drei verschiedenen proteolytischen Aktivitäten (Chymotrypsin-ähnliche, Trypsin-ähnliche und Peptidylglutamylpeptid-spaltende Aktivität) des Proteasoms sind in den β-Ringen lokalisiert. Durch die Bindung von multimeren, proteasomalen Aktivatoren PA28 und PA700 (19S-Einheit) kommt es zur Bildung größerer Komplexe, die aufgrund ihrer gesteigerten katalytischen Aktivität als aktiviertes 20S- bzw. 26S-Proteasom bezeichnet werden.

Es gibt verschiedene Indizien dafür, dass Störungen des UPS eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese familiärer und sporadischer Formen des PS spielen (Abbildung 1-6). Es konnte gezeigt werden, dass die bei familiären Formen des PS identifizierten Mutationen im *Parkin*-, *UCH-L1*- und *α-Synuklein*-Gen die normale Protein-Degradation über das UPS stören können. Die meisten familiär assoziierten Mutationen im *Parkin*-Gen haben einen Verlust der Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität des Parkin-Proteins zur Folge. Mittlerweile konnten verschiedene Substrate von Parkin identifiziert werden, darunter eine glykosylierte Form von α-Synuklein, der Pael (*Parkin-associated endothelin-*

like)-Rezeptor, CDCrel-1 (*cell division control-related protein 1*) und Synphilin-1 (Shimura *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001).

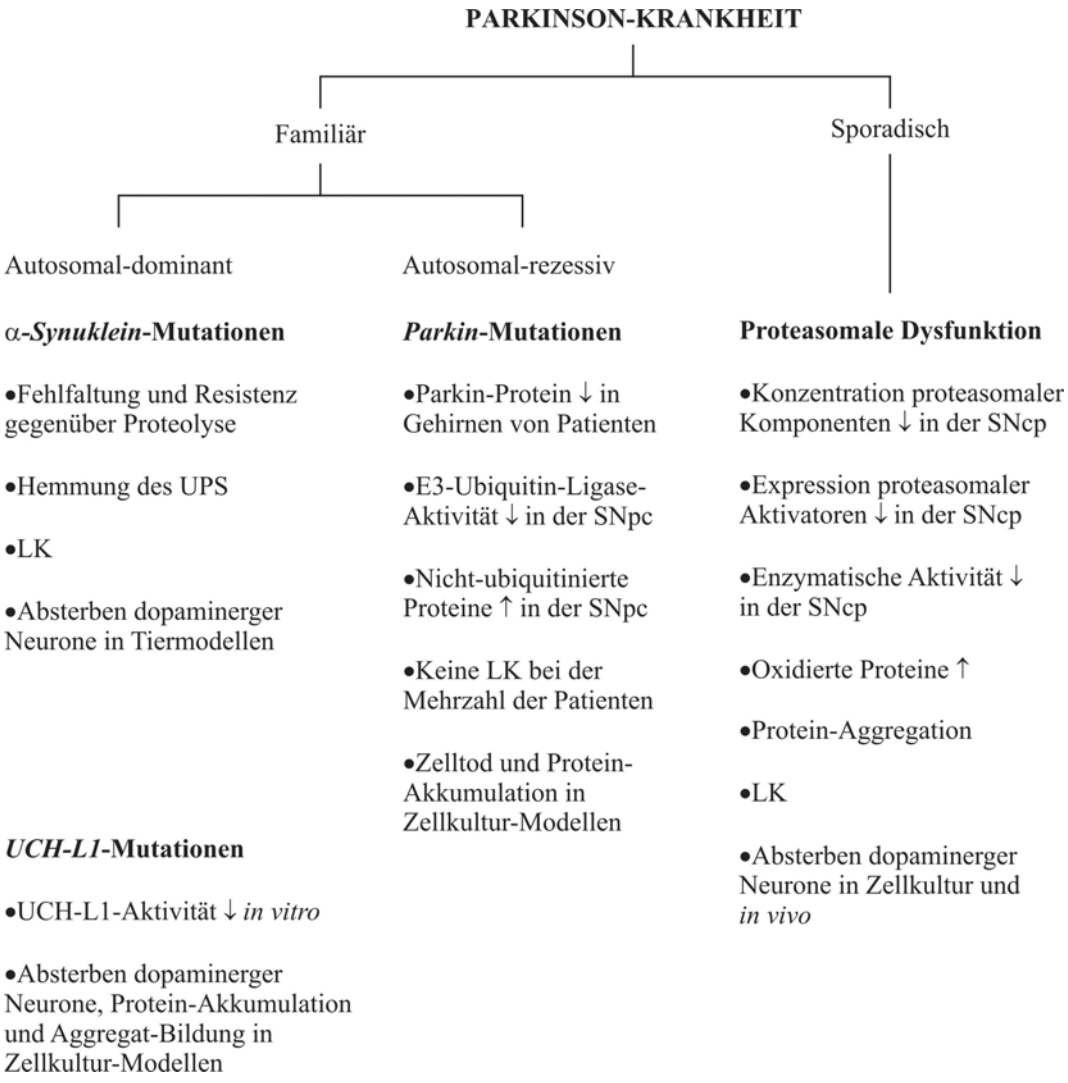


Abbildung 1-6: Hinweise für eine Bedeutung von proteolytischem Stress bei familiären und sporadischen Formen des PS (modifiziert nach McNaught und Olanow, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass nicht-ubiquitiniertes, glykosyliertes α-Synuklein und nicht-ubiquitinierter Pael-Rezeptor in der *Substantia nigra* von Patienten mit früh beginnendem, autosomal-rezessiv vererbtem PS akkumulieren (Shimura *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 2001).

UCH-L1 gehört zur Familie der deubiquitinierenden Enzyme und spielt eine Rolle bei der Wiedergewinnung von Ubiquitinmonomeren im Rahmen des Ubiquitin-

vermittelten Proteinabbaus. In *E.coli* konnte gezeigt werden, dass die Hydrolase-Aktivität der mutierten Form (I93M) der UCH-L1 um 50% reduziert ist (Leroy *et al.*, 1998). Außerdem konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Inhibition der Ubiquitin-C-terminalen Hydrolase zur Degeneration dopaminerger Neurone verbunden mit einer verminderten Ubiquitin-Konzentration und der Bildung α-Synuklein-positiver zytoplasmatischer Aggregate führt (McNaught *et al.*, 2002).

Es wird angenommen, dass α-Synuklein durch das Proteasom abgebaut wird. Die mutierten Formen des Proteins sind jedoch relativ resistent gegenüber proteolytischem Abbau (Bennett *et al.*, 1999). In PC12-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von mutiertem α-Synuklein zur Hemmung des UPS verbunden mit der Anhäufung ubiquitinierter Proteine und zum Zelltod führt (Tanaka *et al.*, 2001; Stefanis *et al.*, 2001).

Auch bei den viel häufigeren sporadischen Formen des PS gibt es Hinweise auf Störungen im UPS. Von McNaught und Mitarbeitern konnte ein signifikanter Verlust der α-, nicht aber der β–Untereinheiten der 20S-Einheit des Proteasoms in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* von Patienten mit sporadischem PS nachgewiesen werden (McNaught *et al.*, 2003). Ein Verlust der α-Untereinheiten führt zur Destabilisierung des 26/20S-Komplexes, zu einer fehlerhaften Zusammensetzung des Proteasoms und zu einer verminderten Bindung der 19S-regulatorischen Untereinheit an das 20S-Proteasom (Voges *et al.*, 1999; Grune *et al.*, 1996; Bulteau *et al.*, 2001). Außerdem konnte bei Patienten mit sporadischem PS eine Inhibition der enzymatischen Aktivität des 20S-Proteasomes festgestellt werden (McNaught und Jenner, 2001; McNaught *et al.*, 2003).

Die Gründe für die Störungen des UPS beim sporadischen PS sind noch nicht bekannt. Möglicherweise spielen noch nicht identifizierte Mutationen in Genen, die für Komponenten des UPS kodieren, eine Rolle. Ebenso ist ein Einfluss von oxidativem Stress, der zu einer Akkumulation von oxidativ geschädigten Proteinen und damit zu einer Überlastung des UPS führen kann, denkbar.

1.5 Zielsetzung

In genetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *α-Synuklein*- und *UCH-L1*-Gen ursächlich für seltene, autosomal-dominante Formen des PS sind (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1998). Des weiteren konnten *Parkin*-Mutationen identifiziert werden, die zu einer früh beginnenden, autosomal-rezessiven Form des PS führen (Kitada *et al.*, 1998). In nachfolgenden Studien konnten die entsprechenden Proteine als Komponenten von LK in Gehirnen von Patienten mit familiärem oder sporadischem PS nachgewiesen werden. Die funktionelle Charakterisierung der identifizierten Gene zeigte, dass die Degradation von Proteinen über das UPS eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der PK spielt (McNaught *et al.*, 2001; Krüger *et al.*, 2002; Petrucelli *et al.*, 2002).

Durch die Identifikation des α-Synuklein- und Parkin-interagierenden Proteins Synphilin-1 gelang erstmals eine funktionelle Verbindung zwischen zwei bekannten Parkinson-Genen (Engelender *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2001). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit, die von Dr. Carsten Holzmann in der Abteilung für Medizinische Genetik der Universität Rostock durchgeführt wurden, konnte eine neue R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen bei zwei deutschen Patienten mit sporadischem IPS identifiziert werden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der ersten Mutation im *Synphilin-1*-Gen im Zellkulturmodell. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf eine mögliche Bedeutung von Synphilin-1 für das UPS und auf eine mögliche toxische Wirkung der Mutation gelegt. Mittels Genexpressionsanalysen sollte ein möglicher Einfluss der Mutation auf die Genexpression in dopaminergen, neuronalen Zellen untersucht werden.

Das Synphilin-1-Protein enthält verschiedene Motive (*coiled-coil*-, Ankyrin-ähnliche Domäne), von denen bekannt ist, dass sie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Vor diesem Hintergrund wurde versucht, über die Identifikation neuer Interaktionspartner von Synphilin-1 Hinweise auf dessen physiologische Funktion zu erhalten.

In Vorarbeiten, die von Dr. Rejko Krüger in der Abteilung für Neurologie der Ruhr-Universität in Bochum durchgeführt wurden, konnte in zwei Familien mit offensichtlich autosomal-dominantem Erbgang für die PK eine neue P159L- und die bereits bekannte R275W-Mutation im *Parkin*-Gen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Mutationen mit Blick auf eine mögliche Rolle bei der Pathogenese der PK funktionell im Zellkulturmodell analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav:	
Dampfsterilisator	Sauter, Schweiz
Bakterienschüttelinkubator:	
Multitron® Inkubationsschüttelmaschine	Infors, Einsbach
Brutschränke:	
Function Line, Typ BB 16	Heraeus, Hanau
B6420	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer:	
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Entwicklermaschine:	
X-OMAT M35	Kodak, Stuttgart
Geldokumentation:	
Kaiser RS1 mit	Kaiser, Buchen
UV-Tisch	MWG Biotech, Ebersberg
Gelkammern für Agarosegele:	
Mini Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Heizblöcke:	
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Heizblock QBT4	Grant, Großbritannien

Kamerasysteme:

ECL-Kamera LAS-1000	Fujifilm, USA
Gekühlte CCD-Kamera, Modell CCD300ETRCX	DAGE-MTI, USA
12 Bit gekühlte CCD-Kamera SensiCam	PCO, Kelheim

Mikroskope:

Axioplan 2	Zeiss, Göttingen
Leica DMIRBE	Leica, Bensheim
Wilowert A	Hund, Wetzlar

Photometer:

Ultrospec 3000	Amersham Biosciences, Freiburg
ELISA-Reader MRX	Dynatech Laboratories, USA
Spectrafluor Fluoreszenz-Spektrophotometer	Tecan, Crailsheim

Pipetten:

Gilson Pipetman (10, 20, 200, 1000 µl)	Gilson, USA
Eppendorf Reference (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Schüttler:

Rollentaumelmischer RM5	Hecht Assistent, Sondheim/Rhön
KS250 basic	Kika Labortechnik, Staufen

SDS-PAGE- und Blotting-Apparatur:

Mini-PROTEAN® II-Elektrophorese-System	Bio-Rad, München
PROTEAN® II xi-Elektrophorese-System	Bio-Rad, München

Spannungsgeräte:

Power-Pac 300	Bio-Rad, München
Power-Pac 3000	Bio-Rad, München

Sterilbank:	
Tecnoflow 3F120-II GS	Integra Biosciences, Schweiz
Thermocycler:	
Primus 96 plus	MWG-Biotech, Ebersberg
PTC-200	MJ Research, USA
Waagen:	
MC1 Laboratory LC420	Sartorius, Göttingen
Micro, Typ M5P	Sartorius, Göttingen
Zell-Zählkammer:	
Neubauer-Zählkammer	Hecht Assistent, Sondheim/Rhön
Zentrifugen und Rotoren:	
Biofuge Fresco mit Rotor 3325	Heraeus, Hanau
Biofuge Pico mit Rotor 3324	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0R mit Rotor 2252	Heraeus, Hanau
Sorvall® RC 5C Plus mit Rotoren SLA-3000 und SLA-600 TC	Kendro, Langenselbold

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Gel-Blotting-Papier:	
Typ GB003	Schleicher und Schuell, Dassel
Transfer-Membran:	
PROTRAN® Nitrocellulose-Transfer-Membran	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturgefäße:	
6-/24-/96-*well*-Zellkulturplatten	BD Falcon, Heidelberg
35 x 10 mm-Zellkulturschalen	BD Falcon, Heidelberg

60 x 15 mm-Zellkulturschalen	BD Falcon, Heidelberg
Costar® Zellkulturflaschen, 25 cm^2	Corning, USA
Costar® Zellkulturflaschen, 75 cm^2	Corning, USA
Nunclon® Zellkulturflaschen, 175 cm^2	NUNC, Wiesbaden

2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid 2K-Lösung (30%, Mix Acrylamid:Bisacrylamid; 37,5:1)	AppliChem, Darmstadt
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)-dinatriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Annexin V-Cy5	BD Pharmingen, USA
ANTI-FLAG® M2 Affinitäts-Gel	Sigma, Taufkirchen
BenchMark® Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Brillant Blau R250	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Clasto-Lactacystin-β-lacton	Calbiochem, Darmstadt
c-myc Monoclonal Antibody-Agarose Beads	BD Clontech, USA
Complete® Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
DEPC	Sigma, Taufkirchen
Desoxynucleosid-5'-triphosphate (dNTPs) für die PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
EDTA-Lösung (0,5 M)	BioWhittaker, USA
Effectene® Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
GeneRuler® 1 kb-DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler® 100 bp-DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenstein
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hoechst 33258	Molecular Probes, USA
Immu-Mount	Shandon, USA
Kanamycinsulfat	Fluka, Neu-Ulm

MG132 (Z-LLL-al)	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Naturaflor® Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Oligo (dT)-Primer	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd (PFA)	Riedel-deHaën, Seelze
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
peqGOLD® Universal-Agarose	Peqlab, Erlangen
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range)	Bio-Rad, München
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
RNasin® (Ribonuklease-Inhibitor)	Promega, Mannheim
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
Suc-LLVY-AMC	Sigma, Taufkirchen
Sulfosalicylsäure	Sigma, Taufkirchen
TALON® Metal Affinity Resin	BD Clontech, USA
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt)
Tris(hydroxymethylaminomethan)	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Fluka, Neu-Ulm
β-Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm

Chemikalien, die nicht in der Liste aufgeführt sind, wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.1.4 Reagenziensets (*Kits*)

In Tabelle 2-1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenziensets (*Kits*) aufgeführt.

Tabelle 2-1: Reagenziensets (*Kits*).

Bezeichnung	**Hersteller**
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München
ECL Western-Blotting-Detektions-Reagenz	Amersham Biosciences, Feiburg
Immun-Star® HRP-Chemoluminiszenz-Kit	Bio-Rad, München
QIAfilter® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie

Enzyme und Puffer, die für molekularbiologische Arbeiten verwendet wurden, sind in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2: Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie.

Enzym/Puffer	**Hersteller**
Biotherm® DNA-Polymerase/ 10x Biotherm® Puffer	GeneCraft, Münster
M-MLV-Reverse-Transkriptase/ 5x M-MLV-RT-Puffer	Promega, Mannheim
PfuTurbo® DNA-Polymerase 10x PfuTurbo®-Puffer	Stratagene, USA
Pwo-DNA-Polymerase/ 10x Pwo-Puffer	Peqlab, Erlangen

Fortsetzung der Tabelle 2-2.

Enzym/Puffer	**Hersteller**
Restriktionsendonukleasen/ 10x Restriktions-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)/ 10x SAP-Puffer	Amersham Biosciences, Freiburg
T4-DNA-Ligase/ 10x Ligations-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Lösungen und Puffer

2.1.6.1 SDS-PAGE und Western-Blotting

Trenngel-Puffer; pH 8,8: 1,5 M Tris-HCl

Sammelgel-Puffer; pH 6,8: 0,5 M Tris-HCl

Laufpuffer; pH 8,3:
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

2x Laemmli-Probenpuffer; pH 6,8:
62,5 mM Tris-HCl
2% (w/v) SDS
0,01% (w/v) Bomphenolblau
25% (v/v) Glycerin
2% (v/v) β-Mercaptoethanol

10%iges Trenngel:
2,0 ml H_2O_{bidest}
1,7 ml Acrylamid 2K-Lösung
1,3 ml Trenngel-Puffer
50 µl 10% (w/v) SDS-Lösung
2 µl TEMED
50µl 10% (w/v) APS-Lösung

12%iges Trenngel:	1,7 ml H_2O_{bidest}
	2,0 ml Acrylamid 2K-Lösung
	1,3 ml Trenngel-Puffer
	50 µl 10% (w/v) SDS-Lösung
	2 µl TEMED
	50µl 10% (w/v) APS-Lösung
4%iges-Sammelgel:	1,21 ml H_2O_{bidest}
	0,27 ml Acrylamid 2K-Lösung
	0,5 ml Sammelgel-Puffer
	20 µl 10% (w/v) SDS
	3 µl TEMED
	20 µl 10% (w/v) APS-Lösung
Coomassie-Färbelösung:	50% (v/v) Methanol
	7% (v/v) HAc
	0,25% Brillant Blau R250
Entfärbelösung:	50% (v/v) Methanol
	7% (v/v) HAc
Transferpuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% (v/v) Methanol
Ponceau S-Lösung:	0,2% (w/v) Ponceau S
	3% (w/v) Trichloressigsäure
	3% (w/v) Sulfosalicylsäure
TBS; pH 7,4:	25 mM Tris-HCl
	8,0 g/l NaCl
	0,2 g/l KCl

TBS-T; pH 7,4:	TBS mit 0,05% (v/v) Tween® 20
Blockierlösung:	TBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver
Stripping-Puffer; pH 2,8:	0,2 M Glycin 0,5 M NaCl

2.1.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer; pH 8,0:	2 M Tris-HAc 50 mM EDTA
6x Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 30% (v/v) Glycerin in H_2O_{bidest}
Ethidiumbromid-Stocklösung:	10 mg/ml in H_2O
1%iges (w/v) Agarosegel:	0,4 g Agarose 40 ml TAE-Puffer Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen unter 60°C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid-Stocklösung zugesetzt.
1,5%iges (w/v) Agarosegel:	0,6 g Agarose 40 ml TAE-Puffer Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen unter 60°C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid-Stocklösung zugesetzt.

2.1.6.3 RT-PCR

DEPC-Wasser:	1 ml DEPC ad 1 l mit H_2O_{bidest} Der Ansatz wurde über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.
TE-Puffer; pH 8,0:	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA

2.1.6.4 Zelllyse

PBS; pH 7,4:	8,0 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l Na_2HPO_4 0,24 g/l KH_2PO_4
Lysepuffer:	PBS mit 1% (v/v) Triton X-100 und Complete® Proteasen-Inhibitoren-Cocktail

2.1.6.5 Immunpräzipitation und His-*Pull-down*

IP-Puffer 1; pH 7,4:	PBS mit 0,5% (v/v) Triton X-100 und Complete® Proteasen-Inhibitoren-Cocktail
IP-Puffer 2; pH 7,4:	PBS mit 1% (v/v) Triton X-100 und Complete® Proteasen-Inhibitoren-Cocktail

Elutionspuffer; pH 5,0:	50 mM Natriumacetat 300 mM NaCl

2.1.6.6 Immunzytochemie

100x Poly-L-Lysin-Lösung:	0,5 mg/ml in H_2O_{bidest}
Fixierlösung:	4% (w/v) PFA in PBS
Permeabilisierungslösung:	0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS
Blockierlösung:	10% (v/v) FBS in PBS

2.1.6.7 Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflusszytometrie

10x Annexin V-Bindungspuffer; pH 7,4:	0,1 M Hepes 1,4 M NaCl 25 mM $CaCl_2$
Propidiumiodid-Lösung:	5 mg/ml in DMSO

2.1.6.8 Proteasomen-Aktivitäts-Test

Proteasomen-Test-Puffer (PT-Puffer); pH 7,6:	30 mM Tris-HCl 2 mM $MgCl_2$ 10 mM NaCl 10 mM KCl 0,5 mM DTT 1 mM ATP 100 µM Suc-LLVY-AMC

2.1.7 Kultivierung von Zellen

2.1.7.1 Zelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tabelle 2-3: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Referenz	Quelle
HEK 293	Humane, embryonale Nierenzellen	Graham *et al.*, 1977	Microbix, Kanada
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzellen	Biedler *et al.*, 1973 Jalava *et al.*, 1990	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

2.1.7.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM-Grundmedium sowie PBS ($CaCl_2$- und $MgCl_2$-frei) wurden von Gibco (Eggenstein) bezogen. FBS wurde von Gibco (Eggenstein) bzw. Biochrom (Berlin) und Trypsin/EDTA-Lösung von Cambrex (USA) bezogen.

DMEM-Vollmedium für HEK 293-Zellen: DMEM mit
10% (v/v) FBS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

DMEM-Vollmedium für SH-SY5Y-Zellen: DMEM mit
15% (v/v) FBS
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin

Einfriermedium-1 (EFM-1): 4 ml FBS
6 ml DMEM (serumfrei)

Einfriermedium-2 (EFM-2):	2 ml DMSO 8 ml DMEM (serumfrei)

2.1.8 Kultivierung von Bakterien

2.1.8.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden chemisch kompetente DH5α™-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) oder chemisch kompetente One Shot® TOP10-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.1.8.2 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien

1000x Ampicillin-Stocklösung:	100 mg/ml in H_2O_{bidest} Die Stocklösung wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei –20°C gelagert.
4000x Kanamycin-Stocklösung:	100 mg/ml in H_2O_{bidest} Die Stocklösung wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei –20°C gelagert.
LB-Amp-Medium:	20 g LB-Broth (Sigma, Taufkirchen) ad 1 l mit H_2O_{bidest} Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurde Ampicillin-Stocklösung in einer Verdünnung von 1:1000 zugesetzt.
LB-Kan-Medium:	20 g LB-Broth (Sigma, Taufkirchen) ad 1 l mit H_2O_{bidest} Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurde Kanamycin-Stocklösung in einer Verdünnung von 1:4000 zugesetzt.

LB-Amp-Agarplatten:	32 g LB-Agar (Invitrogen, Karlsruhe) ad 1 l mit H_2O_{bidest} Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin-Stocklösung in einer Verdünnung von 1:1000 zugesetzt.
LB-Kan-Agarplatten:	32 g LB-Agar (Invitrogen, Karlsruhe) ad 1 l mit H_2O_{bidest} Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C wurde Kanamycin-Stocklösung in einer Verdünnung von 1:4000 zugesetzt.
50%ige (v/v) Glycerinlösung	50% (v/v) Glycerin in H_2O_{bidest} Die Lösung wurde autoklaviert.

2.1.9 Primer

2.1.9.1 PCR-Primer

2.1.9.1.1 Erzeugung von Synphilin-1-Konstrukten mit 5'-FLAG-*tag*

Zur Erzeugung von Wt- und C621-Synphilin-1-Konstrukten mit 5'-FLAG-*tag* mittels PCR wurden folgende Primer verwendet:

- 5'-Primer:

  5'-CCG **CTCGAG** CCACC**ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATC**
  Xho*I** **FLAG-*tag*

  GAA GCC CCT GAA TAC CTT GA-3'
  Nukleotide 4-23 der Synphilin-1-Sequenz

  Über diesen Primer wurden eine 5'-*Xho*I-Schnittstelle sowie ein 5'-FLAG-*tag* (*modifiziert um ein ATC-Triplett in Position 28 nach ATG) eingeführt.

- 3’-Primer:

  5’-CCC **AAGCTT** TCA TTA *TGC TGC CTT ATT CTT TCC TT*-3’
  ***Hind*III** Stop *Nukleotide 2738-2757 der Synphilin-1-Sequenz*

  Über diesen Primer wurde eine 3’-*Hind*III-Schnittstelle eingeführt.

2.1.9.1.2 Primer zur Amplifikation des Sequenzabschnittes 535-1374 von Synphilin-1

- 5’-Primer:

  5’-GGCTTATGCACAACCATCAATGG-3’

  Die Sequenz dieses Primers entspricht den Nukleotiden 535-557 der Synphilin-1-Sequenz.

- 3’-Primer:

  5’-GTTGCCATCCTGGTCTACTTCA-3’

  Die Sequenz dieses Primers ist komplementär zu den Nukleotiden 1353-1374 der Synphilin-1-Sequenz.

2.1.9.1.3 Primer zur Amplifikation des Sequenzabschnittes 1-534 von EGFP

- 5’-Primer:

  5’-ATGGTGAGCAAGGGCGAGG

  Die Sequenz dieses Primers entspricht den Nukleotiden 1-19 der EGFP-Sequenz.

- 3’-Primer:

  5’-CTGCACGCTGCCGTCCTC

  Die Sequenz dieses Primers ist komplementär zu den Nukleotiden 517-534 der EGFP-Sequenz.

2.1.9.2 Primer für die *in vitro*-Mutagenese

2.1.9.2.1 Erzeugung von pcDNA3.1-L159-myc$_6$-Parkin

Zur Generierung von pcDNA3.1-L159-myc$_6$-Parkin aus pcDNA3.1-Wt-myc$_6$-Parkin mittels *in vitro*-Mutagenese wurden folgende Primer verwendet:

- 5'-Primer (L159):
  5'-CTGTCAAAGAGTGCAGC **T** GGGAAAACTCAGGGTAC-3'

- 3'-Primer (L159):
  5'-GTACCCTGAGTTTTCCC **A** GCTGCACTCTTTGACAG-3'

Durch diese Primer wurde eine Punktmutation (Austausch von C zu T) erzeugt, die zum Austausch der AS Prolin durch Leucin in Position 159 der Parkin-AS-Sequenz führte.

2.1.9.2.2 Erzeugung von pcDNA3.1-W275-myc$_6$-Parkin

Zur Generierung von pcDNA3.1-W275-myc$_6$-Parkin aus pcDNA3.1-Wt-myc$_6$-Parkin mittels *in vitro*-Mutagenese wurden folgende Primer verwendet:

- 5'-Primer (W275):
  5'-GTGACAAGACTCAATGAT **T** GGCAGTTTGTTCACGACC-3'

- 3'-Primer (W275):
  5'-GGTCGTGAACAAACTGCCA **A** TCATTGAGTCTTGTCAC-3'

Durch diese Primer wurde eine Punktmutation (Austausch von C zu T) erzeugt, die zum Austausch der AS Arginin durch Tryptophan in Position 275 der Parkin-AS-Sequenz führte.

2.1.9.3 Sequenzierprimer

Zur Sequenzierung von Plasmidkonstrukten wurden T7-Primer, BGH-Primer sowie Primer, die komplementär zu Sequenzabschnitten der zu sequenzierenden Konstrukte waren, verwendet.

2.1.10 Plasmide

2.1.10.1 Expressions- und Klonierungsvektoren

Tabelle 2-4: Expressions- und Klonierungsvektoren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Vektor	Beschreibung	Resistenzen	Hersteller/Quelle
pAdEasy-1	Adenoviraler *Backbone*-Vektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren (He et al., 1998)	Amp^r	B. Vogelstein
pAdTrack-CMV	*Shuttle*-Vektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren; enthält die Sequenz für einen EGFP-Reporter (He et al., 1998); kann auch als Expressionsvektor für Säugerzellen genutzt werden	Kan^r	B. Vogelstein
pcDNA3.1(-)	Expressionsvektor für Säugerzellen	Amp^r, Neo^r	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1-myc_6	Expressionsvektor für Säugerzellen; enthält die Sequenz für einen N-terminalen 6x myc-*tag*	Amp^r, Neo^r	M. Gleichmann
pEGFP-N1	Expressionsvektor für Säugerzellen; enthält die Sequenz für einen C-terminalen EGFP-*tag*	Kan^r, Neo^r	BD Contech, USA

2.1.10.2 Plasmid-Konstrukte

Im folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte aufgeführt.

- pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1:
  Der Vektor enthält die cDNA (ohne Stop-Codon) des humanen Synphilin-1, kloniert in die Restriktionsschnittstellen *Sal*I und *Bam*HI des pEGFP-N1-Vektors (O'Farrell *et al.*, 2001). Quelle: M. R. Cookson.

- pEGFP-N1-C621-Synphilin-1:
  Dieser Vektor wurde durch *in vitro*-Mutagenese mittels Transformer Site Directed Mutagenese Kit (BD Clontech, USA) erzeugt. Dabei wurde eine Punktmutation (Austausch von C zu T), die zum Austausch der AS Arginin durch Cystein in Position 621 der Synphilin-1-AS-Sequenz führt, in den pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1-Vektor eingeführt. Quelle: M. R. Cookson.

- pAdTrack-CMV-Wt/C621-FLAG-Synphilin-1:
  Wt- bzw. C621-FLAG-Synphilin-1-Konstrukte wurden mittels PCR unter Verwendung von Primern, welche die Sequenz für einen 5'-FLAG-*tag* einführten, erzeugt. Als Matrizen dienten pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 bzw. pEGFP-N1-C621-Synphilin-1. Die Konstrukte wurden in die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Hind*III des pAdTrack-CMV-Vektors kloniert.

- pAdEG-Wt/C621-FLAG-Synphilin-1:
  Diese adenoviralen Vektoren wurden durch homologe Rekombination von pAdTrack-CMV-Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. pAdTrack-CMV-C621-FLAG-Synphilin-1 mit pAdEasy-1 in *E.coli* erzeugt. Die Herstellung der Vektoren erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Ellen Gerhardt.

- pAdEG:

  Dieser adenovirale Vektor enthält die Sequenz für einen EGFP-Reporter und dient der Herstellung von AdEG-Kontrollvirus. Quelle: E. Gerhardt.

- pcDNA3.1-Wt/C621-FLAG-Synphilin-1:

  Diese Vektoren wurden durch Umklonierung von Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. C621-FLAG-Synphilin-1 aus pAdTrack-CMV-Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. pAdTrack-CMV-C621-FLAG-Synphilin-1 in den pcDNA3.1(-)-Vektor unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Hind*III erzeugt.

- pcDNA3.1-Wt-myc_6-Parkin:

  Dieser Vektor enthält die cDNA (ohne Start-Codon) des humanen Parkin, kloniert in die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I des pcDNA3.1-myc_6-Vektors. Quelle: O. Eberhardt.

- pcDNA3.1-L159-myc_6-Parkin:

  Dieser Vektor wurde durch *in vitro*-Mutagenese erzeugt. Dabei wurde eine Punktmutation (Austausch von C zu T), die zum Austausch der AS Prolin durch Leucin in Position 159 der Parkin-AS-Sequenz führt, in den pcDNA3.1-Wt-myc_6-Parkin-Vektor eingeführt.

- pcDNA3.1-W275-myc_6-Parkin:

  Dieser Vektor wurde durch *in vitro*-Mutagenese erzeugt. Dabei wurde eine Punktmutation (Austausch von C zu T), die zum Austausch der AS Arginin durch Tryptophan in Position 275 der Parkin-AS-Sequenz führt, in den pcDNA3.1-Wt-myc_6-Parkin-Vektor eingeführt.

- pcDNA3.1-myc_6-Wt/P30-α-Synuklein:

  Diese Vektoren enthalten die cDNAs (ohne Start-Codon) des humanen Wt-α-Synukleins bzw. des P30-α-Synukleins, kloniert in die Restriktionsschnittstellen *Eco*RV und *Xba*I des pcDNA3.1-myc_6-Vektors. Quelle: O. Eberhardt.

- pCMV5L-S6:

  Dieser Vektor enthält die vollständige cDNA der humanen S6-ATPase, kloniert in die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Sal*I des pCMV5L-Vektors, der die Sequenz für einen N-terminalen HA-*tag* enthält (Dawson *et al.*, 2002). Quelle: S. Dawson.

- pET16b-S6':

  Dieser Vektor enthält die vollständige cDNA der humanen S6'-ATPase, kloniert in die Restriktionsschnittstellen *Xho*I und *Bpu*1102I des pET16b-Vektors (Novagen, Darmstadt), der die Sequenz für einen N-terminalen 10x His-*tag* enthält. Quelle: S. Dawson.

- pcDNA3.1-His_{10}-S6':

  Dieser Vektor wurde durch Umklonierung von S6'-ATPase einschließlich des 10x His-*tags* aus pET16b-S6' in den pcDNA3.1(-)-Vektor unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III erzeugt.

- pMT123:

  Dieser Vektor enthält ein 8x HA-Ubiquitin-Konstrukt und ist zur Expression in Säugerzellen geeignet (Treier *et al.*, 1994). Quelle: D. Bohmann.

2.1.11 Antikörper

Tabelle 2-5: Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. WB: Western-Blotting; IZC: Immunzytochemie.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Quelle
Anti-Kaninchen-HRP	WB: 1:10000	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Maus-HRP	WB: 1:5000	Amersham Biosciences, Freiburg
Esel anti-Maus-Cy3	IZC: 1:200	Dianova, Hamburg
Kaninchen anti-FLAG (polyklonal)	WB: 1:500	Sigma, Taufkirchen
Kaninchen anti-GFP (polyklonal)	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Kaninchen anti-HA (polyklonal)	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Kaninchen anti-S6'-ATPase (polyklonal)	WB: 1:500	Affiniti, Großbritannien
Kaninchen anti-S6-ATPase (polyklonal)	IZC: 1:300	Affiniti, Großbritannien
Kaninchen anti-Synphilin-1 (polyklonal; erkennt AS 83-99 von Synphilin-1)	WB: 1:500	C. O'Farrell
Kaninchen anti-Synphilin-1 (polyklonal; erkennt AS 696-710 von Synphilin-1)	IZC: 1:300	C. O'Farrell
Kaninchen anti-Ubiquitin (polyklonal)	WB: 1:1000 IZC: 1:300	Abcam, USA
Maus anti-FLAG (monoklonal)	IZC: 1:300	Stratagene, USA
Maus anti-myc (monoklonal)	WB: 1:1000 IZC: 1:300	Santa Cruz Biotechnology, USA

Fortsetzung der Tabelle 2-5.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Quelle
Maus anti-Ubiquitin (monoklonal; erkennt mono- und polyubiquitinierte Proteine)	IZC: 1:300	Affiniti, Großbritannien
Maus anti-β-Aktin (monoklonal)	WB: 1:5000	Sigma, Taufkirchen
Maus anti-γ-Tubulin (monoklonal)	IZC: 1:5000	Sigma, Taufkirchen
Ziege anti-Kaninchen-Cy3	IZC: 1:500	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen-FITC	IZC: 1:300	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus-FITC	IZC: 1:300	Dianova, Hamburg
Ziege anti-β-Aktin (polyklonal)	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur, Transfektionen und Infektionen

2.2.1.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilbank unter Verwendung steriler Materialien durchgeführt. HEK 293-Zellen wurden in DMEM mit 10% (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit einem CO_2-Gehalt von 5% kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen konfluent gewachsen waren.
SH-SY5Y-Zellen wurden analog in DMEM mit 15% (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert.

2.2.1.2 Teilen und Passagieren von Zellen

Zum Passagieren konfluent gewachsener Zellen wurde zunächst das Medium steril abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Der Trypsin-Verdau wurde nach 5 min durch Zugabe von 10 ml serumhaltigen Kulturmediums gestoppt. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl je

Volumeneinheit in der erhaltenen Zellsuspension bestimmt. Ein Volumen, das der gewünschten Zellzahl entsprach, wurde auf neue Zellkulturgefäße verteilt.
HEK 293- und SH-SY5Y-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 geteilt. Dabei erreichten die Kulturen nach 4-6 Tagen den konfluenten Zustand.

2.2.1.3 Steriles Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden kultiviert bis sie annähernd konfluent gewachsen waren. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Kulturgefäß abgelöst, in serumhaltigem Medium resuspendiert und 5 min bei 300x *g* und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1,5 ml kaltem EFM-1 (siehe 2.1.7.2) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1,5 ml EFM-2 (siehe 2.1.7.2) tropfenweise zugegeben. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein steriles Einfrierröhrchen überführt. Um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen in einen isolierten Behälter gegeben und für 24 h bei –80°C aufbewahrt. Die Lagerung erfolgte in einer –150°C-Truhe.

2.2.1.4 Steriles Auftauen von Zellen

Zum schnellen Auftauen wurden die Zellen nach Entnahme aus der –150°C-Truhe in einem 37°C-Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden 10 ml vorgewärmtes Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 300x *g* und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in wenigen Millilitern Medium resuspendiert und je nach gewünschter Zelldichte auf 2-3 Kulturflaschen (25 cm^2) verteilt.

2.2.1.5 Zellzahl-Bestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Bei dieser Kammer beträgt die Fläche eines Großquadrats 1 mm^2, die Tiefe 0,1 mm. Bei der Auszählung eines Großquadrates, das 16 Kleinquadrate enthält, ergibt sich die Zelldichte der jeweiligen Suspension nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro Milliliter} = \text{Zellen pro Großquadrat} \times 10000 \times F_v$$

wobei F_v ein eventuell zu berücksichtigender Verdünnungsfaktor ist. Es wurden jeweils mindestens zwei Großquadrate ausgezählt.

2.2.1.6 Behandlung

Die Behandlung der Zellen mit bestimmten Effektoren erfolgte durch direkte Zugabe von Stammlösungen ins Kulturmedium.

2.2.1.7 Liposomen-vermittelte Transfektionen

Bei der Liposomen-vermittelten Transfektion wird negativ geladene DNA an kationsche Lipide gebunden. Es bildet sich ein DNA-Liposomen-Komplex, der mit der Zellmembran fusioniert. Die DNA gelangt so in die Zelle und schließlich in den Zellkern, wo sie abgelesen werden kann.

2.2.1.7.1 Transfektion mittels Effectene® Transfektionsreagenz

Einen Tag vor der Transfektion wurden 7 x 10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte in 2 ml Vollmedium ausgesäht und 24 h im Brutschrank kultiviert.
Die Transfektion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Es wurde 1 µg DNA pro Vektor eingesetzt.

2.2.1.7.2 Transfektion mittels FuGENE 6-Transfektionsreagenz

Einen Tag vor der Transfektion wurden 5 x 10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24-*well*-Platte bzw. 7 x 10^5 Zellen pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte in 0,5 bzw. 2 ml Vollmedium ausgesäht und 24 h im Brutschrank kultiviert.
Die Transfektion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Erzeugung des DNA-Liposomen-Komplexes erfolgte in serumfreiem OPTIMEM 1 (Gibco, Eggenstein). Es wurden 0,4 bzw. 2 µg DNA pro Vektor eingesetzt.

2.2.1.8 Infektionen mit rekombinanten Adenoviren

Ein Gentransfer mittels rekombinanter Adenoviren wurden ausschließlich an SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Einen Tag vor der Infektion wurden 4 x 10^6 Zellen in 35 x 10 mm-Zellkulturschalen ausgesäht. Am nächsten Tag wurde das Medium steril abgesaugt. Dann wurden 400 µl frisches Vollmedium zugegeben und gleichmäßig verteilt. Zehn MOI rekombinanter Adenoviren wurden direkt ins Medium pipettiert. Dies entspricht 10 infektiösen Partikeln pro Zelle.

Anschließend wurde durch Schwenken der Kulturschale gemischt und 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 3 ml Vollmedium zugegeben und für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Western-Blotting

2.2.2.1.1 Herstellung von Zellextrakten

Nach Absaugen des Mediums aus einer Vertiefung einer 6-*well*-Platte wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Zur Lyse wurden 300 µl Lysepuffer (siehe 2.1.6.4) zugegeben und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummischaber vom Kulturgefäß abgelöst und in ein eisgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate 30 min bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei –20°C gelagert.

2.2.2.1.2 SDS-PAGE

Für die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (modifiziert nach Ornstein, 1964, und Davis, 1964) unter denaturierenden Bedingungen (modifiziert nach Laemmli, 1970) wurden 10 und 12%ige Trenngele mit jeweils 4%igen Sammelgelen (siehe 2.1.6.1) verwendet.

Die aufzutrennenden Proteinproben wurden mit einem Volumen 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und kurz zentrifugiert. Es wurden jeweils 30 µg Protein pro Geltasche geladen. Die Auftrennung in Laufpuffer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA. Anschließend wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Färbelösung angefärbt oder mittels Elektroblotting auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

2.2.2.1.3 Elektroblotting

Die Proteine wurden nach dem Nasszellen-Blotting-Verfahren von Polyacrylamid-Gelen (Towbin *et al.*, 1979) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Folgende Anordnung wurde in eine Kunststoffhalterung gebracht:

- Schwamm
- 3x Gel-Blotting-Papier
- Nitrocellulose-Membran
- Gel
- 3x Gel-Blotting-Papier
- Schwamm

Alle Komponenten wurden zuvor mit Transferpuffer angefeuchtet. Die Kunststoffhalterung wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingebracht. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 1 h unter Eiskühlung und Rühren. Die Güte des Transfers wurde mittels Ponceau S-Färbung überprüft.

2.2.2.1.4 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Schwenken in Blockierlösung für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS mit 0,02% (w/v) NaN_3) über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach 3x 5-minütigem Waschen mit TBS-T bei RT unter Schütteln wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem adäquaten Sekundärantikörper in TBS-T (anti-Maus in einer Verdünnung von 1:5000, anti-Kaninchen und anti-Ziege in einer Verdünnung von 1:10000) inkubiert. Anschließend wurde 3x 5 min mit TBS-T und 1x 5 min mit TBS bei RT unter Schütteln gewaschen. Die Detektion mittels ECL Western-Blotting-Detektions-Reagenz oder Immun-Star® HRP-Chemoluminiszenz-Kit erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Die Chemoluminiszenz wurde durch Exposition von Chemoluminiszenz-Filmen (Hyperfilm™ ECL; Amersham Biosciences, Feiburg) oder mittels ECL-Kamera sichtbar gemacht.

2.2.2.1.5 *Stripping* der Nitrocellulose-Membran

Zur Entfernung der Primär- und Sekundärantikörper wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst 5 min in TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation in *Stripping*-Puffer (siehe 2.1.6.1) bei RT. Nach Einstellen

des pH-Wertes von 2,8 auf 7,4 mit Natronlauge und intensivem Waschen mit TBS konnte die Nitrocellulose-Membran für eine weitere Immunodetektion verwendet werden.

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Gesamtzellextrakten wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine einfache kolorimetrische Methode, die auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brillant G250 an Proteine beruht, wobei die Stärke der Bindung von der Art des Proteins abhängt. Gemessen wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm, dem Absorptionsmaximum des Protein-Farbstoff-Komplexes. Das Absorptionsmaximum des ungebundenen Farbstoffes liegt bei 465 nm.
Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde unter Verwendung des Bio-Rad Protein-Assays nach den Angaben des Herstellers in Microtiterplatten durchgeführt. Die Messung erfolgte mittels *ELISA-Reader*.

2.2.2.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der selektiven Anreicherung von Proteinen einschließlich ihrer potentiellen Interaktionspartner aus komplexen Mischungen mittels spezifischer Antikörper, die an eine Matrix gekoppelt sind. Zum einen sind bereits kovalent an eine Matrix gebundene Antikörper erhältlich. Zum anderen besteht die Möglichkeit, die Antikörper an bakterielle Ig-Rezeptoren wie z.B. Protein A, die an Sepharose gekoppelt sind, zu binden.
Für die Immunpräzipitation wurden zunächst Zellextrakte unter Verwendung von IP-Puffer 1 oder 2 wie unter 2.2.2.1.1 beschrieben hergestellt. Pro Lysat wurden 20 µl entnommen und für eine spätere Proteinbestimmung und als *Input*-Kontrolle bei –20°C gelagert. Die Zellextrakte wurden mit je 40 µl ANTI-FLAG® M2 Affinitäts-Gel (geeignet für die Präzipitation von Proteinen mit FLAG-*tag*) oder c-myc Monoclonal Antibody-Agarose Beads (geeignet für die Präzipitation von Proteinen mit myc-*tag*) versetzt und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Präzipitate bei 13000 UpM und 4°C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgten 3-5 Waschschritte mit je 500 µl IP-Puffer 1 oder 2. Danach wurden die Präzipitate mit je 15 µl 2x Laemmli-

Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung mittels SDS-PAGE und die Detektion mittels Western-Blotting.

2.2.2.4 His-*Pull-down*-Assay

Der His-*Pull-down* wurde analog der Immunpräzipitation eingesetzt, um Proteine mit Poly-His-*tag* selektiv aus Zellextrakten anzureichern. Verwendet wurde das TALON® Metal Affinity Resin von BD Clontech (USA). Hierbei handelt es sich um Sepharose, an der über einen vierzähnigen Chelator 2-fach positiv geladene Cobalt-Ionen immobilisiert sind. Unter physiologischen pH-Bedingungen bildet sich eine koordinative Bindung zwischen den Histidin-Resten des Poly-His-*tag* und dem Übergansmetall Cobalt aus.

Die Vorgehensweise beim His-*Pull-down* entsprach der bei der Immunpräzipitation. Es wurden jeweils 40 µl 50%iges (w/v) TALON® Metal Affinity Resins in PBS verwendet. Vor Zugabe des 2x Laemmli-Probenpuffers wurde der Talon®-Protein-Komplex durch Inkubation in Elutionspuffer für 10 min bei RT unter Schütteln aufgebrochen.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Vermehrung und Präparation von Plasmiden

Die verwendeten Plasmide wurden in DH5α™- oder One Shot® TOP10-Bakterien vermehrt.

2.2.3.1.1 Transformation

Die Transformation chemisch kompetenter DH5α™- bzw. One Shot® TOP10-Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock modifiziert nach der Methode von Hanahan (1983).

Nach dem Auftauen der Bakterien auf Eis wurden 50-200 ng eines gereinigten Plasmids, 1/5 Volumen eines Ligationsansatzes oder 6 µl eines PCR-Ansatzes zur *in vitro*-Mutagenese zugegeben und durch mehrmaliges, vorsichtiges Pipettieren gemischt. Anschließend folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurde der Hitzeschock bei 42°C für 45 s in einem Heizblock durchgeführt. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 250 µl LB-Medium bzw. SOC-Medium

(Invitrogen, Karlsruhe) ohne Zusatz von Antibiotika zugegeben und 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurden 50-250 µl auf LB-Amp- bzw. LB-Kan-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden dann 16 h bei 37°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Der Erfolg der Transformation wurde durch Minipräparation und anschließenden analytischen Restriktionsverdau überprüft.

2.2.3.1.2 Herstellung von Bakterien-Glycerinstocks

Zur Anzucht wurde 1 ml LB-Amp- bzw. LB-Kan-Medium in einem sterilen 15 ml-Falcon®-Röhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Amp- bzw. LB-Kan-Agarplatte angeimpft und 16 h bei 37°C und 200 UpM in einem Bakterienschüttelinkubator kultiviert. Von der Bakterienkultur wurden 700 µl in ein Einfrierröhrchen überführt, mit 500 µl 50%iger (v/v) Glycerinlösung versetzt und durch mehrmaliges Pipettieren gemischt. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

2.2.3.1.3 Minipräparation von Plasmiden

Zur Minipräparation von Plasmiden wurden 2 ml LB-Amp- bzw. LB-Kan-Medium in einem 15 ml-Falcon®-Röhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Amp- bzw. LB-Kan-Agarplatte angeimpft und 16 h bei 37°C und 200 UpM in einem Bakterienschüttelinkubator kultiviert. Die Minipräparation erfolgte unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.1.4 Midi- und Maxipräparation von Plasmiden

Zur Midi- bzw. Maxipräparation von Plasmiden wurden 100 bzw. 400 ml LB-Amp- oder LB-Kan-Medium in einem Schikanekolben mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Amp- oder LB-Kan-Agarplatte angeimpft und 16 h bei 37°C und 200 UpM in einem Bakterienschüttelinkubator kultiviert. Die Midi- bzw. Maxipräparation wurde unter Verwendung des QIAfilter® Plasmid Midi bzw. Maxi Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.1.5 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung von DNA erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion von DNA-Lösungen bei 260 nm. Folgender Ansatz wurde vermessen:

DNA-Lösung	1 µl
H_2O_{bidest}	99 µl

Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration [µg/ml]} = E_{260\ nm} \times 50 \times 100$$

Als Maß für die Reinheit der DNA kann das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu 280 nm herangezogen werden. Dieses liegt bei reiner DNA in der Regel oberhalb von 1,8.

2.2.3.1.6 Analytischer Restriktionsverdau

Die Kontrolle von Plasmidpräparationen erfolgte durch Verdau der Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Restriktionsansatz

H_2O_{bidest}	15 µl
Plasmid-DNA (100-200 ng)	1 µl
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsendonuklease 1	1 µl
Restriktionsendonuklease 2	1µl

Nach Inkubation für 2-3 h bei 37°C wurden 10 µl des Ansatzes mit 2 µl 6x Probenpuffer versetzt und auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V.

2.2.3.2 RT-PCR

2.2.3.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus SH-SY5Y-Zellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde bei –20°C gelagert.

2.2.3.2.2 Quantifizierung von RNA

Die Quantifizierung von RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion von RNA-Lösungen bei 260 nm. Folgender Ansatz wurde vermessen:

RNA-Lösung	1 µl
H_2O_{bidest}	99 µl

Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu g/ml] = E_{260\,nm} \times 40 \times 100$$

Als Maß für die Reinheit der RNA kann das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu 280 nm herangezogen werden. Dieses sollte größer 1,6 sein und beträgt im optimalen Fall 2,0.

2.2.3.2.3 RT-Reaktion

Es wurden folgende Ansätze pipettiert:

Ansatz A		Ansatz B	
DEPC-Wasser	6,5 µl	5x M-MLV-RT-Puffer	4,0 µl
100 µM Oligo (dT)-Primer	1,0 µl	RNasin® (40 U/µl)	0,5 µl
Gesamt-RNA (200 ng/µl)	5,0 µl	10 mM dNTPs	2,0 µl
		M-MLV-RT (200 U/µl)	1,0 µl

Ansatz A wurde zunächst 10 min bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden Ansatz A und B vereinigt. Das Umschreiben der RNA in

cDNA erfolgte während einer 60-minütigen Inkubation bei 42°C. Die Proben wurden bei –20°C gelagert. Für den Einsatz in einer PCR wurde die cDNA zunächst 1:10 in TE-Puffer verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden dann 5 µl in der PCR eingesetzt.

2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für analytische Zwecke wurde Biotherm® DNA-Polymerase eingesetzt. Zur Klonierung wurde Pwo-DNA-Polymerase verwendet, da diese eine *Proofreading*-Aktivität aufweist.

PCR-Ansatz

cDNA/Vektor (200 ng)	5,0 µl
10x PCR-Puffer	5,0 µl
10 mM dNTPs	1,0 µl
10 µM Vorwärts-Primer 1	1,0 µl
(10 µM Vorwärts-Primer 2	1,0 µl, bei Multiplex-PCR)
10 µM Rückwärts-Primer 1	1,0 µl
(10 µM Rückwärts-Primer 2	1,0 µl, bei Multiplex-PCR)
DNA-Polymerase	0,5 µl
ad 50 µl mit H_2O_{bidest}	

Tabelle 2-6: Temperaturprogramme.

Schritt	**Erzeugung von Wt/C621-FLAG-Synphilin-1**	**Multiplex-PCR (Synphilin-1/EGFP)**
Denaturierung	95°C, 3 min	95°C, 3 min
Zyklen	35	35
Denaturierung	95°C, 1 min	95°C, 1 min
Primer-Anlagerung	50°C, 1 min	50°C, 1 min
Elongation	72°C, 4,2 min	72°C, 1 min
Elongation	72°C, 7 min	72°C, 7 min

2.2.3.4 Klonierung

Bei den Klonierungen wurde weitgehend nach den Methoden von Maniatis und Kollegen (1989) vorgegangen.

2.2.3.4.1 Präparativer Restriktionsverdau

Die Gewinnung von linearisierten Vektoren bzw. Genabschnitten aus Plasmidkonstrukten erfolgte mittels Restriktionsverdau wie unter 2.2.3.1.6 beschrieben. Lineare DNA, in die mittels PCR Restriktionsschnittstellen eingeführt worden war, wurde zunächst mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau für 2-3 h bei 37°C in folgendem Ansatz:

H_2O_{bidest}	6 µl
gereinigtes PCR-Produkt	28 µl
10x Restriktionspuffer	4 µl
Restriktionsendonuklease 1	1 µl
Restriktionsendonuklease 2	1 µl

Die Reinigung der Restriktionsansätze erfolgte im Falle von linearisierten Vektoren und PCR-Produkten mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden). Im Falle von Genabschnitten aus Plasmidkonstrukten wurde zunächst eine präparative Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde sorgfältig aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen Hilden) gereinigt.

2.2.3.4.2 Dephosphorylierung der Vektoren am 5'-Ende

Zur Vermeidung einer Selbstligation der Vektoren wurden deren 5'-Enden mittels SAP (durch Hitze inaktivierbare alkalische Phosphatase aus arktischen Garnelen) dephosphoryliert.

Ansatz

H_2O_{bidest}	7 µl
Vektor-DNA	28 µl
10x SAP-Puffer	4 µl
SAP	1 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die SAP durch Erhitzen auf 65°C für 10 min inaktiviert.

2.2.3.4.3 Ligation

Der DNA-Gehalt der zur Ligation bestimmten DNA-Lösungen wurde über die Ethidiumbromid-Fluoreszenz auf einem Gel mit Hilfe eines DNA-Größenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt. Das zu klonierende Fragment wurde in einem 3-5-fachen Überschuss zum linearisierten Vektor eingesetzt.

Ligationsansatz

Vektor-DNA (50 ng)	x µl
Insert-DNA (150-250 ng)	y µl
10x Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H_2O_{bidest}	ad 20 µl

Der Ansatz wurde 16-18 h bei 16°C inkubiert und zur Transformation eingesetzt.

2.2.3.4.4 Kontrolle von Plasmidkonstrukten

Die Identität neu erzeugter Plasmidkonstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierreaktion wurde von einem kommerziellen Anbieter (GENterprise, Mainz) durchgeführt.

2.2.3.5 *In vitro*-Mutagenese

Die Generierung von pcDNA3.1-L159-myc$_6$-Parkin bzw. pcDNA3.1-W275-myc$_6$-Parkin aus pcDNA3.1-Wt-myc$_6$-Parkin erfolgte durch Einführung von Punktmutationen mittels *in vitro*-Mutagenese. Hierzu wurden die unter 2.1.9.2 aufgeführten Mutagenese-Primer verwendet.

2.2.3.5.1 Prinzip

Die im folgenden beschriebene Methode basiert auf dem Quick Change® Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (USA). Sie ist geeignet, um durch PCR unter Verwendung von *PfuTurbo*® DNA-Polymerase (Stratagene, USA) Punktmutationen, AS-Austausche oder Deletionen in ein superspiralisertes, doppelsträngiges Plamidkonstrukt einzuführen. Hierzu werden zwei selbstkomplementäre Oligonukleotidprimer, welche die gewünschte Mutation enthalten und komplementär zum betreffenden Plasmidabschnitt sind, designed. Mittels PCR wird das Plasmidkonstrukt unter Einführung der Mutation amplifiziert. *PfuTurbo*® DNA-Polymerase amplifiziert beide Plasmidstränge mit hoher Lesegenauigkeit und ohne Austausch der Mutation in den Oligonukleotidprimern. Das PCR-Produkt wird mit der Restriktionsendonuklease *Dpn*I behandelt. Dieses Enzym verdaut spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA (Erkennungssequenz: 5'-Gm^{6}ATC-3'). Da das in der PCR als Matrize eingesetzte Plasmidkonstrukt in *dam*$^+$ DH5α™-Bakterien vermehrt worden ist, ist es methyliert und wird durch *Dpn*I verdaut. Die mittels PCR neu synthetisierte, mutierte DNA weist keine Methylierung auf und wird daher nicht durch *Dpn*I verdaut. Durch Transformation kann sie in superkompetente Bakterien eingebracht werden.

2.2.3.5.2 Durchführung

2.2.3.5.2.1 PCR zur in vitro-Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen mittels PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

PCR-Ansatz

Plasmidkonstrukt (50 ng)	1,0 µl
10x *PfuTurbo*®-Puffer	5,0 µl
2 mM dNTPs	12,5 µl
10 µM Vorwärtsprimer	1,5 µl
10 µM Rückwärtsprimer	1,5 µl
PfuTurbo® DNA-Polymerase	1,0 µl
H_2O_{bidest}	27,5 µl

Tabelle 2-7: Temperaturprogramm.

Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 s
12	95°C	30 s
	55°C	1 min
	68°C	7,2 min

2.2.3.5.2.2 DpnI-Verdau und Transformation

Nach erfolgter PCR wurde 1 µl *Dpn*I zum PCR-Ansatz gegeben. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 1 h. Anschließend wurden 6 µl des Ansatzes zur Transformation von One Shot® TOP10-Bakterien eingesetzt (siehe 2.2.3.1.1). Der Erfolg der Transformation wurde durch Minipräparation und anschließenden analytischen Restriktionsverdau überprüft. Die Identität der Plasmidkonstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft.

2.2.3.6 Herstellung rekombinanter Adenoviren nach dem AdEasy-System

Der Gentransfer mittels rekombinanter Adenoviren weist mehrere Vorteile auf: i) Mit adenoviralem Gentransfer wird ein großes Spektrum verschiedenster Zellarten erreicht. ii) Der Gentransfer ist nicht von aktiver Zellteilung abhängig. iii) Es können sehr hohe Expressionsraten des Transgens erzielt werden.

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Ellen Gerhardt im Neurodegenerationslabor der Neurologischen Klinik der Universität Tübingen.

2.2.3.6.1 Das AdEasy-System

Beim AdEasy-System nach He und Mitarbeitern (1998) handelt es sich um ein einfaches System zur Erzeugung rekombinanter Adenoviren. Hierbei wird das gewünschte Gen zunächst in einen sogenannten *Shuttle*-Vektor (z.B. pAdTrack-CMV) kloniert, der zusätzlich die Sequenz für einen EGFP-Reporter enthält (siehe auch Abbildung 2-1). Das daraus resultierende Plasmid wird anschließend durch einen *Pme*I-Verdau linearisiert und zusammen mit einem sogenannten adenoviralen *Backbone*-Plasmid (z.B. pAdEasy-1), das große Teile des adenoviralen Genoms enthält, in *E.coli* co-transformiert. Dort findet die homologe Rekombination unter Bildung eines rekombinaten, adenoviralen Vektors statt. Rekombinante Bakterien werden nach Kanamycin-Resistenz selektioniert. Die Rekombination wird durch verschiedene Restriktionsanalysen überprüft. Anschließend wird das linearisierte, rekombinante Plasmid in eine Verpackungszelllinie transfiziert (z.B. HEK 293). Die Transfektionseffizienz lässt sich anhand der Fluoreszenz des EGFP-Reporters beurteilen. Innerhalb von 7-10 Tagen werden repliktionsdefiziente, rekombinante Adenoviren gebildet.

2.2.3.6.2 Klonierung von pAdTrack-CMV-Wt/C621-FLAG-Synphilin-1

Die Erzeugung der Wt- bzw. C621-FLAG-Synphilin-1-Konstrukte erfolgte mittels PCR (siehe 2.2.3.3) unter Verwendung der unter 2.1.9.1.1 beschriebenen Primer. Als Matrizen dienten pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 bzw. pEGFP-N1-C621-Synphilin-1. Die Identität der Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Klonierung der Konstrukte in pAdTrack-CMV erfolgte über eine *Xho*I- und *Hind*III-Schnittstelle.

2.2.3.6.3 Homologe Rekombination und Virusproduktion

Die homologe Rekombination zur Erzeugung von pAdEG-Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. pAdEG-C621-FLAG-Synphilin-1, die Virusproduktion zur Erzeugung von AdEG-Wt-FLAG-Synphilin-1 und AdEG-C621-FLAG-Synphilin-1 sowie die Bestimmung der Viren-Titer nach der Methode von He und Mitarbeitern (1998) wurden von Dr. Ellen Gerhardt durchgeführt.

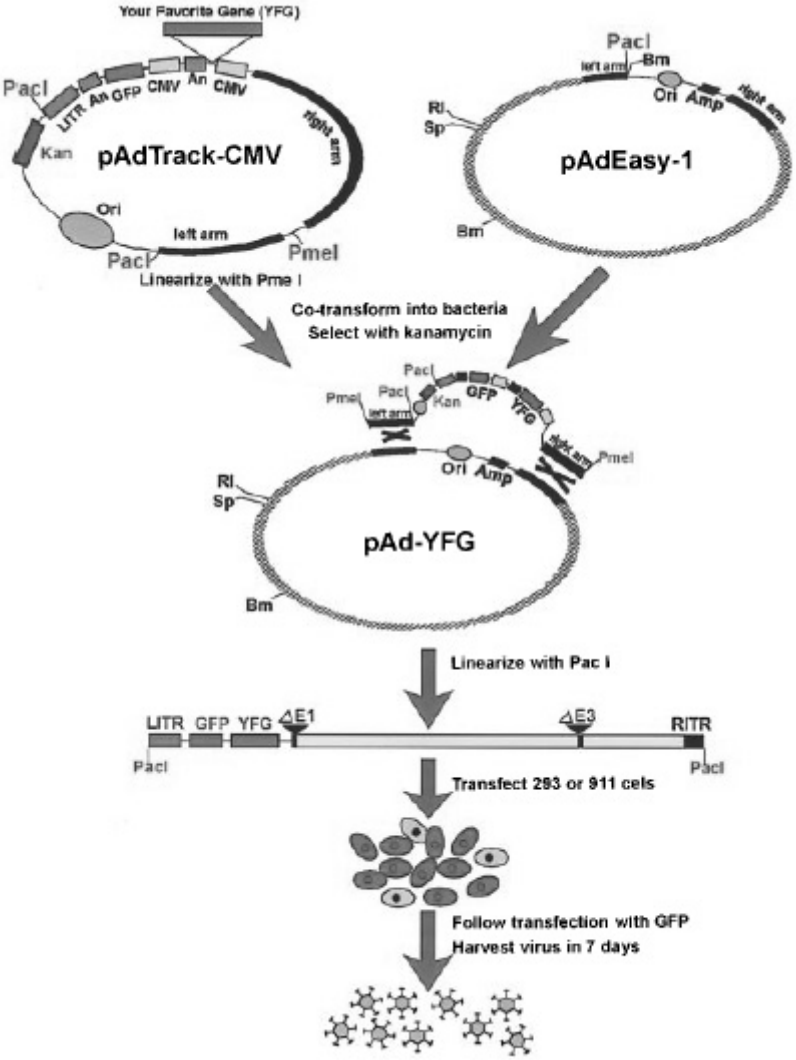


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des AdEasy-Systems (aus He *et al.*, 1998). Für Erläuterungen siehe Text. „*Left arm*“ und „*rigth arm*“ repräsentieren die Regionen, welche die homologe Rekombination zwischen *Shuttle*-Vektor und adenoviralem *Backbone*-Vektor vermitteln. An: Polyadenylierungsstelle; Bm: *Bam*HI; CMV: Cytomegalievirus-Promoter; RI: *Eco*RI; GFP: *green fluorescent protein*; LITR: linkes *inverted terminal repeat* und Verpackungssignal; RITR: rechtes *inverted terminal repeat*; Sp: *Spe*I.

2.2.3.7 Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix-Microarray-Technologie

Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression in Wt- oder C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen wurden Genexpressionsanalysen mittels Affymetrix-Microarray-Technologie in der IZKF Microarray Facility Tübingen

durchgeführt. Hierbei wurde der Human Genome U133 Plus 2.0 Array, der mehr als 47000 Transkripte enthält, verwendet.

2.2.3.7.1 Infektion von SH-SY5Y-Zellen mit rekombinanten Adenoviren und RNA-Präparation

Je drei 35 x 10 mm-Zellkulturschalen mit 4 x 10^6 SH-SY5Y-Zellen wurden mit je 10 MOI AdEG-R621-FLAG-Synphilin-1 (Probenbezeichnung Wt-1, Wt-2 und Wt-3) oder AdEG-C621-FLAG-Synphilin-1 (Probenbezeichnung C621-1, C621-2 und C621-3) wie unter 2.2.1.8 beschrieben infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und abzentrifugiert. Die Zellen wurden 1x mit kaltem PBS gewaschen und bei 300x *g* und 4°C sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 250 µl zur Herstellung von Zellextrakten für eine spätere Expressionsanalyse mittels Western-Blotting entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde bei 300x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden bei –80°C gelagert. Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Die RNA wurde wie unter 2.2.3.2.1 beschrieben isoliert.

2.2.3.7.2 Durchführung der Microarray-Analyse

Die Gesamt-RNA aus 2.2.3.7.1 wurde an die IZKF Microarray Facility Tübingen zur Analyse übergeben. Dort wurde zunächst die Qualität der RNA überprüft. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mittels RT-Reaktion unter Verwendung von T7-Oligo (dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. Mittels RNA-Polymerase-Reaktion wurde die gewonnene cDNA in cRNA (komplementär zur ursprünglichen RNA) umgewandelt, wobei biotinylierte Nukleotide für die Synthese eingesetzt wurden. Nach Fragmentierung der biotinylierte cRNA erfolgte die Hybridisierung. Dabei wurde für jede Probe ein eigener Array verwendet. Gefärbt wurde mit Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin. Die Detektion erfolgte mit dem GeneChip® Scanner 3000. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite Software (Version 5.0), MicroDB und Data Mining Tool.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie dient dazu, die Expression und subzelluläre Lokalisation von Proteinen in der Zelle zu bestimmen. Hierbei können fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet werden, die das zu untersuchende Protein erkennen. Ferner besteht die Möglichkeit, nicht-markierte Primärantikörper gegen das zu untersuchende Protein einzusetzen, an die in einem zweiten Schritt fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper gebunden werden. Die Detektion erfolgt mittels eines Fluoreszenzmikroskops.

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen in 24-*well*-Platten kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, für 10 min bei RT mit 4% (w/v) PFA in PBS fixiert und mit 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS wurden die Zellen 30 min bei RT mit 10% (v/v) FBS in PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (in 5% (v/v) FBS in PBS) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und 30 min bei 37°C mit dem adäquaten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde 4x mit PBS gewaschen. Zellkerne wurden bei Bedarf mit Hoechst 33258 in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS für 20 min bei RT angefärbt. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS wurden die Deckgläschen mit Immu-Mount auf Objektträgern aufgebracht. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei RT.

2.2.4.2 Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflusszytometrie

2.2.4.2.1 Assay-Prinzip

Unter Apoptose versteht man einen physiologischen Prozess, bei dem Zellen nach einem genau festgelegten Programm absterben. Dieses Programm ist durch verschiedene morphologische Merkmale wie z.B. den Verlust der Assymetrie der Plasmamembran, der Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns und der

DNA-Fragmentierung gekennzeichnet. Der Verlust der Assymetrie der Plasmamembran ist eines der frühesten Merkmale für den apoptotischen Zelltod. Das Phospholipid Phosphatidylserin wird dabei von der inneren Lipidschicht der Plasmamembran in die äußere transloziert. Annexin V, ein 35-36 kDa Ca^{2+}-abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin, bindet an Zellen, auf deren Oberfläche Phosphatidylserin exponiert ist (Raynal und Pollard, 1994; Übersichtsartikel). An Annexin V können Fluorochrome wie Cy5 gekoppelt werden, wodurch eine Detektion mittels Durchflusszytometrie möglich ist.

Bei der Nekrose geht im Gegensatz zur Apoptose die Membranintegrität der Zelle verloren. Dadurch kann Annexin V-Cy5 die in die Zelle eindringen und an Phosphatidylserin, das in der inneren Lipidschicht der Membran lokalisiert ist, binden. Um Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können wird daher zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Dieser DNA-bindende Farbstoff kann nur in die Zelle eindringen, wenn die Integrität der Plasmamembran verlorengegangen ist.

Durch die Kombination von Annexin V-Cy5 und PI kann zwischen vitalen Zellen (keine Anfärbung), apoptotischen Zellen (Annexin V-Cy5-positiv), und nekrotischen Zellen (PI-Annexin V-Cy5/PI-positiv) unterschieden werden.

2.2.4.2.2 Durchführung

SH-SY5Y-Zellen wurden mit je 1 µg DNA pro Vektor transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit 0,5 µM Staurosporin behandelt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und auf Eis aufbewahrt, um auch Zellen, die sich durch die Behandlung bereits vom Kulturgefäß abgelöst hatten, in die Messung einzuschließen. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, durch Trypsin/EDTA vom Kulturgefäß abgelöst und in Vollmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit dem zuvor abgenommenen Medium vereinigt. Danach wurden die Zellen bei 300x *g* und 4°C sedimentiert, 2x mit kaltem PBS gewaschen und in 1x Annexin V-Bindungspuffer in einer Konzentration von ca. 1 x 10^6 Zellen/ml resuspendiert. Zu 100 µl dieser Zellsuspension wurden 5 µl Annexin V-Cy5 und 5 µl Propidiumiodid-Lösung geben. Nach Mischen und 15-minütiger Inkubation bei RT in Dunkelheit wurden

400 µl 1x Annexin V-Bindungspuffer zugegeben. Die Analyse erfolgte mittels eines FACSCalibur-Durchflusszyometers. Die EGFP-Fluoreszenz wurde im FL 1-Kanal, PI im FL 2-Kanal und Annexin V-Cy5 im FL 4-Kanal gemessen. Die Kanäle wurden zuvor durch entsprechende Positiv- und Negativkontrollen gegeneinander kompensiert. Durch Setzen eines *Gates* wurden nur EGFP-positive Zellen in die Messung einbezogen. Es wurden jeweils mehr als 7000 Zellen gezählt.

2.2.4.2.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Cell Quest, Version 3.1f, von Becton Dickinson (Heidelberg). Die Zellen wurden entsprechend ihrer Anfärbung in vier Quadranten eingeteilt: keine Anfärbung, Annexin V-Cy5-positiv, PI-positiv und Annexin V-Cy5/PI-positiv. Durch Anwendung einer sogenannten Quadrantenstatistik wurde die prozentuale Verteilung der Zellen erhalten.

2.2.4.3 Proteasomen-Aktivitäts-Test

2.2.4.3.1 Testprinzip

Um die chymotryptische proteasomale Aktivität in Zellextrakten zu bestimmen, kann das fluorogene, proteasomale Substrat Suc-LLVY-AMC verwendet werden. Dieses wird unter Freisetzung des fluoreszierenden AMC durch das Proteasom hydrolysiert. Die AMC-Fluoreszenz kann mit einem Fluoreszenz-Spektrophotometer gemessen werden.

2.2.4.3.2 Durchführung

HEK 293-Zellen wurden mit je 2 µg DNA pro Vektor transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden Zellextrakte unter Verwendung von Lysepuffer ohne Protease-Inhibitoren hergestellt. Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt. Von jedem Zellextrakt wurden jeweils 20 µl je Test eingesetzt. Zu den Extrakten wurden 180 µl PT-Puffer (siehe 2.1.6.8) gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C in Dunkelheit. Als Negativkontrollen dienten Zellextrakte, die mit PT-Puffer ohne Suc-LLVY-AMC inkubiert wurden. Um unspezifische Effekte auszuschließen wurden die Zellextrakte mit PT-Puffer, der 50 µM des

Proteasomeninhibitors MG132 enthielt, inkubiert. Die Proben wurden mit einem Spectrafluor Fluoreszenz-Spektrophotometer bei einer Anregungs-Wellenlänge von 360 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 450 nm nach verschiedenen Zeitpunkten (30, 60, 90, 120 und 150 min) in einer Microtiterplatte vermessen.

2.2.4.3.3 Auswertung

Zunächst erfolgte eine Korrektur der eigentlichen Messwerte durch Subtraktion der Werte der entsprechenden Negativkontrollen. Die so erhaltenen Werte wurden durch Subtraktion der entsprechenden Werte bei Behandlung mit MG132 korrigiert. Die korrigierten Werte wurden dann gegen die Zeit aufgetragen. Für den linearen Teil der Kurve wurde eine lineare Regression durchgeführt. Um die spezifische Aktivität zu ermitteln, wurde die aus der Regression erhaltene Steigung durch die Proteinkonzentration des entsprechenden Zellextraktes dividiert. Der Student's t-Test wurde genutzt, um auf signifikante Unterschiede in der spezifischen Aktivität zu testen ($p < 0,05$).

2.2.4.4 Bestimmung des *Steady-State-Levels* von Synphilin-1

Um einen möglichen Einfluss der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase auf den Synphilin-1-Gehalt in der Zelle zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen mit 2 µg pAdTrack-CMV-Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. pAdTrack-CMV-C621FLAG-Synphilin-1 und steigenden Mengen von pCMV5L-S6 (0, 1 oder 2 µg) transfiziert. Um gleiche DNA-Mengen in allen Transfektionsansätzen zu erhalten, wurde pcDNA3.1-Leervektor als „Füllvektor" verwendet. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden Zellextrakte unter Verwendung von Lysepuffer hergestellt. Die Proteinkonzentration in den Extakten wurde mittels Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt. Gleiche Proteinmengen (30 µg pro Geltasche) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Kaninchen anti-FLAG- und Kaninchen anti-HA-Antikörpern. Zum Nachweis gleicher Transfektionseffizienzen, wurde EGFP, das durch pAdTrack-CMV-Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. pAdTrack-CMV-C621-FLAG-Synphilin-1 co-exprimiert wird, mittels eines Kaninchen anti-GFP-Antikörpers detektiert.

3 Ergebnisse

Synphilin-1, ein Protein mit noch weitgehend unbekannter Funktion, konnte als Interaktionspartner von α-Synuklein (PARK1) und als Substrat der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin (PARK2) identifiziert werden und stellt somit eine funktionelle Verbindung zwischen zwei für die PK relevanten Proteinen her. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für medizinische Genetik der Universität Rostock konnte eine Mutation im *Synphilin-1*-Gen bei zwei Patienten mit sporadischem PS identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Mutation mit Blick auf eine mögliche Bedeutung für die Pathogenese der PK funktionell durch ektope Überexpression des mutierten Proteins im Zellkulturmodell charakterisiert. Ferner wurde in einem Kandidatenansatz versucht, neue Interaktionspartner von Synphilin-1 zu identifizieren, um Hinweise auf die physiologische Funktion des Synphilin-1-Proteins zu erhalten.
Im *Parkin-Gen* konnten bereits eine Reihe von Mutationen identifiziert werden, die zum Funktionsverlust des Parkin-Proteins führen und ursächlich für ein früh beginnendes, autosomal-rezessiv vererbtes PS sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue *Parkin*-Mutation im Zellkulturmodell durch ektope Überexpression des mutierten Proteins funktionell charakterisiert.

3.1 Funktionelle Charakterisierung einer neuen R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen

In Vorarbeiten, die von Dr. Carsten Holzmann in der Abteilung für Medizinische Genetik der Universität Rostock durchgeführt wurden, konnte eine neue R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen entdeckt werden. Bei zwei deutschen Patienten mit sporadischem, spät beginnendem IPS wurde ein Basenaustausch von C zu T in Position 1861 der kodierenden Sequenz identifiziert, der einen Austausch der AS Arginin durch Cystein in Position 621 der AS-Sequenz von Synphilin-1 zur Folge hat (Abbildung 3-1). Diese Sequenz-Variante konnte in der Kontrollgruppe, die aus 351 gesunden Deutschen bestand, nicht gefunden werden.

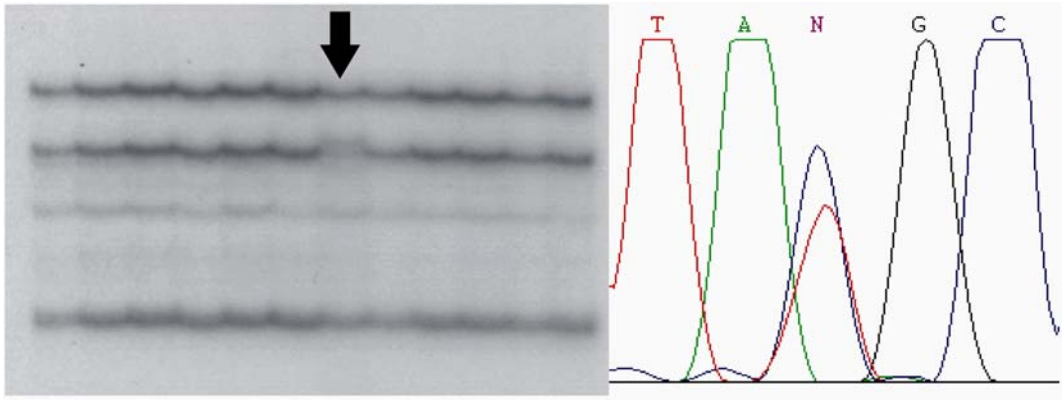


Abbildung 3-1: Entdeckung der R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen. Die Verschiebung der Bande im SSCP-Gel (siehe Pfeil) wurde durch Sequenzierung als heterozygoter Basenaustausch von C zu T in Position 1861 der kodierenden Sequenz identifiziert.

Die identifizierte R621C-Mutation ist in einer zwischen Maus und Mensch hoch konservierten Region (AS 612-698) des Synphilin-1-Proteins lokalisiert (Abbildung 3-2).

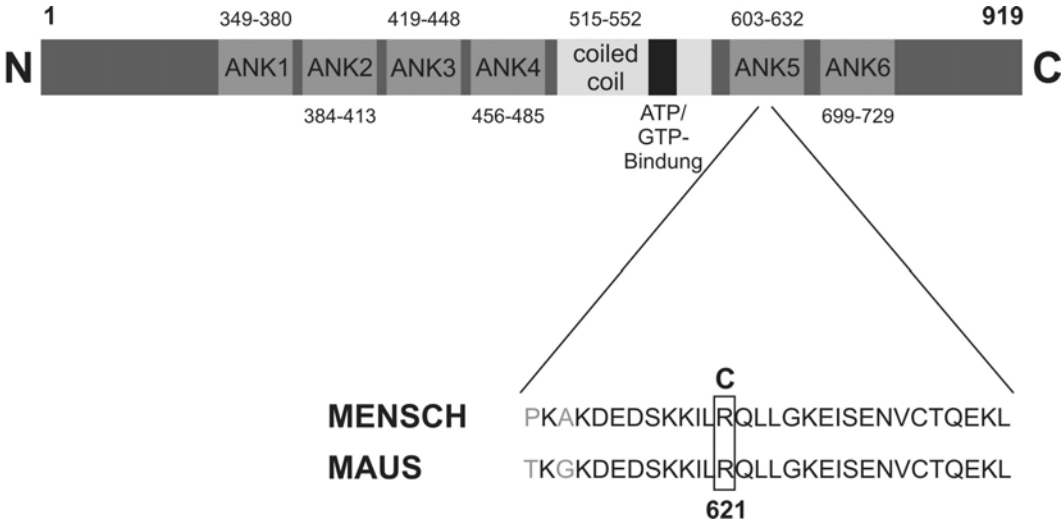


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Synphilin-1-Proteins. Synphilin-1 enthält eine *coiled-coil*-Domäne, eine ATP/GTP-Bindedomäne und 6 Ankyrin-*Repeats*. Die R621C-Mutation liegt in einer zwischen Maus und Mensch hoch konservierten Region.

Um zu untersuchen, ob die mutierte Form von Synphilin-1 (C621-Synphilin-1) eine Rolle bei der molekularen Pathogenese des IPS spielt, wurden verschiedene

funktionelle Analysen im Zellkulturmodell durchgeführt. Hierzu wurden Wt- und C621-Synphilin-1-Konstrukte in humanen, embryonalen Nierenzellen (HEK 293-Zellen) und in neuronalen, dopaminergen SH-SY5Y-Zellen ektop überexprimiert.

3.1.1 Überexpression von Synphilin-1-EGFP-Fusionsprotein in HEK 293- und SH-SY5Y-Zellen

Für die im folgenden beschriebenen funktionellen Untersuchungen wurden unter anderem Wt- und C621-Synphilin-1-EGFP-Konstrukte eingesetzt. Der Vorteil dieser Konstrukte bestand darin, dass durch den C-terminalen EGFP-*tag* die zelluläre Lokalisation von Synphilin-1 direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnte.

Zunächst wurden die Konstrukte hinsichtlich ihrer Expression in Zellen getestet. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 oder pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 für 48 h transfiziert. Mit den anschließend gewonnenen Zelllysaten wurden Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines anti-Synphilin-1-Antikörpers zum Nachweis von Synphilin-1-EGFP durchgeführt. Der Nachweis von β-Aktin diente als Ladekontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Wt- und C621-Synphilin-1-EGFP-Konstrukte gleich gut in HEK 293-Zellen exprimiert wurden (Abbildung 3-3).

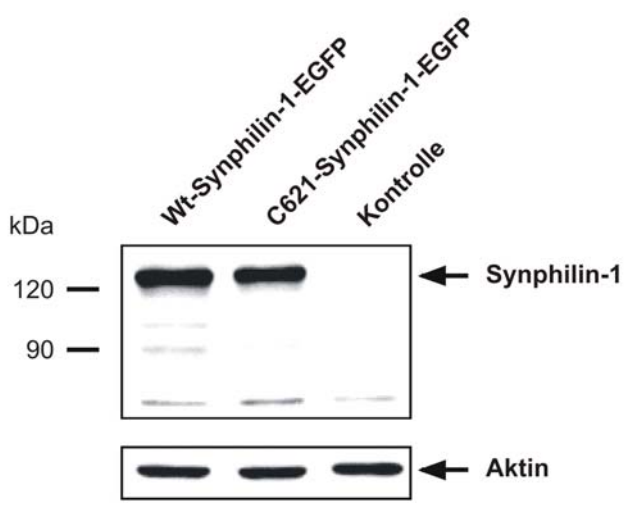


Abbildung 3-3: Überexpression von Wt- und C621-Synphilin-1-EGFP. Lysate aus HEK 293-Zellen, die mit pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 bzw. pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 transfiziert worden waren, zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe von ca. 130 kDa im Western-Blot (Spur 1 und 2). Als Negativkontrolle diente Lysat aus untransfizierten HEK 293-Zellen (Spur 3). Es wurden gleiche Proteinmengen (30 µg) pro Spur geladen. Für die Western-Blot-Analyse wurden ein polyklonaler anti-Synphilin-1- und ein polyklonaler anti-β-Aktin-Antikörper verwendet.

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von Wt- bzw. C621-Synphilin-1 wurden dopaminerge SH-SY5Y-Zellen für 48 h mit pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 oder pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 transfiziert. Neben einer homogenen, zytosolischen Verteilung konnte in einem Teil der Zellen, die Wt- bzw. C621-Synphilin-1-EGFP überexprimierten, die Bildung eines oder mehrerer zytoplasmatischer Synphilin-1-Einschlüsse beobachtet werden (Abbildung 3-4 A und B). Dagegen zeigte sich in den Kontrollen, die nur EGFP exprimierten, ausschließlich eine homogene EGFP-Verteilung ohne Bildung von Protein-Einschlüssen (Abbildung 3-4 C). Die Bildung intrazytoplasmatischer Synphilin-1-Einschlüsse konnte auch in HEK 293-Zellen beobachtet werden.

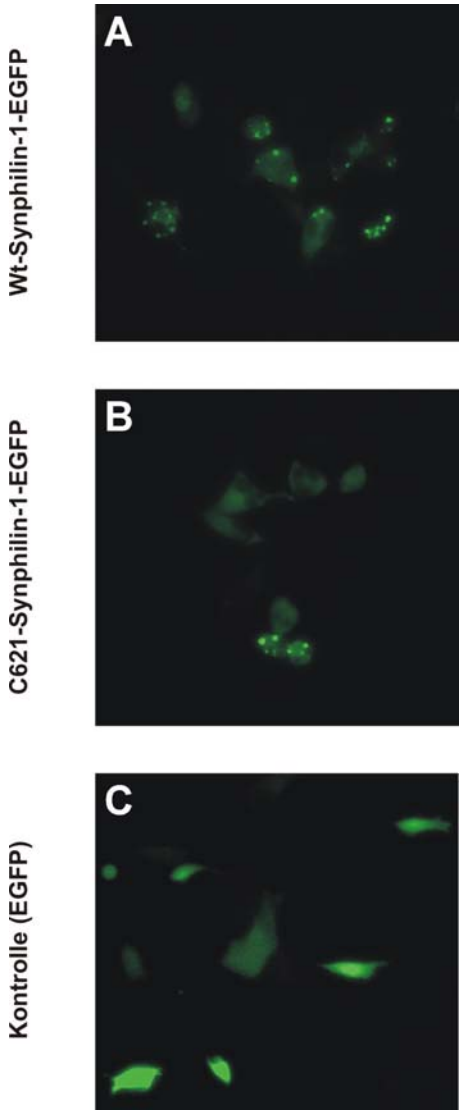


Abbildung 3-4: Bildung intrazytoplasmatischer Synphilin-1-Einschlüsse in SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h mit Kontrollvektor (pEGFP-N1), pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 oder pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 transfiziert. Einige Zellen, die Wt- oder C621-Synphilin-1-EGFP überexprimierten, zeigten ein oder mehrere intrazytoplasmatische Synphilin-1-Einschlüsse (**A** und **B**). Dagegen zeigten Zellen, die EGFP alleine überexprimierten, eine homogene Verteilung des EGFP-Proteins im Zytoplasma (**C**).

3.1.2 Einfluss proteasomaler Hemmung auf die Bildung der zytoplasmatischen Synphilin-1-Einschlüsse

Synphilin-1 wird durch die E3-Ubiquitin-Ligasen Parkin, Siah-1, Siah-2 und Dorfin ubiquitiniert und über das Proteasomen-System degradiert (Chung *et al.*, 2001; Nagano *et al.*, 2003; Liani *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002). Von Lee und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit proteasomalen Inhibitoren zu einer Verminderung des Synphilin-1-Abbaus sowie zur Akkumulation von ubiquitiniertem Synphilin-1 in HEK 293-Zellen führt (Lee *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse ließen sich in der vorliegenden Arbeit sowohl für Wt- als auch C621-Synphilin-1 reproduzieren (Abbildung 3-5). Hierbei wurden Wt- oder C621-Synphilin-1-Konstrukte mit N-terminalem FLAG-*tag* in HEK 293-Zellen 48 h überexprimiert. Anschließend wurde Synphilin-1 quantitativ mittels ANTI-FLAG® M2 Affinitäts-Gel präzipitiert und unter Verwendung eines polyklonalen FLAG-Antikörpers mittels Western-Blot detektiert. Die Ubiquitinierung wurde mit einem polyklonalen anti-Ubiquitin-Antikörper nachgewiesen. Sowohl Wt- als auch C621-Synphilin-1 waren partiell ubiquitiniert (Abbildung 3-5). Nach Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 konnten größere Mengen Wt- bzw. C621-Synphilin-1 präzipitiert werden als dies ohne Behandlung der Fall war. Dieses Ergebnis lässt sich durch einen verminderten Abbau von ubiquitiniertem Synphilin-1 durch das Proteasom erklären.

Um zu untersuchen, ob die Hemmung des Proteasoms einen Einfluss auf die Bildung der intrazytoplasmatischen Synphilin-1-Einschlüsse hat, wurden mit pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 oder pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 transfizierte SH-SY5Y-Zellen für 4 h mit dem proteasomalen Inhibitor Clasto-Lactacystin-β-lacton in einer Konzentration von 4 µM behandelt. Die EGFP-Fluoreszenz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der Anteil der Zellen, die Synphilin-1-Einschlüsse enthielten, wurde durch Auszählen bestimmt.

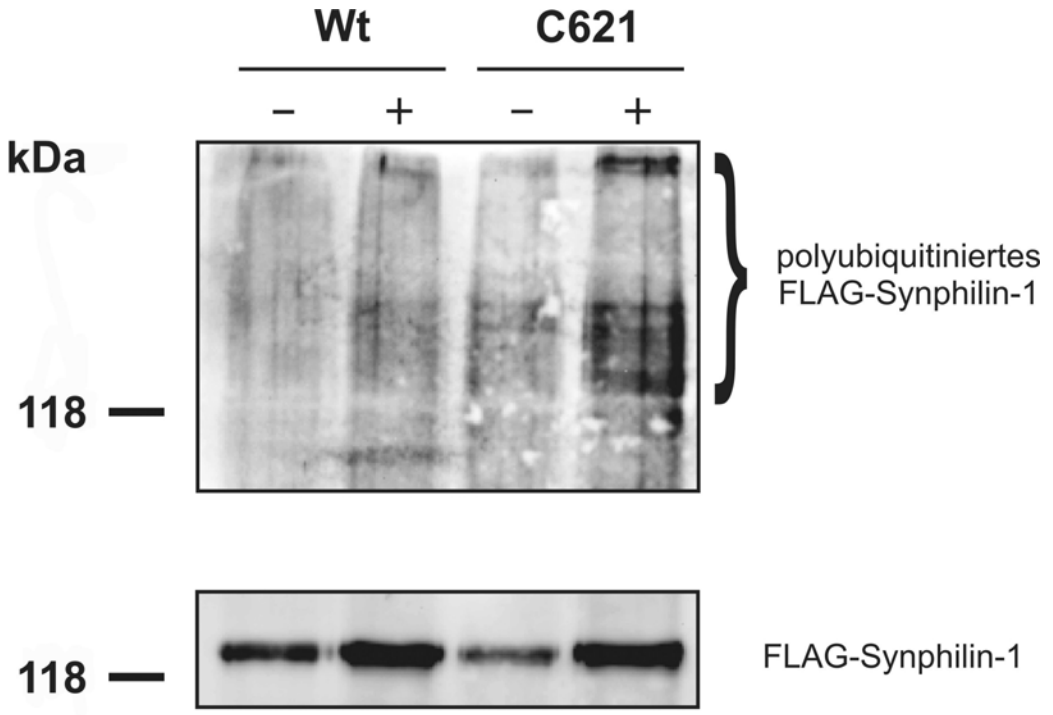
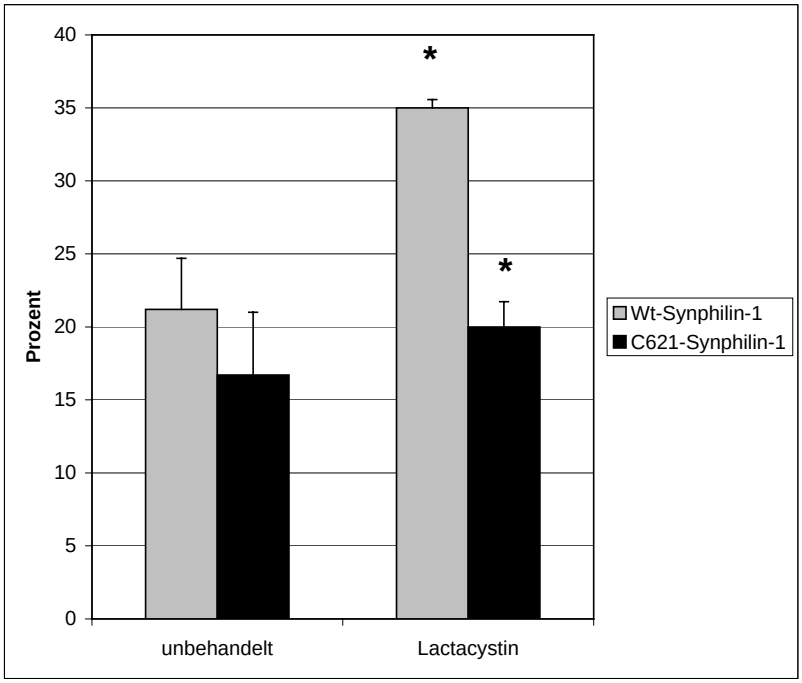


Abbildung 3-5: Ubiquitinierung von Synphilin-1 und Verminderung des Synphilin-1-Abbaus durch proteasomale Inhibition. HEK 293-Zellen wurden mit pAdTrack-CMV-Wt-FLAG-Synphilin-1 oder pAdTrack-CMV-C621-FLAG-Synphilin-1 transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h entweder mit 5 µM MG132 (+) oder DMSO (-) behandelt. Nach weiteren 24 h wurden Immunpräzipitationen unter Verwendung von ANTI-FLAG® M2 Affinitäts-Gel durchgeführt. Für die Western-Blot-Analyse wurden ein polyklonaler anti-FLAG- und ein polyklonaler anti-Ubiquitin-Antikörper verwendet. Der Abbau von Wt- und C621-Synphilin-1 wurde durch MG132-Behandlung vermindert (unterer Bildausschnitt). Sowohl Wt- als auch C621-Synphilin-1 waren polyubiquitiniert (oberer Bildausschnitt).

Die Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor führte zu einer verstärkten Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen. Dieser Effekt war bei Überexpression von Wt-Synphilin-1-EGFP stärker ausgeprägt als bei Überexpression von C621-Synphilin-1-EGFP (Abbildung 3-6). Der Anteil von Zellen mit Synphilin-1-Einschlüssen war nach Behandlung mit Clasto-Lactacystin-β-lacton bei Überexpression der mutierten Form von Synphilin-1 signifikant geringer als bei Überexpression von Wt-Synphilin-1 (Student's t-Test, $p < 0{,}00015$; Abbildung 3-6).



Student's t-Test: $p < 0{,}00015$

Abbildung 3-6: Anteil von SH-SY5Y-Zellen mit intrazytoplasmatischen Synphilin-1-Einschlüssen. Die Überexpression von Wt-Synphilin-1-EGFP in unbehandelten Zellen führte zu einem höheren Anteil von Zellen mit Synphilin-1-Einschlüssen als die Überexpression von C621-Synphilin-1-EGFP. Nach Behandlung mit Clasto-Lactacystin-β-lacton war in beiden Fällen eine gesteigerte Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen zu beobachten. Dabei war der Anteil von Zellen mit Synphilin-1-Einschlüssen bei Überexpression von C621-Synphilin-1 im Vergleich zur Überexpression von Wt-Synphilin-1 signifikant geringer (Student's t-Test, $p < 0{,}00015$). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Zählungen dargestellt. Es wurden jeweils mindestens 300 Zellen gezählt. Jedes Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen reproduziert.

3.1.3 Einfluss der Synphilin-1-Expression auf die Zell-Vitalität

Der Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc ist ein charakteristisches Merkmal des IPS. Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob die Expression von mutiertem Synphilin-1 möglicherweise einen negativen Effekt auf die Vitalität von neuronalen, dopaminergen Zellen hat. Hierzu wurde ein Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflusszytometrie mit SH-SY5Y-Zellen, die mit pEGFP-N1-

Wt-Synphilin-1 oder pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 transfiziert worden waren, durchgeführt.

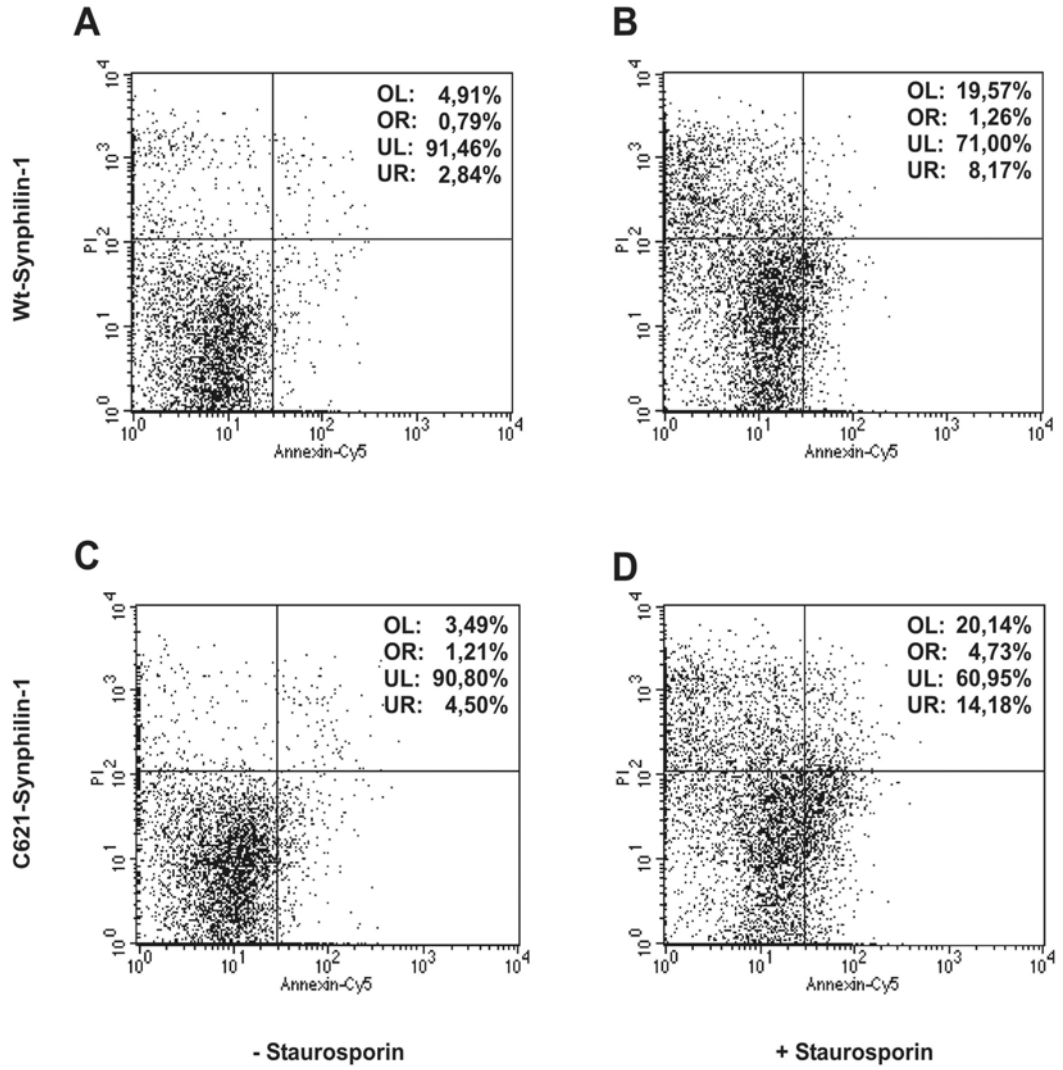


Abbildung 3-7: Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflusszytometrie. Die Vitalität von SH-SY5Y-Zellen, die mit pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 oder pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 transfiziert worden waren, wurde unter Verwendung von PI und Annexin-Cy5 als Nekrose- bzw. Apoptose-Marker analysiert. In die Messung wurden nur EGFP-positive Zellen einbezogen. Unbehandelte Zellen zeigten 48 h nach der Transfektion eine ähnliche Verteilung (**A** und **C**). Nach Behandlung mit 0,5 µM Staurosporin für 6 h (**B** und **D**) zeigten Zellen, die C621-Synphilin-1 exprimierten, eine verminderte Vitalität (61%) im Vergleich zu Wt-Synphilin-1-exprimierenden Zellen (71%). OL: oberer, linker Quadrant (nekrotische Zellen); OR: oberer, rechter Quadrant (nekrotische Zellen); UL: unterer, linker Quadrant (vitale Zellen); UR: unterer, rechter Quadrant (apoptotische Zellen).

Unbehandelte Wt- und C621-Synphilin-1-exprimierende Zellen zeigten einen gleich großen Anteil vitaler Zellen (ca. 90%). C621-Synphilin-1-exprimierende Zellen zeigten jedoch im Vergleich zu Wt-Synphilin-1-exprimierenden Zellen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem Apoptose-Stimulus Staurosporin. Nach Behandlung mit 0,5 µM Staurosporin für 6 h betrug der Anteil vitaler Zellen bei C621-Synphilin-1-exprimierenden Zellen nur noch 61% im Vergleich zu 71% bei den Wt-Synphilin-1-exprimierenden Zellen (Abbildung 3-7). Die verminderte Vitalität der C621-Synphilin-1-exprimierenden Zellen war dabei hauptsächlich auf einen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen von 4,5 auf 14% zurückzuführen (Abbildung 3-7).

3.1.4 Interaktion von Wt- und C621-Synphilin-1 mit α-Synuklein und Parkin

Um einen möglichen Einfluss der R621C-Mutation auf die bekannte Interaktion von Synphilin-1 mit Parkin bzw. α-Synuklein (Engelender *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2001) zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurden Wt-FLAG- bzw. C621-FLAG-Synphilin-1 zusammen mit Wt- bzw P30-myc_6-α-Synuklein oder Wt-myc_6-Parkin in HEK 293-Zellen co-exprimiert. Die bereits bekannten Interaktionen von Synphilin-1 mit α-Synuklein und Parkin konnten bestätigt werden. Ein Einfluss der Mutation auf die Interaktionen konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 3-8 A und C). Das gleiche Ergebnis wurde auch bezüglich der Interaktion mit P30-α-Synuklein erhalten (Abbildung 3-8 B).

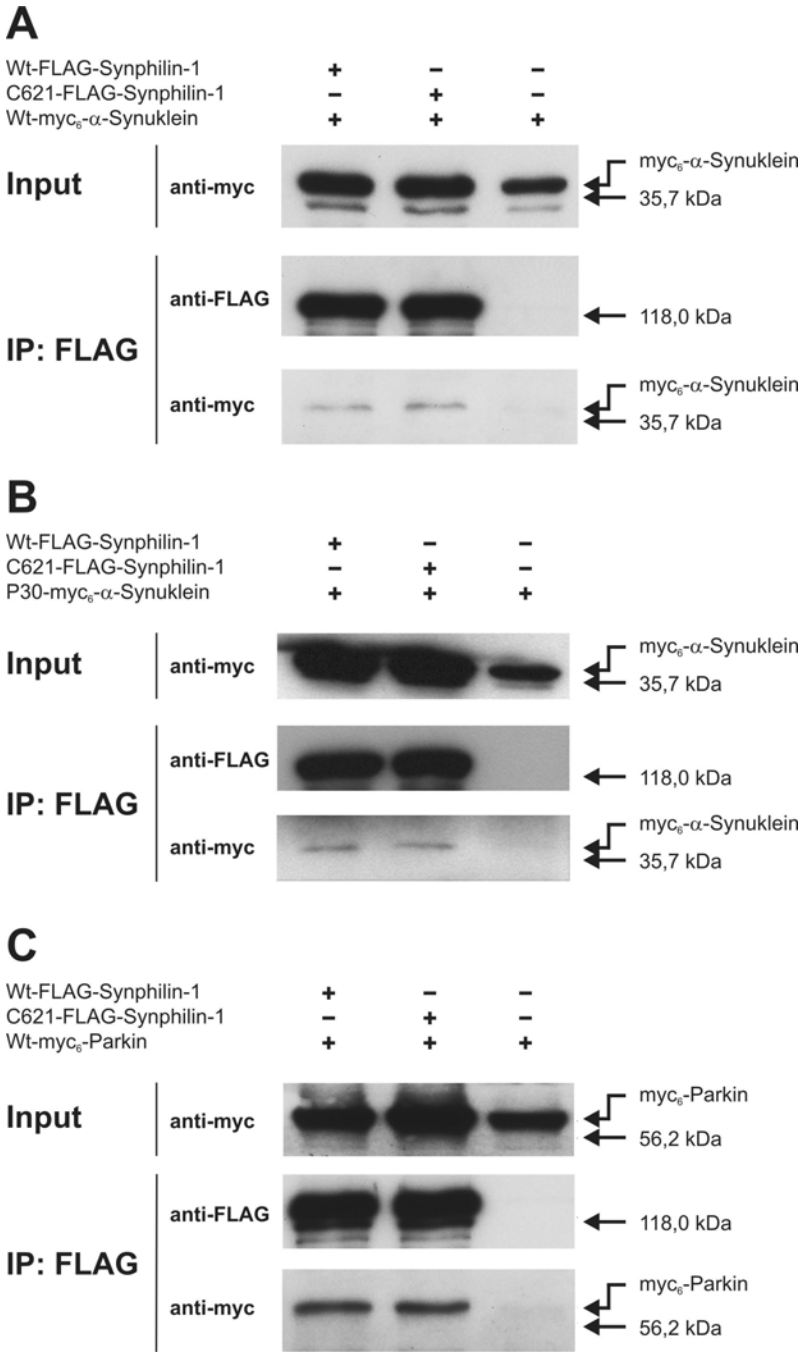


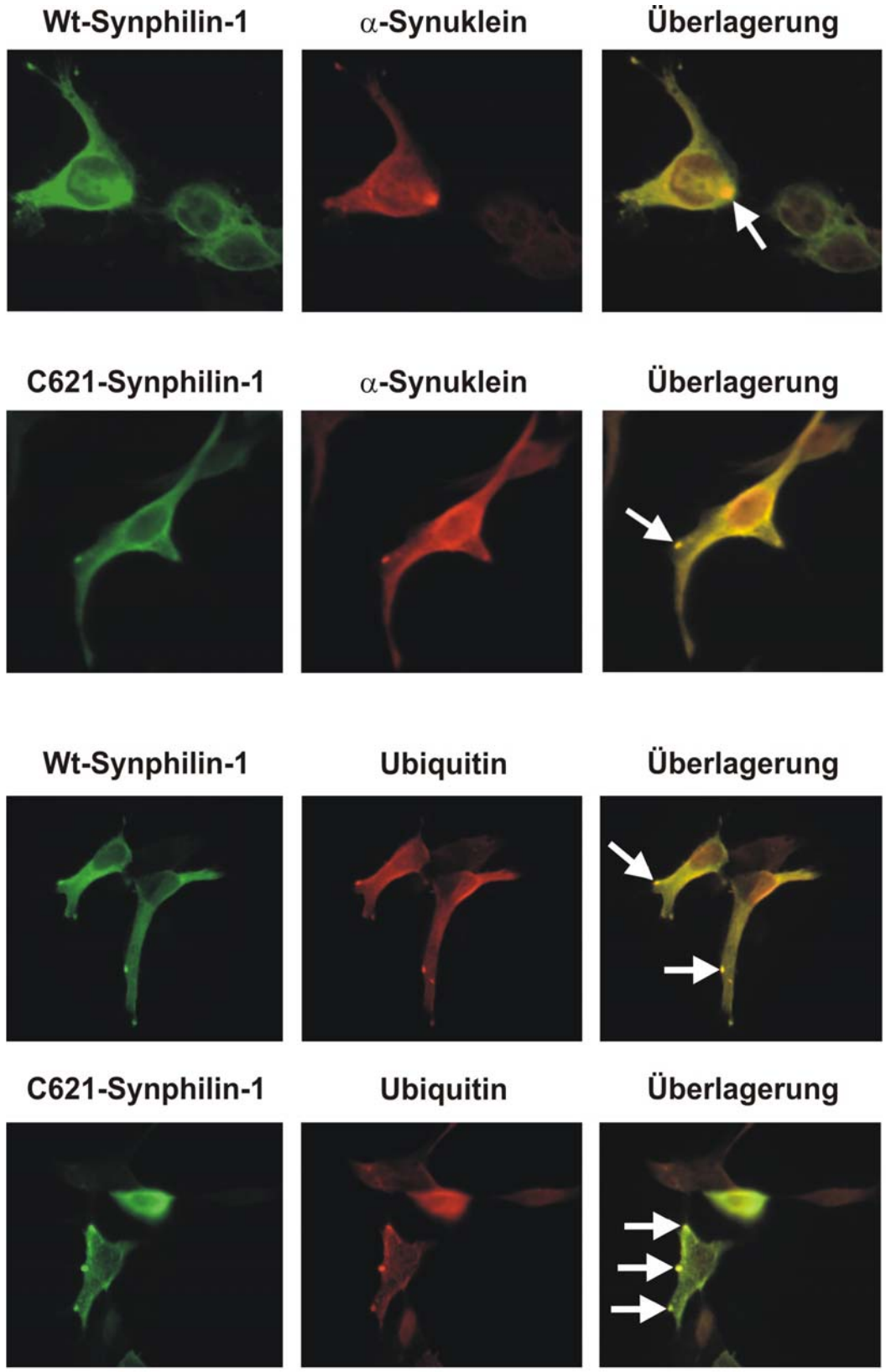
Abbildung 3-8: Interaktion von Wt- und C621-Synphilin-1 mit α-Synuklein und Parkin. Mit Lysaten aus HEK 293-Zellen, die FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) und myc_6-Parkin bzw. FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) und Wt-myc_6-α-Synuklein oder P30-myc_6-α-Synuklein co-exprimierten, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierbei wurde ANTI-FLAG® M2 Affinitäts-Gel verwendet. Für die Western-Blot-Analysen wurden ein polyklonaler anti-FLAG- und ein monoklonaler anti-myc-Antikörper verwendet. Sowohl Wt- als auch C621-Synphilin-1 co-präzipitierten spezifisch Wt-α-Synuklein (**A**), P30-α-Synuklein (**B**) und Parkin (**C**).

3.1.5 Charakterisierung der intrazytoplasmatischen Synphilin-1-Einschlüsse

Zur näheren Charakterisierung der *in vitro* beobachteten, zytoplasmatischen Synphilin-1-Einschlüsse wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Fragestellung war hierbei, ob das Synphilin-1-interagierende Protein α-Synuklein, das zusammen mit Synphilin-1 in LK in Gehirnen von Parkinson-Patienten gefunden wird (Wakabayashi *et al.*, 2000), auch *in vitro* in Synphilin-1-positiven Protein-Einschlüssen nachgewiesen werden kann. Ferner wurde untersucht, ob Ubiquitin in den Synphilin-1-positiven Protein-Einschlüssen nachzuweisen ist. Für die Untersuchungen wurde FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) zusammen mit myc_6-α-Synuklein oder HA_8-Ubiquitin in HEK 293-Zellen co-exprimiert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert. Bei der Immunfärbung wurden ein anti-Synphilin-1-, ein anti-myc- und ein anti-Ubiquitin-Antikörper eingesetzt. Sowohl Wt- als auch C621-Synphilin-1 co-lokalisierten mit α-Synuklein in zytoplasmatischen Protein-Einschlüssen (Abbildung 3-9). Die Synphilin-1-positiven Protein-Einschlüsse enthielten ebenfalls Ubiquitin. Damit konnte gezeigt werden, dass die im Zellkulturmodell beobachteten Protein-Einschlüsse Merkmale von LK aufweisen.

Abbildung 3-9: Co-Lokalisation von α-Synuklein und Ubiquitin in Synphilin-1-positiven, zytoplasmatischen Protein-Einschlüssen. HEK 293-Zellen wurden mit pcDNA3.1-Wt-FLAG-Synphilin-1 oder pcDNA3.1-C621-FLAG-Synphilin-1 in Kombination mit pcDNA3.1-Wt-myc_6-α-Synuklein oder pMT123 co-transfiziert. Die Immunfärbung erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen anti-Synphilin-1-Antikörpers, eines monoklonalen Maus anti-myc-Antikörpers und eines monoklonalen Maus anti-Ubiquitin-Antikörpers. Sowohl Wt- als auch C621-Synphilin-1 co-lokalisierten mit α-Synuklein und Ubiquitin in zytoplasmatischen Protein-Einschlüssen (siehe Pfeile).

Abbildung auf der nächsten Seite ➔


Wt-Synphilin-1
α-Synuklein
Überlagerung
C621-Synphilin-1
α-Synuklein
Überlagerung
Wt-Synphilin-1
Ubiquitin
Überlagerung
C621-Synphilin-1
Ubiquitin
Überlagerung

3.1.6 Analyse der differentiellen Genexpression in Wt- und C621-Synphilin-1-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen

Zur Analyse der differentiellen Genexpression wurden in drei unabhängigen Ansätzen SH-SY5Y-Zellen mit je 10 MOI AdEG-Wt-FLAG-Synphilin-1 (Probenbezeichnung: Wt-1, Wt-2 und Wt-3) oder AdEG-C621-FLAG-Synphilin-1 (Probenbezeichnung: C621-1, C621-2 und C621-3) infiziert. Nach 48 h wurde zunächst die Infektionseffizienz anhand der Fluoreszenz des EGFP-Reporters, der zusammen mit Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. C621-FLAG-Synphilin-1 co-exprimiert wurde, überprüft (Abbildung 3-10).

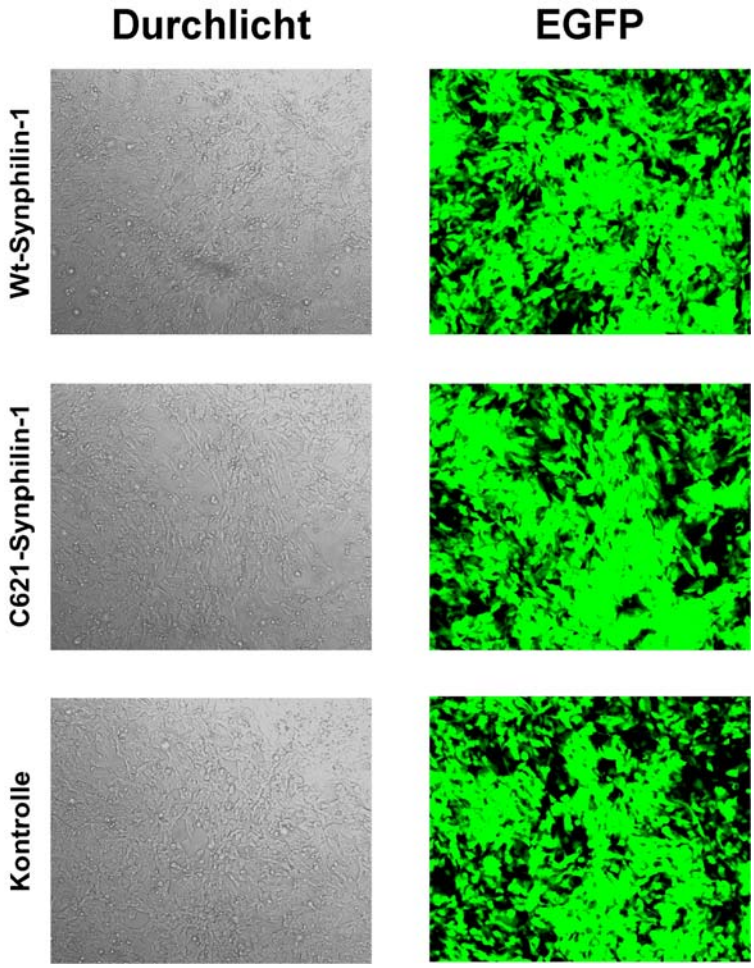


Abbildung 3-10: Infektionskontrolle 48 h nach der Infektion. Die Infektionseffizienz wurde anhand der EGFP-Fluoreszenz beurteilt. SH-SY5Y-Zellen wurden durch AdEG-Wt-FLAG-Synphilin-1 und AdEG-C621-FLAG-Synphilin-1 gleich gut infiziert. Als Kontrolle wurden SH-SY5Y-Zellen mit Kontrollvirus (AdEG) infiziert.

Anschließend wurden die Zellen vom Zellkulturgefäß abgelöst und abzentrifugiert. Aus einem Aliquot wurde Gesamtzellextrakt für eine Protein-Expressionskontrolle hergestellt. Die Protein-Expressionsanalyse mittels Western-Blotting zeigte eine annähernd gleich starke Expression von Wt- und C621-FLAG-Synphilin-1 in allen sechs Ansätzen (Abbildung 3-11).

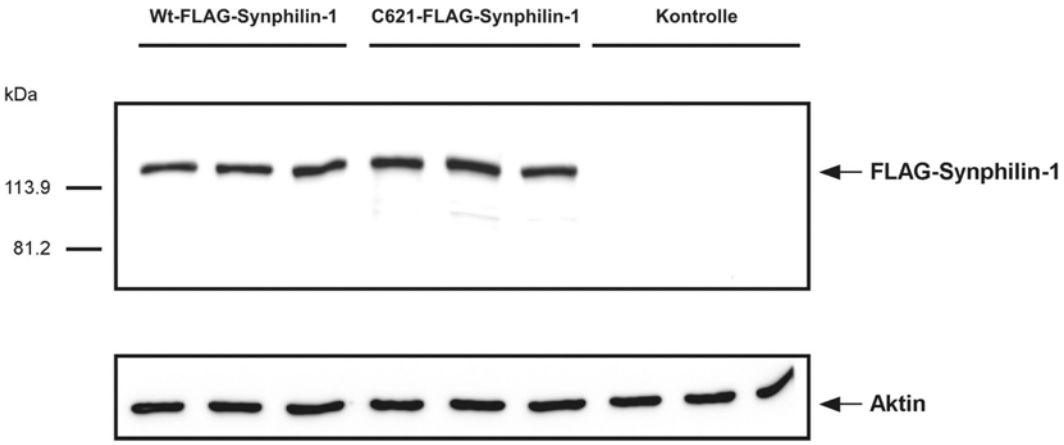


Abbildung 3-11: Analyse der Expression von Wt- und C621-FLAG-Synphilin-1 in SH-SY5Y-Zellen 48 h nach Infektion mittels Western-Blotting. Als Negativkontrolle diente Lysat aus SH-SY5Y-Zellen, die mit Kontrollvirus (AdEG) infiziert worden waren. Es wurden gleiche Proteinmengen (30 µg) pro Spur aufgetragen. Für die Western-Blot-Analyse wurden ein polyklonaler anti-Synphilin-1- und ein polyklonaler anti-β-Aktin-Antikörper verwendet.

Aus den restlichen Zellen wurde die Gesamt-RNA extrahiert. Zum Nachweis von Synphilin-1-cDNA wurde zunächst eine RT-PCR durchgeführt. Anschließend wurden in einer Multiplex-PCR ein 840 bp großes Synphilin-1-cDNA-Fragment sowie ein 534 bp großes cDNA-Fragment des EGFP-Reporters amplifiziert (Abbildung 3-12).

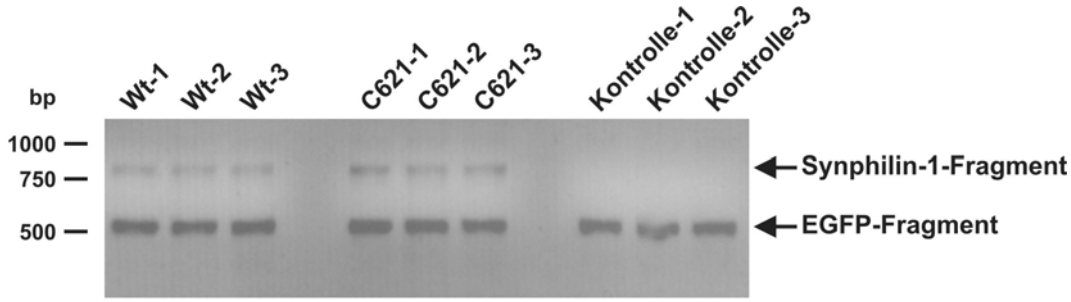


Abbildung 3-12: Multiplex-PCR zum Nachweis von Synphilin-1- und EGFP-cDNA. Gesamt-RNA aus SH-SY5Y-Zellen, die mit AdEG-Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. AdEG-C621-FLAG-Synphilin-1 infizierten worden waren, wurde in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. In einer Multiplex-PCR wurden ein 840 bp großes Synphilin-1-cDNA-Fragment und ein 534 bp großes EGFP-cDNA-Fragment amplifiziert. Als Kontrolle diente cDNA aus SH-SY5Y-Zellen, die mit dem Kontrollvirus AdEG infiziert worden waren. In den Kontrollen war keine endogene Synphilin-1-cDNA nachweisbar.

3.1.6.1 Ergebnisse der Microarray-Analyse

Die Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix-Microarray-Technologie wurde in der IZKF Microarray Facility Tübingen durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren, bei dem die Expression einer sehr großen Anzahl von Genen untersucht werden kann. Zur Analyse des komplexen Genexpressionsmusters von Wt- und C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen wurde der Human Genome U133 Plus 2.0 Array, der mehr als 47000 Transkripte enthält, eingesetzt. Markierte RNA aus den drei C621- und den drei Wt-Proben wurde mit jeweils einem Array hybridisiert. Anschließend wurde ein Vergleich der C621-Proben mit den Wt-Proben durchgeführt. Dies ergab insgesamt neun Kreuz-Vergleiche (3 x 3-Matrix). Als stringent, differentiell exprimiert wurden nur solche Gene gewertet, die in acht oder neun Vergleichen einen gleichgerichteten, ähnlichen Expressionsunterschied zeigten. Als Maßeinheit diente hierbei das *Signal Log Ratio* (SLR). Darunter versteht man den binären Logarithmus (Basis 2) des Expressionsunterschiedes eines Transkriptes. Ein SLR von 1 bedeutet eine um den Faktor 2 erhöhte Expression eines Gen, ein SLR von –1 eine um den Faktor 2 erniedrigte Expression. Gene mit einem SLR $\geq$ 0,5 bzw. SLR $\leq$ - 0,5 wurden als signifikant, differentiell exprimiert gewertet.

Beim Genexpressionsvergleich konnten 60 Gene/Transkripte als stringent, differentiell reguliert identifiziert werden (siehe Anhang). Das Kriterium für eine signifikant differentielle Expression erfüllten dabei 25 Gene/Transkripte (Tabelle 3-1). Dabei waren die meisten Gene/Transkripte in den C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen hochreguliert (SLR ≥ 0,5). Nur 3 Gene/Transkripte zeigten eine verminderte Expression (SLR ≤ - 0,5).

Tabelle 3-1: Liste der signifikant, differentiell regulierten Gene/Transkripte.

GenBank-Nr.	**UniGen-Beschreibung / Gensymbol**	**Funktion**	**SLR**
AB043997	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7 / SLC5A7	Transport	1,18
AF134726	heat shock 70kD protein 1B / HSPA1B	Chaperon	0,9
AI378647	ESTs / -	-	0,77
X91171	laminin, alpha 4 / LAMA4	extrazelluläre Matrix	0,77
BC000125	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease) / TGFB1	Signaltransduktion	0,71
S69738	small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1) / SCYA2	Signaltransduktion	0,67
NM_000088	collagen, type I, alpha 1 / -	extrazelluläre Matrix	0,64
U77914	jagged 1 (Alagille syndrome) / JAG1	Signaltransduktion	0,64
Y13786.2	a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta) / ADAM19	Protein-Prozessierung	0,64
AI242583	hypothetical protein FLJ21269 / -	-	0,63
U32907	37 kDa leucine-rich repeat (LRR) protein / -	-	0,61
AU121762	vascular cell adhesion molecule 1 / VCAM1	Zell-Adhäsion	0,6

Fortsetzung der Tabelle 3-1.

M92934	connective tissue growth factor / CTGF	Signaltransduktion	0,58
AA576961	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 / PHLDA1	-	0,58
N34895	ESTs	-	0,56
AL353759	H2A histone family, member L / -	DNA-Bindung	0,55
U73936	jagged 1 (Alagille syndrome) / JAG1	Signaltransduktion	0,53
D84109	RNA-binding protein gene with multiple splicing / -	RNA-Bindung	0,53
D78611	mesoderm specific transcript homolog (mouse) / MEST	-	0,53
AF003114	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 / CYR61	Signaltransduktion	0,51
AA081084	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) / -	Transkriptions-Regulation	0,5
AI433463	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10) / MME	Protein-Prozessierung	0,5
NM_001067	topoisomerase (DNA) II alpha (170kD) / TOP2A	DNA-Prozessierung	-0,57
BC001638	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila) / ASCL1	Transkriptionsfaktor	-0,71
BC002341	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila) / ASCL1	Transkriptionsfaktor	-0,79

Mit Hilfe einer sogenannten nicht-überwachten, hierarchischen Cluster-Analyse unter Einbeziehung der 60 stringent, differentiell exprimierten Gene/Transkripte konnte gezeigt werden, dass sich die C621-Proben in ihrem Genexpressionsprofil eindeutig von den Wt-Proben unterschieden (Abbildung 3-13). In den Dendrogrammen in Abbildung 3-13 lassen sich zwei Gruppen von Proben (Wt-

und C621-Proben; oberes Dendrogramm) sowie zwei Gruppen von Genen (Gene mit erhöhter bzw. erniedrigter Expression; linkes Dendrogramm) unterscheiden.

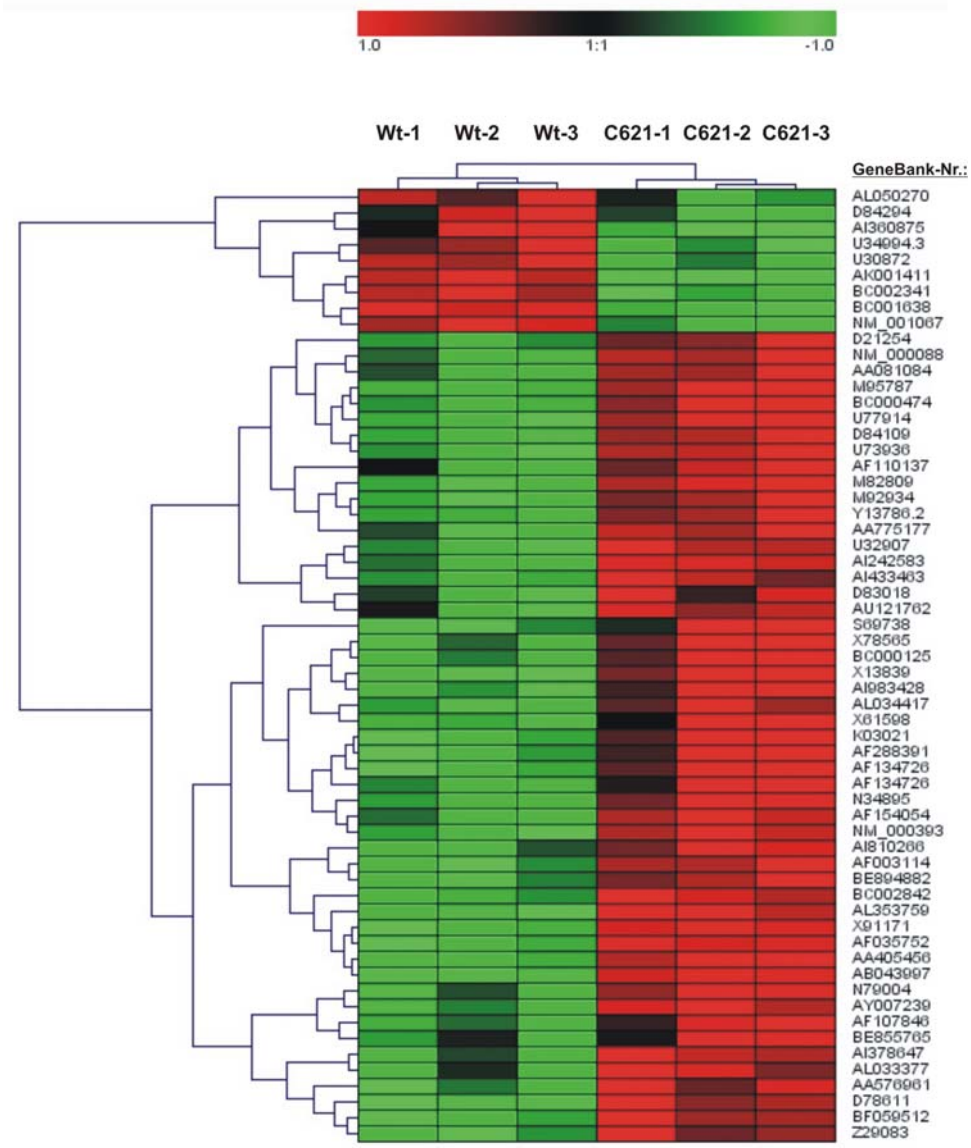


Abbildung 3-13: Nicht-überwachte, zweidimensionale Cluster-Analyse unter Einbeziehung aller stringent, differentiell regulierten Gene/Transkripte. Jede Zeile repräsentiert ein Gen, jede Säule repräsentiert eine Probe. Farbcodierung: rot = erhöhte Expression, grün = verminderte Expression, schwarz = keine Veränderung.

3.1.7 Zusammenfassung

Bei der funktionellen Charakterisierung der neuen R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Synphilin-1 *in vitro* zur Bildung zytoplasmatischer Synphilin-1-Einschlüsse führt. Diese war bei Überexpression der mutierten Form von Synphilin-1 weniger stark ausgeprägt als bei Überexpression von Wt-Synphilin-1. Durch proteasomale Hemmung konnte die Bildung der Synphilin-1-Einschlüsse gesteigert werden. Dabei war der Anteil von Zellen mit Synphilin-1-Einschlüssen bei Überexpression von Wt-Synphilin-1 signifikant höher als bei Überexpression von mutiertem Synphilin-1. Zudem waren Zellen, welche die mutierte Form von Synphilin-1 überexprimierten, empfindlicher gegenüber dem Apoptose induzierenden Agens Staurosporin.

Die bekannten Interaktionen zwischen Synphilin-1 und α-Synuklein bzw. Parkin konnten bestätigt werden. Ein Einfluss der R621C-Mutation auf die bekannten Interaktionen konnte nicht festgestellt werden.

In immunzytochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* beobachteten, Synphilin-1-positiven intrazytoplasmatischen Protein-Einschlüsse ubiquitiniert waren und α-Synuklein enthielten.

Bei der Analyse der differentiellen Genexpression unterschieden sich die C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen in ihrem Genexpressions-muster eindeutig von den Wt-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen. Insgesamt 60 stringent, differentiell regulierte Gene/Transkripte konnten identifiziert werden. Davon waren 25 Gene/Transkripte signifikant, differentiell reguliert.

3.2 Identifizierung der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase als neuen Interaktionspartner von Synphilin-1

Es gibt Hinweise dafür, dass Störungen des UPS bei der molekularen Pathogenese der PK eine Rolle spielen. Bei erblichen Formen des PS konnten Mutationen in verschiedenen Genen identifiziert werden. Diese kodieren für Proteine, die über das UPS abgebaut werden (α-Synuklein, Parkin, Synphilin-1 und DJ-1) oder selbst integrale Bestandteile des UPS sind (Parkin und UCH-L1; Übersichtsartikel: Krüger *et al.*, 2002). Eine erste direkte Verbindung zwischen Proteinen, die eine Rolle bei der Parkinson-Krankheit spielen, und dem Proteasom

konnte durch die Beschreibung der Interaktion zwischen α-Synuklein und der proteasomalen Untereinheit S6'-ATPase (Tbp1) hergestellt werden (Snyder *et al.*, 2003).

Vor diesem Hintergrund wurde eine mögliche funktionelle Bedeutung von Synphilin-1 im Rahmen des UPS durch die Identifizierung neuer Synphilin-1-interagierender Proteine untersucht. Über die Analyse der funktionellen Domänen von Synphilin-1 wurde die proteasomale Untereinheit S6-ATPase (Tbp7) als potentieller Interaktionspartner identifiziert. Synphilin-1 enthält sechs sogenannte Ankyrin-*like Repeats* (Abbildung 3-2). Dieses Motiv findet man ebenfalls bei Gankyrin, einem Onkoprotein, das mit S6-ATPase (Tbp7) interagiert (Dawson *et. al.*, 2002). S6-ATPase ist wie auch S6'-ATPase ein Bestandteil der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms. Beide Proteine gehören zur AAA-ATPase-Superfamilie. AAA-ATPasen weisen eine Chaperon-Funktion auf und binden ubiquitinierte Proteine, was eine wichtige Rolle bei der Regulation der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation nahe legt (Lam *et al.*, 2002). Mittels Co-Immunpräzipitation wurde eine mögliche Interaktion von Synphilin-1 mit S6-ATPase untersucht.

3.2.1 Interaktion von Synphilin-1 mit der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase

Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Synphilin-1 und S6-ATPase wurden FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) und HA-S6-ATPase in HEK 293-Zellen co-exprimiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit den Zelllysaten unter Verwendung von ANTI-FLAG® M2 Affinitäts-Gel durchgeführt. S6-ATPase wurde sowohl durch Wt- als auch durch C621-Synphilin-1 präzipitiert (Abbildung 3-14).

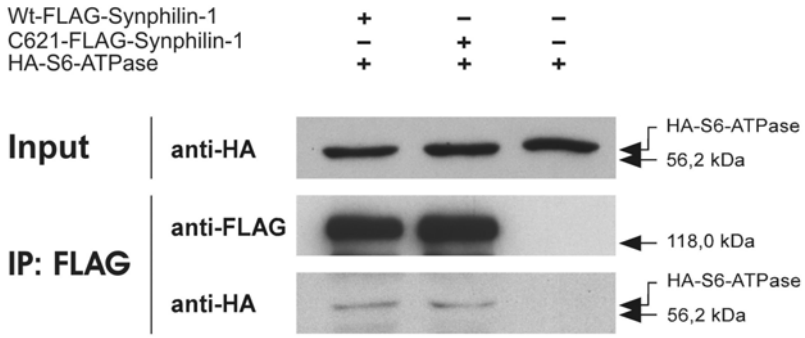


Abbildung 3-14: Interaktion von Synphilin-1 mit S6-ATPase. Mit Lysaten aus HEK 293-Zellen, die FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) und HA-S6-ATPase exprimierten, wurden Immunpräzipitationen unter Verwendung von ANTI-FLAG® M2 Affinitäts-Gel durchgeführt. Für die Western-Blot-Analyse wurden ein polyklonaler anti-FLAG- und ein polyklonaler anti-HA-Antikörper verwendet. Wt- und C621-Synphilin-1 co-präzipitierten S6-ATPase. Es konnte kein Hinweis für eine differentielle Interaktion von Wt- bzw. C621-Synphilin-1 mit S6-ATPase gefunden werden.

Die beobachtete Interaktion zwischen S6-ATPase und Synphilin-1 war spezifisch, da eine Interaktion zwischen S6'-ATPase (Tbp1) und Synphilin-1 ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 3-15).

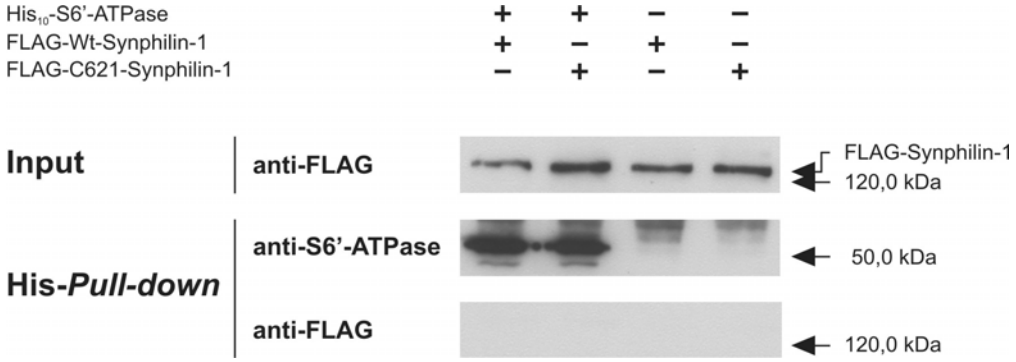


Abbildung 3-15: Ausschluss einer Interaktion zwischen S6'-ATPase (Tbp1) und Synphilin-1. Mit Lysaten aus HEK 293-Zellen, die His_{10}-S6'-ATPase und FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) exprimierten, wurden His-*Pull-down*-Assays unter Verwendung von TALON® Metal Affinity Resin durchgeführt. Für die Western-Blot-Analyse wurden ein polyklonaler anti-S6'-ATPase- und ein polyklonaler anti-FLAG-Antikörper verwendet. Es konnte keine Interaktion zwischen S6'-ATPase und Wt- oder C621-Synphilin-1 festgestellt werden.

Eine Interaktion zwischen α-Synuklein und S6-ATPase (Tbp7) konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 3-16).

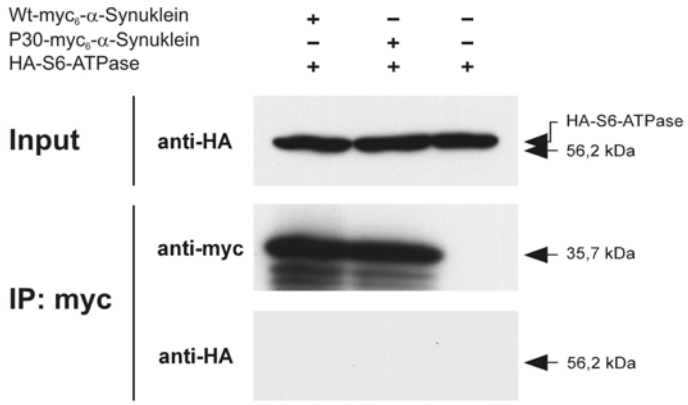


Abbildung 3-16: Ausschluss einer Interaktion zwischen α-Synuklein und S6-ATPase (Tbp7). Mit Lysaten aus HEK 293-Zellen, die myc_6-α-Synuklein (Wt oder P30) und HA-S6-ATPase exprimierten, wurden Immunpräzipitationen unter Verwendung von c-myc Monoclonal Antibody-Agarose Beads durchgeführt. Für die Western-Blot-Analyse wurden ein monoklonaler anti-myc und ein polyklonaler anti-HA-Antikörper verwendet. Es konnte keine Interaktion zwischen S6-ATPase und Wt- oder P30-α-Synuklein festgestellt werden.

3.2.2 Co-Lokalisation von Synphilin-1 und S6-ATPase

Zur näheren Charakterisierung der Interaktion zwischen Synphilin-1 und der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase wurden HEK 293-Zellen mit einer Kombination aus pcDNA3.1-Wt-FLAG-Synphilin-1 und pCMV5L-S6 bzw. pcDNA3.1-C621-FLAG-Synphilin-1 und pCMV5L-S6 co-transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde eine Immunfärbung mit anti-FLAG- und anti-S6-ATPase-Antikörpern durchgeführt. Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Axioplan 2-Mikroskops analysiert.

S6-ATPase konnte als Bestandteil Synphilin-1-positiver zytoplasmatischer Protein-Einschlüsse identifiziert werden (Abbildung 3-17). Dabei konnte kein Unterschied zwischen Wt- und C621-Synphilin-1-Einschlüssen festgestellt werden. Die Synphilin-1-positiven Protein-Einschlüsse waren perinukleär lokalisiert (Abbildung 3-17) und enthielten γ-Tubulin (Abbildung 3-18). Damit erfüllten sie die Kriterien für Aggresomen (Kopito, 2000). In Zellkulturmodellen für neurodegenerative Erkrankungen gelten Aggresomen als Äquivalente zu charakteristischen Protein-Einschlüssen, die in den betroffenen Neuronen von

Patienten gefunden werden (Kopito, 2000; Junn *et al.*, 2002). Bei der PK entsprechen diese den pathognomonischen LK.

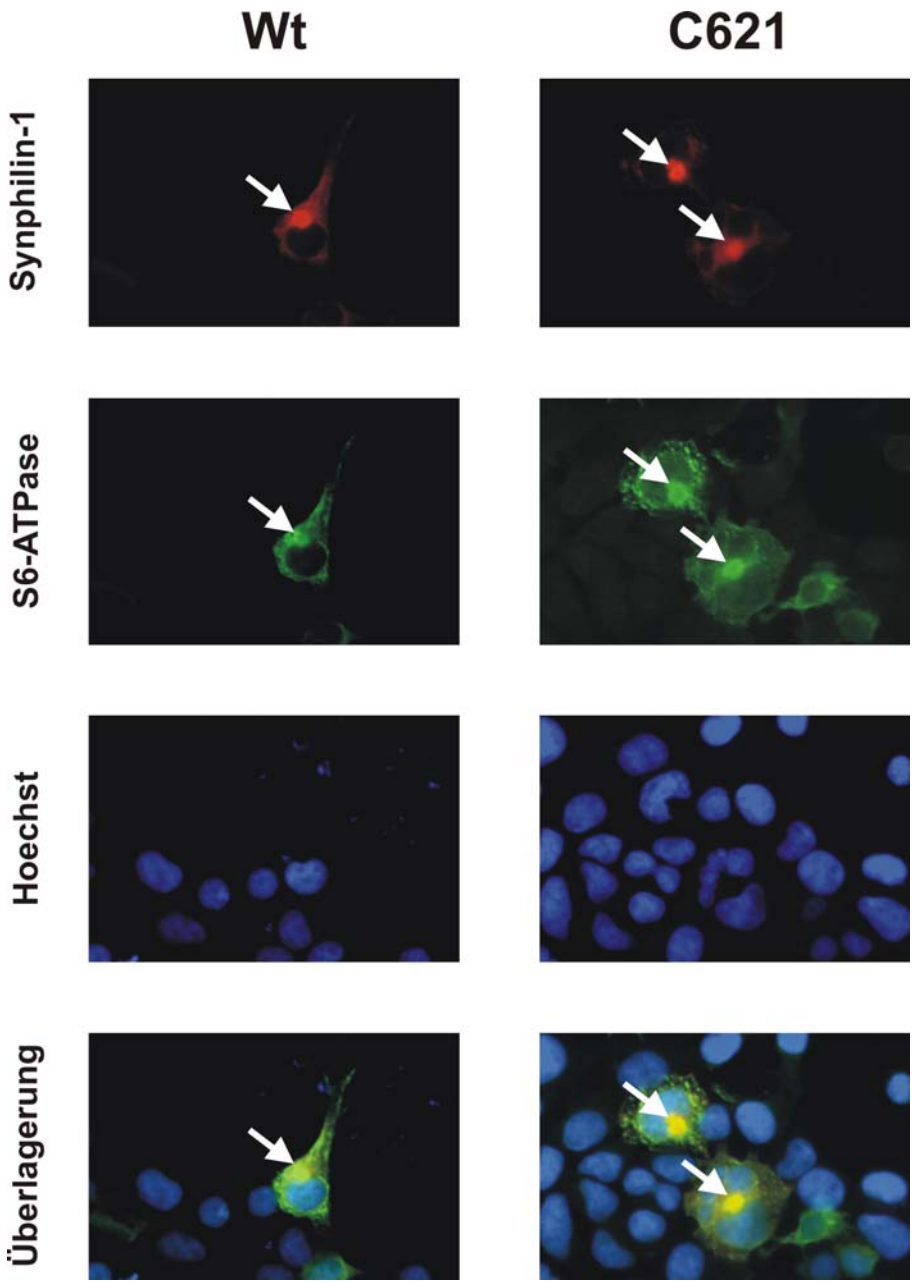


Abbildung 3-17: Transiente Überexpression von FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) und HA-S6-ATPase in HEK 293-Zellen. Nach Fixierung der Zellen wurde eine Doppelfärbung mit einer Kombination aus anti-FLAG- und anti-S6-ATPase-Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 angefärbt. Synphilin-1 (Wt und C621) co-lokalisiert mit der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase in großen, perinukleären Protein-Einschlüssen (siehe Pfeile).

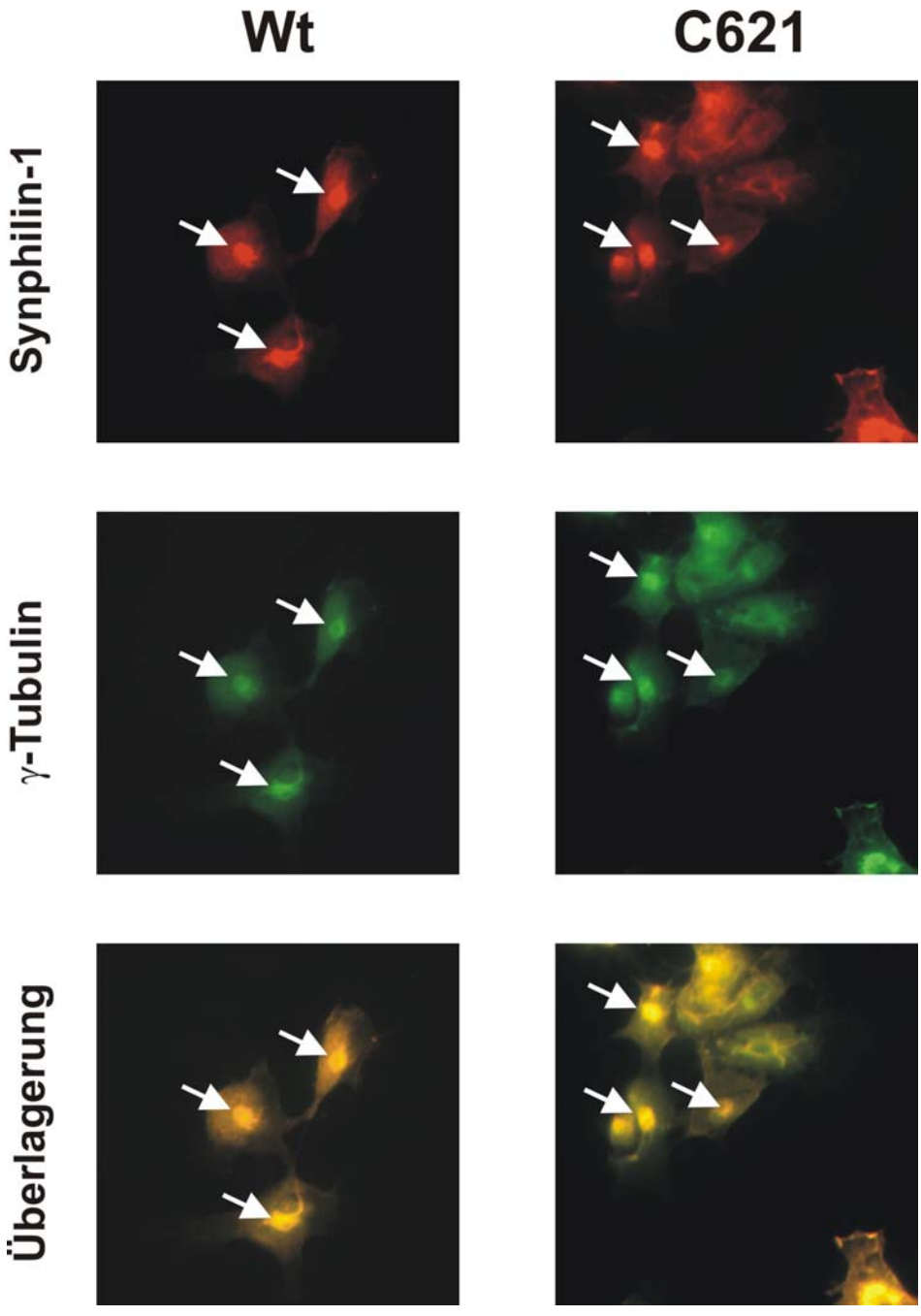


Abbildung 3-18: Transiente Überexpression von FLAG-Synphilin-1 (Wt oder C621) und HA-S6-ATPase in HEK 293-Zellen. Nach Fixierung der Zellen wurde eine Doppelfärbung mit einer Kombination aus anti-FLAG- und anti-γ-Tubulin-Antikörpern durchgeführt. Die Synphilin-1-positiven Einschlüsse enthalten γ-Tubulin (siehe Pfeile). Die Zellen wurden vor der Färbung mit 5 µM MG132 für 5 h vorbehandelt, um die Bildung der Synphilin-1-Einschlüsse zu verstärken.

3.2.3 Identifizierung der S6-ATPase als Bestandteil von Lewy-Körpern in Gehirnen von Parkinson-Patienten

In vitro konnte gezeigt werden, dass Synphilin-1 und S6-ATPase in großen, γ-Tubulin-positiven, perinukleären Protein-Einschlüssen, sogenannten Aggresomen, co-lokalisieren. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob S6-ATPase auch in LK, den Äquivalenten von Aggresomen bei der PK, vorhanden ist. Die dazu nötigen immunhistochemischen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Daniela Berg in der Abteilung für medizinische Genetik der Universität Tübingen durchgeführt.

S6-ATPase konnte immunhistochemisch als Bestandteil von LK in Gehirnen von Patienten mit IPS nachgewiesen werden (Abbildung 3-19). Der Anteil der LK, die sich mit Antikörpern gegen die humane S6-ATPase anfärben ließen, betrug ca. 25%. Die S6-ATPase war dabei hauptsächlich im sogenannten Hof der LK lokalisiert. Diese Lokalisation entspricht der von α-Synuklein in LK (Spillantini *et al.*, 1998).

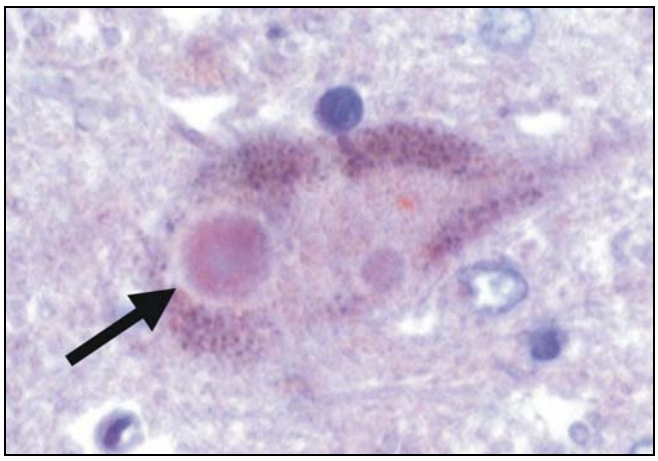
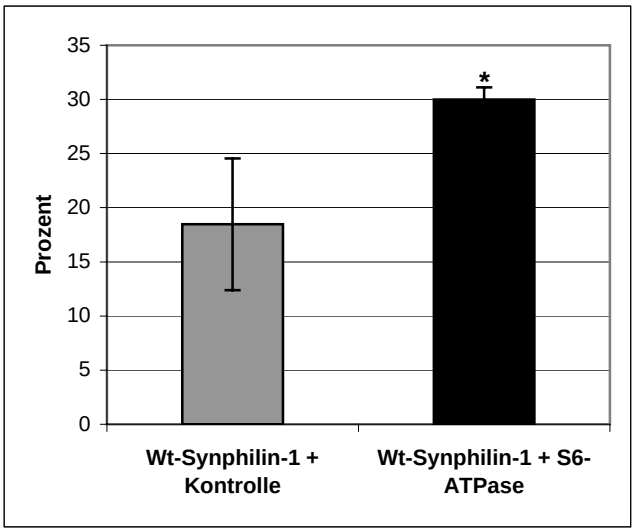


Abbildung 3-19: Immunhistochemische Untersuchung an Gehirnschnitten von Patienten mit IPS. S6-ATPase ist Bestandteil von LK in Gehirnen von Parkinson-Patienten (siehe Pfeil). Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten, 8 µm dicken Gehirnschnitten von Parkinson-Patienten mittels Avidin-Biotin-Immuno-Peroxidase-Technik durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler anti-S6-ATPase-Antikörper verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin gegengefärbt. Dargestellt ist ein teilweise depigmentiertes Neuron mit schwach angefärbtem Zytoplasma, melanisiertem Bereich und Neuropil. Der LK ist hauptsächlich im Randbereich angefärbt.

3.2.4 Einfluss der Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase auf die Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen

Wie unter 3.1.1 gezeigt führte die Überexpression von Synphilin-1 zur Bildung intrazytoplasmatischer Synphilin-1-Einschlüsse in transient transfizierten Zellen. Um einen möglichen Einfluss der Co-Expression von S6-ATPase auf die Bildung der Synphilin-1-Einschlüsse zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen mit pCMV5L-S6 und pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 bzw. pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 co-transfiziert. Als Kontrolle wurde pcDNA3.1-myc$_6$ zusammen mit pEGFP-N1-Wt-Synphilin-1 bzw. pEGFP-N1-C621-Synphilin-1 co-transfiziert.

A



B

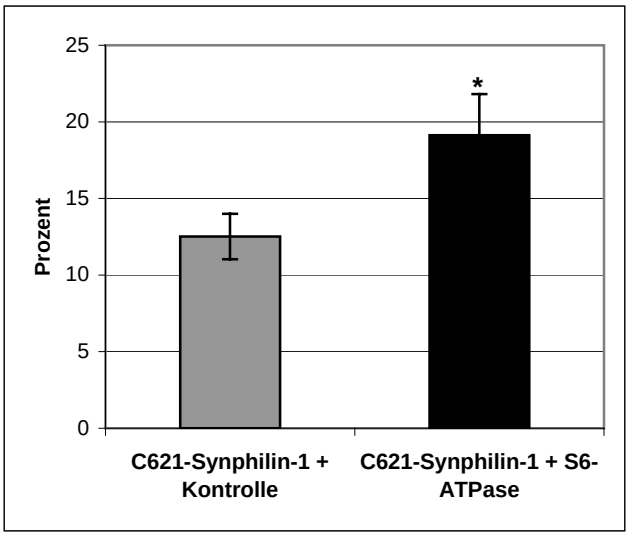


Abbildung 3-20: Einfluss der S6-ATPase auf die Bildung zytoplasmatischer Synphilin-1-Einschlüsse. (**A**) HEK 293-Zellen, die Wt-Synphilin-1-EGFP und HA-S6-ATPase co-exprimierten, zeigten einen signifikant höheren Anteil von Zellen mit Synphilin-1-Einschlüssen als die Kontrollen (Student's t-Test, p = 0,032). (**B**) Das gleiche Ergebnis wurde bei Zellen, die C621-Synphilin-1 und S6-ATPase co-exprimierten, beobachtet (Student's t-Test, p = 0,02). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Zählungen dargestellt. Es wurden jeweils mindestens 300 Zellen gezählt. Jedes Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen reproduziert.

Die Co-Expression von S6-ATPase führte zu einer verstärkten Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen. Zellen, die Wt-Synphilin-1 und S6-ATPase co-exprimierten, zeigten signifikant mehr Synphilin-1-Einschlüsse als die Kontrollen (Abbildung 3-20 A). Gleiches zeigte sich bei Zellen, die C621-Synphilin-1 und S6-ATPase co-exprimierten (Abbildung 3-20 B).

3.2.5 Einfluss der Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase auf die Proteasomen-Funktion und den Gehalt an Synphilin-1-Protein

Da die S6-ATPase ein integraler Bestandteil der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms ist, lag die Vermutung nahe, dass die Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase einen Einfluss auf die proteasomale Funktion haben könnte. Um dies zu prüfen, wurde die chymotryptische Aktivität des Proteasoms mit Hilfe eines Proteasomen-Aktivitäts-Tests unter Verwendung des Substrats Suc-LLVY-AMC untersucht.

Die Co-Expression von S6-ATPase und Wt-Synphilin-1 in HEK 293-Zellen führte im Vergleich zur Kontrolle, bei der Wt-Synphilin-1 und myc_6-Peptid co-exprimiert wurden, zu einer signifikanten Verringerung der chymotryptischen Aktivität des Proteasoms (Abbildung 3-21 A). Interessanterweise führte die Überexpression der mutierten Form von Synphilin-1 alleine ebenfalls zu einer im Vergleich zur Wt-Kontrolle signifikant verringerten proteasomalen Aktivität. Dieser Effekt des mutierten Synphilin-1 konnte durch Co-Expression von S6-ATPase nicht weiter gesteigert werden (Abbildung 3-21 A).

Der Einfluss von S6-ATPase auf den Proteingehalt von Synphilin-1 in HEK 293-Zellen wurde untersucht, indem Wt- bzw. C621-Synphilin-1 in Gegenwart steigender Mengen an S6-ATPase co-exprimiert wurden. Dabei konnte jedoch kein Hinweis auf einen Einfluss von S6-ATPase auf den *Steady-State-Level* von Synphilin-1 festgestellt werden (Abbildung 3-21 B).

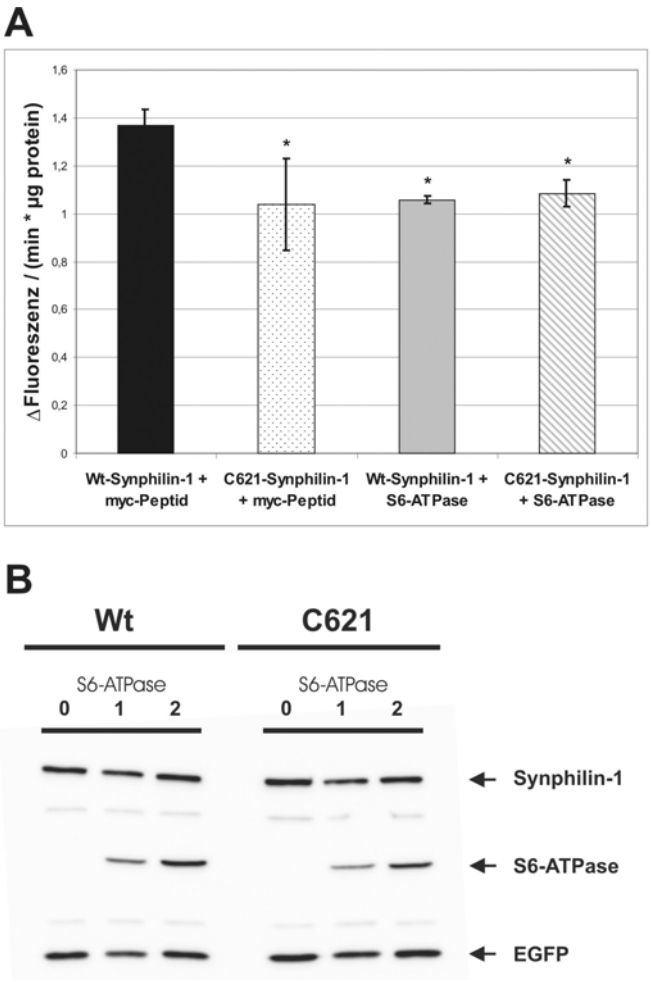


Abbildung 3-21: Proteasomale Aktivität und *Steady-State-Level* von Synphilin-1 in HEK 293-Zellen, die Synphilin-1 und S6-ATPase co-exprimierten. (**A**) Bei der Untersuchung der chymotryptischen Aktivität des Proteasoms unter Verwendung des Substrats Suc-LLVY-AMC zeigten Zellen, die Wt-Synphilin-1 und S6-ATPase co-exprimierten, eine signifikant erniedrigte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression von C621-Synphilin-1 allein führte zum gleichen Effekt, der durch zusätzliche Expression von S6-ATPase nicht verstärkt werden konnte. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen spezifischen chymotryptischen Aktivität (n = 3). * bedeutet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich zur Wt-Kontrolle (Wt + myc-Peptid). Jedes Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen reproduziert. (**B**) HEK 293-Zellen wurden mit der gleichen Menge Gesamt-DNA bestehend aus pAd-Track-CMV-Wt- bzw. pAd-Track-CMV-C621-FLAG-Synphilin-1, pcDNA3.1 und den aufgeführten Mengen (in µg DNA) an pCMV5L-S6 co-transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde der Proteingehalt von Synphilin-1 bei steigenden S6-ATPase-Mengen mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Es konnte kein Hinweis auf eine Veränderung der *Steady-State-Level* von Synphilin-1 (Wt oder C621) festgestellt werden.

3.2.6 Zusammenfassung

Mittels Co-Immunpräzipitation konnte die proteasomale Untereinheit S6-ATPase (Tbp7) als neuer Interaktionspartner von Synphilin-1 identifiziert werden.

Bei den *in vitro* durchgeführten Analysen zur funktionellen Charakterisierung dieser Interaktion zeigte sich, dass Synphilin-1 und S6-ATPase in zytoplasmatischen Strukturen, die Aggresomen entsprechen, co-lokalisiert waren. Die Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase führte zu einer reduzierten proteasomalen Aktivität bei gleichzeitig signifikant gesteigerter Bildung von Synphilin-1-positiven Protein-Einschlüssen. Interessanterweise führte die Überexpression von mutiertem Synphilin-1 alleine ebenfalls zu einer reduzierten proteasomalen Aktivität. Ein Einfluss von S6-ATPase auf den *Steady-State-Level* von Synphilin-1 konnte nicht beobachtet werden.
In immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die proteasomale Untereinheit S6-ATPase ein Bestandteil von LK in Gehirnen von Patienten mit IPS ist.

3.3 Charakterisierung einer neuen P159L-Mutation im *Parkin*-Gen

Es sind eine Reihe von Mutationen im *Parkin*-Gen bekannt, die zu autosomal-rezessiven Formen der PK führen. Hierbei kommt es durch Exon-Deletionen, Exon-Vervielfältigungen oder Punktmutationen zum Funktionsverlust des Parkin-Proteins. Parkin wirkt als E3-Ubiquitin-Ligase, durch die Proteine wie z.B. α-Synuklein oder Synphilin-1 ubiquitiniert und so für den Abbau durch das Proteasom markiert werden (Shimura *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass der Verlust der E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion von Parkin zu Neurodegeneration führt. Die meisten der bekannten Mutationen im *Parkin*-Gen bedingen einen frühen Krankheitsbeginn. Es konnten jedoch auch heterozygote Mutationen bei Merkmalsträgern mit späterem Krankheitsbeginn identifiziert werden (Foroud *et al.*, 2003; Hedrich *et al.*, 2002; Kann *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003). Von diesen Mutationen wurden die R275W- und die R256C-Mutation bereits funktionell *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprechen eher für einen *toxic gain of function* von Parkin, d.h. eine veränderte schädliche Funktion des Parkin-Proteins, als für einen Funktionsverlust (Cookson *et al.*, 2003).

In Vorarbeiten, die von Dr. Rejko Krüger in der Neurologischen Klinik der Ruhr-Universität in Bochum durchgeführt wurden, konnte in zwei Familien mit offensichtlich autosomal-dominantem Erbgang für die Parkinson-Krankheit eine neue heterozygote P159L-Mutation sowie die bereits bekannte R275W-Mutation im *Parkin*-Gen nachgewiesen werden. Dabei zeigten die betroffenen Patienten einen späten Krankheitsbeginn.

Um die P159L- und die R275W-Mutation funktionell in HEK 293-Zellen untersuchen zu können, wurden L159-myc$_6$-Parkin- und W275-myc$_6$-Parkin-Konstrukte durch Einführung von Punktmutationen in pcDNA3.1-myc$_6$-Wt-Parkin mittels *in vitro*-Mutagenese hergestellt.

3.3.1 Einfluss der Überexpression von Wt- und mutiertem Parkin in HEK 293-Zellen

Zunächst wurden die verschiedenen myc$_6$-Parkin-Konstrukte hinsichtlich ihrer Expression in HEK 293-Zellen getestet. Hierzu wurden HEK 293-Zellen mit pcDNA3.1-Wt-, pcDNA3.1-L159- bzw. pcDNA3.1-W257-myc$_6$-Parkin für 48 h transfiziert. Anschließend wurden mit den Zelllysaten Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines anti-myc-Antikörpers zum Nachweis der myc$_6$-Parkin-Konstrukte durchgeführt. Der Nachweis von β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die drei verwendeten Konstrukte wurden gleich gut in HEK 293-Zellen exprimiert (Abbildung 3-22).

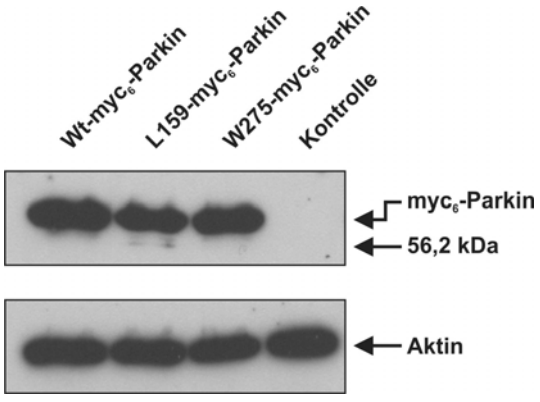


Abbildung 3-22: Überexpression von Wt-, L159- und W275-myc$_6$-Parkin. Lysate aus HEK 293-Zellen, die mit pcDNA3.1-Wt-, pcDNA3.1-L159- bzw. pcDNA3.1-W257-myc$_6$-Parkin transfiziert worden waren, zeigten eine Bande mit der erwarteten Größe im Western-Blot (Spur 1, 2 und 3). Als Negativkontrolle diente Lysat aus untransfizierten HEK 293-Zellen (Spur 4). Es wurden gleiche Proteinmengen (30 µg) pro Spur geladen. Für die Western-Blot-Analyse wurden ein monoklonaler anti-myc- und ein monoklonaler anti-β-Aktin-Antikörper verwendet.

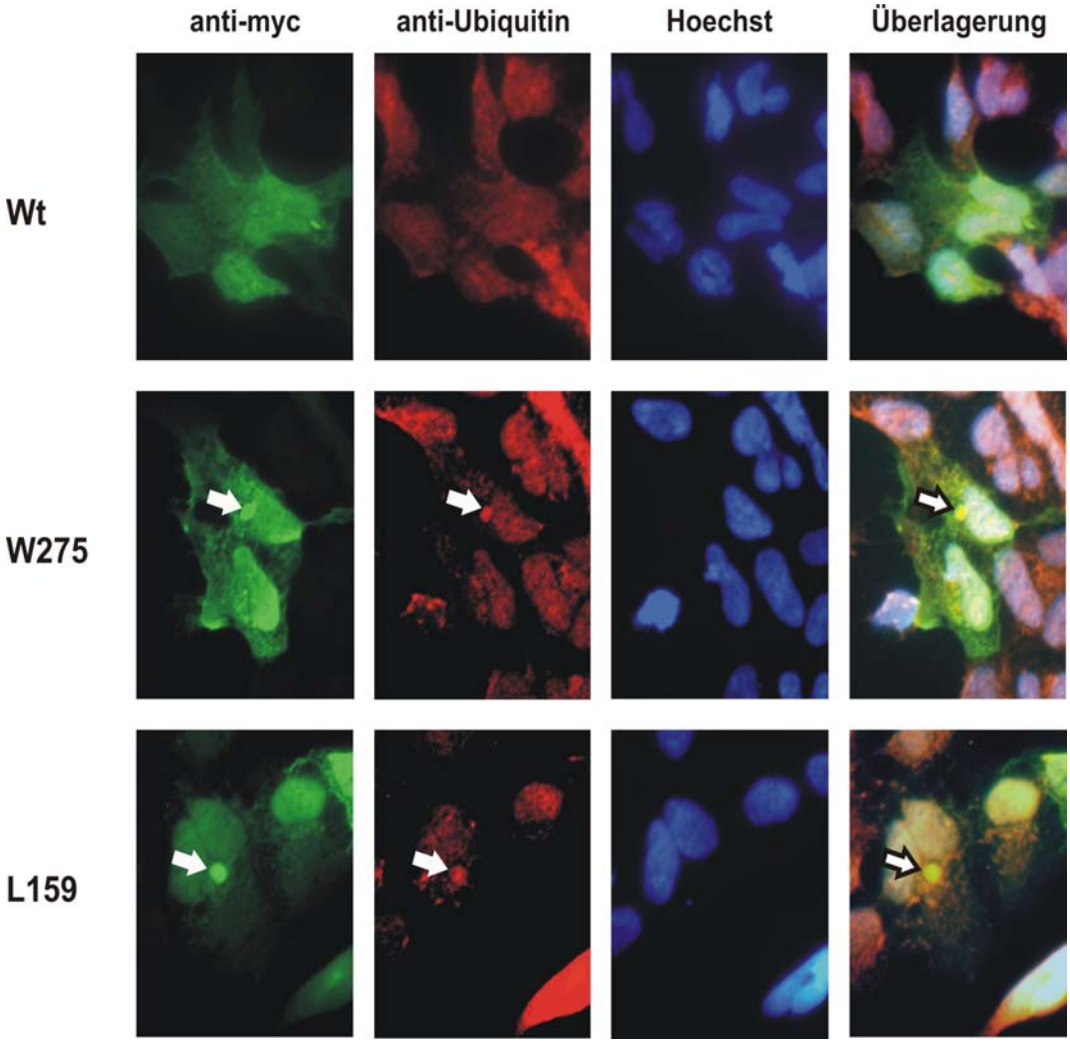


Abbildung 3-23: Intrazytoplasmatische Verteilung von Parkin in HEK 293-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h mit pcDNA3.1-Wt-, pcDNA3.1-W275- oder pcDNA3.1-L159-myc$_6$-Parkin transient transfiziert. Nach Fixierung der Zellen wurde eine Doppelfärbung mit einem monoklonalen anti-myc- und einem polyklonalen anti-Ubiquitin-Antikörper durchgeführt. Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 angefärbt. Intrazytoplasmatische, Parkin-positive Protein-Einschlüsse sind durch Pfeile markiert.

Immunzytochemische Untersuchungen zeigten, dass die transiente Überexpression von Wt-, L159- und W275-myc$_6$-Parkin in HEK 293-Zellen zur Bildung großer, perinukleärer, Parkin-positiver Protein-Einschlüsse führte. Diese Aggresomen-ähnlichen Strukturen enthielten Parkin und Ubiquitin (Abbildung 3-23). Bei Zellen, die L159- bzw. W275-myc$_6$-Parkin überexprimierten, konnte eine signifikant erhöhte Bildung von Protein-Einschlüssen im Vergleich zu

Zellen, die Wt-myc$_6$-Parkin überexprimierten, festgestellt werden (Abbildung 3-24).

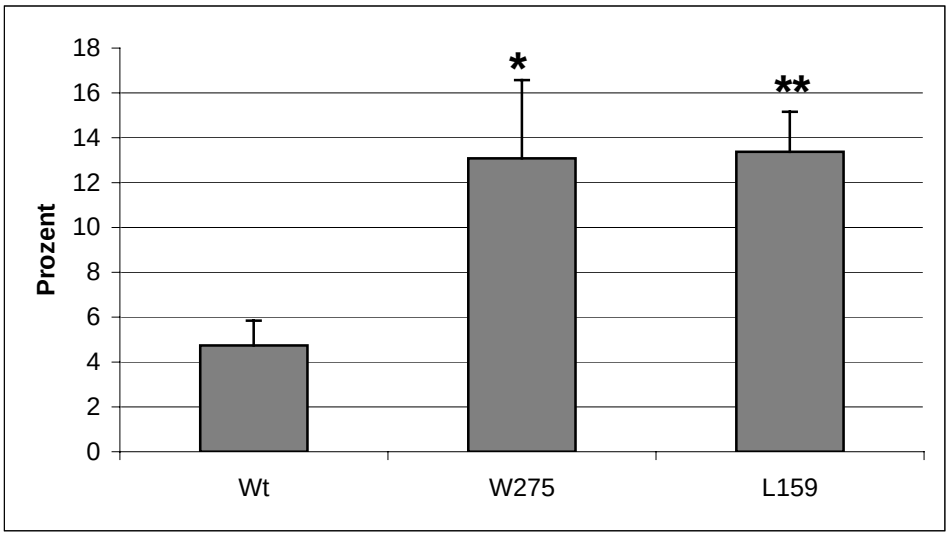


Abbildung 3-24: Prozentualer Anteil von HEK 293-Zellen mit Parkin-positiven Protein-Einschlüssen. Zellen, die L159- bzw. W275-myc$_6$-Parkin überexprimierten, zeigten im Vergleich zu Zellen, die Wt-myc$_6$-Parkin überexprimierten, einen signifikant höheren Anteil von Zellen mit Parkin-positiven Protein-Einschlüssen (*$p<0,05$, **$p<0,01$; ANOVA/Tukey-Test).

3.3.2 Zusammenfassung

Zur funktionellen Analyse der neuen P159L-Mutation im *Parkin*-Gen wurden immunzytochemische Untersuchungen mit transient transfizierten HEK 293-Zellen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Wt-, W275- und L159-myc$_6$-Parkin zur Bildung von zytoplasmatischen Parkin-Einschlüssen führte. Diese waren perinukleär lokalisiert, enthielten Ubiquitin und wiesen somit charakteristische Merkmale von Aggresomen auf. Die Überexpression von L159- und W275-myc$_6$-Parkin führte zu einer gegenüber der Überexpression von Wt-myc$_6$-Parkin signifikant gesteigerten Bildung von Parkin-Einschlüssen.

4 Diskussion

4.1 Funktionelle Charakterisierung einer neuen R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen

Es gibt Hinweise dafür, dass Proteinfehlfaltung, Proteinaggregation und Störungen des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der PK spielen. In genetischen Untersuchungen konnten Gene identifiziert werden, die eine kausale Rolle bei der Pathogenese der PK spielen (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1998; Bonifati *et al.*, 2003; Valente *et al.*, 2004). Einige dieser Gene kodieren für Proteine, welche in den für die Erkrankung typischen LK aggregieren (α-Synuklein, UCH-L1) und/oder eine Rolle im Rahmen des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus spielen (Parkin, UCH-L1; Übersichtsartikel: Krüger *et al.*, 2002). Synphilin-1, ein Protein mit noch weitgehend unbekannter, physiologischer Funktion, konnte als Interaktionspartner von Parkin und α-Synuklein identifiziert werden (Engelender *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2001). Ferner konnte gezeigt werden, dass Synphilin-1 ein Substrat der Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin ist (Chung *et al.*, 2001). Synphilin-1 stellt somit eine funktionelle Verbindung zwischen den Proteinen Parkin und α-Synuklein, die beide eine Rolle bei der Pathogenese der PK spielen, her. Sowohl im α-*Synuklein*-Gen als auch im *Parkin*-Gen wurden krankheitsauslösende Mutationen bei Parkinson-Patienten identifiziert. Basierend auf drei unabhängigen genetischen Kopplungsstudien wurde ein Krankheits-Lokus für die PK auf den langen Arm von Chromosom 5, der das *Synphilin-1*-Gen enthält, kartiert (Scott *et al.*, 2001; Pankratz *et al.*; 2002; Hicks *et al.*, 2002). Daher war auch Synphilin-1 ein guter Kandidat für ein Mutations-*Screening* bei der PK. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde durch Mutationsanalyse eine neue R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen bei zwei Patienten mit sporadischem IPS identifiziert. Hinweise für eine pathogenetische Bedeutung dieser Mutation bei der Entstehung der PK kamen zunächst aus einem Interspezies-Vergleich der AS-Sequenz von Synphilin-1. Das Synphilin-1-Protein enthält eine *coiled-coil*-Domäne und sechs Ankyrin-*Repeats*. Diese Domänen vermitteln Protein-Protein-

Interaktionen und sind hoch konserviert zwischen Maus und Mensch. Die R621C-Mutation ist in einem zwischen beiden Spezies homologen Sequenzabschnitt (Abbildung 3-2) lokalisiert (O'Farrell *et al.*, 2002). Da sich die Mutation in einer Region des Synphilin-1-Proteins befindet, die zwischen verschiedenen Spezies identisch ist, scheint ein Einfluss auf die Funktion des Synphilin-1-Proteins wahrscheinlich zu sein.

Synphilin-1 wird durch verschiedene E3-Ubiquitin-Ligasen (Parkin, Siah-1, Siah-2 und Dorfin) ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Chung *et al.*, 2001; Nagano *et al.*, 2003; Liani *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die R621C-Mutation keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung von Synphilin-1 in HEK 293-Zellen hat. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition des Proteasoms mittels MG132 zur Akkumulation von Wt- und C621-Synphilin-1 führte. Dies deutet darauf hin, dass beide Formen des Synphilin-1-Proteins proteasomal degradiert werden. Die Überexpression von Wt- und C621-Synphilin-1 führte zur Bildung intrazytoplasmatischer Einschlüsse in dopaminergen SH-SY5Y-Zellen. Die Bildung dieser Protein-Einschlüsse konnte durch den spezifischen proteasomalen Inhibitor Clasto-Lactacystin-β-lacton verstärkt werden, was ebenfalls für einen proteasomalen Abbau von Wt- und mutiertem Synphilin-1 spricht. Im Vergleich zu Wt-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen war jedoch unter proteasomaler Hemmung die Bildung der Einschlüsse bei C621-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen signifikant vermindert. Diese verminderte Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen könnte auf mögliche Unterschiede in der Erkennung von Wt- und C621-Synphilin-1 durch das UPS oder auf Unterschiede im Aggregationsverhalten hindeuten.

Zusätzlich zu der verminderten Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen zeigten C621-Synphilin-1-überexprimierende, dopaminerge Zellen im Vergleich zu Wt-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber zellulärem Stress. Dies spricht für eine veränderte Funktion des mutierten Synphilin-1-Proteins. Berücksichtigt man den späten Krankheitsbeginn bei den Mutationsträgern, dann kann ein milder, über einen langen Zeitraum wirkender

toxic gain of function der C621-Synphilin-1-Form, d.h. eine veränderte schädliche Funktion, angenommen werden, die zur Neurodegeneration führt. Aufgrund ihres offensichtlich sporadischen Auftretens muss die R621C-Mutation als genetischer Suszeptibilitätsfaktor für die PK mit verminderter Penetranz angesehen werden.

Ein Einfluss der R621C-Mutation auf die Interaktion von Synphilin-1 mit den bereits bekannten Interaktionspartnern α-Synuklein und Parkin konnte in Co-Immunpräzipitations-Analysen nicht beobachtet werden. Der Sequenzabschnitt, in dem sich die R621C-Mutation befindet, scheint auch nicht essentiell für die Interaktion zwischen Synphilin-1 und α-Synuklein bzw. Parkin zu sein. Dies zeigen Studien, in denen versucht wurde, die für die Interaktionen notwendigen Synphilin-1-Domänen zu bestimmen. Dabei konnte keine signifikante Interaktion zwischen Parkin bzw. α-Synuklein und Synphilin-1-Fragmenten, welche die AS-Reste 466-711 bzw. 556-919 enthielten, beobachtet werden (Chung *et al.*, 2001, Neystat *et al.*, 2002). Somit scheint ein *toxic gain of function* der C621-Variante durch differentielle Interaktion mit Parkin bzw. α-Synuklein unwahrscheinlich zu sein.

Beim Einsatz von Zellkulturmodellen ist es wichtig zu prüfen, in wieweit diese die *in vivo*-Situation widerspiegeln. Mittels immunzytochemischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* beobachteten Synphilin-1-positiven zytoplasmatischen Einschlüsse α-Synuklein und Ubiquitin enthielten. Diese Merkmale sind charakteristisch für LK in Gehirnen von PK-Patienten, zu deren Hauptbestandteilen aggregiertes, polyubiquitiniertes α-Synuklein in seiner fibrillären Form gehört.

Die Frage, ob die bei der PK beobachteten, intrazytoplasmatischen Proteinaggregate selbst oder aber nicht-aggregierte lösliche Vorstufen Auslöser der Neurodegeneration sind, wird kontrovers diskutiert. Die Aggregation von Proteinen kann als ein Prozess beschrieben werden, an dessen Anfang die Entstehung löslicher Oligomere und Protofibrillen steht (Walsh *et al.*, 1997; Lansbury, 1999). Von Conway und Mitarbeitern konnten *in vitro* α-Synuklein-Protofibrillen nachgewiesen werden (Conway *et al.*, 1998). Die Bildung dieser Protofibrillen wird durch die A30P und A53T-Mutation verstärkt (Conway *et al.*, 1998). Es ist daher denkbar, dass lösliche nicht-fibrilläre α-Synuklein-Oligomere

toxisch wirken. Ein interessanter Aspekt der Pathogenese der PK ist die besondere Vulnerabilität der dopaminergen Neuronen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass DA die Bildung von α-Synuklein-Fibrillen inhibiert und die potentiell toxische, protofibrilläre Form stabilisiert (Xu *et al.*, 2002). Dieser Effekt wird durch ein DA-Oxidationsprodukt (Ortochinon) vermittelt und kann durch Antioxidantien rückgängig gemacht werden. Der Mechanismus, durch den Protofibrillen zellschädigend wirken, ist noch nicht aufgeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass α-Synuklein-Protofibrillen bakteriellen Poren-bildenden Toxinen ähneln (Lashuel *et al.*, 2002). Die zellschädigende Wirkung der α-Synuklein-Protofibrillen könnte somit in der Permeabilisierung der Zellmembran bestehen.
Sollte hingegen die Hypothese zutreffen, dass die unlöslichen Proteinaggregate toxisch wirken, dann müsste eine direkte Korrelation zwischen Aggregatbildung und Neurodegeneration bestehen. Es gibt jedoch vermehrt Hinweise dafür, dass dies nicht der Fall ist. Untersuchungen an Gehirnen von Parkinson-Patienten zeigen, dass die Mehrzahl der in der *Substantia nigra* apoptotisch absterbenden Neurone keine LK aufweisen (Tompkins *et al.*, 1997). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von α-Synuklein ohne die Bildung von fibrillären Proteinaggregaten zum Absterben dopaminerger Neurone und zu Bewegungsstörungen führt (Masliah *et al.*, 2000). Des weiteren können bei der Mehrzahl der Parkinson-Patienten mit Neurodegeneration durch Mutationen im *Parkin*-Gen keine LK in den betroffenen Hirnregionen nachgewiesen werden.
In der vorliegenden Arbeit konnte im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass die R621C-Mutation zwar zu einer verminderten Bildung zytoplasmatischer Synphilin-1-Einschlüsse, andererseits aber zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber zellulärem Stress führt. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese von Lansbury und Kollegen, die von einem protektiven Effekt der Aggregatbildung ausgeht und nicht von einem kausalen Zusammenhang zwischen Proteinaggregaten und Zelltod (Conway *et al.*, 2001). Es kann spekuliert werden, dass lösliche Vorstufen der Synphilin-1-Einschlüsse analog den α-Synuklein-Protofibrillen zellschädigend wirken. Die Bildung der mikroskopisch sichtbaren Synphilin-1-Einschlüsse könnte einen Mechanismus darstellen, durch den sich die Zelle durch Sequestrierung vor toxischen, löslichen Oligomeren zu schützen

versucht. Dafür sprechen auch Untersuchungen von Tanaka und Mitarbeitern (2004), in denen gezeigt werden konnte, dass die Bildung von Synphilin-1- und α-Synuklein-Einschlüssen im Zellkulturmodell zytoprotektiv ist.

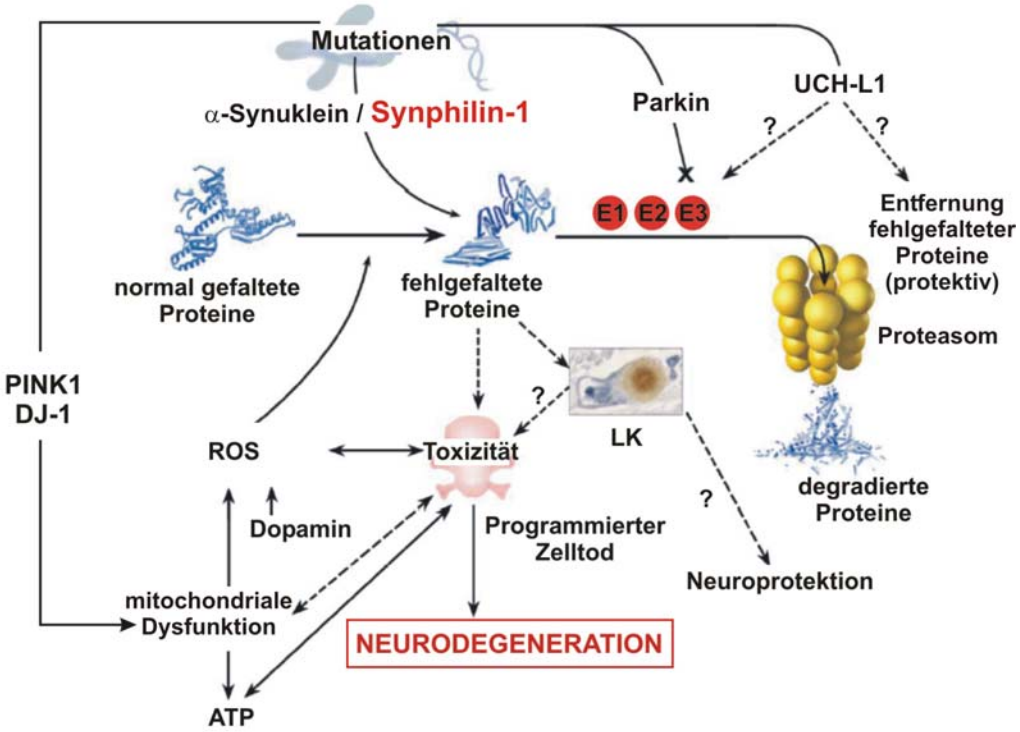


Abbildung 4-1: Mechanismen der Neurodegeneration bei der PK (modifiziert nach Dauer und Przedborski, 2003). Es gibt Hinweise dafür, dass die Akkumulation fehlgefalteter Proteine eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der PK spielt. Pathogene Mutationen können entweder direkt zu Fehlfaltungen oder zu Störungen des UPS führen. Oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und ein gestörter DA-Metabolismus können zu einer verstärkten Fehlfaltung von Proteinen führen. Die Frage, ob fehlgefaltete Proteine direkt toxisch wirken oder ob die Anhäufung unlöslicher Protein-Aggregate (LK) zur Neurodegeneration führt, wird kontrovers diskutiert. Aufgrund neuerer Untersuchungen und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint es aber wahrscheinlicher zu sein, dass lösliche Aggregat-Vorstufen zellschädigend wirken.

Die PK ist eine komplexe Erkrankung, an deren Entstehung verschiedene Faktoren beteiligt sind. Störungen des UPS, Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen sowie mitochondriale Defekte verbunden mit oxidativem Stress konnten als ursächlich für die Krankheit identifiziert werden. Abbildung 4-1 gibt einen

Gesamtüberblick über die verschiedenen Mechanismen, die zur Neurodegeneration führen können, zeigt mögliche Beziehungen zwischen ihnen auf und ordnet Synphilin-1 in dieses Gesamtkonzept ein.

4.1.1 Analyse der differentiellen Genexpression in Wt- und C621-Synphilin-1-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen

Zur Definition von molekularen Signalnetzwerken, die den pathogenetischen Effekt von C621-Synphilin-1 vermitteln, wurde das Genexpressionsprofil von dopaminergen SH-SY5Y-Zellen, die C621- bzw. Wt-Synphilin-1 überexprimierten, mittels Affymetrix-Microarray-Technologie untersucht. Durch den Einsatz des Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays konnte dabei die Expression von mehr als 47000 humanen Genen/Transkripten analysiert werden. Zur Überexpression von Wt- bzw. C621-Synphilin-1 in den SH-SY5Y-Zellen wurde ein Gentransfer mittels rekombinanter Adenoviren (AdEG-Wt-FLAG-Synphilin-1 bzw. AdEG-C621-FLAG-Synphilin-1) durchgeführt. Diese Art des Gentransfers wurde aufgrund ihrer sehr hohen Effizienz gewählt.

Im Vergleich zwischen C621- und Wt-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen konnten 60 Gene/Transkripte als stringent, differentiell reguliert identifiziert werden (siehe Anhang). Davon waren 25 Gene/Transkripte signifikant, differentiell reguliert. Darunter war keines der bereits bekannten Parkinson-Gene vertreten. Im folgenden wird auf einige der signifikant, differentiell regulierten Gene, die aufgrund ihrer Funktion und/oder ihrer möglichen Relevanz im Rahmen molekularer Signalwege der Neurodegeneration bei der PK interessant erscheinen, näher eingegangen.

- ***Solute carrier family 5 (choline transporter), member 7 (SLC5A7)***

Dieses Gen wurde in C621-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen als am stärksten hochreguliert identifiziert (SLR: 1,18). Es kodiert für den *high-affinity choline transporter* CHT1. Hierbei handelt es sich um einen Na^+- und Cl^--abhängigen Transporter, der die Aufnahme von Cholin für die Acetylcholinsynthese in cholinergen Neuronen vermittelt (Apparsundaram *et al.*, 2000). Hinweise für eine mögliche Bedeutung des *high-affinity choline transporter* bei neurodegenerativen Erkrankungen kommen aus Untersuchungen

von Slotkin und Mitarbeitern (1994), die eine Überexpression dieses Transporters in kortikalen Regionen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten zeigen konnten.

- ***Heat shock 70kD protein 1B (HSPA1B)***

Das *HSPA1B*-Gen kodiert für ein Chaperon, das zur Hsp70 (*heat shock protein* 70)-Familie gehört. Hsp70s vermitteln die Faltung neu translatierter Proteine und können die Aggregation ungefalteter Proteine verhindern (Fink, 1999; Übersichtsartikel).

Im Drosophila-Modell für die PK mit Überexpression von α-Synuklein (Wt-, A30P- und A53T-Form) konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression von Hsp70 das Absterben dopaminerger Neurone verhindert und somit vor α-Synuklein-vermittelter Toxizität schützt (Auluck *et al.*, 2002). Die Überexpression von Wt-, A30P- und A53T-α-Synuklein führt auch bei Drosophila zur Bildung LK-ähnlicher Aggregate (Feany und Bender, 2000). Interessanterweise konnte kein Effekt von Hsp70 auf die Bildung der LK-ähnlichen Aggregate in Drosophila beobachtet werden (Auluck *et al.*, 2002). Wie unter 4.1 diskutiert sind möglicherweise nicht die Aggregate selbst das toxische Agens, sondern lösliche, fehlgefaltete, protofibrilläre Strukturen. Es kann spekuliert werden, dass Chaperone wie Hsp70 protektiv wirken, indem sie diese toxischen Proteinkonformationen modulieren. In diesem Zusammenhang lässt sich die beobachtete Hochregulation von *HSPA1B* in C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen als Stressantwort auf die toxisch wirkende, mutierte Form des Synphilin-1-Proteins interpretieren.

- ***Transforming growth factor, beta 1 (TGFB1)***

Transforming growth factor-βs (TGF-βs) gehören zu einer Familie von multifunktionalen Wachstumsfaktoren. In Säugern gibt es drei Isoformen, TGF-β1, 2 und 3, die alle im adulten menschlichen Gehirn exprimiert werden (Flanders *et al.*, 1998; Übersichtsartikel). Abhängig vom Zelltyp und von Umweltfaktoren können TGF-βs Apoptose auslösen oder das Überleben von Zellen fördern. Sie können kontextabhängig die Proliferation oder die Differenzierung von Zellen

fördern, Entzündungsprozesse auslösen oder verhindern (Dennler *et al.*, 2002; Massague *et al.*, 2000).

TGF-β1 wird im gesunden Gehirn normalerweise niedrig exprimiert. Nach Schädigungen kommt es allerdings zu einer schnellen Hochregulation, wodurch die Induktion weiterer Gene als Antwort auf die Schädigung bedingt wird (Finch *et al.*, 1993). TGF-β1 scheint auch eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen zu spielen. In dopaminergen, striatalen Regionen in Gehirnen und im Liquor von Parkinson-Patienten konnten signifikant erhöhte TGF-β1-Konzentrationen festgestellt werden (Mogi *et al.*, 1995). Ferner konnte *in vitro* gezeigt werden, dass TGF-β1, 2 und 3 dopaminerge Neuronen gegen MPTP-Toxizität schützen können (Krieglstein *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mutierte Form von Synphilin-1 die Suszeptibilität von dopaminergen SH-SY5Y-Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli erhöht. Aufgrund der beschriebenen neuroprotektiven Wirkung von TGF-β1 ist es wahrscheinlich, dass die Hochregulation von *TGFB1* in C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen eine zelluläre Antwort auf die potentiell toxische, mutierte Form von Synphilin-1 darstellt.

In einer Arbeit von Brionne und Mitarbeitern (2003) konnte gezeigt werden, dass der Verlust der TGF-β1-Expression in neonatalen Tgfb1$^{-/-}$-Mäusen zu einer verstärkten Degeneration von Neuronen verbunden mit einer verminderten Expression von Synaptophysin und Laminin führt. Die Autoren spekulieren, dass die beobachtete verminderte Expression des extrazellulären Matrix-Proteins Laminin eine Rolle bei der Degeneration von Neuronen spielen könnte. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass *laminin alpha 4* (*LAMA4*), das für eine Laminin-Untereinheit kodiert, in den C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen eine reaktiv erhöhte Expression (SLR: 0,77) zeigte.

4.2 Identifizierung der proteasomalen Untereinheit S6-ATPase als neuen Interaktionspartner von Synphilin-1

Die Identifikation der spezifischen Interaktion von Synphilin-1 mit einem Bestandteil des regulatorischen Komplexes des 26S-Proteasom, der S6-ATPase (auch Tbp7 oder RPT3), stellt erstmals eine direkte Verbindung zwischen

Synphilin-1 und dem Proteasomen-System her. Die mittels Co-Immunpräzipitation gefundene Interaktion ließ sich durch den Nachweis der Co-Lokalisation beider Proteine *in vitro* bestätigen. Erst kürzlich konnte von einer anderen Arbeitsgruppe durch den Nachweis der Interaktion von α-Synuklein mit der proteasomalen Untereinheit S6'-ATPase (Tbp1) eine direkte Verbindung zwischen einem für die PK relevanten Protein und dem UPS hergestellt werden (Snyder *et al.*, 2003). Die S6-ATPase und die S6'-ATPase gehören zur AAA (***A****TPases* ***a****ssociated with various cellular* ***a****ctivities*)-Protein-Superfamilie. Charakteristisch für diese Superfamilie ist eine aus ca. 220 AS bestehende konservierte ATPase-Domäne (Vale, 2000; Übersichtsartikel). AAA-Proteine weisen eine Chaperon-ähnliche Aktivität auf und spielen eine Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. der Proteasomen-Funktion, Peroxisomenbiogenese, Membranfusion und Regulation von Transkriptionsfaktoren (Braun *et al.*, 1999; Wiebel und Kunau, 1992; Rabouille *et al.*, 1995; Rape *et al.*, 2001). In eukaryontischen Zellen enthält die regulatorische 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms sechs AAA-ATPasen, darunter die S6-ATPase (Baumeister *et al.*, 1998; Übersichtsartikel). Diese ATPasen spielen eine Rolle bei der Substraterkennung und vermitteln die ATP-abhängige Entfaltung der zur Degradation bestimmten Proteine sowie deren Einschleusung in die 20S-Untereinheit des Proteasoms (Baumeister *et al.*, 1998).

Auch für andere neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. die spinocerebelläre Ataxie (SCA) wurden bereits Interaktionen zwischen Proteinen, die eine Rolle bei der Erkrankung spielen, und Bestandteilen der 19S-Untereinheit des Proteasoms beschrieben (Matilla *et al.*, 2001). Ataxin-7 interagiert mit der S4-ATPase-Untereinheit des 19S-Proteasoms und co-lokalisiert mit weiteren proteasomalen Komponenten in nukleären *Foci* (Matilla *et al.*, 2001). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der AAA-ATPase Spastin, die zum Funktionsverlust des Proteins führen, zur Neurodegeneration bei der autosomal-dominant vererbten spastischen Paraplegie führen (Hazan *et al.*, 1999). Auch Ataxin-3, das eine Rolle bei der SCA3 spielt, ist mit dem Proteasom assoziiert (Doss-Pepe *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2004). Insgesamt sprechen diese

Beobachtungen dafür, dass Störungen in der Erkennung oder im Abbau ubiquitinierter Proteine durch das Proteasom zur Neurodegeneration beitragen.

Die Akkumulation und Aggregation von Proteinen ist ein gemeinsames Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen (Schulz und Dichgans, 1999). Die für die PK typischen LK enthalten verschiedene Proteine, darunter auch Synphilin-1 (Wakabayashi *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte die S6-ATPase ebenfalls als Bestandteil von LK in Gehirnen von Parkinson-Patienten identifiziert werden. Entsprechend konnte im Zellkulturmodell eine Co-Lokalisation von Synphilin-1 und S6-ATPase in intrazytoplasmatischen Protein-Einschlüssen gezeigt werden. In Zellkulturmodellen für neurodegenerative Erkrankungen werden die Äquivalente zu den charakteristischen Proteinaggregaten, die in Gehirnen von Patienten gefunden werden, als Aggresomen bezeichnet (Kopito, 2000; Junn *et al.*, 2002). Die bei Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase in HEK 293-Zellen beobachteten zytoplasmatischen Aggregate waren perinukleär lokalisiert und enthielten γ-Tubulin. Damit erfüllten sie die Kriterien für Aggresomen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Überexpression von Synphilin-1 alleine bereits ausreichend für die Bildung zytoplasmatischer Protein-Einschlüsse, die Aggresomen entsprechen, ist (O'Farrell *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2004). Die Co-Expression von S6-ATPase und Synphilin-1 führte zu einer vermehrten Aggresomenbildung verbunden mit einer verminderten Proteasomen-Funktion. Ob Aggresomen die Ursache oder das Ergebnis einer proteasomalen Dysfunktion darstellen, ist bis jetzt noch nicht bekannt (Tanaka *et al.*, 2004). Interessanterweise führte die Überexpression der mutierten Form von Synphilin-1 alleine bereits zu einer verminderten proteasomalen Aktivität. Dieser Effekt konnte durch Co-Expression von S6-ATPase nicht weiter gesteigert werden. Möglicherweise ist diese inhibitorische Wirkung der C621-Variante auf die proteasomale Aktivität ein Mechanismus, über den mutiertes Synphilin-1 zellschädigend wirkt.

Wie unter 4.1 bereits diskutiert sprechen neuere Untersuchungen sowie die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass lösliche Proteinintermediate und nicht die Aggresomen selbst zellschädigend wirken. In diesem Kontext könnte die

verstärkte Aggresomenbildung nach Co-Expression von Synphilin-1 und S6-ATPase einen protektiven Mechanismus darstellen, mit dem die Zelle versucht, sich vor der Anhäufung toxischer, löslicher Proteinintermediate zu schützen.
Synphilin-1 wird über das UPS degradiert. Die verminderte proteasomale Aktivität verbunden mit der vermehrten Aggresomenbildung in Zellen, die Synphilin-1 und S6-ATPase co-exprimierten, führte jedoch nicht zu einer Erhöhung des Synphilin-1-Proteingehalts. Dies könnte dafür sprechen, dass es alternative, an die Bildung von Aggresomen gekoppelte Abbauwege für Synphilin-1 gibt. In Zellkulturmodellen für andere neurodegenerative Erkrankungen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Aggresomen und einem beschleunigten Abbau fehlgefalteter Proteine, an dem verschiedene Proteinabbauwege einschließlich dem lysosomalen Proteinabbau beteiligt sind, beobachtet werden (Taylor *et al.*, 2003). Von Fortun und Mitarbeitern (2003) konnte gezeigt werden, dass Aggresomen mit lysosomalen Strukturen assoziiert sind. Autophagie, der Hauptweg, über den zytosolische Proteine ins Lysosom gelangen, scheint dabei ein möglicher Mechanismus zur Eliminierung von Aggresomen zu sein (Fortun *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass die Bildung von Aggresomen eine zelluläre Antwort auf die schädliche Akkumulation von Proteinen ist, die eine effizientere Elimination dieser Proteine ermöglicht.

4.3 Charakterisierung einer neuen P159L-Mutation im *Parkin*-Gen

Mutationen im *Parkin*-Gen sind die häufigste genetische Ursache für die PK. Neben homozygoten Mutationen und *compound*-heterozygoten Mutationen (d.h. zwei verschiedene Mutationen auf jedem der beiden Allele im selben Gen), die meist bei autosomal-rezessiv vererbten Formen des PS mit frühem Krankheitsbeginn gefunden werden, konnten auch heterozygote Mutationen identifiziert werden (Hedrich *et al.*, 2002; Kann *et al.*, 2002; Foroud *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang wurde spekuliert, dass Mutationen in der nicht-kodierenden Region des *Parkin*-Gens unentdeckt geblieben sind. PET-Untersuchungen, bei denen präklinische Veränderungen des

Dopaminstoffwechsels bei Trägern heterozygoter *Parkin*-Mutationen nachgewiesen werden konnten, legen jedoch nahe, dass auch eine einzige, heterozygote Mutation für ein PS prädisponieren kann (Hilker *et al.*, 2001). Die am häufigsten gefundene heterozygote Punktmutation ist eine R275W-Substitution. Diese Mutation wurde in 15 Parkinson-Familien beschrieben. Im Gegensatz zu *loss of function*-Mutationen im *Parkin*-Gen, die durch Exon-Deletionen bedingt sind, konnte für die R275W-Form von Parkin der Erhalt der E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion nachgewiesen werden (Chung *et al.*; 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von R275W-Parkin *in vitro* zu einer vermehrten Bildung intrazytoplasmatischer Parkin-Einschlüsse führt, was für einen möglichen *toxic gain of function* spricht (Cookson *et al.*, 2003). Diese *in vitro*-Ergebnisse korrelieren gut mit *Postmortem*-Untersuchungen, bei denen im Gehirn eines Patienten mit *compound*-heterozygoter R275W-Mutation LK nachgewiesen werden konnten, und sprechen für einen „dominant“ wirkenden Typ von *Parkin*-Mutationen (Farrer *et al.*; 2001). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte in einer Familie mit offensichtlich autosomal-dominantem Erbgang für die Parkinson-Krankheit eine neue heterozygote P159L-Mutation identifiziert werden. Diese Mutation befindet sich außerhalb der RING-Finger-Domänen von Parkin. Die Überexpression von L159-Parkin in HEK 293-Zellen führt ebenso wie die Überexpression der W275-Form zu einer im Vergleich zur Wt-Form signifikant gesteigerten Bildung intrazytoplasmatischer Parkin-Einschlüsse. Somit zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Tendenz zur Bildung von Parkin-Einschlüssen nicht notwendigerweise auf Parkin-Varianten mit Mutationen in den RING-Finger-Domänen beschränkt ist. Des weiteren stützen die Ergebnisse die Hypothese, dass heterozygote Punktmutationen eine Rolle bei der Pathogenese der PK spielen. Auch wenn die Bildung von Protein-Einschlüssen nicht unbedingt ursächlich für Neurodegeneration ist, wird eine Aggregatbildungstendenz auch bei anderen PK-assoziierten Proteinen wie z.B α-Synuklein beobachtet (Conway *et al.*, 1998).

5 Zusammenfassung

Die Parkinson-Krankheit (PK) ist die häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung beim Menschen. Neuropathologisch ist sie durch den Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) im Mittelhirn und das Auftreten von Lewy-Körpern (LK) gekennzeichnet. Durch die Identifizierung von Krankheitsgenen, die ursächlich für familiäre Formen der PK sind, konnten neue Einblicke in die Pathogenese der PK gewonnen werden. Die Ergebnisse der nachfolgenden funktionellen Charakterisierung der entsprechenden Genprodukte sprechen dafür, dass Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen sowie Störungen im Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der PK spielen. Synphilin-1 wurde als Interaktionspartner von α-Synuklein und Parkin, die beide eine Rolle bei der Pathogenese der PK spielen, identifiziert. Ferner konnte dieses Protein als Bestandteil von LK in Gehirnen von Patienten mit sporadischer PK nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue R621C-Mutation im *Synphilin-1*-Gen, die bei zwei Patienten mit sporadischer PK identifiziert wurde, *in vitro* funktionell charakterisiert. Die Überexpression von Synphilin-1 in dopaminergen SH-SY5Y-Zellen führte zur Bildung intrazytoplasmatischer Protein-Einschlüsse. Diese Einschlüsse enthielten α-Synuklein und Ubiquitin und wiesen damit Merkmale von LK auf. In Zellen, welche die mutierte Form (C621) von Synphilin-1 überexprimierten, wurde unter proteasomaler Hemmung eine im Vergleich zu Wildtyp (Wt)-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen signifikant verminderte Bildung von Protein-Einschlüssen beobachtet. Gleichzeitig zeigten C621-Synphilin-1-überexprimierende Zellen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber zellulärem Stress. Bei der Analyse der differentiellen Genexpression in Wt- und C621-Synphilin-1-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen mittels Affymetrix-Microarray-Technologie konnte in C621-Synphilin-1-überexprimierenden Zellen eine reaktive Hochregulation des Chaperons Hsp70 und des Wachstumsfaktors TGF-β1 auf transkriptioneller Ebene festgestellt werden. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die pathogenetische Bedeutung der R621C-Mutation im

Synphilin-1-Gen bei der Entstehung der PK und stützen indirekt die Hypothese, dass die Bildung von zytoplasmatischen Protein-Einschlüssen protektiv ist.

Durch die Identifizierung der S6-ATPase, einem Bestandteil der regulatorischen 19S-Untereinheit des Proteasoms, als Interaktionspartner von Synphilin-1 konnte erstmals eine direkte Verbindung zwischen Synphilin-1 und dem Proteasomen-System hergestellt werden. Bei der funktionellen Charakterisierung dieser Interaktion *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Synphilin-1 und S6-ATPase in Aggresomen-ähnlichen, intrazytoplasmatischen Protein-Einschlüssen co-lokalisieren. Die Überexpression von Synphilin-1 und S6-ATPase in HEK 293-Zellen führte im Vergleich zu Zellen, die Synphilin-1 alleine exprimierten, zu einer verminderten proteasomalen Aktivität verbunden mit einer signifikant erhöhten Bildung von Synphilin-1-Einschlüssen. Die *Steady-State-Level* waren allerdings nicht verändert, was für alternative Abbauwege für Synphilin-1 spricht. In nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen konnte die S6-ATPase als Bestandteil von LK in Gehirnen von Parkinson-Patienten identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine direkte Interaktion von Synphilin-1 mit dem regulatorischen Komplex des Proteasoms, welche die proteasomale Funktion moduliert.

Es sind eine Vielzahl von Mutationen im Gen, das für das Synphilin-1-interagierende Protein Parkin kodiert, bekannt, die ursächlich für ein autosomal-rezessiv vererbtes Parkinson-Syndrom (PS) mit frühem Krankheitsbeginn sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue P159L-Mutation, die bei einer Familie mit offensichtlich dominantem Erbgang für die PK mit spätem Krankheitsbeginn identifiziert wurde, *in vitro* funktionell analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der P159L-Variante in HEK 293-Zellen im Vergleich zu Wt-Parkin zu einer signifikant gesteigerten Bildung von Parkin-Einschlüssen führt. Dies spricht für einen *toxic gain of function* der mutierten Form, der ursächlich für eine neue, autosomal-dominant vererbte Form des Parkin-bedingten Parkinsonismus mit spätem Krankheitsbeginn ist.

Insgesamt stützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass Proteinaggregation und Störungen des UPS eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der PK spielen und bieten Angriffspunkte für zukünftige Therapien.

6 Literaturverzeichnis

Al-Chalabi, A. und Miller, C. C. (2003). Neurofilaments and neurological disease. Bioessays *25*, 346-355.

Apparsundaram, S., Ferguson, S. M., George, A. L., Jr. und Blakely, R. D. (2000). Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. Biochem. Biophys. Res. Commun. *276*, 862-867.

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

Bandopadhyay, R., de Silva, R., Khan, N., Graham, E., Vaughan, J., Engelender, S., Ross, C., Morris, H., Morris, C., Wood, N. W. *et al.* (2001). No pathogenic mutations in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. Neurosci. Lett. *307*, 125-127.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. und Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell *92*, 367-380.

Bennett, M. C., Bishop, J. F., Leng, Y., Chock, P. B., Chase, T. N. und Mouradian, M. M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. J. Biol. Chem. *274*, 33855-33858.

Biedler, J. L., Helson, L. und Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res. *33*, 2643-2652.

Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M. *et al.* (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. Science *299*, 256-259.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. *72*, 248-254.

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. und Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. Nat. Cell. Biol. *1*, 221-226.

Brionne, T. C., Tesseur, I., Masliah, E. und Wyss-Coray, T. (2003). Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. Neuron *40*, 1133-1145.

Bulteau, A. L., Lundberg, K. C., Humphries, K. M., Sadek, H. A., Szweda, P. A., Friguet, B. und Szweda, L. I. (2001). Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. J. Biol. Chem. *276*, 30057-30063.

Canet-Aviles, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M. J., Ringe, D., Petsko, G. A. und Cookson, M. R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 9103-9108.

Castillo, S. O., Baffi, J. S., Palkovits, M., Goldstein, D. S., Kopin, I. J., Witta, J., Magnuson, M. A. und Nikodem, V. M. (1998). Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. Mol. Cell. Neurosci. *11*, 36-46.

Chan, P., DeLanney, L. E., Irwin, I., Langston, J. W. und Di Monte, D. (1991). Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. J. Neurochem. *57*, 348-351.

Chiba, K., Trevor, A. J. und Castagnoli, N., Jr. (1985). Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *128*, 1228-1232.

Chung, K. K., Zhang, Y., Lim, K. L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C. A., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. Nat. Med. *7*, 1144-1150.

Conway, K. A., Harper, J. D. und Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. Nat. Med. *4*, 1318-1320.

Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M. und Lansbury, P. T., Jr. (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. Science *294*, 1346-1349.

Cookson, M. R., Lockhart, P. J., McLendon, C., O'Farrell, C., Schlossmacher, M. und Farrer, M. J. (2003). RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein. Hum. Mol. Genet. *12*, 2957-2965.

Dauer, W. und Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron *39*, 889-909.

Davis, B. J. (1964). Disc Electrophoresis. Ii. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. *121*, 404-427.

Dawson, S., Apcher, S., Mee, M., Higashitsuji, H., Baker, R., Uhle, S., Dubiel, W., Fujita, J. und Mayer, R. J. (2002). Gankyrin is an ankyrin-repeat oncoprotein that interacts with CDK4 kinase and the S6 ATPase of the 26 S proteasome. J. Biol. Chem. *277*, 10893-10902.

Dawson, T. M. und Dawson, V. L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. Science *302*, 819-822.

de Rijk, M. C., Tzourio, C., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J. M., Alperovitch, A. und Rocca, W. A. (1997). Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *62*, 10-15.

Dennler, S., Goumans, M. J. und ten Dijke, P. (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. J. Leukoc. Biol. *71*, 731-740.

Doss-Pepe, E. W., Stenroos, E. S., Johnson, W. G. und Madura, K. (2003). Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. Mol. Cell. Biol. *23*, 6469-6483.

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

El-Agnaf, O. M., Jakes, R., Curran, M. D. und Wallace, A. (1998). Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of alpha-synuclein protein implicated in Parkinson's disease. FEBS Lett. *440*, 67-70.

Engelender, S., Kaminsky, Z., Guo, X., Sharp, A. H., Amaravi, R. K., Kleiderlein, J. J., Margolis, R. L., Troncoso, J. C., Lanahan, A. A., Worley, P. F. *et al.* (1999). Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. Nat. Genet. *22*, 110-114.

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

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

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

Finch, C. E., Laping, N. J., Morgan, T. E., Nichols, N. R. und Pasinetti, G. M. (1993). TGF-beta 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. J. Cell. Biochem. *53*, 314-322.

Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. Physiol. Rev. *79*, 425-449.

Flanders, K. C., Ren, R. F. und Lippa, C. F. (1998). Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. Prog. Neurobiol. *54*, 71-85.

Foroud, T., Uniacke, S. K., Liu, L., Pankratz, N., Rudolph, A., Halter, C., Shults, C., Marder, K., Conneally, P. M. und Nichols, W. C. (2003). Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. Neurology *60*, 796-801.

Fortun, J., Dunn, W. A., Jr., Joy, S., Li, J. und Notterpek, L. (2003). Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. J. Neurosci. *23*, 10672-10680.

Giasson, B. I., Uryu, K., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M. (1999). Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. J. Biol. Chem. *274*, 7619-7622.

Gibb, W. R. (1986). Idiopathic Parkinson's disease and the Lewy body disorders. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *12*, 223-234.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol. *36*, 59-74.

Grune, T., Reinheckel, T. und Davies, K. J. (1996). Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. J. Biol. Chem. *271*, 15504-15509.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. *166*, 557-580.

Hartl, F. U. und Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science *295*, 1852-1858.

Hasegawa, E., Kang, D., Sakamoto, K., Mitsumoto, A., Nagano, T., Minakami, S. und Takeshige, K. (1997). A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. *337*, 69-74.

Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y. und Minakami, S. (1990). 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Biochem. Biophys. Res. Commun. *170*, 1049-1055.

Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C. S., Cruaud, C., Durr, A., Wincker, P. *et al.* (1999). Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. Nat. Genet. *23*, 296-303.

He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 2509-2514.

Hedrich, K., Marder, K., Harris, J., Kann, M., Lynch, T., Meija-Santana, H., Pramstaller, P. P., Schwinger, E., Bressman, S. B., Fahn, S. und Klein, C. (2002). Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. Neurology *58*, 1239-1246.

Hicks, A. A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H. S., Sainz, J., Frigge, M. L., Kong, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K. und Sveinbjornsdottir, S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. Ann. Neurol. *52*, 549-555.

Hilker, R., Klein, C., Ghaemi, M., Kis, B., Strotmann, T., Ozelius, L. J., Lenz, O., Vieregge, P., Herholz, K., Heiss, W. D. und Pramstaller, P. P. (2001). Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. Ann. Neurol. *49*, 367-376.

Hill, W. D., Lee, V. M., Hurtig, H. I., Murray, J. M. und Trojanowski, J. Q. (1991). Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are present in Parkinson's disease Lewy bodies. J. Comp. Neurol. *309*, 150-160.

Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. und Takahashi, R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. Cell *105*, 891-902.

Ito, T., Niwa, J., Hishikawa, N., Ishigaki, S., Doyu, M. und Sobue, G. (2003). Dorfin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. J. Biol. Chem. *278*, 29106-29114.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1984). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. Eur. J. Biochem. *138*, 9-37.

Jalava, A. M., Heikkila, J., Akerlind, G., Pettit, G. R. und Akerman, K. E. (1990). Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Cancer Res. *50*, 3422-3428.

Javitch, J. A., D'Amato, R. J., Strittmatter, S. M. und Snyder, S. H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 - tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *82*, 2173-2177.

Junn, E., Lee, S. S., Suhr, U. T. und Mouradian, M. M. (2002). Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment. J. Biol. Chem. *277*, 47870-47877.

Kann, M., Jacobs, H., Mohrmann, K., Schumacher, K., Hedrich, K., Garrels, J., Wiegers, K., Schwinger, E., Pramstaller, P. P., Breakefield, X. O. *et al.* (2002). Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. Ann. Neurol. *51*, 621-625.

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

Klaidman, L. K., Adams, J. D., Jr., Leung, A. C., Kim, S. S. und Cadenas, E. (1993). Redox cycling of MPP+: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. Free Radic. Biol. Med. *15*, 169-179.

Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol. *10*, 524-530.

Krieglstein, K., Suter-Crazzolara, C., Fischer, W. H. und Unsicker, K. (1995). TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. EMBO J. *14*, 736-742.

Krüger, R., Eberhardt, O., Rieß, O. und Schulz, J. B. (2002). Parkinson's disease: one biochemical pathway to fit all genes? Trends Mol. Med. *8*, 236-240.

Krüger, R., Fischer, C., Schulte, T., Strauss, K. M., Müller, T., Woitalla, D., Berg, D., Hungs, M., Gobbele, R., Berger, K. *et al.* (2003). Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease. Neurosci. Lett. *351*, 125-129.

Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schöls, L. und Rieß, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat. Genet. *18*, 106-108.

Krüger, R., Vieira-Saecker, A. M., Kuhn, W., Berg, D., Müller, T., Kuhnl, N., Fuchs, G. A., Storch, A., Hungs, M., Woitalla, D. *et al.* (1999). Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. Ann. Neurol. *45*, 611-617.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L. und Pickart, C. M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. Nature *416*, 763-767.

Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. und Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science *219*, 979-980.

Lansbury, P. T., Jr. (1999). Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *96*, 3342-3344.

Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T. und Lansbury, P. T., Jr. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. Nature *418*, 291.

Lavedan, C., Buchholtz, S., Nussbaum, R. L., Albin, R. L. und Polymeropoulos, M. H. (2002). A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. Neurosci. Lett. *322*, 57-61.

Le, W. D., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S. H., Smith, R. G. und Vassilatis, D. K. (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. Nat. Genet. *33*, 85-89.

Lee, G., Junn, E., Tanaka, M., Kim, Y. M. und Mouradian, M. M. (2002). Synphilin-1 degradation by the ubiquitin-proteasome pathway and effects on cell survival. J. Neurochem. *83*, 346-352.

Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T. *et al.* (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature *395*, 451-452.

Liani, E., Eyal, A., Avraham, E., Shemer, R., Szargel, R., Berg, D., Bornemann, A., Rieß, O., Ross, C. A., Rott, R. und Engelender, S. (2004). Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *101*, 5500-5505.

Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. A., Liu, Z. und Lansbury, P. T., Jr. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell *111*, 209-218.

Liu, Y., Roghani, A. und Edwards, R. H. (1992). Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *89*, 9074-9078.

Lockhart, P. J., Lincoln, S., Hulihan, M., Kachergus, J., Wilkes, K., Bisceglio, G., Mash, D. C. und Farrer, M. J. (2004). DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function. J. Med. Genet. *41*, e22.

Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R. J. und Wilkinson, K. D. (1990). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. J. Pathol. *161*, 153-160.

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

Maniatis, T., Fritsch, E. und Sambrook, J. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual., Cold spring harbor lab (USA).

Markey, S. P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R. S. und Herkenham, M. A. (1984). Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. Nature *311*, 464-467.

Martin, E. R., Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., Lyons, K., Pahwa, R., Stern, M. B., Colcher, A. *et al.* (2001). Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease. JAMA *286*, 2245-2250.

Marttila, R. J., Kaprio, J., Koskenvuo, M. und Rinne, U. K. (1988). Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. Neurology *38*, 1217-1219.

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

Massague, J., Blain, S. W. und Lo, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell *103*, 295-309.

Mata, I. F., Lockhart, P. J. und Farrer, M. J. (2004). Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. Hum. Mol. Genet. *13 Spec No 1*, R127-133.

Matilla, A., Gorbea, C., Einum, D. D., Townsend, J., Michalik, A., van Broeckhoven, C., Jensen, C. C., Murphy, K. J., Ptacek, L. J. und Fu, Y. H. (2001). Association of ataxin-7 with the proteasome subunit S4 of the 19S regulatory complex. Hum. Mol. Genet. *10*, 2821-2831.

Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M. und Nakayama, K. I. (2004). Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. EMBO J. *23*, 659-669.

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

McNaught, K. S. und Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. Neurosci. Lett. *297*, 191-194.

McNaught, K. S., Mytilineou, C., Jnobaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jennert, P. und Olanow, C. W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. J. Neurochem. *81*, 301-306.

McNaught, K. S. und Olanow, C. W. (2003). Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. Ann. Neurol. *53 Suppl. 3*, S73-84; discussion S84-76.

McNaught, K. S., Olanow, C. W., Halliwell, B., Isacson, O. und Jenner, P. (2001). Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 589-594.

Miller, D. W., Hague, S. M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M. R. und Singleton, A. B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. Neurology *62*, 1835-1838.

Mitsumoto, A. und Nakagawa, Y. (2001). DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. Free Radic. Res. *35*, 885-893.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Narabayashi, H., Riederer, P. und Nagatsu, T. (1995). Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. Neurosci. Lett. *193*, 129-132.

Morett, E. und Bork, P. (1999). A novel transactivation domain in parkin. Trends Biochem. Sci. *24*, 229-231.

Mouradian, M. M. (2002). Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. Neurology *58*, 179-185.

Nagano, Y., Yamashita, H., Takahashi, T., Kishida, S., Nakamura, T., Iseki, E., Hattori, N., Mizuno, Y., Kikuchi, A. und Matsumoto, M. (2003). Siah-1 facilitates ubiquitination and degradation of synphilin-1. J. Biol. Chem. *278*, 51504-51514.

Neystat, M., Rzhetskaya, M., Kholodilov, N. und Burke, R. E. (2002). Analysis of synphilin-1 and synuclein interactions by yeast two-hybrid beta-galactosidase liquid assay. Neurosci. Lett. *325*, 119-123.

Nicklas, W. J., Vyas, I. und Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. Life Sci. *36*, 2503-2508.

O'Farrell, C., Murphy, D. D., Petrucelli, L., Singleton, A. B., Hussey, J., Farrer, M., Hardy, J., Dickson, D. W. und Cookson, M. R. (2001). Transfected synphilin-1 forms cytoplasmic inclusions in HEK293 cells. Brain Res. Mol. Brain Res. *97*, 94-102.

O'Farrell, C., Pickford, F., Vink, L., McGowan, E. und Cookson, M. R. (2002). Sequence conservation between mouse and human synphilin-1. Neurosci. Lett. *322*, 9-12.

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

Olanow, C. W. und Youdim, M. B. H. (1996). Iron and neurodegeneration: prospects for neuroprotection. In Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease., C. W. Olanow, P. Jenner und M. B. H. Youdim, eds. (London, Academic Press), pp. 50-67.

Oliveira, S. A., Scott, W. K., Martin, E. R., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., Pahwa, R., Stern, M. B., Hiner, B. C. *et al.* (2003). Parkin mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. Ann. Neurol. *53*, 624-629.

Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. *121*, 321-349.

Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P. M. und Foroud, T. (2002). Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. Am. J. Hum. Genet. *71*, 124-135.

Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J. und Parks, J. K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. Ann. Neurol. *26*, 719-723.

Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P. J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, M., Hardy, J. und Cookson, M. R. (2002). Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. Neuron *36*, 1007-1019.

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

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. Annu. Rev. Biochem. *70*, 503-533.

Pollanen, M. S., Dickson, D. W. und Bergeron, C. (1993). Pathology and biology of the Lewy body. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *52*, 183-191.

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

Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R. *et al.* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science *276*, 2045-2047.

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

Rabouille, C., Levine, T. P., Peters, J. M. und Warren, G. (1995). An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. Cell *82*, 905-914.

Ramsay, R. R. und Singer, T. P. (1986). Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. J. Biol. Chem. *261*, 7585-7587.

Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H. und Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. Cell *107*, 667-677.

Raynal, P. und Pollard, H. B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. Biochim. Biophys. Acta. *1197*, 63-93.

Ribeiro, C. S., Carneiro, K., Ross, C. A., Menezes, J. R. und Engelender, S. (2002). Synphilin-1 is developmentally localized to synaptic terminals, and its association with synaptic vesicles is modulated by alpha-synuclein. J. Biol. Chem. *277*, 23927-23933.

Rieß, O., Krüger, R., Schöls, L., Kösel, S. und Graeber, M. B. (1999). Zur Genetik und Pathogenese des Morbus Parkinson. Deutsches Ärzteblatt *96*, A-2739-A-2748.

Saucedo-Cardenas, O., Quintana-Hau, J. D., Le, W. D., Smidt, M. P., Cox, J. J., De Mayo, F., Burbach, J. P. und Conneely, O. M. (1998). Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 4013-4018.

Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P. und Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J. Neurochem. *54*, 823-827.

Schlossmacher, M. G., Frosch, M. P., Gai, W. P., Medina, M., Sharma, N., Forno, L., Ochiishi, T., Shimura, H., Sharon, R., Hattori, N. *et al.* (2002). Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. Am. J. Pathol. *160*, 1655-1667.

Schmidt, M. L., Murray, J., Lee, V. M., Hill, W. D., Wertkin, A. und Trojanowski, J. Q. (1991). Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. Am. J. Pathol. *139*, 53-65.

Schulz, J. B. und Dichgans, J. (1999). Molecular pathogenesis of movement disorders: are protein aggregates a common link in neuronal degeneration? Curr. Opin. Neurol. *12*, 433-439.

Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Koller, W. C., Lyons, K., Pahwa, R., Stern, M. B., Colcher, A., Hiner, B. C. *et al.* (2001). Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes. JAMA *286*, 2239-2244.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. und Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat. Genet. *25*, 302-305.

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

Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R. *et al.* (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. Science *302*, 841.

Slotkin, T. A., Nemeroff, C. B., Bissette, G. und Seidler, F. J. (1994). Overexpression of the high affinity choline transporter in cortical regions affected by Alzheimer's disease. Evidence from rapid autopsy studies. J. Clin. Invest. *94*, 696-702.

Snyder, H., Mensah, K., Theisler, C., Lee, J., Matouschek, A. und Wolozin, B. (2003). Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. J. Biol. Chem. *278*, 11753-11759.

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. und Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *95*, 6469-6473.

Stefanis, L., Larsen, K. E., Rideout, H. J., Sulzer, D. und Greene, L. A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. J. Neurosci. *21*, 9549-9560.

Tan, E. K., Matsuura, T., Nagamitsu, S., Khajavi, M., Jankovic, J. und Ashizawa, T. (2000). Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: an etiologic link with essential tremor? Neurology *54*, 1195-1198.

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

Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., Wanner, T., Tanzi, R. E., Sawa, A., V, L. D., Dawson, T. M. und Ross, C. A. (2001). Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. Hum. Mol. Genet. *10*, 919-926.

Tanner, C. M., Ottman, R., Goldman, S. M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R. und Langston, J. W. (1999). Parkinson disease in twins: an etiologic study. JAMA *281*, 341-346.

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

Tompkins, M. M., Basgall, E. J., Zamrini, E. und Hill, W. D. (1997). Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. Am. J. Pathol. *150*, 119-131.

Touchman, J. W., Dehejia, A., Chiba-Falek, O., Cabin, D. E., Schwartz, J. R., Orrison, B. M., Polymeropoulos, M. H. und Nussbaum, R. L. (2001). Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. Genome Res. *11*, 78-86.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *76*, 4350-4354.

Treier, M., Staszewski, L. M. und Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. Cell *78*, 787-798.

Tu, P. H., Robinson, K. A., de Snoo, F., Eyer, J., Peterson, A., Lee, V. M. und Trojanowski, J. Q. (1997). Selective degeneration fo Purkinje cells with Lewy body-like inclusions in aged NFHLACZ transgenic mice. J. Neurosci. *17*, 1064-1074.

Vale, R. D. (2000). AAA proteins. Lords of the ring. J Cell Biol *150*, F13-19.

Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G. *et al.* (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. Science *304*, 1158-1160.

Vaughan, J. R., Farrer, M. J., Wszolek, Z. K., Gasser, T., Durr, A., Agid, Y., Bonifati, V., DeMichele, G., Volpe, G., Lincoln, S. *et al.* (1998). Sequencing of the alpha-synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (GSPD). Hum Mol Genet *7*, 751-753.

Vieregge, P., Hagenah, J., Heberlein, I., Klein, C. und Ludin, H. P. (1999). Parkinson's disease in twins: a follow-up study. Neurology *53*, 566-572.

Vieregge, P., Schiffke, K. A., Friedrich, H. J., Muller, B. und Ludin, H. P. (1992). Parkinson's disease in twins. Neurology *42*, 1453-1461.

Voges, D., Zwickl, P. und Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annu. Rev. Biochem. *68*, 1015-1068.

Wakabayashi, K., Engelender, S., Yoshimoto, M., Tsuji, S., Ross, C. A. und Takahashi, H. (2000). Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. Ann. Neurol. *47*, 521-523.

Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M. und Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. J. Biol. Chem. *272*, 22364-22372.

Ward, C. D., Duvoisin, R. C., Ince, S. E., Nutt, J. D., Eldridge, R. und Calne, D. B. (1983). Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. Neurology *33*, 815-824.

Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 169-178.

Wiebel, F. F. und Kunau, W. H. (1992). The Pas2 protein essential for peroxisome biogenesis is related to ubiquitin-conjugating enzymes. Nature *359*, 73-76.

Wintermeyer, P., Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Berg, D., Becker, G., Leroy, E., Polymeropoulos, M., Berger, K. *et al.* (2000). Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. Neuroreport *11*, 2079-2082.

Xu, J., Kao, S. Y., Lee, F. J., Song, W., Jin, L. W. und Yankner, B. A. (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. Nat. Med. *8*, 600-606.

Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B. *et al.* (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Ann. Neurol. *55*, 164-173.

Zetterström, R. H., Solomin, L., Jansson, L., Hoffer, B. J., Olson, L. und Perlmann, T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. Science *276*, 248-250.

Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L. und Dawson, T. M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *97*, 13354-13359.

7 Anhang

Tabelle 7-1: Liste der Gene/Transkripte, die bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression in Wt- und C621-Synphilin-1-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen als stringent, differentiell reguliert identifiziert wurden.

GenBank-Nr.	UniGen-Beschreibung / Gensymbol	Funktion	SLR
AB043997	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7 / SLC5A7	Transport	1,18
AF134726	heat shock 70kD protein 1B / HSPA1B	Chaperon	0,9
AI378647	ESTs / -	-	0,77
X91171	laminin, alpha 4 / LAMA4	extrazelluläre Matrix	0,77
BC000125	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease) / TGFB1	Signaltransduktion	0,71
S69738	small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1) / SCYA2	Signaltransduktion	0,67
NM_000088	collagen, type I, alpha 1 / -	extrazelluläre Matrix	0,64
U77914	jagged 1 (Alagille syndrome) / JAG1	Signaltransduktion	0,64
Y13786.2	a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta) / ADAM19	Protein-Prozessierung	0,64
AI242583	hypothetical protein FLJ21269 / -	-	0,63
U32907	37 kDa leucine-rich repeat (LRR) protein / -	-	0,61
AU121762	vascular cell adhesion molecule 1 / VCAM1	Zell-Adhäsion	0,6
M92934	connective tissue growth factor / CTGF	Signaltransduktion	0,58
AA576961	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 / PHLDA1	-	0,58

Fortsetzung der Tabelle 7-1.

GenBank-Nr.	UniGen-Beschreibung / Gensymbol	Funktion	SLR
N34895	ESTs	-	0,56
AL353759	H2A histone family, member L / -	DNA-Bindung	0,55
U73936	jagged 1 (Alagille syndrome) / JAG1	Signaltransduktion	0,53
D84109	RNA-binding protein gene with multiple splicing / -	RNA-Bindung	0,53
D78611	mesoderm specific transcript homolog (mouse) / MEST	-	0,53
AF003114	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 / CYR61	Signaltransduktion	0,51
AA081084	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) / -	Transkriptions-Regulation	0,5
AI433463	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10) / MME	Protein-Prozessierung	0,5
X78565	hexabrachion (tenascin C, cytotactin) / HXB	Zell-Adhäsion	0,49
AF107846	- / -	-	0,49
BF059512	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761G02121 (from clone DKFZp761G02121); partial cds / -	-	0,49
BE894882	ESTs, Weakly similar to ALU1_HUMAN ALU SUBFAMILY J SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY [H.sapiens] /	-	0,48
K03021	plasminogen activator, tissue / -	Protein-Prozessierung	0,48
AF134726	heat shock 70kD protein 1A / HSPA1A	Chaperon	0,48

Fortsetzung der Tabelle 7-1.

GenBank-Nr.	UniGen-Beschreibung / Gensymbol	Funktion	SLR
AF154054	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1 / CKTSF1B1	-	0,47
D21254	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast) / -	-	0,47
AA775177	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E / PTPRE	Protein-Prozessierung	0,47
AA405456	Homo sapiens cDNA FLJ30058 fis, clone ADRGL2000074, weakly similar to RHO-GTPASE-ACTIVATING PROTEIN / -	-	0,47
AF288391	chromosome 1 open reading frame 24 / C1orf24	-	0,47
N79004	ESTs, Weakly similar to A43932 mucin 2 precursor, intestinal [H.sapiens] / -	-	0,45
M95787	transgelin / TAGLN	Zytoskelett	0,45
AF035752	caveolin 2 / -	Vesikeltransport	0,44
AY007239	DKFZP564G202 protein / -	-	0,44
NM_000393	collagen, type V, alpha 2 / -	extrazelluläre Matrix	0,44
X13839	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta / ACTA2	Zytoskelett	0,42
BC002842	H2B histone family, member B / H2BFB	DNA-Bindung	0,42
AI810266	ESTs / -	-	0,42
AF110137	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1 / CKTSF1B1	-	0,41
AL034417	Gene 33/Mig-6 / -	Signaltransduktion	0,4
AI983428	collagen, type V, alpha 1 / -	extrazelluläre Matrix	0,39
BC000474	quinone oxidoreductase homolog	-	0,38

Fortsetzung der Tabelle 7-1.

GenBank-Nr.	UniGen-Beschreibung / Gensymbol	Funktion	SLR
X61598	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein) / SERPINH1	Chaperon	0,38
BE855765	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434P228 (from clone DKFZp434P228) / -	-	0,38
Z29083	trophoblast glycoprotein / TPBG	-	0,38
AL033377	hypothetical protein DKFZp564D0462 / -	-	0,34
D83018	NEL-like 2 (chicken) / NELL2	-	0,31
M82809	annexin A4 / ANXA4	Membran-Bindung	0,27
D84294	tetratricopeptide repeat domain 3 / TTC3	-	-0,38
U34994.3	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide / -	Kinase	-0,39
U30872	centromere protein F (350/400kD, mitosin) / -	Zellteilung	-0,41
AL050270	putative ankyrin-repeat containing protein / -	-	-0,43
AK001411	- / -	-	-0,46
AI360875	SRY (sex determining region Y)-box 11 / SOX11	Transkriptionsfaktor	-0,48
NM_001067	topoisomerase (DNA) II alpha (170kD) / TOP2A	DNA-Prozessierung	-0,57
BC001638	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila) / ASCL1	Transkriptionsfaktor	-0,71
BC002341	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila) / ASCL1	Transkriptionsfaktor	-0,79

8 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Privatdozenten:

K. Albert
E. Bayer
H. Bisswanger
K. W. Bock
P. Bohley
U. Breyer-Pfaff
A. Buchmann
K. Eisele
K.-U. Fröhlich
G. Gauglitz
R. Gebhard
H. Günzl
H. Hagenmaier
B. Hamprecht
M. Hanack
V. Hoffmann
G. Jung
E. Lindner
E. Mayer
D. Mecke
P. Münzel
W. Nakel
H. Oberhammer
D. Oelkrug
P. Overath
E. Pfaff
W. Pfeiffer
H. Pommer
H. Probst
K. Reutter
O. Rieß
H. Schott
M. Schwarz
G. Staudt
S. Stoeva
J. Strähle
W. Voelter
K. Wegmann
J. Werringloer
U. Weser
H. Wiesinger

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Frank Peter Marx

geboren am 27.07.1973 in Dillingen/Saar

Schulausbildung:

1984 – 1991	Staatliches Gymnasium Dillingen
1991 – 1993	Robert-Schuman-Gymnasium Saarlouis
23.06.1993	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1993 – 1994	Zivildienst im Bereich Umweltschutz im Umweltamt der Stadt Dillingen/Saar

Hochschulausbildung:

1994 – 2001	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
07.2000 – 03.2001	Diplomarbeit im Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. P. Overath mit dem Thema „Charakterisierung von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für die kleine GTPase Arf1p in Saccharomyces cerevisiae“
15.03.2001	Abschluss als Diplom-Biochemiker
09.2001 – 10.2004	Promotion im Neurodegenerationslabor der Neurologischen Klinik der Universität Tübingen und am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. M. Schwarz am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen mit dem Thema „Funktionelle Charakterisierung von Mutationen im *Synphilin-1*- und *Parkin*-Gen bei der Parkinson-Krankheit: Bedeutung von Proteinaggregation und des Ubiquitin-Proteasomen-Systems für die Pathogenese der Parkinson-Krankheit“