

**Funktionelle Charakterisierung von
Mutationen im *Neurofilament M* Gen
bei der Parkinson-Krankheit**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Mira Lang
aus Nürtingen
vorgelegte
Dissertation

2007

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2007

Dekan: Prof. Dr. H. A. Mallot

1. Berichterstatter: PD Dr. R. Krüger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Rieß

Meiner Familie!

„42“

Douglas Adams

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2004 bis Juni 2007 im Labor für funktionelle Neurogenomik der Neurologischen Klinik der Universität Tübingen und am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. O. Rieß am Institut für Humangenetik der Universität Tübingen durchgeführt.

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. O. Rieß** danke ich für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit an der Fakultät für Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zu vertreten, sowie für die interessanten, wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn **PD Dr. Rejko Krüger** danke ich für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, für seine Unterstützung und Betreuung sowie die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders möchte ich mich bei Frau **S. Kautzmann** und Frau **C. Schiesling** für die Unterstützung, technische Hilfe, das angenehme Arbeitsklima und die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau **R. Radde** für ihre technische und theoretische Hilfe und Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Mitarbeitern des Hertie Institutes möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Allen Kooperationspartner danke ich für ihre Unterstützung.

Meinen Eltern möchte ich für ihr Vertrauen und ihre uneingeschränkte Unterstützung danken.

Michael danke ich dafür, daß er immer für mich da war!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	v
1 Einleitung	1
1.1 Geschichte	1
1.2 Expression/Regulation	1
1.3 Struktur/Anordnung	2
1.4 Transport	3
1.5 Post-translationelle Modifikationen	5
1.5.1 Glykosylierung	5
1.5.2 Phosphorylierung	5
1.6 Funktion	7
1.7 Degradation	9
1.7.1 Ubiquitinierung	9
1.7.2 Autophagie	10
1.7.3 Calpain Degradation	11
1.8 Tiermodelle für Neurofilament Untereinheiten	12
1.8.1 NF-L Knockout Mäuse	12
1.8.2 NF-H Knockout Mäuse	13
1.8.3 NF-M Knockout Mäuse	13
1.8.4 NF-M/H Knockout Mäuse	13
1.8.5 NF-L Transgene Mäuse	14
1.8.6 NF-M Transgene Mäuse	14
1.8.7 NF-H Transgene Mäuse	14
1.9 Neurofilament und Neurodegeneration	15
1.9.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	15
1.9.2 Alzheimer Krankheit (AK)	16
1.9.3 Charcot-Marie-Tooth (CMT)	17
1.10 Neurofilament und die Parkinson Erkrankung	17
1.10.1 Die Parkinson-Krankheit (PK)	17
1.10.2 Neurofilament in Zusammenhang mit Parkinson	19

1.11	Ziele der Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Geräte	22
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3	Chemikalien und Biochemikalien	24
2.1.4	Reagenziensets (Kits)	26
2.1.5	Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie	26
2.1.6	Lösungen und Puffer	26
2.1.6.1	SDS-PAGE und Western Blotting	26
2.1.6.2	Agarose Gelelektrophorese	28
2.1.6.3	Bakterien Lysispuffer zur Präparation von Plasmid DNA	29
2.1.6.4	Zell-Lyse	29
2.1.6.5	Immunzytochemie	30
2.1.6.6	Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflußzytometrie	30
2.1.7	Kultivierung von Zellen	31
2.1.7.1	Zell-Linien	31
2.1.7.2	Medien und Lösungen für die Zellkultur	31
2.1.8	Kultivierung von Bakterien	33
2.1.8.1	Bakterienstämme	33
2.1.8.2	Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien	33
2.1.9	Primer	34
2.1.9.1	Klonierungsprimer	34
2.1.9.2	Primer für die <i>in vitro</i> -Mutagenese	34
2.1.9.3	Sequenzierprimer	35
2.1.10	Plasmide	35
2.1.10.1	Klonierungs-und Expressionsvektoren	35
2.1.10.2	Plasmidkonstrukte	36
2.1.10.3	Antikörper	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1.1	Vermehrung und Präparation von Plasmiden	38
2.2.1.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	40
2.2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.1.4	Zyklische Sequenzierung	41
2.2.1.5	TOPO [®] -TA-Klonierung	42

2.2.1.6	<i>In vitro</i> Mutagenese	43
2.2.1.7	Umklonierung aus bestehenden Expressionskonstrukten	44
2.2.2	Zellkultur und Transfektion	46
2.2.2.1	Zellkultivierung	46
2.2.2.2	Teilen und Passagieren von Zellen	46
2.2.2.3	Zellzahl-Bestimmung	46
2.2.2.4	Steriles Einfrieren von Zellen	47
2.2.2.5	Steriles Auftauen von Zellen	47
2.2.2.6	Liposomen-vermittelte Transfektion	47
2.2.2.7	Generierung stabil exprimierender Zell-Linien	48
2.2.2.8	Behandlung	48
2.2.3	Biochemische Methoden	49
2.2.3.1	Western-Blotting	49
2.2.3.2	Immunodetektion von Proteinen	50
2.2.3.3	<i>Stripping</i> der Nitrocellulose-Membran	51
2.2.3.4	Immunpräzipitation	51
2.2.4	Zellbiologische Methoden	51
2.2.4.1	Immunzytochemie	51
2.2.4.2	Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflußcytometrie	52
2.2.4.3	Proteasomen-Assay mittels Durchflußcytometrie	54
2.2.4.4	Bestimmung des <i>Steady-State-Levels</i> von NF-M	55
2.2.5	Statistik	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Überexpression von NF-M	59
3.2	Rekonstitution des Filamentnetzwerkes	61
3.3	Transport	64
3.4	<i>Steady-state</i> / Degradation	66
3.5	Phosphorylierung	68
3.6	Proteasomen-Aktivitäts-Assay	71
3.7	Aggregationsverhalten	73
3.8	Untersuchung des Löslichkeitsverhalten	76
3.9	Zellvitalität	78
4	Diskussion	81
5	Zusammenfassung	92

Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	97
Literaturverzeichnis	99
Lebenslauf	119

Abkürzungen

AK	Alzheimer-Krankheit
Ak	Antikörper
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin Tri-Phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>Complementary</i> -Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
CoIP	Ko-Immunpräzipitation
DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Transporter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFM	Einfriermedium
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FBS	Fötale Rinderserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
<i>g</i>	Gravitationskonstante
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
HAc	Essigsäure
HK	Huntington-Krankheit
HRP	<i>Horseradish</i> -Peroxidase
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>

Ig	Immunglobulin
IP	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
IZC	Immunzytochemie
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LK	Lewy-Körper
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NEB	New England Biolabs
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Spektroskopie
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PI	Propidiumiodid
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PK	Parkinson-Krankheit
PS	Parkinson-Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
UpM	Umdrehungen pro Minute
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
WB	Western-Blotting
Wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Geschichte

Neurofilamente werden in der Literatur bereits in den 30iger Jahren des 19. Jahrhunderts als fibröses Netzwerk in Neuronen von Valentin (1836) [1] und Purkinje (1838) [2] beschrieben. Mit der Weiterentwicklung der Silberfärbung gelang es Apathy (1897) [3] und Cajal (1899) [4] die *Neurofibrillen* deutlich zu visualisieren. Durch die Entwicklung des Elektronenmikroskops 1931 (Max Knoll und Ernst Ruska) konnte Schmitt [5] zeigen, daß diese *Neurofibrillen* aus Filamenten mit einem Durchmesser von $\sim 10\text{nm}$ bestehen. Er nannte sie Neurofilamente (NF). Bereits seit langer Zeit war bekannt, daß Neurofilamente in verschiedenen neuronalen Erkrankungen eine Rolle spielen. In den letzten Jahrzehnten konnten immer mehr Krankheiten Störungen der Neurofilamente zugeordnet werden.

1.2 Expression/Regulation

Die Expression der Neurofilament Untereinheiten L und M wird in Form von mRNA im Embryo ab Tag 12-13 (E12-13) im Gehirn und Rückenmark detektierbar, und überlappt dabei mit der Expression von α -Internexin und Peripherin [6]. Neurofilament H (NF-H) dagegen wird erst später (E21) nachweisbar, allerdings steigt zu diesem Zeitpunkt die Expression drastisch an [7]. Humanes NF-L und NF-M liegen beide nahe beieinander auf Chromosom 8p21 [8], hNF-H dagegen liegt auf Chromosom 22q12.2 [9]. Dies deutet darauf hin, daß eventuell hNF-L und hNF-M von der gleichen regulatorischen Komponente gesteuert werden, im Gegensatz zu hNF-H, welches sowohl räumlich als auch zeitlich unterschiedlich reguliert wird. Neurofilamente werden ausschließlich in Neuronen exprimiert [10], wobei sie sowohl im peripheren (PNS) als auch zentralen (ZNS) Nervensystem vorkommen [11].

1.3 Struktur/Anordnung

Gemeinsam mit Peripherin, α -Internexin und Nestin gehören die Neurofilament Proteine (NFP) zu den Typ IV Intermediärfilamenten. Neurofilamente bestehen aus drei Untereinheiten, welche durch ihr Molekulargewicht definiert werden: NF-L (light), NF-M (medium) und NF-H (heavy) [9]. Anhand der DNA-Sequenz wurden Molekulargewichte von jeweils 60kD, 100kD und 110kD berechnet. Alle diese Proteinen teilen sich eine gemeinsame strukturelle Organisation. Eine zentrale alpha-helikale *Rod*-Domäne aus ca. 300 Aminosäuren wird von einer Amino-terminalen *head*-Domäne und einer Carboxy-terminalen *Tail*-Domäne eingefasst [12]. Die zentrale *Rod*-Domäne beginnt und endet mit hoch konservierten Motiven, welche charakteristisch für alle Intermediärfilamente, und für eine korrekte Anordnung der Filamente essentiell ist. Im mittleren Teil dieser *Rod*-Domäne ist jeder siebte Aminosäurerest hydrophob [13], was die Formation von α -helikalen parallelen Homo- oder Heterodimeren ermöglicht. Die Amino-terminale *Head*-Domäne wird extensiv durch Phosphorylierung und O-Glykosylierung [14] post-translationell modifiziert. Diese Modifikationen sind dynamisch und regulieren möglicherweise die Anordnung und den Transport, wie man es auch von anderen Intermediärfilamenten bereits kennt [15, 14, 16]. Die Carboxy-terminalen *Tail*-Domänen sind auffallend durch ihre erheblichen repetitiven Strukturen der zwei schweren Untereinheiten NF-M und NF-H. Sie beinhalten das Motiv X-Lysin-Serin-Prolin-X₁₋₃-Lysin (XKSP(X)₁₋₃K), wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann [13]. Es wird angenommen, daß diese KSP Wiederholungen von spezifischen Prolin gerichteten Kinasen erkannt werden [17, 18]. Die meisten, möglicherweise alle der Serine in diesem Motiv können phosphoryliert werden. Diese extreme Phosphorylierung führt zu einer starken negativen Ladung der *Tail*-Domänen [19]. Auf Grund dieser Modifikationen wandern die Neurofilament Untereinheiten im SDS Gel je nach Phosphorylierungsstatus weit aus höher als anhand der Peptid-Sequenz berechnet. Neurofilamente sind obligat Heteropolymere bestehend aus NF-L mit je NF-M oder NF-H [20, 21]. Die Bildung der im Durchmesser 10nm dicken Neurofilamente erfolgt in 5 Phasen: die heteropolymeren Dimere lagern sich anti-parallel aneinander und bilden somit stabile Tetramere, zwei Tetramere wiederum bilden ein Protofilament und acht davon ergeben das finale Neurofilament mit seinen 10nm Durchmesser [16] (siehe Abb. 1.1).

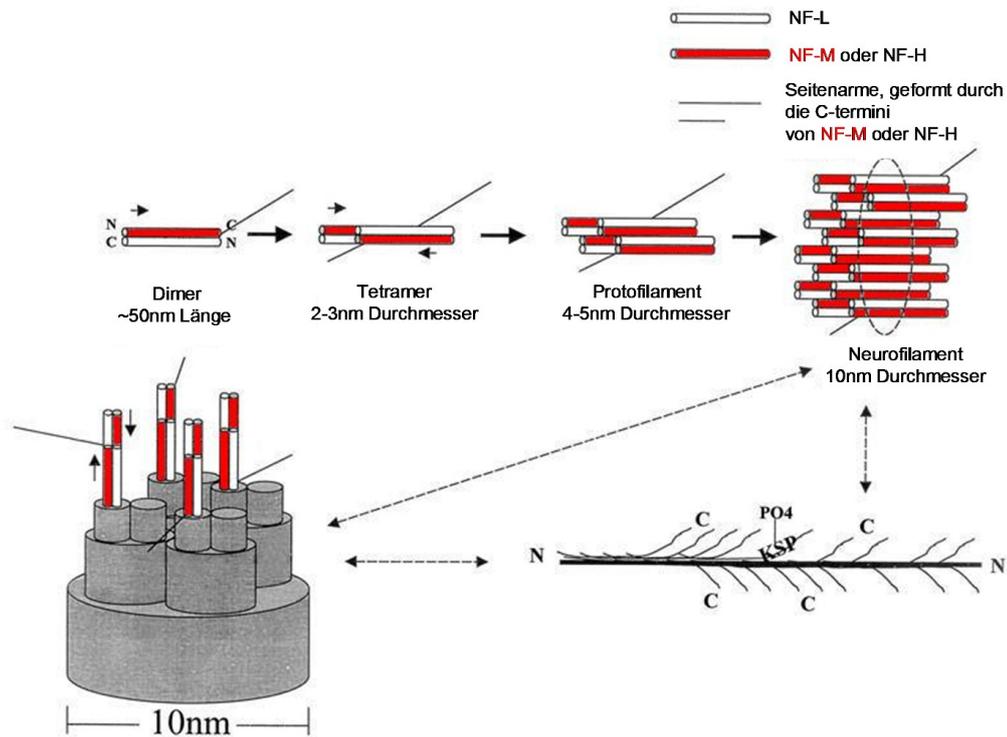


Abbildung 1.1: Schematisches Modell der Neurofilament Anordnung. Die Zusammenlagerung erfolgt über die Zwischenschritte der Heteropolymerbildung von NF-L mit NF-M oder NF-H, diese lagern sich zu Tetrameren und wiederum zu Protofibrillen zusammen. Der Querschnitt eines 10nm Neurofilaments besteht aus ~ 32 Molekülen. (Nach Liu *et al.* [16])

1.4 Transport

In den ersten Studien zum Transport von Neurofilament, mit radioaktiv markierten Molekülen, wurde eine Transportgeschwindigkeit von 0,25-3mm/Tag ermittelt [22, 23, 24]. Allerdings wäre dies langsamer als alle bekannten molekularen Transportmotoren [25]. Mit der Möglichkeit GFP-markierte Neurofilament Untereinheiten in Echtzeit zu beobachten, ergaben sich Geschwindigkeiten von $1\mu\text{m}$ in der Sekunde, was dem normalen schnellen Transport entspricht [13]. Dieser Transport erfolgt in anterograder und retrograder Richtung und ist unterbrochen durch lange Pausen [26, 27, 28]. Der eigentliche Neurofilament Transport findet in so genannten *bursts* statt, in 90% der Zeit liegen Neurofilamente stationär vor. Dies bedeutet, daß ein unterbrochener, bidirektionaler schneller Transport in der Gesamtheit als langsamer Transport interpretiert wird [16]. Daraus kann man ableiten, daß Neurofilamente durch konventionelle Motorproteine, aus der Familie der Dyneine [29, 30] und Kinesine [10, 31], transportiert werden. Es wurde gezeigt, daß Kinesin als Fracht Neurofilamente aus dem Perikaryon entlang der Axone in anterogra-

de Richtung transportiert, und daß Dynein für den retrograden Transport verantwortlich ist. Schlüsselereignisse in der Phosphorylierung der C-termini verringern die Affinität von Neurofilamenten zu Kinesin und erhöhen dagegen diese zu Dynein. Der Grad der Phosphorylierung korreliert umgekehrt mit der Geschwindigkeit des axonalen Transportes [29]. Weiterhin sind Neurofilamente Liganden für Myosin, diese Interaktion ist essentiell für einen korrekten Myosin Transport und die Verteilung der Neurofilamente im Axon. Der Transport von Neurofilamenten ist abhängig von der Vollständigkeit der Hauptbestandteile des Zytoskeletts, bestehend aus Aktin-Filamenten und Mikrotubuli mit ihren dazugehörigen Motorproteinen Kinesin, Dynein und Myosin. Da jeder dieser Motoren einen schnellen axonalen Transport anderer Bestandteile bedingt, unterstützt die Hypothese, daß ein einzelnes Motor-System mehrere Transportraten vermitteln kann, abhängig davon wie lange die Fracht an den Motor gekoppelt ist. Myosin Va bindet direkt an Kinesin, was die Möglichkeit offen lässt, daß Myosin Neurofilamente ebenso an Kinesin wie auch an Aktin bindet. Zusätzlich kann Myosin auch Mikrotubuli transportieren, wobei an diese Neurofilamente gekoppelt sein können [32] (siehe Abb. 3.7). Gebündelte Neurofilamente unterliegen einem langsameren Transport als einzelne Untereinheiten, wobei die Bündel eine höhere C-terminale Phosphorylierung aufweisen. Es wird angenommen, daß gebündelte Neurofilamente die Neurofilamente darstellen, welche von ihrem Motor-System gelöst sind und Neurofilament Interaktionen unterliegen, welche mit dem Transport konkurrieren [32].

Axonaler Neurofilament Transport

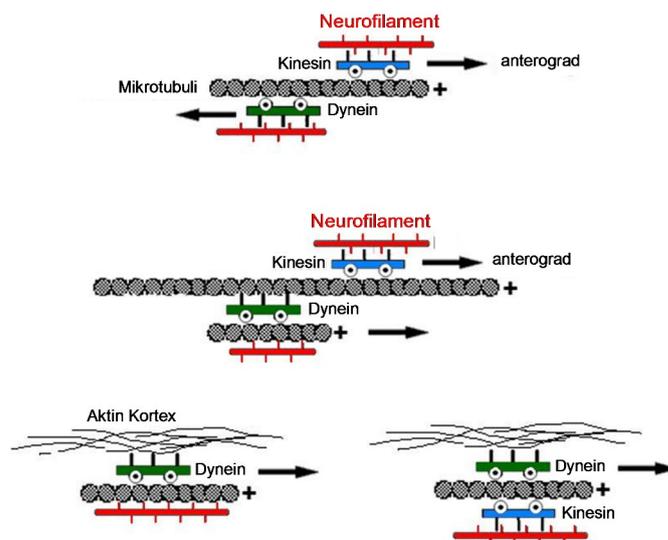


Abbildung 1.2: Model für den antero- und retrograden Transport von Neurofilamenten und/oder deren Untereinheiten. (Nach Jung *et al.* [32])

1.5 Post-translationelle Modifikationen

1.5.1 Glykosylierung

Insgesamt vier Glycosylierungsstellen konnten in den Neurofilament Untereinheiten identifiziert werden, Thr²¹ und Ser²⁷ bei NF-L und Thr⁴⁸ und Thr⁴³¹ bei NF-M. Die tryptischen Sequenzen, die diese Stellen umgeben sind innerhalb der Vertebraten hoch konserviert. Basierend auf der Primärsequenz dieser vier gefundenen Glycosylierungsstellen, gibt es zwei gemeinsame Eigenschaften. Zum einen umgibt ein Prolinrest diese Stelle und zum anderen wurde in allen Peptiden entweder direkt oder 2 Aminosäuren neben der Erkennungsstelle ein Valinrest gefunden [14]. Die Nähe und die dadurch entstehende Konkurrenz der Glycosylierungsstellen zu den Phosphorylierungsstellen in der *head*-Domäne, und die Relevanz der *head*-Domäne, deuten darauf hin, daß die Glykosylierung ebenfalls eine Rolle bei der korrekten Neurofilament Anordnung spielt [33, 34, 35]. Es wird angenommen, daß die Glycosylierung direkt nach der Synthese und noch vor der Neurofilament Anordnung im Perikaryon stattfindet [14] und später als Folge des Transports wieder entfernt wird. Durch das Ersetzen der Oligosaccharide durch Phosphate wird angenommen, daß sich die Interaktion der Neurofilament Untereinheiten verändert und zu einer dichteren Packung dieser führt, wie man sie in den Ranvier Schnürringen beobachten kann [16].

1.5.2 Phosphorylierung

Nahezu alle (>99%) der zusammen gelagerten Neurofilamente in myelinisierten internodal Regionen sind dafür bekannt, daß sie stöchiometrisch in der Lys-Ser-Pro (KSP) Domäne phosphoryliert sind. Im Gegensatz dazu, sind die KSP-Wiederholungen von Neurofilamenten in Zellkörper, Dendriten und den Ranvier Schnürringen weniger phosphoryliert. Die unphosphorylierte Neurofilamente stellen ca. 1% aller Neurofilamente in Neuronen dar [36, 37, 38]. Obwohl auch andere Ser/Thr Motive phosphoryliert werden, liegen die meisten Phosphorylierungsstellen in den KSP Domänen der *Tail*-Domänen von NF-M und NF-H. 33 von insgesamt 38 Phosphorylierungsstellen des NF-H C-terminus liegen in KSP-Wiederholungen [39]. Normalerweise unterliegen NF-M und NF-H einer post-translationellen Hyperphosphorylierung vor dem Eintritt ins Axon [40]. Die Phosphorylierung von NF-M erscheint im Embryo an Tag 13 (E13) im Maus Rückenmark. Die Konzentration an phosphoryliertem NF-M zeigt einen gerichteten Charakter im wachsenden Axon, ein proximal-distaler Gradient, mit der höchsten Expression im Axon und keine bis wenig Expression im Perikaryon und in den Dendriten [41, 42, 43, 44]. NF-M und NF-L Mengen erreichen adulte Werte an E15, wenn nur ein geringes Maß an phosphorylier-

tem und nicht-phosphoryliertem NF-H erstmals im Hirn und Rückenmark detektierbar ist [45]. Myelinisierung unterstützt die Neurofilament Phosphorylierung und das radiale Wachstum der Axone [37]. In vivo ist die Phosphorylierung der Neurofilamente ein langsamer Vorgang [46]. Eine Erklärung schließt den langsamen Transport und die dadurch verspätete Aktivierung der Kinasen ein. Wahrscheinlicher ist die Unzugänglichkeit der Phosphat Bindungsstellen, aufgrund einer „geschlossenen“ Konformation der zusammen gelagerten Polymere. Einer fortlaufende Phosphorylierung liegt zugrunde, daß eine „Öffnung“ der nächstliegenden Phosphorylierungsstelle erst erfolgt, nachdem die davor liegende modifiziert wurde [16] (siehe Abb. 1.3). Neurofilament Phosphorylierung spielt viele Rollen: es wird angenommen, daß die Hauptfunktion die Regulierung des radialen Wachstums des Axons ist. Eine erhebliche Phosphorylierung der KSP-Wiederholungen in den *Tail*-Domänen von NF-M und NF-H scheint vorwiegend in den Axonen statt zu finden [41, 47]. Diese Seitenarm-Bildung hat eine erhöhte Inter-Neurofilamentäre Ausweitung, radiales Wachstum und erhöhte Leitungsgeschwindigkeit zu Folge [48, 37, 47]. Weder NF-H noch seine phosphorylierte *Tail*-Domäne sind für den axonalen Durchmesser essentiell [49, 50], viel wichtiger dafür scheint NF-M zu sein. Phosphorylierung spielt auch eine kritische Rolle bei der Inhibierung der Zusammenlagerung der Neurofilamente im Perikaryon, was erklärt warum Neurofilamente nur in Axonen Filamente bildet [45, 41]. Die Phosphorylierung der N-terminalen *head*-Domäne durch die Protein-Kinase-A (PKA) an Ser⁵⁵ in NF-L oder Ser⁴⁶ in NF-M verhindert eine Zusammenlagerung der Neurofilament Untereinheiten zu einem Polymer in vitro und in vivo [51, 52, 53]. Demzufolge reguliert die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Ser⁵⁵ und Ser⁵⁷ in NF-L die Zusammenlagerung und den Abbau [54, 55]. Zusätzlich reguliert eine Phosphorylierung der *head*-Domäne von NF-M die Phosphorylierung der KSP-Wiederholungen in der *Tail*-Domäne [56]. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung der *head*-Domäne durch PKA die Erk 1/2 Kinasen Aktivität vermindert, welche die *Tail*-Domäne in vivo und in vitro phosphoryliert [57]. Vorübergehende Phosphorylierung der *head*-Domänen Motive von NF-L und NF-M durch PKA und PKC im Zellkörper verhindert die Neurofilament Zusammenlagerung und auch C-terminale Phosphorylierung im Perikaryon, und schützt somit Neurone vor einer abnormalen Akkumulierung phosphorylierter Neurofilamente im Zellkörper. Tatsächlich kann man nur wenige Neurofilamente im Zellkörper finden und nur kleine Oligomere sind detektierbar, was darauf hinweist, das die Neurofilament Zusammenlagerung auf Axone während dem Transport eingeschränkt ist [58]. Phosphorylierung von Neurofilamenten verlangsamt möglicherweise den Transport im Axon. Es wird angenommen, daß die stark phosphorylierte NF-H Untereinheit sich vom Transport-Carrier löst und im Axon für mehrere Monate verbleibt, während weniger phosphorylierte Untereinheiten langsam weiter transportiert werden könne [59, 60].

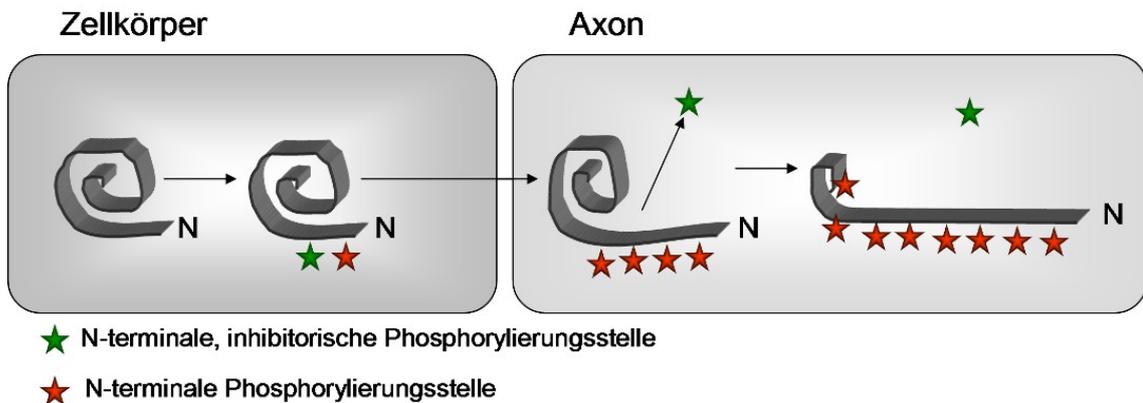


Abbildung 1.3: Modell für die regulatorischen Mechanismen der Phosphorylierung. N-terminale Phosphorylierung kann sowohl einen hemmenden als auch einen fördernden Effekt auf die C-terminale Phosphorylierung ausüben. (Nach Liu *et al.* [16])

1.6 Funktion

Als Bestandteil des Zytoskelett Systems sorgen Neurofilamente zusammen mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten, dafür die strukturelle Integrität, Zellform und Zell- und Organellen-Motilität zu verbessern. Die Hauptfunktion von Neurofilamenten ist die Kontrolle des axonalen Durchmessers, welcher im Verhältnis zu ihrem Phosphorylierungsgrad steht. Dies ist wichtig, da die Leitungsgeschwindigkeit eines Impulses entlang des Axons proportional zum Durchmesser ist. Neurofilamente sind besonders häufig in Neuronen mit großen Querschnitt der Axone ($>5\mu\text{m}$), z.B. bei peripheren Motorneuronen, die Skelettmuskeln kontrollieren, bei denen eine schnelle Impulsweiterleitung entscheidend ist [61, 62, 63]. Weitere Studien zeigen einen protektiven Effekt von Neurofilamenten bei neuronalem Überleben. Die Hypothese ist, daß Neurofilamente im Perikaryon die Toxizität von mutiertem SOD1 (Kupfer/Zink Superoxid Dismutase) verringern. Sie agieren durch absondern eines p25/Cdk5 Komplexes und als Phosphorylierungs-Falle für dysregulierte Kinase Aktivität [64, 65, 66, 67]. Die auffallendsten Charakteristika von NF-M und NF-H sind die vielen KSP-Wiederholungen in den C-termini [68]. Hyperphosphorylierung der KSP-Wiederholungen in den C-termini trägt zu einer Neurofilament Verbreiterung, durch ladungsabhängige Abstoßung bei [69], und verhindert eine Degradation durch Proteasen während der langen Lebensspanne dieser Proteine [70]. Es wurde gezeigt, daß die Lysin-Reste in KSP-Wiederholungen von Carbonylen, als Produkt oxidativen Stress verursachen können, und daß dies durch Phosphorylierung reguliert wird, so daß phosphoryliertes NF-H leichter HNE (Hydroxynonenal = Fett-Peroxidations-Aldehyd-Produkt) anzieht [71]. Eine selektive Absorption zeigt, daß die Lysin-Reste hauptsächlich die Reak-

tionsstellen für die HNE Anziehung sind (siehe Abb. 1.4). Neurofilamente sind das Hauptziel von erhöhten oxidativen Stressprodukten bei einer Verletzung des Rückenmarks [72]. Während der Lebensspanne von Neuronen, sind Neurofilamente, im besonderen NF-H, dazu fähig stressbezogene, toxische Produkte aufzunehmen um zelluläre Konzentrationen auszugleichen, bis sie an den Synapsen degradiert werden oder ihre Modifikationen im Zellkörper rückgängig gemacht werden. Neurofilamente als Hauptbestandteil von Neuronen können somit als Falle für toxische Carbonyle, wie z. B. HNE dienen. Die Bildung von NF-H-HNE Komplexen könnte ein protektiver Mechanismus im Neuron sein, reguliert durch Dephosphorylierung/Phosphorylierung, welche dazu dient plötzliche Spitzen an toxischen Carbonylen abzufuffern.

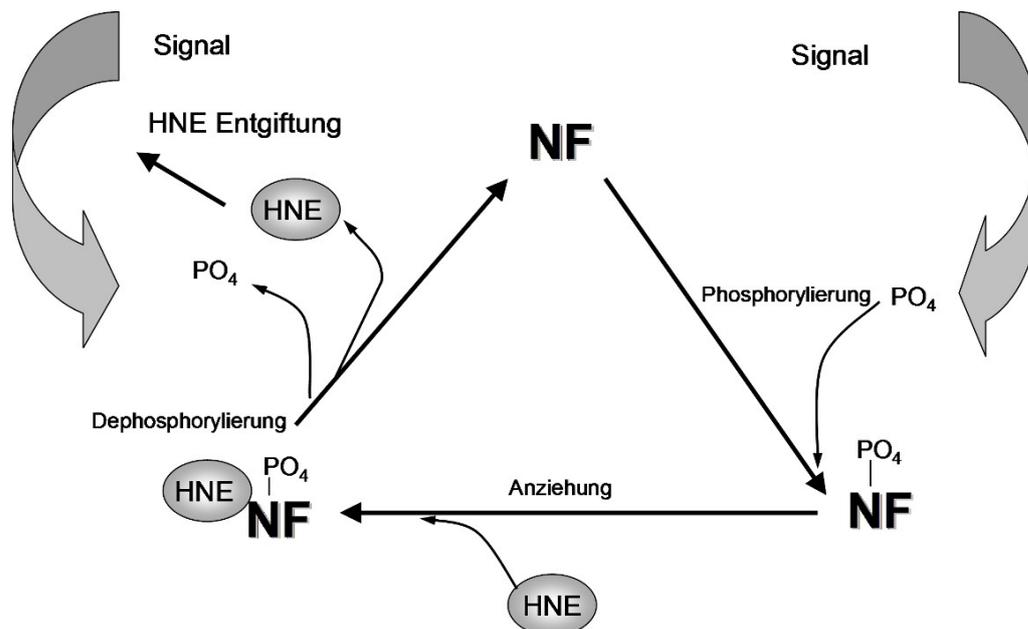


Abbildung 1.4: Möglicher protektiver Effekt einer Phosphorylierungs-abhängigen HNE Modifikation von Neurofilament Proteinen. (Nach Liu *et al.* [16])

1.7 Degradation

Viele Neurone erstrecken ihre Axone über große Distanzen, bis zu einem Meter im Menschen, um Synapsen mit geeigneten Rezeptor-Zellen zu bilden. Während des Transports kann kein Abbau der Neurofilament Proteine detektiert werden [73]. Es wird angenommen, daß der Neurofilament-Abbau nur an den Synapsen stattfindet [74], durch eine vorausgegangene Dephosphorylierung der Neurofilamente durch die Protein Phosphatase 2A (PP2A). Was zeigt, daß Phosphorylierung eine protektive Funktion hat um Neurofilamente vor Abbau zu schützen [70]. Am Axonende beträgt die durchschnittliche Verweildauer der Neurofilament Proteine ca. 2 Tage [75]. Der Abbau und Umsatz an Neurofilament Proteinen könnte als Aktivierung der Proteasen am Axonende ausgewiesen werden [76, 77]. Es wäre möglich, daß eine Wiederverwertung der Neurofilament Abbauprodukte einen wichtigen Feedback Mechanismus darstellt, der die Synthese reguliert. Die Lebensspanne von Neurofilamenten wird auf 1-2 Jahre berechnet, basierend auf der Transportzeit durch den humanen Ischiasnerv mit einer Transportgeschwindigkeit von ca. 1-2mm/Tag [40].

1.7.1 Ubiquitinierung

Der Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) ist der wichtigste und effektivste zelluläre Abbauweg für kurzlebige, fehlgefaltete, geschädigte oder mutierte Proteine [78]. Proteasomen sind zylinderförmige Multiprotein Komplexe, die sowohl nicht-ubiquitinierte (20S-Proteasom) als auch ubiquitinierte (26S-Proteasom) Proteine degradieren können. Die meisten Proteine werden für die proteasomale Degradation markiert indem Ubiquitin kovalent angeheftet wird. Ketten von vier oder mehr Ubiquitin-Molekülen scheinen als Erkennungssequenz für das 26S-Proteasom zu dienen [79, 80] (siehe Abb. 1.5). Das Ubiquitin-Proteasomen-System ist weitaus effizienter als die basale Menge an Makroautophagy. Proteine, die Zugang zu beiden Degradationswegen haben bevorzugen das UPS [81]. Eine verminderte Proteasomen-Signalweg-Aktivität ist eine Eigenschaft von vielen Zellkultur-Modellen, bei welchen intrazelluläre Aggregate gebildet werden. Man geht davon aus, daß normale Neurofilament Proteine über das Proteasom abgebaut werden. Es gibt Hinweise darauf, daß die Ubiquitinierung von der Phosphorylierung abhängig ist, und somit von der Konformation der Neurofilament Proteine. Weiterhin wurde gezeigt, daß an Neurofilament nur wenige Ubiquitin-Moleküle angehängt sind, was durch eine nur geringe Größenveränderung nach der Deubiquitinierung deutlich gemacht wurde [82].

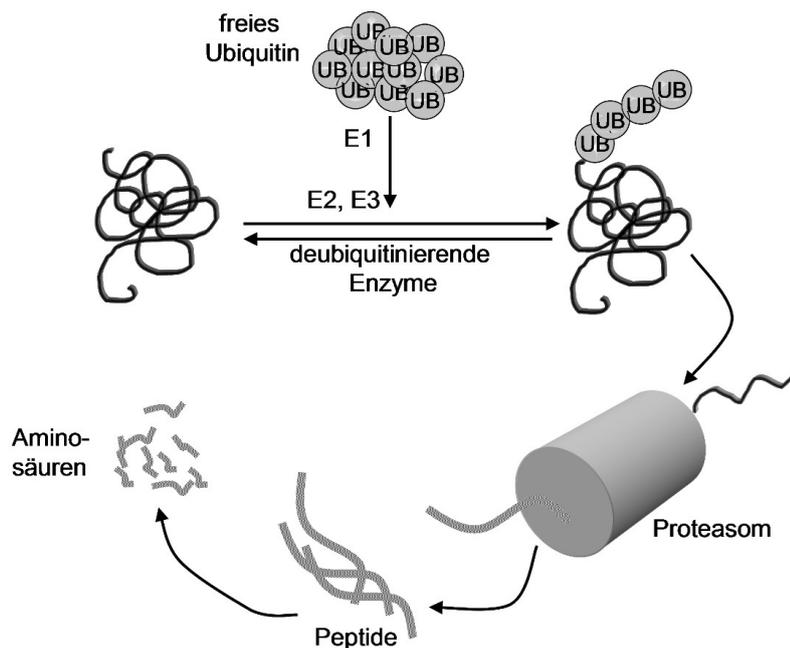


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des UPS. Nach einer kovalenten Bindung von Ubiquitin an das abzubauen Protein, wird dieser Komplex zum Proteasom transportiert. Dort werden sie zu Peptiden abgebaut. (Nach Rubinsztein *et al.* [81])

1.7.2 Autophagie

Säugetier-Lysosomen sind in der Lage Protein-Komplexe und Organellen zu degradieren. Die Gesamtdegradierung von zytoplasmatischen Proteinen und Organellen wird durch Makroautophagie vermittelt, ein Prozess der auch als Autophagie bezeichnet wird [83]. Dieser beinhaltet die Bildung von Doppelmembran Strukturen, die Autophagosomen oder autophagische Vakuolen genannt werden. Diese verbinden sich mit Lysosomen und formen somit Autophagolysosomen, deren Inhalt durch saure lysosomale Hydrolasen degradiert wird (siehe Abb. 1.6). Verschiedene Proteine, wie zum Beispiel Kinasen regulieren die Makroautophagie. Polyglutaminverlängerungs-Mutationen, wie z.B. in Huntingtin und Ataxie 3, veränderte Formen von α -Synuclein und verschiedenen Formen von Tau hängen bei ihrer *clearance* sehr vom Signalweg der Autophagy ab [84, 85, 86]. Eine Inhibition der Makroautophagie durch Gen Knockout bei ansonsten gesunden Mäusen führt zu der Bildung ubiquitiniertes Aggregate in verschiedenen Geweben [87]. Eine Autophagie Blockade, z.B. durch Gen Knockout, hat nachteilige Auswirkungen auf eine Vielzahl von Systemen. Es verhindert eine ausreichende Nährstoffverwertung durch Makromoleküle unter Nahrungsentzug [88], erhöht die Anfälligkeit für verschiedene Arten der Apoptose [89, 90] und führt zu der Bildung von ubiquitinierten Aggregaten. Das Ausschalten spe-

zifischer Autophagie-Genen führt zu einer frühen neonatalen Sterblichkeit [87, 88]. Mäuse mit neuronal begrenzten Autophagie-Gen Knockouts entwickeln intraneuronale Aggregate und Neurodegeneration [91, 92].

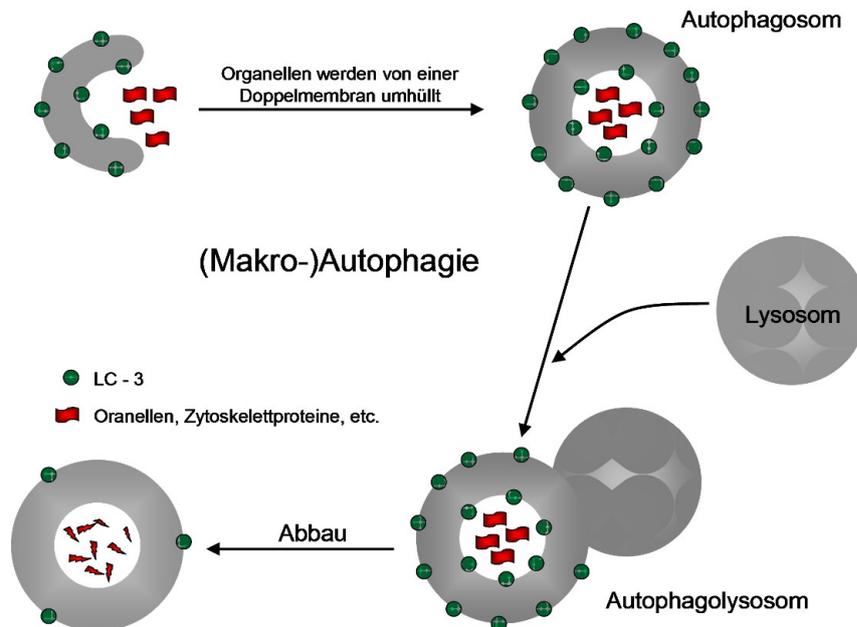


Abbildung 1.6: Durch die Bildung von Autophagosomen und deren Verschmelzung mit Lysosomen, entstehen Autophagolysosomen. Deren Inhalt wird durch saure Hydrolasen degradiert. (Nach Rubinsztein *et al.* [81])

1.7.3 Calpain Degradation

Der Zerfall von Neurofilament Proteinen unter pathologischen Bedingungen ist ausgewiesen durch die Präsenz von Calcium-aktivierten Proteasen (Calpaine) im Axoplasma [77, 76]. Calpaine können viele verschiedene Proteine degradieren, darunter auch wichtige axonale Cytoskelettproteine wie Spectrin, Mikrotubuli-assoziiertes Protein-1 (MAP1), Tau, Tubulin und Neurofilamente [93]. Calpaine sind im ZNS als auch im PNS gegenwärtig und ubiquitär in allen Zellen und Geweben. Es gibt 2 Isoformen, μ Calpain und mCalpain, welchen von μ M und mM Konzentration an Calcium aktiviert werden [94]. Die Calcium-aktivierte neutrale Protease Calpain degradiert Neurofilament Proteine *in vitro* und *in vivo* [95]. Im Gegensatz zu vielen Proteasen, wird die Calpain Spezifität durch die Konformation, sowie durch primäre Peptidsequenzen bestimmt, und katalysiert nur einen limitierten Abbau seiner Substrate. Die limitierte Proteolyse durch Calpain generiert möglicherweise eine Mikroheterogenität und reguliert somit die Neurofilament Struktur und Funktion [74]. Calpain reguliert weiterhin den Umsatz von Neurofilamenten

am Axonende. NF-H wird in Abbauprodukte von 120kD und 146kD aufgespalten. NF-M zu 136, 132, 94 und 82kD [96, 97]. Calpain ist eine Cystein Protease, welche Calcium-abhängig ist. Calpain erkennt bestimmte strukturelle Eigenschaften seiner Substrate bevor sie gespalten werden. Es gibt die Hypothese nach der diese Erkennungssequenzen Regionen sind, die reich an Prolin, Glutamatsäure, Aspartatsäure, Serin und Threonin, die so genannte PEST-Region, sind. Diese zwei Bedingungen für die Calpain Proteolyse- eine Erkennungssequenz und eine anfällige Abbaustelle dicht nebeneinander- erklärt möglicherweise warum Calpain nur einen limitierten Abbau seiner Substrate katalysiert. Serin und Threonin Reste innerhalb der PEST-Region sind potentielle Phosphat-Akzeptoren. Phosphorylierung in der PEST-Region unterbricht die Interaktion der Substrate mit Calpain [98, 99].

1.8 Tiermodelle für Neurofilament Untereinheiten

Viele Tiermodelle haben zur Erforschung der Neurofilament Untereinheiten beigetragen. Das erste Modell ist eine japanische Wachtel, die 1991 entdeckt wurde [100], sie hat eine spontane Mutation der NF-L Aminosäure 114, eine nonsens Mutation, die zu einer verkürzten Version des Proteins mit nur 113 Aminosäuren anstatt 556 führt, die unfähig dazu ist Neurofilamente zu formen [61]. Homozygote Mutanten besitzen keine axonalen Neurofilamente und zeigen mildes Zittern. In diesen Tieren ist das radiale Wachstum der myelinisierten Axone sehr vermindert, was zu einer Reduktion der Leitungsgeschwindigkeit führt [62]. Weitere Tiermodelle zu den verschiedenen Neurofilament Untereinheiten wurden generiert und analysiert.

1.8.1 NF-L Knockout Mäuse

Die gerichtete Unterbrechung des NF-L Gens in Mäusen hat die Wichtigkeit von NF-L bei der Zusammenlagerung von Neurofilamente bestätigt [101]. NF-L Knockout Mäuse haben keinen offenkundigen Phänotypen. In der Abwesenheit von NF-L, sind die Mengen von NF-M und NF-H dramatisch reduziert, bis auf ca. 5% vom normalen Niveau, und nicht dazu fähig die typischen 10nm Filamente auszubilden. Diese Mäuse haben einen Mangel an Intermediärfilament-Strukturen, schwere axonale Hypotrophy und keine großen myelinisierten Axone. Die Menge von anderen Zytoskelett Proteinen, wie Tubulin, sind als möglicher kompensatorischer Effekt stark erhöht. Während die NF-L Knockout Mäuse einen definitiven Beweis dafür darstellen, daß NF-L ein bestimmender Faktor für den axonalen Durchmesser ist, und daß NF-L für die Formation von Neurofilamenten benötigt wird, bleibt immer noch die Rolle von NF-M und NF-H unklar. Das verminderte

Niveau von NF-M und NF-H in NF-L^{-/-} Mäusen ist möglicherweise das Ergebnis eines gesteigerten proteolytischen Abbaus, der nicht zusammengelagerten und unorganisierten Neurofilament Proteine in Abwesenheit von NF-L [65, 102].

1.8.2 NF-H Knockout Mäuse

Mehrere Labore haben eine Charakterisierung von NF-H Null Mäusen beschrieben [50, 103, 101]. Überraschenderweise hat die Abwesenheit von NF-H kaum einen Effekt; die Neurofilament Anzahl und der Durchmesser von Axonen während der Entwicklung waren normal. In C57Bl6 Mäusen wurde eine minimale Reduktion der Durchmesser der myelinisierten Axone in der ventralen Wurzel beobachtet, wahrscheinlich sind diese minimalen Veränderungen durch eine erhöhte Konzentration an NF-M Protein und Phosphorylierung begründet. Die Mikrotubuli erhöhten sich zweifach, mit nur einer leichten Verringerung der Aktin Menge. NF-H Knockout Mäuse im 129J Stamm, zeigten eine stärker betonte Reduktion der Axondurchmesser [104]. Allerdings wurden nur kleine Unterschiede in den Konzentrationen an NF-M und NF-L beschrieben. Diese Unterschiede kann man den verschiedenen genetischen Hintergründen der Mausstämme zuschreiben. In jedem Fall zeigen die gesamten Ergebnisse, daß NF-H nur einen geringen Effekt auf das radiale Wachstum von Axonen hat und möglicherweise ein Schlüsselfaktor für Interaktionen mit Mikrotubuli oder Mikrofilamenten ist.

1.8.3 NF-M Knockout Mäuse

Eine klarere Aussage kommt von Studien mit NF-M Knockout Mäusen. Zwei unabhängige Studien haben gezeigt, daß ein Ausschalten von NF-M schwerere Effekte als NF-H auf das radiale Wachstum von myelinisierten Axonen hat [105, 106]. Die Abwesenheit von NF-M hat keine phänotypischen Auswirkungen bei Mäusen, hat allerdings ursächlich eine erhöhte NF-H Konzentration und dessen Phosphorylierung zur Folge. Verglichen mit NF-H^{-/-} Mäusen zeigen NF-M^{-/-} Mäuse das NF-M für den axonalen Durchmesser wichtiger ist.

1.8.4 NF-M/H Knockout Mäuse

Doppel-Knockout Mäusen denen sowohl NF-M, als auch NF-H fehlt, zeigen eine Paralyse der hinteren Gliedmaßen [106]. Die Abwesenheit von NF-M/H verursacht eine Absonderung von NF-L Proteinen ins neuronale Perikaryon, keine Neurofilament Bildung im Axon, einen zweifachen Anstieg an Mikrotubuli und einen Verlust von 24% der Axone der Vorderhorn-Neurone [107]. Die Analyse von NF-M^{-/-}, NF-H^{-/-} doppel-Knockout

Mäusen zeigt deutlich, daß die zwei hochmolekularen Untereinheiten *in vivo* für ein Zusammenlagern der Neurofilamente und ein normales axonales Wachstum benötigt werden.

1.8.5 NF-L Transgene Mäuse

Studien an transgenen Mäusen, die Maus-NF-L vierfach überexprimieren zeigen eine auffällige ALS-ähnliche Pathologie. Die meisten dieser Mäuse sterben innerhalb der ersten drei Lebenswochen mit nur 1/3 bis 1/2 des normalen Körpergewichts [108]. Die einzigen zwei Mäuse, die die ersten drei Wochen überlebt haben, erholten sich langsam bis zu einem Normalzustand innerhalb der nächsten neun Monate. Die transgenen Mäuse zeigten eine intensive Neurofilament Aggregation in allen Kompartimenten des Neurons mit einer Verringerung des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER), Neurodegeneration in dorsalen und ventralen Wurzeln, phosphoryliertes NF-H im Zellkörper und schwere Muskelatrophie, was einer human ALS Pathologie ähnelt.

1.8.6 NF-M Transgene Mäuse

NF-M transgene Mäusen erscheinen normal [34]. Mit einem zweifachen Anstieg an NF-M (WT + Transgen), wurde eine Anreicherung von Neurofilamenten im Zellkörper und Axonen detektiert. Der Durchmesser von Neuronen verringerte sich um 50% ohne eine Veränderung der NF-L Konzentration und einer Verringerung um 50% der WT NF-M und WT NF-H Konzentration. Die Durchmesser Reduktion ist eher ein Ergebnis der Wachstumsretardierung als einer gesamten Wachstums Inhibition, welche wieder hergestellt wird mit der Zeit und mit einer Reduktion von NF-M und NF-H korreliert. Es konnte keine Neurodegeneration festgestellt werden.

1.8.7 NF-H Transgene Mäuse

1.2- 4.5fache Überexpression von WT NF-H in transgenen Mäuse zeigte keinen auffälligen Phänotypen oder Neuronenverlust [109, 19]. Die Menge an NF-M in Axonen ist korrelativ vermindert mit erhöhter NF-H Expression, und die NF-L Konzentration verminderte sich um 20%-40% in Axonen. Eine Reduktion des axonalen Durchmessers korrelierte mit der Konzentration an NF-H Überexpression und eine mehr als dreifache Überexpression verhinderte ein axonales Wachstum vollständig. Die Durchmesser Reduktion kann im direkten Zusammenhang mit der Menge an NF-M oder der Gesamtzahl an Neurofilamente gesehen werden.

In allen Studien zeigten nur Tiere, die entweder eine mehr als dreifache Überexpressi-

on von NF-L, oder NF-M/H Knockout waren, einen schweren Phänotypen. Zusammengefasst erklären alle diese Studien die Funktionen der NF Untereinheiten: NF-L ist für die Neurofilament Anordnung verantwortlich, und NF-M/H Untereinheiten werden für die Zusammenlagerung *in vivo* benötigt; NF-M ist entscheidender für das axonale Wachstum als NF-H, wobei NF-H der Schlüsselfaktor für die Neurofilament Interaktion mit anderen Cytoskelett Polymeren ist. Die Expression von NF-M und NF-H wird in umgekehrter Weise in Motorneuronen ko-reguliert, und sie konkurrieren beim Transport und der Zusammenlagerung mit NF-L.

1.9 Neurofilament und Neurodegeneration

Abnormale Anreicherungen an Neurofilamenten kann man in vielen neurodegenerativen Erkrankungen beobachten, wie z.B. bei amyotrophischer Lateralsklerose (ALS), Alzheimer Erkrankung (AD), Demenz mit Lewy Körpern, Parkinson und Diabetes. Viele Veränderungen können zu einer Neurofilament Anreicherung führen, z.B. Dysregulierung der Synthese, defekter axonaler Transport, abnormale Phosphorylierung oder Proteolyse. Es ist eine weitläufige Annahme, daß Neurofilament- Abnormalitäten in neurodegenerativen Erkrankungen ein Kennzeichen für neuronale Dysfunktion ist.

1.9.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

ALS ist eine Motorneuron-Erkrankung, die 1869 zum ersten Mal von dem französischen Neurologen Jean-Martin Charcot beschrieben wurde. Mit einem typischen Beginn im Alter von 40-60 Jahren. Das Risiko von Männern daran zu erkranken ist ca. 1.5mal erhöht gegenüber Frauen. ALS ist üblicherweise innerhalb der nächsten 5 Jahre nach der Diagnose tödlich. Es ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, welche die Motorneuronen im Hirn und Rückenmark angreift. Die progressive Degeneration der Motorneuronen bei ALS führt letztendlich zu einem Absterben der Neurone und den dazugehörigen Muskelbewegungen. ALS Patienten sind teilweise oder komplett paralysiert, wobei die kognitiven Fähigkeiten nicht eingeschränkt sind. Ein markantes Kennzeichen für ALS sind intraneuronale Aggregate von Neurofilament Proteinen in degenerierten Motorneuronen. Obwohl der Grund für die Aggregation der Neurofilamente [110, 111, 112] noch nicht geklärt ist, zeigen Tiermodelle, die eine der Neurofilament Untereinheiten überexprimieren, Motorneuropathien in Anwesenheit von abnormaler Neurofilament Anreicherungen, ähnlich derer in ALS [108]. Bemerkenswerterweise wird die Motorneuropathie in transgenen Mäusen mit überexprimierenden humanem NF-H, durch ein Wiederherstellen einer korrekten Stöchiometrie von NF-L zu NF-H durch die Ko-Expression von humanem NF-L,

gerettet [113]. Es wird angenommen, daß solche Änderungen in der Neurofilament Homöostase direkt relevant für die Pathogenese bei ALS ist [65]. Interessanterweise sind Neurofilament-Einschlüsse häufig mit einer Verringerung der NF-L mRNA Konzentration assoziiert. NF-L mRNA ist bis zu 70% selektiv reduziert in degenerativen Neuronen bei ALS und der Alzheimer Krankheit [114, 115]. Eine Verminderung der NF-L mRNA Konzentration erscheint mit einer Verminderung der α -Internexin oder Peripherin mRNA Menge, was eine absolute Änderung der Stöchiometrie der Neurofilament Expression in ALS zeigt [116].

1.9.2 Alzheimer Krankheit (AK)

Die Alzheimer Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung des ZNS. Sie wurde erstmal 1906 von Alois Alzheimer beschrieben. Das Risiko an Alzheimer zu erkranken variiert zwischen 12% und 19% bei Frauen über 65 Jahre und zwischen 6% bis 10% bei Männern [117]. Im Durchschnitt leben die Patienten noch 8 Jahre nach der Diagnose, obwohl die Erkrankung auch bis zu 20 Jahre dauern kann. Als erstes sind die Hirnregionen betroffen, die für das Gedächtnis und für die Denkfähigkeit zuständig sind. Schreitet die Krankheit fort sterben allerdings auch Zellen anderer Hirnregionen ab. Sofern der Patient keine weiteren schweren Erkrankungen hat, führt der Verlust der Hirnfunktion zum Tod. Als Ursache wurden viele Hypothesen aufgestellt wie z.B. die Amyloid- β -Kaskade [118], Tauopathien [119], Entzündungen [120, 121] und oxidativer Stress [122, 123, 124, 125, 126]. Die Zytoskelett Zersetzung ist eine wichtige Eigenschaft und ein sekundäres Ereignis, als Folge von oxidativer Schädigung [127]. Alzheimer-Degenerationsfibrillen (*neurofibrillary tangles*, NFT) als Kennzeichen für die AK sind aus abnormal modifiziertem τ , Neurofilamenten und anderen Zytoskelettproteinen zusammengesetzt. Bei der AK ist die unphysiologische Phosphorylierung von Proteinen wie τ und Neurofilament Proteinen von Bedeutung, was durch eine Störung der Balance zwischen Phosphatasen- und Kinasen-Aktivität verursacht wird [128]. MAP Kinase [129], GSK-3 [130] und CDK5 [131, 132] Signalwege sind bekannt dafür, τ und Neurofilament Untereinheiten zu phosphorylieren. Eine der ersten Veränderungen, welche bei der AK erkannt werden ist die Anreicherung von hyperphosphoryliertem τ und Neurofilament im normalen Perikaryon. Diese abnormale Hyperphosphorylierung kann die Protein Aggregation in NFT's, bei den von Alzheimer Patienten betroffenen Neuronen, verursachen. Mutationen in den Neurofilament Untereinheiten konnten allerdings bis jetzt noch nicht bei AK-Patienten nachgewiesen werden. Bisher konnten Mutationen in verschiedenen Genen, *PSEN1* [133, 134, 135], *PSEN2* [136], *TAU* [137, 138], *APP* [139] und *APOE* [140, 141] bei AK-Patienten identifiziert werden. Alle diese Proteine sind auch in den NFT's nachweisbar.

1.9.3 Charcot-Marie-Tooth (CMT)

Charcot-Marie-Tooth ist die am häufigsten vorkommende vererbte neurologische Erkrankung. CMT wurde 1886 von den drei Ärzten Jean-Marie Charcot, Pierre Marie und Howard Henry Tooth beschrieben. CMT betrifft Motoneuronen und die sensorischen Neurone zu den Muskeln. Patienten verlieren langsam den normalen Gebrauch ihrer Hände/Arme bzw. Füße/Beine, in Korrelation zur Degeneration der Neuronen, welche zu den Extremitäten führen. Die Fähigkeit warm von kalt zu unterscheiden, verringert sich ebenso, wie der Tastsinn. Es gibt mehrere verschiedene Typen von CMT wobei eine Unterscheidung in Typ 1, 2 oder 3 am gebräuchlichsten ist. CMT wird normalerweise autosomal dominant vererbt. Mehrere Familien wurden identifiziert, bei welchen eine heterozygote Mutation im *NF-L* Gen mit CMT2 assoziiert ist. Die erste dieser Mutationen ist ein Austausch von Prolin zu Glutamin an Position 8. Die zweite Mutation ist ein Austausch von Leucin zu Prolin an Position 333 in der hoch konservierten *Rod*-Domäne. Diese Mutationen unterbrechen eine Neurofilament Anordnung und den Transport, und bedingen somit eventuell dem Krankheitsmechanismus. Eine weitere Mutation (C64T) wurde in einer großen slowenischen Familie als Ursache der Krankheit identifiziert [142]. Diese Mutation führt zu einem Austausch von Prolin zu Serin an Position 22, und zeigt eine vollständige Co-Segregation in der Familie mit der CMT2 Erkrankung. Manche CMT Typen werden durch Defekte in Proteinen aus den Schwann Zellen verursacht, wie z. B. das Connexin32 Gen. Solche Mutationen resultieren in einer veränderten Myelinisierung und Phosphorylierung der Neurofilament Proteine. In solchen Fällen erscheint die Abnormalität der Neurofilament Phosphorylierung abwärts des primären pathologischen Prozesses, aber immer noch vor dem Endpunkt.

1.10 Neurofilament und die Parkinson Erkrankung

1.10.1 Die Parkinson-Krankheit (PK)

Die Parkinson-Krankheit wurde erstmals 1817 von dem englischen Arzt James Parkinson (1755-1824) in seinem Aufsatz „*An Essay on the Shaking Palsy*“ beschrieben, damals war die Erkrankung noch unter dem Namen „Schüttellähmung“ bekannt. Bei der PK, welche auch als idiopathisches Parkinson-Syndrom oder *Morbus Parkinson* bezeichnet wird, handelt es sich um eine progressive Erkrankung des ZNS. Zu den bei der PK am auffälligsten Symptomen gehören: die Verlangsamung der Bewegung bis hin zur Bewegungsunfähigkeit (*Bradykinese, Akinese*), ein Zittern im Ruhezustand (*Ruhe-Tremor*), eine Erhöhung des Muskeltonus (*Rigor*) und reduzierte Stellreflexe (posturale Instabilität).

Die PK stellt neben der Alzheimer Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Er-

krankung dar, wobei etwa 0,1% der deutschen Gesamtbevölkerung daran erkrankt. Die Wahrscheinlichkeit daran zu erkranken steigt zwischen dem 55. und dem 75. Lebensjahr von 1,4% auf 3,4%. Die Mehrzahl der Fälle wird als sporadisch angesehen, wobei bei ca. 10% der Fälle eine positive Familienanamnese für eine genetische Ursache spricht. Pathologisch auffällig bei der PK ist ein Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) im Mittelhirn. Weitere Kennzeichen sind sogenannte Lewy-Körper (LK) in Neuronen sowohl in der *Substantia nigra* als auch in anderen Hirnregionen. Lewy-Körper wurden erstmals 1912 beschrieben, bei ihnen handelt es sich um proteinhaltige, zytoplasmatische Einschlüsse in Nervenzellen. Histologisch werden diese LK durch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung detektierbar mit einem deutlichen dichten eosinophilen Kernbereich und einem hellen Randbereich. Bei Parkinson-Patienten findet man diese Einschlüsse hauptsächlich in der SNpc und im *Locus coeruleus*. Als Ursache der Parkinson typischen Symptomatik ist das Absterben der dopaminergen Neurone in der SNpc und im *Striatum* beschrieben. Daraus entsteht ein Mangel an Dopamin (DA) in den betroffenen Hirnregionen. Als Therapie wird den Betroffenen L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin), eine Vorläufersubstanz von Dopamin, verabreicht. Allerdings ist diese Therapie nur symptomatisch und kann ein Fortschreiten der Erkrankung nicht aufhalten. Die Ursache für die Erkrankung ist noch nicht geklärt und es gibt viele unterschiedliche Faktoren, die sowohl alleine als auch in Kombination Auslöser sein können. So stehen z.B. Umweltgifte in der Diskussion, wie beispielsweise Herbizide (Paraquat) und Insektizide (Rotenon). Auch das aus der synthetischen Drogenherstellung abfallende Nebenprodukt MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) führt bei der Aufnahme der dadurch verunreinigten Drogen zu einer schweren Parkinson-ähnlichen Symptomatik. Alle diese Gifte wirken in den Mitochondrien als ein Hemmer des Komplex I der Atmungskette. Als alleinige Ursache für die PK sind diese Substanzen allerdings fraglich, da sie sehr instabil sind oder nur unzureichend die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Es konnte bis jetzt auch keine dieser Substanzen im Gehirn von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden.

Dysfunktionen der Mitochondrien werden ebenfalls mit Parkinson in Verbindung gebracht. Es wurden oxidative Schädigungen in Gehirnen von Parkinson-Patienten nachgewiesen. Gründe hierfür könnten Defekte der Mitochondrien oder Mutationen in deren Genom sein. Direkte Schädigungen des mitochondrialen Genoms konnten bis jetzt nicht identifiziert werden, allerdings wurde bei einer familiären Form des Parkinson Syndroms eine Mutation im *PINK1*-Gens identifiziert. Dieses kodiert für das mitochondrial lokalisierte Protein *PTEN-induced putative kinase 1*. Bei weiteren genetischen Untersuchungen bei Familien, in denen Parkinson entweder autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt wird, konnten bis jetzt insgesamt 13 Loci, mit der Erkrankung in Verbindung ge-

bracht werden (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Gene und Loci bei familiären Formen des PS

Lokus	Gen	Lokalisation	Vererbungsmodus
PARK1	α -Synuclein	4q21-23	autosomal dominant
PARK2	Parkin	6q25.2-27	autosomal-rezessiv
PARK3	unbekannt	2p13	autosomal-dominant
PARK4	α -Synuclein	4p15	autosomal-dominant
PARK5	UCH-L1	4p14	autosomal-dominant
PARK6	PINK1	1p35-p36	autosomal-rezessiv
PARK7	DJ-1	1p36	autosomal-rezessiv
PARK8	LRRK2	12p11.2-q13.1	autosomal-dominant
PARK9	unbekannt	1p36	autosomal-rezessiv
PARK10	unbekannt	1q12-q23	autosomal-dominant
PARK11	unbekannt	1q36-q37	?
PARK12	unbekannt	Xq21-q25	?
PARK13	HTRA2 / OMI	2q12	autosomal-dominant

1.10.2 Neurofilament in Zusammenhang mit Parkinson

Es ist bekannt, daß Neurofilamente ein Hauptbestandteil von Lewy-Körpern sind. Epitope aller drei Untereinheiten konnten in immunhistochemischen Analysen in LK identifiziert werden. Aufgrund dieser Tatsache wurden bei genetischen Untersuchungen bei Parkinson-Patienten assoziierte Mutationen im *Neurofilament-M* Gen gefunden [143, 144]. Die identifizierten Mutationen zeichnen sich dadurch aus, daß sie in hochkonservierten Regionen liegen. Die 2002 von Lavedan und Kollegen publizierte Mutation G336S [145] wurde bei einer französisch-kanadischen Patientin identifiziert. Die Patientin entwickelte bereits im Alter von 16 Jahren erste Parkinson Symptome, wie zum Beispiel Tremor. In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß diese Mutation mit Parkinson assoziiert ist, allerdings mit einer reduzierten Penetranz von 25%. Betroffen von der Mutation ist die *Rod*-Domäne in einer hochkonservierten Sequenz unter verschiedenen Spezies und verschiedenen Intermediärfilamenten (Internexin, Vimentin und GFAP). 2003 wurden von Krüger und Kollegen [143] zwei weitere Parkinson assoziierte Mutationen publiziert. Eine Punktmutation, welche zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Glutamin an der Position 725 (Pro725Glu) führt, konnte bei einem sporadischen Patienten mit einem Erkrankungsalter von 51 Jahren detektiert werden. Ein 3bp umfassende Deletion konnte bei

einem Patienten mit positiver Familienanamnese ausfindig gemacht werden. Diese Deletion führt zu einer Deletion von Valin an der Position 829 (del829Val). Obwohl diese Mutation nicht innerhalb der betroffenen Familienmitglieder Ko-segregierte konnte sie auch nicht in 754 Kontrollen identifiziert werden. Beide gefundenen Mutation befinden sich in der *tail*-Domäne, in einer unter verschiedenen Spezies hochkonservierten Sequenz. Es gibt verschiedene Ansätze, welche Mechanismen bei Mutationen zu einer Involvierung, in die bisher bekannten Pathomechanismen bei der Parkinson Krankheit eine Rolle spielen.

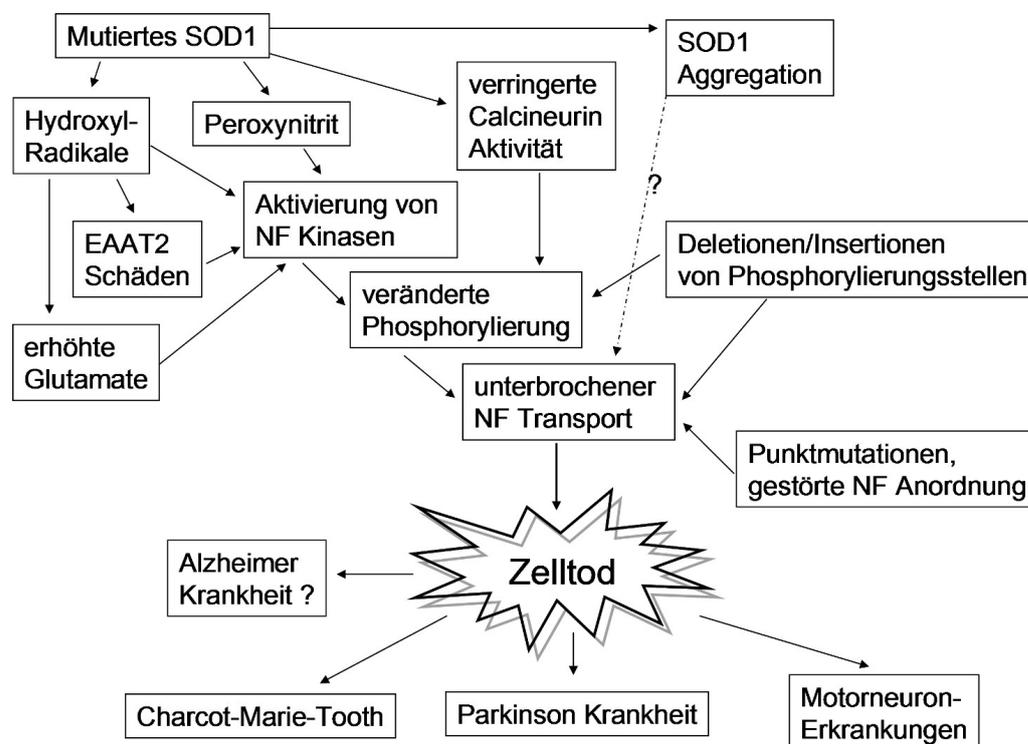


Abbildung 1.7: Neurofilament in Zusammenhang mit Neurodegeneration. (Nach Al-Chalabi *et al.* [13])

1.11 Ziele der Arbeit

Nachdem bereits neurodegenerative Erkrankungen wie die Amyotrophische Lateralsklerose oder Charcot-Marie-Tooth [146, 147, 148] mit verschiedenen Mutationen der Neurofilament Untereinheit L in Zusammenhang gebracht werden konnten, sollte in dieser Arbeit untersucht werden in wie weit dies für die Untereinheit M und Parkinson zutrifft. 2004 wurde bereits von Perez-Olle und Kollegen [149] eine funktionelle Studie zu der von

Lavedan identifizierte Mutation G336S publiziert. In dieser Studie wurde untersucht, wie diese Mutation in der *Rod*-Domäne zu Veränderungen in der Filamentausbildung und dem Transport führen kann. Die Untersuchungen wurden anhand verschiedener Zellkultur Systeme durchgeführt. Es wurde gezeigt, daß beide Mechanismen in den untersuchten Modellen zu keiner Veränderung im Vergleich zum WT führten.

In der vorliegenden Arbeit sollten die von Krüger und Kollegen [143] entdeckten, Parkinson-assoziierten Mutationen (Pro725Glu & del829Val) hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung im Rahmen von neuronaler Integrität und Zelluntergang untersucht werden. In verschiedenen Zellkultur Systemen wurden zuerst grundsätzliche Funktionen der NF-M Untereinheit, wie zum Beispiel die Ausbildung des Filamentnetzwerkes und der Transport entlang axonaler Strukturen analysiert. Weitergehend wurde auf die für Parkinson bekannten Pathomechanismen, wie Aggregat Bildung und / oder Hemmung des Ubiquitin-Proteasomen-Systems, Analysen durchgeführt, da wie bereits beschrieben Neurofilamente einen Hauptbestandteil von Lewy-Körpern darstellen. Da in der Literatur verschiedene Abbaumechanismen für Neurofilament beschrieben sind, wurden die *steady-state Level* durch Modulation der bekannten Degradationswege untersucht. Da die zu charakterisierenden Mutationen in der *tail*-Domäne liegen, sollte weiterhin die für Neurofilament typische Phosphorylierung und eventuelle Abweichungen davon ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav:

V50

Systec, Wettenberg

Bakterienschüttelinkubator:

Unitron

HT Infors, Bottmingen, CH

Brutschränke:

CO₂-Inkubator

Sanyo, München

Durchflußcytometer:

CyanADP

DakoCytomation, Hamburg

Entwicklermaschine:

FMP 800A

Fuji Film, Düsseldorf

Geldokumentation:

Vilber lonsimat

PeqLab, Erlangen

Gelkammern für Agarosegele:

ClassicTM CSSU911

Thermo, Waltham, USA

Heizblöcke:

Thermomixer Comfort

Eppendorf, Hamburg

Mikroskope:

Eclipse TS100

Nikon

Axiovert200M	Zeiss, Jena
<u>Photometer:</u>	
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
<u>Pipetten:</u>	
Gilson Pipetman	Gilson, USA
Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
<u>Rollenmischer:</u>	
RM5	CAT, Staufen
<u>SDS-PAGE und Blotting Apparatur:</u>	
Mini Protean II TM	BioRad, München
<u>Spannungsgeräte:</u>	
Power-Pac 300	BioRad, München
Power-Pac 3000	BioRad, München
<u>Sterilbank:</u>	
HeraSafe	Haeraeus, Osterode
<u>Thermocycler:</u>	
DNA Engine PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
<u>Waagen:</u>	
Universal	Sartorius
Micro	Sartorius, Göttingen
<u>Zell-Zählkammer:</u>	
NeubauerImproved	Hecht Assistent, Sondheim
<u>Zentrifugen:</u>	
centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Biofuge pico	Haeraeus; Osterode
Multifuge 3S-R	Haeraeus, Osterode
FVL-2400	PeqLab, Erlangen

Vortexer:

Vortex-GenieR-2 Scientific Industries, Toronto, Ca

2.1.2 VerbrauchsmaterialienGel-Blotting Papier:

Typ GB003 Schleicher und Schuell, Dassel

Transfer-Membran:

PROTRANR Nitrocellulose Schleicher und Schuell, Dassel
Transfer Membran

Zellkultur-Gefäße:

6-/24-/96-well-Zellkulturplatten BD Falcon, Heidelberg

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
Brilliant Blau R250	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Complete [®] Proteasen Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Cycloheximide	Sigma, Taufkirchen
Desoxynucleosid-5'-triphosphat für PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Lösung (0,5M)	BioWhittaker, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fugene [®] HD Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
GeneRuler [™] 100bp-DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler [™] 1kb-DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Geneticin (G418)	Bico, Eggenstein

Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hoechst 33258	Molecular Probes, USA
Kanamycinsulfat	Fluka, Neu-Ulm
MDL-28170	Sigma, Taufkirchen
MG132 (Z-LL-al)	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
Phosphatase Inhibitor I & II	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	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
Xylenyanol	Fluka, Neu-Ulm
YoPro	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm

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

2.1.4 Reagenziensets (Kits)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Reagenziensets

Bezeichnung	Hersteller
BioRad Protein Assay	BioRad, München
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
TOPO [®] TA Cloning	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie

Die für molekularbiologische Arbeiten verwendeten Puffer und Enzyme sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie

Bezeichnung	Hersteller
Biotherm DNA-Polymerase / 10x Puffer	GeneCraft, Münster
PfuTurbo Polymerase / 10x Puffer	Stratagene, USA
Restriktionendonukleasen / 10x Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase / 10x 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:	1,5M Tris-HCl
Sammelgel-Puffer; pH 6,8:	0,5M Tris-HCl
Laufpuffer; pH 8,3:	25mM Tris 192mM Glycin 0,1% (w/v) SDS

2x Laemmli-Probenpuffer; pH 6,8:	62,5mM Tris-HCl 2% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 25% Glycerin 2% (v/v) β -Mercaptoethanol
8%iges Trenngel:	2,3ml H ₂ O _{bidest} 1,3ml Acrylamid 2K-Lösung 1,3ml Trenngel-Puffer 50 μ l 10% (w/v) SDS Lösung 2,0 μ l TEMED 50 μ l 10% (w/v) APS Lösung
10%iges Trenngel:	2,0ml H ₂ O _{bidest} 2,0ml Acrylamid 2K-Lösung 1,3ml Trenngel-Puffer 50 μ l 10% (w/v) SDS Lösung 2,0 μ l TEMED 50 μ l 10% (w/v) APS Lösung
12%iges Trenngel:	2,0ml H ₂ O _{bidest} 1,7ml Acrylamid 2K-Lösung 1,3ml Trenngel-Puffer 50 μ l 10% (w/v) SDS Lösung 2,0 μ l TEMED 50 μ l 10% (w/v) APS Lösung
4%iges Sammelgel:	1,15ml H ₂ O _{bidest} 0,22ml Acrylamid 2K Lösung 0,5ml Sammelgel Puffer 20 μ l 10% (w/v) SDS Lösung 2,0 μ l TEMED 20 μ l 10% (w/v) APS Lösung

Transferpuffer:	25mM Tris 192mM 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:	25mM Tris-HCl 8,0g/l NaCl 0,2g/l KCl
TBS-T; pH 7,4:	TBS mit 0,05% (v/v) Tween [®] 20
Blockierlösung:	TBS mit 5% Magermilchpulver
Stripping Puffer; pH 2,8:	0,2M Glycin 0,5M NaCl
Homemade-ECL-Detektionsreagenz:	Lösung A: 200ml Tris-HCl (pH 8,6) 50mg Luminol Lösung B: 10ml DMSO 11mg para-Hydroxycoumarinsäure H ₂ O ₂ (35%)
2.1.6.2 Agarose Gelelektrophorese	
50x TAE Puffer; pH 8,0:	2M Tris-HAc 50mM EDTA
6x Probenpuffer:	0.25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 30% Glycerin in H ₂ O _{bidest}

Ethidiumbromid-Stocklösung:	10mg/ml in H ₂ O
1%iges (w/v) Agarosegel:	0,4g Agarose 40ml TAE Puffer 2,5µl Ethidiumbromid
1,5%iges Agarosegel:	0,6g Agarose 40ml TAE Puffer 2,5µl Ethidiumbromid

2.1.6.3 Bakterien Lysispuffer zur Präparation von Plasmid DNA

Lysis Puffer 1 (L1):	9,0g Glucose 3,72g EDTA 3,03g Tris-HCl ad 1l H ₂ O
Lysis Puffer 2 (L2):	20ml 2N NaOH 10ml 20% SDS ad 200ml H ₂ O
Lysis Puffer 3 (L3):	120ml 5M KAc pH 4.8 - 5.2 23 ml Eisessig ad 200ml H ₂ O

Alle Lösungen wurden steril autoklaviert.

2.1.6.4 Zell-Lyse

PBS; pH 7,4:	8,0g/l NaCl 0,2g/l KCl 1,44g/l Na ₂ HPO ₄ 0,24g/l KH ₂ PO ₄
--------------	--

Lysepuffer für lösliche Proteinfraction:	PBS 1% (v/v) Triton X-100 Complete [®] Proteasen-Inhibitor-Cocktail Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I & II
Lysepuffer für unlösliche Proteinfraction:	PBS 1% (v/v) SDS Complete [®] Proteasen-Inhibitor-Cocktail Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I & II
RIPA-Puffer (Gesamtprotein); pH 7,4:	150mM NaCl 50mM Tris 0,5% Desoxycholat 0,1% SDS 1% Triton X-100 Complete [®] Proteasen-Inhibitor-Cocktail Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I & II

2.1.6.5 Immunzytochemie

100x Poly-L-Lysin:	0,5mg/ml in H ₂ O _{bidest}
Fixierlösung:	100% (v/v) Aceton
Permeabilisierungslösung:	100% (v/v) Methanol
Blockierlösung:	10% FBS in PBS

2.1.6.6 Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflußzytometrie

Yo-Pro [®] -1-Lösung:	100nM in DMSO
Propidiumiodid-Lösung:	5mg/ml in DMSO

2.1.7 Kultivierung von Zellen

2.1.7.1 Zell-Linien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zell-Linien sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete Zell-Linien

Zell-Linie	Zell-Typ	Referenz	Quelle
HEK293	Humane embryonale Nierenzelle	Graham et al., 1977	Microbix, USA
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzellen	Biedler et al., 1973	DSMZ
SW13 ⁻	Humane Nebennierenrinde	Sarria et al., 1990	Chris Miller, GB
CAD	Murine katecholaminerge Hirntumorzelle	Suri et al., 1993	Susan Horn, HIH

2.1.7.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM-Grundmedium (4,5g/l bzw. 1000mg/l D-Glukose), F12-Grundmedium, PBS (CaCl₂- und MgCl₂-frei) und Trypsin/EDTA-Lösung wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. FBS wurde von Biochrom (Berlin) bezogen und G418 Sulfat von Calbiochem/Merck (Darmstadt).

Vollmedium für HEK293-Zellen:

DMEM
10% (v/v) FBS
100U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin

Vollmedium für stabil exprimierende HEK293-Zellen:

DMEM
10% (v/v) FBS
100U/ml Penicillin
100µg/ml Streptomycin
700µg/ml G418

Vollmedium für SH-SY5Y-Zellen:	DMEM 15% FBS 100U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
Vollmedium für stabil exprimierende SH-SY5Y-Zellen:	DMEM 15% FBS 100U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 1000 μ g/ml G418
Vollmedium für stabil exprimierende GFPu-Zellen:	DMEM 15% FBS 100U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin 200 μ g/ml G418
Vollmedium für SW13 ⁻ -Zellen:	DMEM (1000mg/l D-Glukose) 10% FBS 100U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
Vollmedium für CAD-Zellen:	F12 8% FBS 100U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
Differenzierungsmedium für CAD-Zellen:	F12 100U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
Einfriermedium-1 (EFM-1):	4ml FBS 6ml DMEM (serumfrei)

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

2.1.8 Kultivierung von Bakterien

2.1.8.1 Bakterienstämme

Für die Vermehrung von Plasmiden wurden chemisch kompetente Bakterien (DH5 α TM oder One Shot[®] TOP10) von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

2.1.8.2 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien

1000x Ampicillin-Stocklösung:	100mg/ml in H ₂ O _{bidest}
4000x Kanamycin-Stocklösung:	100mg/ml in H ₂ O _{bidest}
LB-Amp-Medium:	20g LB-Broth (Sigma, Taufkirchen) ad 1l mit H ₂ O _{bidest} Ampicillin 1:1000
LB-Kan-Medium:	20g LB-Broth (Sigma, Taufkirchen) ad 1l mit H ₂ O _{bidest} Kanamycin 1:4000
LB-Amp-Agarplatten:	32g LB-Agar (Invitrogen (Karlsruhe)) ad 1l mit H ₂ O _{bidest} Ampicillin 1:1000
LB-Kan-Agarplatten:	32g LB-Agar (Invitrogen (Karlsruhe)) ad 1l mit H ₂ O _{bidest} Kanamycin 1:1000
50%ige Glycerinlösung:	50% (v/v) Glycerin in H ₂ O _{bidest} Die Lösung wurde autoklaviert.

2.1.9 Primer

2.1.9.1 Klonierungsprimer

Für die Generierung von Neurofilament-M Konstrukten mit C-terminalen GFP-tag, mit Hilfe des TOPO[®] TA Klonierungskit von Invitrogen (Karlsruhe), wurden folgende PCR-Primer verwendet:

Forward-Primer: 5'-atgagctacacgctggactcgc-3'

Reverse-Primer: 5'-ggtcaccctgggtgacttccttga-3'

Diese Primer entsprechen der cDNA Sequenz von NF-M aus *Rattus norvegicus* und erzeugen ein PCR-Produkt mit T-Überhängen für die TA-Klonierung.

2.1.9.2 Primer für die *in vitro*-Mutagenese

Für die *in vitro* Mutagenese von Neurofilament-M WT cDNA (*rattus norvegicus*) wurden folgende Mutageneseprimer verwendet um die entsprechenden bekannten Mutationen aus dem humanen Screening zu erzeugen:

- C2002A

5'Primer: tggagaaaaaggaggagaagc **A** aaaagatgtcccagataaaaagaaggct

3'Primer: agccttctttttatctgggacatcttt **T** gcttctcctcctttttctcca

Diese Primer erzeugen eine Punktmutation, die zu einem Basenaustausch von C zu A an der Position 2002 führt und einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Glutamin verursacht. Diese Mutation entspricht der beim Menschen von Krüger et al. beschriebenen Pro725Gln Mutation.

- delGTT

5'Primer: ggcaagaggaggagaaaaggg***gtcactaatggcttagatgt

3'Primer: acatctaagccattagtgac***cccttctcctccttggcc

Diese Mutation führt zu einer Deletion der Basen GTG an der Stelle 2310, und somit zu einer AS-Deletion (Valin) ohne Frameshift, entsprechend der humanen del829Val Mutation (Krüger et al.).

- G1038A

5'Primer: ctcgagtcggtgcga **A** gcactaaggagtccc

3'Primer: gggactccttagtgc **T** tcgaccgactcgag

Entsprechend der humanen G336S (G1008A) Mutation, wurde mit diesen Primer dieser Basenaustausch von G zu A an der Position 1038 eingefügt.

2.1.9.3 Sequenzierprimer

Für die Überprüfung der generierten Konstrukte durch Sequenzierung wurden T7-Primer, BGH-Primer und entsprechend der komplementären Sequenzabschnitte Primer verwendet.

2.1.10 Plasmide

2.1.10.1 Klonierungs-und Expressionsvektoren

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Klonierungs- und Expressionsvektoren

Vektor	Beschreibung	Resistenzen	Hersteller/Quelle
PclNeo	Expressionsvektor für Säugerzellen	Amp ^r , Neo ^r	Chris Miller, UK
psG5	Expressionsvektor für Säugerzellen	Amp ^r	Chris Miller, UK
pEGFP C1	Expressionsvektor für Säugerzellen; enthält die Sequenz für einen C-terminalen EGFP-tag	Amp ^r	Clontech, USA

Vektor	Beschreibung	Resistenzen	Hersteller/Quelle
GFPu	Expressionsvektor für Säugerzellen; enthält die Sequenz für einen N-terminalen EGFP-tag	Kan ^r , Neo ^r	Ron Kopito [150]
pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO [®]	Expressionsvektor für Säugerzellen; enthält die Sequenz für einen C-terminalen EGFP-tag	Amp ^r , Neo ^r	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1/V5-His	Expressionsvektor für Säugerzellen; enthält die Sequenz für einen C-terminalen V5/His-tag	Amp ^r , Neo ^r	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10.2 Plasmidkonstrukte

Die folgenden Plasmidkonstrukte wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet.

- PclNeo-Wt-NF-M:
Der Vektor enthält die cDNA von NF-M aus *Rattus norvegicus*, und wurde über die *EcoRI*-Schnittstelle inkloniert. Quelle: Chris Miller.
- pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Wt-NF-M:
Dieses Konstrukt wurde durch PCR generiert, indem die cDNA aus PclNeo ohne Stop-Codon amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde über TA-Klonierung in den Vektor eingeführt. Das Konstrukt exprimiert NF-M mit einem C-terminalen EGFP-tag.
- pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-C2002A/delGTT/G1038A-NF-M:
Mit Hilfe der *in vitro* Mutagenese Technik wurde ausgehend von dem pcDNA3.1/CT-GFP-Topo-Wt-NF-M Konstrukt die beschriebenen Mutationen in den Vektor eingebracht.

- pcDNA3.1/V5-His-NF-M:
Dieses Konstrukt wurde durch umklonieren der cDNA aus pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-NF-M mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *EcoRV*, erzeugt. Sowohl der WT als auch die Mutationen wurden in diesen Vektor umkloniert. Das Konstrukt exprimiert NF-M mit einem C-terminalen V5 Epitop und zusätzlichem 6fach Histag.
- pSG5-NF-L:
Dieses Konstrukt enthält die Ratten cDNA von NF-L, und wurde durch einklonieren über die *EcoRI* Schnittstelle generiert. Quelle: Chris Miller.

2.1.10.3 Antikörper

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Antikörper. WB: Western-Blotting, IZC: Immunzytochemie.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Quelle
α -Kaninchen-HRP	WB: 1:10000	Amersham Biosciences, Freiburg
α -Maus-HRP	WB: 1:5000	Amersham Biosciences, Freiburg
Esel α -Maus-Cy3	IZC: 1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Esel α -Kaninchen-Cy3	IZC: 1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Esel α -Maus-Alexa Fluor [®] 488	IZC: 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege α -Kaninchen-Cy3	IZC: 1:500	Dianova, Hamburg
Ziege α -Kaninchen-FITC	IZC: 1:300	Dianova, Hamburg
Ziege α -Maus-FITC	IZC: 1:300	Dianova, Hamburg
Kaninchen α -V5	WB: 1:1000 IZC: 1:300	Chemicon, USA
Maus α -V5	WB: 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Kaninchen α -GFP	WB: 1:1000	Santa Cruz, USA
Maus α -Actin	WB: 1:5000	Sigma, Taufkirchen
Maus α -NF-L; Klon NR4	IZC: 1:300	Sigma, Taufkirchen
Maus α -Phospho-NF-M (RMO55)	WB: 1:5000	Upstate, USA

Antikörper	Verdünnung	Hersteller/Quelle
Maus α -non-Phospho-NF-M (FNP7)	WB: 1:1000	Zymed, USA
Maus α -NF-M (RMO255)	WB: 1:1000	Virginia Lee

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Vermehrung und Präparation von Plasmiden

Die Vermehrung der verwendeten Plasmide erfolgte in DH5 α TM bzw. in One Shot[®] TOP10-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe).

- Transformation:

Die Transformation der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte, soweit nicht angegeben, nach Herstellerangaben.

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 50-200ng DNA eines Plasmids (Retransformation), 10 μ l eines Ligationsansatzes oder 6 μ l einer *in vitro* Mutagenese PCR versetzt und vorsichtig gemischt. Es erfolgte eine 20-30 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden durchgeführt. Nach einer erneuten Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden die Zellen mit 250 μ l SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) bei 37°C unter schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden für die weitere Vermehrung auf LB-Amp- bzw. LB-Kan-Agarplatten ausgestrichen und für weitere 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Transformation wurde durch eine Minipräparation und einem Restriktionsverdau überprüft.

- Herstellung von Bakterien Glycerinstocks:

Für die Herstellung von Bakterien Glycerinstocks wurde je 1ml LB-Amp- bzw. LB-Kan-Medium in einem sterilen 15ml Falcon[®] Röhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Diese Lösung wurde für etwa 16h bei 37°C und 200UpM in einem Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurden 700 μ l der Bakterienkultur mit 500 μ l einer 50%igen (v/v) sterilen Glycerinlösung in einem Einfrierröhrchen gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

- Präparation von Plasmiden durch alkalische Lyse:

Für die Plasmidpräparation wurden 7ml LB-Amp- bzw. LB-Kan-Medium aus einem Bakterien Glycinstock in einem 15ml Falcon[®] Röhrchen angeimpft und für 16h bei 37°C und 200UpM in einem Bakterienschüttler inkubiert. Die Bakterien-suspension wurde in 2ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 14.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 150µl Lysispuffer L1 sorgfältig resuspendiert. Für die alkalische Lyse der Bakterienmembran wurden 150µl Lysispuffer L2 zugegeben und durch vorsichtiges invertieren gemischt. Die Lyse wurde durch Zugabe von 150µl Lysispuffer L3 gestoppt, wobei Membranpartikel und Proteine ausflockten. Durch eine weitere Zentrifugation bei 14.000 UpM für 10 Minuten wurde der Zellschrott pelletiert. Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 600µl 100%igen (v/v) Isopropanol überführt. Die DNA wurde durch zentrifugieren bei 14.000 UpM für 10 Minuten bei RT gefällt, und das Pellet anschließend mit 70%igen Ethanol zwei mal gewaschen. Für die Präparation größerer Plasmidmengen wurden mehrere 2ml Präparationen durchgeführt und die daraus entstandenen Pellets zwischen den Waschschritten zusammengeführt. Nach dem Waschen wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet für 30-60 Minuten unter der Sterilbank getrocknet. Die getrocknete DNA wurde mit 30µl H₂O_{bidest}+RNase bei 65°C für 10 Minuten unter schütteln gelöst. Die Konzentration und Reinheit der aufgereinigten DNA wurde photometrisch bestimmt. Die so gewonnene DNA wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

- Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA:

Für die Quantifizierung der DNA wurde die Extinktion photometrisch bei 260nm gemessen. Die Messung erfolgte in einer 1:100 Verdünnung mit H₂O_{bidest}. Die DNA Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

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

Die Reinheit wurde bestimmt durch das Verhältnis der Extinktion bei 260nm zu 280nm, wobei eine reine DNA-Lösung einen Wert von >1.8 haben sollte.

- Analytischer Restriktionsverdau:

Der Erfolg einer Klonierung wurde durch einen Plasmid-DNA Verdau mit geeigne-

ten Restriktionsendonuklease überprüft. Die daraus entstandenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Restriktionsansatz:

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

Der Restriktionsverdau wurde für 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1µl Probenpuffer versetzt und auf ein Agarose Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V für 20-40 Minuten.

2.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für analytische Untersuchungen wurde Biotherm[®]-Taq- DNA-Polymerase eingesetzt. Zur Klonierung wurde ein Gemisch aus Taq- / Pfu-DNA-Polymerase im Verhältnis 1:1 eingesetzt um einen *proofreading*-Effekt zu erzielen.

PCR-Ansatz:

cDNA / Plasmid-DNA (100-200ng)	1,0µl
10x PCR-Puffer	2,5µl
10 mM dNTP's	1,0µl
Vorwärts-Primer [10µM]	2,0µl
Rückwärts-Primer [10µM]	2,0µl
Taq-Polymerase	0,3µl
Pfu-Polymerase	0,3µl
H ₂ O _{bidest}	ad 25µl

PCR-Programm:

Tabelle 2.6: PCR-Programm zur Amplifizierung von NF-M cDNA

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	1 min
Primer-Anlagerung	50°C	1 min
Elongation	72°C	4,5 min
	35 Zyklen	
finale Elongation	72°C	7 min

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA Fragmenten in einer Größe von 100-10.000bp. Die Agarose Konzentration wurde entsprechend der zu trennenden Fragmente zwischen 0,8 und 2% gewählt. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern in TAE (Tris-Acetat) Puffer bei einer Stromstärke von 100V. Die dazu benötigten Gele wurden hergestellt, indem eine entsprechende Menge Agarose in TAE aufgeköcht wurde und mit Ethidiumbromid versetzt wurde. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Ladepuffer und einem angepassten DNA-Größen- und evtl. Mengenstandard für die spätere Auswertung aufgetragen.

2.2.1.4 Zyklische Sequenzierung

Die zyklische Sequenzierung beruht auf der nach Sanger (1977) entwickelten Methode. Hierbei kommt es durch die Verwendung von ddNTP's (Didesoxynukleotide) zu einem Kettenabbruch an statistisch verteilten Stellen der DNA-Sequenz. ddNTP's zeichnen sich dadurch aus, daß ihnen die 3'Hydroxylgruppe fehlt und keine weiteren Phosphodiesterbrücken mehr ausgebildet werden können. Es kommt zum Kettenabbruch. Die verwendeten ddNTP's sind durch verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe markiert und können so mit Hilfe eines Lasers durch die Kappillarelektrophorese detektiert werden. Die Sequenzierung erfolgte durch eine Kooperation der AG Gasser, Hertie Institut, unter der Verwendung des ABI BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit und einem ABI Prism[®] Sequenzierautomaten.

PCR-Ansatz:

cDNA / Plasmid-DNA (500-700ng)	1,0 μ l
5x PCR-Puffer	2,0 μ l
BigDye [®] v3.1	2,0 μ l
Primer [10 μ M]	0,5 μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 10 μ l

PCR-Programm:

Tabelle 2.7: PCR-Programm für die zyklische Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	1 min
Denaturierung	94°C	10 sek
Primer-Anlagerung	50°C	5 sek
Elongation	60°C	4 min
30 Zyklen		

Nach erfolgter Amplifizierung erfolgte eine Ethanol-Fällung. Das so aufgereinigte Pellet wurde in 15 μ l H₂O gelöst und die Hälfte davon mit 20 μ l Formamid auf die Sequenzierplatte aufgetragen.

2.2.1.5 TOPO[®]-TA-Klonierung

Für die TOPO[®]-TA-Klonierung mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Kits von Invitrogen wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die TA-Klonierungstechnik ermöglicht eine Klonierung von PCR-Produkten ohne das Einbringen zusätzlicher Restriktionsstellen über Primer. In dem Kit wird der Zielvektor, hier pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO[®], in linearisierter Form in „aktiver“ Form bereitgestellt. Dies bedeutet die Topoisomerase ist bereits kovalent mit dem Vektor verknüpft. Durch die Klonierungsreaktion wird das Enzym entfernt und das PCR-Produkt einkloniert.

- PCR-Reaktion:
Die für die TOPO[®]-TA-Klonierung benötigte cDNA wurde wie in dem oben aufgeführten Protokoll amplifiziert. Als Kontrolle wurden 5 μ l des PCR Produkts auf ein Agarosegel aufgetragen.
- 3'-A Überhänge erzeugen:
Für die TA-Klonierungstechnik werden zwingend 3'-A Überhänge des PCR-Produkts benötigt. Dafür wird das PCR Produkt (20 μ l) mit einer Unit Taq-Polymerase für 10 Minuten bei 72°C inkubiert.
- Klonierungsreaktion:
Für die Klonierungsreaktion werden 4 μ l des PCR-Produkts mit 1 μ l der mitgelieferten Salzlösung und 1 μ l des aktivierten Vektors für 30 Minuten bei 22°C inkubiert. Anschließend werden 2 μ l dieser Reaktion in One Shot[®] TOP10-Bakterien transformiert.
- Kontrolle der generierten Plasmidkonstrukte:
Die generierten Plasmide wurden durch einen Restriktionsverdau und durch vollständige Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

2.2.1.6 *In vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese wurde mit Hilfe des Quick Change[®] Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (USA) durchgeführt. Dieses Kit ermöglicht es durch eine PCR unter der Verwendung von *PfuTurbo*[®] DNA-Polymerase (Stratagene, USA) Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in ein superspiralisiertes, doppelsträngiges Plasmidkonstrukt einzuführen. Hierfür werden zwei selbtskomplementäre Oligonukleotidprimer mit der gewünschten Mutation generiert. Über eine PCR Reaktion wurden, unter Verwendung der *PfuTurbo*[®] DNA-Polymerase, die Mutationen eingeführt, da diese Polymerase eine hohe Lesegenauigkeit aufweist, ohne eine Veränderung der Primer zu verursachen. Das Ausgangsplasmid wurde nach erfolgter Amplifizierung durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut. Dieses Enzym erkennt spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Da im Gegensatz zur neu amplifizierten DNA das Ausgangsplasmid methyliert ist, wird dieses verdaut. Durch anschließende Transformation in superkompetente Bakterien kann das neu generierte Plasmid vermehrt werden.

Durchführung:

Zur Einführung der beschriebenen Mutationen wurde folgender Ansatz gewählt:

PCR-Ansatz:

Plasmid-DNA (50ng)	1,0 μ l
10x <i>PfuTurbo</i> [®] -Puffer	5,0 μ l
2 mM dNTP's	12,5 μ l
Vorwärts-Primer [10 μ M]	1,5 μ l
Rückwärts-Primer [10 μ M]	1,5 μ l
<i>PfuTurbo</i> [®] DNA Polymerase	1,0 μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 50 μ l

PCR-Programm:Tabelle 2.8: PCR-Programm für *in vitro* Mutagenese

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	30 sek
Denaturierung	95°C	30 sek
Primer-Anlagerung	55°C	1 min
Elongation	68°C	7,2 min
12 Zyklen		

DpnI-Verdau und Transformation:

Das neu generierte Plasmid wurde anschließend an die PCR für 1h mit 1 μ l *DpnI* bei 37°C verdaut. Daraufhin wurden 6 μ l des Ansatzes in One Shot[®] TOP10-Bakterien transformiert. Der Erfolg der Transformation wurde durch Minipräparation und anschließender Sequenzierung überprüft.

2.2.1.7 Umklonierung aus bestehenden Expressionskonstrukten

Für die Generierung von Expressionsvektoren mit C-terminalen V5/His-tag wurden die cDNA Sequenzen von NF-M aus den bereits bestehenden EGFP-Konstrukten umkloniert.

- Präparativer Restriktionsverdau:

Für die Gewinnung der zu klonierenden Fragmente wurde der Ausgangsvektor (pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO[®]-NF-M) und der Zielvektor (pcDNA3.1/V5-His) mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *EcoRV* verdaut. Der Restriktionsverdau erfolgte bei 37°C für 2-4 Stunden in folgendem Ansatz:

Plasmid-DNA (1-5µg)	5,0µl
10x Restriktionspuffer	5,0µl
<i>KpnI</i>	1,0µl
<i>EcoRV</i>	1,0µl
H ₂ O _{bidest}	ad 50µl

Der gesamte Restriktionsverdau wurde über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden Banden sorgfältig ausgeschnitten. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick[®] Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) für die weiteren Versuche aufgereinigt.

- Ligation:

Aus dem aufgereinigten Restriktionsverdau wurden 5µl auf ein Agarose-Gel zusammen mit einem DNA-Größenstandard aufgetragen um anhand der Ethidiumbromid-Fluoreszenz die Konzentration festzustellen. Mit einem 3-5fachen Überschuss zum linearisierten Vektor wurde das zu klonierende Fragment in den Ligationansatz eingesetzt.

Vektor-DNA (50ng)	x µl
Insert-DNA (150-250ng)	y µl
10x Ligationspuffer	2,0µl
T4-DNA-Ligase	5,0µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20µl

Der Ansatz wurde für 16-18 Stunden bei 16°C inkubiert und für die Transformation in DH5αTM eingesetzt.

- Kontrolle von Plasmidkonstrukten:

Um die Identität der neu generierten Konstrukte zu überprüfen wurde direkt von der Bakterienplatte eine sogenannte *Colony-PCR* durchgeführt. Dabei wird mit einer sterilen Pipettenspitze von 10-20 verschiedenen Klonen ein Teil direkt in ein PCR-Reaktionsgefäß mit bereits vorgelegtem Mastermix gegeben und eine PCR durchgeführt. Durch die Wahl spezifischer Primer innerhalb des *Inserts* können somit schnell und einfach positive Klone vorselektioniert werden. Eine endgültige Bestätigung erfolgte nach Minipräparation und anschließender Sequenzierung.

2.2.2 Zellkultur und Transfektion

2.2.2.1 Zellkultivierung

Alle Zellkultur-Versuche wurden an einer Sterilbank unter Verwendung steriler Gebrauchsmaterialien durchgeführt. Alle aufgeführten Zellkultur-Linien wurden in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. HEK 293, SH-SY5Y und SW13⁻ wurden je nach Konfluenz 1-2 mal in der Woche passagiert. Das Medium von undifferenzierten CAD Zellen wurde alle zwei Tage erneuert und die Zellen ca. alle zwei Wochen passagiert. Für die Ausdifferenzierung wurden CAD Zellen in 24well Platten umgesetzt und durch ständigen Serumentzug über 96h ausdifferenziert. Durch ständigen Medienaustausch konnten die so differenzierten Zellen bis zu vier Wochen kultiviert werden.

2.2.2.2 Teilen und Passagieren von Zellen

Konfluent gewachsene Zellen wurden passagiert, indem zunächst das Medium abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit ca. 1ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde abgestoppt durch Zugabe von 10ml serumhaltigen Medium, wenn sich die Zellen sichtbar vom Kulturgefäß lösten. Die Zellen wurden durch gründliches resuspendieren vereinzelt und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 geteilt und erreichten somit einen konfluenten Zustand nach 4-6 Tagen.

2.2.2.3 Zellzahl-Bestimmung

Die Zellzahl Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. In dieser Kammer beträgt die Fläche eines Großquadrates die definierte Fläche von 1mm² und einer Tiefe von 0,1mm. Ein Großquadrat, bestehend aus 16 Kleinquadraten, ergibt bei der Auszählung der Zellsuspension eine Zelldichte, die sich nach folgender Formel berechnet:

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

F_v steht für einen eventuell zu berücksichtigenden Verdünnungsfaktor. Für eine korrekte Zellzahl-Bestimmung wurden mindestens 2 Großquadrate ausgezählt.

2.2.2.4 Steriles Einfrieren von Zellen

Annähernd konfluent gewachsene Zellen wurden wie zum passagieren gewaschen, vom Kulturgefäß abgelöst und in serumhaltigen Medium resuspendiert. Es erfolgte eine Sedimentierung bei 300x g und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in 1,5ml EFM-1 resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden unter schütteln tropfenweise 1,5ml EFM-2 zugegeben. Von der entstandenen Zellsuspension wurden jeweils 1ml in ein steriles Einfrierröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einen isolierten Behälter gegeben und für 24h bei -80°C eingefroren um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten. Die endgültige Lagerung erfolgte bei -150°C.

2.2.2.5 Steriles Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus der -150°C entnommen und in ein 37°C Wasserbad überführt. Die so aufgetauten Zellen wurden in ein neues steriles Kulturgefäß gegeben und 10ml vorgewärmtes Medium dazu pipetiert. 12-16h später wurde das Medium erneut gewechselt um nicht angewachsene Zellen und DMSO Reste zu entfernen.

2.2.2.6 Liposomen-vermittelte Transfektion

Das Prinzip der Liposomen-vermittelten Transfektion beruht auf der Verbindung von negativ geladener DNA, welche an kationische Lipide gebunden wird. Es entsteht ein Liposomen-DNA-Komplex, welcher mit der Zellmembran fusionieren kann. Die so in die Zelle gelangte DNA wird anschließend im Zellkern abgelesen.

- Transfektion mittels METAFECTENE™
METAFECTENE™ ist eine Kombination aus einem polykationischen Transfektionsreagenz, welches mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. Nach dem Eintritt in die Zelle ermöglicht ein spezieller „Endosome Buffering“ Mechanismus und der von Biontexas entwickelten RMA-Technologie („Repulsive Membrane Acidolysis“) eine komplette Freilegung der transfizierten DNA als Grundlage hoher Transkription. Für die Transfektion wurden am selben Tag 7×10^4 Zellen pro

Vertiefung einer 24-*well*-Platte bzw. 7×10^5 pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden je nach Ansatz zwischen 0,3 und $2\mu\text{g}$ DNA eingesetzt.

- Transfektion mittels FuGENE[®] HD

Für die Transfektion wurden am selben Tag 7×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 24-*well*-Platte bzw. 7×10^5 pro Vertiefung einer 6-*well*-Platte ausgesät. Die Liposomen-DNA-Komplexbildung erfolgte in serumfreien OPTIMEM, die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.7 Generierung stabil exprimierender Zell-Linien

Um quantitative Aussagen über das Verhalten verschiedener Zell-Linien gegenüber äußeren Einflüsse machen zu können, wurden Zellen benötigt, die das gewünschte Protein stabil und gleichmäßig exprimieren.

Hierbei wurde sich der Umstand zunutze gemacht, daß die generierten pcDNA3.1/V5-His-NF-M Konstrukte eine Neomycin-Kassette enthalten. Dies erlaubte es, transfizierte Zellen unter einem Selektionsdruck mit dem Antibiotikum G418 zu vermehren.

Für die Generierung wurden HEK 293 und SH-SY5Y Zellen in 6-*well*-Platten ausgesät und am selben Tag mittels FuGENE[®] HD transfiziert um eine möglichst hohe Effizienz zu erzielen. Nach 48 Stunden wurde das Kulturmedium durch Selektionsmedium (jeweiliges Kulturmedium + G418) ersetzt. Als Selektionskontrolle dienten jeweils untransfizierte Zellen. Während der Selektionsdauer von ca. 2 Wochen wurde täglich das Medium gewechselt um tote Zellen zu entfernen und den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Um eine stabile dauerhafte Expression des Proteins zu überprüfen wurde jeweils ein Western-Blot mit Ladekontrolle durchgeführt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten stabilen Zellen handelt es sich stets um polyklonale Zell-Linien mit ungefähr gleichem Expressionslevel.

2.2.2.8 Behandlung

Die Zellen wurden mit verschiedenen Stressoren, Toxinen und Inhibitoren behandelt, indem Stammlösungen in Kulturmedium zugegeben wurden und das bestehende Medium dadurch ersetzt wurde.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Western-Blotting

- Herstellung von Zellextrakten:

Für die Herstellung von Zellextrakten wurde das Medium einer Vertiefung einer 6-*well*-Platte abgesaugt und die Zellen mit 1ml kaltem PBS in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4°C und 1200rpm für 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Lyse wurden die Zellen in 150µl eiskaltem Lysepuffer (Puffer für die lösliche Fraktion oder RIPA-Puffer) für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13000rpm bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Bei einer Auftrennung zwischen löslich und unlöslicher Proteinfraction wurde zusätzlich das nach der Lyse entstandene Pellet in PBS/ 1% Triton-X-100 bei 60°C für eine Stunde unter schütteln lysiert.

- Proteinbestimmung nach Bradford:

Um eine definierte Menge an Protein für die anschließende SDS-PAGE zu erhalten wurde der Proteingehalt der Zellextrakte nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Es handelt sich dabei um eine kolorimetrische Methode. Das Prinzip beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant G250 an Proteine, wobei die Stärke der Bindung von der Art des Proteins abhängt. Das Absorptionsmaximum des Protein-Farbstoff-Komplexes kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen werden, wobei ungebundener Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465nm aufweist.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein-Assays nach Angaben des Hersteller in 96-*well*-Mikrotiterplatten. Die Messung erfolgte an einem *ELISA-Reader*.

- SDS-PAGE:

Die Auftrennung der Protein-Lysate erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Es wurden 8-10%ige Trenngele mit einem jeweils 4%igen Sammelgel verwendet.

Die aufzutrennenden Proteinextrakte wurden für die Verwendung eines 10-*well*-Kammes auf 40µg bzw. 30µg bei einem 15-*well*-Kammes eingestellt und mit einem Volumen 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Lysate aus der unlöslichen Proteinfraction wurden mit 30µl 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 30µl davon

auf das Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte in Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 25mA. Die Proteine wurden anschließend mittels Elektroblothing auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

- Elektroblothing:

Die nach der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach dem Nasszell-Blotting-Verfahren oder mit Hilfe des iBlot™ Dry Blotting Systems (Invitrogen) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Für das Nasszell-Verfahren wurde folgender Versuchsaufbau verwendet:

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

Die zuvor mit Transferpuffer angefeuchteten Komponenten wurden in eine Kunststoffhalterung eingebracht und in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer unter Eiskühlung und Rühren für 1 Stunde auf eine Spannung von 100V gesetzt.

Für das Trocken-Blotting-Verfahren mittels dem iBlot™ Dry Blotting Systems wurde das Gel in die vorgefertigten iBlot™ Gel Transfer Stacks nach Herstellerangaben übertragen und anschließend für 7 Minuten die Proteine bei einer Spannung von 20V auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Der Erfolg des Transfers wurde jeweils mittels einer Ponceau-S-Färbung überprüft.

2.2.3.2 Immunodetektion von Proteinen

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran nach dem Transfer abzusättigen wurde diese, für 1 Stunde bei RT, in einer Blockierlösung geschwenkt. Nachfolgend wurde die Membran im gewünschten Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung bei 4°C über Nacht auf einem Rollentaumelmischer inkubiert. Unter schütteln wurde die Membran 1x 5 Minuten mit TBS und 2x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen, anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper (α -Maus 1:5000, α -Kaninchen 1:10000) für 1 Stunde bei RT. Abschließend wurde die Membran 1x 5 Minuten mit TBS-

T und 2x mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Homemade-ECL und durch Exposition von Chemolumineszenz-Filmen (HyperfilmTM ECL; Amersham, Freiburg).

2.2.3.3 Stripping der Nitrocellulose-Membran

Primär- und Sekundärantikörper können durch sogenanntes *strippen* von der Membran entfernt werden. Dafür wird diese zuerst ausgiebig in TBS-T gewaschen, anschließend erfolgt eine Inkubation für 5 Minuten bei RT in *Stripping*-Puffer. Der extrem saure pH des Puffers wird folgend mit Natronlauge auf einen neutralen pH eingestellt. Nach weiteren intensiven Waschschritten in TBS konnte die Membran für weitere Immunodetektionen verwendet werden.

2.2.3.4 Immunpräzipitation

Um selektiv Proteine aus einem Gemisch Anzureichern wurde die Immunpräzipitation mit Hilfe des TALON[®] Metal Affinity Resin von BD Clontech (USA) durchgeführt. Hierbei können Proteine mit einem Poly-His-*tag* angereichert werden. Das Prinzip der Anreicherung basiert auf der Zusammensetzung der verwendeten Sepharose, an der über einen vierzähligen Chelator 2-fach positiv geladene Cobalt-Ionen immobilisiert sind. Die Histidin-Reste des Poly-His-*tags* bilden unter physiologischen pH Bedingungen eine koordinative Bindung zu dem Übergangsmetall Cobalt aus.

Für die Immunpräzipitation wurden zuerst Zellextrakte unter der Verwendung von RIPA-Puffer und EDTA-freiem Phosphatase-Inhibitor hergestellt. Für eine *Input*-Kontrolle wurden 30µg entnommen und bei -20°C gelagert. Für jede Probe wurden 30µl 50%iges (w/v) TALON[®] Metal Affinity Resin in RIPA-Puffer 5x gewaschen und anschließend auf das Zellextrakt gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht unter schütteln. Die Präzipitate wurden für 5 Minuten bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde 5x mit RIPA oder PBS gewaschen und anschließend wurde der Komplex durch eine 10 minütige Inkubation in 10µl Elutionspuffer aufgebrochen. Die entstandene Lösung wurde mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf ein SDS-Gel geladen.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie ist eine Methode mit der man sowohl die Expression als auch die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Zellen bestimmt. In dieser Arbeit wurde diese

Möglichkeit für verschiedene Fragestellungen, wie zum Beispiel die Ausbildung des Filamentnetzwerkes oder das Aggregationsverhalten, genutzt. Es gibt zwei Optionen die zu untersuchenden Proteine zu detektieren. Erstens durch fluoreszenz-markierte Antikörper oder durch nicht-markierte Primärantikörper, an welche in einem zweiten Schritt entsprechende fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper gebunden werden. Es wurden bis zu drei verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe genutzt. Die Detektion erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop.

Für die immunzytochemische Untersuchung wurden Deckgläschen (Cover-Slips) in einer 24-well-Platte für eine halbe Stunde bei 37°C mit einer Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet, um ein späteres Anheften der Zellen zu gewährleisten. Die Lösung wurde anschließend abgesaugt und die Deckgläschen getrocknet. Zur Sicherheit erfolgte ein Waschschrift mit PBS um eventuelle Rückstände zu entfernen, da Poly-L-Lysin einen toxischen Effekt auf Zellen hat. In die so vorbereitete Platte wurden die Zellen in einer Dichte von 7×10^4 bis 1×10^5 ausgesät und für 48 Stunden kultiviert. Eventuelle Behandlungen erfolgten 16 Stunden vor der Fixierung, soweit nicht anders angegeben. Nach absaugen des Mediums wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit 100%igem Aceton für 5 Minuten bei -20°C fixiert und mit 100%igen Methanol für weitere 5 Minuten bei -20°C permeabilisiert. Es folgte ein Waschschrift mit PBS, nach welchem die Zellen mit einer 10% FBS in PBS Lösung 30 Minuten bei RT inkubiert wurden, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in 5% FBS in PBS erfolgte für 2 Stunden bei 37°C oder optional bei 4°C über Nacht. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei RT in einem adäquaten fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper in 10% FBS in PBS inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 (DAPI) in einer Verdünnung von 1:10000 für weitere 20 Minuten bei RT angefärbt. Anschließend wurden die Zellen 4x mit PBS und 1x mit H_2O_{bidest} gewaschen. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit einem Tropfen Mowiol „eingedeckelt“. Es erfolgte eine Trocknung über Nacht an einem lichtgeschützten Ort.

2.2.4.2 Apoptose/Nekrose-Assay mittels Durchflußcytometrie

- Prinzip:

Mit Hilfe der Durchflußcytometrie ist es möglich innerhalb kurzer Zeit große Zellpopulationen auf ihre Größe und Granularität hin zu untersuchen. Um Analysen über Zelltod-Mechanismen durchzuführen steht eine große Anzahl kommerzieller Testsysteme zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stabil exprimierende HEK 293 und SH-SY5Y Zellen unter dem Einfluß verschiedener Stressoren auf ihre Zelltod-Mechanismen hin untersucht.

– Apoptose-Assay mit Yo-Pro[®]-1:

Apoptose ist ein genau regulierter Mechanismus von Zelltod, welcher in der Entwicklung völlig normal ist. Ist dieser Mechanismus allerdings gestört, kommt es zu einer fehlgeleiteten Regulation, wie man es bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen feststellen kann. Apoptose zeichnet sich durch spezielle morphologische und biochemische Veränderungen aus. Dazu gehören die Fragmentierung der DNA, Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran und die Kondensation des Zytoplasmas und des Zellkerns. Das früheste Anzeichen für Apoptose ist der Verlust der Plasmamembran Asymmetrie. Dieses Merkmal wird genutzt um diese Zelle spezifisch mit dem Farbstoff Yo-Pro[®]-1 anzufärben.

– Nekrose-Assay mit Propidium Iodid (PI):

Nekrose unterscheidet sich von Apoptose morphologisch durch den kompletten Verlust der Membranintegrität. In diesem Falle besteht die Möglichkeit den DNA-bindenden Farbstoff PI einzusetzen. Dieser färbt ausschließlich nekrotische Zellen.

● Durchführung:

Für die oben aufgeführten Messungen wurden jeweils stabil exprimierende HEK 293 oder SH-SY5Y Zellen in 6-well-Platten ausgesät und für jeweils 48 Stunden kultiviert. Eine Behandlung mit verschiedenen Stressoren erfolgte meist 16 Stunden vor der Messung. Für die Analysen wurden die Zellen aus den Platten, zusammen mit dem Medium, in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 4°C und 300xg sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgesaugt und die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Färbung wurden pro Probe 500µl Lösung angesetzt, (100nM Yo-Pro[®]-1 in PBS) und die Zellen für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff und die Zellen wurden für die Messung in 500µl PBS resuspendiert.

Die PI Färbung erfolgte entsprechend mit einer Gebrauchsverdünnung von 50µg/ml in PBS und einer 20minütigen Inkubation bei 37°C. Die Analyse für beide Farbstoffe erfolgte an einem CyanADP Cytometer, DakoCytomation, Hamburg, mit einem 488nm Laser.

- Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Summit v4.2. Die *gates* wurden mit Hilfe einer negativ Kontrolle (ungefärbte, unbehandelte Zellen) gesetzt und nur die Yo-Pro[®]-1 bzw. PI positiven Zellen ausgewertet. Es wurden jeweils insgesamt mindestens 100.000 Zellen gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte in Excel mit Hilfe des Student's t-Test um auf eventuelle signifikante Unterschiede zu testen.

2.2.4.3 Proteasomen-Assay mittels Durchflußcytometrie

- Prinzip:

Für diesen Versuch standen monoklonale SH-SY5Y Zellen zur Verfügung, welche GFP^u-1 stabil exprimierten. Das von Bence und Kollegen 2001 publizierte GFP^u-System [150] dient als Nachweis einer Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) Hemmung. Bei diesem System handelt es sich um Reporter, bestehend aus einem kurzen CL1-Degron-Peptid, welches mit dem C-terminus des *green fluorescent-protein* (GFP) fusioniert ist. Dieses Konstrukt wird im Gegensatz zu herkömmlichen GFP über das Proteasom abgebaut und hat somit eine verkürzte Halbwertszeit innerhalb der Zelle von etwa 30 Minuten. Werden nun diese stabil exprimierenden Zellen zusätzlich transient mit einem Protein transfiziert, welches aggregiert und / oder über das Proteasom abgebaut wird, kommt es zu einer Hemmung des UPS und dadurch zu einer Akkumulation von GFP^u innerhalb der Zelle. Diese Akkumulation kann quantitativ über einen Anstieg der Fluoreszenz über FACS Analysen untersucht werden. Ein Effekt auf das UPS kann zusätzlich durch Zugabe von Proteasomen-Inhibitoren (MG132) induziert bzw. verstärkt werden.

- Durchführung:

Stabil exprimierende GFP^u Zellen wurden in 6-well-Platten mit einer Dichte von 7×10^5 ausgesät und am selben Tag mittels FuGENE[®] HD mit je $2 \mu\text{g}$ NF-M Plasmid-DNA transfiziert. Eine eventuelle Behandlung mit MG132 erfolgte 36 Stunden später. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen gemeinsam mit dem Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei $300 \times g$ bei 4°C sedimentiert und anschließend 2x mit kaltem PBS gewaschen. Die Messung erfolgte an einem CyanADP Cytometers der Firma DakoCytomation. Die EGFP-Fluoreszenz wurde im FITC-Kanal gemessen und mit Hilfe untransfizierter Zellen eingestellt. Für die Messung wurden insgesamt mehr als 100.000 Zellen gemessen. Um eine effiziente Transfektion von NF-M mit den Messergebnissen in Zusammenhang zu bringen, wurden für jeden Versuchsansatz von einem Teil der Zellen Proteinextrak-

te hergestellt und auf einem Western-Blot nachgewiesen.

- Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Summit v4.2, von DakoCytomation. Durch das Ausschlußprinzip wurden *gates* gesetzt in welchen die GFP-positiven Zellen im Verhältnis der Gesamt-Zellzahl dargestellt wurden. Eine anschließende statistische Auswertung erfolgte mittels Excel mit Hilfe des Student's t-Test um auf eventuelle signifikante Unterschiede zu testen.

2.2.4.4 Bestimmung des *Steady-State-Levels* von NF-M

- Prinzip:

Da die NF-M zugrunde liegenden Abbaumechanismen noch nicht vollständig geklärt sind und um eventuelle Unterschiede zwischen physiologischem und mutierten NF-M zu analysieren, wurden verschiedene Versuche zur Bestimmung des *Steady-State-Levels* durchgeführt. Um sowohl Unterschiede in der Synthese- als auch in der Abbaurrate zu analysieren wurden diese Mechanismen durch Einsatz verschiedener Inhibitoren spezifisch geblockt.

- Cycloheximid (CHX):

Cycloheximid ist ein von *Streptomyces griseus* produziertes Antibiotikum. Es inhibiert spezifisch in Eukaryonten die Translation und führt somit zu einer Inhibition der Protein-Synthese, was weiter zu einem Zellwachstums-Stop und Zelltod führt. CHX wurde eingesetzt um eventuelle Abweichungen in der Syntheserate von NF-M fest zustellen

- Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132):

MG132 ist ein hochpotenter, membran-permeabler Proteasomen-Inhibitor. Durch die proteasomale Hemmung wird die Akkumulation von mRNA von Hitzeschock Proteinen und deren Aktivierung induziert. Eine weitere Folge ist die Aktivierung der JNK-1, welche zum einen Apoptose als Antwort auf Stress induziert, zum anderen man davon ausgeht, daß sie NF-M phosphoryliert.

- Bafilomycin A1:

Bafilomycin A1 inhibiert spezifisch die vakuoläre H⁺-ATPase zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Ansäuerung von Endosomen. Ohne eine vakuoläre An-

säuerung kommt es zu einer Hemmung der Aktivierung der Proreasen. Bafilomycin A1 dient somit zur Hemmung der Autophagy.

– Z-Val-Phe-CHO (MDL 28170):

MDL 28170 ist ein spezifischer und zellpermeabler Inhibitor für Calpain I und II und für γ -Secretase. MDL 28170 diente zur Hemmung des möglichen Abbaus von NF-M durch μ Calpain und mCalpain

• Durchführung:

Für die Analysen wurden jeweils stabil exprimierende SH-SY5Y Zellen in 6-well-Platten ausgesät und für jeweils 48 Stunden darin kultiviert. Eine Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren erfolgte in entsprechender Verdünnung für jeweils 3, 6, 16 und 24 Stunden. Als Kontrolle wurde jeweils ein well unbehandelter Zellen mitgeführt. Die Lyse erfolgte mit RIPA-Puffer und anschließender Proteinbestimmung. Die Proben wurden auf ein 8%iges SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Es erfolgte eine Standard Western-Blot Prozedur.

• Auswertung:

Für die Auswertung wurden die Nitrocellulose Membranen auf der Höhe der 70kDa Banden horizontal durchgeschnitten und die Teile in α -V5- oder α -Actin-Primär-Antikörper inkubiert. Nach erfolgter Chemolumineszenz-Detektion wurden die Röntgenfilme mit Hilfe eines herkömmlichen Scanner digitalisiert. Die Auswertung erfolgte durch densitometrisches Ausmessen der Banden mit dem AlphaEaseFC 4.0 Programmes. Die Werte wurden gegen den Actin-Wert abgeglichen (Ladekontrolle) und in Excel mit Hilfe des Student's t-Test auf eventuelle signifikante Unterschiede getestet.

2.2.5 Statistik

Für alle statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurde Excel (Microsoft) verwendet. Aus den Daten von jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen wurde zuerst der Mittelwert ermittelt. Anschließend wurden sowohl der Standardfehler als auch der „standard error of mean“ (SEM) berechnet. Um die Ergebnisse auf eine Signifikanz hin

zu überprüfen wurde der Student's t-Test angewandt, dieser erfolgte zweiseitig nach dem Typ 3. Eine Signifikanz wurde bis zu einem $t < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

Mutationen in den verschiedenen Neurofilament Untereinheiten (L und H) konnten bereits neurodegenerativen Erkrankungen zugeordnet werden. Den Ursachen der Erkrankungen konnten meist Fehlfunktionen der Untereinheiten zugeschrieben werden, wie zum Beispiel übermäßige Phosphorylierung, Aggregation oder fehlende Filamentbildung. In Vorarbeiten von Krüger und Kollegen konnten zwei bisher unbekannte Mutationen in der Neurofilament-M Untereinheit bei Parkinson Patienten identifiziert werden. Beide befinden sich in zwischen verschiedenen Spezies hoch konservierten Domänen (siehe Abb. 3.1). Zuvor wurde bereits eine Mutation von Lavedan und Kollegen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Mutationen mit Blick auf eine mögliche Bedeutung für die Pathogenese der Parkinson Krankheit funktionell durch ektope Überexpression des mutierten Proteins im Zellkulturmodell charakterisiert.

Die Pro725Gln Mutation konnte bei einem sporadischen Parkinson Patienten und seinem nicht-betroffenen dizygoten Zwillingenbruder nachgewiesen werden. Der 64-jährige Patient zeigte erste Symptome mit 51 Jahren und sprach gut auf eine Levodopa-Therapie an. Die Familienanamnese war negativ (5 Geschwister und 4 Kinder). Dieser Basenaustausch von C zu A konnte in einer Kontrolle von 472 Chromosomen gesunder Probanden nicht gefunden werden. Ein anderer Patient mit familiärer Parkinson Erkrankung wies eine 3bp umfassende Deletion an Basenpaar-Position 2485 auf. Die Deletion führt auf Aminosäureebene zu einer Deletion von Valin an Position 829 ohne Leserahmenverschiebung. Die Deletion konnte bei keiner gesunden Kontrollperson gefunden werden, allerdings ko-segregierte sie in der Untersuchung des ebenfalls betroffenen Sohns des Indexpatienten nicht in der betroffenen Familie. Die von Lavedan und Kollegen identifizierte Gly336Ser Mutation konnte bei dieser Untersuchung bei keinem deutschen Parkinson-Patienten nachgewiesen werden und wurde als weitere PK-assoziierte NF-M Mutation in dieser Arbeit mitgeführt.

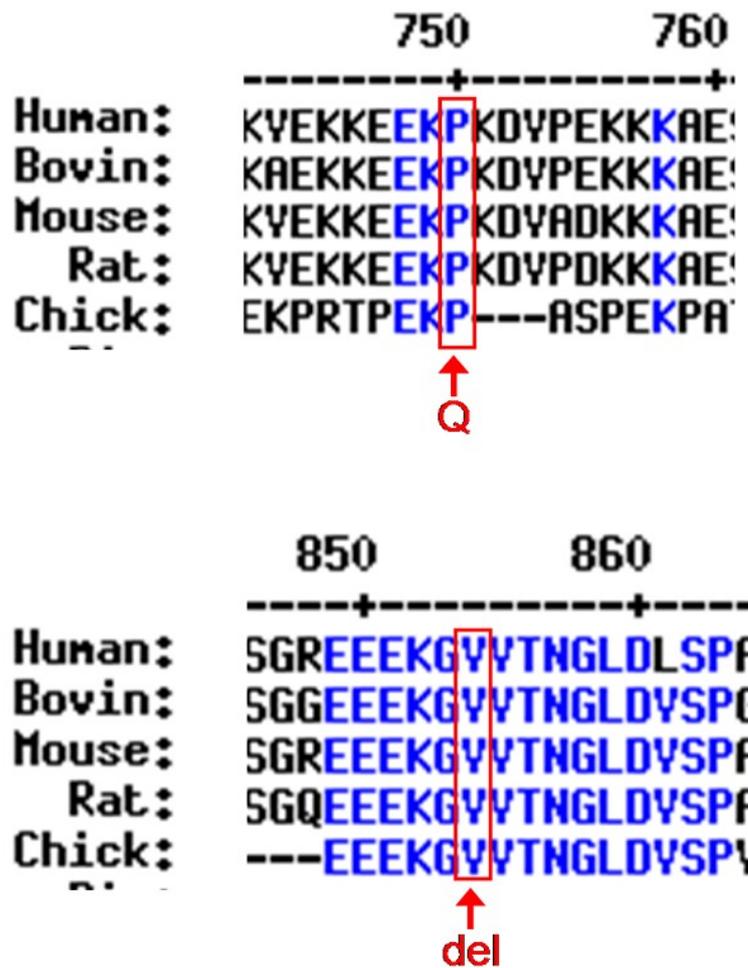


Abbildung 3.1: Alignment der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Spezies an der jeweiligen Stelle der gefundenen Mutationen. Es zeigt, daß die Mutationen in hoch konservierten Domänen des Proteins sind. [143]

3.1 Überexpression von NF-M-GFP / NF-M-V5/His Fusionsprotein in HEK 293 und SH-SY5Y-Zellen

In dieser Arbeit wurden je nach zu untersuchender Fragestellung zwei verschiedenen Expressionskonstrukte verwendet. Die Konstrukte beinhalteten NF-M WT / Mut mit jeweils einem fusionierten C-terminalen GFP- oder V5/His-tag. Für Fragestellungen der zellulären Lokalisation bzw. des Transports wurden Konstrukte mit einem EGFP-tag verwendet, da diese direkt in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnten. Für verschiedene Expressionsanalysen wurden Konstrukte mit einem V5/His-tag verwendet.

Zuerst wurden die verschiedenen Konstrukte hinsichtlich ihrer Expression in HEK 293-

Zellen getestet. Die Zellen wurden dazu für 48 Stunden mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert und anschließend lysiert. Es erfolgten Western-Blot-Analysen, der Nachweis erfolgte über Antikörper gegen den jeweiligen *tag*. Es konnte gezeigt werden, daß alle Konstrukte gleich gut in HEK 293-Zellen exprimiert werden. Auffallend bei der Expression der unterschiedlichen Konstrukte war, daß die NF-M-EGFP Konstrukte im Western-Blot eine distinkte Bande bei ca. 160kDa zeigten (siehe Abb. 3.2). Dies entspricht der aus der Literatur zu erwartenden Größe der NF-M und GFP Peptide. Alle Konstrukte mit V5/His-*tag* hingegen zeigten je 2 Doppelbanden bei ca. 140kDa und 120 kDa. Dieses Phänomen könnte verschiedenen Stufen der Phosphorylierung der jeweiligen Konstrukte entsprechen, und die Proteine je nach Phosphorylierungsgrad unterschiedliche Banden ergeben. Ebenfalls kommen Abbauprodukte des V5/His markierten Konstrukts als Ursache in Frage.

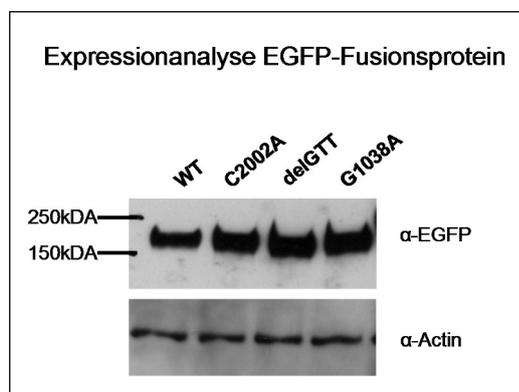


Abbildung 3.2: Für die Expressionsanalyse der NF-M-EGFP Konstrukte wurden HEK 293-Zellen ausgesät und für 48 Stunden mit je $2\mu\text{g}$ Plasmid-DNA transfiziert. Die Lysate wurden mit einem Triton-Puffer hergestellt und stellen somit die lösliche Fraktion dar.

Für die Generierung stabil exprimierender Zellen wurden jeweils HEK 293- und SH-SY5Y-Zellen mit dem V5/His-*tag*-Konstrukt transfiziert und nach 48 Stunden einem Selektionsdruck durch G418 ausgesetzt. Die Selektion erfolgte über 2 Wochen und der Erfolg der Expression wurde ebenfalls über Western-Blot-Analysen bestätigt (siehe Abb. 3.3).

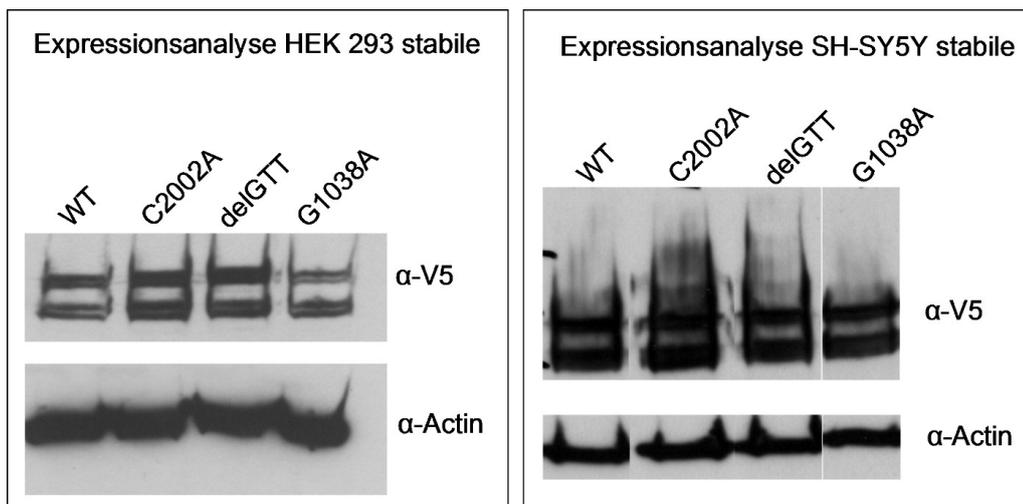


Abbildung 3.3: Um den Erfolg der Transfektion und der Selektion durch G418 zu testen wurden nach ca. 2 Wochen Lysate der Zellen hergestellt und mittels Western-Blot analysiert.

3.2 Rekonstitution des Filamentnetzwerkes

Die Differenzierung von Neuroblasten zu Neuronen wird durch die zeitlich bestimmte Expression von Zytoskelettproteinen bestimmt. Diese sind im speziellen für die morphologische Veränderung, Verlängerung der Axone und Dendriten, zuständig. Die Regulation von Zytoskelettproteinen im besonderen von Intermediärfilamenten während der Entwicklung ist eindeutig beschrieben. Das erste in Neuroblasten exprimierte Protein ist Nestin, welches später durch Vimentin ersetzt wird. Neuronen-spezifische Intermediärfilamente werden in post-mitotischen Zellen exprimiert. Zuerst α -Internexin, gefolgt von den Neurofilament-Untereinheiten L, M und H [151].

Um funktionelle Aussagen über die Ausbildung von Filamentnetzwerken machen zu können wurden SW13⁻ Zellen gewählt. Diese Zellen eignen sich besonders, da keinerlei Intermediärfilamente endogen exprimiert werden. Für die Analyse der Filament-Bildung wurde physiologisches NF-L mit Wildtyp oder mutiertem NF-M ko-transfiziert. Als Kontrolle wurden sowohl NF-L als auch NF-M einzeln überexprimiert. Wie in der Literatur beschrieben, konnten beobachtet werden, daß NF-L *in vitro* in der Lage ist Filamente auszubilden, was die Fähigkeit zur Homodimerbildung voraussetzt (siehe Abb. 3.4). Die Transfektion von SW13⁻ erwies sich als äußerst komplex, und bedurfte einer aufwendigen Etablierungsphase. Hierfür wurden Zellen in verschiedenen Konzentrationen ausgesät und mittels verschiedener Transfektionsreagenzien (FuGENE[®], METAFECTENE[™], Ca-Izium-Phosphat) transfiziert. Sowohl die eingesetzte DNA Menge als auch die Verhältnisse von DNA zu Transfektionsreagenz wurden dabei variiert. Eine akzeptable Transfek-

tionseffizienz (ca. 10%) konnte nur mit FuGENE[®]6 erreicht werden.

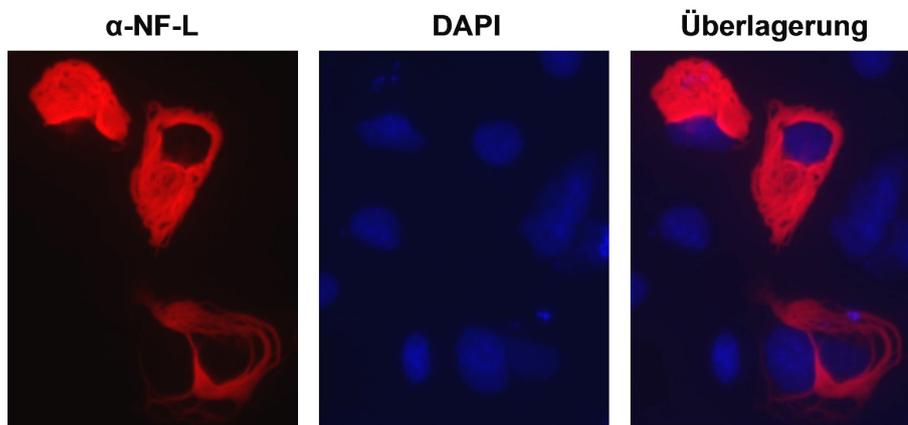


Abbildung 3.4: Ausbildung des Filamentnetzwerkes in SW13⁻ Zellen bei Transfektion von physiologischem NF-L. Es konnte die in der Literatur beschriebene Filamentausbildung als Hinweis auf eine Homodimerbildung bestätigt werden.

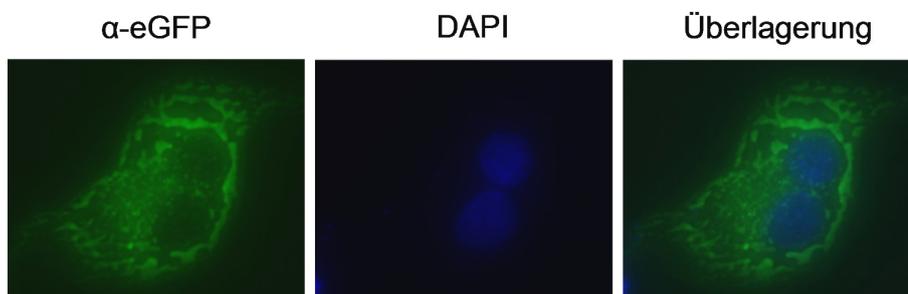


Abbildung 3.5: Fixationsartefakte wie dieses entstehen bei einer Einzeltransfektion mit NF-M und der Fixierung mittels PFA. Bei einer Methanolfixierung entstehen diese Strukturen nicht, es kommt zu einer zytoplasmatischen Anfärbung.

Die einzelne Expression der NF-M Konstrukte führte je nach Fixationsart, entweder zu einer zytosolischen Verteilung (Methanol) oder zu Organellen-ähnlichen (PFA) Strukturen (siehe Abb. 3.5). Letztere konnten nach Ko-Immunfärbungen mit Organellen-spezifischen Antikörpern, gegen das endoplasmatische Retikulum (α -PDI) und Mitochondrien (Mitotracker), als Artefakt identifiziert werden. Es konnte keine Ko-Lokalisation gezeigt werden. Eine Filamentbildung konnte in beiden Fällen nicht beobachtet werden. Eine Ko-Expression beider Untereinheiten, NF-L und NF-M, führten zu einer deutlichen und vollständigen Filamentbildung (siehe Abb. 3.6). Es konnte gezeigt werden, daß alle

Mutationen in gleichem Maße in der Lage sind Filamentnetzwerke auszubilden wie der WT. Die Filamentbildung ist Grundvoraussetzung für einen korrekten Transport.

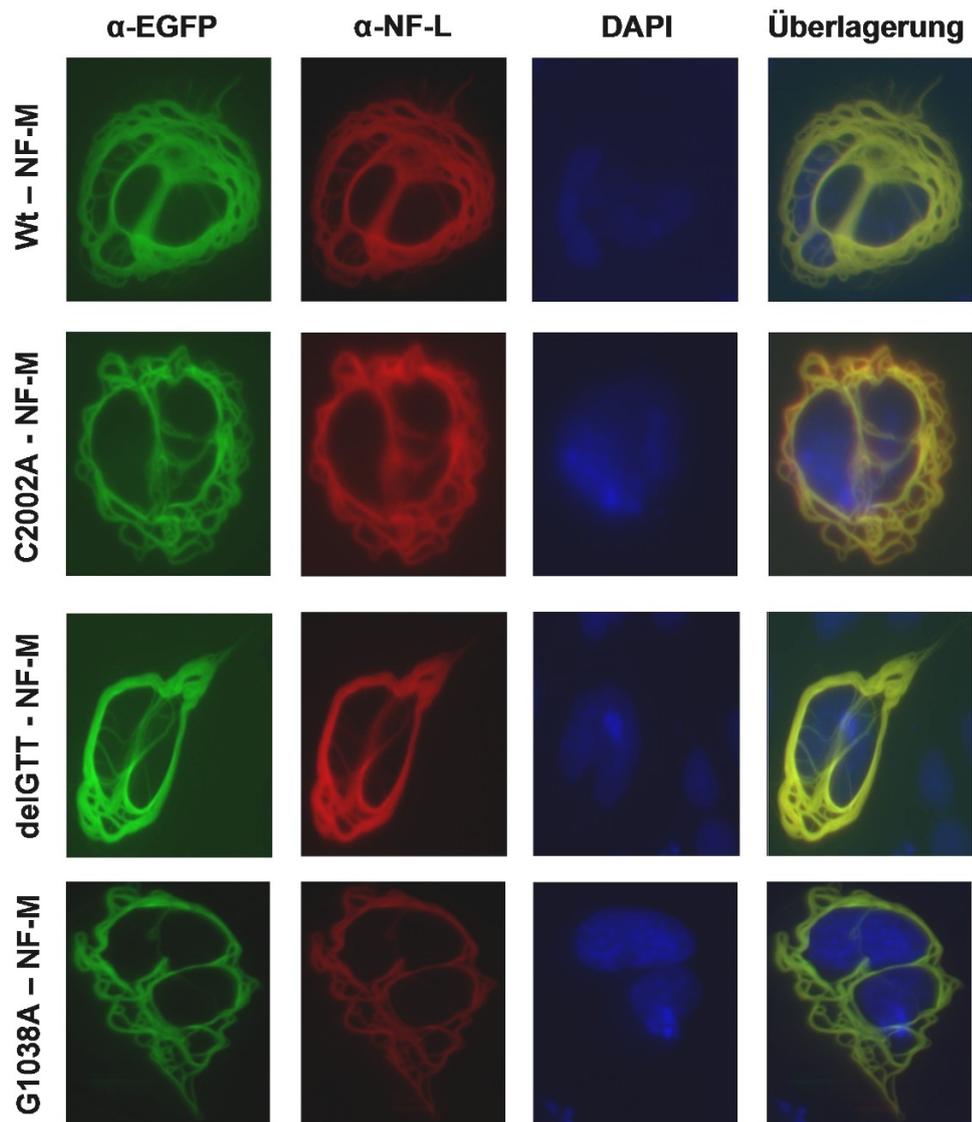


Abbildung 3.6: Ausbildung des Filamentnetzwerkes in SW13⁻ Zellen unter Ko-Transfektion von physiologischem NF-L und NF-M WT respektive Mutationen für 48 Stunden. Für alle NF-M Varianten konnte gezeigt werden, daß eine Filamentbildung ohne sichtbare Unterschiede erfolgte.

3.3 Transport

Ein wichtiger Anhaltspunkt auf die Entstehung Neurofilament-bedingter Erkrankungen ist ein normaler bzw. gestörter Transport der Filamente aus dem Zytosol der Neuronen in und entlang der Axone. Um eventuelle Störungen im Transport von Neurofilament zu beobachten wurden CAD Zellen gewählt. Diese Zellen entstanden aus einer katecholaminergen Zell-Linie, Cath.a. CAD-Zellen sind eine Variante von Cath.a-Zellen, welche reversibel morphologisch zu Neuronen-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden können. Diese Ausdifferenzierung erfolgt durch Serumentzug, was zu einem Teilungsstopp und der Ausbildung langer, axonähnlicher Fortsätze führt. CAD-Zellen weisen sowohl biochemisch als auch morphologisch Charakteristika von primären Neuronen aus, was sie zu einem etablierten Modell des Studiums des axonalen Transports macht [152].

Perez-Olle und Kollegen zeigten für die Gly336Ser Variante, daß sowohl das WT Protein als auch das mutierte einem normalen axonalen Transport in CAD-Zellen unterliegen [149]. Weiterhin konnte diese Gruppe zeigen, daß im Falle des Transports der fusionierte EGFP-tag keinen Einfluß auf die biochemischen Eigenschaften von NF-M hat. Für die Analyse des Transports wurden CAD-Zellen für 96 Stunden in serumfreien F12 Medium auf Deckgläschen ausdifferenziert und anschließend transfiziert. Im Rahmen der Vorarbeiten wurde ein Transfektionsprotokoll für CAD Zellen etabliert. Eine Transfektion konnte nur mittels FuGENE[®]HD erreicht werden, mit einer eingeschränkten Effizienz von ca. 5%. Bei der Verwendung von METAFECTENE[™] konnte keine Transfektion nachgewiesen werden. Die klassische Calcium-Phosphat-Transfektionsmethode führte zu einem Absterben der Zellen. Da eine kontinuierliche Beobachtung des Transports in lebenden Zellen technisch nicht möglich war, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeiten nach der Transfektion fixiert und mikroskopiert. Sowohl das WT als auch das mutierte NFM Protein wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten in derselben Entfernung zum Soma gefunden. Diese statische Betrachtungsweise kann allerdings nicht zeigen ob sich die einzelnen Varianten in einem antero- oder retrograden Zustand des Transports befinden. Nach einer Expressionszeit von 48 Stunden konnte eine Anreicherung von NF-M an den Ausläufern („Tips“) der Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 3.7), daraus kann man schließen, daß alle Varianten nach 48 Stunden axonal über die gesamte Strecke transportiert werden können.

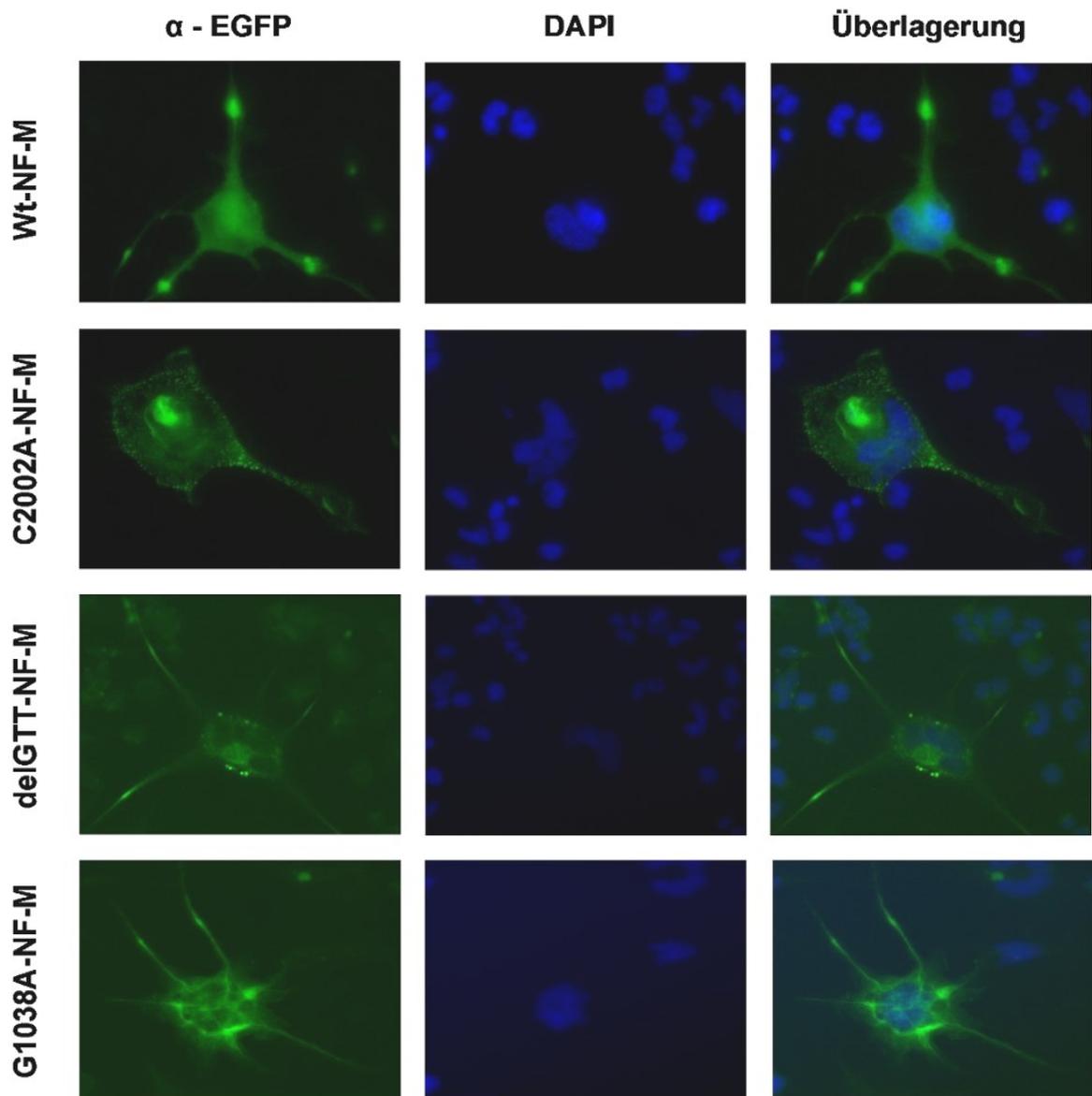


Abbildung 3.7: Ausdifferenzierte CAD-Zellen wurden für 48 Stunden transfiziert und anschließend fixiert. Es konnte weder zu diesem, noch zu einem früheren Zeitpunkt der Fixierung Unterschiede im Transportverhalten von NF-M WT oder den Mutationen gefunden werden.

3.4 *Steady-state* / Degradation

In der Literatur werden verschiedene Abbaumechanismen für Neurofilament Proteine beschrieben. Erste Hinweise zu einem möglichen Mechanismus gaben ubiquitinierte Neurofilament-Aggregate in Lewy Körpern in Gehirnen von Parkinson-Patienten. Neurofilament Ubiquitinierung wurde bereits direkt durch Western-Blot-Analysen [82] und indirekt über proteasomale Hemmung mit anschließender Aggregation [153] gezeigt. Calpain ist eine Calcium-abhängige Protease, welche mehrfach in der Literatur beschrieben wird Neurofilamente zu degradieren [154, 94, 155, 76, 156]. Calpaine sind nur bedingt spezifisch und haben eine limitierte Abbaurate, man geht davon aus, daß dies zu einer Regulierung der Neurofilament-Homöostase beiträgt. Autophagie stellt den zweit wichtigsten Abbauweg von Proteinen und Organellen in der Zelle. Neueste Untersuchungen zeigen den Zusammenhang zwischen UPS und Autophagie [81]. Autophagie stellt den Hauptabbauweg von langlebigen Proteinen, Zytoskelettbestandteilen und Organellen dar. Eine Hemmung der Autophagie bei Mäusen führt zu neurodegenerativen Erkrankungen [91, 92]. Weiterhin wurde beschrieben, daß Protein-Aggregate äußerst effektiv über Autophagie abgebaut werden können [85, 157, 158].

Um Hinweise auf die Abbaurate von NF-M zu erhalten wurde zunächst die Neu-Synthese inhibiert um mögliche Unterschiede zu erkennen. Die Neusynthese wurde durch Cycloheximid, einem Translationsinhibitor, gehemmt und die Proteinmenge mittels Western-Blot analysiert. Die Hemmung mittels Cycloheximid erfolgte für 4, 16 und 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen lysiert und jeweils gleiche Proteinmengen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Western-Blot-Analysen wurden digital densitometrisch ausgewertet. Der Bezugspunkt war jeweils der unbehandelte Wert, welcher auf 1 gesetzt wurde. Es gab Hinweise, daß die Abbaurate für die C2002A-Variante schneller und auch in einem erhöhten Ausmaß gegenüber dem WT statt findet. Bei einer Signifikanzbestimmung mittels Student's-t-Test konnte eine Signifikanz für die C2002A-Variante errechnet werden. Eine Hemmung der Proteinsynthese scheint in dem beobachteten Zeitraum sowohl auf die Protein-Menge von delGTT- als auch die G1038A-Variante kaum einen Einfluß zu haben (siehe Abb. 3.8). Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß möglicherweise verschiedene Abbaukinetiken oder -mechanismen zugrunde liegen. Aus diesem Grund wurden Versuche zur Analyse verschiedener Abbauege durchgeführt.

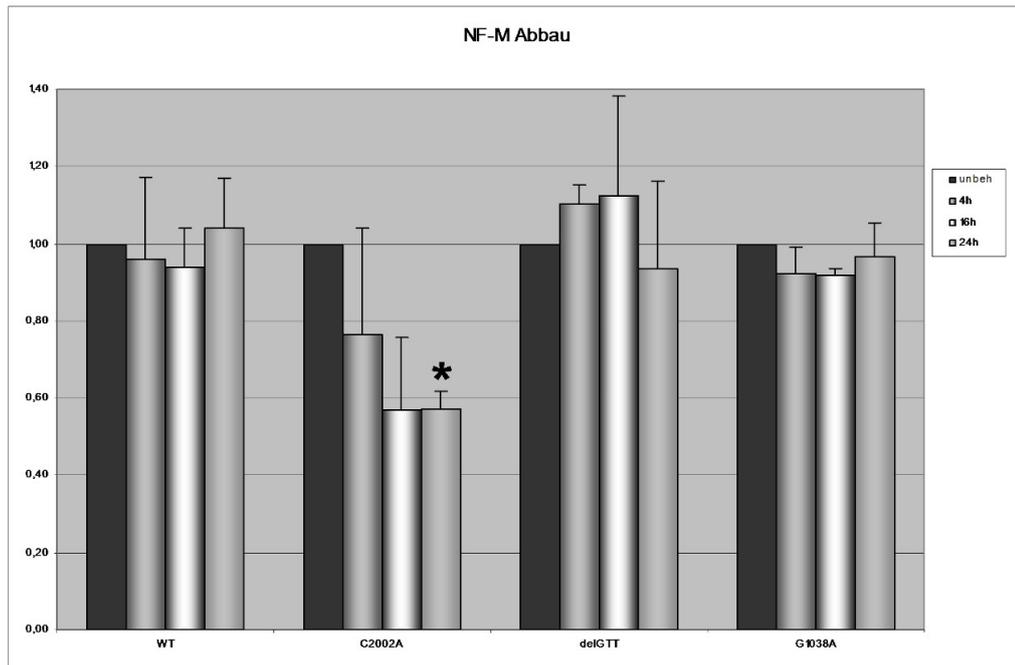


Abbildung 3.8: Die im Diagramm dargestellten Werte beziehen sich auf densitometrische Auswertungen der Western-Blot-Analysen bezüglich der Abbaugeschwindigkeit von Neurofilament. Für diese Analyse wurden die stabil exprimierenden SH-SY5Y-Zellen mit dem Proteinneusynthese Inhibitor Cycloheximid für jeweils 4, 16 und 24 Stunden behandelt und anschließend die Proteinmengen mittels Western-Blot bestimmt. Für die C2002A-Variante konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Proteinmenge nach 24 Stunden gezeigt werden.

Um mögliche Abbaumechanismen zu untersuchen wurden stabil NF-M exprimierende SH-SY5Y-Zellen verschiedenen Inhibitoren ausgesetzt und mittels Western-Blot-Analysen ausgewertet. Ziel war es unter der Hemmung der verschiedenen Abbauwege (UPS, Calpain, Autophagie) einen Anstieg der Protein-Menge zu erhalten. Die Zellen wurden dafür in 6-well-Platten ausgesät und für 48 Stunden kultiviert. Die jeweilige Hemmung erfolgte für das UPS mit MG132 für 16 Stunden, Autophagie durch Bafilomycin A1 für 4 Stunden und Calpain mittels MDL28170 für 6 Stunden. Die Dauer und die Konzentrationen ergaben sich aus Literaturangaben und eigenen Vorversuchen für eine vollständige Hemmung des betreffenden Mechanismus. Insgesamt zeigt sich, daß das WT NF-M Protein in einem größeren Maße angereichert wird als die einzelnen Mutationen. Anhand der großen Schwankungen konnte statistisch keine sichere Aussage über einen möglichen Haupt- bzw. Nebenabbauweg gemacht werden (siehe Abb. 3.9). Es gibt keine bevorzugte Anreicherung der Proteinmenge unter einem der verschiedenen Inhibitoren, was darauf

schließen läßt, daß alle 3 Abbauwege involviert sein können. Der im vorhergehenden Versuch gefundene Effekt des schnelleren Abbaus der C2002A-Variante konnte nicht weiter ursächlich geklärt werden und ist möglicherweise auf eine erhöhte Instabilität zurückzuführen. Da in der Literatur Hinweise zwischen dem NF-Abbau bzw. der NF-Stabilität und der Phosphorylierung dargestellt werden, Abbau zusammen mit Phosphorylierung erwähnt wird, wurde im folgenden die Phosphorylierung mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

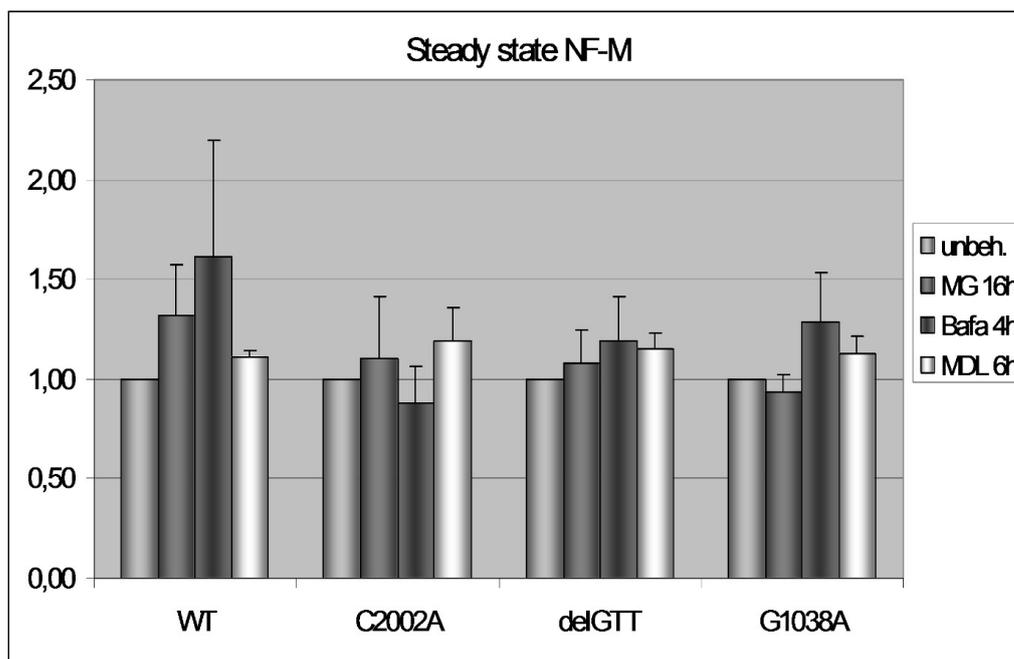


Abbildung 3.9: Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen nach der Hemmung der entsprechenden Abbaumechanismen. Die Werte der unbehandelten Zellen wurden jeweils auf 1 gesetzt.

3.5 Phosphorylierung

Man geht davon aus, daß Neurofilamente zu den am stärksten phosphorylierten Proteinen im Gehirn und auch im gesamten Körper zählen. Die Phosphorylierung hat mehrere Funktionen. Es wurde bereits gezeigt, daß hyperphosphorylierte Neurofilamente Bestandteile von sowohl Lewy-Körpern bei Parkinson als auch NFT's bei Alzheimer sind. Dies sind Hinweise auf eine fehlregulierte Phosphorylierung als Ursache der Aggregat-Bildung. In wieweit diese übermäßige Phosphorylierung direkt als Ursache der Erkrankung gesehen werden kann ist noch nicht aufgeklärt.

Zur quantitativen Charakterisierung der Phosphorylierung standen Antikörper zur Verfügung, welche ausschließlich phosphoryliertes NF-M erkennen [41]. Es war somit möglich den Grad der Phosphorylierung mit Hilfe von Western-Blot-Analysen zu untersuchen. Für die Versuche wurden stabil exprimierende NF-M-V5/His SH-SY5Y-Zellen verwendet. Es wurden Zell-Lysate mittels RIPA-Puffer hergestellt und in Teilen davon das Neurofilament über Talon angereichert. Die Anreicherung erfolgte, da in Vorversuchen mit Proteinmengen von $30\mu\text{g}$ kein phosphoryliertes WT NF-M detektiert werden konnte (s. Abb. ??PhosphoIP). NF-M wurde sowohl über einen Phospho-spezifischen- als auch über einen V5-Antikörper nachgewiesen. Dabei wird die delGTT-Variante erheblich stärker phosphoryliert als das WT Protein. Die C2002A-Variante wird augenscheinlich weniger phosphoryliert und die G1038A-Variante entspricht im Ausmaß der Phosphorylierung in etwa dem WT (siehe Abb. 3.10). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine Instabilität der C2002A-Variante durch eine verminderte Phosphorylierung sein. In wieweit Phosphorylierung mit dem Abbau von NF-M durch das Proteasom zusammenhängt sollte im Folgenden mit Hilfe eines Degron-markierten Grün-fluoreszierenden Proteins (GFPu) geklärt werden.

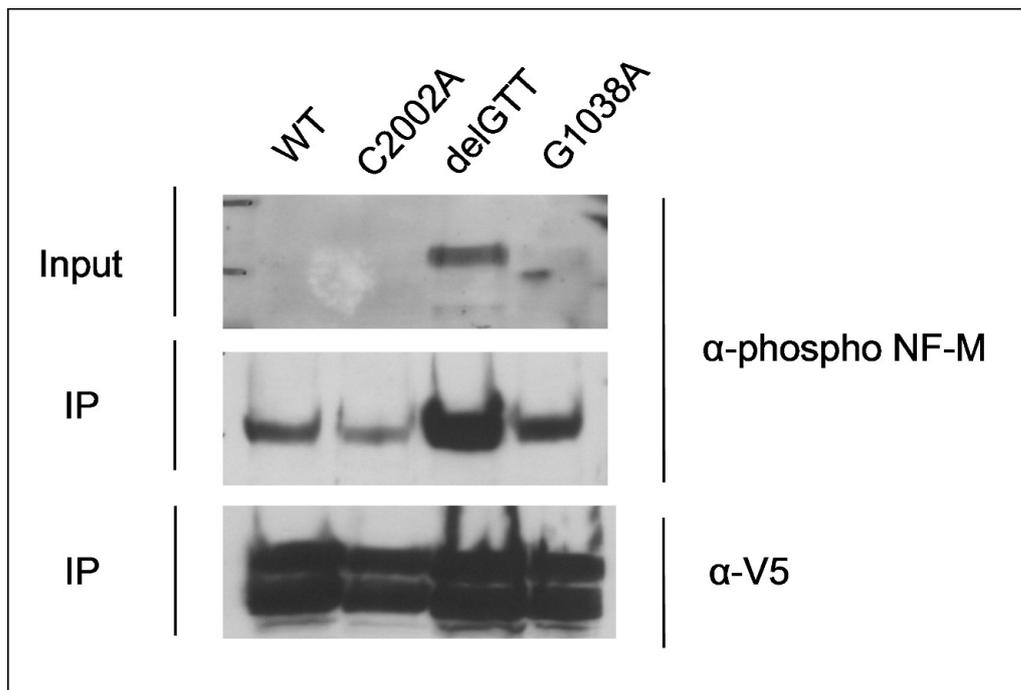


Abbildung 3.10: Stabil exprimierende SH-SY5Y Zellen wurden mittels RIPA-Lysispuffer lysiert und über Talon angereichert (Immunpräzipitation / IP). NF-M wurde jeweils mittels eines Phospho-spezifischen und eines V5-Antikörpers detektiert, dazwischen wurde derselbe Blot *gestrippt* um Antikörperreste zu entfernen. Die delGTT-Variante fällt besonders durch den erhöhten Phosphorylierungsgrad auf.

3.6 Proteasomen-Aktivitäts-Assay

Um eine Hemmung des Proteasomen-Ubiquitin-Systems zu analysieren eignet sich besonders das von Bence *et al.* 2001 publizierte GFPu-System. Dabei handelt es sich um einen Reporter, bestehend aus einem kurzen Degron (CL1), welches an den C-terminus eines GFP-tags angebracht wurde. Mit Hilfe dieses Systems verkürzt sich die Halbwertszeit des GFP-Proteins auf 20-30 Minuten von ursprünglich mehr als 10 Stunden. GFPu kann über einen Proteasomeninhibitor stabilisiert werden, was zu einer Anreicherung führt. Um den Einfluß von NF-M auf das UPS zu analysieren standen polyklonale stabil exprimierende HEK 293-Zellen und monoklonale stabil exprimierende SH-SY5Y-Zellen zur Verfügung. Für die Analysen wurden diese Zellen mit NF-M transfiziert und für 48 Stunden kultiviert. Zur Steigerung eines möglichen Effekts von NF-M auf das UPS wurde jeweils ein Ansatz mit dem Proteasomeninhibitor MG132 behandelt. Für die Analyse wurde die Hälfte der Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und die andere Hälfte für Western-Blot-Analysen mittels RIPA-Puffer lysiert. Bei der FACS Analyse wurden die GFP-positiven Zellen gezählt, was den Zellen mit einer proteasomalen Hemmung des GFPu-Abbaus entsprach. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Summit Software von Dako Cytomation. Die Western-Blot-Analysen dienten als Transfektionskontrolle, um die gleichmäßige Expression von NF-M zu überprüfen (siehe Abb. 3.12). Bereits die alleinige Expression von NF-M führte zu einer je nach Variante (WT oder Mut) zu einer proteasomalen Hemmung (siehe Abb. 3.11). Dabei fällt auf, daß die delGTT-Variante, welche bereits bei der Phosphorylierung Hinweise auf ein unphysiologisches Verhalten aufwies, eine signifikante Hemmung des Proteasoms verursacht. Eine zusätzliche Hemmung des Proteasoms durch MG132 in verschiedenen Konzentrationen und/oder Zeiten führte zu keiner Modulation der proteasomalen Funktion bei Zellen die das delGTT mutierte NF-M exprimieren. Es kam stets zu einer vollständigen Hemmung ohne differenzierbare Unterschiede zwischen den einzelnen Mutationen und dem Wildtyp. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt sowohl in den verwendeten polyklonalen HEK293- als auch in den monoklonalen SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden konnte. Weitere Aussagen über die Art der Hemmung des Proteasoms sollten weitere Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von NF-M klären. Von anderen mit der Parkinson-Krankheit assoziierten Proteinen wie α -Synuklein und Synphilin-1 ist ebenfalls ein Einfluss auf die Proteasomen-Funktion bekannt, wobei fehlgefaltetes Protein häufig in Form von Aggregaten im Zytoplasma ausfällt. Dies sollte aufgrund der Beobachtungen zur Proteasom-Funktion auch bei den verschiedenen NF-Varianten analysiert werden

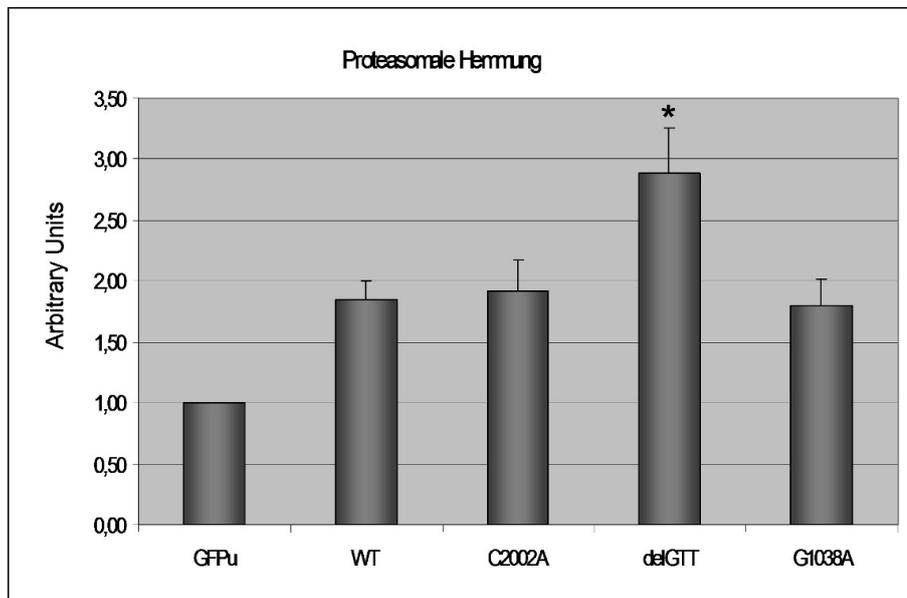


Abbildung 3.11: Bereits die transiente Überexpression von NF-M in stabil exprimierenden GFPu Zellen führte zu einer Hemmung des Proteasoms. Für die delGTT-Variante konnte statistisch eine Signifikanz errechnet werden ($p < 0,05$).

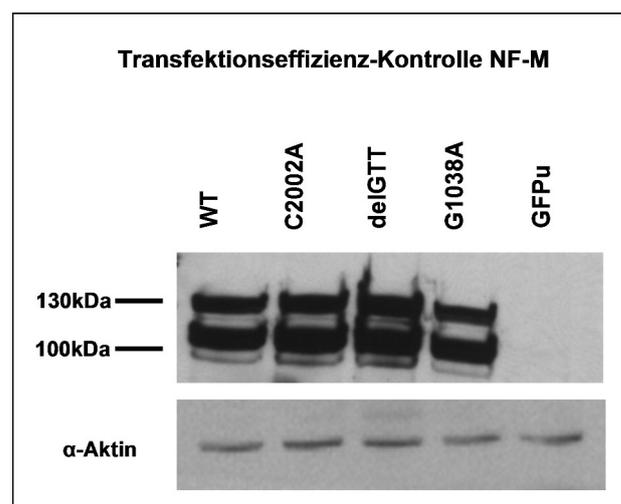


Abbildung 3.12: Die erfolgreiche Transfektion mit gleichmässiger Expression von NF-M in stabil exprimierenden GFPu Zellen wurde mittels Western-Blot-Analysen bestätigt.

3.7 Aggregationsverhalten

Die für Parkinson typischen Lewy-Körper ähneln sich stark in Struktur und Zusammensetzung den sogenannten Aggresomen. Sowohl LK's als auch Aggresomen setzen sich aus verschiedenen Proteinen zusammen. So enthalten beide beispielsweise Tubulin, Ubiquitin und Vimentin, welche sich als Marker dieser Strukturen eignen. In diesem Versuch wurde zum einen geklärt in wie weit diese Marker sich in NF-M Aggregaten nachweisen lassen und ob es Unterschiede zwischen dem WT und den Mutanten in Bezug auf die Anzahl der Aggregate gibt. Hierfür wurden stabil exprimierende HEK 293-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für 48 Stunden kultiviert. Die stabile Überexpression der verschiedenen NF-M Proteine führte in HEK293-Zellen zu keiner nachweisbaren Aggregation. Um eine Aggregatbildung auszulösen wurde das Proteasom mit dem Inhibitor MG132 gehemmt. Für die anschließenden Färbungen wurden stabil exprimierende HEK 293-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und nach 32 Stunden für 16 Stunden mit $10\mu\text{M}$ MG132 behandelt. Diese führte zu einer vollständigen Inhibition des Proteasoms. Die Zellen wurden anschließend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen V5 (NF-M) und Vimentin inkubiert und visualisiert. Wie man deutlich erkennen kann, ko-lokalisieren NF-M und Vimentin sowohl im behandelten als auch im unbehandelten Zustand. Auffallend ist die filamentöse Struktur, welche den HEK 293-Zellen einen neuronalen Phänotyp verleiht. Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Aggregaten um sogenannte Aggresomen handelt, welche sich in ihrer typischen Weise an den Zellkern lagern (siehe Abb. 3.13).

Weiterhin sollte geklärt werden, ob es in der Zahl der Aggregate Unterschiede zwischen dem WT und den Mutanten gibt. Dieselben Zellen, HEK293, wurden mit verschiedenen Konzentrationen von MG132 und für verschiedenen Zeitintervalle behandelt um ein Zwischenstadium abzubilden, in welchem noch keine vollständige Aggregation auftritt. Wie im vorhergehenden Versuch gezeigt führte eine Inkubation für 16 Stunden mit $10\mu\text{M}$ MG132 zu einer vollständigen Hemmung des Proteasoms. Geringere Konzentrationen an MG132 für ebenfalls 16 Stunden zeigten gleichfalls eine vollständige Hemmung. Sowohl die Zeitintervalle als auch die Konzentration des Inhibitors wurden verringert. Als bester Zeitpunkt ergab sich eine Behandlungsdauer von 6 Stunden bei einer Konzentration von $5\mu\text{M}$. Bei diesem Ansatz wurden die Zellen mit Antikörpern gegen V5 (NF-M), Ubiquitin und einem speziellen Farbstoff für die Zellkerne gefärbt und visualisiert (siehe Abb. 3.14). Für die Auswertung wurden Übersichtsbilder in 20facher Vergrößerung angefertigt und anschließend manuell ausgewertet. Pro Gesichtsfeld wurden zwischen 20 und 40 Zellkerne visualisiert. Für die Analyse wurden die Zellkerne sowie Aggregat-positive Zellen gezählt, wobei zwischen 100 und 300 Zellkerne gewertet wurden, was durchschnittlich ca.

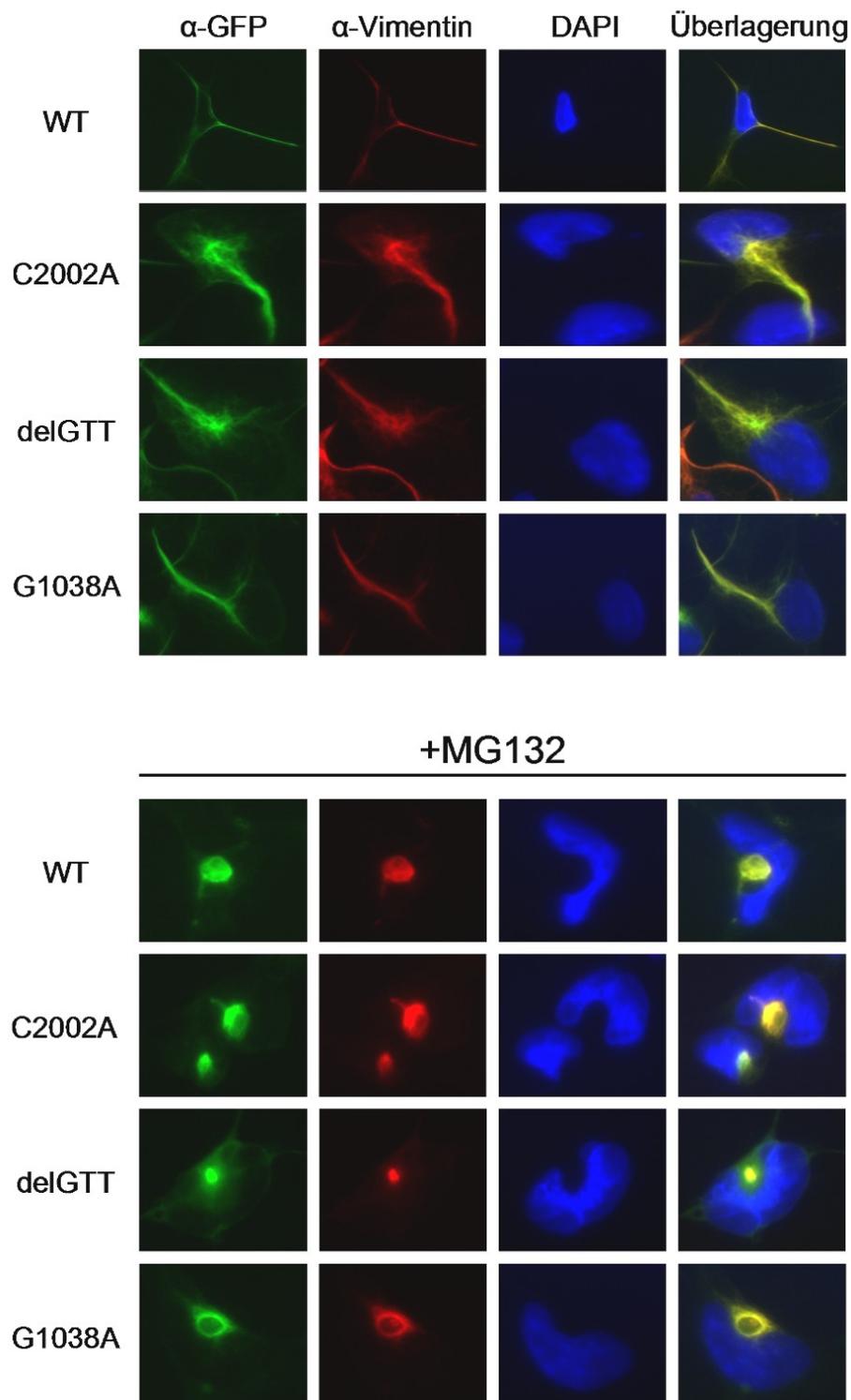


Abbildung 3.13: Sowohl der WT als auch die mutierten NFM Proteine ko-lokalisieren mit Vimentin in unbehandeltem Zustand. Eine filamentöse Struktur führt zu einem neuronalen Phänotypen der Zellen. Eine Behandlung mit MG132 für 16 Stunden in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ führt zu einer vollständigen Aggregation von NF-M und Vimentin

10 Gesichtsfeldern entsprach. Die Auswertung erfolgte unabhängig und geblindet durch Frau Sabine Kautzmann, welche nicht in das Projekt involviert war. Weiterhin wurden die Aggregate in Ubiquitin-positiv oder -negativ differenziert. Es konnte gezeigt werden, daß alle Mutationen weniger zu einer Aggregatbildung neigen als das Wildtyp Protein. Die delGTT- und G1038A-Variante zeigten sogar eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) geringere Aggregatbildung. Weniger als die Hälfte aller Aggregate zeigte eine Ko-Lokalisation von NF-M und Ubiquitin. In einigen Zellen kam es zu unabhängigen Aggregaten von jeweils Ubiquitin und NF-M. Die G1038A-Variante zeigte ebenso eine statistisch signifikante geringere Anzahl an Ubiquitin-positiven NF-M Aggregaten (siehe Abb. 3.15). In Zusammenhang mit dem Aggregationsverhalten wurde weiterführend die Löslichkeit von NF-M untersucht.

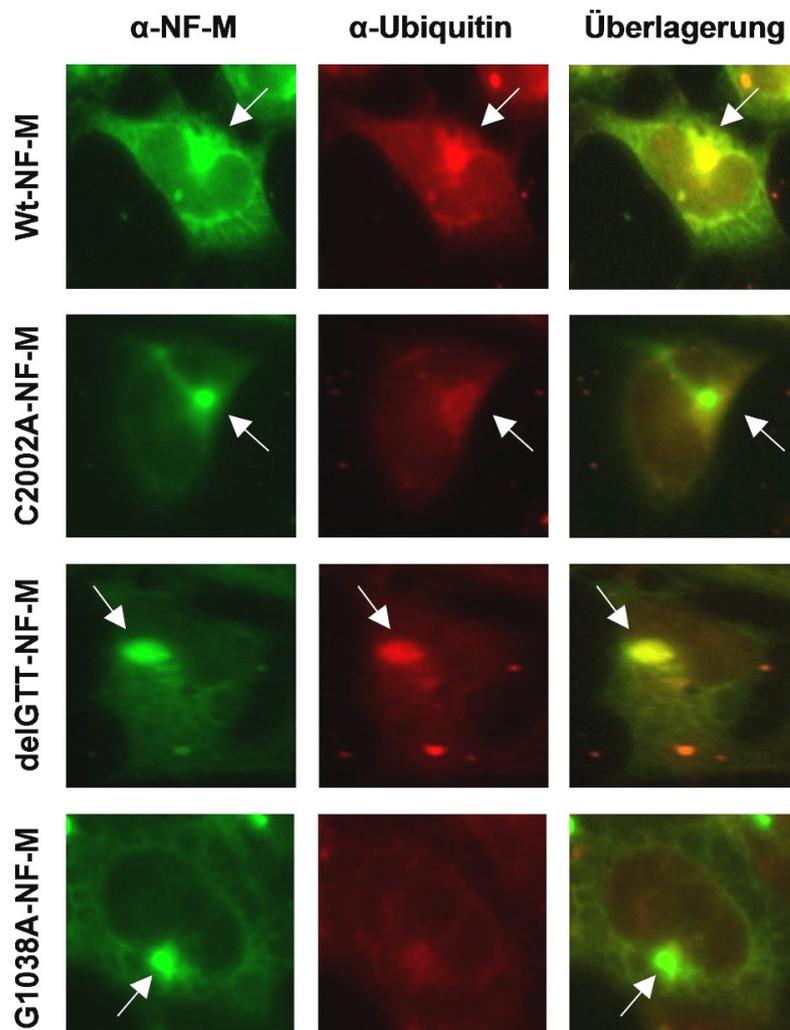


Abbildung 3.14: Ausschnitt der Übersichtsbilder mit Aggregaten (Pfeil), welche zum Teil auch ubiquitiniert sind.

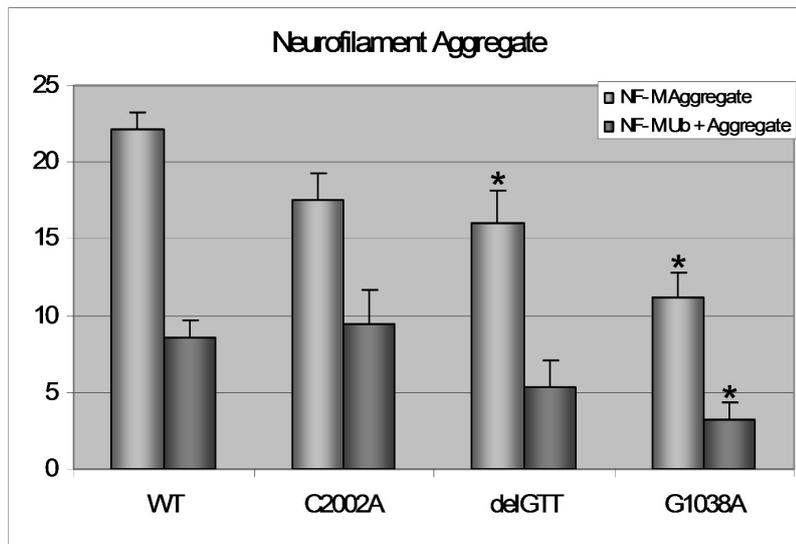


Abbildung 3.15: Anzahl der NF-M Aggregate und Ubiquitin-positiven Aggregate.

3.8 Untersuchung des Löslichkeitsverhalten

Eine besondere Eigenschaft von Neurofilamenten ist ihre Unlöslichkeit in Puffer mit physiologischen Ionenstärke oder pH. Intermediärfilamente sind völlig resistent gegenüber Puffern mit hoher Ionenstärke oder Detergenzien wie Natriumchlorid oder Triton-X-100. Die Ursache hierfür ist das komplexe Zusammenspiel der sauren *Rod*-Dömäne mit der basischen *Head*-Dömäne. Entfernt man die *Head*-Domäne lösen sich die Filamente bereits unter physiologischen Bedingungen [159]. Neurofilament-Proteine, die sich in Form von Intermediärfilamenten anordnen und/oder aggregieren sind somit in der Triton-X-100 unlöslichen Fraktion zu erwarten. Für die Analyse des Löslichkeitsverhalten im Vergleich zwischen WT und den verschiedenen Mutationen wurden HEK 293-Zellen transient mit sowohl GFP- als auch V5/His-NF-M transfiziert und für 48 Stunden exprimiert. Für die Western-Blot-Analysen wurden aus den Zellen Proteinlysate für jeweils die unlösliche und die lösliche Fraktion hergestellt. Erste Versuche mit EGFP-*tag*-Konstrukten ließen Unterschiede im Löslichkeitsverhalten vermuten (siehe Abb. 3.16). Dieses ließ sich jedoch nicht bei der Verwendung der V5/His-*tag*-Konstrukte bestätigen, so daß es sich um ein durch das große Fusionsprotein bedingten Effekt handelt. Das Ergebnis läßt vermuten, daß der EGFP-*tag* die Struktur von NF-M verändert und so Unterschiede zwischen WT und Mutanten induziert. Eine densitometrische Auswertung der Western-Blots zeigte eine leichte Verschiebung der Mutationen zur unlöslichen Fraktion hin, wobei große interexperimentelle Schwankungen keine Aussage über eine eventuelle Signifikanz zuließen

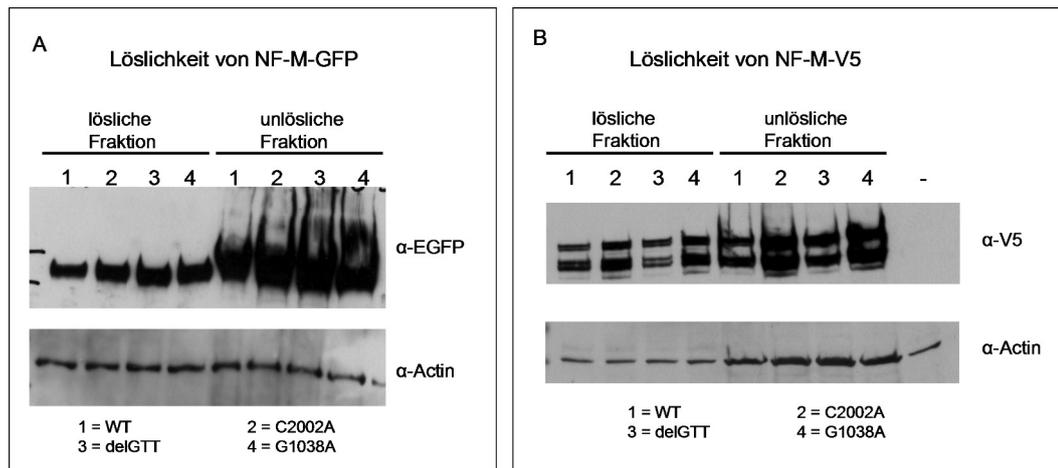


Abbildung 3.16: Um das Löslichkeitsverhalten von NF-M zu testen wurden HEK 293-Zellen mit dem NF-M-EGFP- (A) oder dem NF-M-V5/His- (B) Konstrukt transient transfiziert und für 48 Stunden exprimiert. Die Lysate wurde mit Hilfe zwei verschiedener Puffersysteme in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt.

(siehe Abb. 3.16). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die lösliche bzw. die unlösliche Fraktion einen Einfluß auf die Toxizität haben könnten.

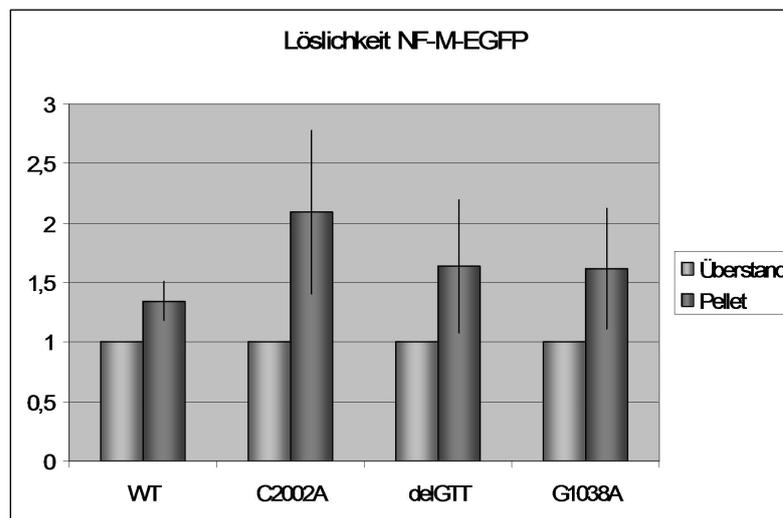


Abbildung 3.17: Die densitometrische Auswertung der Western-Blots für die EGFP-Konstrukte (siehe Abb. 3.16) ergab eine leichte Verschiebung der Mutanten hin zur unlöslichen Fraktion oder Tendenz der mutierten NF-M verstärkt unlösliche Strukturen auszubilden.

3.9 Zellvitalität

In dieser Arbeit wurden stabil exprimierende HEK 293- und SH-SY5Y-Zellen auf ihre Anfälligkeit gegenüber äußeren Stressoren und die involvierten Zelltodmechanismen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 und H_2O_2 als Auslöser für oxidativen Stress behandelt. Es erfolgte eine FACS Analyse mit spezifischen Farbstoffen für apoptotischen und nekrotischen Zelltod.

Für die Nekrose-Assays wurden stabil exprimierende HEK 293-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und für 24 Stunden kultiviert und für weitere 24 Stunden mit $200\mu M H_2O_2$ behandelt. Für die Analyse wurden die Zellen in ein FACS Röhrchen überführt, mit Propidium-Iodid gefärbt und anschließend gemessen. Die Sensitivität der Messung wurde so eingestellt, daß die unbehandelten Zellen einen Grund-Nekrosewert von ca. 20% aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, daß die delGTT-Variante statistisch Signifikant empfindlicher auf oxidativen Stress reagiert, im Vergleich zu WT und den beiden anderen Mutanten (siehe Abb. 3.18).

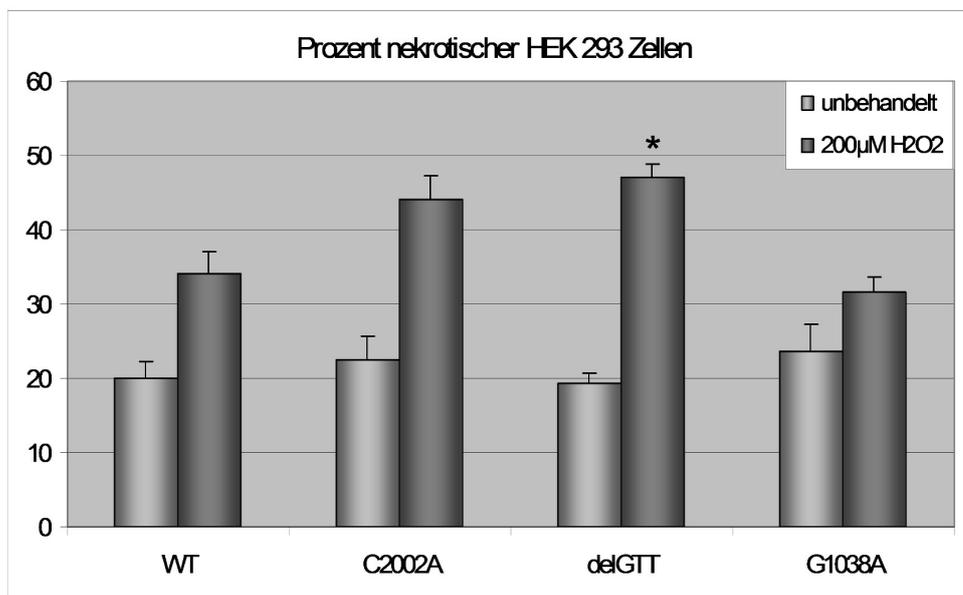


Abbildung 3.18: Es konnte gezeigt werden, daß die delGTT-Variante empfindlicher auf oxidativen Stress mit Nekrose reagiert als der WT.

Für die Apoptose-Assays wurden HEK 293-Zellen mit $10\mu M$ MG132 für 16 Stunden behandelt. Die Färbung erfolgte mit Yo-Pro[®], einem spezifischen Apoptose-Farbstoff. Die Sensitivität der Messung wurde in diesem Fall so eingestellt, daß der WT einen Grund-Apoptosewert von ca. 15% aufwies. Bereits die stabile Überexpression der NF-M Mutan-

ten zeigte einen signifikanten Effekt auf die Apoptose, so daß bereits ohne Behandlung eine erhöhte Apoptose-Rate nachweisbar war. Eine zusätzliche Behandlung mit MG132 zeigte jeweils eine weitere Erhöhung der Apoptose Rate (siehe Abb. 3.19).

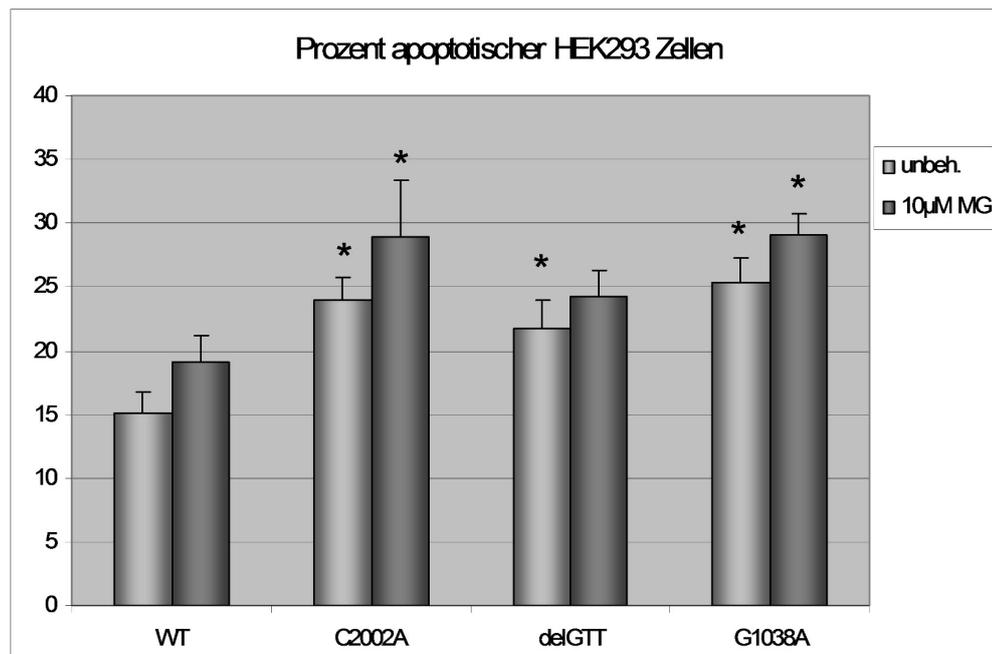


Abbildung 3.19: Es konnte gezeigt werden, daß eine stabile Überexpression der NF-M Mutanten zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose führte.

Um eine Aussage über die Auswirkung der NF-M Mutanten auf neuronale Zellen machen zu können wurde derselbe Versuch mit stabil NF-M exprimierenden SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Auch hier konnte bereits ohne zusätzliche Inkubation mit Stressoren eine signifikante Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen bei den NF-M Mutanten gezeigt werden (siehe Abb. 3.20). Eine zusätzliche Behandlung mit MG132 führte zu einem deutlichen Anstieg der apoptotischen Zellen, der allerdings bei allen untersuchten NF-Proteinen ähnlich stark ausgeprägt war.

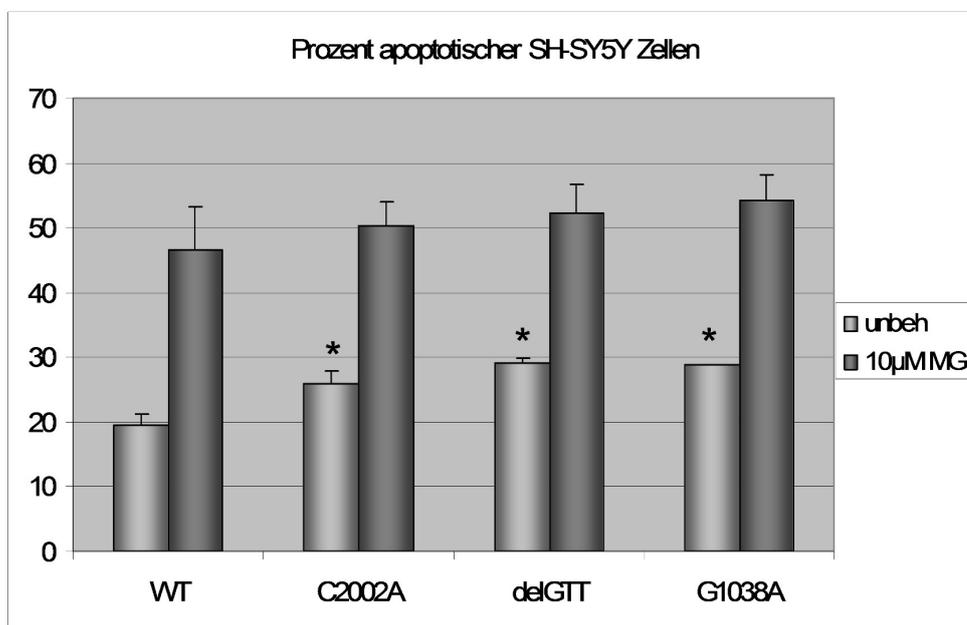


Abbildung 3.20: Es konnte gezeigt werden, daß eine stabile Überexpression der NF-M Mutanten zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose führte.

4 Diskussion

Die wesentlichen der Parkinson Erkrankung zugrunde liegenden zellulären Veränderungen bestehen aus einem Absterben der dopaminergen Neurone in der SNpc und der Akkumulation von Proteinen, den sogenannten Lewy-Körpern. Darüberhinaus ist jedoch inzwischen bekannt, daß auch viele andere Bereiche des ZNS in unterschiedlichem Ausmaß mitbetroffen sind [160]. Als Ursache für den Neuronenuntergang wurden aufgrund biochemischer, pathologischer und genetischer Befunde bisher verschiedene Theorien diskutiert. Im Mittelpunkt stehen das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) und mitochondriale Veränderungen, welche über eine Störung der mitochondrialen Energiegewinnung der Zelle zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress führen. Es konnte in einem Drosophila Modell gezeigt werden, daß *Parkin* knock-out zu morphologisch veränderten Mitochondrien führt. Diese Veränderungen führten zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber oxidativem Stress [161]. Bisher war *Parkin* im Zusammenhang mit Störungen des UPS analysiert worden, wo es aufgrund seiner bekannten Funktion als E3-Ligase untersucht wurde. Das Drosophila Modell zeigte erstmals eine wichtige mögliche Verknüpfung von UPS und mitochondrialen Störungen in der Pathogenese der Parkinson Krankheit. Mitochondriale Fehlfunktionen wurden ebenso bereits beim Menschen durch Analyse von Thrombozyten, von an der Parkinson Krankheit leidenden Patienten beschrieben [162, 163]. Diese Anfälligkeit gegenüber oxidativen Stress, und in Kombination mit exogenen Toxinen, könnte eine Verbindung zu Neurodegeneration und der Apoptose von Neuronen in der SNpc sein [164]. Neben *Parkin* wurden noch weitere Gene identifiziert, in welchen Mutationen mitochondriale Funktionsstörungen verursachen können. Dazu gehört *PINK-1* eine Serin/Threonin Kinase, welche im Zellkern exprimiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert wird, wo sie protektiv gegenüber oxidativem Stress wirkt [165]. DJ-1, ein Sensor für oxidativen Stress, ist in mutierter Form ebenfalls als Ursache einer erblichen Form der Parkinson Krankheit identifiziert worden. In der Wildtyp Form oxidiert dieses unter oxidativem Stress *in vitro* und wird ins Mitochondrium transloziert, was eine Protektion derer vermittelt [166]. Canet-Aviles und Kollegen konnten zeigen, daß die Veränderung der Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins an Position 106 zu einem dominant-negativen Effekt durch Verlust der Oxidierbarkeit führte. Darüber hinaus vermutet man, daß *loss-of-function* Mutationen zu einer rezessiven Form von Parkinson

führen. Ein erst kürzlich identifiziertes Protein, welches dem PARK13 Locus zugewiesen wurde, zeigt bei Parkinson Patienten Veränderungen auf. Das Protein Omi/HtrA2 ist ein mitochondriales Protein, welches nukleär kodiert ist und bei der zellulären Stressantwort und der Mitochondrien-Homöostase beteiligt ist. Auch hier konnte *in vitro* gezeigt werden, daß Zellen, welche das mutierte Protein überexprimieren, stärker auf oxidativen Stress reagieren, als solche, die das Wildtyp Protein exprimieren [167].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht in wie weit die Parkinson assoziierten Mutationen im Neurofilament-M Gen analog zu den beschriebenen Veränderungen in den anderen bei der Parkinson-Krankheit mutierten Proteinen zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber exogenen Stressoren führen. Zu diesem Zweck wurde stabil NF-M exprimierende HEK 293-Zellen und SH-SY5Y-Zellen mit verschiedenen Stressoren behandelt und mit Hilfe von FACS-Analysen hinsichtlich der Zelltodmechanismen Apoptose und Nekrose untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen, die die delGTT-Variante in HEK 293-Zellen exprimieren unter dem Einfluß von oxidativem Stress, in Form einer H₂O₂ Behandlung, signifikant empfindlicher reagierten als der Wildtyp, was zu einer erhöhten Nekrose-Rate führte. Die zusätzlich untersuchten Mutationen (C2002A und G1038A) zeigten unter diesen Bedingungen keine Auffälligkeiten. Um den Einfluß von proteasomalem Stress zu untersuchen wurden gleichfalls HEK 293-Zellen mit dem Proteasomeninhibitor MG132, behandelt und mit Hilfe von FACS-Analysen untersucht. Es konnte auch hier gezeigt werden, daß die delGTT-Variante eine erhöhte Apoptose-Rate im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Dabei zeigten hier die zusätzlich untersuchten Mutationen ebenfalls signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp nach der Behandlung. Bereits ohne Einfluß äußerer Stressoren zeigten alle Mutationen eine signifikant erhöhte Apoptose-Rate verglichen mit dem Wildtyp. Um diese Ergebnisse auf eine neurodegenerative Situation zu übertragen wurden weiterführend stabil NF-M exprimierende neuronale SH-SY5Y-Zellen auf ihre Apoptose-Rate hin untersucht. Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, daß bereits die stabile Überexpression aller Mutanten zu einer signifikant erhöhten Apoptose-Rate führten. Diese Ergebnisse bezüglich der Zellvitalität zeigen, daß eine Überexpression der bei Parkinson Patienten gefundenen Mutationen im NF-M-Gen zu einer basal erhöhten Apoptose-Rate in verschiedenen Zelltypen führen. Unter zusätzlichem oxidativen Stress reagieren die Zellen, welche die delGTT-Variante exprimierten mit einer gesteigerten Nekrose-Rate und somit zu einem Absterben der Zellen. Wie bereits von Nguyen und Kollegen [66, 67] gezeigt wurde, sprechen diese Ergebnisse für einen protektiven Effekt von physiologischem NF-M. Wildtyp NF-M puffert unter physiologischen Umständen oxidativen Stress über die phosphorylierten Lysin-Reste der KSP-Wiederholungen in der *tail*-Domäne [71, 168].

Aufgrund der oben beschriebenen festgestellten Zelltodmechanismen durch die Überexpression mutierter NF-M Proteine in verschiedenen Zelltypen und der bisher bekannten protektiven Rolle der NF-M Phosphorylierung, wurden diesbezüglich weitere Analysen durchgeführt. Post-translationelle Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierung spielen bei neurodegenerativen Erkrankungen eine große Rolle. Bei der Alzheimer Erkrankung (AK) werden die spezifischen Protein-Ablagerung in Gehirnen von Patienten in Plaques (extrazellulär) und NFT's (*neurofibrillary tangles* / intrazellulär) unterschieden. Die für die AK typischen NFT in dystrophen Neuriten bestehen aus gepaarten helikalen Filamenten (PHF) [160, 169, 170], welche zu einem Großteil aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein τ bestehen. Dieses liegt in den NFT's in einer hyper-phosphorylierten Form vor [171, 172, 173], es wird angenommen, daß diese von der Norm abweichende Phosphorylierung für die Aggregation verantwortlich ist. Verschiedene Kinasen können *in vivo* τ phosphorylieren [174, 175] und es ist bekannt, daß GSK3 β und cdk-5 τ auch in zellulären Systemen phosphorylieren [176, 177]. Die höchste Aktivität von cdk-5 konnte in neuronalen Strukturen nachgewiesen werden [178, 131]. Cdk-5 spielt weiterhin eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Entwicklung, da gezeigt werden konnte, daß cdk-5 *knock-out* Mäuse nicht lebensfähig sind [179]. Der Bezug zu Neurofilament wird zum einen dadurch deutlich, daß Epitope von phosphoryliertem NF-M und NF-H sowohl in NFT's als auch in Lewy-Körpern nachgewiesen werden konnten, und zum anderen, daß gezeigt werden konnte, daß cdk-5 und GSK3 β die *tail*-Domäne von Neurofilament phosphoryliert [66, 131, 40]. Neben den bereits genannten Kinasen, gibt es noch weitere, welche in der Lage sind Neurofilamente zu phosphorylieren, z. B. ERK1, ERK2, JNK1 und JNK3 [180, 181, 182, 183, 184]. Die einzelnen Kinasen setzen an den verschiedenen Domänen an. Neben der protektiven Rolle von phosphorylierten Neurofilamenten [168] ist eine bedeutende Funktion der *tail*-Domänen, durch extensive Phosphorylierung, die Aufspreizung der Neurofilament-Enden. Dadurch kommt es zu einer Verbreiterung des axonalen Durchmessers, was letztendlich zu einer erhöhten Reizleitungsgeschwindigkeit führt. Die Hauptrolle bei dieser Funktion wird der Untereinheit NF-M zugewiesen [105, 106]. Anhand der Auffälligkeiten der delGTT-Variante in den Zellvitalität-Analysen dieser Arbeit, wurde untersucht, inwieweit sich die beobachteten Effekte auf eine differentielle Phosphorylierung zurückführen lassen. Es wurde mittels Ko-Immunpräzipitations-Analysen, mit Hilfe von Phospho-spezifischen Antikörpern, gezeigt, daß die delGTT-Variante eine stärkere Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Die zusätzlich untersuchten Mutanten zeigten diesbezüglich keine bzw. nur geringe Auffälligkeiten. Diese vom Wildtyp abweichende Phosphorylierung könnte ursächlich für die erhöhte Apoptose-Rate und die erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativen

Stress sein. Nach der Theorie von Liu und Kollegen [16] scheint das Neurofilament in dieser hyper-phosphorylierten Form nicht mehr in der Lage zu sein, seine Aufgabe als Puffer für fehlregulierte Kinasen/Phosphatasen korrekt zu erfüllen. Normalerweise werden die einzelnen Neurofilament Untereinheiten erst nach dem Transport aus dem Zellsoma ins Axon phosphoryliert. Eine zu frühe Phosphorylierung kann zur Aggregation und somit zu einer mechanischen Blockade der Transportwege von Partikeln und Vesikeln ins Axon führen [25, 18, 108]. In Proteinaggregaten sowohl bei Alzheimer- als auch bei Parkinson-Patienten konnte hyperphosphoryliertes NF-M nachgewiesen werden [13]. Die Proteinaggregation ist ein Hauptmerkmal verschiedenster neurodegenerativer Erkrankungen, wie zum Beispiel Alzheimer, ALS, Parkinson und Charcot-Marie-Tooth [185, 186, 187, 188]. Ein wichtiger Bezug von Phosphorylierung und der Parkinson Krankheit zeigen Ergebnisse verschiedener Forschungen an α -Synuclein. Für α -Synuclein konnte gezeigt werden, daß eine Phosphorylierung an Ser129 die Proteinaggregation fördert, möglicherweise durch eine modulierte Interaktion mit Synphilin-1 [189, 190, 191, 192]. Die intrazytoplasmatische Ablagerung von zellulären Proteinen in Aggregate verläuft über komplexe Übergangsstadien, wie oligomere und protofibrilläre Strukturen. Man nimmt an, daß die Aggregate als Endstadium protektiv sind, um die Zelle durch Sequestration vor schädlichen Zwischenstadien zu schützen [193]. Exemplarisch ist in diesem Zusammenhang das α -Synuclein bei Parkinson gut untersucht, daß bei Überexpression von mutiertem α -Synuclein in Zellkultursystemen zu Zytotoxizität führt [194, 195]. Dabei zeigen diese Zellen jedoch nur wenige Aggregate. Ko-Transfektionsanalysen von α -Synuclein und Synphilin-1 zeigen zwar eine vermehrte Aggregatbildung [196], was jedoch zu einer verbesserten Zellvitalität führt [197].

Um diesen Mechanismus an den hier analysierten Neurofilament-M Mutanten zu untersuchen, wurde das Aggregationsverhalten untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß in stabil NF-M exprimierenden HEK 293-Zellen ohne Behandlung die Neurofilament Untereinheit M mit Vimentin in filamentösen Strukturen ko-lokalisiert. Unter dem Einfluß des proteasomalen Inhibitors MG132 für insgesamt 16 Stunden in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$, kam es zu einer Aggregation von NF-M und Vimentin in Form von intrazytoplasmatischen Einschlüssen. Die Ko-Lokalisation von NF-M und Vimentin weist darauf hin, daß es sich hierbei um Aggresomen handelt [197]. Ziel war es mögliche Unterschiede im Aggregationsverhalten zwischen Wildtyp und dem mutiertem NF-M zu erkennen. Hierfür wurden die Zellen einer geringeren Konzentration an MG132 für einen kürzeren Zeitraum ausgesetzt ($5\mu\text{M}$ MG132 für 6 Stunden) um eine Aggregation auszulösen, welche nicht durch eine vollständigen Inhibierung des Proteasoms ausgelöst wird. Die Auswertung ergab eine geringere Anzahl an Aggregaten bei allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp,

was darauf hinweist, daß die mutierten NF-M Proteine eine geringere Aggregationstendenz zeigen. Wie bereits oben beschrieben, sprechen diese Ergebnisse für eine protektive Rolle der Aggregate und einer Zytotoxizität der Vorläuferstadien. Die delGTT-Variante zeigte eine signifikante Abweichung vom Wildtyp, wobei die G1038A-Variante die geringste Anzahl von Aggregaten aufwies. Neben der Ko-Lokalisation von NF-M und Vimentin, gab die Färbung mit Ubiquitin Antikörpern weiteren Aufschluß über die Beschaffenheit der Aggregate und die Definition als Aggresom. Es konnte gezeigt werden, daß im Schnitt weniger als die Hälfte aller Aggregate mit Ubiquitin ko-lokalisieren. Auch hier zeigte die G1038A-Variante eine statistisch signifikant geringere Anzahl an Ubiquitin-positiven Aggregaten. Insgesamt kann man aus diesen Ergebnissen schließen, daß die Aggregatbildung auch im Falle von Neurofilament eine protektive Wirkung auf die Zelle hat. Die Aggregatvorläufer scheinen allerdings unterschiedlich in ihrem toxischen Potential. Obwohl die G1038A-Variante nur sehr wenige Aggregate ausbildet, scheinen die Vorstufen in den untersuchten Paradigmen einen weniger schädlichen Einfluß auf die Zelle auszuüben, im Gegensatz zu der delGTT-Variante. Ein direkter Aussage über die protektive Rolle von Aggregaten im Falle von Neurofilament ist nicht möglich, da bereits alle mutierten NF-M Proteine bereits basal toxisch auf die Zellen wirken, ohne sichtbare Aggregation. Der geringere Anstieg der Apoptose nach MG132-Behandlung der stabil NF-M exprimierenden HEK293-Zellen spricht aber für einen möglichen kompensatorischen Effekt durch Aggregation. Der Anstieg der Apoptose unter gleichen Bedingungen bei stabil NF-M exprimierenden SH-SY5Y-Zellen ist sehr viel höher, was eventuell durch eine geringere Kompensationsmöglichkeit durch Aggregation in diesem Zellkulturmodell hervorgerufen wird. Um genauere Aussagen machen zu können, müssten Einzelzell-Analysen unter den Bedingungen der Aggregationanalysen durchgeführt werden, hinsichtlich der prozentualen Verteilung von apoptotischen Aggregat-tragenden Zellen zu nicht-Aggregat-tragenden Zellen. Da die Abbaumechanismen für Neurofilament noch nicht vollständig geklärt sind, könnten verschiedene gestörte Degradationswege eine Rolle spielen. Die gezeigte erhöhte Phosphorylierung der delGTT-Variante spiegelt sich in diesem Falle nicht in einer gesteigerten Aggregatbildung wider.

Über die Abbauege und die involvierten Mechanismen bezüglich Neurofilament ist bisher wenig bekannt. Drei Abbauege, UPS, Autophagie und Calpain, werden in der Literatur als mögliche relevanten Degradations-Mechanismen erwähnt. Eine gestörte Funktion des UPS ist bereits bekannt bei der Entstehung von Parkinson eine Rolle zu spielen. Viele der bisher identifizierten Parkinson-assoziierten Proteine fügen sich in einen Signalweg ein, in dessen Zentrum das Proteasom steht. Hinweise für eine Beteiligung von Neurofilament Proteinen an diesem Signalweg gibt in der Literatur von Gou und Kolle-

gen [82]. Diese fanden Hinweise auf eine Mono-Ubiquitinierung. Dennoch fehlen sichere Hinweise für eine Bedeutung der 26S proteasomalen ubiquitin-abhängigen Degradation von Neurofilament M *in vivo*. Aber auch bei fehlendem Nachweis von ubiquitiniertem NF-M kann ein Abbau über das 20S Proteasom von nicht-ubiquitiniertem Neurofilament nicht ausgeschlossen werden kann. Hinweise über einen möglichen Abbau von Neurofilament mittels Calpain wurde in der Literatur 1985 von Kamakura und Kollegen [96] erbracht und wurden in den letzten Jahren durch verschiedene Forschungsarbeiten unterstützt [154, 153, 77, 95, 94]. Man geht davon aus, daß die Phosphorylierung der Neurofilamente vor einem vorzeitigen Abbau auf dem Weg entlang des Axons schützend wirkt. Eine Dephosphorylierung durch die Phosphatase 2 A (PP2A) an den Axonenden macht die Neurofilamente zugänglich für einen Abbau durch Calpain. Neuere Arbeiten konzentrieren sich auf den Mechanismus der Autophagie als Abbaumechanismus für Aggregate bei neurodegenerativen Erkrankungen. Es konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, daß zum Beispiel pathognomonische Huntingtin-, τ - und α -Synuclein-Aggregate über Autophagie abgebaut werden können [84, 85, 86]. Die Autophagie gilt als zweit wichtigster Abbauweg in der Zelle, ist allerdings nicht so effizient wie das UPS. Um eine mögliche differentielle Beteiligung der genannten Abbauege bei der Neurofilament-Degradation zu zeigen, wurden in dieser Arbeit stabil NF-M exprimierende SH-SY5Y-Zellen den jeweiligen spezifischen Inhibitoren ausgesetzt und die Protein-Menge anhand Western-Blot-Analysen verglichen. Aufgrund der großen Schwankungen bei verschiedenen Versuchen konnte keine sichere Aussage über den möglichen Hauptabbaueweg von Neurofilament gemacht werden. Diese Methode scheint somit für eine aussagekräftige Analyse nicht adäquat zu sein. In weiteren Analysen wurden Aussagen bezüglich der Halbwertszeit von NF-M erzielt, indem die selben Zellen einem Protein-Synthese-Inhibitor ausgesetzt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die C2002A-Variante signifikant schneller bzw. in einem stärkeren Maße umgesetzt wird, als der Wildtyp oder die anderen zwei Mutanten. Diese verkürzte Halbwertszeit konnte allerdings nicht mit den verschiedenen Abbaumechanismen in Verbindung gesetzt werden.

Da eine Störung des UPS bei der Entstehung der Parkinson Erkrankung eine wichtige Rolle spielt, wurden weitere Versuche unternommen, um zu untersuchen in wieweit Neurofilament in dessen Signalweg eingreift. Ein etabliertes Modell zur *in vitro* Analyse der proteasomalen Funktion in Zellkultur stellt das von Bence *et al.* 2001 publizierte GFPu-System dar [150]. Dieses Modell bietet die Möglichkeit die Hemmung des Proteasoms durch zusätzliche Protein-Expression oder durch Inhibitoren durch Einzelzellanalysen zu untersuchen. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, durch die Fusion eines kurzen Degron-tags an das ursprüngliche GFP-Protein, die Halbwertszeit von GFP von 10

Stunden auf ca. 20-30 Minuten verkürzt. Unter dem Einfluß von proteasomaler Hemmung kommt es zu einer Anreicherung des GFP-Proteins, welches anhand von FACS-Analysen quantitativ gemessen werden kann. Bence und Kollegen konnten zeigen, daß Proteine, welche dafür bekannt sind, daß sie zu vermehrter Aggregation neigen das Proteasom hemmen und so zu einem Anstieg der GFP-Fluoreszenz in der Zelle führen. Die Autoren gehen davon aus, daß dabei die Aggregate Ausdruck einer Überlastung der Kapazität des UPS sind [198] oder möglicherweise diese sogar direkt mit dem Proteasom interagieren. Als Hinweis auf eine pathologische Sequestration von funktionellen proteasomalen Bestandteilen konnte gezeigt werden, daß verschiedene proteasomale Untereinheiten in unterschiedlichen Proteinaggregaten bei neurodegenerativen Erkrankungen ko-lokalisieren [199, 200]. Jedoch konnte in dieser Arbeit keine vermehrte Aggregatbildung unter dem Einfluß von mutiertem Neurofilament M detektiert werden, wobei eine proteasomale Hemmung nicht zwangsläufig mit Aggregation einhergeht, letztere scheint sekundär und wahrscheinlich sogar protektiv. Um die Auswirkungen der verschiedenen NF-M Varianten auf das Proteasom zu untersuchen, standen sowohl polyklonale, stabil GFPu exprimierende HEK 293-Zellen als auch monoklonal, stabil GFPu exprimierende SH-SY5Y-Zellen zu Verfügung. Die transiente Überexpression der einzelnen Varianten zeigte eine statistisch signifikante Hemmung des Proteasoms in Zellen, die die delGTT-Variante exprimierten. Die zwei weiteren Mutanten entsprachen im Ausmaß der proteasomalen Hemmung in etwa dem Wildtyp. Eine zusätzliche Behandlung mit MG132 konnte keine Modulation dieses Effektes erzeugen, und führte bei allen Varianten zu einer vollständigen Hemmung des Proteasoms ohne noch Differenzen erkennen zu lassen. Die nachgewiesene proteasomale Hemmung durch delGTT mutiertes Neurofilament steht also bei Neurofilament in keinem direkten Zusammenhang zu der Art und Anzahl der Aggregate. Die Hemmung des Proteasom scheint somit nicht durch aggregiertes Neurofilament Protein zustande zu kommen. Die bisherigen Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, daß die delGTT-Variante mit einer nur geringen Aggregationsneigung zu einer erhöhten Toxizität und proteasomalen Hemmung führt. Für eine genauere Aussage inwieweit protofibrilläre oder unlösliche fibrilläre Strukturen eine Rolle bei der proteasomalen Hemmung spielen waren Löslichkeitsanalysen notwendig.

Neurofilamente zeichnen sich dadurch aus, daß sie in Puffern mit physiologischer Ionenstärke oder pH nahezu unlöslich sind [159]. Man ging zunächst davon aus, daß alle polymerisierten Neurofilamente statisch in dieser Form verbleiben [201]. Es konnte allerdings inzwischen gezeigt werden, daß diese Polymersierung reversibel ist. Die Detektion erwies sich als äußerst schwierig, da dies in nur geringem Maße der Fall ist [202, 203, 204, 205]. In der Zwischenzeit ist bekannt, daß es einen dynamischen, löslichen Pool an Neurofila-

ment in der Zelle gibt. Auch die charakteristischen Protein-Aggregate bei den verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei der Parkinson-Krankheit, gehören zu der unlöslichen Fraktion innerhalb der Zelle. Nach aktuellen Hypothesen gelten am ehesten die löslichen Vorstufen der involvierten Proteine allerdings als toxisch und die fibrillären Strukturen in den Aggregaten als protektiv. Um diese Theorien mit den bisherigen Analysen zu vergleichen, wurden in dieser Arbeit Löslichkeitsanalysen der verschiedenen NF-M Varianten durchgeführt. Hierfür wurden HEK-293-Zellen mit den verschiedenen Neurofilament Varianten jeweils mit einem GFP-tag und einem V5/His-tag transient transfiziert. Erste Ergebnisse unter Verwendung des GFP-Fusions-Konstruktes ergaben Hinweise auf eine Verschiebung der Menge an Neurofilament Protein hin zur unlöslichen Fraktion, wobei sich Unterschiede zwischen Wildtyp und den Mutanten abzeichneten, mit vermehrt unlöslichem Protein bei Überexpression des mutierten Proteins. Eine Wiederholung der Analyse unter Verwendung des V5/His-Konstruktes zeigten ebenfalls, daß Teile des synthetisierten NF-Proteins als unlöslicher Bestandteil in der Zelle vorliegen, es ergab sich jedoch kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und mutierten Protein. Diese Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu den mit dem GFP-Fusionskonstrukt erzielten. Diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Konstrukten deuten darauf hin, daß je nach verwendetem Fusionsprotein-tag dieser ein unterschiedlicher Einfluß auf das Verhalten der NF-M Proteine erzeugt wird. Es ist anzunehmen, daß der GFP-tag aufgrund seiner Größe von 27kDa eine strukturelle Veränderung des Proteins mit sich bringt, welcher zu einem unphysiologischen biochemischen Verhalten führt. Desweiteren unterscheiden sich die Proteine mit unterschiedlichem tag in ihrem Laufverhalten im SDS-Polyacrylamid-Gel. Die GFP-Konstrukte ergeben bei der Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel eine distinkte Bande bei ca. 170kDa, wohingegen die V5/His-Konstrukte sich zu zwei Doppelbanden auftrennen, welche bei ca. 100kDa und bei 130kDa liegen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß die zwei Doppelbanden des V5/His-Konstrukts die unterschiedliche Phosphorylierungszustände des Proteins widerspiegeln. Hierfür spricht, daß bei Verwendung phospho-spezifischer Antikörper nur die zwei obersten dieser 4 Bande detektieren. Möglich wäre eine differentielle Konformationsänderung der Proteine in Abhängigkeit des fusioniertem tag, wobei unsere Ergebnisse darauf hindeuten, daß die V5/His-Konstrukte auf ein physiologischeres Verhalten der Proteine hindeuten.

Neurofilamente gehören zu den Typ IV Intermediärfilamenten, welche spezifisch in reifen Neuronen exprimiert werden. Die Aufgabe von Intermediärfilamenten liegt in der Versteifung, Stabilisierung und gleichzeitig der Flexibilität der einzelnen Zellen und Zellverbänden. Im Falle von Neurofilamenten gehört weiterhin zu ihrer Funktion die Erweiterung des

axonalen Durchmessers und der damit verbundenen Erhöhung der Reizleitungsgeschwindigkeit. Die von Intermediärfilamenten gebildeten Netzwerke durchziehen die gesamte Zelle. Neurofilamente sind obligate Heteropolymere, wobei *in vitro* Homodimere von NF-L auftreten können. Bereits 2004 konnten Perez-Olle und Kollegen [149] anhand der hier ebenfalls verwendeten G1038A-Mutation zeigen, daß die Fusionierung von NF-M mit einem GFP-*tag* zu keiner Veränderung der Eigenschaften bezüglich der Netzwerkbildung führt. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der durch den GFP-*tag* hervorgerufene Effekt bei den vorher beschriebenen Löslichkeits-Analysen zumindest keinen Einfluß auf die Filamentbildungseigenschaften hat. In der vorliegenden Arbeit wurden darüberhinaus die neu identifizierte C2002A und delGTT-Mutationen in NF-M auf ihre Fähigkeit der Netzwerkbildung in SW13⁻-Zellen getestet. Diese Zellen eignen sich besonders für diese Aufgabe, da endogen keine Intermediärfilamente exprimiert werden und somit der restitutive Effekt von transient überexprimierten NF-M mit und ohne NF-L untersucht werden kann. Als Vorversuch konnte gezeigt werden, daß wie bereits in der Literatur beschrieben, NF-L in der Lage ist Homopolymere auszubilden. Es konnte eine vollständige Polymerisierung beobachtet werden. Weiterhin konnte bestätigt werden, daß NF-M alleine dazu nicht in der Lage ist, was einem physiologischem Verhalten in der Zelle entspricht. Auch der Umstand, daß in dieser Arbeit die NF-M cDNA aus Ratte verwendet wurde, zeigt deutlich wie konserviert die Proteine zwischen den Spezies sind, da sich die untersuchten Proteine in humanen Zell-Linien physiologisch und wie erwartet verhalten haben. Sowohl der WT als auch die Mutanten zeigten eine zytoplasmatische Verteilung ohne Filamentbildung. Eine Fixierung dieser Zellen mittels PFA führte zu Artefakten, welche Organellen-ähnliche Strukturen aufwiesen, welche in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurden. Eine transiente Ko-Expression von NF-L und NF-M WT zeigte eine vollständige Netzwerkbildung und eine 100%igen Ko-Lokalisation beider Proteine. Für die Ausbildung der Filamente ist die zentrale *rod*-Domäne von besonderer Bedeutung. Diese Domäne besteht bei allen Intermediärfilamenten aus vier langen α -Helices, welche durch drei „Spacer“ getrennt sind. Diese α -helikalen Segmente bilden Dimere mit superhelikaler Struktur. Von den in dieser Arbeit zu untersuchenden Mutationen im NF-M liegt nur die C2002A Mutation in dieser Domäne. Alle NF-M Mutationen wurden zusammen mit physiologischem NF-L transient überexprimiert. Wie schon beim WT beobachtet, waren alle Mutationen in der Lage ein vollständiges Filament-Netzwerk auszubilden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß sowohl die Mutation in der zentralen *rod*-Domäne als auch die Mutationen in der *tail*-Domäne keinen Einfluß auf die Filamentbildung ausüben. Bei der hier angewandten Methode können allerdings nur statische Momentaufnahmen bewertet werden. Dies läßt keine Aussage über dynamische Eigenschaften, wie zum Beispiel die Geschwindigkeit der Zusammenlagerung zu. Es wäre somit möglich, daß die Muta-

tionen zu einer langsameren Netzwerkausbildung führen, welche in diesem Falle nicht beobachtet werden konnten, die einen nachteiligen Effekt auf die Zellen haben. Nach einer Expression der beiden Untereinheiten L und M konnte nach 48h *in vitro* weder funktionelle noch morphologische Auffälligkeiten bei den mutierten Varianten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, daß falls ein nachteiliger Effekt der Mutationen im Rahmen der Filamentausbildung und des Transports auftritt, dieser nach 48 Stunden bereits wieder kompensiert ist. Diese Untersuchungen bestätigen die in der Literatur angegebenen Eigenschaften der Domänen, und die aus strukturellen Überlegungen abgeleitete Vermutung, daß Mutationen in der *tail*-Domäne keinen Einfluß auf die Netzbildung haben.

Neurofilament Proteine werden im Zytosol synthetisiert und entlang der Axone transportiert. Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen können Störungen dieses Transports als Ursache der Erkrankung gesehen werden. Es kommt zu einer Anreicherung der Proteine im Zytosol, einer Verringerung des axonalen Durchmessers und somit zu einer verminderten Reizleitungsgeschwindigkeit. Die genauen Transportmechanismen für Neurofilamente sind bisher weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, daß bekannte Motorproteine wie Myosin und Dynein dafür verantwortlich sind und somit zu einem schnellen axonalen Transport führen. Beobachtungen an lebenden Zellen zeigten allerdings, daß eine langsame Netto-Geschwindigkeit vorliegt. Dies liegt an dem Phänomen, daß Neurofilamente die meiste Zeit stationär im Axon verharren und nur in kurzen, sogenannten „bursts“ transportiert werden. Der Transport von Neurofilamenten findet sowohl antero- als auch retrograd statt, was bereits durch verschiedene Gruppen gezeigt werden konnte [149, 29]. Unklar bisher ist allerdings, in welcher Form die Proteine transportiert werden, ob als Untereinheiten oder gesamte Filamentstrukturen. Als Ursache für Störungen innerhalb des Transports kommen sowohl Phosphorylierungsänderungen als auch unterschiedliche Konformationen der Proteine in Frage. Für die Analyse des Transportverhaltens von Neurofilament Proteinen stellen CAD-Zellen eine etablierte Zell-Linie als Alternative zu primären Neuronen dar. Es wurde bereits gezeigt, daß diese Zellen sowohl phänotypisch als auch biochemisch die Eigenschaften von Neuronen aufweisen. Durch Serumentzug können diese Zellen reversibel ausdifferenziert werden, wobei typische Fortsätze entstehen, die prototypisch für axonale Strukturen bei primären neuronalen Zellen sind. Im ausdifferenzierten Zustand sind diese Zellen bis zu 8 Wochen kultivierbar.

In dieser Arbeit wurden CAD-Zellen über 96 Stunden auf Deckgläschen ausdifferenziert und anschließend transient mit den verschiedenen NF-M-GFP Konstrukten transfiziert. Da eine Beobachtung der lebenden Zellen mit der vorhandenen technischen Ausstattung nicht möglich war, wurden die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfek-

tion fixiert und mikroskopiert. Es konnte gezeigt werden, daß alle Mutanten in gleichem Maße wie der WT transportiert wurden. Dies kann aber nur als generelle Aussage über den Transport gesehen werden, da eine Differenzierung zwischen antero- und retrogradem Transport nicht vorgenommen werden konnte. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, ob die zu einem gewissen Zeitpunkt fixierten Neurofilament Proteine sich in einem antero- oder retrograden Transport befunden haben. Die Analysen zeigten jedoch eine Anreicherung aller Varianten nach 48 Stunden in den Endigungen der Zellfortsätze, den sogenannten „tips“. Die Ergebnisse ergeben keinen Hinweis für eine Störung auf die Transportmechanismen. Alle Varianten scheinen in physiologischer Weise an die Motorproteine an- und wieder abzukoppeln, was weiterhin für eine intakte Interaktion der verschiedenen beteiligten Proteine und Mechanismen spricht. Perez-Olle und Kollegen konnten zeigen, daß weder der GFP-tag noch die verwendeten CAD-Zellen einen möglichen Effekt auf die Untersuchungen haben und der Situation von primären Neuronen entsprechen.

5 Zusammenfassung

Die Parkinson-Krankheit ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung beim Menschen. Neben den auftretenden Bewegungsstörungen, wie zum Beispiel *Bradykinese*, *Akinese* und der typische *Ruhe-Tremor*, zeichnet sich die Erkrankung neuropathologisch durch ein Absterben von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) im Mittelhirn aus. Desweiteren können für die Krankheit typische Protein Ablagerungen, so genannte Lewy-Körper, in den betroffenen Neuronen nachgewiesen werden. In einigen Proteinen, welche in den Aggregaten nachgewiesen werden konnten, wurden bei Parkinson Patienten Mutationen in den betreffenden Genen identifiziert. Bisher beschriebene Parkinson-assoziierte Proteine lassen sich zum Teil funktionell dem Signalweg des UPS zuordnen. Mittels immunhistochemischer Analysen konnten die Epitope aller drei Untereinheiten von Neurofilament in den Aggregaten im Gehirn von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden. Mutationen in den Untereinheiten L und H wurden bereits mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht. 2002 und 2003 wurden erstmals Mutationen in der Neurofilament-Untereinheit M bei Parkinson Patienten identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden diese Mutationen funktionell charakterisiert und ihre Rolle bei der Pathogenese der Parkinson-Krankheit untersucht. In den Versuchen bezüglich der Filamenteigenschaften, wie der Rekonstitution des Filamentnetzwerkes und dem Transport, zeigten alle mutierten NF-M Varianten die selben Eigenschaften wie der WT und entsprachen somit den aus der Literatur bekannten Eigenschaften *in vitro*. Es konnte gezeigt werden, daß alle Varianten in der Lage waren das Filamentnetzwerk in physiologischer Art und Weise wieder herzustellen. Auch im Rahmen der zur Verfügung stehenden Methoden wurden keine Unterschiede im Transportverhalten identifiziert. Die Verwendung der cDNA-Sequenz aus *rattus norvegicus* zeigte dabei keinen Unterschied zu den Ergebnissen bei humanem NF-M [149] zu haben.

Biochemisch konnte nachgewiesen werden, daß die C2002A-Variante eine signifikant kürzer Lebensdauer als der WT hat. Desweiteren konnte ein geringerer Grad der Phosphorylierung für diese Variante detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine vermehrte Instabilität dieser Variante hin. Die delGTT-Variante hingegen zeigte eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung gegenüber dem Wildtyp.

Um die verschiedenen mutierten NF-M Proteine in die bisher bekannten Parkinson-assoziierten Signalwege einzuordnen, konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression der delGTT-Variante sowohl in HEK 293- als auch in SH-SY5Y-Zellen zu einer signifikanten Hemmung des Proteasoms führte. Im Gegensatz dazu, wurde eine geringere Anzahl an Aggregaten bei der delGTT- und der G1039A-Variante im Vergleich zum Wildtyp detektiert. Hinsichtlich der Löslichkeit verhielten sich alle Varianten, auch unter proteasomaler Hemmung mittels MG132, ähnlich und zeigten eine starke interexperimentelle Schwankung zwischen den unabhängigen Versuchen.

In den Analysen zur Zellvitalität wurde festgestellt, daß die delGTT-Variante eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber oxidativen Stress aufwies was sich an einer erhöhten Nekrose rate zeigte. Ohne den Einfluß äußerer Stressoren zeigten sowohl HEK 293- als auch SH-SY5Y bereits eine erhöhte Apoptoserate bei einer stabilen Überexpression der NF-M Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die vorliegende Arbeit zur funktionellen Charakterisierung aller bislang beschriebenen Mutationen im NF-M Gen bei der Parkinson-Krankheit zeigt erstmals einen direkten toxischen Effekt der verschiedenen Varianten *in vitro*. Dabei weist die Tendenz zur verminderten Aggregatbildung unter Stressbedingungen bei den mutierten NF-M Varianten, auf einen möglichen gemeinsamen Mechanismus in der Vermittlung von Neurotoxizität hin. Analog zu einer publizierten Untersuchung bei der G1038A Mutation zeigen sich keine Auswirkungen der Mutationen auf die Ausbildung des Neurofilament -Netzwerks. Für die delGTT Mutation weisen die Befunde auf eine Hyperphosphorylierung mit konsekutiver proteasomaler Hemmung als möglichen Mechanismus zur Vermittlung einer gesteigerten zellulären Suszeptibilität hin, wohingegen die Effekte der übrigen Varianten schwächer ausgeprägt waren und bislang keine sichere Aussage zu den involvierten Mechanismen erlauben. Zusammenfassend sind unsere Ergebnisse mit bisherigen genetischen Befunden, die auf eine Rolle von NF-M Mutationen als Risikofaktoren bei der Parkinson-Krankheit vor dem Hintergrund einer reduzierten Penetranz hinweisen, vereinbar.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Anordnung der Neurofilament Untereinheiten	3
1.2	Neurofilament Transport	4
1.3	Möglicher Phosphorylierungsmechanismus	7
1.4	Protektiver Effekt von Neurofilamenten	8
1.5	UPS	10
1.6	Autophagy	11
1.7	Neurofilament in Zusammenhang mit Neurodegeneration. (Nach Al-Chalabi <i>et al.</i> [13])	20
3.1	AS-Sequenz Alignment	59
3.2	Expressionscheck NF-M-EGFP	60
3.3	Expressionscheck stabile Zellen	61
3.4	Ergebnis Netzworkebildung	62
3.5	Ergebnis Artefakt	62
3.6	Ergebnis Netzworkebildung	63
3.7	Axonaler Transport	65
3.8	Ergebnis Abbau	67
3.9	Ergebnis <i>Steady state</i>	68
3.10	Western Blot Phospho IP	70
3.11	GFPu	72
3.12	GFPu Western-Blot	72
3.13	Ko-Lokalisation NF-M / Vimentin	74
3.14	NF-M / Ubiquitin Aggregate	75
3.15	NF-M / Ubiquitin Aggregate Auswertung	76
3.16	Löslichkeit Western-Blot	77
3.17	Densitometrische Auswertung der Löslichkeit.	77
3.18	FACS Ergebnis Nekrose Nachweis HEK 293.	78
3.19	FACS Ergebnis Apoptose Nachweis HEK 293.	79
3.20	FACS Ergebnis Apoptose Nachweis SH-SY5Y.	80

Tabellenverzeichnis

1.1	Parkinson Loci	19
2.1	Kits	26
2.2	Enzyme und Puffer	26
2.3	Zell-Linien	31
2.4	Vektorenübersicht	35
2.5	Antikörperübersicht	37
2.6	PCR-Programm zur Amplifizierung von NF-M cDNA	41
2.7	PCR Programm Sequenzierung	42
2.8	PCR Programm Mutagenese	44

Literaturverzeichnis

- [1] G. Valentin. Über den Verlauf und die letzten Enden der Nerven. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae*, 18:51–71, 1836.
- [2] J. E. Purkinje. Untersuchungen aus der Nerven und Hirnanatomie. *Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte*, 1838.
- [3] S. Apathy. Nach welcher Richtung hin soll die Nervenlehre reformiert werden? *Biol Zentralal*, 1897.
- [4] S. R. Cajal. Embryogenesis of neurofibrils. *Trab. Lab Investigaciones Biol. Univ. Madrid*, 2:219–225, 1903.
- [5] F. O. Schmitt. Fibrous proteins–neuronal organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 60:1092–101, 1968.
- [6] M. J. Carden, J. Q. Trojanowski, W. W. Schlaepfer, and V. M. Lee. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci*, 7:3489–504, 1987.
- [7] C. Perrone Capano, R. Pernas-Alonso, and U. di Porzio. Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration. *Bioessays*, 23:24–33, 2001.
- [8] M. W. Myers, R. A. Lazzarini, V. M. Lee, W. W. Schlaepfer, and D. L. Nelson. The human mid-size neurofilament subunit: a repeated protein sequence and the relationship of its gene to the intermediate filament gene family. *Embo J*, 6:1617–26, 1987.
- [9] J. F. Lees, P. S. Shneidman, S. F. Skuntz, M. J. Carden, and R. A. Lazzarini. The structure and organization of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. *Embo J*, 7:1947–55, 1988.
- [10] C. H. Xia, E. A. Roberts, L. S. Her, X. Liu, D. S. Williams, D. W. Cleveland, and L. S. Goldstein. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J Cell Biol*, 161:55–66, 2003.

- [11] Y. Yan, K. Jensen, and A. Brown. The polypeptide composition of moving and stationary neurofilaments in cultured sympathetic neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64:299–309, 2007.
- [12] N. Geisler, E. Kaufmann, S. Fischer, U. Plessmann, and K. Weber. Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions increasing in size between triplet proteins. *Embo J*, 2:1295–302, 1983.
- [13] A. Al-Chalabi and C. C. Miller. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays*, 25:346–55, 2003.
- [14] D. L. Dong, Z. S. Xu, M. R. Chevrier, R. J. Cotter, D. W. Cleveland, and G. W. Hart. Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J Biol Chem*, 268:16679–87, 1993.
- [15] E. Fuchs and K. Weber. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63:345–82, 1994.
- [16] Q. Liu, F. Xie, S. L. Siedlak, A. Nunomura, K. Honda, P. I. Moreira, X. Zhua, M. A. Smith, and G. Perry. Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci*, 61:3057–75, 2004.
- [17] C. C. Miller, S. Ackerley, J. Brownlees, A. J. Grierson, N. J. Jacobsen, and P. Thornhill. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell Mol Life Sci*, 59:323–30, 2002.
- [18] P. Grant and H. C. Pant. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol*, 29:843–72, 2000.
- [19] J. P. Julien and W. E. Mushynski. Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. *J Biol Chem*, 257:10467–70.
- [20] M. K. Lee, Z. Xu, P. C. Wong, and D. W. Cleveland. Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol*, 122:1337–50, 1993.
- [21] G. Y. Ching and R. K. Liem. Assembly of type IV neuronal intermediate filaments in nonneuronal cells in the absence of preexisting cytoplasmic intermediate filaments. 122:1323–35, 1993.
- [22] Z. Xu and V. W. Tung. Overexpression of neurofilament subunit M accelerates axonal transport of neurofilaments. *Brain Res*, 866:326–32, 2000.

- [23] Z. Xu and V. W. Tung. Temporal and spatial variations in slow axonal transport velocity along peripheral motoneuron axons. *Neuroscience*, 102:193–200, 2001.
- [24] S. Ackerley, A. J. Grierson, J. Brownlees, P. Thornhill, B. H. Anderton, P. N. Leigh, C. E. Shaw, and C. C. Miller. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J Cell Biol*, 150:165–76, 2000.
- [25] R. C. Lariviere and J. P. Julien. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*, 58:131–48, 2004.
- [26] S. Roy, G. Coffee, P. and Smith, R. K. Liem, S. T. Brady, and M. M. Black. Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. *J Neurosci*, 20:6849–61, 2000.
- [27] L. Wang, C. L. Ho, D. Sun, R. K. Liem, and A. Brown. Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. *Nat Cell Biol*, 2:137–41, 2000.
- [28] S. Ackerley, P. Thornhill, A. J. Grierson, J. Brownlees, B. H. Anderton, P. N. Leigh, C. E. Shaw, and C. C. Miller. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. 161:489–95, 2003.
- [29] J. Motil, W. K. Chan, M. Dubey, P. Chaudhury, A. Pimenta, T. M. Chylinski, D. T. Ortiz, and T. B. Shea. Dynein mediates retrograde neurofilament transport within axons and anterograde delivery of NFs from perikarya into axons: regulation by multiple phosphorylation events. *Cell Motil Cytoskeleton*, 63:266–86, 2006.
- [30] O. I. Wagner, J. Ascano, M. Tokito, J. F. Leterrier, P. A. Janmey, and E. L. Holzbaur. The interaction of neurofilaments with the microtubule motor cytoplasmic dynein. *Mol Biol Cell*, 15:5092–100, 2004.
- [31] J. T. Yabe, A. Pimenta, and T. B. Shea. Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. *J Cell Sci*, 112:3799–814, 1999.
- [32] C. Jung, T. M. Chylinski, A. Pimenta, D. Ortiz, and T. B. Shea. Neurofilament transport is dependent on actin and myosin. *J Neurosci*, 24:9486–96, 2004.
- [33] S. R. Gill, P. C. Wong, M. J. Monteiro, and D. W. Cleveland. Assembly properties of dominant and recessive mutations in the small mouse neurofilament (NF-L) subunit. *J Cell Biol*, 111:2005–19, 1990.
- [34] P. C. Wong and D. W. Cleveland. Characterization of dominant and recessive assembly-defective mutations in mouse neurofilament NF-M. *J Cell Biol*, 111:1987–2003, 1990.

- [35] S. S. Chin, P. Macioce, and R. K. Liem. Effects of truncated neurofilament proteins on the endogenous intermediate filaments in transfected fibroblasts. *J Cell Sci*, 99:335–50, 1991.
- [36] S. T. Hsieh, G. J. Kidd, T. O. Crawford, Z. Xu, W. M. Lin, B. D. Trapp, D. W. Cleveland, and J. W. Griffin. Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J Neurosci*, 14:6392–401, 1994.
- [37] S. M. de Waegh, V. M. Lee, and S. T. Brady. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell*, 68:451–63, 1992.
- [38] J. S. Cole, A. Messing, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee. Modulation of axon diameter and neurofilaments by hypomyelinating Schwann cells in transgenic mice. *J Neurosci*, 14:6956–66, 1994.
- [39] H. Jaffe, Veeranna, K. T. Shetty, and H. C. Pant. Characterization of the phosphorylation sites of human high molecular weight neurofilament protein by electrospray ionization tandem mass spectrometry and database searching. *Biochemistry*, 37:3931–40, 1998.
- [40] A. Petzold. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci*, 233:183–98, 2005.
- [41] L. A. Sternberger and N. H. Sternberger. Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80:6126–30, 1983.
- [42] M. M. Oblinger, S. T. Brady, I. G. McQuarrie, and R. J. Lasek. Cytotypic differences in the protein composition of the axonally transported cytoskeleton in mammalian neurons. *J Neurosci*, 7:453–62, 1987.
- [43] R. A. Nixon, P. A. Paskevich, R. K. Sihag, and C. Y. Thayer. Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons in vivo: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber. *J Cell Biol*, 126:1031–46, 1994.
- [44] H. C. Pant and Veeranna. Neurofilament phosphorylation. *Biochem Cell Biol*, 73:575–92, 1995.
- [45] R.A. Nixon and T.B. Shea. Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell Motil Cytoskeleton*, 22:81–91, 1992.

- [46] Y. Komiya, N. A. Cooper, and A. D. Kidman. The long-term effects of a single injection of beta,beta'-iminodipropionitrile on slow axonal transport in the rat. *J Biochem (Tokyo)*, 100:1242–6, 1986.
- [47] V. M. Lee, Jr. Otvos, L., M. L. Schmidt, and J. Q. Trojanowski. Alzheimer disease tangles share immunological similarities with multiphosphorylation repeats in the two large neurofilament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85:7384–8, 1988.
- [48] T. Nakagawa, J. Chen, Z. Zhang, Y. Kanai, and N. Hirokawa. Two distinct functions of the carboxyl-terminal tail domain of NF-M upon neurofilament assembly: cross-bridge formation and longitudinal elongation of filaments. *J Cell Biol*, 129:411–29, 1995.
- [49] M. V. Rao, J. Campbell, A. Yuan, A. Kumar, T. Gotow, Y. Uchiyama, and R. A. Nixon. The neurofilament middle molecular mass subunit carboxyl-terminal tail domains is essential for the radial growth and cytoskeletal architecture of axons but not for regulating neurofilament transport rate. *J Cell Biol*, 163:1021–31, 2003.
- [50] M. V. Rao, M. K. Houseweart, T. L. Williamson, T. O. Crawford, J. Folmer, and D. W. Cleveland. Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. *J Cell Biol*, 143:171–81, 1998.
- [51] R. K. Sihag and R. A. Nixon. Identification of Ser-55 as a major protein kinase A phosphorylation site on the 70-kDa subunit of neurofilaments. Early turnover during axonal transport. *J Biol Chem*, 266:18861–7, 1991.
- [52] S. Hisanaga and N. Hirokawa. Dephosphorylation-induced interactions of neurofilaments with microtubules. *J Biol Chem*, 265:21852–8, 1990.
- [53] S. Hisanaga and N. Hirokawa. Molecular architecture of the neurofilament. ii. Reassembly process of neurofilament L protein in vitro. *J Mol Biol*, 211:871–82, 1990.
- [54] B. J. Gibb, J. Robertson, and C. C. Miller. Assembly properties of neurofilament light chain Ser55 mutants in transfected mammalian cells. *J Neurochem*, 66:1306–11, 1996.
- [55] B. J. Gibb, J. P. Brion, J. Brownlees, B. H. Anderton, and C. C. Miller. Neuropathological abnormalities in transgenic mice harbouring a phosphorylation mutant neurofilament transgene. *J Neurochem*, 70:492–500, 1998.

- [56] G. Y. Ching and R. K. Liem. Analysis of the roles of the head domains of type IV rat neuronal intermediate filament proteins in filament assembly using domain-swapped chimeric proteins. *J Cell Sci*, 112:2233–40, 1999.
- [57] Y. L. Zheng, B. S. Li, Veeranna, and H. C. Pant. Phosphorylation of the head domain of neurofilament protein (NF-M): a factor regulating topographic phosphorylation of NF-M tail domain KSP sites in neurons. *J Biol Chem*, 278:24026–32, 2003.
- [58] T.B. Shea. Microtubule motors, phosphorylation and axonal transport of neurofilaments. *J Neurocytol*, 29:873–87, 2000.
- [59] S. E. Lewis and R. A. Nixon. Multiple phosphorylated variants of the high molecular mass subunit of neurofilaments in axons of retinal cell neurons: characterization and evidence for their differential association with stationary and moving neurofilaments. *J Cell Biol*, 107:2689–701, 1988.
- [60] R. A. Nixon and R. K. Sihag. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci*, 14:501–6, 1991.
- [61] O. Ohara, Y. Gahara, T. Miyake, H. Teraoka, and T. Kitamura. Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J Cell Biol*, 121:387–95, 1993.
- [62] T. Sakaguchi, M. Okada, T. Kitamura, and K. Kawasaki. Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett*, 153:65–8, 1993.
- [63] J. X. Zhao, A. Ohnishi, C. Itakura, M. Mizutani, T. Yamamoto, H. Hayashi, and Y. Murai. Greater number of microtubules per axon of unmyelinated fibers of mutant quails deficient in neurofilaments: possible compensation for the absence of neurofilaments. *Acta Neuropathol (Berl)*, 87:332–6, 1994.
- [64] S. Couillard-Despres, Q. Zhu, P. C. Wong, D. L. Price, D. W. Cleveland, and J. P. Julien. Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:9626–30, 1998.
- [65] T. L. Williamson, L. I. Bruijn, Q. Zhu, K. L. Anderson, S. D. Anderson, J. P. Julien, and D. W. Cleveland. Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic

- lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:9631–6, 1998.
- [66] M. D. Nguyen, R. C. Lariviere, and J. P. Julien. Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron*, 30:135–47, 2001.
- [67] M. D. Nguyen, M. Boudreau, J. Kriz, S. Couillard-Despres, D. R. Kaplan, and J. P. Julien. Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci*, 23:2131–40, 2003.
- [68] Veeranna, N. D. Amin, N. G. Ahn, H. Jaffe, C. A. Winters, P. Grant, and H. C. Pant. Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J Neurosci*, 18:4008–21, 1998.
- [69] S. de Waegh and S. T. Brady. Altered slow axonal transport and regeneration in a myelin-deficient mutant mouse: the trembler as an in vivo model for Schwann cell-axon interactions. *J Neurosci*, 10:1855–65, 1990.
- [70] C. X. Gong, J. Z. Wang, K. Iqbal, and I. Grundke-Iqbal. Inhibition of protein phosphatase 2A induces phosphorylation and accumulation of neurofilaments in metabolically active rat brain slices. *Neurosci Lett*, 340:107–10, 2003.
- [71] T. Wataya, A. Nunomura, M. A. Smith, S. L. Siedlak, P. L. Harris, S. Shimohama, L. I. Szwedda, M. A. Kaminski, J. Avila, D. L. Price, D. W. Cleveland, L. M. Sayre, and G. Perry. High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *J Biol Chem*, 277:4644–8, 2002.
- [72] M. L. Leski, F. Bao, L. Wu, H. Qian, D. Sun, and D. Liu. Protein and dna oxidation in spinal injury: neurofilaments—an oxidation target. *Free Radic Biol Med*, 30:613–24, 2001.
- [73] P. N. Hoffman and R. J. Lasek. The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol*, 66:351–66, 1975.
- [74] B.I. Roots. Neurofilament accumulation induced in synapses by leupeptin. *Science*, 221:971–2, 1983.
- [75] P. Paggi and R.J. Lasek. Axonal transport of cytoskeletal proteins in oculomotor axons and their residence times in the axon terminals. *J Neurosci*, 7:2397–411, 1987.

- [76] H.C. Pant and H. Gainer. Properties of a calcium-activated protease in squid axoplasm which selectively degrades neurofilament proteins. *J Neurobiol*, 11:1–12, 1980.
- [77] A. Buki, R. Siman, J. Q. Trojanowski, and J. T. Povlishock. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58:365–75, 1999.
- [78] A. Ciechanover. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology*, 66:7–19, 2006.
- [79] H. Richly, M. Rape, S. Braun, S. Rumpf, C. Hoege, and S. Jentsch. A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, 120:73–84, 2005.
- [80] C. C. Weihl, S. Dalal, A. Pestronk, and P. I. Hanson. Inclusion body myopathy-associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Genet*, 15:189–99, 2006.
- [81] D. C. Rubinsztein. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, 443:780–6, 2006.
- [82] J. P. Gou and J. F. Leterrier. Possible involvement of ubiquitination in neurofilament degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 217:529–38, 1995.
- [83] T. Yorimitsu and D. J. Klionsky. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 12:1542–52, 2005.
- [84] M. Shibata, T. Lu, T. Furuya, A. Degtarev, N. Mizushima, T. Yoshimori, M. MacDonald, B. Yankner, and J. Yuan. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem*, 281:14474–85, 2006.
- [85] A. Iwata, J. C. Christianson, M. Bucci, L. M. Ellerby, N. Nukina, L. S. Forno, and R. R. Kopito. Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 37:13135–40, 2005.
- [86] Z. H. Qin, Y. Wang, K. B. Kegel, A. Kazantsev, B. L. Apostol, L. M. Thompson, J. Yoder, N. Aronin, and M. DiFiglia. Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet*, 12:3231–44, 2003.

- [87] M. Komatsu, S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, and T. Chiba. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*, 169:425–34, 2005.
- [88] A. Kuma, M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhiya, and N. Mizushima. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432:1032–6, 2004.
- [89] P. Boya, R. A. Gonzalez-Polo, N. Casares, J. L. Perfettini, P. Dessen, N. Larochette, D. Metivier, D. Meley, S. Souquere, T. Yoshimori, G. Pierron, P. Codogno, and G. Kroemer. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 25:1025–40, 2005.
- [90] B. Ravikumar, C. Vacher, Z. Berger, J. E. Davies, S. Luo, L. G. Oroz, F. Scaravilli, D. F. Easton, R. Duden, C. J. O’Kane, and D. C. Rubinsztein. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 36:585–95, 2004.
- [91] M. Komatsu, S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami, and K. Tanaka. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441:880–4, 2006.
- [92] T. Hara, K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano, and N. Mizushima. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441:885–9, 2006.
- [93] A. Kampfl, R. M. Posmantur, X. Zhao, E. Schmutzhard, G. L. Clifton, and R. L. Hayes. Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: implications for pathology and therapy: a review and update. *J Neurotrauma*, 14:121–34, 1997.
- [94] N. L. Banik, D. C. Matzelle, G. Gantt-Wilford, A. Osborne, and E. L. Hogan. Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. *Brain Res*, 752:301–6, 1997.
- [95] J. A. Greenwood, J. C. Troncoso, A. C. Costello, and G. V. Johnson. Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of the 200-kDa and 160-kDa neurofilament proteins. *J Neurochem*, 61:191–9, 1993.

- [96] K. Kamakura, S. Ishiura, K. Suzuki, H. Sugita, and Y. Toyokura. Calcium-activated neutral protease in the peripheral nerve, which requires microM order Ca²⁺, and its effect on the neurofilament triplet. *J Neurosci Res*, 13:391–403, 1985.
- [97] D. E. Goll, V. F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. The calpain system. *Physiol Rev*, 83:731–801, 2003.
- [98] S. Rogers, R. Wells, and M. Rechsteiner. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 234:364–8, 1986.
- [99] K. K. Wang, A. Villalobo, and B. D. Roufogalis. Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem J*, 262:693–706, 1989.
- [100] H. Yamasaki, C. Itakura, and M. Mizutani. Hereditary hypotrophic axonopathy with neurofilament deficiency in a mutant strain of the Japanese quail. *Acta Neuropathol (Berl)*, 82:427–34, 1991.
- [101] Q. Zhu, M. Lindenbaum, F. Levavasseur, H. Jacomy, and J. P. Julien. Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta'-iminodipropionitrile. *J Cell Biol*, 143:183–93, 1998.
- [102] F. Levavasseur, Q. Zhu, and J. P. Julien. No requirement of alpha-internexin for nervous system development and for radial growth of axons. *Brain Res Mol Brain Res*, 69:104–12, 1999.
- [103] J. Kriz, Q. Zhu, J. P. Julien, and A. L. Padjen. Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Res*, 885:32–44, 2000.
- [104] G. A. Elder, Jr. Friedrich, V. L., C. Kang, P. Bosco, A. Gourov, P. H. Tu, B. Zhang, V. M. Lee, and R. A. Lazzarini. Requirement of heavy neurofilament subunit in the development of axons with large calibers. *J Cell Biol*, 143:195–205, 1998.
- [105] G. A. Elder, Jr. Friedrich, V. L., A. Margita, and R. A. Lazzarini. Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in the mid-sized neurofilament subunit. *J Cell Biol*, 146:181–92, 1999.
- [106] G. A. Elder, Jr. Friedrich, V. L., D. Pereira, P. H. Tu, B. Zhang, V. M. Lee, and R. A. Lazzarini. Mice with disrupted midsized and heavy neurofilament genes lack axonal neurofilaments but have unaltered numbers of axonal microtubules. *J Neurosci Res*, 57:23–32, 1999.

- [107] H. Jacomy, Q. Zhu, S. Couillard-Despres, J. M. Beaulieu, and J. P. Julien. Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits. *J Neurochem*, 73:972–84, 1999.
- [108] Z. Xu, L. C. Cork, J. W. Griffin, and D. W. Cleveland. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell*, 73:23–33, 1993.
- [109] J. R. Marszalek, T. L. Williamson, M. K. Lee, Z. Xu, P. N. Hoffman, M. W. Becher, T. O. Crawford, and D. W. Cleveland. Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. *J Cell Biol*, 135:711–24, 1996.
- [110] V. Manetto, N. H. Sternberger, G. Perry, L. A. Sternberger, and P. Gambetti. Phosphorylation of neurofilaments is altered in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 47:642–53, 1988.
- [111] P. Averbach. Unusual particles in motor neuron disease. *Arch Pathol Lab Med*, 105:490–3, 1981.
- [112] D. G. Munoz, C. Greene, D. P. Perl, and D. J. Selkoe. Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol*, 47:9–18, 1988.
- [113] J. Meier, S. Couillard-Despres, H. Jacomy, C. Gravel, and J. P. Julien. Extra neurofilament NF-L subunits rescue motor neuron disease caused by overexpression of the human NF-H gene in mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58:1099–110, 1999.
- [114] D. R. McLachlan, W. J. Lukiw, L. Wong, C. Bergeron, and N. T. Bech-Hansen. Selective messenger RNA reduction in Alzheimer’s disease. *Brain Res*, 427:255–61, 1988.
- [115] C. Bergeron, K. Beric-Maskarel, S. Muntasser, L. Weyer, M. J. Somerville, and M. E. Percy. Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J Neuropathol Exp Neurol*, 53:221–30, 1994.
- [116] N. K. Wong, B. P. He, and M. J. Strong. Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervical spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Neuropathol Exp Neurol*, 59:972–82, 2000.

- [117] S. Seshadri, P. A. Wolf, A. Beiser, R. Au, K. McNulty, R. White, and R. B. D'Agostino. Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease. The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology*, 49:1498–504, 1997.
- [118] D. J. Selkoe. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci*, 924:17–25, 2000.
- [119] V. M. Lee, M. Goedert, and J. Q. Trojanowski. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*, 24:1121–59, 2001.
- [120] P. L. McGeer and E. G. McGeer. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 22:799–809, 2001.
- [121] H. L. Weiner and D. J. Selkoe. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature*, 420:879–84, 2002.
- [122] W. R. Markesbery. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 23:134–47, 1997.
- [123] G. Perry, R. J. Castellani, K. Hirai, and M. A. Smith. Reactive Oxygen Species Mediate cellular Damage in Alzheimer disease. *J Alzheimer Dis*, 1:45–55, 1998.
- [124] G. Perry, A. Nunomura, K. Hirai, X. Zhu, M. Perez, J. Avila, R. J. Castellani, C. S. Atwood, G. Aliev, L. M. Sayre, A. Takeda, and M. A. Smith. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radic Biol Med*, 33:1475–9, 2002.
- [125] Y. Christen. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, 71:621S–629S, 2000.
- [126] M. J. Picklo, T. J. Montine, V. Amarnath, and M. D. Neely. Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicol Appl Pharmacol*, 184:187–97, 2002.
- [127] A. Nunomura, G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen, and M. A. Smith. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60:759–67, 2001.
- [128] C. X. Gong, T. Lidsky, J. Wegiel, L. Zuck, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase

- 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 275:5535–44, 2000.
- [129] J. Q. Trojanowski, M. Mawal-Dewan, M. L. Schmidt, J. Martin, and V. M. Lee. Localization of the mitogen activated protein kinase ERK2 in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaque neurites. *Brain Res*, 618:333–7, 1993.
- [130] E. M. Mandelkow, G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenneede, and E. Mandelkow. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett*, 314:315–21, 1992.
- [131] J. Lew, Q. Q. Huang, Z. Qi, R. J. Winkfein, R. Aebersold, T. Hunt, and J. H. Wang. A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*, 371:423–6, 1994.
- [132] R. B. Maccioni, C. Otth, II Concha, and J. P. Munoz. The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem*, 268:1518–27, 2001.
- [133] J. Theuns, J. Del-Favero, B. Dermaut, C. M. van Duijn, H. Backhovens, M. V. Van den Broeck, S. Serneels, E. Corsmit, C. V. Van Broeckhoven, and M. Cruts. Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression. *Hum Mol Genet*, 9:325–31, 2000.
- [134] M. Wragg, M. Hutton, and C. Talbot. Genetic association between intronic polymorphism in presenilin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Collaborative Group. *Lancet*, 347:509–12, 1996.
- [135] D. J. Selkoe. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 81:741–66, 2001.
- [136] J. Hardy. The genetic causes of neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*, 3:109–116, 2001.
- [137] H. Tanahashi, T. Asada, and T. Tabira. Association between tau polymorphism and male early-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 15:175–9, 2004.
- [138] M. J. Ramirez, S. Puerto, P. Galofre, E. M. Parry, J. M. Parry, A. Creus, R. Marcos, and J. Surralles. Multicolour FISH detection of radioactive iodine-induced 17cen-p53 chromosomal breakage in buccal cells from therapeutically exposed patients. *Carcinogenesis*, 21:1581–6, 2000.

- [139] N. Suzuki, T. T. Cheung, X. D. Cai, A. Odaka, Jr. Otvos, L., C. Eckman, T. E. Golde, and S. G. Younkin. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*, 264:1336–40, 1999.
- [140] G. D. Schellenberg. Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:8552–9, 1995.
- [141] P. H. St George-Hyslop. Piecing together Alzheimer's. *Sci Am*, 283:76–83, 2000.
- [142] D. M. Georgiou, J. Zidar, M. Korosec, L. T. Middleton, T. Kyriakides, and K. Christodoulou. A novel NF-L mutation Pro22Ser is associated with CMT2 in a large Slovenian family. *Neurogenetics*, 4:93–6, 2002.
- [143] R. Kruger, C. Fischer, T. Schulte, K. M. Strauss, T. Muller, D. Voitalla, D. Berg, M. Hungs, R. Gobbele, K. Berger, J. T. Epplen, O. Riess, and L. Schols. Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 351:125–9, 2003.
- [144] F. Han, D. E. Bulman, M. Panisset, and D. A. Grimes. Neurofilament M gene in a French-Canadian population with Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, 32:68–70, 2005.
- [145] C. Lavedan, S. Buchholtz, R. L. Nussbaum, R. L. Albin, and M. H. Polymeropoulos. 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, 2002.
- [146] R. Perez-Olle, S. T. Jones, and R. K. Liem. Phenotypic analysis of neurofilament light gene mutations linked to Charcot-Marie-Tooth disease in cell culture models. *Hum Mol Genet*, 13:2207–20, 2004.
- [147] R. Perez-Olle, C. L. Leung, and R. K. Liem. Effects of Charcot-Marie-Tooth-linked mutations of the neurofilament light subunit on intermediate filament formation. *J Cell Sci*, 115:4937–46, 2002.
- [148] R. Perez-Olle, M. A. Lopez-Toledano, D. Goryunov, N. Cabrera-Poch, L. Stefanis, K. Brown, and R. K. Liem. Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport. *J Neurochem*, 93:861–74, 2005.

- [149] R. Perez-Olle, M. A. Lopez-Toledano, and R. K. Liem. The G336S variant in the human neurofilament-M gene does not affect its assembly or distribution: importance of the functional analysis of neurofilament variants. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63:759–74, 2004.
- [150] N. F. Bence, R. M. Sampat, and R. R. Kopito. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 292:1552–5, 2001.
- [151] R. Butler, J. Robertson, and J. M. Gallo. Mutually exclusive expression of beta(iii)-tubulin and vimentin in adrenal cortex carcinoma SW13 cells. *FEBS Lett*, 470:198–202, 2000.
- [152] Y. Qi, J. K. Wang, M. McMillian, and D. M. Chikaraishi. Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J Neurosci*, 17:1217–25, 1997.
- [153] R. Masaki, T. Saito, K. Yamada, and R. Ohtani-Kaneko. Accumulation of phosphorylated neurofilaments and increase in apoptosis-specific protein and phosphorylated c-Jun induced by proteasome inhibitors. *J Neurosci Res*, 62:75–83, 2000.
- [154] P. K. Stys and Q. Jiang. Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons. *Neurosci Lett*, 328:150–4, 2002.
- [155] H. C. Pant. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J*, 256:665–8, 1988.
- [156] W. W. Schlaepfer, C. Lee, V. M. Lee, and U. J. Zimmerman. An immunoblot study of neurofilament degradation in situ and during calcium-activated proteolysis. *J Neurochem*, 44:502–9, 1985.
- [157] H. J. Rideout, I. Lang-Rollin, and L. Stefanis. Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int J Biochem Cell Biol*, 36:2551–62, 2004.
- [158] J. L. Webb, B. Ravikumar, J. Atkins, J. N. Skepper, and D. C. Rubinsztein. Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem*, 278:25009–13, 2003.
- [159] H. Herrmann and U. Aebi. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem*, 73:749–89, 2004.

- [160] H. Braak, E. Braak, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett*, 65:351–5, 1986.
- [161] Y. Pesah, T. Pham, H. Burgess, B. Middlebrooks, P. Verstreken, Y. Zhou, M. Harding, H. Bellen, and G. Mardon. Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development*, 131:2183–94, 2004.
- [162] M. F. Beal. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. 2000.
- [163] A. H. Schapira. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta*, 1410:159–70, 1999.
- [164] O. Riess, R. Kruger, H. Hochstrasser, A. S. Soehn, S. Nuber, T. Franck, and D. Berg. Genetic causes of Parkinson's disease: extending the pathway. *J Neural Transm Suppl*, pages 181–9, 2006.
- [165] E. M. Valente, P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger, and N. W. Wood. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304:1158–60, 2004.
- [166] R. M. Canet-Aviles, M. A. Wilson, D. W. Miller, R. Ahmad, C. McLendon, S. Bandyopadhyay, M. J. Baptista, D. Ringe, G. A. Petsko, and M. R. Cookson. *Proc Natl Sci U S A*, 101:9103–8, 2004.
- [167] K. M. Strauss, L. M. Martins, H. Plun-Favreau, F. P. Marx, S. Kautzmann, D. Berg, T. Gasser, Z. Wszolek, T. Muller, A. Bornemann, H. Wolburg, J. Downward, O. Riess, J. B. Schulz, and R. Kruger. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 14:2099–111, 2005.
- [168] Q. Liu, A. K. Raina, M. A. Smith, L. M. Sayre, and G. Perry. Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Mol Aspects Med*, 24:305–13, 2003.
- [169] A. C. McKee, K. S. Kosik, and N. W. Kowall. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 30:156–65, 1991.

- [170] G. K. Wilcock and M. M. Esiri. Plaques, tangles and dementia. A quantitative study. *J Neurol Sci*, 56:343–56, 1982.
- [171] S. G. Greenberg and P. Davies. A preparation of alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:5827–31, 1990.
- [172] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, and L. I. Binder. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:4913–7, 1986.
- [173] V. M. Lee, B. J. Balin, Jr. Otvos, L., and J. Q. Trojanowski. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*, 251:675–8, 1991.
- [174] K. Ishiguro, M. Takamatsu, K. Tomizawa, A. Omori, M. Takahashi, M. Arioka, T. Uchida, and K. Imahori. Tau protein kinase i converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J Biol Chem*, 267:10897–901, 1992.
- [175] T. Hosoi, M. Uchiyama, E. Okumura, T. Saito, K. Ishiguro, T. Uchida, A. Okuyama, T. Kishimoto, and S. Hisanaga. Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J Biochem*, 117:741–9, 1995.
- [176] U. Wagner, M. Utton, J. M. Gallo, and C. C. Miller. Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 beta influences tau binding to microtubules and microtubule organisation. *J Cell Sci*, 109:1537–43, 1996.
- [177] G. Michel, M. Mercken, M. Murayama, K. Noguchi, K. Ishiguro, K. Imahori, and A. Takashima. Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim Biophys Acta*, 1380:177–82, 1998.
- [178] L. H. Tsai, I. Delalle, Jr. Caviness, V. S., T. Chae, and E. Harlow. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*, 371:419–23, 1994.
- [179] T. Ohshima, J. M. Ward, C. G. Huh, G. Longenecker, Veeranna, H. C. Pant, R. O. Brady, L. J. Martin, and A. B. Kulkarni. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:11173–8, 1996.

- [180] T. Sasaki, M. Taoka, K. Ishiguro, A. Uchida, T. Saito, T. Isobe, and S. Hisanaga. In vivo and in vitro phosphorylation at Ser-493 in the glutamate (E)-segment of neurofilament-H subunit by glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem*, 277:36032–9, 2002.
- [181] B. S. Li, M. P. Daniels, and H. C. Pant. Integrins stimulate phosphorylation of neurofilament NF-M subunit KSP repeats through activation of extracellular regulated-kinases (Erk1/Erk2) in cultured motoneurons and transfected NIH 3T3 cells. *J Neurochem*, 76:703–10, 2001.
- [182] B. S. Li, L. Zhang, J. Gu, N. D. Amin, and H. C. Pant. Integrin alpha(1) beta(1)-mediated activation of cyclin-dependent kinase 5 activity is involved in neurite outgrowth and human neurofilament protein H Lys-Ser-Pro tail domain phosphorylation. *J Neurosci*, 20:6055–62, 2000.
- [183] R. J. Guan, B. S. Khatra, and J. A. Cohlberg. Phosphorylation of bovine neurofilament proteins by protein kinase FA (glycogen synthase kinase 3). *J Biol Chem*, 266:8262–7, 1991.
- [184] H. Miyasaka, S. Okabe, K. Ishiguro, T. Uchida, and N. Hirokawa. Interaction of the tail domain of high molecular weight subunits of neurofilaments with the COOH-terminal region of tubulin and its regulation by tau protein kinase ii. *J Biol Chem*, 268:22695–702, 1993.
- [185] A. Hirano, H. Donnerfeld, S. Sasaki, and I. Nakano. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 43:461–70, 1984.
- [186] D. F. Watson, F. N. Nachtman, R. W. Kuncel, and J. W. Griffin. Altered neurofilament phosphorylation and beta tubulin isotypes in Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Neurology*, 44:2383–7, 1994.
- [187] M. L. Schmidt, J. A. Martin, V. M. Lee, and J. Q. Trojanowski. Convergence of lewy bodies and neurofibrillary tangles in amygdala neurons of Alzheimer’s disease and Lewy body disorders. *Acta Neuropathol (Berl)*, 91:475–81, 1996.
- [188] C. E. Shepherd, H. McCann, E. Thiel, and G. M. Halliday. Neurofilament-immunoreactive neurons in Alzheimer’s disease and dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis*, 9:249–57, 2002.

- [189] T. Iwatsubo, H. Yamaguchi, M. Fujimuro, H. Yokosawa, Y. Ihara, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee. Purification and characterization of Lewy bodies from the brains of patients with diffuse Lewy body disease. *Am J Pathol*, 148:1517–29, 1996.
- [190] T. Iwatsubo. Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol*, 250:III11–4, 2003.
- [191] M. Okochi, J. Walter, A. Koyama, S. Nakajo, M. Baba, T. Iwatsubo, L. Meijer, P. J. Kahle, and C. Haass. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 275:390–7, 2000.
- [192] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388:839–40, 1997.
- [193] C. A. Ross and M. A. Poirier. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:891–8, 2005.
- [194] L. Stefanis, K. E. Larsen, H. J. Rideout, D. Sulzer, and L. A. Greene. 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*, 21:9549–60, 2001.
- [195] L. Petrucelli, C. O'Farrell, P. J. Lockhart, M. Baptista, K. Kehoe, L. Vink, P. Choi, B. Wolozin, M. Farrer, J. Hardy, and M. R. Cookson. Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*, 36:1007–19, 2002.
- [196] S. Engelender, Z. Kaminsky, X. Guo, A. H. Sharp, R. K. Amaravi, J. J. Kleiderlein, R. L. Margolis, J. C. Troncoso, A. A. Lanahan, P. F. Worley, V. L. Dawson, T. M. Dawson, and C. A. Ross. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet*, 22:110–4, 1999.
- [197] M. Tanaka, Y. M. Kim, G. Lee, E. Junn, T. Iwatsubo, and M. M. Mouradian. Aggregates formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem*, 279:4625–31, 2004.
- [198] B. Bercovich, I. Stancovski, A. Mayer, N. Blumenfeld, A. Laszlo, A. L. Schwartz, and A. Ciechanover. Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J Biol Chem*, 272:9002–10, 1997.
- [199] S. Kwak, T. Masaki, S. Ishiura, and H. Sugita. Multicatalytic proteinase is present in Lewy bodies and neurofibrillary tangles in diffuse Lewy body disease brains. *Neurosci Lett*, 128:21–4, 1991.

- [200] C. J. Cummings, M. A. Mancini, B. Antalffy, D. B. DeFranco, H. T. Orr, and H. Y. Zoghbi. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet*, 19:148–54, 1998.
- [201] C. Jung, J. Yabe, F. S. Wang, and T. B. Shea. Neurofilament subunits can undergo axonal transport without incorporation into Triton-insoluble structures. *Cell Motil Cytoskeleton*, 40:44–58, 1998.
- [202] M. Inagaki, Y. Nishi, K. Nishizawa, M. Matsuyama, and C. Sato. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature*, 328:649–52, 1987.
- [203] S. Kitamura, S. Ando, M. Shibata, K. Tanabe, C. Sato, and M. Inagaki. Protein kinase C phosphorylation of desmin at four serine residues within the non-alpha-helical head domain. *J Biol Chem*, 164:5674–8, 1989.
- [204] J. E. Celis, P. M. Larsen, S. J. Fey, and A. Celis. Phosphorylation of keratin and vimentin polypeptides in normal and transformed mitotic human epithelial amnion cells: behavior of keratin and vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol*, 97:1429, 1983.
- [205] P. M. Steinert and R. K. Liem. Intermediate filament dynamics. *Cell*, 60:521–3, 1990.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Mira Lang
geboren am 21.01.1980 in Nürtingen

Schulausbildung:

1986 - 1990
Grund- und Hauptschule Großbettlingen

1990 - 1996
Gymnasium Neckartenzlingen

1996 - 1999
Fritz-Ruoff-Gymnasium Nürtingen

Hochschulausbildung:

10/1999 - 03/2004
Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

07/2003 - 03/2004
Diplomarbeit im Labor für Molekulare Genetik
in der Hals-Nasen-Ohren Klinik Tübingen mit dem Titel:
„Kandidatengenanalyse bei Familien mit Waardenburg-Syndrom“

29.03.2004
Abschluß als Diplom-Biologe

05/2004 - 09/2007
Promotion im Labor für funktionelle Neurogenomik am
Hertie Institut für klinische Hirnforschung Tübingen mit dem Titel:
„Funktionelle Charakterisierung von Mutationen
im *Neurofilament M* Gen bei der Parkinson Krankheit“