

**Analyse der biologischen Funktion
des Parkinson assoziierten Proteins LRRK2
in Knockdown Modellen**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Karina Häbig, geb. Schöbel

aus Elsterwerda

vorgelegte

DISSERTATION

2010

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 02. 2010

Dekan: Prof. Dr. Hanspeter Mallot

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Rieß
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rejko Krüger
3. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Müller

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2005 bis Juli 2009 im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Tübingen in der Abteilung Medizinische Genetik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß durchgeführt.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Olaf Rieß für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und seiner wissenschaftlichen Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens und Diskussionen beim Parkinson-Meeting danke ich Rejko Krüger.

Einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit verdanke ich Michael Bonin. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für die fachkompetente Betreuung und seinen steten Diskussionswillen, insbesondere jedoch für seine uneingeschränkte Unterstützung und die jederzeit erhaltene Hilfe.

Was wären wissenschaftliche Ergebnisse ohne den kritischen Blick von lieb gewonnenen Leidensgenossen der LRRK2-Forschung. In diesem Sinne bin ich sehr dankbar für die großartige Unterstützung von Saskia Biskup. Sie hat mich gelehrt mit „Reviewer“-Augen meine Ergebnisse zu betrachten und mir mit hilfreichen Diskussionen immer wieder „unser“ Ziel vor Augen geführt. Natürlich gilt mein Dank ihr und Natalja Funk für die Bereitstellung und Genotypisierung der LRRK2 Knockdown Tiere.

Allen Mitarbeitern der Microarray Facility Tübingen möchte ich herzlich danken, nicht nur für die kompetente Hilfe bei den Mikroarray Analysen, sondern auch für das Zusammengehörigkeitsgefühl. Insbesondere geht dabei mein Dank an Michael Walter, der sich für meine Fragen (nicht nur zu Arrays) immer Zeit genommen hat. Karin Schäferhoff und Jessica Hoffmann danke ich dafür, dass sie mit mir oft Frust aber auch Freude geteilt haben. Ein herzlicher Dank geht auch an Sandra Gellhaar. Sie war mit ihrer Begeisterungsfähigkeit für die LRRK2-Forschung eine echte Bereicherung für meinen Arbeitsalltag.

Ich bedanke mich auch bei allen Mitarbeitern der Medizinischen Genetik für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders Silke Metzger, Jeannette Hübener, Kathrin Grundmann und Anne Söhn haben mir mit netten Gesprächen manche Inkubationszeit verkürzt.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, in der alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Enden möchte ich mit einem großen „DANKE!“ an Kai. Er war während der Entstehung dieser Arbeit nicht nur mein Ehemann, sondern auch Frustableiter, Kritiker, Motivationskünstler, Computerspezialist, Seelsorger und liebevoller Gesprächspartner. Seine Liebe, seine Geduld und sein Verständnis gaben mir die moralische Unterstützung für diese Arbeit.

„Das Schöne an der Wissenschaft ist, dass
man nie damit fertig wird, sondern sich
bei jedem Ergebnis fragen sollte, ob es
nicht auch ganz anders aussehen könnte.“

Prof. Dr. Ferdinand Starmühlner

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

- Habig, K., Walter, M., Poths, S., Riess, O. and Bonin, M. (2008)
RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. *Neurogenetics*, **9**, 83-94
- Habig, K., Walter, M., Poths, S., Riess, O. and Bonin, M. (2008)
Investigating the function of LRRK2, a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Qiagen Gene Expression Newsletter*, **14**
- Habig, K., Walter, M., Stappert, H., Riess, O. and Bonin, M. (2009) Microarray expression analysis of human dopaminergic neuroblastoma cells after RNA interference of SNCA-a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res*, **1256**, 19-33.

Poster:

- Karina Häbig, Michael Walter, Olaf Riess und Michael Bonin
Microarray Expression Profile of LRRK2 Cell Culture Parkinson Model
18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Bonn, März 2007
- Karina Häbig, Saskia Biskup, Olaf Riess und Michael Bonin
The Parkinson's disease causing gene LRRK2 influences actin cytoskeleton signalling cascades
19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Hannover, April 2008
- Karina Häbig, Olaf Riess, Saskia Biskup und Michael Bonin
LRRK2 interacts with key mediators of cytoskeleton signaling
Alzheimer's Conference / Parkinson's Conference: *ADPD* 2009 Prag, März 2009

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis..... V

Tabellenverzeichnis..... VII

Abkürzungsverzeichnis VIII

1. Einleitung I

1.1 Das Parkinson-Syndrom..... 1

1.1.1 Symptomatik und Prävalenz des Parkinson-Syndroms 1

1.1.2 Neuropathologie des Parkinson-Syndroms..... 4

1.1.3 Therapie des Parkinson-Syndroms 6

1.1.4 Nicht genetische Ursachen des Parkinson-Syndroms..... 7

1.1.4.1 Alterung 7

1.1.4.2 Umweltfaktoren 8

1.1.4.3 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress 8

1.1.4.4 Proteinanhäufungen 10

1.1.4.5 Apoptose 11

1.1.4.6 Kalzium-Homöostase..... 12

1.1.5 Genetische Ursachen des Parkinson-Syndroms 13

1.2 Leucine-rich repeat kinase 2 - LRRK2 18

1.2.1 Genetischer Ursprung und Struktur von LRRK2..... 18

1.2.2 Zelluläre Lokalisation und Expression von LRRK2..... 20

1.2.3 LRRK2 als genetische Ursache des Parkinson-Syndroms..... 21

1.2.4 Funktionelle Domänen von LRRK2..... 24

1.2.4.1 Proteininteraktionsdomänen von LRRK2 24

1.2.4.2 GTPase-Funktion von LRRK2 25

1.2.4.3 Kinase-Funktion von LRRK2 26

1.2.5 Substrate und Interaktionspartner von LRRK2..... 27

1.2.5.1 Substrate 27

1.2.5.2 Interaktionspartner 28

1.2.6 Toxizität von LRRK2 29

1.2.7 Tiermodelle von LRRK2 31

1.3 Die Funktion des Zytoskeletts in Neuronen..... 33

1.3.1 Das Zytoskelett der Zelle..... 33

1.3.2 ARHGEF7 und seine Bedeutung für das Aktin-Zytoskelett der Zelle 34

1.3.3 Das Zytoskelett und seine Funktion in Neuronen..... 36

1.3.4 Zytoskelettkomponenten und ihr Einfluss auf neuronale Degeneration 37

1.4 Zielstellung der Arbeit..... 39

2. Material und Methoden..... 41

2.1 Material..... 41

2.1.1 Zellkultur 41

2.1.2 LRRK2-Knockdown-Mäuse..... 41

2.1.3 Software und Internetressourcen 41

2.1.4 Oligonukleotide 42

2.1.5 Vektoren 45

2.1.6 Größenstandards 45

2.1.7 Enzyme 45

2.1.8 Antikörper..... 45

2.1.9 Gebrauchsfertige Reaktionslösungen 46

2.1.10 Chemikalien..... 47

2.1.10.1 Toxine 48

2.1.11 Puffer und Lösungen 49

2.1.12 Geräte 51

2.1.13 Verbrauchsmaterialien..... 52

2.2 Methoden	53
2.2.1 Zellkultur	53
2.2.1.1 Versorgen, Passagieren, Zählen	53
2.2.1.2 Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen	53
2.2.2 Klonierung	54
2.2.2.1 Insert-Vorbereitung	54
2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	55
2.2.2.3 Vektor-Vorbereitung	55
2.2.2.4 Ligation	55
2.2.2.5 LIC-Klonierung	55
2.2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -Bakterien	56
2.2.2.7 Transformation chemisch kompetenter DH5 α -Bakterien	57
2.2.2.8 Kolonie-PCR	57
2.2.2.9 Kultivierung von DH5 α -Bakterien	58
2.2.2.10 Plasmidpräparation	58
2.2.2.11 Kontrollverdau	58
2.2.2.12 Sequenzierung	58
2.2.2.13 <i>In Vitro</i> Mutagenese (IVM)	59
2.2.3 Transfektion humaner Zellen	61
2.2.3.1 Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit siRNA	61
2.2.3.2 Transfektion von HEK-293-Zellen mit Plasmiden	62
2.2.4 RNA-Methoden	63
2.2.4.1 RNA-Isolation	63
2.2.4.2 RNA Quantitäts- und Qualitätsbestimmung	63
2.2.5 Mikroarray Expressionsanalyse	63
2.2.5.1 Grundlagen	63
2.2.5.2 Affymetrix GeneChip [®] Arrays	64
2.2.5.3 Illumina BeadChip Arrays	65
2.2.5.4 Experimentaufbau	67
2.2.6 Funktionelle Analyse von Expressionsprofilen	67
2.2.6.1 GO-Kategorisierung	67
2.2.6.2 Funktions- und Netzwerkanalyse	67
2.2.7 Synthese von cDNA	68
2.2.8 Quantitative RT-PCR	69
2.2.8.1 Grundlagen	69
2.2.8.2 Primerentwurf und Etablierung	70
2.2.8.3 Bestimmung der relativen Expression	71
2.2.9 Proteinbasierte Methoden	72
2.2.9.1 Proteinisolation	72
2.2.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	73
2.2.9.3 Koimmunopräzipitation	73
2.2.9.4 GTP-Bindungsanalyse und GTP-Austauschanalyse	74
2.2.9.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	74
2.2.9.6 Western Transfer	75
2.2.9.7 Immunologische Detektion von Proteinen nach dem Western Transfer	76
2.2.9.8 Quantifizierung von Proteinbanden	76
2.2.10 Apoptose-Analyse	76
2.2.11 Immunfluoreszenzanalyse	77

3. Ergebnisse	79
3.1 Gesamtgenomische Analyse humaner LRRK2-Knockdown-Zellen	80
3.1.1 RNA-Interferenz von LRRK2	80
3.1.2 Mikroarray-Experiment von LRRK2-Knockdown-Zellen	80
3.1.2.1 Funktionelle Analysen	81
3.1.2.2 Netzwerk-Analyse	83
3.1.2.3 Validierung des Mikroarray-Experiments der LRRK2-Knockdown-Zellen.....	86
3.2 Zellkulturbasierte Analyse von LRRK2-Knockdown-Zellen	88
3.2.1 LRRK2-Expression unter Stressbedingungen	88
3.2.2 LRRK2-Knockdown und sein Einfluss auf Apoptose	89
3.2.3 Transkriptbasierte Analyse des LRRK2-Knockdowns	90
3.3 Gemeinsame Regulationskaskaden des LRRK2- und SNCA-Knockdowns	95
3.4 Gesamtgenomische Analyse des ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdowns	99
3.5 LRRK2-Interaktionspartnersuche mit Proteinen des zytoskelettalen Signalweges	103
3.5.1 Koimmunopräzipitationsanalyse	104
3.5.2 Kolokalisationsanalyse.....	105
3.5.3 Analyse des Einflusses von mutiertem LRRK2.....	107
3.6 Gesamtgenomische Analyse von LRRK2-Knockdown-Mäusen	115
3.6.1 Mikroarray-Experiment des murinen LRRK2-Knockdowns.....	115
3.6.2 Funktionelle Analyse differenziell regulierter Gene des murinen LRRK2-Knockdowns	116
3.6.3 Vergleich zwischen humanen LRRK2-Knockdown und murinen LRRK2-Knockdown	120
4. Diskussion	127
4.1 Einfluss des LRRK2-Knockdowns auf Apoptoseprozesse	127
4.1.1 Gesamtgenomische Expressionsanalyse des humanen LRRK2-Knockdowns unter Betrachtung der Apoptose-Signalkaskaden	127
4.1.2 Funktionelle Apoptose-Analyse des humanen LRRK2-Knockdowns.....	131
4.1.3 Vergleich des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns bei Apoptoseprozessen.....	136
4.1.4 Zusammenfassung: LRRK2 und seine Bedeutung für Apoptoseprozesse.....	141
4.2 Vergleich des LRRK2- und SNCA-Knockdowns in humaner Zellkultur	142
4.2.1 Einfluss von LRRK2 und SNCA auf Apoptoseprozesse	142
4.2.2 Einfluss von LRRK2 und SNCA auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg	143
4.2.3 Einfluss von LRRK2 und SNCA auf Zytoskelettprozesse	145
4.2.4 Zusammenfassung: Gemeinsamkeiten von LRRK2 und SNCA Regulationskaskaden.....	147
4.3 Einfluss des LRRK2-Knockdowns auf zytoskelettale Signalkaskaden	148
4.3.1 Gesamtgenomische Expressionsanalyse des humanen LRRK2-Knockdowns unter Betrachtung zytoskelettaler Signalkaskaden.....	148
4.3.1.1 Funktionelle Analyse des LRRK2-Knockdowns unter zytoskelettalem Stress.....	150
4.3.1.2 Gesamtgenomische Analyse des ARHGEF7 - LRRK2 Doppel-Knockdowns	152
4.3.2 Vergleich des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns in zytoskelettalen Prozessen.....	153
4.3.2.1 LRRK2-Knockdown und die Beeinflussung synaptischer Prozesse.....	153
4.3.2.2 LRRK2-Knockdown und die Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts	156
4.3.3 Interaktionspartneranalyse.....	161
4.3.3.1 Beta-Aktin.....	161
4.3.3.2 CDC42	162
4.3.3.3 ARHGEF7	163
4.3.3.4 Modell der LRRK2-Interaktion mit Zytoskelett-Proteinen.....	168
4.3.4 Zusammenfassung: Die Bedeutung von LRRK2 auf zytoskelettäre Prozesse.....	171

5. Zusammenfassung und Ausblick.....	173
5.1 Zusammenfassung.....	173
5.2 Ausblick	175
5.3 Summary.....	176
7. Anhang.....	179
7.1 Differentiell regulierte Transkripte des ARHGEF7 - LRRK2 Doppel-Knockdowns.....	179
7.1.1 siARHGEF7 vs control.....	179
7.1.2 siARHGEF7 + siLRRK2 vs control	182
7.1.3 Überlagerung siARHGEF7 vs control und siLRRK2 vs control.....	189
7.1.4 Überlagerung siARHGEF7 vs control und siARHGEF7 + siLRRK2 vs control	190
7.1.5 Überlagerung siARHGEF7 + siLRRK2 vs control und siLRRK2 vs control.....	191
7.1.6 Überlagerung des siARHGEF7 vs control und siARHGEF7 + siLRRK2 vs control und siLRRK2 vs control (3er Vergleich).....	193
7.2 Differentiell regulierte Transkripte mLRRK2 KD vs WT.....	194
8. Literaturverzeichnis.....	207
9. Lebenslauf	229
10. Erklärung.....	231

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Prävalenz des Parkinson-Syndroms 3

Abbildung 1.2: Wesentliche Schritte der dopaminergen Neurotransmission..... 5

Abbildung 1.3: Entstehung und Inaktivierung von ROS..... 9

Abbildung 1.4: Signalkaskaden die mit der Pathogenese des PS in Zusammenhang stehen 14

Abbildung 1.5: Domänen-Struktur von humanem LRRK2 18

Abbildung 1.6: Dimerisierungsmodelle von LRRK2..... 19

Abbildung 1.7: Modell der Autophosphorylierung von LRRK2 20

Abbildung 1.8: MAPK-Signalwege 28

Abbildung 1.9: Zusammenspiel von Mikrofilamenten und seinen Hilfsproteinen 34

Abbildung 1.10: Domänenstruktur der PIX-Familie..... 35

Abbildung 1.11: Aufbau eines Neurons und Zytoskelettkomponenten im Wachstumskegel eines Axons..... 36

Abbildung 3.1: Übersichtsdarstellung der Analysen und die dabei betrachteten Fragestellungen..... 79

Abbildung 3.2: Effizienz der RNA-Interferenz von LRRK2 80

Abbildung 3.3: GO-Kategorisierung der differenziell regulierten Gene..... 81

Abbildung 3.4: Differenziell regulierte Gene in kanonischen Netzwerken 82

Abbildung 3.5: Netzwerk 1 - Einfluss von LRRK2 in Apoptose-Signalkaskaden..... 84

Abbildung 3.6: Netzwerk 2 - Einfluss von LRRK2 in Zytoskelett-Signalkaskaden 85

Abbildung 3.7: Netzwerk der Validierung mit qRT-PCR..... 87

Abbildung 3.8: Validierung mit qRT-PCR 87

Abbildung 3.9: LRRK2-Expression unter Stress-induzierenden Toxinen 88

Abbildung 3.10: Apoptose-Analyse unter LRRK2-Knockdown und Stress-induzierenden Toxinen 89

Abbildung 3.11: Netzwerk zur Analyse apoptotischer Signalkaskaden..... 91

Abbildung 3.12: Berechnung der relativen Expressionen der Transkripte bei Stressinduktion 91

Abbildung 3.13: qRT-PCR nach LRRK2-Knockdown und oxidativem Stress 92

Abbildung 3.14: qRT-PCR nach LRRK2-Knockdown und ER-Stress..... 93

Abbildung 3.15: qRT-PCR nach LRRK2-Knockdown und zytoskelettalem Stress 94

Abbildung 3.16: Venn-Diagramm des LRRK2- und SNCA-Knockdowns..... 95

Abbildung 3.17: Funktionelle Übereinstimmung von LRRK2- und SNCA-Knockdown..... 96

Abbildung 3.18: Vergleich veränderter kanonischer Netzwerke im LRRK2- und SNCA-Knockdown 97

Abbildung 3.19: Analyse der Effizienz der RNA Interferenz von ARHGEF7 gemeinsam mit LRRK2 99

Abbildung 3.20: Venn-Diagramm des ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdowns..... 100

Abbildung 3.21: Netzwerk des ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdowns 102

Abbildung 3.22: Übersichtsdarstellung der Interaktionsanalysen 103

Abbildung 3.23: LRRK2-Interaktion mit Kandidatenproteinen 104

Abbildung 3.24: LRRK2- und ARHGEF7-Domäneneingrenzung 105

Abbildung 3.25: LRRK2-Kolokalisation mit Kandidatenproteinen..... 106

Abbildung 3.26: Einfluss von LRRK2 mit Mutationen auf die endogene Expression von Interaktoren 108

Abbildung 3.27: ARHGEF7-Interaktion mit mutiertem LRRK2..... 109

Abbildung 3.28: Berechnung des Bindungspotentials zwischen ARHGEF7 und LRRK2 110

Abbildung 3.29: ARHGEF7-Interaktion mit R1441C LRRK2..... 111

Abbildung 3.30: GTP-Bindungseinfluss von ARHGEF7 auf mutiertes LRRK2..... 111

Abbildung 3.31: Berechnung des GTP-Bindungspotentials von LRRK2 unter ARHGEF7-Einfluss..... 112

Abbildung 3.32: GTP-Austauschanalyse von LRRK2 unter ARHGEF7-Einfluss 113

Abbildung 3.33: Berechnung der GTP-Bindung von LRRK2 unter GTP-Kompetition 114

Abbildung 3.34: Validierung des murinen LRRK2-Knockdowns mit qRT-PCR..... 115

Abbildung 3.35: Beeinflusste biologische Funktionen durch murinen LRRK2-Knockdown 116

Abbildung 3.36: Beeinflusste kanonische Signalwege durch murinen LRRK2-Knockdown 117

Abbildung 3.37: Einfluss des murinen LRRK2-Knockdowns in synaptische Langzeitdepression..... 118

Abbildung 3.38: Einfluss des murinen LRRK2-Knockdowns in Dopamin-Rezeptor-Signalwege..... 119

Abbildung 3.39: Venn-Diagramm des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns..... 121

Abbildung 3.40: Einfluss von BRAP in zelluläre Signalkaskaden 122

Abbildung 3.41: Funktionelle Überlagerung des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns..... 122

Abbildung 3.42: Beeinflusste kanonische Netzwerke des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns 123

Abbildung 4.1: Darstellung intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalkaskaden.....	128
Abbildung 4.2: Einfluss von MAPKKK-Kaskaden auf Apoptoseprozesse	130
Abbildung 4.3: Positive und negative Rückkopplungs-Regulation bei ER-Stress.....	132
Abbildung 4.4: Einfluss der MAPK8 auf Apoptose-Signalkaskaden	135
Abbildung 4.5: Einfluss des LRRK2-Knockdowns auf TP53-Signalkaskaden	137
Abbildung 4.6: Einfluss des LRRK2- und SNCA-Knockdowns auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg	144
Abbildung 4.7: Einfluss des LRRK2- und SNCA-Knockdowns auf Aktin-Zytoskelett-Signalwege	145
Abbildung 4.8: Signalkaskade der Aktinpolymerisierung durch CDC42	149
Abbildung 4.9: Die Bildung synaptischer Vesikel.....	154
Abbildung 4.10: Aktin und der synaptische Vesikel-Zyklus	155
Abbildung 4.11: Zelladhäsionsrezeptoren und deren Verbindung zum Aktin-Zytoskelett.....	157
Abbildung 4.12: Regulationsmechanismen um PIP ₂	158
Abbildung 4.13: Einfluss der PKC auf ERM-Proteine	158
Abbildung 4.14: Einfluss der ARHGEF7-Bindung auf die LRRK2-R1441C-Mutante.....	165
Abbildung 4.15: Einfluss des ARHGEF7 auf die LRRK2-GTP-Bindung.....	167
Abbildung 4.16: LRRK2-GTP-Austauschanalyse unter ARHGEF7-Einfluss.....	168
Abbildung 4.17: Modell der LRRK2-Wirkung als Gerüstprotein am Wachstumskegel.....	169

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Neuropathologische Stadieneinteilung des Parkinson-Syndroms	4
Tabelle 1.2: Aufstellung der bisher gefundenen PARK-Loci	13
Tabelle 1.3: LRRK2-Mutationen und ihre charakteristischen Eigenschaften	22
Tabelle 2.1: Software und Internetressourcen	41
Tabelle 2.2: Oligonukleotide zur Messung der Expression von Transkripten der Apoptose-Signalkaskade	42
Tabelle 2.3: Oligonukleotide zur Klonierung	43
Tabelle 2.4: Oligonukleotide zur <i>In Vitro</i> Mutagenese	43
Tabelle 2.5: Oligonukleotide zur Sequenzierung	44
Tabelle 2.6: Oligonukleotide zur Messung der murinen Referenzgene	44
Tabelle 2.7: Oligonukleotide zur Validierung des mLRRK2-Mikroarray-Experimentes	44
Tabelle 2.8: verwendete Vektoren	45
Tabelle 2.9: Primäre und Sekundäre Antikörper	46
Tabelle 2.10: Gebrauchsfertige Reaktionslösungen	46
Tabelle 2.11: Chemikalienverzeichnis	47
Tabelle 2.12: Toxinverzeichnis	49
Tabelle 2.13: Geräteverzeichnis	51
Tabelle 2.14: Verbrauchsmaterialien	52
Tabelle 2.15: Bedingungen der Klonierungs-PCR	54
Tabelle 2.16: Ansätze LIC-Klonierung	56
Tabelle 2.17: Bedingungen der Kolonie-PCR	57
Tabelle 2.18: Sequenzierungsreaktion	59
Tabelle 2.19: IVM Reaktionsbedingungen	59
Tabelle 2.20: Menge an transfizierten Plasmiden	62
Tabelle 2.21: Mikroarray-Experimentaufbau	67
Tabelle 2.22: qRT-PCR Programm	71
Tabelle 2.23: Einstellungen des LSM510	77
Tabelle 3.1: Differenziell regulierte Gene nach LRRK2-RNAi mit Einfluss auf Zytoskelett-Signalkaskaden	86
Tabelle 3.2: Gemeinsam differenziell regulierte Gene des LRRK2- und SNCA-Knockdowns	96
Tabelle 3.3: Regulierte Gene des LRRK2- und SNCA-Knockdowns in kanonischen Netzwerken	98
Tabelle 3.4: Differenziell regulierte Gene synaptischer Prozesse des murinen LRRK2-Knockdowns	119
Tabelle 3.5: Differenziell regulierte Gene mit Zytoskelettfunktion im murinen LRRK2-Knockdown	124

Abkürzungsverzeichnis

@	at (bei)	incl.	inklusive
®	registered Trademark	IP	Immunopräzipitation
°C	Grad Celsius	IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat, Inositoltriphosphat
μ	Mikro-	IVT	In Vitro Transkription
3-MT	3-Metyoxytyramin	k	Kilo
6-OH-DA	6-Hydroxydopamin	kb	Kilobasen
APS	Ammoniumpersulfat	KD	Knockdown
AS	Aminosäuren	kDa	Kilo-Dalton
bp	Basenpaar(e)	Kit	gebrauchsfertige Reaktionslösung
BSA	Rinder Serum Albumin	l	Liter
cAMP	Adenosin-3',5'-cyclisches Phosphat	L-DOPA	L-3,4-dioxyphenylalanin;
cDNA	copied DNA	LIC	Ligation independent cloning, Ligations unabhängige Klonierung
cm	Zentimeter	m	Milli-
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	M	Molar
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase	MAO-B	Monoamin-Oxidase Typ B
Cp	Crossing Point	MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
cRNA	copied RNA	MAPKK	Map-Kinase-Kinase
d.h.	das heißt	MAPKKK	Map-Kinase-Kinase-Kinase
DAT	Dopamin-Transporter	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
dd	doppelt destilliert	min	Minuten
DDC	DOPA-Decarboxylase	MLK	„Mixed-lineage“ Kinase
D-MEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium	mLRRK2 KD	muriner LRRK2 Knockdown
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridin
dNTP	Desoxyribonukleosid- Triphosphat	MPP ⁺	1-Methyl-4-phenyl-pyridin
DOPAC	3,4 Dihydroxyphenylethylsäure	n	Nano-
ds	Doppelstrang	NCBI	National Center for Biotechnology Information
E	Effizienz	nm	Nanometer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NO	Stickstoffmonoxid
et al.	et alii (und andere)	nt	Nukleotid
FC	„Fold Change“	OD	optische Dichte
FCS	Fötales Kälber Serum	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
g	Gramm	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
GAP	GTPase aktivierendes Protein	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
GEF	Guanidin-Austauschfaktoren	PS	Parkinson-Syndrom
GI	Adenylat-Zyklase-inhibierendes G-Protein	PI ₃ -Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat
GO-Kategorie	Gene Ontology-Kategorie	PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)- trisphosphat
Gs	Adenylat-Zyklase-stimulierendes G-Protein	qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
h	Stunde(n)	RIN	RNA integrity number
H ₂ O	Wasser	RNA	Ribonukleinsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	RNAi	RNA-Interferenz
hLRRK2 KD	humaner LRRK2 Knockdown	rpm	Umdrehungen pro Minute
HVA	Homovanillinsäure	rRNA	ribosomale RNA
Hz	Hertz	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
ID	Identifikationsnummer		
Inc	Incorporated company		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

sec	Sekunde(n)	Tween-20	Polyoxyethylen Sorbitan-Monolaurat
siRNA	short interfering RNA		
ss	Einzelstrang	UV	Ultraviolett
TBE	Tris-Borat-EDTA	V	Volt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	VMAT	vaskulärer Monoamin-Transporter
TH	Thyrosin-Hydroxylase	WT	Wildtyp
TM	Trade Mark	x g	mal Erdbeschleunigung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	z.B.	zum Beispiel

Purin und Pyrimidinbasen: A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin, T= Thymin, U= Uracil

Aminosäuren: Alanin= A, Arginin= R, Asparagin= N, Asparaginsäure= D, Cystein= C, Glutamin= Q, Glutaminsäure= E, Glycin= G, Histidin= H, Isoleucin= I, Leucin= L, Lysin= K, Methionin = M, Phenylalanin= F, Prolin= P, Serin= S, Threonin= T, Tryptophan= W, Tyrosin= Y, Valin= V

Länder: D= Deutschland, B= Belgien, CH= Schweiz, GB= Großbritannien, USA=Vereinigte Staaten v. Amerika

1. Einleitung

1.1 Das Parkinson-Syndrom

1.1.1 Symptomatik und Prävalenz des Parkinson-Syndroms

Die erste Beschreibung der Parkinson-Erkrankung geht in das Jahr 1817 zurück. Zu dieser Zeit verfasste James Parkinson, der vom 11.04.1755 bis zum 21.12.1824 in Hoxton, einem Vorort von London, lebte, die Schrift „An Essay on the Shaking Palsy“. In diesem Essay beschreibt er die Symptome, welche er bei sechs seiner Patienten beobachtet hatte (Parkinson, 1817). Diese erste Beschreibung diente als Grundlage der auch jetzt noch geltenden vier Kardinalsymptome der Parkinson-Erkrankung: Bradykinese (verlangsamte Bewegung), Rigor (Muskelsteifheit), Tremor (Zittern) und posturale Instabilität (Haltungsinstabilität) (Gibb und Lees, 1989).

Im Lauf der Jahre wurde die Bezeichnung „Parkinson-Erkrankung“ durch den syndromatischen Oberbegriff „Parkinson-Syndrom“ (PS) abgelöst (Diener und Putzki, 2008). Parkinson-Syndrome werden in vier Gruppen klassifiziert:

- (1) das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), welches 75% aller PS ausmacht;
- (2) die selten vorkommenden familiären Formen des Parkinson-Syndroms;
- (3) symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome und
- (4) Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (atypische Parkinson-Syndrome) (Diener und Putzki, 2008).

Betrachtet man die vier Kardinalsymptome detailliert, so bezeichnet die Bradykinese die verlangsamte Initiation von Willkürbewegungen, wobei bei repetitiven Aktionen Geschwindigkeit und Amplitude progressiv abnehmen. Automatische und gewohnte Bewegungen wie zum Beispiel das Mitschwingen der Arme während der Bewegung, sind gewöhnlich bei Parkinson-Patienten stark reduziert. Bradykinese im Gang erkennt man an Initiationsschwierigkeiten, Langsamkeit und kleinen Schritten (Klockgether, 2004). Wendebewegungen benötigen viele Zwischenschritte und die Fallneigung ist erhöht. Auch haben die Patienten wenig Gesichtsbewegung (Hypomimie) und gestikulieren selten während eines Gesprächs. Im späteren Verlauf der Krankheit wird ihre Stimme zunehmend leiser und monoton. Mit Fortschreiten der Krankheit werden flüssige, koordinierte Geschicklichkeit benötigende Bewegungsabläufe wie Zähneputzen, Zuknöpfen, Ballspiele oder Computerarbeit für die Patienten immer problematischer (Gerlach et al., 2007).

Der Rigor oder die muskuläre Steifigkeit ist definiert als ansteigender Widerstand eines Gelenks gegen passive Bewegung. Im Gegensatz zur Spastizität betrifft die Steifigkeit konstant alle Bereiche der Bewegung. Parkinson-Patienten fühlen sich starr und haben eine reduzierte Fähigkeit Extremitätenmuskeln zu entspannen (Klockgether, 2004). Aus dem Rigor resultiert die Unfähigkeit von Patienten sich rasch zu bewegen oder sich nachts im Bett zu wenden. Zusätzlich verhindert er feinmotorische Arbeiten wie das Schreiben.

Ein Frühsymptom der Krankheit ist auch die Verkleinerung des Schriftbildes (Mikrografie), das zusätzlich die Zeile nicht mehr hält und krakelig erscheint (Gerlach et al., 2007).

Der Tremor bei Parkinson-Patienten ist meistens ein Ruhetremor. Dieses Zittern hat eine Frequenz von 4-7 Hz mit einer kleinen Amplitude. Es ist das auffälligste Symptom der Parkinsonschen Krankheit, wobei das Zittern meistens die oberen Gelenke, seltener die Beine oder den Kopf betrifft (Klockgether, 2004). Es sind zudem Patienten bekannt, welche nach vielen Erkrankungsjahren auch einen hochamplitudigen Tremor entwickeln. Bei psychischer Belastung kann der Tremor deutlicher werden und sich in seiner Amplitude steigern. Der Ruhetremor verschwindet bei Bewegungen mit der betroffenen Extremität (Gerlach et al., 2007).

In den späten Stadien des PS tritt das vierte Kardinalsymptom, die posturale Instabilität, auf. Dabei fällt es den Patienten schwer, ihre aufrechte Körperhaltung stabil beizubehalten. Die Betroffenen korrigieren sowohl im Sitzen als auch im Stehen oft auffällig ihre Haltung, da sie diese nicht automatisch ausbalancieren können. Die posturale Instabilität kann durch einen Stoß- oder Zugtest nachgewiesen werden. Bei diesem Test reagiert der aufrecht stehende, betroffene Patient auf ein Schubsen oder Ziehen mit einem Ausfallschritt, um sein Fallen zu verhindern (Gerlach et al., 2007).

Als fünftes Kardinalsymptom wird die Riechstörung diskutiert. Sie tritt bei nahezu allen Parkinson-Patienten auf und ist leicht zu diagnostizieren (Doty et al., 1988; Muller et al., 2002; Sommer et al., 2004). Die Riechstörung äußert sich in einer reduzierten Diskriminierung ähnlicher Gerüche oder dem Erkennen bestimmter Geruchsstoffe. Das bekannteste Beispiel ist die Unfähigkeit vieler Parkinson-Patienten Oregano in Pizzen zu erkennen. Dabei ist zu bemerken, dass die Riechstörung nicht im Verlauf der Krankheit zunimmt, sondern auf gleichem Level bleibt (Muller et al., 2002).

Neben den beschriebenen Kardinalsymptomen treten auch vegetative Symptome bei Parkinson-Patienten auf. So kommt es zur Entstehung des „Salbengesichts“ (Seborrhö) durch eine Überproduktion von Hautfetten, aber auch genauso häufig zu einer sehr trockenen Haut (Gerlach et al., 2007). Typischerweise liegt als Frühsymptom eine Störung der Farbdiskriminierung, insbesondere von blau und grün, vor. Diese Farbdiskriminierungsschwäche geht mit dem Schweregrad der Krankheit einher (Muller et al., 1997). Sehr viele Patienten leiden unter Störungen der autonomen Systeme wie der Magen-Darm-Funktion, des Urogenital- und Sexualsystems, der Schweißproduktion und der kardiovaskulären Systeme.

Bei dem PS kommen auch kognitive und neuropsychiatrische Störungen vor. So treten neben Depressionen auch Demenz und Halluzinationen auf. Eine Depression entwickeln etwa 40% der Parkinson-Patienten und sie kann der Bradykinese vorausgehen (Dooneief et al., 1992). Dabei ist kein Zusammenhang zwischen Depression und Dauer des PS oder Alter des Patienten festzustellen. Typischerweise fehlt Parkinson-Patienten die Freude an Dingen wie gutem Essen, guten Weinen, Sex oder guten Filmen (Gerlach et al., 2007). Bei mehr als 20%

der Patienten mit PS tritt Demenz auf (Aarsland et al., 2003; Biggins et al., 1992). Dabei ist das Risiko von Patienten mit PS eine Demenz zu entwickeln im Vergleich zu Personen ohne PS zwei- bis dreifach erhöht. Zusätzliche Risikofaktoren sind hohes Alter bei Krankheitsbeginn, familiär gehäufte Demenzen, schwere extrapyramidale Symptome, niedriges Bildungsniveau, frühzeitig auftretender beidseitiger Befall mit motorischen Störungen und das frühe Auftreten von Verwirrtheit und Psychosen (Aarsland et al., 2003). Bevor es zur ausgeprägten Demenz kommt, zeigen viele Patienten Schlafstörungen, vermehrte Angstgefühle und verlangsamte Denkprozesse (Gerlach et al., 2007). Ein weiteres neuropsychiatrisches Symptom sind bei dem PS auftretende Halluzinationen. Diese treten etwa bei jedem vierten Patient auf, wobei nicht nur die Medikamente, sondern auch die Grundkrankheit an sich, zu dieser Symptomatik führen (Fenelon et al., 2000). Vorhersagende Faktoren für Halluzinationen sind schwere kognitive Einbußen, Tagesmüdigkeit und eine lang andauernde Krankheit.

Das mittlere Erkrankungsalter des PS liegt im 60. Lebensjahr (Polymeropoulos, 2000). Betrachtet man die Gesamtbevölkerung in Deutschland, so liegt die Prävalenz des PS zwischen 100-200/100.000. Bei den über 65-jährigen steigt sie jedoch auf 1.800/100.000 (Diener und Putzki, 2008). Der Anstieg der Betroffenen mit zunehmendem Alter wurde schon 1986 von Mutch et al. erkannt (Abbildung 1.1).

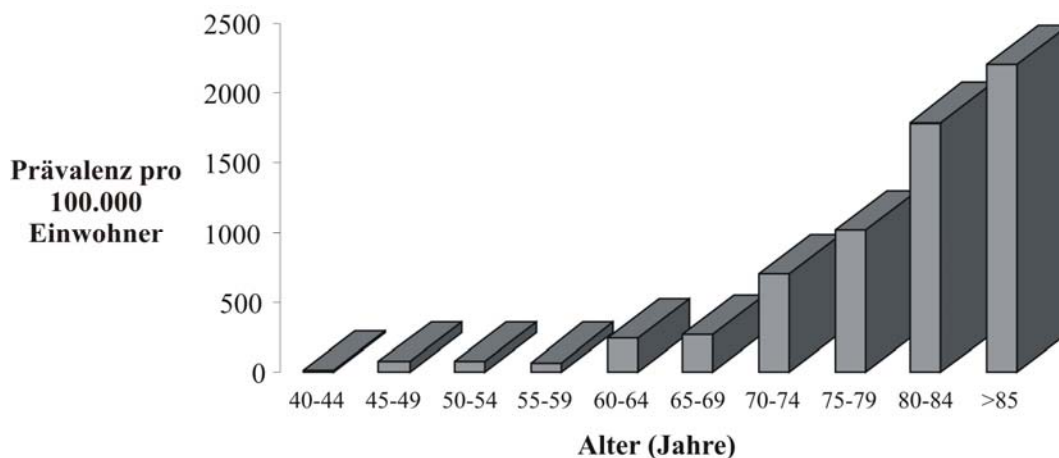


Abbildung 1.1: Prävalenz des Parkinson-Syndroms

Darstellung nach der Analyse von Mutch und Mitarbeitern im Jahre 1986 (Mutch et al., 1986).

So finden sich 12,5 Patienten pro 100.000 Einwohner im Alter von 40 und 44. Die Zahl der Betroffenen steigt bei 60-64 jährigen auf 240 und erreicht fast das dreifache bei 70-74 Jahre alten Personen. Bei Personen über 85 Jahren sind 2.205 PS Patienten auf 100.000 Einwohnern zu erwarten (Mutch et al., 1986).

Das Problem des PS liegt in der Früherkennung. Klinisch manifestierte Symptome treten erst nach einer Reduktion von 60% der dopaminergen Neuronen auf (Bernheimer et al., 1973; Riederer und Wuketich, 1976). Die Dauer dieser Latenzphase schwankt allerdings je nach zu Grunde liegendem Modell zwischen 5-40 Jahren (Gerlach et al., 2007).

1.1.2 Neuropathologie des Parkinson-Syndroms

Die neuropathologische post mortem Gehirn-Analyse von Patienten mit PS zeigt einen Verlust der Pigmentierung der Substantia nigra und des Locus coeruleus (Hirsch et al., 1988). Diese beiden Komponenten des menschlichen Mittelhirns haben eine auffallend dunkle Farbe, welche durch die Anwesenheit bläulichen bis braun-schwarzen Neuromelanins verursacht wird (Gerlach et al., 2007). Die Ursache des Pigmentverlustes liegt in der Degeneration von Dopamin- und Neuromelanin-haltigen Nervenzellen. Von dieser Degeneration sind vor allem jene dopaminergen Zellen der Substantia nigra betroffen, die Neuromelanin enthalten. Unpigmentierte und damit neuromelaninfreie dopaminerge Zellen dieser Gehirnregion sind deutlich weniger betroffen (Hirsch et al., 1988).

In einigen der noch intakten dopaminergen Neuronen der Substantia nigra und des Locus coeruleus kommt es zu eosinophilen, zytoplasmatischen Einschlüssen - den Lewy Körperchen (Braak et al., 1995; Gibb und Lees, 1988). Zusätzlich treten auch Lewy-Neuriten auf, welche als degenerierte, ubiquitin-positive Neuriten definiert sind (Lang und Lozano, 1998).

Die Lokalisation von Lewy Körperchen beschränkt sich nicht nur auf die Substantia nigra und den Locus coeruleus, sondern kann sich auch auf den Hypothalamus oder den zerebellären Kortex ausbreiten (Gibb und Lees, 1988). Das Auftreten der Lewy Körperchen scheint einem charakteristischen regionalen und zeitlichen Muster zu folgen, so dass eine neue neuropathologische Stadieneinteilung des PS etabliert wurde (Tabelle 1.1) (Braak et al., 2002).

Tabelle 1.1: Neuropathologische Stadieneinteilung des Parkinson-Syndroms
(Braak et al., 2002)

	Lokalisation der Lewy Körperchen	Phase des PS
Stadien 1-2	Medulla oblongata, Bulbus olfactorius, hinterer Vaguskern	präsymptomatisch
Stadien 3-4	Substantia nigra, graue Substanz des Mittelhirns und basalen Vorderhirns	symptomatisch
Stadien 5-6	Telenzephaler Kortex	symptomatisches Endstadium

Ultrastrukturell bestehen die 5-25 µm großen Lewy Körperchen aus intermediären Filamenten. Dabei haben sie als charakteristische Erscheinungsform einen runden, dichten Kern mit einem diesen umschließenden, blassen Hof (Gibb und Lees, 1988). Die immunhistochemische Betrachtung zeigt die Anwesenheit von Ubiquitin und Alpha-Synuklein als Hauptkomponenten der Lewy Körperchen (Gerlach et al., 2007; Spillantini et al., 1997). Im Moment gibt es eine starke Diskussion, ob das Auftreten der Lewy Körperchen die Nervenzelle schädigt oder ob diese Einschlüsse eher protektiv sind (de la Fuente-Fernandez et al., 1998; Moore et al., 2005; Ross und Poirier, 2005).

Die Folge des Verlustes der dopaminergen Neurone ist eine deutliche Reduktion der Dopamin-Konzentration im Striatum von PS Patienten. Dieses Dopamin-Defizit ist dabei im Putamen deutlich stärker ausgeprägt als im Nucleus caudatus. Die Reduktion von Dopamin

im Striatum korreliert dabei mit dem morphologisch nachgewiesenen Nervenzellverlust (Bernheimer et al., 1973). Die Enzyme zur Produktion und zum Abbau von Dopamin sowie die wesentlichen Schritte der dopaminergen Neurotransmission, sind in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Synthese von Dopamin erfolgt im Zytoplasma des Neurons. Dabei wird durch die Hilfe der Tyrosin-Hydroxylase (TH) L-DOPA (L-3,4-dioxyphenylalanin) aus der Aminosäure Tyrosin gebildet. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dopamin-Synthese. Nachfolgend kann die DOPA-Decarboxylase (DDC) Dopamin aus L-DOPA synthetisieren. Ist Dopamin im Zytoplasma vorhanden, so wird es mit Hilfe spezifischer Transportsysteme in synaptische Vesikel aufgenommen und gespeichert.

In diesen Vesikeln ist es vor dem Abbau geschützt. Beim Auftreten eines Nervenimpulses wird durch Ca^{2+} die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran ausgelöst und Dopamin durch Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt. An der postsynaptischen Membran bindet das Dopamin an spezifische Dopamin-Rezeptoren. Der reversible Dopamin-Rezeptor-Komplex aktiviert mit Hilfe von G-Proteinen intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden. Um eine ständige Aktivierung durch Dopamin zu verhindern, geschieht die Inaktivierung von Dopamin entweder durch die Wiederaufnahme in das präsynaptische Neuron oder in Gliazellen über spezifische Transport-Proteine. Zusätzlich geschieht der Abbau enzymatisch mit Hilfe der Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) und der Monoamin-Oxidase (MAO) (Gerlach et al., 2007).

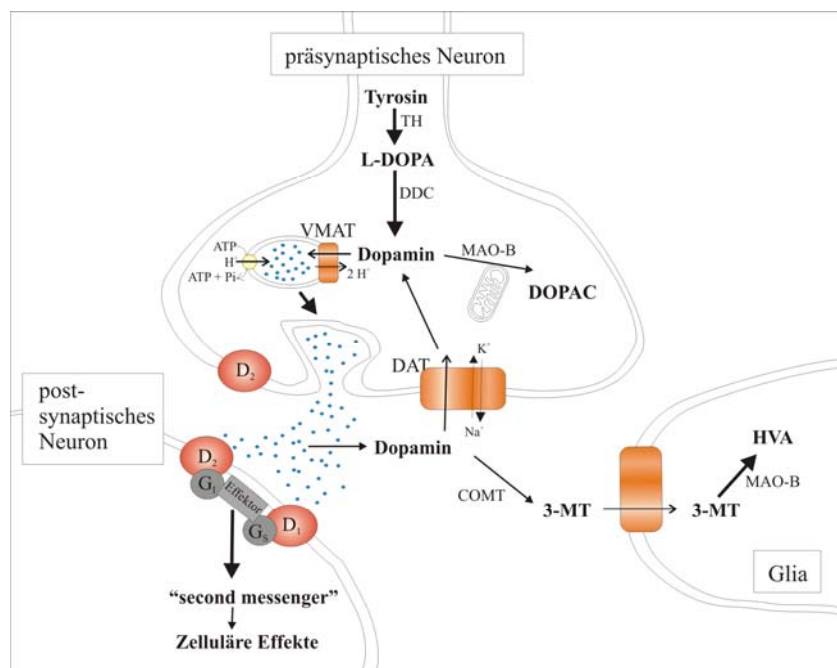


Abbildung 1.2: Wesentliche Schritte der dopaminergen Neurotransmission

Beschreibung der Einzelschritte siehe Text. COMT, Catechol-O-Methyl-Transferase; D_1, D_2 , Dopamin-Rezeptorsubtypen; DAT, Dopamin-Transporter; DDC, DOPA-Decarboxylase; DOPAC, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, G_i , Adenylat-Zyklase-inhibierendes G-Protein; G_s , Adenylat-Zyklase-stimulierendes G-Protein; HVA, Homovanillinsäure; L-DOPA, L-3,4-dioxyphenylalanin; MAO-B, Monoamin-Oxidase, Typ B; 3-MT, 3-Metyoxytyramin; TH, Tyrosin-Hydroxylase; VMAT, vaskulärer Monoamin-Transporter (Gerlach et al., 2007)

Zusätzlich zu den reduzierten Dopamin-Mengen findet man in PS Patienten geringere Konzentrationen der Dopamin Metabolite DOPAC und HVA. Auch liegen die Dopamin synthetisierenden Enzyme TH und DDC in verringerter Aktivität vor (Gerlach et al., 2007). Das nigrostriatale dopaminerge System scheint den Dopaminverlust in der Latenzphase der Erkrankung dennoch kompensieren zu können. Dafür spricht, dass der Ausbruch des Vollbildes der Erkrankung erst nach dem Verlust von 2/3 der dopaminergen Neurone und einer Dopamin-Konzentrationen von 30-50% geschieht (Bernheimer et al., 1973; Riederer und Wuketich, 1976). Vermutlich können die noch verbleibenden aktiven dopaminergen Neurone vermehrt Dopamin produzieren, um die dopaminerge Neurotransmission so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Ist aber durch den fortschreitenden Verlust dopaminerner Neurone die nigrostriatale Projektion und die Dopamin-Konzentration zu gering, so kommt es zu einer verstärkten Wirkung von GABAergen Neuronen. Dies führt nachfolgend zu einer Blockade kortikaler, motorischer Strukturen, wodurch es wahrscheinlich zum Auftreten der Kardinalsymptome des PS kommt (Chesselet und Delfs, 1996).

1.1.3 Therapie des Parkinson-Syndroms

Die ersten Therapie-Ansätze des PS gehen bis in das Jahr 1890 zurück. Zu dieser Zeit wurden Extrakte aus Wurzeln, Blüten und Samen von Nachtschattengewächsen wie der Tollkirsche oder der gemeinen Stechpalme genutzt, um den Tremor von PS Patienten zu lindern. Später wurden Atropin und Scopolanin als Wirkstoff dieser Therapie identifiziert, wobei sie als Anticholinergica wirken (Gerlach et al., 2007). Basierend auf diesen natürlichen Anticholinergica wurden 1946 synthetische Varianten hergestellt und untersucht. Im Jahre 1961 wurde erfolgreich die Wirkung der zentralen Dopamin-Substitution mit L-DOPA beschrieben (Birkmayer und Hornykiewicz, 1961). Um die dabei auftretenden Nebenwirkungen zu mindern, wurden später zusätzlich DOPA-Decarboxylase (DCC)-Hemmer oder COMT-Hemmer verabreicht (Bartholini et al., 1967; Birkmayer und Mentasti, 1967; Fazio et al., 1972; Nutt und Fellman, 1984).

Die Therapie mit MAO-B-Hemmern ist ebenfalls in Kombination mit L-DOPA möglich. Dabei wird der zentrale Dopamin-Abbau gehemmt und damit die synaptische Dopamin-Konzentration erhöht (Factor, 2008). Andere Therapien werden mit Dopamin-Rezeptoragonisten und NMDA-Rezeptorantagonisten durchgeführt (Gerlach et al., 2007).

Eine Langzeittherapie ist mit L-DOPA in Kombination mit den oben genannten Zusatz-Medikamenten aus drei Gründen nicht möglich.

- (1) Es treten bei 80% der Patienten nach mehr als 5 Jahren Behandlung motorische Komplikationen auf, die auch als L-DOPA Spätsyndrom bezeichnet werden (Obeso et al., 2000). Die Patienten bekommen Dyskinesien, Wirkungsschwankungen, Psychosen und Verwirrheitszustände (Gerlach et al., 2007).

- (2) Einige Symptome von Parkinson-Patienten wie autonome Dysfunktionen, Depressionen und Demenz sprechen nicht auf die L-DOPA Therapie an. Aber gerade diese Symptome führen oft zur häuslichen Pflege der Patienten (Olanow, 2004).
- (3) Die Krankheit schreitet trotz L-DOPA Therapie fort, was in einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes und einer inakzeptablen Behinderung des Patienten resultiert (Olanow, 2004).

Deshalb gilt, dass der Therapiebeginn mit L-DOPA so spät wie möglich, dann aber so niedrig wie möglich und so hoch wie nötig durchgeführt werden sollte.

Den Patienten, die auf diese medikamentösen Therapien nicht mehr ansprechen, kann mit chirurgischen Ansätzen geholfen werden. Dabei wird eine Elektrode in den subthalamischen Nucleus des Gehirns bilateral implantiert, welche mit Frequenzen von 100-180 Hz stimuliert. Diese Methode wird „Deep Brain Stimulation“ genannt und reduziert alle motorischen Hauptsymptome des PS (Limousin et al., 1998). Dennoch kann meistens nicht vollständig auf eine medikamentöse Therapie verzichtet werden. Sie kann aber deutlich reduziert werden, wodurch auch die Nebenwirkungen wie Dyskinesien gemindert auftreten (Gerlach et al., 2007).

1.1.4 Nicht genetische Ursachen des Parkinson-Syndroms

Die molekularen Grundlagen der Pathogenese des PS sind bisher nur unvollständig verstanden. Mit 1% Betroffenen in der Bevölkerung über 50 Jahre ist sie die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Polymeropoulos et al., 1996). Für einige selten auftretende familiäre PS sind Mutationen in PS-assoziierten Genen ursächlich. Dabei wird vermutet, dass diese nur etwa 5% aller PS Fälle erklären können (Bossy-Wetzel et al., 2004). Diese Gene werden in Abschnitt 1.1.5 näher betrachtet. Weit häufiger (75% aller PS Fälle) tritt das idiopathische PS auf, dessen Ursachen weitgehend unbekannt sind (Diener und Putzki, 2008). Bei diesen Fällen wird der Einfluss der Alterung, der Umweltfaktoren, mitochondrialer Dysfunktion, oxidativen Stresses, Proteinhäufung, Apoptose und Kalziumhomöostase diskutiert (Moore et al., 2005).

1.1.4.1 Alterung

Das Hauptcharakteristikum des PS ist die Manifestation im mittleren bis späten Lebensalter (Polymeropoulos, 2000). Bis es zum Ausbruch der Krankheit kommt, können die betroffenen Neurone erfolgreich Probleme, welche durch Mutationen in Proteinen infolge oxidativen Stresses, mitochondrialer Dysfunktion oder Umweltfaktoren auftreten, beherrschen oder mit ihnen umgehen. Mit dem Alter akkumulieren fehlgefaltete Proteine in bestimmten Neuronen und erreichen möglicherweise toxische Mengen. Das heißt, dass die Zelle mit den Jahren die Kapazität verliert, anormale Polypeptide vor ihrer Akkumulation zu schützen und toxische Konsequenzen zu vermeiden (Sherman und Goldberg, 2001).

Möglicherweise liegt der Grund in der reduzierten Aktivierung von Hitzeschockproteinen durch alternde Neurone (Rattan und Derventzi, 1991). Auch haben alternde Zellen eine reduzierte Fähigkeit Proteine zu degradieren. Dabei scheint vor allem der lysosomale Abbauweg, welcher den Abbau der meisten endozytierten Proteine wie Membranproteine bewerkstelligt, reduziert zu sein (Cuervo und Dice, 1998). Diese Schäden könnten indirekt neurodegenerative Prozesse auslösen, wie es bei dem PS der Fall ist (Sherman und Goldberg, 2001).

1.1.4.2 Umweltfaktoren

Neben der Alterung scheinen auch Umweltfaktoren eine Rolle bei der Entwicklung des PS zu spielen. So ist das Risiko an PS zu erkranken erhöht, wenn man auf dem Land lebt, Brunnenwasser trinkt und mit Industrie-Abfällen und Toxinen in Kontakt kommt. Auch wenn bisher kein spezielles Toxin in post mortem Gehirnen von PS Patienten gefunden wurde, so birgt dennoch der Umgang mit Pestiziden (Paraquat, Diquat), Schwermetallen (Blei), Zyaniden, Lackverdünnern, organischen Lösungsmitteln, Kohlenmonoxid, Kohlendisulfid und Mangan ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Olanow und Tatton, 1999).

Das bisher am besten charakterisierte Toxin, welches zu der Parkinson-Krankheit führt, ist MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin). Es wurde zufällig als Verunreinigung in Heroin gefunden und führte bei den Konsumenten über Nacht zur fast vollkommenen Bewegungslosigkeit, was dem Endstadium des PS entspricht (Davis et al., 1979). Heute weiß man, dass nicht MPTP selbst toxisch ist, sondern sein Metabolit MPP⁺. Er entsteht durch die enzymatische Aktivität von MAO-B. Danach erfolgt die Aufnahme von MPP⁺ in dopaminerge Neuronen über Dopamin-Transporter (Gerlach et al., 1991). In den Neuronen akkumuliert MPP⁺ und inhibiert den Komplex-I der mitochondrialen Atmungskette. Dies führt zur erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) und zur Reduktion der ATP-Produktion (Gerlach et al., 1991). Der Einfluss von ROS auf die Neurodegeneration wird im nächsten Kapitel näher betrachtet.

1.1.4.3 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress werden Schädigungen biologischer Systeme durch Sauerstoff und reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) zusammengefasst. Dabei sind reaktive Sauerstoffverbindungen nicht nur vom Sauerstoff ableitbare Radikale wie das Superoxid-Radikal-Anion (O₂^{•-}), das Hydroxyl-Radikal (OH[•]) und das Nitrit-Oxid (NO[•]), sondern ebenso nichtradikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und das Peroxinitrit-Anion (ONOO⁻), die leicht zu Radikalen umgewandelt werden können (Abbildung 1.3) (Bogaerts et al., 2008). Oxidativer Stress verursacht DNA-Schäden, DNA-Mutationen und Lipid-Peroxidation, was sich in Membranschäden, Protein-Schädigungen und -Veränderungen äußert. Durch diese vielfältigen Schäden verliert die Zelle viele lebenswichtige Funktionen und es kommt zur Degeneration der Zellen. Die Mitochondrien, die Hauptenergielieferanten der Zelle, produzieren die höchste Menge an ROS als ein Beiprodukt der oxidativen

Phosphorylierung. Dabei entsteht das Superoxid-Radikal-Anion ($O_2^{\bullet-}$), welches die Vorstufe der meisten ROS ist, aus bis zu 2% des von Mitochondrien umgesetzten Sauerstoffes (Beal, 2003).

Die Zelle schützt sich vor ROS über deren enzymatische Umwandlung durch die Superoxid-Dismutase, die Glutathion-Peroxidase oder die Katalase. Zusätzlich kommen metallbindende Proteine wie Lactoferrin, Transferrin oder Ferritin zum Einsatz, welche die Bildung freier Radikale (wie sie durch die Fenton-Reaktion mit Hilfe von Fe^{2+} entstehen) gering halten (Gerlach et al., 2007).

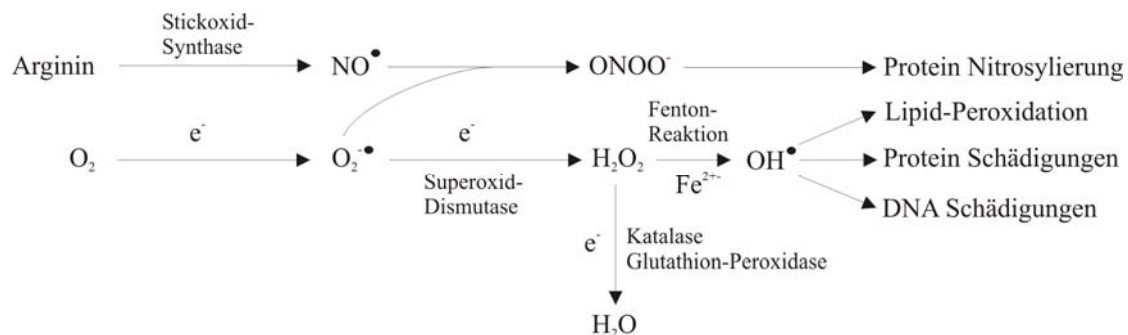


Abbildung 1.3: Entstehung und Inaktivierung von ROS

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) sind das Superoxid-Radikal-Anion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\bullet}), Nitrit-Oxid (NO^{\bullet}) sowie die nichtradikalischen Verbindungen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Peroxinitrit-Anion ($ONOO^{\bullet}$). Die Abbildung zeigt die Bildung von ROS als auch ihre Inaktivierung über enzymatische Reaktionen, welche im Text genauer beschrieben werden (Bogaerts et al., 2008).

Das Gehirn ist besonders anfällig für oxidativen Stress, da das Gehirn von Erwachsenen etwa 20% des Sauerstoffs benötigt, um in Nervenzellen die Ionen-Homöostase aufrecht zu erhalten, welche für die Erzeugung von Aktionspotentialen erforderlich ist (Gerlach et al., 2007). Die dopaminergen Neurone der Substantia nigra, welche im Anfangsstadium des PS besonders von der Degeneration betroffen sind, könnten aus fünf Gründen eine besonders hohe Anfälligkeit gegenüber ROS entwickeln.

- (1) Der erhöhte Dopaminumsatz durch COMT und MAO-B führt zur vermehrten Entstehung von H_2O_2 (Olanow und Tatton, 1999). Zusätzlich kann Dopamin spontan zu toxischem Dopamin-Chinon oxidiert werden (Stokes et al., 1999).
- (2) In der Substantia nigra gibt es einen Mangel an Glutathion, welches mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase in der Lage wäre, H_2O_2 zu detoxifizieren (Sofic et al., 1992).
- (3) Das vermehrte Vorkommen von Eisen fördert die Hydroxylradikalbildung durch die Fenton-Reaktion (Gerlach et al., 1997).
- (4) In der Substantia nigra vorkommendes Pigment Neuromelanin kann Schwermetalle wie Eisen binden. Unter bestimmten Umständen kann das gebundene Eisen wieder freigesetzt werden und nachfolgend toxisch wirken (Double et al., 2003).
- (5) In der Substantia nigra von Parkinson-Erkrankten gibt es eine um 30-40% erniedrigte Komplex-I-Aktivität der mitochondrialen Atmungskette, wodurch vermehrt ROS produziert werden (Schapira et al., 1990). Zusätzlich konnte in nigrostriatalen

dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten eine erhöhte Existenz von Mutationen im mitochondrialem Genom aufgezeigt werden (Bender et al., 2006).

Dennoch bleibt die Frage offen, ob oxidativer Stress als primärer Faktor das PS auslösen kann oder ob er eine sekundäre Folge anderer Ursachen ist (Bogaerts et al., 2008).

1.1.4.4 Proteinanhäufungen

In der Zelle sind hochreaktive Bedingungen mit spontaner Denaturierung und chemischen Modifikationen von Proteinen vorherrschend. Alle Zellen benutzen einen großen Anteil ihrer Energieproduktion dafür, dass Proteine richtig synthetisiert, korrekt gefaltet und in das richtige Zielkompartiment gebracht werden. Wenn die natürliche Proteinkonformation durch Mutationen oder postsynthetische Mechanismen gestört ist, haben die Zellen Strategien entwickelt, um die Aggregation der ungefalteten oder fehlgefalteten Proteine zu verhindern, sie wieder korrekt zu falten oder, wenn dies nicht mehr möglich ist, diese abzubauen (Sherman und Goldberg, 2001). Dies ist besonders wichtig, da ungefaltete Polypeptide im Zellkern oder im Zytosol die normale zelluläre Funktion stören und Apoptose auslösen können (Gandhi und Wood, 2005). Intrazelluläre Einschlüsse denaturierter Proteine sind charakteristische Merkmale vieler neurologischer Erkrankungen. Neben den Lewy-Körperchen beim PS oder der Demenz mit Lewy-Körperchen, treten amyloide Plaques und neurofibrilläre *Tangles* bei der Alzheimer Krankheit, Bunina-Körperchen bei der amyotrophen Lateralsklerose und neuronale Einschlusskörperchen bei den Polyglutamin-Erkrankungen Chorea Huntington oder einigen Formen der spinozerebellären Ataxie auf (Sherman und Goldberg, 2001). Alle Einschlusskörperchen enthalten Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) und molekulare Chaperone. Beides sind Hauptmechanismen der Zelle, um auf ungefaltete Polypeptide zu reagieren (Sherman und Goldberg, 2001).

Proteinaggregation scheint bei dem PS eine wichtige Rolle zu spielen. In der Substantia nigra von PS Patienten gibt es eine 33-42%ige Reduktion der proteolytischen Aktivität des 26S Proteasom-Komplexes (McNaught und Jenner, 2001). Das Hauptprotein in Lewy-Körperchen von PS Patienten ist Alpha-Synuklein (Mezey et al., 1998). Normalerweise ist dieses Protein löslich und ungefaltet. Durch Mutationen (wie bei genetisch bedingten PS Fällen, siehe 1.1.5), posttranslationalen kovalenten Modifikationen wie Phosphorylierung, Nitrierung und Glykosylierung kommt es zur Aggregation von Alpha-Synuklein (Giasson et al., 2000). Dabei treten intermediäre, ringförmige, oligomere Strukturen auf, welche Protofibrillen genannt werden. Aus diesen Protofibrillen können sich polymere, unlösliche Fibrillen formen (Giasson et al., 2001). Besonders hervorzuheben ist, dass Dopamin die protofibrilläre Form von Alpha-Synuklein durch Bildung von Dopamin-Alpha-Synuklein Addukten stabilisiert (Conway et al., 2001). Es scheint, als ob die fibrilläre Alpha-Synuklein Form das eigentliche neurotoxische Molekül ist. Eventuell ist die Lewy-Körperchen Bildung und der Einschluss des fibrillären Alpha-Synukleins in diese ein Versuch der Nervenzelle, sich vor dieser Struktur zu schützen (Kahle et al., 2002).

Auch ein gestörtes UPS wird als Pathomechanismus des PS angesehen. Parkin, eine E3-Ubiquitin-Ligase, wurde in genetisch bedingten PS Fällen als ursächliches Gen identifiziert (siehe 1.1.5) (Kitada et al., 1998). Mutationen in diesem führen zum Verlust der Enzymaktivität. Parkin hat die aggregierte und glykosylierte Form von Alpha-Synuklein als Substrat und kann somit zu deren Degradation führen. Fällt die enzymatische Funktion von Parkin aus, so reichert sich diese Form von Alpha-Synuklein im Gehirn an (Gandhi und Wood, 2005). Auch Mutationen in der Ubiquitin C-terminalen Hydrolase (*UCHL1*) sind mit dem PS assoziiert (siehe 1.1.5) (Leroy et al., 1998). Dieses Enzym hilft bei dem Recycling von Polyubiquitin-Ketten zu monomeren Ubiquitin und trägt somit zur Funktion des UPS bei (Sherman und Goldberg, 2001).

Auf jeden Fall führen Mutationen im *Alpha-Synukleingen*, Defekte durch freie Radikale oder der Verlust dieses Protein zu ubiquitinylieren zu einer Akkumulation von unnormalen, toxischen Alpha-Synuklein-Spezies. Diese beeinflussen die normale Zellfunktion und lösen möglicherweise apoptotische Prozesse in dopaminergen Neuronen aus (Sherman und Goldberg, 2001).

1.1.4.5 Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein streng regulierter physiologischer Vorgang. Die Aktivierung der Apoptose erfolgt auf zwei Wegen. Zum einen durch den extrinsischen Mechanismus, welcher durch die Aktivierung von auf der Zelloberfläche befindlichen Todesrezeptoren wie Fas gesteuert wird und in dessen Signalkaskade die Aktivierung der Caspase 8 und nachfolgend der Caspase 3 erfolgt. Zum anderen kann Apoptose auch über den intrinsischen Mechanismus erfolgen, bei welchem die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran erfolgt und nachfolgend erst Caspase 9 und dann Caspase 3 aktiviert werden. Der extrinsische Apoptose-Signalweg kann über die Spaltung von BID auch die intrinsische Apoptose-Signalkaskade auslösen (Polster und Fiskum, 2004).

Ob apoptotische Mechanismen bei dem PS eine Rolle spielen, wird zurzeit noch diskutiert (Hartmann et al., 2000; Tatton et al., 2003). Zum einen scheint es schwer und nicht eindeutig Apoptose in post mortem Gewebe nachzuweisen, da der apoptotische Zelltod rasch verläuft. Zum anderen tritt der die Parkinson-Krankheit auslösende Prozess schon Jahre vor Eintritt der Symptome ein (Gerlach et al., 2007). Der Nachweis typischer morphologischer und biochemischer apoptotischer Veränderungen könnte aber auch nur ein Epiphänomen der Parkinson-Pathologie darstellen. Gerade weil die Generation von ROS oder die Freisetzung proapoptotischer Moleküle aus Mitochondrien infolge der Entkopplung der Atmungskette auch Apoptose auslösen können, muss sorgsam analysiert werden, ob Apoptose als primärer Pathomechanismus in Frage kommt (Gerlach et al., 2007).

1.1.4.6 Kalzium-Homöostase

Eine Störung der Kalzium-Homöostase wird durch einen deregulierten Ca^{2+} -Einstrom in Neuronen verursacht. Dadurch werden Ca^{2+} -abhängige Enzyme wie Calmodulin, Calpain, Phospholipase A und Proteinkinase C unphysiologisch aktiviert. Diese Aktivierung kann zum unregulierten Abbau von Lipiden und Proteinen in der Nervenzelle, zur Erzeugung freier Radikale, zur Erhöhung der Membranpermeabilität der Mitochondrien oder zur Reduktion der Transkription führen (Gerlach et al., 2007). Die durch den Ca^{2+} -Einstrom ausgelöste Depolarisation der Nervenzelle verursacht einen passiven Einstrom von Cl^- und Wasser, wodurch die Neuronen eine osmotische Belastung erfahren. Diese vielseitigen Prozesse führen zum Verlust der Integrität der Nervenzelle und damit zu ihrer Degeneration.

Die Kalzium-Homöostase scheint in Parkinson-Erkrankten verändert zu sein, dies lassen post mortem Untersuchungen vermuten. Immunhistochemisch wurde gezeigt, dass dopaminerge Neuronen in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten, wenn sie Calbindin D-28K oder Calretinin enthalten (beides Ca^{2+} bindende Enzyme), nicht degenerieren (Mouatt-Prigent et al., 1994; Yamada et al., 1990). Damit könnten Ca^{2+} -bindende Enzyme eine Schutzfunktion in dopaminergen Neuronen übernehmen. Auch die semiquantitative Bestimmung der Ca^{2+} -abhängigen Protease Calpain II in post mortem Untersuchungen deutet darauf hin, dass eine gestörte Kalzium-Homöostase vorliegt (Mouatt-Prigent et al., 1996).

Um die Pathogenese des PS genauer identifizieren zu können und Therapieansätze zu finden, ist die detaillierte Analyse des Einflusses von Umweltfaktoren, Apoptosemechanismen, mitochondrialer Dysfunktion, oxidativen Stresses, des Kalzium-Stoffwechsels und des Auftretens von Proteinanhäufungen auf diese neurodegenerative Erkrankung essentiell. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Proteine, welche bei selten auftretenden, genetisch bedingten PS Fällen eine Rolle spielen, wird ebenfalls nötig sein, um die Pathogenese des PS zu verstehen.

1.1.5 Genetische Ursachen des Parkinson-Syndroms

Es wurden bisher viele Faktoren für die Entwicklung des PS postuliert, aber neben dem Alter ist der bedeutendste Risiko-Faktor eine positive Familiengeschichte (Polymeropoulos, 2000). Allgemein kann man sagen, je früher sich die Krankheit manifestiert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass genetische Faktoren eine Rolle spielen könnten (Warner und Schapira, 2003). Die bis heute bekannten Genloci, die mit dem familiären PS assoziiert werden, sind in Tabelle 1.2 aufgelistet.

Tabelle 1.2: Aufstellung der bisher gefundenen PARK-Loci

VB= Vererbung; AD= autosomal dominant; AR= autosomal rezessiv; LB=Lewy Bodys

Locus	VB	Gen	Ort	LB	Typ	Symptome	Quelle
PARK1	AD	<i>SNCA</i>	4q21	+	Mutationen	Beginn um 40, rapides Fortschreiten, kognitive Verschlechterung	(Polymeropoulos et al., 1997)
PARK2	AR	<i>PRKN</i>	6q25	-	Deletionen/ Mutationen	jugendlicher Beginn (20-40), langsames Fortschreiten, fokale Dystonie	(Kitada et al., 1998)
PARK3	AD	?	2p13	+	?	Beginn um 60	(Gasser et al., 1998)
PARK4	AD	<i>SNCA</i>	4q21	+	Triplikation	zeitiger Beginn (30), rapides Fortschreiten, posturaler Tremor, späte Demenz	(Farrer et al., 1999; Singleton et al., 2003)
PARK5	AD	<i>UCHL1</i>	4p14	?	Mutation	Beginn um 50	(Leroy et al., 1998)
PARK6	AR	<i>PINK1</i>	1p35-p37	?	Mutation	zeitiger Beginn (30-40), langsames Fortschreiten	(Valente et al., 2004)
PARK7	AR	<i>DJI</i>	1p36	?	Deletion / Mutation	zeitiger Beginn (30-40), langsames Fortschreiten, fokale Dystonie	(Bonifati et al., 2003)
PARK8	AD	<i>LRRK2</i>	12p11.2- q13.1	+	Mutationen	später Beginn	(Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004a)
PARK9	AR	<i>ATP13A2</i>	1p36	?	Mutationen	zeitiger Beginn (20-40)	(Ramirez et al., 2006)
PARK10	AD	?	1p32	?	?	später Beginn (50-60)	(Hicks et al., 2002)
PARK11	AD	<i>GIGYF2</i>	2q34	?	Mutation	später Beginn	(Lautier et al., 2008)
PARK12	X- linked	?	Xq31	?	?	später Beginn	(Pankratz et al., 2002)
PARK13	?	<i>HTRA2</i>	2p12	?	Mutation	später Beginn	(Strauss et al., 2005)
PARK14	AR	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	+	Mutationen	zeitiger Beginn (10-20)	(Gregory et al., 2008)
PARK15	AR	<i>FBXO7</i>	22q12- q13	?	Mutationen	zeitiger Beginn (7-20)	(Di Fonzo et al., 2009)

Die Analyse der Mechanismen, die für die Parkinsonsche Krankheit in den betroffenen Familien mit familiären Parkinsonformen verantwortlich sind, macht es eventuell möglich, Abnormalitäten in Stoffwechselwegen zu erkennen, die auch bei der nicht genetisch

bedingten Form des PS ihre Wichtigkeit haben könnten (Golbe und Mouradian, 2004). Der mögliche pathogene Zusammenhang zwischen den mit Parkinson-assoziierten Genen und den putativen Pathogenesemechanismen über den Ubiquitin-Signalweg oder/und den mitochondrialen Signalweg wird in Abbildung 1.4 dargestellt.

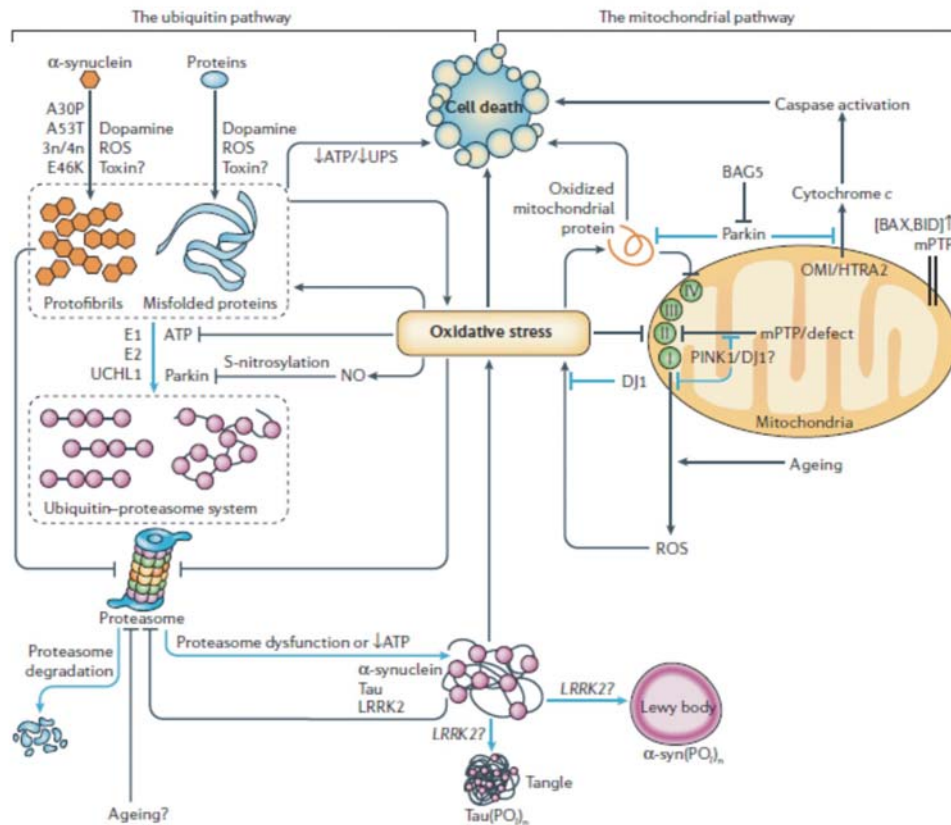


Abbildung 1.4: Signalkaskaden die mit der Pathogenese des PS in Zusammenhang stehen

Genprodukte die mit dem genetisch bedingten PS assoziiert sind, ermöglichen Signalkaskaden zu erkennen, welche auch in der Pathogenese des nicht genetisch bedingten PS zur Diskussion stehen. Nähere Erläuterungen siehe Text. (Abou-Sleiman et al., 2006)

Der erste Parkinsonlokus (**PARK1**) wurde von der Arbeitsgruppe um Polymeropoulos (Polymeropoulos et al., 1997) identifiziert. Das Gen an dieser Stelle ist *Alpha-Synuklein* (*SNCA*), welches auch als Hauptkomponente der Lewy-Körperchen in sowohl familiären als auch nicht genetischen Fällen identifiziert werden konnte (Spillantini et al., 1997). Die biologische Funktion von Alpha-Synuklein wird in der Regulation der synaptischen Neurotransmission gesehen, da Alpha-Synuklein an Vesikel binden kann (Davidson et al., 1998). Es können sich Aggregate von Alpha-Synuklein bilden, wenn es nicht mehr genügend durch das Proteasom degradiert oder überexprimiert wird, in hohen Konzentrationen vorliegt oder sich durch Mutationen oder Modifikationen fehlfaltet (Golbe und Mouradian, 2004).

Die bekannten drei *SNCA*-Punktmutationen (A30P, A53T, E46K) werden autosomal dominant vererbt, so dass sie das PS vermutlich durch eine toxische Funktionsveränderung und nicht durch einen Funktionsausfall verursachen (Kruger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997; Zarranz et al., 2004). Erhöhte Konzentrationen können durch Duplikationen oder

Triplikationen von *SNCA* entstehen (**PARK4**) (Farrer et al., 1999; Singleton et al., 2003). Proteinaggregate von Alpha-Synuklein zerstören in der frühen Phase der Einschlusskörperchenbildung intakte Membranen der Zelle wie zum Beispiel Dopamin-Vesikel oder mitochondriale Membranen (Golbe und Mouradian, 2004). Das dadurch frei werdende Dopamin hemmt den Einbau von Protoaggregaten in harmlose Einschlusskörperchen, welche dadurch weiter toxisch wirken. Außerdem führt Dopamin zur Erhöhung zytoplasmatischer, reaktiver Sauerstoff-Spezies, wodurch vermehrt Mutationen auftreten können, welche zu Proteinmissfaltungen und Aggregatbildungen führen (Junn und Mouradian, 2002; Kanda et al., 2000a).

Mutationen im *Parkin* Gen (*PRKN*, **PARK2**) wurden in Familien mit autosomal rezessiver Parkinson-Krankheit identifiziert (Kitada et al., 1998). Betrachtet man die Häufigkeit von *Parkin* Mutationen bei PS Fällen mit frühem Erkrankungsalter, so liegt sie bei 49% (Lucking et al., 2000). Substrate dieser E3-Ubiquitin-Protein-Ligase sind unter anderem die glykosylierte Form von Alpha-Synuklein (Shimura et al., 2001) und Synphilin-1 (Chung et al., 2001). Mutationen in dem Gen führen dazu, dass die Ligase ihre Aktivität verliert und eventuell die glykosylierte Form von Alpha-Synuklein oder andere Proteine, die, wenn sie akkumulieren, neurotoxisch sind, nicht ubiquitinylieren kann und diese damit nicht mehr vom Proteasom abgebaut werden können (Haass und Kahle, 2001; Shimura et al., 2001). *Parkin* scheint eine wichtige Rolle in der Regulation der mitochondrialen Funktion und bei dem Schutz vor oxidativem Stress zu spielen. Die genauen Prozesse dabei sind aber unklar (Abou-Sleiman et al., 2006).

Ein weiteres gut charakterisiertes PARK-Gen ist die *Ubiquitin Carboxyl-Terminale Hydrolase 1* (*UCHL1*, **PARK5**). Sein Genprodukt ist ein Enzym, welches in die Dekonjugation von Ubiquitin verwickelt und in Lewy-Körperchen zu finden ist (Leroy et al., 1998; Lowe et al., 1990). Die gefundene Mutation in *UCHL1* resultiert in vermindertem Recycling von Ubiquitin-Monomeren und damit in der Dysfunktion des proteolytischen Proteasom-Regelkreises und wird autosomal dominant vererbt (Leroy et al., 1998). *UCHL1* wurde als Hauptziel oxidativer Schädigungen identifiziert (Choi et al., 2004). Da die Mutation nur in einer einzigen deutschen Familie mit reduzierter Penetranz gefunden wurde und die Symptome dem idiopathischen PS entsprechen, könnte die Mutation entweder ein extrem seltener Fall der familiären Parkinsonform sein oder eine harmlose Mutation in dieser Familie mit idiopathischem PS darstellen (Huang et al., 2004).

Der **PARK6**-Locus wurde mit einem autosomal rezessiven familiären PS in Verbindung gebracht und Mutationen in *PINK1* (*PTEN-induced putative Kinase 1*) als Ursache identifiziert (Valente et al., 2004). Das Genprodukt ist in Mitochondrien, aber auch in allen anderen Zellkompartimenten, lokalisiert und besitzt eine konservierte Protein-Kinase-Domäne, welche hohe Homologie zu Serin/Threonin-Kinasen der Calcium/Calmodulin Familie hat (Hencliff und Beal, 2008). Damit könnte dieses Protein eventuell

mitochondriale Proteine in Antwort auf zellulären Stress phosphorylieren und einen Schutz gegen Mitochondrien-Dysfunktion bieten (Valente et al., 2004). In neuen Studien wurde gezeigt, dass das mitochondriale Chaperon TRAP1 durch PINK1 phosphoryliert werden kann, wodurch die Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien unterdrückt und die Zelle vor Zelltod durch oxidativen Stress geschützt wird (Pridgeon et al., 2007).

Das am **PARK7**-Locus befindliche *DJ1*-Gen wurde als eine Ursache für ein autosomal rezessives, juveniles PS identifiziert (Bonifati et al., 2003). Seine Funktion wird im Schutz vor durch oxidativen Stress induzierten Zelltod gesehen (Yokota et al., 2003). Dabei ist noch nicht klar, ob es seine schützende Funktion primär als Redox-Sensor oder als Antioxidanz-Protein ausübt (Abou-Sleiman et al., 2006). Die beim PS auftretenden Mutationen in DJ1 zerstören seine Aktivität entweder durch Destabilisierung des Proteins oder durch die Veränderung seiner Lokalisation. Dabei scheinen einige Mutationen eine Lokalisation in die Mitochondrien zu Ungunsten seiner Lokalisation im Zellkern zu fördern. Hier bleibt dennoch die Frage offen, ob die Mutagenität mit der erhöhten mitochondrialen Lokalisation und einem DJ1-Funktions-Zugewinn in diesem Kompartiment einhergeht oder ob der Verlust der DJ1-Funktion in anderen Kompartimenten zum PS führt (Abou-Sleiman et al., 2006).

Eine autosomal dominante, spät manifestierende Parkinsonform entwickeln Patienten, bei denen der **PARK8**-Locus und damit *LRRK2* (*Leucine-rich repeat kinase 2*) von Mutationen betroffen ist (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004a). Die Symptome sind vergleichbar denen des nicht genetisch bedingten PS (Healy et al., 2008). Die bisher gefundenen Mutationen in dieser Serin-Threonin-Kinase und ihre potentiellen pathogenen Funktionen werden in Abschnitt 1.2 detailliert erörtert.

Mutationen in *ATP13A2* (**PARK9**, *ATPase*, *TYPE 13A2*) führen zu früh manifestierendem, autosomal rezessiven PS (Ramirez et al., 2006). *ATP13A2* ist eine lysosomale ATPase, wodurch Veränderungen im lysosomalen Protein-Degradationsweg mit der Pathogenese des PS in Verbindung gebracht werden können.

Auch konnten Mutationen in *GIGYF2* (**Park11**, *GRB10-interacting gyf protein 2*) identifiziert werden. *GIGYF2* hat einen Einfluss in Insulin-Wachstums-Faktor- und Insulin-Singalkaskaden, welche auch wichtige Effekte im zentralen Nervensystem ausüben (Lautier et al., 2008). Die gefundenen Mutationen treten in einer italienischen und französischen Kohorte mit autosomal dominantem, spät manifestierenden PS auf. Allerdings wurden zwei dieser Mutationen auch in gesunden Kontrollen von Portugiesen und Nord-Amerikanern gefunden (Bras et al., 2008). Demnach muss noch aufgeklärt werden, welchen Einfluss Mutationen in *GIGYF2* auf die Entstehung des PS haben.

Die mitochondriale Serin-Protease HTRA2 (high temperature requirement protein A2, oder OMI) wurde als Genprodukt des ***PARK13***-Locus identifiziert. Mutationen in diesem Gen führen zum spät manifestierenden PS. Ist HTRA2 durch Mutationen verändert, so kommt es zu einer Schwellung der Mitochondrien, einem reduzierten mitochondrialen Membranpotential und zu einem erhöhten Risiko von Toxin-induziertem Zelltod (Strauss et al., 2005). Dieser Zelltod wird vermutlich durch die Freisetzung von HTRA2 aus den Mitochondrien und seiner nachfolgenden Inhibierung durch XIAP induziert (Suzuki et al., 2001). Die Protease-Aktivität von HTRA2 wird durch eine PINK1-abhängige Phosphorylierung kontrolliert (Plun-Favreau et al., 2007). Im Jahr 2008 wurden die vorher als pathogen angesehenen Mutationen in einer Kontrollgruppe gefunden, so dass zu klären bleibt, welche Funktion HTRA2 in der Pathogenese des PS spielt (Simon-Sanchez und Singleton, 2008).

Ende des Jahres 2008 wurden Mutationen im *PLA2G6*-Gen (***PARK14***, *phospholipase A2, group VI*) als Ursache für familiäres PS identifiziert (Gregory et al., 2008). Anfang 2009 wurden zusätzlich Mutationen in *FBXO7* (***PARK15***, F-box only protein 7) mit einem früh manifestierenden, autosomal rezessiven PS assoziiert (Di Fonzo et al., 2009). Welche biologischen Funktionen die kodierenden Proteine in der PS Pathogenese haben, müssen weitere Studien klären.

1.2 Leucine-rich repeat kinase 2 - LRRK2

Mutationen in der *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* oder Dardarin (baskisch dardara = Tremor) verursachen ein autosomal dominantes PS (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004a; Zimprich et al., 2004b). Der *PARK8*-Locus wurde zum ersten Mal 2002 in einer großen japanischen Familie beschrieben (Funayama et al., 2002). Zwei Jahre später konnte das Gen *LRRK2* identifiziert und Mutationen in diesem mit der Segregation der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden (Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004a). *LRRK2* hat 51 Exone und umfasst 144 kb auf dem Chromosom 12q12 (Zimprich et al., 2004a).

1.2.1 Genetischer Ursprung und Struktur von LRRK2

LRRK2 gehört zu der Familie der Roco-Gene (Marin, 2006). Die Proteine dieser Gene haben zwei charakteristische Domänen: eine Roc-Domäne und eine COR-Domäne (Bosgraaf und Van Haastert, 2003). Dabei ist die Roc-Domäne eine Ras-ähnliche GTP-Bindedomäne, ihr Name leitet sich von „Ras of complex“ ab. Die Funktion der COR-Domäne, die sich immer C-terminal der Roc-Domäne anschließt - deshalb der Name „C-terminal of Roc“- ist noch nicht bekannt (Bosgraaf und Van Haastert, 2003). Gene der Roco-Familie findet man in Prokaryoten, in einigen Pflanzenarten, im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* und in Tieren (Marin, 2006). Der historische Ursprung von *LRRK2* ist vor der Protostomia-Deuterostomia Unterteilung zu finden (Marin, 2006). Dabei entstanden wahrscheinlich durch zwei Duplikationen drei unterschiedliche *LRRK*- ähnliche Gene. Danach gingen zwei der drei Gene in den Protostomia wie die Modellorganismen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* und anderen Insekten und Nematoden verloren, welche damit nur noch ein *LRRK*-Gen besitzen. Vertebraten (wie Säugetiere, Reptilien, Fische), die zu den Deuterostomia gehören, haben aber genau dieses Gen verloren und dafür zwei *LRRK* Gene behalten - *LRRK1* und *LRRK2* (Marin, 2008).

Vertebraten besitzen in der Regel vier Gene der Roco Familie: *LRRK1*, *LRRK2*, *MFHAS1* und *DAPK1* (Bosgraaf und Van Haastert, 2003; Marin, 2006). Phylogenetische Studien konnten zeigen, dass von diesen *LRRK1* der nächste Verwandte zu *LRRK2* ist (Marin, 2008). Dennoch unterscheidet sich *LRRK2* von *LRRK1*. Nur *LRRK2* (Abbildung 1.5) hat eine 650 Aminosäuren lange N-terminale Region, welche 14 konservierte Wiederholungen aufweist (Marin, 2006). Diese Wiederholungen beschreiben eine eigentümliche Armadillo-ähnliche, helikale Domäne, welche für Potein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein könnte (Marin, 2008).



Abbildung 1.5: Domänen-Struktur von humanem LRRK2

Die Hauptstrukturen von *LRRK2* umfassen neben der charakteristischen N-terminalen Struktur, Leucin-reiche Wiederholungen (LRR), eine Ras ähnliche GTP-Bindedomäne (ROC), eine Domäne C-terminal von ROC (COR) sowie eine Kinase-Domäne. Am C-terminalen Ende (C) befinden sich WD40 Wiederholungen. Zusätzlich ist die Aminosäuren Anzahl (oben), als auch die Nukleotid Anzahl (kursiv, unten) dargestellt.

Zusätzliche Protein-Interaktionsstellen offenbaren sich in acht Leucin-reichen Wiederholungen (LRR), welche sich zwischen der Armadillo-ähnlichen Domäne und der Roc-Domäne befinden (Marin, 2006; Mata et al., 2006). Der Roc- und der COR-Domäne folgt C-terminal eine Kinase-Domäne. LRRK2 gehört zur „Tyrosin-Kinase-like“-Untergruppe (TLK) der Kinasen (Mata et al., 2006) und unter diesen ähnelt es am ehesten den „Mixed-lineage“ Kinasen (MLKs) (West et al., 2005). Am C-terminus von LRRK2 befinden sich zusätzlich noch sieben Aminosäure-Wiederholungen, die eine Protein-Interaktionsdomäne ausmachen - die WD40 Wiederholungen (Mata et al., 2006).

LRRK2 liegt in der Zelle hauptsächlich als Dimer vor (Gloeckner et al., 2006; Greggio et al., 2008). Kristallographieanalysen des LRRK2 Dimers sollen aufklären, in welchen Domänen die Dimerisierung stattfindet (Abbildung 1.6).

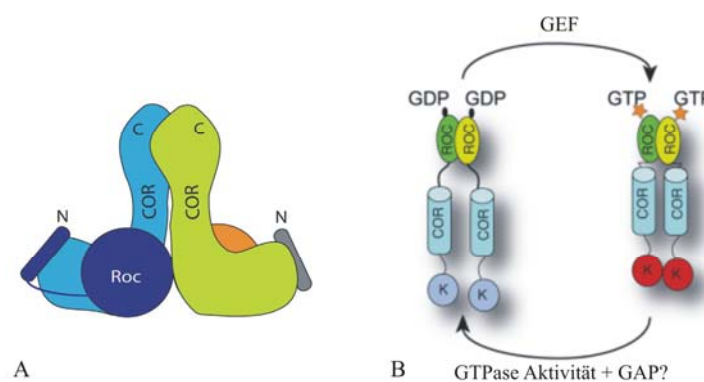


Abbildung 1.6: Dimerisierungsmodelle von LRRK2

A: Modell der COR-Dimerisierung

Dimerisierung der Roc-COR-Domänen von *C. tepidum* erfolgt über parallel zueinander gelagerte COR-Domänen. Die Roc-Domänen verbleiben mobil im Dimer (Gotthardt et al., 2008).

B: Modell der Roc-Regulation der Kinase-Aktivität von humanem LRRK2

Die Aktivierung der dimeren Roc-GTPase (gelbe und grüne Ovale, Roc) führt durch die Bindung von GTP (Sterne) zur Dimerisierung der COR-Domäne (blaue Zylinder, COR). Dies löst die Selbstassoziation der Kinase-Domäne (K) mit anschließender Autophosphorylierung und Aktivierung (rote Kreise) aus. Die Hydrolyse von GTP zu GDP (schwarze Ovale) führt zu Konformationsänderungen in der Roc-Domäne, welches die dimere Assoziation von der COR- und der Kinase-Domäne zerstört und zur Inaktivierung der Kinase führt (blaue Kreise). GTPase aktivierende Proteine (GAP) und Guanidin-Austauschfaktoren (GEF) sind für LRRK2 noch nicht bekannt (modifiziert nach (Deng et al., 2008).

Da es noch nicht gelungen ist, das komplette Protein kristallographisch darzustellen, wird mit Hilfe der Struktur der Einzeldomänen versucht, auf die komplette LRRK2 Dimerstruktur Rückschlüsse zu ziehen. Dabei werden diese Analysen nicht nur mit Domänen des humanen LRRK2s durchgeführt (Deng et al., 2008), sondern auch homologe Roco-Proteine von Thermobakterien (*Chlorobium tepidum*) genutzt (Gotthardt et al., 2008). Die Dimerisierung der Roc-COR-Domäne von Thermobakterien soll demnach über die COR-Domäne stattfinden, wobei sich zwei COR-Domänen parallel zueinander ausrichten und die Roc-Domänen mobil im Dimer bleiben, wobei sie selbst nicht dimerisieren (Abbildung 1.6 A) (Gotthardt et al., 2008).

Entgegengesetzt dazu zeigen Kristallstruktur-Analysen der humanen Roc-Domäne, dass auch diese als Dimer vorliegt und die Bindung von sowohl GTP als auch GDP zur Stabilisierung des Dimers beiträgt (Deng et al., 2008). Dabei sollen die Roc-Dimere antiparallel zueinander ausgerichtet sein. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Roc-Domäne eine intrinsische Interaktion mit der COR-Domäne eingeht. Bei diesem Model (Abbildung 1.6 B) ist daher anzunehmen, dass während des GTP/GDP Bindezyklusses die Konformationsänderungen in der Roc-Domäne direkt oder indirekt durch die COR-Domäne auf die Kinase-Domäne übertragen werden (Deng et al., 2008). Das führt zur Dimerisierung der Kinase-Domäne, was deren Autophosphorylierung und Aktivierung nach sich zieht (Deng et al., 2008).

Ob die Autophosphorylierung dabei intramolekular oder intermolekular ausgelöst wird, ist im Moment Schwerpunkt der Forschung (Abbildung 1.7).

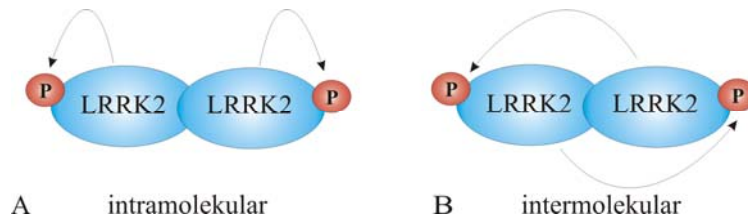


Abbildung 1.7: Modell der Autophosphorylierung von LRRK2

A: Bei der intramolekulare Autophosphorylierung kann jedes einzelne Monomer des dimeren LRRK2 Komplexes sich selbst phosphorylieren (P)

B: Die intermolekulare Autophosphorylierung beruht auf der gegenseitigen Phosphorylierung der Monomere im LRRK2-Dimer. (modifiziert nach (Greggio et al., 2008))

Bei der These der intramolekularen Autophosphorylierung (cis-Phosphorylierung) wird davon ausgegangen, dass sich jedes LRRK2 Monomer im dimeren Zustand selbst phosphoryliert (Abbildung 1.7 A) (Greggio et al., 2008). Andere Arbeitsgruppen postulieren, dass die Autophosphorylierung intermolekular (trans-Phosphorylierung) passiert (Abbildung 1.7 B). Dies bedeutet, dass sich die LRRK2 Monomere im dimeren Zustand gegenseitig phosphorylieren und damit aktivieren (Jaleel et al., 2007; Luzon-Toro et al., 2007). Die Fragestellung, welche Zielmoleküle LRRK2 phosphorylieren kann und welches die Hauptautophosphorylierungsstellen im eigenen Molekül sind, ist zurzeit noch offen.

1.2.2 Zelluläre Lokalisation und Expression von LRRK2

LRRK2 wird als 2527 Aminosäurenprotein mit einer molekularen Größe von 280kDa exprimiert (Biskup et al., 2006; Gloeckner et al., 2006). Betrachtet man die Expression von LRRK2 im Gesamtgewebe von Nagetieren, so befindet sich LRRK2 mit moderaten Mengen in der Lunge, im Herz und der Milz und zu großen Teilen in der Niere und im Gehirn (Biskup et al., 2007). Die detaillierte Analyse der Regionen von Nagetiergehirnen zeigte, dass LRRK2 in allen Regionen detektiert werden kann. Dabei kommt es vor allem im Kortex, Striatum, Hippokampus, Zerebellum und in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra vor (Biskup et al., 2006; Han et al., 2008; Melrose et al., 2007; Simon-Sanchez et al., 2006; Taymans et al., 2006).

Die Lokalisation begrenzt sich dabei auf das Soma der Nervenzellen und auf dendritische axonale Strukturen. Dies bedeutet, dass LRRK2 weder in der Glia noch in anderen nicht neuronalen Zelltypen des Rattengehirns vorkommt (Biskup et al., 2006). Diese LRRK2-Lokalisationsstudien konnten auch an humanen post mortem Gehirn verifiziert werden (Biskup et al., 2006).

Betrachtet man die Proteinexpression von LRRK2 in der Entwicklung von Mäusen, so stellt sich heraus, dass seine Expression ab dem embryonalen Tag 17 bis zum postnatalen Tag 28 kontinuierlich ansteigt und dann ein konstantes Level beibehält. Im Vergleich zu anderen Geweben steigt vor allem im Gehirn die LRRK2-Expression früher und bis zu einem gewissen Ausmaß an (Biskup et al., 2007). Es konnte in diesen Studien zusätzlich gezeigt werden, dass die LRRK2-Expressionslevels besonders hoch in embryonalen und erwachsenen Lungen als auch in der erwachsenen Niere sind (Biskup et al., 2007).

Analysiert man die Anwesenheit von LRRK2 in subzellulären Fraktionen so findet man es vorzugsweise angereichert in Fraktionen, die Membranen enthalten oder mit ihnen assoziiert sind - einschließlich der mikrosomalen Fraktion, der Fraktion synaptischer Vesikel, und der synaptosomalen, zytosolischen Fraktion (Biskup et al., 2006). Dies lässt die Vermutung zu, dass LRRK2 sowohl mit Membranen des Golgi-Apparates, des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien als auch mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist (Biskup et al., 2006; Gloeckner et al., 2006). Die detaillierte Analyse der submitochondrialen Fraktionen stellte heraus, dass LRRK2 nicht im Intermembranraum der Mitochondrien und nur zu kleinen Teilen in der Fraktion der Mitochondrien-Matrix vorkommt.

Der Großteil von LRRK2 befindet sich in der äußeren Mitochondrienmembran-Fraktion (Biskup et al., 2006). Betrachtet man die LRRK2-Lokalisation in Zellkulturen primärer kortikaler Neuronen, so ist es über das gesamte Zytoplasma sowie in axonalen und dendritischen Strukturen verteilt, wobei es in letzteren große punktierte Muster aufweist (Biskup et al., 2006). Diese punktierten Strukturen lassen sich teilweise auf Mitochondrien und Lysosomen zurückführen (Biskup et al., 2006). Defekte im Protein-Transport sind verknüpft mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel der Alzheimer Erkrankung (Uemura et al., 2004), der Huntington Erkrankung (Smith et al., 2005a) oder des Parkinson-Syndroms (Hauser et al., 2005). Die Assoziation von LRRK2 mit vesikulären Strukturen und Membranen lässt die Vermutung zu, dass LRRK2 an Protein-Transportprozessen beteiligt sein könnte (Biskup et al., 2006).

1.2.3 LRRK2 als genetische Ursache des Parkinson-Syndroms

Seit 2002 der PARK8-Locus zum ersten Mal beschrieben wurde und 2004 Mutationen im *LRRK2*-Gen identifiziert wurden, steigt die Anzahl der beschriebenen Sequenzvarianten in *LRRK2* stetig. Allgemein schwankt das Erkrankungsalter von PS Patienten mit LRRK2 Mutation zwischen 30 und 90 Jahren, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 60 Jahren liegt (Biskup und West, 2008). Zusätzlich ist die Penetranz altersabhängig und scheint reduziert vorzuliegen (Brice, 2005; Ross et al., 2006).

Die bisher identifizierten Varianten von LRRK2 verteilen sich über das gesamte Molekül. Dennoch liegen die Mutationen, welche eine hohe Segregation zeigen und damit potentiell pathogen sind, vermehrt in der Kinase- sowie der GTPase-Domäne von LRRK2 (Biskup und West, 2008).

Bei vielen Mutationen bleibt noch zu klären wie sie die Enzymaktivitäten von LRRK2 verändern, sei es aus dem Grund, dass für bestimmte Mutationen diese Analysen noch nicht durchgeführt worden sind oder aber je nach Methode oder Labor jede Arbeitsgruppe verschiedene Ergebnisse lieferte. Basierend auf dem Übersichtsartikel von S. Biskup und A. West sind in Tabelle 1.3 die Varianten von LRRK2 dargestellt, für welche die enzymatischen Eigenschaften des resultierenden mutierten LRRK2 charakterisiert wurden (Biskup und West, 2008).

Tabelle 1.3: LRRK2-Mutationen und ihre charakteristischen Eigenschaften

n.b.= nicht bestimmt, (Biskup und West, 2008)

Variante	LRRK2-Domäne	Konservierung	GTPase-Aktivität	Kinase-Aktivität	Referenz
L1122V	LRR	Keine Konservierung	n.b.	erhöht	(West et al., 2007; Zimprich et al., 2004b)
I1371V	GTPase	Konservierung mittel	n.b.	unverändert	(Paisan-Ruiz et al., 2005; West et al., 2007)
R1441C/G/H	GTPase	Konservierung hoch, Segregation	verringert	erhöht/ unverändert	(Jaleel et al., 2007; Lewis et al., 2007; Paisan-Ruiz et al., 2004; West et al., 2005; Zabetian et al., 2005; Zimprich et al., 2004b)
R1514Q	COR	Konservierung mittel	n.b.	erhöht	(Mata et al., 2005; West et al., 2007)
Y1699C	COR	Konservierung hoch, Segregation	n.b.	erhöht/ unverändert	(Jaleel et al., 2007; Luzon-Toro et al., 2007; Paisan-Ruiz et al., 2004; West et al., 2007; Zimprich et al., 2004b)
R1941H	Kinase	Konservierung mittel	n.b.	verringert / unverändert	(Jaleel et al., 2007; Khan et al., 2005; Luzon-Toro et al., 2007)
I2012T	Kinase	Konservierung mittel	n.b.	verringert	(Jaleel et al., 2007; Luzon-Toro et al., 2007; West et al., 2007; Zimprich et al., 2004b)
G2019S	Kinase	Konservierung hoch, Segregation	n.b.	erhöht	(Di Fonzo et al., 2005; Gilks et al., 2005; Liu et al., 2008; Nichols et al., 2005; Wang et al., 2008b; West et al., 2007)
I2020T	Kinase	Konservierung hoch, Segregation	n.b.	erhöht/ verringert / unverändert	(Gloeckner et al., 2006; Jaleel et al., 2007; Luzon-Toro et al., 2007; West et al., 2007; Zimprich et al., 2004b)
T2356I	C-Terminus	Keine Konservierung	n.b.	unverändert	(Jaleel et al., 2007; Khan et al., 2005)
G2385R	C-Terminus	Konservierung mittel	n.b.	unverändert /verringert	(Jaleel et al., 2007; Mata et al., 2005; West et al., 2007)

In der Kinase-Domäne des LRRK2-Proteins konnten bisher zwei Sequenzvarianten mit hoher Konservierung und Segregation identifiziert werden (G2019S, I2020T) (Di Fonzo et al., 2005; Gilks et al., 2005; Nichols et al., 2005; Zimprich et al., 2004b). Dabei ist die Mutation an Position I2020 als jene identifiziert worden, welche zur Identifikation des PARK8-Lokus geführt hat (Funayama et al., 2005). Die G2019S Mutation ist die häufigste in LRRK2 gefundene Mutation. Dabei schwankt ihre Häufigkeit in familiären PS Fällen von 0% (Schweden, Indien, Kanada, Griechenland, Polen) bis zu 37% (Nord Afrika) (Bialecka et al., 2005; Dupre et al., 2007; Healy et al., 2008; Kalinderi et al., 2007; Lesage et al., 2005). Betrachtet man die internationale Häufigkeit (getestet wurden 1045 Personen) der G2019S Mutation, so konnte sie in 1% der Patienten mit idiopathischem PS und in 4% der familiären PS Patienten identifiziert werden. Dabei lag das Erkrankungsrisiko für Patienten, welche diese LRRK2-Mutation trugen, bei 28% für 59jährige, bei 51% bei 69jährigen und stieg auf 74% bei einem Alter von 79 Jahren an (Healy et al., 2008). Die biochemischen Analysen der G2019S Mutation, bei welcher der Austausch von Glycin zu Serin eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle in das Aktivierungssegment der Kinase-Domäne einfügt, lassen auf einen toxischen Funktionszugewinn als Auslöser des LRRK2-gekoppelten Parkinsonismus schließen (Luzon-Toro et al., 2007; West et al., 2007).

In der GTPase-Domäne von LRRK2 gibt es an der hoch konservierten Position R1441 die Varianten R1441C/G/H (Mata et al., 2005; Nuytemans et al., 2008; Paisan-Ruiz et al., 2004; Zabetian et al., 2005; Zimprich et al., 2004b). Dabei zeigt die R1441C eine Segregation (Zimprich et al., 2004b). Die Häufigkeit mit der die R1441C Mutation auftritt, wurde in einer italienischen Familie mit 2% in Patienten mit idiopathischem und 4% in Patienten mit familiärem PS beschrieben (Di Fonzo et al., 2006). Mit einer Häufigkeit von 1,97% kommt diese Mutation in belgischem familiären Parkinson vor (Nuytemans et al., 2008).

Betrachtet man die Krankheitsausprägung von LRRK2-assoziiertem PS, so gibt es keinen Unterschied zu idiopathischem PS - die Betroffenen entwickeln ebenso die motorischen Symptome Ruhetremor und Bradykinese sowie auch die bekannten nicht motorischen Symptome, auch wenn sie bei G2019S Mutationsträgern schwächer ausgeprägt erscheinen (Healy et al., 2008). Die neurochemischen Anzeichen des LRRK2-assoziierten PS wie früher Zellverlust, amyloid-positive Aggregate, Veränderungen der Dopaminspeicherung oder Synthese und neuronale Inflammation, sind nicht unterscheidbar zum idiopathischen PS (Adams et al., 2005). In Gehirnen von Patienten mit LRRK2-Mutation können ebenso wie in idiopathischen Parkinson-Patienten Lewy-Körperchen identifiziert werden, wobei auch einzelne Patienten beschrieben wurden, bei denen dies nicht festgestellt wurde (Biskup und West, 2008). Die Lokalisation von LRRK2 in Lewy-Körperchen wird im Moment noch diskutiert. Je nach benutztem Antikörper zur Analyse von LRRK2 findet sich LRRK2 in weniger als 15% der Lewy-Körperchen im Gehirn von Parkinson-Patienten (Greggio et al., 2006; Higashi et al., 2007) oder bis zu 100% (Miklossy et al., 2006; Perry et al., 2008; Zhu et al., 2006a; Zhu et al., 2006b).

1.2.4 Funktionelle Domänen von LRRK2

1.2.4.1 Proteininteraktionsdomänen von LRRK2

Mit einer Molekülmasse von 280 kDa und sechs verschiedenen Domänen (N-terminus, LRR, Roc, COR, KINASE, WD40) bietet LRRK2 eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Im N-terminalen Bereich von LRRK2 befindet sich eine spezielle Interaktionsdomäne, die Ähnlichkeit zu Armadillo-Domänen besitzt (Marin, 2008). Dennoch ist sie so speziell, dass der N-terminale Bereich von LRRK2 einzigartig für dieses Molekül ist und auch nicht in anderen LRRK Molekülen wie LRRK1 zu finden ist (Marin, 2008). Dabei befinden sich multiple hydrophobe Aminosäuren in diesem Bereich des Proteins. Dies führt zur Ausbildung von langen, alpha-helikalen Strukturen (ähnlich wie bei Armadillo Wiederholungen), welche eine optimale Protein-Protein-Interaktionsfläche darstellen (Groves und Barford, 1999).

An den N-terminalen Bereich von LRRK2 schließen sich acht Leucin-reiche Wiederholungen (LRR, leucine-rich repeat) an (Marin, 2006; Mata et al., 2006). Betrachtet man andere Proteine mit 4-17 solcher Wiederholungen, so falten sie sich immer in die Form eines Hufeisens mit parallelen β -Faltblättern auf der konkaven und α -Helix-Strukturen auf der konvexen Seite (Enkhbayar et al., 2004). Diese Struktur ist optimal für Interaktionen mit verschiedensten Proteinen (Kobe und Kajava, 2001).

Neben der direkten Interaktion von Proteinen in den enzymatisch aktiven Regionen von LRRK2 - der GTPase-Domäne (siehe 1.2.5.2) oder der Kinase-Domäne (siehe 1.2.5.3) - gibt es am C-terminus von LRRK2 zusätzlich ein weiteres Interaktionsmotiv (Mata et al., 2006). Es besteht aus sieben WD40-Wiederholungen, wobei jede Wiederholung ein vierfach verdrilltes, antiparalleles β -Faltblatt bildet. Alle Wiederholungen zusammen bilden eine zirkuläre, Propeller-ähnliche Struktur (Mata et al., 2006). Dieses Motiv ist das am häufigsten gefundene in humanen Proteinen und es kommt in den unterschiedlichsten Proteinen vor (Yu et al., 2000). Die Funktion von WD40 enthaltenden Proteinen reicht von Transkriptionsfaktoren, Proteinen der RNA Prozessierung, über Zytoskelett beeinflussende Proteine bis hin zu Proteinen, die in Vesikelbildung und Transportprozesse involviert sind, als auch Proteine, die den Zellzyklus und die Apoptose beeinflussen (Li und Roberts, 2001; Yu et al., 2000). Die Struktur der WD40-Proteine gleicht einem Donut, wobei bei dieser Struktur drei verschiedene funktionelle Oberflächen entstehen - oben, unten und rundherum. Damit stellen WD40-Proteine eine stabile Plattform oder ein Gerüst dar, auf der simultan verschiedene Proteine miteinander interagieren oder funktionelle Komplexe ausbilden können (Li und Roberts, 2001).

1.2.4.2 GTPase-Funktion von LRRK2

LRRK2 besitzt eine GTPase-Domäne (Roc), welche Ähnlichkeit zu kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie besitzt. In dieser Superfamilie findet sich die höchste Homologie zu Mitgliedern der Rab-Familie (Bosgraaf und Van Haastert, 2003). Rab-GTPasen sind dafür bekannt, spezifische Effektorproteine an Membranen zu rekrutieren und durch diese Effektoren Vesikelbildung, Aktin- und Tubulin-abhängige Vesikelbewegungen und Membranfusionen zu steuern (Stenmark und Olkkonen, 2001). Die Struktur dieser Domäne setzt sich aus sechs β -Faltblättern zusammen, wobei fünf davon parallel und eins antiparallel angeordnet ist. Umgeben ist diese Struktur von fünf α -Helices. In dieser Anordnung sorgen die Verbindungsschleifen der Faltblätter und Helices für die Elemente, welche sowohl für die GTP- und Mg^{2+} -Bindung als auch für die GTP-Hydrolyse nötig sind (Stenmark und Olkkonen, 2001).

In vitro Studien zeigten, dass LRRK2 GTP-Bindungsaktivität besitzt und diese durch Mutationen an Lys1347 und Thr1348 deutlich reduziert wird (Guo et al., 2007; Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007; Smith et al., 2006; West et al., 2007). Die GTP-Bindung kann durch GDP, GTP oder das nicht hydrolysierbare Analog GTP γ S nicht aber durch andere Nukleotide wie ATP verdrängt werden, was LRRK2 als echte GTPase kennzeichnet (West et al., 2007).

Die Bindung von GTP in der Roc-Domäne von LRRK2 ist die Voraussetzung für die Hydrolyse von GTP zu GDP. Vergleicht man die Hydrolyseaktivität von LRRK2 zum Beispiel mit Ras, so besitzt LRRK2 *in vitro* nur eine schwache GTP-Hydrolyseaktivität (Guo et al., 2007; Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007). Es liegt die Vermutung nahe, dass bei diesen Studien die aktivierenden Faktoren wie LRRK2-spezifische GAPs (GTPase aktivierende Proteine) oder GEFs (Guanidin-Austauschfaktoren) fehlen, um die tatsächliche *in vivo* Aktivität von LRRK2 adäquat abzubilden (West et al., 2007). Deutlich konnte aber herausgestellt werden, dass die pathogenen Mutationen R1441C und R1441G die GTP-Hydrolyse verringern, wobei sie die GTP-Bindung nicht beeinflussen (Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007). Die Verringerung der GTP-Hydrolyse resultiert dabei wahrscheinlich aus der Destabilisierung des GTPase-Dimers, da die Position 1441 genau an der Verbindungsstelle zweier Monomere angesiedelt ist (Deng et al., 2008).

1.2.4.3 Kinase-Funktion von LRRK2

Die Kinase-Domäne von LRRK2 zeigt Sequenzhomologie zu Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKK) (Mata et al., 2006). Dabei zeigt sie größte Ähnlichkeit zu deren Unterklasse der „Mixed-lineage“ Kinasen (MLK). Die MLKs gehören zu der „Tyrosin-Kinase-like“ Familie (TKL) (Manning et al., 2002). Die Mitglieder der TKLs zeigen neben der Homologie zu Serin/Threonin-Kinasen auch Homologie zu Tyrosin-Kinasen (Mata et al., 2006). Dennoch konnte herausgestellt werden, dass MLKs nur Serine und Threonine phosphorylieren können (Gallo und Johnson, 2002).

LRRK2 ist eine echte Serin/Threonin-Kinase und phosphoryliert kein Tyrosin. Dies wurde *in vitro* sowohl mit Hilfe von Autophosphorylierungsanalysen als auch mit der Phosphorylierung des Myelin basic protein (MBP) gezeigt (Gloeckner et al., 2006; Smith et al., 2006; West et al., 2005; West et al., 2007). Betrachtet man detailliert die Sequenzhomologie zu MLKs, so gibt es in der Kinase-Domäne von LRRK2 Unterschiede, welche LRRK2 deutlich von typischen MLKs abgrenzen (West et al., 2007). Dennoch formt LRRK2 wie auch die MLKs Dimere, wobei die Dimerbildung von der Kinase-Aktivität abhängig zu sein scheint (Greggio et al., 2008; West et al., 2007).

Die häufigste LRRK2-Mutation G2019S führt zu einer zusätzlichen Phosphorylierungsstelle in dem Aktivierungssegment der Kinase-Domäne. Dadurch kommt es zu einer deutlichen Autophosphorylierungssteigerung sowie zu einer Steigerung der Kinase-Aktivität (Gloeckner et al., 2006; Greggio et al., 2006; Luzon-Toro et al., 2007; West et al., 2005; West et al., 2007).

Das besondere an den Enzymfunktionen von LRRK2 ist deren gegenseitige Beeinflussung (Guo et al., 2007; Ito et al., 2007; Smith et al., 2006; West et al., 2007). So führt der Einsatz des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons GTP γ S oder GppNHPs und damit die kontinuierliche GTPase-Aktivierung von LRRK2 zur gesteigerten Kinase-Aktivität (West et al., 2007). Auch resultiert die Konkurrenz zwischen GTP und GDP um die Bindung an die GTPase-Domäne in einer reduzierten Kinase-Aktivität (West et al., 2007). Ein kompletter Kinase-Aktivitätsverlust entsteht, wenn Mutationen in der GTP-Bindedomäne an Lys1347 und Thr1348 eingefügt werden, da die GTP-Bindung dadurch nicht mehr möglich ist (Ito et al., 2007; Smith et al., 2006; West et al., 2007). Betrachtet man allerdings den Effekt von Mutationen, welche die Kinase-Aktivität reduzieren (K1906M, D1994A), so erkennt man keinen Einfluss auf die GTP-Bindungs- oder GTP-Hydrolyseaktivität seitens LRRK2 (Ito et al., 2007; West et al., 2007).

Damit ist LRRK2 ein Protein, welches durch seine eigene GTPase-Funktion intrinsisch die Aktivität der eigenen Kinase-Funktion beeinflusst. Sowohl die Aufklärung dieser internen Signalkaskade als auch die Erkenntnis über nachfolgende Effektorproteine wird helfen, die biologische Funktion von LRRK2 aufzuklären.

1.2.5 Substrate und Interaktionspartner von LRRK2

1.2.5.1 Substrate

Die Identifikation von Substraten der Kinase LRRK2 können helfen, die Signalkaskaden, in welche LRRK2 eingreift, besser zu verstehen. Das Bindeprotein des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E (4E-BP) konnte als *in vitro*-Substrat von LRRK2 ermittelt werden (Imai et al., 2008). Der eukaryotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E) vermittelt im unphosphorylierten Zustand die Bindung von eIF4F an die 5'-Kappenstruktur der mRNA, was zum effektiven Start der Translation der mRNA beiträgt (Gingras et al., 1999). Die Bindung von eIF4E an die mRNA wird durch seine Interaktion mit 4E-BP reduziert. Die LRRK2-vermittelte Phosphorylierung von 4E-BP an Thr37/Thr46 resultiert in einer verminderten Bindung zwischen 4E-BP und eIF4E, wodurch mehr freies eIF4E durch seine Bindung an den Initiationskomplex zur Aktivierung der mRNA-Translation beitragen kann (Gingras et al., 2001; Imai et al., 2008). Die biologische Funktion von 4E-BP liegt durch seinen Einfluss auf die Translationsinitiation in der Regulation des Überlebens der Zelle unter oxidativem Stress und Stress, welcher durch Nährstoffmangel oder durch ungefaltete Proteine ausgelöst wird (Teleman et al., 2005; Tettweiler et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008). Inwieweit LRRK2 und seine Phosphorylierung von 4E-BP Stress-Signalkaskaden oder die Pathogenese des idiopathischen PS direkt beeinflussen, muss in detaillierten Studien noch aufgeklärt werden.

LRRK2 scheint durch die Phosphorylierung von Komponenten der Ezrin/Radixin/Moesin-Familie auch einen Einfluss auf das Zytoskelett der Zelle zu haben (Jaleel et al., 2007). Moesin ist dafür verantwortlich, dass das Aktin-Zytoskelett an der Plasmamembran verankert wird und spielt aus diesem Grund eine große Rolle bei der Regulation der Struktur und Organisation der Zellmembran (Bretscher et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Moesin durch LRRK2 *in vitro* an Thr558 phosphoryliert wird (Jaleel et al., 2007). Dabei befindet sich die Phosphorylierungsstelle genau in der Domäne, wo Moesin mit Aktin interagiert (Pestonjamas et al., 1995). Auch werden die mit Moesin verwandten Proteine Ezrin und Radixin *in vitro* von LRRK2 phosphoryliert (Jaleel et al., 2007). Ob diese drei Proteine aber physiologische Substrate von LRRK2 sind und welchen Einfluss deren Phosphorylierung durch LRRK2 auf Zytoskelett-Signalkaskaden haben, wird noch Gegenstand weiterer Analysen sein.

Aufgrund der Sequenzhomologie der Kinase-Domäne von LRRK2 mit MLKs als Untergruppe der MAPKKKs wird vermutet, dass es über den dreistufigen MAPK-Signalweg den programmierten Zelltod beeinflussen und auf zelluläre Stressoren reagieren kann (Abbildung 1.8) (West et al., 2007). Alle bisher bekannten Mitglieder der MLKs führen zur vermehrten Phosphorylierung von JNK und c-JUN und initialisieren damit den Zelltod (Gallo und Johnson, 2002). *In vitro*-Analysen zeigen, dass LRRK2 wie MLKs sowohl MKK3/6 als auch MKK4/7 phosphorylieren und dadurch den MAPK-Signalweg als MAPKKK anschalten kann (Gloeckner et al., 2009).

Es konnte zusätzlich herausgestellt werden, dass LRRK2 selektiv, aber GTP-Bindungs- und kinaseunabhängig, die Phosphorylierung von sowohl ERK1/2 als auch von ERK5 auslöst (West et al., 2007). Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe um Liou zeigen, dass in Anwesenheit von LRRK2 und oxidativem Stress der ERK1/2-Signalweg aktiviert wird und dies vor Zelltod schützt (Liou et al., 2008). Dabei geschieht dies nur bei der Anwesenheit der Kinase-Domäne von LRRK2. Bisher ist aber noch nicht bekannt, mit welchem Protein der ERK1/2-Signalkaskade LRRK2 direkt interagiert, um einen Einfluss auf diesen Signalweg auszuüben.

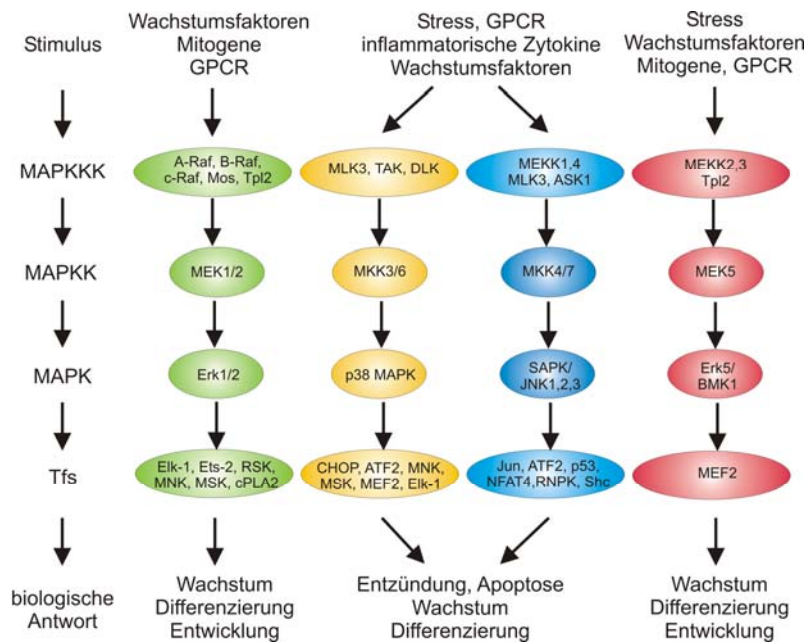


Abbildung 1.8: MAPK-Signalwege

Die vier Hauptsignalwege der MAPKKK-MAPKK-MAPK-Signalkaskaden. (modifiziert nach (Roberts und Der, 2007) GPCR= G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tfs= Transkriptionsfaktoren)

1.2.5.2 Interaktionspartner

Es ist zu erwarten, dass es auch Interaktionspartner von LRRK2 gibt, welche nicht durch seine Kinase-Aktivität phosphoryliert werden. So konnte die Massenspektrometrie-basierte Interaktionspartnersuche von Dächsel und Kollegen (Dachsel et al., 2007) Clathrin und Vimentin als *in vitro* LRRK2-Interaktoren identifizieren. Beide Proteine sind Mediatoren des Zytoskeletts und des Transports. Es konnte auch eine direkte Interaktion zwischen Alpha- und Beta-Tubulin (den Bestandteilen der Mikrotubuli) und LRRK2 gezeigt werden, was ein weiterer Hinweis auf den Einfluss von LRRK2 auf das Zytoskelett ist (Gandhi et al., 2008). Auch wenn LRRK2 und das Mikrotubuli-Bindeprotein Tau in Einschlüssen kolokalisieren, deren Bildung durch die Parkinson-assoziierte LRRK2-G2019S Mutation verursacht wird, so konnte bisher die Interaktion wie auch die Phosphorylierung von Tau durch LRRK2 nicht gezeigt werden (MacLeod et al., 2006; West et al., 2005).

Auch die mit dem PS-assoziierten Proteine Alpha-Synuklein, DJ1 und Parkin werden nicht durch LRRK2 phosphoryliert (Smith et al., 2005b; West et al., 2005). Es konnte aber eine direkte Interaktion zwischen der COR-Domäne von LRRK2 und der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin festgestellt werden (Smith et al., 2005b). Dabei fungiert LRRK2 nicht als Substrat der

Ubiquitinylierung durch Parkin, sondern führt zur Autoubiquitinylierung von Parkin selbst. Zusätzlich lagert sich LRRK2 durch die Aktivität von Parkin in zytoplasmatischen Proteinaggregaten ab, welche eine starke Ubiquitinylierung aufweisen.

Dass LRRK2 trotz der fehlenden Ubiquitinylierung durch Parkin über das Proteasom und nicht über den lysosomalen Abbauweg degradiert wird, konnte durch die Arbeitsgruppe von Wang (Wang et al., 2008b) gezeigt werden. Dabei spielen das Chaperon HSP90 und sein Co-chaperon p50^{CDC37} eine wichtige Rolle, da beide direkt mit LRRK2 interagieren und seine Stabilität positiv beeinflussen (Dachsel et al., 2007; Gloeckner et al., 2006; Wang et al., 2008).

Ein weiterer Interaktionspartner von LRRK2 ist Rab5b (Shin et al., 2008). Rab-Proteine sind kleine GTPasen, welche in verschiedenen vesikulären Strukturen zu finden sind und als Regulatoren des Transports fungieren (Pfeffer and Aivazian, 2004; Seabra and Wasmeier, 2004). Rab5 ist dabei der Hauptmediator des endozytotischen, vesikulären Transports von der Plasmamembran zu frühen Endosomen (Carney et al., 2006).

Dabei geschieht die Rab5b-Interaktion unter Abhängigkeit von GTP in der LRR-Domäne von LRRK2 (Shin et al., 2008). In diesen Interaktionsstudien konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass LRRK2 die Endozytoserate synaptischer Vesikeln reduziert und möglicherweise keinen Einfluss auf die Exozytose hat (Shin et al., 2008).

1.2.6 Toxizität von LRRK2

Inwieweit LRRK2 über seine Interaktionspartner Toxizität auf die Zelle vermittelt, kann im Moment noch nicht abgeschätzt werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass bei der transienten Überexpression der pathogenen, mutierten LRRK2-Varianten (R1441C, Y1699C und G2019S), nicht aber in diesem Ausmaß bei der Expression von WT LRRK2, neuronale Toxizität und Zelltod ausgelöst werden konnten (Greggio et al., 2006; MacLeod et al., 2006; Smith et al., 2005b). Dabei scheint dieser, durch die Mutationen in LRRK2 induzierte, Zelltod über apoptotische Mechanismen gesteuert zu werden, da eine Aktivierung der Caspase 3, sowie nukleäre Kondensation ausgelöst werden (Iaccarino et al., 2007; Smith et al., 2006). Genauere Studien zeigten, dass durch mutiertes LRRK2 bei Abwesenheit von Apaf-1, ein wichtiges Protein zum Aufbau des Apoptosoms, die Caspase 3-Aktivierung nicht induziert wird. Dabei wird aber ganz normal Cytochrom C aus dem Mitochondrium freigesetzt. Deshalb vermutet man, dass LRRK2 toxisch in intrinsische Apoptose-Signalkaskaden eingreift, welche nach der Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium angesiedelt sind. Ein Hauptmediator der LRRK2-Toxizität scheint dabei Apaf-1 und die Bildung des Apoptosoms zu sein (Iaccarino et al., 2007). Andere Analysen lassen vermuten, dass LRRK2 über den extrinsischen Apoptosesignalweg durch seine Interaktion mit FADD (death adaptor Fas-associated protein with death domain) die Caspase 8 rekrutieren und aktivieren kann (Ho et al., 2009). Dabei wurde verdeutlicht, dass die PS auslösenden Mutationen diese Signalkaskade aktivieren und möglicherweise dadurch Neurodegeneration auslösen (Ho et al., 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass die neuronale Toxizität von mutiertem LRRK2 nur vermittelt werden kann, wenn eine intakte Kinasefunktion zur Verfügung steht (Greggio et al., 2006; Smith et al., 2006). Das Zusammenspiel der einzelnen Funktionen der LRRK2-Domänen wird deutlich, wenn man betrachtet, dass auch WT LRRK2 eine milde neuronale Toxizität auslösen kann. Dies ist jedoch abhängig sowohl von einer normalen GTP-Bindung als auch von seiner Kinase-Aktivität (Greggio et al., 2006; Smith et al., 2006; Smith et al., 2005b; West et al., 2007).

Erstaunlich ist auch die Erkenntnis, dass oxidativer Stress durch H₂O₂ die Toxizität auf neuronale Kulturen sowohl von WT als auch von mutiertem LRRK2 deutlich verstärkt (West et al., 2007). Dabei ist auch bei diesen Experimenten keine H₂O₂-induzierte Toxizität mehr erkennbar, wenn die Kinasefunktion sowie die GTP-Bindungsfähigkeit von LRRK2 durch funktionelle Mutationen ausgeschaltet wurden. Es ist jedoch herausgestellt worden, dass Mutationen in der GTP-Bindungsdomäne von LRRK2 wahrscheinlich nur über die intrinsische Veränderung der Kinasefunktion zur Toxizität von LRRK2 unter oxidativem Stress führen (West et al., 2007). Diese Untersuchungen an neuronalen Kulturen stehen im Gegensatz zu Ergebnissen, welche mit Nierenzelllinien (HEK293) und Neuroblastomzelllinien (SH-SY5Y) erhalten wurden. In diesen Zellenlinien schützt WT LRRK2 - aber nicht seine Kinase-Aktivität beeinflussenden Varianten Y1699C und G2019S - vor H₂O₂-induziertem Zelltod über die Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade (Liou et al., 2008). Welchen Einfluss LRRK2 auf die MAPKKK-Signalkaskaden hat und inwieweit diese in verschiedenen Zellsystemen modifiziert sind, können nur weitere detaillierte Studien zeigen.

Transfiziert man die pathogenen LRRK2-Mutationen G2019S, R1441C, Y1699C und I2020T, so bilden sie in 25-60% der Zellen Einschlüsse. Der WT von LRRK2 hingegen führt nur in 5-7% zu dem gleichen Phänotyp (Greggio et al., 2006; MacLeod et al., 2006; Smith et al., 2005b). Dabei sind die Einschlüsse bei der R1441C und der Y1699C Mutation größer und im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Die Mutationen G2019S und I2020T führen hingegen zu Einschlüssen, die sich eher perinukleär befinden (Greggio et al., 2006). Die LRRK2-enthaltenden Einschlüsse haben einen Mantel aus Vimentin und zeigen eine Färbung für Gamma-Tubulin (Greggio et al., 2006). Vimentin ist ein Protein der Intermediärfilamente und Tubulin ist ein Bestandteil der Mikrotubuli. Beide Proteine sind wesentlich am Aufbau des Zytoskeletts der Zelle beteiligt (Langelier et al., 2000). Das Mikrotubuli-depolymerisierende Nocodazol führt ebenso wie die Überexpression von Kinase-inaktiven LRRK2-Mutationen nicht zur Einschlussbildung (Greggio et al., 2006). Damit scheint die Kinasefunktion von LRRK2 einen bedeutenden Einfluss auf die Aggregatneigung dieses Proteins zu besitzen. Auch die Expression von Kinase-aktiven Mutanten G2019S und I2020T in kortikalen Neuronenkulturen führt zur Bildung von axonalen, membrangebundenen Einschlüssen. Diese sphäroid-ähnlichen Einschlüsse haben neben mutiertem LRRK2 auch phosphoryliertes Tau, sowie geschwollene Lysosomen, multivesikuläre Körper, vergrößerte, mit Vakuolen assoziierte Mitochondrien und zerrissene zytoskelettäre Strukturen als Bestandteil (Greggio et

al., 2006). Ob die Zelle sich durch den Einschluss von LRRK2 in Aggregaten vor dessen Toxizität schützt oder aber diese Einschlüsse die Toxizität auslösen, kann im Moment noch nicht beantwortet werden.

1.2.7 Tiermodelle von LRRK2

Die biologische Funktion von LRRK2 kann durch *in vitro* Analysen nicht detailliert untersucht werden. Erst durch die Betrachtung der *in vivo* Auswirkung des Verlustes oder der vermehrten Bildung von WT oder mutiertem LRRK2 in Tiermodellen, kann die physiologische Relevanz von LRRK2 abgeschätzt werden.

Im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* gibt es ein LRRK-Protein mit Namen GbpC (van Egmond et al., 2008). Es besitzt neben der charakteristischen Roc-COR-Domäne ebenso wie LRRK2 LRR-Wiederholungen und eine MARKKK-Domäne. Zusätzlich hat dieses Protein aber zwei Nukleotid-Bindedomänen sowie eine RasGEF-Domäne (van Egmond et al., 2008). *In vitro*-Analysen mit diesem Multidomänenprotein konnten herausstellen, dass über eine intramolekulare Signalkaskade - ausgehend von der cGMP-Bindung - die GEF-Funktion dieses Proteins den GDP/GTP-Austausch an der Roc-Domäne beschleunigt. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die cGMP-Bindung, die RasGEF-Funktion sowie die Roc-Domänenfunktion der Kinasefunktion dieses Proteins vorgeschaltet sind. GbpC kann seine chemotaktische, biologische Funktion *in vivo* nur umsetzen, wenn es seine kompletten Domänen besitzt und diese ihre intrinsische Signalkaskade aktivieren können (van Egmond et al., 2008). Damit ist dies das erste Modell, welches den funktionellen Zusammenhang zwischen der Kinase- und der Roco-Domäne - gemeinsam mit dem Zusammenspiel mit einer intrinsischen GEF-Funktion - *in vivo* darstellen konnte. Bislang bleibt aber abzuwarten, ob es im humanen System einen GEF gibt, welcher die Aktivierung der GTPase-Funktion von LRRK2 übernimmt und damit die Kinase-Funktion beeinflusst oder ob kein GEF benötigt wird.

Als Modellorganismus wird auch *Caenorhabditis elegans* zur Analyse der *in vivo*-Funktion von LRK-1 genutzt (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007). LRK-1 hat die charakteristischen Domänen, ähnlich dem humanen LRRK2, ist jedoch ein paraloges und kein orthologes Protein zu dem humanen LRRK2 (Marin, 2008). Der Verlust von LRK-1 führt zu einer Mislokalisierung von synaptischen Vesikel-Proteinen in dendritische Regionen, welche im Normalfall nur in axonalen Regionen zu finden sind (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007). In diesen Studien konnte auch gezeigt werden, dass LRK-1 nicht nur die Lokalisation synaptischer Vesikel-Proteine kontrolliert, sondern auch deren Transport und ihre Sortierung beeinflusst. Allerdings scheint der Verlust von LRK-1 nicht die Ausbildung funktioneller, dorsaler Synapsen zu blockieren (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007). Zusätzlich kolokalisiert LRK-1 mit dem Golgi-Apparat in Neuronen von *C. elegans*. Dies lässt die Vermutung zu, dass LRK-1 über seine Zusammenarbeit mit den trans-Golgi-Netzwerk synaptische Vesikel-Proteine von dem Dendriten-spezifischen Transport ausschließt, welcher über den AP-1-Clathrin-Adaptor Komplex vermittelt wird (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007).

Obwohl auch das humane LRRK2 mit membranösen und vesikulären, intrazellulären Strukturen kolokalisiert, kann im Moment noch nicht geklärt werden, ob es eine ähnliche Funktion wie sein Paralog in *C. elegans* ausüben kann (Biskup et al., 2006). Weitere Studien in diesem Modell zeigen, dass die Expression von sowohl WT LRRK-1 als auch des G2019S analogen LRRK-1 G1876S zu abweichender Axon-Wegfindung führt (Samann et al., 2009).

Auch *Drosophila melanogaster* besitzt ein LRRK2-Paralog (Marin, 2008). Drei Gruppen haben bisher den Verlust des endogenen dLRRK2 untersucht (Imai et al., 2008; Lee et al., 2007; Wang et al., 2008a). Besonders die Ergebnisse in Bezug auf die Erhaltung von dopaminergen Neuronen und ihren Dopamingehalt waren in diesen Untersuchungen unterschiedlich. Auch die Studien mit Stress-Induktoren H₂O₂ und Paraquat zeigten gegensätzliche Ergebnisse (Imai et al., 2008; Wang et al., 2008a)

Es konnten auch *Drosophila*-Tiermodelle etabliert werden, welche das humane LRRK2 als WT oder mit der Kinase-aktiven G2019S Mutation überexprimierten (Liu et al., 2008). In beiden Bedingungen kommt es zu einer retinalen Degeneration, einer reduzierten Bewegungsaktivität und früheren Sterblichkeit. Zusätzlich tritt ein selektiver Verlust dopaminergener Neuronen gemeinsam mit reduzierter Tyrosin-Hydroxylase Färbung auf (Liu et al., 2008). Allerdings ist der Phänotyp der G2019S hLRRK2 *Drosophila* Mutanten in allen Punkten deutlich stärker ausgeprägt als bei den WT hLRRK2 Tieren (Liu et al., 2008).

Inwieweit sich die physiologische Relevanz von dLRRK mit humanem LRRK2 überschneidet oder unterscheidet ist im Moment noch nicht abzusehen.

Da die phylogenetische Abstammung von dLRRK und LRRK-1 unterschiedlich zu dem humanen LRRK2 ist, sollten Säugetiermodellen für die Analyse der biologische Bedeutung von LRRK2 genutzt werden (Marin, 2008). Bisher sind allerdings noch keine Daten solcher Modelle publiziert.

1.3 Die Funktion des Zytoskeletts in Neuronen

1.3.1 Das Zytoskelett der Zelle

Das Zytoskelett gibt der Zelle ihre Form und Reißfestigkeit, befestigt manche Organellen und bewegt andere. Es verleiht der ganzen Zelle die Fähigkeit ihre Gestalt zu verändern oder sich fortzubewegen. Die Filamente des Zytoskeletts gehören drei Proteinfamilien an: den Mikrotubuli, den Mikrofilamenten (Aktinfilamenten) und den Intermediärfilamenten (Alberts et al., 2004). Die Intermediärfilamente sind verantwortlich für die mechanische Festigkeit und den Widerstand der Zelle gegen Scherkräfte (Alberts et al., 2004). Mikrotubuli hingegen bestimmen die Lage von membranumschlossenen Organellen und gewährleisten den intrazellulären Transport (Gordon-Weeks, 2004). Mikrofilamente sorgen für die Formgebung der Zelloberfläche und für die Wanderung der Zelle. Sie umfassen drei dynamische Strukturen: die Lamellipodien, Filopodien und die Mikrovilli (Alberts et al., 2004).

Hilfsproteine, welche mit dem Filamentsystem des Zytoskeletts verbunden sind, können deren Länge, Lage, Ordnung und Dynamik kontrollieren. Extrazelluläre Signale (wie Netrin, Slit, Semaphorin, Ephrin) wirken auf Rezeptoren der Zelloberfläche. Die Hauptrezeptoren für positive und negative Richtungssignale des Wachstumskegels sind Netrin-Rezeptoren, Robo-Transmembranproteine, welche Slit-Richtungssignale erkennen, Plexine, deren Liganden Semaphorine sind und Ephrin-Rezeptoren (Huber et al., 2003). Eine Bindung des Liganden an seinen Rezeptor resultiert meistens in einem Effekt auf monomere GTPasen der Rho-Protein-Familie. Zu diesen gehören CDC42, Rac und Rho. Sie dienen als molekulare Schalter und wechseln zwischen einem aktiven GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand hin und her (Abbildung 1.9 B) (Ridley, 2006). Viele GTPasen benötigen für ihre Aktivierung Guanidin-Austauschfaktoren (GEF, guanidine exchange factor), welche durch den Austausch von GDP zu GTP die inaktive GTPase wieder in den aktiven Zustand versetzen können. Ihre Gegenspieler sind GTPase-Aktivierungsfaktoren (GAP, GTPase-activating proteins). Sie überführen die GTP-gebundene GTPase wieder in den GDP-gebundenen Zustand, damit sie wieder aktiviert werden kann (Ridley, 2006). Die Aktivierung der verschiedenen monomeren GTPasen resultiert in unterschiedlichen Signalkaskaden. So führt die Aktivierung von Rho zu einer Bindung von Aktin und Myosin II, wodurch sich Stressfasern ausbilden. Zusätzlich kommt es durch die Zusammenlagerung von Integrinen und Aktin zur Bildung von Fokalkontakten (Koh, 2006). Wird Rac aktiviert, polymerisiert vor allem Aktin am Zellrand und es bilden sich blattartige Lamellipodien (Koh, 2006). Die Aktivierung von CDC42, welches unter anderem durch den Guanidin-Austauschfaktor ARHGAP7 (Cool-1, Beta-Pix) induziert werden kann (Feng et al., 2006; Manser et al., 1998), führt zu einer Polymerisierung von Aktin und einer Bündelung der Filamente, so dass es zu Zellvorstülpungen (Filopodien) kommt (Koh, 2006).

Die CDC42-gesteuerte Signalkaskade zur Bildung von Filopodien ist in Abbildung 1.9 A detailliert veranschaulicht. Die dabei regulatorisch wirkenden Proteine sind unter anderem WASp, Arp2/3, Cofiline, LIM-Kinasen, PAKs, Capping-Proteine und Profilin, deren Funktionen in dieser Abbildung beschrieben sind.

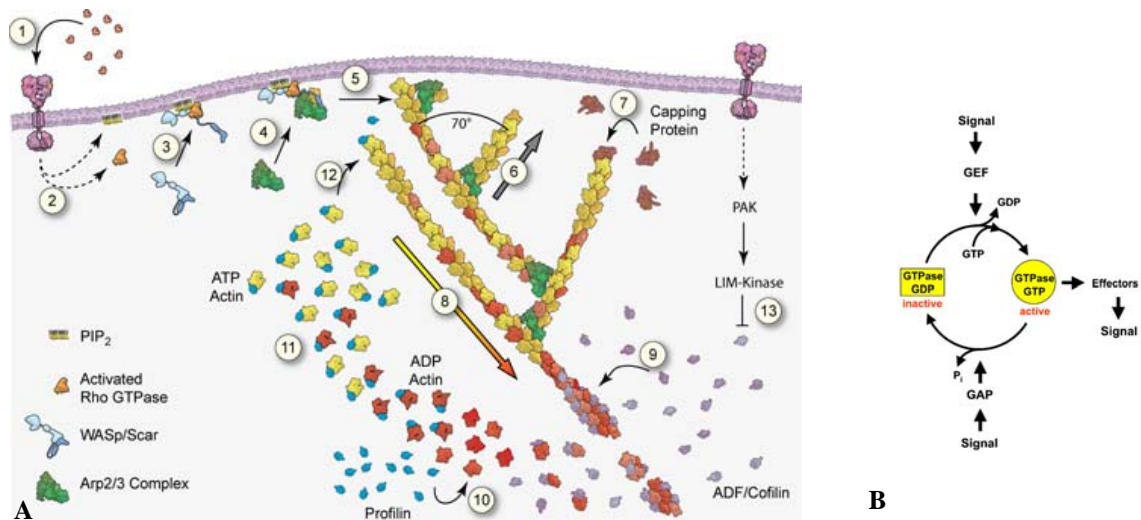


Abbildung 1.9: Zusammenspiel von Mikrofilamenten und seinen Hilfsproteinen

A: 1) Extrazelluläre Stimuli aktivieren RhoGTPasen 2) aktivierte RhoGTPasen binden an PIP₂ und 3) WASp-Proteine werden rekrutiert. 4) Aktivierung von WASp-Proteinen führt zur Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes. 5) Dieser lagert sich an das Aktin-Polymer an und führt so zu neuen, freien Enden, die im Winkel von 70° polymerisiert werden können. 6) Diese Filamente wachsen schnell und drücken die Membran vorwärts. 7) Capping-Proteine können das Wachstum an den freien Enden beenden. 8) Fortwährend kommt es im Mikrofilament zur ATP-Hydrolyse und P_i-Dissoziation. 9) ADF/Cofiline binden an polymeres Aktin und destabilisieren dadurch die Aktinfilamente. 10) Profilin bindet an ADP-Aktin 11) und katalysiert den Nukleotid-Austausch zu ATP. 12) Dieses kann nachfolgend am Plus-Ende des Mikrofilaments eingebaut werden. 13) LIM-Kinasen, welche durch PAKs aktiviert werden, hemmen durch Phosphorylierung Cofilin, welches dann nicht mehr destabilisierend wirken kann. (Pollard et al., 2000)

B: Aktivierung und Inaktivierung von GTPasen mit Hilfe von Guanidin-Austauschfaktoren (GEF) und GTPase-Aktivierungsfaktoren (GAP) (Wiesmuller und Wittinghofer, 1994)

Ohne die hier genannten Hilfsproteine könnte das Zytoskelett der Zelle nicht aufrecht gehalten werden. Zusätzlich ist die Zusammenarbeit aller Komponenten entscheidend für die Entwicklung und Aktivität von Neuronen.

1.3.2 ARHGEF7 und seine Bedeutung für das Aktin-Zytoskelett der Zelle

Der Guanidin-Austauschfaktor ARHGEF7 (rho guanine nucleotide exchange factor 7) ist auch unter dem Namen βPIX (PAK [p21-activated kinase]-interacting exchange factor) oder COOL-1 (cloned out of library 1) bekannt. Das *ARHGEF7*-Gen ist auf Chromosom 13 lokalisiert (Nagase et al., 1995). Die PIX-Familie beinhaltet zwei Mitglieder: αPIX (ARHGEF6, COOL-2) und βPIX. Der βPIX existiert unter den zwei verschiedenen Isoformen β1PIX und β2PIX, wobei sie sich nur in der Anwesenheit einer C-terminalen coiled-coil-Leucin-Zipper-Domäne (im β1PIX) unterscheiden (siehe Abbildung 1.10) (Koh et al., 2001).

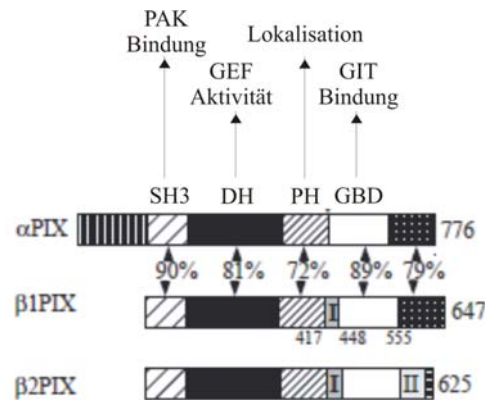


Abbildung 1.10: Domänenstruktur der PIX-Familie

Die PIX-Familie besteht aus den Mitgliedern α PIX und β PIX (Isoformen β 1PIX und β 2PIX). Die Prozentzahlen verdeutlichen die Sequenzhomologie zwischen α PIX und β 1PIX. Abkürzungen der Domänen sind: SH3, Src Homologie-3; DH, Dbl-Homologie-Domäne; PH, Pleckstrin-Homologie-Domäne; GBD, GIT1-Bindedomäne. Die Pfeile verdeutlichen die Funktion dieser Domänen (modifiziert nach (Koh et al., 2001)).

Die SH3 (Src Homologie-3)-Domäne ist ausschlaggebend für die Bindung an PAK1 (p21-activated kinase), wodurch die Translokation des β PIX-PAK1-Komplexes zu den Fokalkontakten induziert wird (Manser et al., 1998). Die PAK-Protein-Familie ist eine zentrale Komponente zytoskelettaler Veränderungen des Neuritenwachstums, hat aber auch Einfluss auf die Stimulation der MAP-Kinasen (Bagrodia und Cerione, 1999). PAKs können LIM-Kinasen phosphorylieren, wodurch diese Cofilin phosphorylieren und damit in seiner destabilisierenden Wirkung auf Aktinpolymere hemmen (Pollard et al., 2000).

Die Lokalisation von ARHGEF7 an der Zellperipherie wird auch durch seine PH (Pleckstrin Homologie)-Domäne ermöglicht (Koh et al., 2001; Whitehead et al., 1997). C-terminal der PH-Domäne folgen eine GIT1-Bindedomäne (GBD) und eine Leucin-Zipper-Domäne. Die GIT1-Bindung an der GBD von ARHGEF7 resultiert in der transienten Lokalisation von PAK zu den Fokalkontakten (Premont et al., 2004). Auch die Homodimerisierung von β PIX über die Leucin-Zipper-Domäne fördert die Lokalisation zu Fokalkontakten (Kim et al., 2001; Koh et al., 2001). Es kann auch eine Heterodimerisierung zwischen β PIX und α PIX erfolgen (Rosenberger et al., 2003). Mutationen in α PIX (ARHGEF6), ebenfalls ein Rac1/CDC42 GEF, werden in Patienten mit X-gekoppelter mentaler Retardierung gefunden (Kutsche et al., 2000).

Die Mutation beeinflusst die Bindung zwischen β PIX und α PIX nicht, führt aber zur Blockade der α PIX-Translokation zur Zellmembran, welches in fehlender Ras1/CDC42-Aktivierung resultiert (Rosenberger et al., 2003). Wird ARHGEF7 in der GBD-Domäne durch FGF2 phosphoryliert, so kommt es zur internen Aktivierung der DH (Dbl Homologie)-Domäne (Shin et al., 2004). Diese Domäne ist entscheidend für die GEF-Aktivität des ARHGEF7 gegenüber CDC42 und Rac1 (Shin et al., 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Expression eines mutierten ARHGEF7, welchem die GEF Aktivität fehlt, zur Rückbildung vorhandener Neuriten führte (Shin et al., 2004).

1.3.3 Das Zytoskelett und seine Funktion in Neuronen

Ein Neuron ist die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems. Es besteht grundsätzlich aus einem Zellkörper, welcher den Zellkern und andere Organellen enthält, und langen Fortsätzen (Neuriten). Die Neuriten können unterteilt werden in Dendriten, welche elektrische Signale empfangen, und ein Axon, welches elektrische Signale überträgt (Abbildung 1.11 A) (Alberts et al., 2004). In Axonen und Dendriten befinden sich alle Komponenten des Zytoskeletts: Mikrotubuli, Aktinfilamente und Intermediärfilamente (Dent et al., 2003).

Die Wachstumskegel (Abbildung 1.11 B) wachsender Neuriten sind reich an Aktinfilamenten. Dabei bilden die meisten Wachstumskegel Filopodien (kleine Zellvorstülpungen mit eng gepackten, parallelen Aktinbündeln) sowie zusätzlich Lamellipodien (stark verzweigtes Aktin-Maschengeflecht) (Dehmelt und Halpain, 2004; Dent et al., 2003).

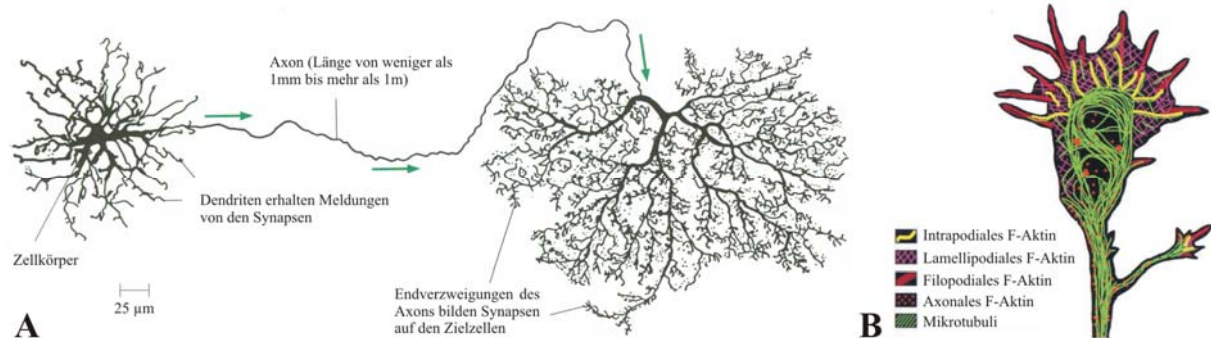


Abbildung 1.11: Aufbau eines Neurons und Zytoskelettkomponenten im Wachstumskegel eines Axons

A: Aufbau eines Neurons mit Dendriten und Endverzweigungen des Axons (Alberts et al., 2004)

B: Komponenten des Zytoskeletts im Wachstumskegel einer Endverzweigung eines Axons

Mikrotubuli (grün) befinden sich im Schaft des Axons, seiner Verzweigung und in der zentralen Region des Wachstumskegels. Es erstreckt sich aber auch in Bereiche der Lamellipodien und Filopodien. Filamentöses (F)-Aktin bildet punktförmige Strukturen entlang des Axon-Schaftes und in der zentralen Region des Wachstumskegels. Es bildet aber ein Geflecht in Lamellipodien und feste Bündel in den Filopodien. Intrapodiales F-Aktin kolokalisiert mit Mikrotubuli, welche von zentral angesiedelten Mikrotubuli ausgehen (Dent et al., 2003).

Beides ist nötig um die Umgebung abzutasten. Die Filopodien reagieren sensibel auf ihre Wegweiser aus der Umgebung. Diese können positiv sein, wodurch die Bindung an den Untergrund länger erhalten bleibt und der Wachstumskegel sich in diese Richtung bewegt. Die Signale können aber auch negativ sein, wodurch der Wachstumskegel an dieser Stelle zusammenbricht. Mikrotubuli verstärken dann die vom aktinreichen Wachstumskegel gefällten Richtungsentscheidungen (Dent und Gertler, 2003). Mikrotubuli und Mikrofilamente sind über verschiedenste Signalmoleküle wie MAPs (Mikrotubuli assoziierte Proteine) oder Plakine direkt und indirekt miteinander verknüpft, so dass sie sich in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen (Dehmelt und Halpain, 2004).

Die Mikrotubuli dienen als Schienen für den Transport von Proteinen, proteinhaltigen Vesikeln, synaptischen Vesikelvorläufern und Mitochondrien, welche im Zellkörper vorhanden sind oder hergestellt werden und an der Synapse oder dem Wachstumskegel gebraucht werden. Für diesen axonalen, anterograden Transport und vermutlich auch für die

genaue Zielerkennung ist die Motorprotein-Familie der Kinesine zuständig (Hirokawa und Noda, 2008).

Für den retrograden, axonalen Transport, also den Transport zum Zellkörper hin, ist eine andere Proteinfamilie zuständig, die Dyneine. Sie gewährleisten, dass alte Bausteine zum Recycling über das gleiche Mikrotubuli-Schienensystem wieder in den Zellkörper transportiert werden (He et al., 2005). Aber auch Aktinfilamente und Intermediärfilamente sind für die Funktionstüchtigkeit des Axons nötig. Die Intermediärfilamente geben dem Axon strukturellen Halt. Die Aktinfilamente geben ebenfalls Halt, indem sie den Bereich unter der Plasmamembran des Axons auskleiden (Alberts et al., 2004). Zusätzlich unterstützen die Motorproteine der Aktinfilamente wie Myosin V und VI den Materialtransport auf den Aktinfilamenten und spielen eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Vesikeln an präsynaptischen Endigungen (Cingolani und Goda, 2008; Dehmelt und Halpain, 2004; Ishikawa und Kohama, 2007).

1.3.4 Zytoskelettkomponenten und ihr Einfluss auf neuronale Degeneration

Das Zytoskelett ist eine der wichtigsten Komponenten zur Ausbildung von Neuronen. Die akkurate Ausbildung und Funktion des Zytoskeletts ist abhängig von vielen Hilfsproteinen. Unter ihnen ist Tau, welches über seine Bindung an Mikrotubuli für deren Zusammenbau sowie ihre Stabilität verantwortlich ist. Kommt es zu einer Hyperphosphorylierung von Tau, so kann es keine Bindung mit Mikrotubuli eingehen. Es kommt zu einer Akkumulation von Tau in neurofibrillären Tangles, welches ein Hauptmerkmal der häufigsten neurodegenerativen Krankheit Alzheimer ist (Goedert, 1999).

Aber auch bei der zweithäufigsten neurodegenerativen Erkrankung Parkinson sind die Pathogenesemechanismen an das Zytoskelett geknüpft. So werden abnormale Polypeptide, welche der proteasomalen Degradation entgehen und im Zytosol aggregieren könnten, über Mikrotubuli zum Aggresom transportiert (Zaarur et al., 2008). Betrachtet man das PS-auslösende Toxin Rotenon, so führt dieses zur Depolymerisierung der Mikrotubuli. Damit einher geht der Verlust des vesikulären Transports entlang der Axone dopaminerger Neuronen. Die Vesikel verbleiben damit im Zellkörper des Neurons, wo es zur Freisetzung von Dopamin kommen kann. Damit steigt der Dopamingehalt im Zytosol dopaminerger Neuronen, wodurch vermehrt oxidativer Stress und dadurch Zelltod auftritt (Feng, 2006).

Das mit dem genetischen PS assoziierte Protein Parkin kann auf zwei Wegen das Zytoskelett beeinflussen. Zum einen kann es mit der LIM-Kinase 1 interagieren und sie ubiquitinylieren. Dies reduziert ihre Fähigkeit Cofiline zu phosphorylieren (Lim et al., 2007). Damit können Aktinfilamente durch Cofiline wieder destabilisiert und depolymerisiert werden (Pollard et al., 2000).

Die zweite Einflussmöglichkeit von Parkin auf das Zytoskelett liegt in seiner Interaktion mit Mikrotubuli, wodurch diese stabilisiert werden (Feng, 2006). Auch LRRK2 kann mit seiner Roc-Domäne an Mikrotubuli binden (Gandhi et al., 2008). Welche Auswirkungen dies auf die Struktur der Mikrotubuli oder den vesikulären Transport auf den Mikrotubuli hat, ist noch unklar.

In weiteren Studien konnte der Einfluss der Kinase-Aktivität von LRRK2 auf die Neuritenlänge und die Verzweigungsvielfalt sowie auf die Bildung von Zelltod-auslösenden Phospho-Tau-positiven Einschlusskörperchen verdeutlicht werden (MacLeod et al., 2006). Die direkte Korrelation zwischen dem Einfluss von LRRK2 auf das Zytoskelett und seinem Einfluss auf neurodegenerative Prozesse wurde bisher noch nicht gezeigt und die molekularen Grundsätze bei beiden Prozessen sind noch weitgehend unbekannt.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Aufklärung der biologischen Funktionen von LRRK2 ist für die Analyse der Pathogenese des Parkinson-Syndroms (PS) von entscheidender Bedeutung.

In dieser Arbeit soll mit Hilfe eines Zellkulturmodells und eines Mausmodells die biologische Funktion von LRRK2 analysiert werden. Dabei liegt in beiden Modellen sowohl das Expressions- als auch das Proteinniveau von LRRK2 reduziert vor („Knockdown“), um die Auswirkungen des Verlustes dieses Parkinson-assoziierten Proteins auf zelluläre Signalwege zu charakterisieren.

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung des Transkriptoms des humanen sowie des murinen LRRK2-Knockdown-Modells mit Hilfe gesamtgenomischer Expressionsanalysen. Diese Analyse der LRRK2-Knockdown-Modelle soll folgende drei Fragestellungen beantworten:

- (i) Welchen Einfluss hat der Verlust von LRRK2 auf Apoptoseprozesse in der Zelle?
- (ii) Gibt es funktionelle Gemeinsamkeiten in den beeinflussten Signalkaskaden des Knockdowns von LRRK2 und dem Knockdown des ebenso wichtigen Parkinson-Syndrom-assoziierten Gens Alpha-Synuklein?
- (iii) Wird das Zytoskelett der Zelle durch die LRRK2-Reduktion beeinflusst und enthalten die dabei identifizierten Hauptsignalkaskaden Proteine, welche mit LRRK2 interagieren?

Die Basis zur Beantwortung dieser drei Fragestellungen ist das humane dopaminerge Neuroblastom-Zellkulturmodell, bei welchem LRRK2 durch RNA-Interferenz reduziert vorliegt. Dieses Modell wird durch eine gesamtgenomische Expressionsanalyse charakterisiert.

Zur Aufklärung der Fragestellung (i) werden die differentiell regulierten Transkripte der gesamtgenomischen Expressionsanalyse mit Einfluss auf Apoptosesignalkaskaden detailliert betrachtet. Um aufzuklären, ob der Verlust von LRRK2 die Apoptose humaner, dopaminerge Zellen verändert, kommt zusätzlich eine Analyse der Apoptoserate zum Einsatz. Die Applikation von Apoptose-induzierenden Toxinen auf diese LRRK2-defizienten Zellen und die Expressionsbestimmung von Transkripten von zugrunde liegenden Signalkaskaden weitet diese Analyse aus. Der Einfluss des LRRK2-Verlustes auf Apoptoseprozesse in komplexen neuronalen Zellverbänden wird mit Hilfe des gesamtgenomischen Expressionsprofils des murinen LRRK2-Knockdown-Modells diskutiert und vergleichend zum humanen Modell betrachtet.

Das neuropathologische Hauptmerkmal des PS ist die Akkumulation von Alpha-Synuklein in Lewy-Körperchen. Auch bei dem familiären LRRK2-assoziierten Parkinson-Syndrom finden sich diese Alpha-Synuklein-positiven Lewy-Körperchen. Unter der Fragestellung (ii) wird die gesamtgenomische Analyse der Alpha-Synuklein-Reduktion in humanen dopaminergen Neuroblastomzellen (Habig et al., 2009) mit der gesamtgenomischen Reaktion der Zelle verglichen, die auf eine Reduktion von LRRK2 erfolgt. Mit Hilfe dieser Betrachtung könnten gemeinsame Regulationskaskaden identifiziert werden, welche zur Pathogenese des PS beitragen.

Die Charakterisierung des LRRK2-Einflusses auf zytoskelettäre Signalkaskaden ist Thema der Fragestellung (iii). Die Betrachtung der differentiell regulierten Transkripte des gesamtgenomischen Expressionsprofils des humanen Modells mit Einfluss in diese Signalkaskaden wird als Ausgangspunkt für *in vitro* Interaktionsanalysen mit LRRK2 genutzt. Zusätzlich wird analysiert, ob pathogene Mutationen im LRRK2 die Bindung zu dessen Interaktionspartnern verändern. Auch wird betrachtet, ob die bisher bekannten Funktionen von LRRK2 durch den Interaktor modifiziert werden können. Da zytoskelettäre Prozesse vor allem in komplexen Zellverbänden von entscheidender Bedeutung sind, findet auch ein Vergleich mit dem murinen LRRK2-Knockdown-Modell unter dem Zytoskelett Gesichtspunkt statt.

Über den Ansatz der Reduktion von LRRK2 in zwei Modellen hat diese Arbeit das Ziel, die biologischen Regelkreise, in welche LRRK2 eingreift, aufzudecken und den Einfluss von LRRK2 auf diese näher zu charakterisieren. Die daraus abgeleitete Interaktionspartnersuche wird helfen, seine biologische Relevanz und damit seine Funktion in der Entwicklung des genetisch und des nicht genetisch bedingten PS näher zu beleuchten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

In dieser Arbeit kommen zwei humane Zelllinien zum Einsatz. Zum Ersten die dopaminerge, humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, welche eine klonale Sublinie der Neuroepithelzelllinie SK-N-SH ist. Zum Zweiten die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293. Für die Kultivierung dieser Zellen wird folgendes Kulturmedium verwendet, wobei alle Bestandteile von der Firma GIBCO™ Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D) sind.

SH-SY5Y Kulturmedium = D-MEM (+4500 mg/l Glucose, +GlutaMAX™, -Pyruvat)
15% Fötale Kälber Serum (FCS)
1% Penicillin-Streptomycin-Lösung

HEK-293 Kulturmedium = D-MEM (+4500 mg/l Glucose, +GlutaMAX™, -Pyruvat)
10% Fötale Kälber Serum (FCS)
1% Penicillin-Streptomycin-Lösung

2.1.2 LRRK2-Knockdown Mäuse

Die LRRK2-Knockdown Tiere wurden von der Arbeitsgruppe D. Vogt-Weisenhorn, W. Wurst und F. Giesert generiert (Hitz et al., 2009) und von Dr. S. Biskup genotypisiert. Für die Mikroarray-Analysen kamen sowohl 3 Wildtyp Tiere der Linie C57/Bl6 (Jackson Laboratories) als auch 3 homozygote LRRK2-Knockdown Tiere zum Einsatz. Diese waren Geschwistertiere und zum Zeitpunkt der Gehirnentnahme 7 Tage alt.

2.1.3 Software und Internetressourcen

Für alle Analysen wurden die zugrunde liegenden Sequenzinformationen aus dem ENSEMBL Human Genome Browser gewonnen. Die Tabelle 2.1 beinhaltet die benutzten Programme und Internetressourcen.

Tabelle 2.1: Software und Internetressourcen

Software	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer-BioSizing Version B.02.03.SI307	Agilent Technologies, Inc., USA
AlphaEaseFC™ Software Version 4.0.1	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
ArrayAssist 4.0	Stratagene, La Jolla, USA
BeadScan-Software Version 3.5.49.29917	Illumina, San Diego, USA
BeadStudio Version 3.1.3.0	Illumina, San Diego, USA
BiblioSphere PathwayEdition	Genomatix Software GmbH, München, D
GeneChip Operating Software Version 1.2.0.037	Affymetrix, Inc., USA
KC4 Version 3.2	Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D
LightCycler Software 480 release 1.5.0.SP1	Roche Diagnostics GmbH, Hamburg, D
ND-1000 Version 3.6.0	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
qBase v1.2.2	Center for Medical Genetics, Ghent, B

Internetressourcen	Internetseite
Bioconductor	http://www.bioconductor.org
Ingenuity Pathways Analysis Software	http://www.ingenuity.com
NCBI-Datenbank-Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
NCBI-Datenbank-Veröffentlichungen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed
NEB, Pufferbestimmung des Doppelverdaus mit Restriktionsenzymen	http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp?
NETAFFX	https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
REST Version 2	http://www.wzw.tum.de/gene-quantification

2.1.4 Oligonukleotide

Die genutzten Oligonukleotide zur Validierung des LRRK2 RNAi Experimentes sind im Material und Methoden Teil von Häbig et al. veröffentlicht (Häbig et al., 2008). Ebenso sind in dieser Publikation die dabei zum Einsatz gekommenen siRNAs aufgeführt.

Die für den Knockdown von ARHGEF7 genutzte Zielsequenz der siRNA ist siARHGEF7 CAAGCGCAAACCTGAACGGAA. Alle verwendeten siRNAs wurden von der Firma Qiagen GmbH (Hilden, D) synthetisiert.

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried, D) synthetisiert und in einer Konzentration von 100 µM geliefert. Diese Oligonukleotide wurden zu je 5 µM verdünnt. Zusätzlich wurden einige Transkriptspezifische Oligonukleotide für die qRT-PCR der Firma Qiagen genutzt und nach Herstellerangaben in die qRT-PCR eingesetzt (Bestellnummer in der Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Oligonukleotide zur Messung der Expression von Transkripten der Apoptose-Signalkaskade

Gen Symbol	Sequenz vorwärts 5'-3'	Sequenz rückwärts 5'-3'
ARHGEF7	CCAGCAAATGCTCGTACAGT	TCACTGCAGAAGGGTGATTG
ACTB	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
CASP3	AGCGAATCAATGGACTCTG	GTTTGCTGCATCGACATCTG
CDC42	QT00066528	
CYCS	AATTGGCCACTGCCTTATTT	TTCATGATCTGAATTCTGGTGT
DDIT3	AGCGACAGAGCCAAAATCAG	TGCTTTCAGGTGTGGTGATG
FGF2	QT00047579	
HSPA5	AAACCGCTGAGGCTTATTTG	AGTTCAGCGTCTTTGGTTG
MAPK14	GCTGTGAATGAAGACTGTGAGC	GCCACGTAGCCTGTCATTC
MAPK8	QT01149512	
MDM2	GGCAGGGGAGAGTGATACAG	TGTTGCAATGTGATGGAAGG
TP53	AGGCCTTGGAACCTCAAGGAT	ACTGACCCTTTTGGACTTCAG

Für die Klonierung wurden die in Tabelle 2.3 aufgelisteten Oligonukleotide und Enzyme genutzt.

Tabelle 2.3: Oligonukleotide zur Klonierung

Gen Symbol	Ensembl Transkript ID	Sequenz vorwärts 5'-3'	Enzym-schnitt-stelle	Sequenz rückwärts 5'-3'	Enzym-schnitt-stelle	Zielvektor
ACTB	ENST00000331789	CGCGGATCCAT GGATGATGATA TCGCCG	BamHI	TACCGCTCGAG AAGAAGCATT GCGGTGGAC	XhoI	pcDNA3.1 V5HisB
ACTB	ENST00000331789	CTCGCTCGCCC AATGGATGATG ATATCGCCG	LIC	CTGGTTCGGCC CAGAAGCATT GCGGTGGAC	LIC	pCMV_L_ VC
ARHGEF7	ENST000000317133	CGCGGATCCAT GAATCCGCCG AGCAA	BamHI	TCGAGCGGCCG CAGTTCTGGTG AGAGATATAT	NotI	pcDNA3.1 V5HisB
ARHGEF7	ENST000000317133	CTCGCTCGCCC AATGAATCCG CCGAGCAA	LIC	CTGGTTCGGCC CAGTTCTGGTG AGAGATATAT	LIC	pCMV_L_ VC
CDC42	ENST00000315554	CGCGGATCCAT GCAGACAATTA AGTGTG	BamHI	TACCGCTCGAG AAGAATATACA GCACTTCCTTT	XhoI	pcDNA3.1 V5HisB
CDC42	ENST00000315554	CTCGCTCGCCC AATGCAGACAA TTAAGTGTG	LIC	CTGGTTCGGCC CAGAATATACA GCACTTCCTTT	LIC	pCMV_L_ VC
Roc-COR-PK	ENST00000298910, in pCMV_XL4 Park8	GGGGATCCGTG CCTTATAACCG AATGA	BamHI	TACCGCTCGAG TTAAGGTAATA AAATGCGTCTC G	XhoI	pcDNA3.1 6xmyc
Roc-COR-PK	ENST00000298910, in pCMV_XL4 Park8	CTCGCTCGCCC AATGGTGCCTT ATAACCGAATG AA	LIC	CTGGTTCGGCC CAAGGTAATAA AATGCGTCTCG	LIC	pCMV_L_ VN
LRRK2 FULL	ENST00000298910, in pCMV_XL4 Park8	GGGGATCC GCTAGTGGCAG CTGTCA	BamHI	TACCGCTCGAG TACTCAACAG ATGTTCTGTCTC	XhoI	pcDNA3.1 6xmyc

Für die *In Vitro* Mutagenese kamen die Oligonukleotide aus Tabelle 2.4 zum Einsatz.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide zur *In Vitro* Mutagenese

(AS= Aminosäure, Bp= Basenpaar)

Originalvektor	AS-Austausch	Bp-Austausch	Sequenz vorwärts 5'-3'	Sequenz rückwärts 5'-3'
pCMV_L_VC_ARHGEF7_V5	L386R	CTG→CGG	GAT AAA TAC CCT ACG CGG CTC AAA GAG CTC GAG A	TCTCGAGCTCTTTGAGCCG CGTAGGGTATTATC
pCMV_L_VC_ARHGEF7_V5_L386R	L387S	CTC→TCC	GAT AAA TAC CCT ACG CGG TCC AAA GAG CTC GAG AGA CA	TGTCTCTCGAGCTCTTTGG ACCGCGTAGGGTATTATC
pCMV_L_VN_Roc-COR-PK	G2019S	GGC→AGC	AAAGATTGCTGACTACAGCATTG CTCAGTACTGCTG	CAGCAGTACTGAGCAATGC TGTAGTCAGCAATCTTT
pCMV_L_VN_Roc-COR-PK	K1906M	AAG→ATG	TGAAGGAGAAGAAGTGGCTGTGA TGATTTTAAATAAACATACATCA	TGATGTATGTTTATTAATAA ATCATCACAGCCACTTCTT CTCCTTCA
pCMV_L_VN_Roc-COR-PK	R1441C	CGC→TGC	CTTCAATATAAAGGCTTGCCTTC TTCTCCCTG	CAGGGGAAGAAGAAGCGC AAGCCTTATATTGAAG

Für die Kontrolle der generierten Konstrukte wurden für die Sequenzierung die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Oligonukleotide benutzt.

Tabelle 2.5: Oligonukleotide zur Sequenzierung

Gen Symbol	Sequenz 5'-3'
ARHGEF7	CTTTGCACACTCGGACTTCA / CCATTGCAGACCAGTGAGAA / AGTCCGGAAGAGGAAAGAGC / GCACACCACCATCAACTGG
ACTB	GGCATCCTCACCTGAAGTA / GCTATCCCTGTACGCCTCTG
LRRK2	CCCAGGATGTTGGAATGAT / TGAGTGGCAATGTCAGGTGT / CCCAGCTCATAGGGAAGTGA / CAGTGTTC AAGAATGATATTCACAA / GGCGCTTCGAGCTATTTTAC / AGCAATCCTCAAATTGTCAGC / TGTGGCCAACAATAGCATT / TTGCAAAGACATTCCAATTCC / CATTGGACCCTCAGTGGTTT / CGCACACTGGAAATCTTTGA / AGTGCCACAGTTGGCATAGA / TCGGAAAACCATCATAAACG / TTTCCAAAGAACTACATGTCACAG / AAGAATGGTTTCCTGGGTTG / CCACCACCCAGTTTGATA / GGGTTTGAAGTTTCCAAATGA / GTGTCTGGGACACAGTCTGG / CCCTGTTGTGGAAGTGTGG / TGGAATCACTGAAAGCTGCAT / GCAACTTCCTCAGAAGTGTATCC / TTCCTCTGGCAACTTCAGGT / CAGCCACTTCTTCTCCTTCA / GCCTTGTCGCAATACATTC / TACAAAGCCACTTGGGTTCC / ATGTGTGCCAACGAGAATCA / CCCATTTCATTGGGAAAG / TCCACTTTAGGACAAGCCTCA / GCTCCAGCTTTTCAAGATGC / GCCTGAGGCTGTTCTTCTT / AGCATTCAACCATGATGCTG / AGCACCTTCAGGGATAACA / TCCAAAACATT CAGGTGTATTCC / GCACAGCTTTCACCACAAAC / TTCATCCAGTATCAGCAAGGTG
pcDNA3.1	TAATACGACTCACTATAGGG / TAGAAGGCACAGTCGAGG
pCMV_L_VC	CACCTTGATGCCGTTCTTCTGC
pCMV_L_VC/VN	AATTAACCCCTACTAAAGGG
pCMV_L_VN	TGAACAGCTCCTCGCCCTTGC

Für die Validierung des murinen LRRK2-Mikroarray-Experimentes wurden für die Messung der Referenzgene die in Tabelle 2.6 aufgelisteten Oligonukleotide genutzt und für die Messung der Zielgene die in Tabelle 2.7 aufgelisteten Oligonukleotide benötigt.

Tabelle 2.6: Oligonukleotide zur Messung der murinen Referenzgene

Gen Symbol	Sequenz vorwärts 5'-3'	Sequenz rückwärts 5'-3'
PDHB	GTAGAGGACACGGCAAGAT	TGAAAACGCCTCTTCAGCA
HMBS	AAAGTTCCCAACCTGGAAT	CCAGGACAATGGCACTGAAT
SDHA	GCAGCACAGGGAGGTATCA	CTCAACCACAGAGGCAGGA
TBP	TCTATTTTGGAAAGAGCAACAAAGAC	GAGGCTGCTGCAGTTGCTA

Tabelle 2.7: Oligonukleotide zur Validierung des mLRRK2-Mikroarray-Experimentes

Gen Symbol	Sequenz vorwärts 5'-3'	Sequenz rückwärts 5'-3'
APOA2	CACCATCTGTAGCCTGGAAG	TGCTCGTGTGCTTCTCAAAG
BAI1	TTCCAGATCCTCTTCGCTGT	TCTACCACACGGCACTTCAC
CACNA1C	ATTCGACGTGAAGGCACTG	GAGCACAAGAAGGGCAATGT
CHL1	TTATCCTGGGGCCTTCCTAA	CGTTGATTTCAATTAACCTCCAA
IGF1	TGGATGCTCTCAGTTCGTG	CACAATGCCTGTCTGAGGTG
KRAS	AGAGCGCCTTGACGATACA	TGCTGTGTCGAGAATATCCAA
PCDH21	CACAGACCGTCTGAATGAA	CAATGTCTGCTGTGGAAGTGA
PFN2	ATGGACATCCGGACAAAGAG	CTCCATGGACCCCTTCTTTT
RHOV	TCGGCCTACAGCACTAGACA	CGGGTAGCAGAGAGAACGAA
STXBP2	GGTCCCCAGTCATCAAGG	CAGCTTTGTTTTTGTGCCAGT

2.1.5 Vektoren

Bei der Klonierung kamen die in Tabelle 2.8 aufgelisteten Ausgangsvektoren zum Einsatz.

Tabelle 2.8: verwendete Vektoren

Vektor	zur Verfügung gestellt von
pcDNA3.1 6xmyc	Dr. Frank P. Marx, Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen
pcDNA3.1 V5HisB	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
pCMV_L_VC	Dr. Michael Walter, Medizinische Genetik, Tübingen
pCMV_L_VN	Dr. Michael Walter, Medizinische Genetik, Tübingen
pCMV6-XL4 Park8	OriGene, Rockville, USA
pCMV_LRRK2_T1348N_Flag	Dr. Christian Klein, Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen

2.1.6 Größenstandards

Es wurden für die Analysen folgende Größenstandards verwendet.

100 bp DNA-Leiter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
1kb DNA-Leiter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

2.1.7 Enzyme

Die Untersuchungen erforderten die hier aufgelisteten Enzyme.

BioTherm™ DNA Polymerase 1000 U 5 U/μl	GeneCraft, Münster, D
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Hamburg, D
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main, D
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Promega GmbH, Mannheim, D
T4 DNA Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. Main, D

2.1.8 Antikörper

Die in Tabelle 2.9 aufgelisteten Antikörper wurden genutzt. Vor der Verwendung der primären Antikörper für die immunologische Detektion wurde, wie in der Tabelle angegeben, entweder Slimfast (SF) oder Naturaflor (NF) Blockierungslösung eingesetzt. Nutzt man die primären Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen, so wird 10% normales Eselserum (NDS) in PBS als Blockierungslösung verwendet.

Tabelle 2.9: Primäre und Sekundäre Antikörper

(WB= Western Transfer [Blot], IF= Immunfluoreszenzanalyse, SF= Slimfast, NF= Naturaflo)

Primäre Antikörper				
Name	Blockierungs- lösung WB	Konzentration WB	Konzentration IF	Firma
Anti-LRRK2 (NB300-267) Novus Biologicals	5% SF in TBS	1:1000	1:200	Biologicals, Littleton, USA
anti-V5 Antibody rabbit V8137	5% SF in TBS	1:5000	-	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
anti-c-Myc (9E10): sc-40	5% NF in TBST	1:200	-	Santa Cruz Biotechnology inc, Heidelberg, D
Anti-β-Actin mouse-monoklonal (Clone AC15)	5% NF in TBST	1:10000	1:5000	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
mouse polyclonal ARHGEF7 H00008874-A01	5% SF in TBS	1:1000	1:100	Novus Biologicals, LLC, Littleton, USA
CDC42 antibody [M152], ab41429	5% NF in TBST	1:500	1:100	Abcam plc, Cambridge, GB
Anti-α-Tubulin Mouse mAb (DM1A)	5% NF in TBST	1:3000	1:40	Merck KGaA, Darmstadt, D
Anti-Streptavidin antibody (goat), biotinylated	-	-	-	Vector Laboratories, Peterborough, GB
Sekundäre Antikörper				
Name	Konzentration WB	Konzentration IF	Firma / Referenz	
ECL Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab (from sheep)	1:3000	-	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB	
ECL Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab') ₂ Fragment (from donkey)	1:3000	-	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB	
Anti-mouse-cy3 (from donkey)	-	1:500	Jackson laboratories, Hamburg, D	
Anti-rabbit-cy2 (from donkey)	-	1:300	Jackson laboratories, Hamburg, D	

2.1.9 Gebrauchsfertige Reaktionslösungen

Die in Tabelle 2.10 aufgeführten gebrauchsfertigen Reaktionslösungen (Kits) wurden für die Analysen benötigt.

Tabelle 2.10: Gebrauchsfertige Reaktionslösungen

Name des Kits	Firma
Cell Line Nucleofector Solution V	Amaxa GmbH, Köln, D
CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Beckman-Coulter GmbH, Unterschleißheim, D
ECL WesternBlotting Detection System	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB
ECLplus WesternBlotting Detection System	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB
GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit	Affymetrix, Inc., USA
GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, Inc., USA
GeneChip® Expression 3` Amplification Reagents for IVT Labeling	Affymetrix, Inc., USA
GeneChip® Expression 3` Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit	Affymetrix, Inc., USA

GeneChip® Sample Cleanup Module	Affymetrix, Inc., USA
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Lipofectamine™2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
miRNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Plasmid Wizard Plus SV Miniprep-Kit	Promega GmbH, Mannheim, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
QIAshredder™	Qiagen GmbH, Hilden, D
QuantiTect ReverseTranscription Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNA6000 Nano Reagents&Supplies	Agilent Technologies, Inc., USA
RNA6000 Pico Reagents&Supplies	Agilent Technologies, Inc., USA
RNeasy Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Whole Genome Expression Kit, 8-sample format	Illumina, San Diego, USA

2.1.10 Chemikalien

Die in Tabelle 2.11 dargestellte Liste umfasst die für die Untersuchungen erforderlichen Chemikalien.

Tabelle 2.11: Chemikalienverzeichnis

Chemikalienbezeichnung	Firma
29:1 Acrylamid; N,N'-Methylen-Bisacrylamid	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
5x first strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Ampicilin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Ampuwa	Fresenius Kabi, BadHomburg, D
Anti-c-Myc Agarose Affinity Gel antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Anti-V5 Agarose Affinity Gel antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Bacto™ Agar	Merck KGaA, Darmstadt, D
BioTherm™ 10x buffer	GeneCraft, Münster, D
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
BSA (100x BSA 10 mg/ml)	New England Biolabs GmbH, München, D
CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Complete Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Dabco	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
dATP Solution 25 µmol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
dCTP Solution 25 µmol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Developer G135	Agfa-Gaevent NV, Mortsel, B
Diethyl pyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
D-MEM, +4500mg/l Glucose, +GlutaMAX™, -Pyruvat	GIBCO™ Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

MATERIAL UND METHODEN

dNTP Solution 25µmol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
D-PBS, -CaCl ₂ , -MgCl ₂	GIBCO™Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid 1%	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Foetal Bovine Serum (FCS)	GIBCO™Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Gamma-aminohexyl-GTP-Sepharose	Jena Bioscience GmbH, Jena, D
Guanosine 5'-diphosphate sodium salt (GDP)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate (GTP)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Glycogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magermilchpulver Naturaflo	Töpfer GmbH, Dietmannsried, D
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
MgCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Mowiol 4-88	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaOAcetat	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaOH	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Normales Eselserum (normal donkey serum)	Dianova GmbH, Hamburg, D
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin-Loesung (10000:10000)	GIBCO™Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phosphate buffered saline (PBS)	GIBCO™Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Poly-L-Lysin 0,01% solution	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Rapidfixer G354	Agfa-Gaevent NV, Mortsel, B
Retinolsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
RNase free Water	Affymetrix, Inc., USA
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Slim Fast Milchshake Pulver Vanille	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
TritonX-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Trizma®base	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Trypsin-EDTA (1x), 0,25% Trypsin	GIBCO™Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Tween20	Merck KGaA, Darmstadt, D

2.1.10.1 Toxine

Für funktionelle Analysen kamen die in Tabelle 2.12 beschriebenen Toxine mit den aufgelisteten Konzentrationen und Inkubationszeiten zum Einsatz.

Tabelle 2.12: Toxinverzeichnis

Toxin	Konzentration	Inkubation	Wirkung
6-OH-DA	100 µM	4 h	Durch extrazelluläre Auto-Oxidation werden oxidative Produkte freigesetzt, welche oxidativen Stress auslösen (Hanrott et al., 2006)
Cytochalasin D	1 µM	24 h	Inhibition der Aktinpolymerisierung und Zerstörung von Aktinfilamenten (Cooper, 1987)
H ₂ O ₂	250 µM	4 h	Induktion von oxidativem Stress
MG132	3 µM	24 h	Membran-permeabler Proteasom Inhibitor (Lee und Goldberg, 1998)
Nocodazole	1 µM	24 h	Depolymerisierung von Mikrotubuli (Barth et al., 2004)
Staurosporin	1 µM	2 h	Inhibitor von Phospholipid/Kalzium abhängigen Kinasen (Tamaoki et al., 1986)
Thapsigargin	0.5 µg/ml	24 h	ER-Stress durch Inhibition von Ca(2+)-ATPasen (Treiman et al., 1998)
Tunicamycin	2 µg/ml	24 h	Inhibition von UDP-N-acetylglucosaminen, welches zur Blockade der N-Glykosylierung von Proteinen führt wodurch ER-Stress ausgelöst wird (Price und Tsvetanova, 2007),

2.1.11 Puffer und Lösungen

Die Analysen wurden mit den nachfolgend zusammengestellten Puffern und Lösungen durchgeführt. Dabei wurden die Lösungen, wenn nicht anders beschrieben, mit ddH₂O angesetzt.

10x Agarose-Blaupuffer	Ficoll TBE Bromphenolblau	8% 1x 0,01%
5x Lämmli-Puffer	Tris-HCL pH 6,8 β-Mercaptoethanol Glycerin SDS Bromphenolblau	62,5 mM 5% 10% 2% 1 Spatelspitze
LB-Agar	Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) Bacto™ Agar Agar-Agar	25 g 7.5 g 7.5 g add 1 l ddH ₂ O
LB-Medium	Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	25 g add 1 l ddH ₂ O
Lysepuffer-G	TritonX-100 frisch versetzt mit Complete Proteaseinhibitor (Roche) und Phosphataseinhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma) nach Herstellerangaben	1% in PBS
Naturaflor Blockierungs-Puffer	Naturaflor TBS-T	5% 1x
NP40-Lysepuffer	NP40 Deoxycholat frisch versetzt mit Complete Proteaseinhibitor (Roche) und Phosphataseinhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma) nach Herstellerangaben	0,50% 0,50% in PBS

MATERIAL UND METHODEN

10x PAGE-Puffer	Glycin	1,92 M
	Tris base	0,25 M
	SDS	1%
RIPA-Lysepuffer (ohne SDS)	NaCl	150 mM
	Tris base pH 7,5	50 mM
	NP-40	1%
	Deoxycholat	0,50%
	frisch versetzt mit Complete Proteaseinhibitor (Roche) und Phosphataseinhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma) nach Herstellerangaben	
SE-Lösung	NaCl	2,5 M
	EDTA	100 mM
SlimFast Blockierungs-Puffer	SlimFast	5%
	TBS	1x
Stripping Puffer	β -Mercaptoethanol	0,70%
	SDS	2%
	Tris-HCl, pH 6,7	62,5 mM
10x TBE	Tris base	0.1 M
	Borsäure	0.1 M
	EDTA, pH 8,0	20 mM
1x TBS	Tris base pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
1x TBS-T	Tris base pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1%
Tfb1	RbCl	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 mM
	Glycerol	10%
	pH 5.8 mit Essigsäure einstellen	
Tfb2	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	75 mM
	Glycerol	10%
	pH 6.8 mit NaOH einstellen	
10x Transferpuffer	Tris base	250 mM
	Glycin	1,92 M
1x Transferpuffer	10x Transferpuffer	10%
	Methanol	20%

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde sowohl mit 6%igen, 8%igen, 10%igen als auch 12%igen Trenngelen durchgeführt. Die Zusammensetzung dieser Gele ist wie folgt:

	6%	8%	10%	12%
ddH ₂ O	2700 µl	2300 µl	2000 µl	1700 µl
29:1 Acrylamid/Bisacrylamid	1000 µl	1300 µl	1700 µl	200 µl
1,5 M Tris base pH 8,8		1300 µl		
10% SDS		50 µl		
10% APS		50 µl		
TEMED		2 µl		

Das Sammelgel war stets 4%ig mit folgender Zusammensetzung:

Sammelgel 4%	29:1 Acrylamid/Bisacrylamid	666 µl
	0,5 M Tris base pH 6,8	1000 µl
	10% SDS	40 µl
	10% APS	40 µl
	TEMED	4 µl
	ddH ₂ O	2300 µl

2.1.12 Geräte

In Tabelle 2.13 sind alle Geräte mit denen gearbeitet wurde aufgeführt.

Tabelle 2.13: Geräteverzeichnis

Gerätename	Firma
Autoklav ELV 5075	Systec, Wetzlar, D
BeadArray Reader GX	Illumina, San Diego, USA
BeadChip® Hybridisierungskammer	Illumina, San Diego, USA
BeadChip® Waschbehälter	Illumina, San Diego, USA
BeadChip® Waschständer	Illumina, San Diego, USA
Binder CB210	Binder, Tuttlinger, D
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Inc., USA
BioPhotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Biostep Transilluminator	biostep Labor- und Systemtechnik GmbH, Jahnsdorf, D
Centrifuge 5415 D	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Centrifuge 5417 R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Centrifuge 5804 R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Concentrator 5301	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Consort E835 Electrophoresis PowerSupply	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
CURIX 60	Agfa-Gevaert NV, Mortsel, B
Elektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Gelkamm für Agarose-Gelelektrophorese	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
GeneChip®Fluidics Station 450	Affymetrix, Inc., USA
GeneChip®Hybridization Oven 640	Affymetrix, Inc., USA
GeneChip®Scanner	Affymetrix, Inc., USA
Glasküvetten	Illumina, San Diego, USA
Heizblock HLC HBT 130	Haep Labor Consult, Bovenden, D
HERA Safe Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
HP Scanjet 3970	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, D
Hybridization Oven	Illumina, San Diego, USA
Laboport Vakuum Pumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg I.Br., D
Laser Scanning Microscope, LSM 510	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, D
LightCycler Centifuge Adapters	Roche Diagnostics GmbH, Hamburg, D
LightCycler®480	Roche Diagnostics GmbH, Hamburg, D
Magnetrührer Heidolph MR3000	Neo Lab, Heidelberg, D
Mikrowelle	LG Electronics Deutschland GmbH, Willich, D
Milli-Q	Millipore GmbH, Eschborn, D

MATERIAL UND METHODEN

Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, D
Multitron II	Infors HT, Bottmingen, CH
NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Nikon Eclipse TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf, D
Nucleofector™	Amaxa GmbH, Köln, D
OLYMPUS Camedia C-5050 Zoom	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Orbitalschüttler 7-0031	neoLab, Heidelberg, D
pH-Meter MP230	Mettler Toledo GmbH, Giessen, D
PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences AG, Chur, CH
PowerPac Basis	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Reasearch Pipette 10	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Reasearch Pipette 100	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Reasearch Pipette 1000	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
REAX control Vortexer	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, D
SERVA Blue Blot WET 100	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG, Schwabach, D
Sirius HT Synergy HT Plate Reader	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D
ThermoStat plus	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Ultra-Thorax	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Waage Precisa XT 6200C-FR	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Wasserbad Hybex™ Microsample Incubator	SciGene, Sunnyvale, USA
Zählkammer Neubauer	Neo Lab, Heidelberg, D

2.1.13 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.14 gibt eine Zusammenfassung über die benötigten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2.14: Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
5 ml Stripette	Corning incorporated, NY, USA
10 ml Stripette	Corning incorporated, NY, USA
25 ml Stripette	Corning incorporated, NY, USA
50 ml Stripette	Corning incorporated, NY, USA
384 PCR Platte	Treff Lab, CH
96 well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
96F Microwell Platte	Nunc, Rosteilde, Dänemark
Absolute QPCR Seal	Abgene House, Surrey, GB
BD Falcon™ Tissue Culture Dish	BD Biosciences, Pharmingen, D
Cell Scraper	Corning incorporated, NY, USA
CELLSTAR® Gewebekulturplatte 24 well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
CELLSTAR® Gewebekulturplatte 6 well	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
CELLSTAR® PP-Test tubes 15 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
CELLSTAR® PP-Test tubes 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Costar® Cell Culture Cluster 12 well	Corning incorporated, NY, USA
Easy Peel	Abgene House, Surrey, GB
Gel-Blotting-Papier	Schleicher&Schnell, Dassel, D
High performance chemiluminescence film	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB
MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChip	Illumina, San Diego, USA
Optitran BA-S83 Reinforced NC	Schleicher&Schnell, Dassel, D
Parafilm	American National Ban, Chicago, USA
Pasteur Capillary pipettes	WM, Mainz, D
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße 2,2 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
RNA6000 Nano LabChip	Agilent Technologies, Inc., USA
RNA6000 Pico LabChip	Agilent Technologies, Inc., USA
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D

SAFESKIN SATIN PLUS	Hakle-Kimberly-Clark GmbH, Mainz, D
Thermo-Fast® 96	Abgene House, Surrey, GB
TipOne®Bevelled Filter Tips	Starlab GmbH, Ahrensburg, D
U133 Plus 2.0 Array	Affymetrix, Inc., USA
UVette 50-200 µl	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Versorgen, Passagieren, Zählen

Die Kultivierung der SH-SY5Y Zelllinie und der HEK-293 Zelllinie erfolgt im Binder CB210 Inkubator bei 37°C und 10% CO₂. Die Zellen wachsen adhärent im jeweiligen Kulturmedium, welches aller 3 Tage gewechselt wird, um die optimale Nährstoffversorgung sicher zu stellen (siehe 2.1). Sowohl HEK-293 als auch SH-SY5Y-Zellen müssen passagiert, d.h. aufgeteilt werden, wenn sie eine 80%ige Konfluenz erreicht haben. Dabei wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgt mittels Trypsinierung. Dazu wird 1,0 ml Trypsin-EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und die Reaktion nach 5 min Inkubation bei 37°C und 10% CO₂ mit 9 ml Medium abgestoppt. Nach Abspülen aller Zellen werden diese in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt. Es werden 10 µl der Zellsuspension entnommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die restliche Zellsuspension wird bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums über dem Pellet, resuspendiert man dieses in 10 ml Medium. Danach werden pro Kulturschale 2x 10⁶ Zellen ausgesät oder die gewünschte Zellzahl in 6-well oder 96-well Platten gegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgt anschließend bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank. Dabei wird das Medium regelmäßig gewechselt bis die Zellen eine Konfluenz erreicht haben, bei welcher sie wieder passagiert werden können.

Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer der Firma Neo Lab ist die Zellzahl einer Lösung bestimmbar. Dazu werden 10 µl der in Lösung befindlichen Zellen unter das Deckglas pipettiert. Anschließend werden 4 Großquadrate (mit jeweils 16 Kleinquadraten) ausgezählt und der Mittelwert gebildet, das heißt die mittlere Zellzahl pro Großquadrat berechnet. Aufgrund des Volumens der Zählkammer berechnet man die Zellzahl pro 1 ml Lösung indem man mit 10⁴ multipliziert.

2.2.1.2 Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen

Die Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen ist für die endogene Immunfluoreszenzanalyse (siehe 2.2.11) nötig. Dafür wird das SH-SY5Y Medium der auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern wachsenden SH-SY5Y-Zellen nach 48 h durch SH-SY5Y Medium mit 10 µM Retinolsäure (als Stocklösung in DMSO gelöst) ersetzt. Diese Konzentration ist optimal für die Induktion der Neuritogenese von SH-SY5Y-Zellen (Encinas et al., 2000). Das Medium wird aller 2 Tage durch neues SH-SY5Y Medium mit Retinolsäure ersetzt. Nach 6 Tagen kann mit der Immunfluoreszenzanalyse begonnen werden.

2.2.2 Klonierung

Die grundsätzlichen Schritte einer Klonierung sind Amplifikation, Restriktionsverdau und Gelextraktion des Inserts. Danach folgt die Vorbereitung des Vektors, welche aus Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Gelextraktion besteht. Anschließend werden eine Ligation und eine Transformation in Bakterien durchgeführt. Die entstandenen Klone werden mit Hilfe der Kolonie-PCR, des Kontrollverdau und der Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.

2.2.2.1 Insert-Vorbereitung

Für die Klonierung der cDNA eines potentiellen LRRK2-Interaktors werden 2 µl cDNA von SH-SY5Y-Zellen als Ausgangsmaterial genutzt (siehe 2.2.7). An dieser wird mit genspezifischen Oligonukleotiden, welche Restriktionsenzymstellen tragen (siehe 2.1.4) eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zur Herstellung von Teilkonstrukten oder Umklonierung von einem Vektor in einen anderen, kamen statt der cDNA 50ng des Ursprungsvektors als PCR-Ausgangsmaterial zum Einsatz. Die Grundsätze der PCR sind von Mullis et al. und Saiki et al. beschrieben und beruhen auf mehreren Zyklen von Denaturierung, Anlagerung und Amplifikation (Mullis et al., 1992; Saiki et al., 1988). Die PCR erfolgt im MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler.

Für jeden PCR-Ansatz wird eine Negativkontrolle (1 µl ddH₂O statt Ausgangsmaterial) analysiert, um Kontaminationen auszuschließen. Für die Klonierung kommt stets die Expand Long Polymerase der Firma Roche mit folgenden Bedingungen zum Einsatz:

Tabelle 2.15: Bedingungen der Klonierungs-PCR

PCR-Ansatz		Programm der PCR-Reaktion		
Inhalt	Menge	Zeit	Temperatur	Zyklen
10x Puffer 3	2,5 µl	5 min	94°C	1
dNTPs (10mM)	1 µl	1 min	94°C	10
Expand Long Polymerase (5U/µl)	0,4 µl	1 min	65-55°C (1°C pro Zyklus)	
Primer vorwärts (5pmol/µl)	1 µl	3 min	72°C	30
Primer rückwärts (5pmol/µl)	1 µl	1 min	94°C	
Template (Ausgangsmaterial)	2 µl	1 min	62°C	
		3 min	72°C	
ddH ₂ O	17,1 µl	10 min	72°C	1
		unendlich	10°C	1

Zu der PCR-Reaktion werden die für die Klonierung notwendigen Restriktionsenzyme sowie der für den Doppelverdau nötige 10xRestriktionspuffer gegeben und der Ansatz 2 h bei 37°C inkubiert (<http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp?>). Nachfolgend wird die komplette PCR-Reaktion mit 10x Agarose-Blaupuffer versetzt und in die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.2.2) eingesetzt.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgt mit 0,8% TBE-Agarose-Gelen unter direkter Ethidiumbromidzugabe im Gel. Ethidiumbromid kann in die DNA interkalieren und wird unter UV-Licht sichtbar. Da die DNA in der Probe durch ihr Phosphatrückgrat negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld zur Anode. Dabei trennen sich aufgrund ihrer Größe die DNA-Fragmente auf (Sharp et al., 2001). Um die Größe der Fragmente bestimmen zu können, wird in einer Geltasche, je nach Größe des zu erwartenden Produktes, der 100 bp oder 1 kb Größenstandard (siehe 2.1.6) mit aufgetrennt. Ist die Elektrophorese beendet, wird das Gel im Biostep Transilluminator unter UV-Licht fotografiert (Olympus Camedia) und mit der ArgusX1 Software am Computer bearbeitet.

Die Gelextraktion der spezifischen Bande wird mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 µl ddH₂O.

2.2.2.3 Vektor-Vorbereitung

Der Zielvektor wird, ebenso wie das Insert, mit 2 Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 2.2.2.1). Dafür wird 1 µg Vektor als Ausgangsmenge in 20 µl Reaktionsvolumen mit dem entsprechenden 10x Restriktionspuffer eingesetzt.

Nach der Restriktions-Inkubationszeit von 2 h wird zu diesem Ansatz 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und 2,2 µl 10x SAP-Puffer gegeben. Diese dephosphoryliert die aufgeschnittenen Enden des Zielvektors, welcher dadurch an der Religation gehindert wird. Nach 45 min bei 37°C und 15 min bei 70°C wird dieser Ansatz mit 10x Agarose-Blaupuffer versetzt und ebenso wie das Insert der Gelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion unterzogen (siehe 2.2.2.2).

2.2.2.4 Ligation

Für die Ligation werden Vektor und Insert im molekularen Verhältnis von 1:3 in den 10 µl Ligationansatz inklusive 1 µl Ligase und 1 µl Ligase-Puffer eingesetzt. Die Ligation erfolgt 16 h bei 12°C mit nachfolgender Inaktivierung bei 65°C für 15 min. Der komplette Ligationansatz wird in die Transformation von kompetenten DH5α-Bakterien eingesetzt (siehe 2.2.2.7).

2.2.2.5 LIC-Klonierung

Die Ligations-unabhängige Klonierung (Ligation independent cloning, LIC) hat den Vorteil, dass der Ligationsschritt der Klonierung gespart werden kann. Die Methode beruht auf der Generierung von einem 11 Nukleotide langen Überhang an den Enden des PCR-Produktes, welche sich komplementär ebenso im vorbereiteten Vektor befinden (Aslanidis und de Jong, 1990; Kaluz und Flint, 1994). Die LIC-Klonierung wird in dieser Arbeit mit den Vektoren pCMV_L_VC (V5 Tag) oder pCMV_L_VN (myc Tag) durchgeführt.

In diesen Vektoren liegt statt der multiplen Klonierungsstelle eine LIC-Klonierungsstelle vor. Diese kann mittig mit Hilfe der SmaI Restriktionsendonuklease aufgeschnitten und der Vektor anschließend aus dem Agarose-Gel aufgereinigt werden (siehe 2.2.2.2). Das PCR-Produkt wird mit LIC-kompatiblen Primern amplifiziert (PCR-Protokoll siehe 2.2.2.1). Diese LIC-Primersequenzen tragen einen 12 nt Überhang (Vorwärtsprimer 5'-3' Sequenz = CTCGCTCGCCCA und Rückwärtsprimer 5'-3' Sequenz CTGGTTCGGCCCA), welche vor der Position 12 kein Adenin enthalten. Nach Aufreinigung des PCR-Produktes aus dem Agarose-Gel (siehe 2.2.2.2) werden 2 Ansätze vorbereitet, welche in Tabelle 2.16 dargestellt sind. Die LIC-Klonierung nutzt die 3'-5' Exonukleaseaktivität der T4 Polymerase, welche so lange diese Aktivität ausübt, bis vorhandene Nukleotide eingebaut werden können.

Tabelle 2.16: Ansätze LIC-Klonierung

Vektor Ansatz		PCR-Produkt Ansatz	
10x T4 DNA Polymerase Puffer	1 µl	10x T4 DNA Polymerase Puffer	1 µl
10x BSA	1 µl	10x BSA	1 µl
25mM dATP	1 µl	25mM dTTP	1 µl
T4 DNA Polymerase	0,2 µl	T4 DNA Polymerase	0,2 µl
Vektor	variabel	PCR-Produkt	variabel
ddH ₂ O	add 10 µl	ddH ₂ O	add 10 µl

Damit entstehen 11 nt lange Überhänge. Gleiches geschieht an der komplementären Sequenz im Vektor. Diese Reaktion wird 30 min bei 12°C durchgeführt. Anschließend stoppt man die Reaktion mit der Zugabe von 2 µl SE-Lösung (siehe 2.1.11) und der Inkubation bei 75°C für 15 min. Nachfolgend wird 1 µl des Vektor Ansatzes zum kompletten PCR-Ansatz gegeben. Hier sollte darauf geachtet werden, dass Vektor und PCR-Produkt nun im molekularen Verhältnis von 1:3 vorliegen. Anschließend wird der Ansatz bei 75°C für 5 min und nachfolgend 1 h bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird der komplette Ansatz in die Hitzeschock Transformation von DH5α-Bakterien eingesetzt (siehe 2.2.2.7).

2.2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter DH5α-Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter DH5α-Bakterien werden als Ausgangskultur DH5α-Bakterien der Firma Invitrogen (Karlsruhe) mit folgenden Eigenschaften genutzt:

DH5α F-φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(rK-mK+)
deoRthi-1supE44 λ- gyrA96 relA1

Mit diesen Bakterien impft man 20 ml LB-Medium an und inkubiert dieses bei 225 rpm und 37°C über Nacht. Diese Zellsuspension wird nachfolgend komplett zu 500 ml LB-Medium in einen 1 l Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kultur inkubiert man anschließend bei 37°C und 225 rpm bis zu einer OD von 0,45. Mit Hilfe von 50 ml Falcon Reaktionsgefäßen wird die komplette Kultur zuerst 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 1500 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird nachfolgend dekantiert und jedes Pellet in 10 ml sterilfiltrierten kalten Tfb1-Puffer (siehe 2.1.11) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 1500 x g und 4°C dekantiert man wiederum den Überstand und jedes Pellet

wird in 4 ml sterilfiltrierten kalten Tfb2-Puffer (siehe 2.1.11) resuspendiert. Anschließend inkubiert man die Zellsuspension 15 min auf Eis und aliquotiert danach je 500 µl Zellen, welche in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

2.2.2.7 Transformation chemisch kompetenter DH5α-Bakterien

Für die Transformation des Ligationsproduktes werden 150 µl kompetente DH5α-Bakterien benötigt, welche mit 10 µl des Ligationsansatzes 30 min auf Eis inkubiert werden. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 42°C für 1 min. Nach 2 min Inkubation auf Eis gibt man zum Transformationsansatz 850 µl LB-Medium hinzu und kultiviert die DH5α-Bakterien bei 37°C und 225 rpm für 45 min. Anschließend werden die Bakterien bei 3000 rpm 30 sec pelletiert und der Überstand dekantiert. Die im Reaktionsgefäß verbleibenden 50 µl Medium nutzt man zum Resuspendieren des Pellets. Die resuspendierten Bakterien werden nachfolgend mit Hilfe von 3-4 Glaskugeln komplett auf vorgewärmte Antibiotikum enthaltene LB-Platten ausplattiert. Diese werden 12-16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zählung und Analyse der gewachsenen Klone über Kolonie-PCR (siehe 2.2.2.8).

2.2.2.8 Kolonie-PCR

Für die erste Analyse korrekt transformierter DH5α-Bakterien wird die Kolonie-PCR durchgeführt. Durch das Erhitzen der PCR-Reaktion bricht die Bakterienzellwand auf und die Plasmid-DNA kann amplifiziert werden. Bei dieser speziellen PCR wird die BioTherm™ DNA Polymerase im in Tabelle 2.17 gezeigten Reaktionsansatz und dem beschriebenen PCR-Programm verwendet.

Tabelle 2.17: Bedingungen der Kolonie-PCR

PCR-Ansatz		Programm der PCR-Reaktion		
Inhalt	Menge	Zeit	Temperatur	Zyklen
10x Puffer	2,5 µl	3 min	94°C	1
dNTPs (10mM)	0,5 µl	30 sec	94°C	35
Taq-Polymerase	0,25 µl	30 sec	58°C	
Primer vorwärts (5pmol/µl)	1 µl	30 sec	72°C	
Primer rückwärts (5pmol/µl)	1 µl	3 min	72°C	1
Ausgangsmaterial	Klon-Material	unendlich	10°C	1
ddH ₂ O	19,75 µl			

Hierbei ist entscheidend Oligonukleotide einzusetzen, welche die vordere oder hintere Ligationsstelle zwischen Vektor und Insert überspannen (siehe 2.1.4).

Statt der DNA wird in den Reaktionsansatz mit einem Zahnstocher direkt Material der Klone als Ausgangsmaterial gegeben. Das restliche Material am Zahnstocher wird nachfolgend auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Diese Platte dient als „backup“-Platte der Klone.

Nach Ablauf der PCR-Reaktion werden zur Detektion der Amplifikation und damit der korrekten Klone 7 µl des PCR-Ansatzes mit 10x Agarose-Blaupuffer versetzt und auf ein Agarose-Gel geladen (siehe 2.2.2.2).

2.2.2.9 Kultivierung von DH5 α -Bakterien

E.coli des DH5 α -Stammes werden in LB-Medium kultiviert. Zu diesem Ansatz werden Antibiotika zur selektiven Anreicherung Vektor enthaltender Stämme gegeben. Für eine Übernachtskultur werden 12,5 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Ampicillin-Stocklösung [1000x]: 100 mg/ml in ddH₂O oder Kanamycin-Stocklösung [1000x]: 25 mg/ml in ddH₂O) und einer geringen Menge der Kultur der „backup“-Platte oder des Glycerolstocks versetzt und für 12-16 h bei 37°C und 250 rpm im 50 ml Falcon inkubiert. Das Anlegen eines Glycerolstocks erfolgt von 800 μ l der gewachsenen Übernachtskultur, zu welcher 200 μ l 86%ige autoklaviertes Glycerol gegeben wird. Dieser Glycerolstock kann bei -80°C gelagert werden.

2.2.2.10 Plasmidpräparation

Die Übernachtskultur kann für eine Mini-Plasmidpräparation mit dem Plasmid Wizard Plus SV Miniprep-Kit von Promega nach Angaben des Herstellers genutzt werden. Die Plasmidpräparation basiert dabei auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und einer DNA-Aufreinigung über eine Anionenaustauscher Matrix. Die Modifikationen am Protokoll sind: (i) Nutzung von 12,5 ml Übernachtskultur, (ii) Erhöhung des Volumens des Resuspensionspuffers auf 500 μ l und die nachfolgende Teilung des Ansatzes auf 2 Reaktionen. Die Plasmide aus beiden Ansätzen werden am Ende des Protokolls mit je 50 μ l ddH₂O eluiert und vereint. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt am BioPhotometer (Eppendorf). Wird eine größere Proteinmenge benötigt, so kommt das High Speed Plasmid Midi Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers zum Einsatz.

2.2.2.11 Kontrollverdau

Der Kontrollverdau von 1 μ g neu hergestelltem Plasmid erfolgt mit Restriktionsenzymen der Firma New England Biolabs und den jeweils dafür angegebenen Puffern unter Zusatz von BSA für 2 h bei 37°C. Es wird stets ein Restriktionsenzym genutzt, welches eine Schnittstelle im Vektor und eine Schnittstelle im Insert hat. Die anschließende Agarose-Gelelektrophorese von 10 μ l des Ansatzes identifiziert die Länge der erhaltenen Fragmente und damit die Korrektheit des klonierten Plasmides.

2.2.2.12 Sequenzierung

Für die Sequenzierungsreaktion wird das 8-Kapillar-Sequenziergerät CEQ 8000 von Beckman Coulter und die von der Firma empfohlenen Fluoreszenzfarbstoffe (Quickstart: CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Beckman-Coulter) verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wird im MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler durchgeführt (siehe Tabelle 2.18). Für den Sequenzieransatz legt man zunächst ddH₂O vor und fügt das Plasmid hinzu. Nachfolgend wird der Ansatz 3 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Anschließend fügt man den Primer (siehe 2.1.4) und den Quickstart Mix hinzu und setzt die Sequenzierungsreaktion fort.

Tabelle 2.18: Sequenzierungsreaktion

Sequenzieransatz		Programm der Sequenzierungsreaktion		
Inhalt	Menge	Zeit	Temperatur	Zyklen
Plasmid	500 ng	3 min	94°C	1
Primer (10 µM)	1 µl	20 sec	94°C	31
Quickstart	4 µl	25 sec	53°C	
		4 min	60°C	
ddH ₂ O	ad 20 µl	unendlich	10°C	1

Zur Aufreinigung der Reaktion wird eine DNA-Fällung verwendet. Dazu wird die Reaktion mit 5 µl Stopp-Mix, bestehend aus einem Teil Glycogen (Beckman-Coulter), zwei Teilen 3M NaAcetat pH 5,2 und zwei Teilen 100 mM Na₂EDTA pH 8,0, versetzt. Hinzu werden 60 µl 100%iger eiskalter Ethanol gegeben. Nach Fällung der DNA bei 13000 rpm für 30 min bei 4°C wird das Pellet mit 120 µl eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen (15 min, 4°C, 13000 rpm). Dieser Schritt wird mit 90 µl 70%igen Ethanol wiederholt. Die Ethanolreste entfernt man bei 30°C für 12 min im Concentrator 5301. Das Pellet wird anschließend in 40 µl Proben-Ladepuffer (Beckman-Coulter) gelöst. Nach 1 h Inkubation im Dunkeln überführt man die Probe in die Sequenzierplatte und überschichtet sie mit einem Tropfen Mineralöl (Beckman-Coulter). Die Pufferplatte wird zu zwei Dritteln mit Auftrennungs-Puffer (Beckman-Coulter) gefüllt. Für die Plasmid-Sequenzierung werden folgende Parameter am Gerät eingestellt: Kapillartemperatur 50°C, 120 sec Denaturierung bei 90°C, Injektionszeit 25 sec bei 2,0 kV und 105 min Separierung bei 4,2 kV.

2.2.2.13 *In Vitro* Mutagenese (IVM)

Der *In Vitro* Mutagenese (IVM) liegt eine komplette Amplifikation des Ursprungsvektors zugrunde (siehe Tabelle 2.19). Dabei kommt die Expand Long Polymerase der Firma Roche zum Einsatz. Der Primerentwurf, mit der einzufügenden Mutation in der Mitte der Primer, erfolgt nach den Angaben im QuikChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene. Die benutzten Primer sind im Materialteil 2.1.4 in der Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.19: IVM Reaktionsbedingungen

IVM Ansatz		PCR-Programm		
Inhalt	Menge	Zeit	Temperatur	Zyklen
10x Puffer 3	5 µl	30 sec	94°C	1
Primer vorwärts (5pmol/µl)	1,5 µl	30 sec	94°C	16
Primer rückwärts (5pmol/µl)	1,5 µl	1 min	55°C	
dNTPs (10mM)	2,5 µl	1 min / kb	68°C	
Expand Long Polymerase	0,75 µl	7 min	68°C	1
Ursprungsvektor	500 ng	unendlich	10°C	1
ddH ₂ O	add 50 µl			

Als Negativkontrolle wird bei der Amplifikation und der weiteren Prozessierung ein Ansatz ohne Polymerase mitgeführt. Nach Ablauf der Amplifikation werden 10 µl des Ansatzes entnommen, mit 5 µl 10x Agarose-Blaupuffer versetzt und die Amplifikation auf einem 0,8% Agarose-Gel kontrolliert (siehe 2.2.2.2).

Nachfolgend werden zum Rest des PCR-Ansatzes 4 µl 10x Restriktionsenzym Puffer 4 (New England Biolabs) und 1 µl DpnI Enzym (New England Biolabs) gegeben und 1 h und 20 min bei 37°C inkubiert.

Die Inhibierung des Enzyms erfolgt anschließend für 20 min bei 80°C. Das DpnI Enzym schneidet die methylierte Ursprungs-Vektor DNA. Zurück bleibt nur die mit Mutation neu amplifizierte Vektor DNA in voller Länge. Dieser Schritt wird durch die Entnahme von 10 µl des Ansatzes und der Betrachtung auf einem 0,8% Agarose-Gel überprüft. Nachfolgend wird 1 µl dieses Ansatzes für die Transformation mittels Hitzeschock (siehe 2.2.2.7) genutzt. Gewachsene Klone werden mit Sequenzierung überprüft (siehe 2.2.2.12).

Um ein ARHGEF7-Protein zu erhalten, welches keine Guanidin-Austauschfaktor-Aktivität mehr besitzt (Manser et al., 1998), werden die Aminosäuren L386R und L387S mutiert. Die IVM des pCMV_L_VC_ARHGEF7_L386R/L387S (im Weiteren als pCMV_L_VC_ARHGEF7_Gefdead bezeichnet) wird in 2 Schritten durchgeführt. Der erste IVM-Schritt nutzt den pCMV_L_VC_ARHGEF7 Vektor als Originalvektor um die L386R-Mutation einzufügen (Oligonukleotide siehe Tabelle 2.4). An dem entstandenen pCMV_L_VC_ARHGEF7_L386R wird nachfolgend die L387S IVM durchgeführt, um das pCMV_L_VC_ARHGEF7_Gefdead Konstrukt zu erhalten.

Die IVM ist nicht mit 13 kb großen Originalvektoren möglich. Deshalb kann der generierte pcDNA3.1-LRRK2-WT Vektor nicht als Ausgangsvektor für die Generation der G2019S-, K1906M- und R1441C-Mutationen genutzt werden. Aus diesem Grund wird der, über LIC-Klonierung (siehe 2.2.2.4) generierte, pCMV_L_VN_Roc-COR-PK Vektor als Originalvektor für die IVM genutzt und nachfolgend eine Klonierung der generierten Konstrukte in den pcDNA3.1_LRRK2_WTmyc Vektor durchgeführt. Die genutzten IVM-Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.1.4 (Tabelle 2.4) aufgelistet. Für die Umklonierung in den Vollängenvektor werden für die G2019S-, K1906M- und R1441C-Mutation die Schnittstellen EcoNI und PacI genutzt.

Der pcDNA3.1-LRRK2-T1348N Vektor wird durch eine Umklonierung über die BsrG1- und PacI-Schnittstelle im LRRK2-Transkript, aus dem von Dr. Christian Klein (Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen) erhaltenen pCMV_LRRK2_T1348N-Flag Vektor, generiert.

2.2.3 Transfektion humaner Zellen

2.2.3.1 Transfektion von SH-SY5Y-Zellen mit siRNA

In transgenen Pflanzen entdeckten Forscher 1990, dass RNA, welche von einem Transgen transkribiert wurde, sowie RNA von homologen endogenen Genen, degradiert wird (Napoli et al., 1990). Dieses Phänomen wurde zu diesem Zeitpunkt „Co-Suppression“ genannt. Es wurde unter dem Namen „quelling“ auch in *Neurospora crassa* beobachtet (Romano und Macino, 1992). Dieses Phänomen, welches in den nachfolgenden Jahren ebenfalls in anderen Pilzen und Ciliaten gefunden wurde, nannte man Posttranskriptionale Gen-Stilllegung (Vaucheret, 2005). Den zugehörigen Mechanismus in Tieren identifizierten Fire et al., als sie dsRNA in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) injizierten und in diesem Organismus einen effektiveren Gen-Stilllegungs-Effekt bemerkten, als wenn sie jeweils einen einzelnen RNA-Strang injizierten (Fire et al., 1998). Sie nannten den Prozess RNA-Interferenz (RNAi) und erkannten, dass die Expression des Genes, zu welchem die dsRNA komplementär ist, fast komplett ausgeschaltet wird. Weitere Experimente in *Drosophila melanogaster* zeigten, dass die dsRNA durch einen Proteinkomplex in 21-23 nt (Nukleotide) lange dsRNA gespalten wird (Zamore et al., 2000). Es konnte ein RNase III ähnliches Enzym – genannt Dicer – als Bestandteil dieses Proteinkomplexes identifiziert werden (Bernstein et al., 2001). Die durch seine Aktivität entstehenden kurzen doppelsträngigen RNA-Moleküle wurden mit dem Gen-Stilllegungs-Effekt assoziiert (Elbashir et al., 2001a). Nachdem gezeigt werden konnte, dass auch synthetisch hergestellte 21-23 nt umfassende dsRNA diese sequenzspezifische mRNA-Degradation auslöst, wurde sie siRNA („short interfering RNA“) genannt (Elbashir et al., 2001b).

Es ist nicht bekannt, wie die Sequenz einer siRNA sein muss, damit sie eine nahezu komplette Stilllegung ihres Ziel-Gens erreicht. Verschiedene siRNAs, welche das selbe Zielgen herunterregulieren sollen, aber an unterschiedlichen Zielsequenzen dieses Gens binden, schaffen keine gleichen Effektivitäten in der Gen-Stilllegung (Holen et al., 2002). Die siRNA-Sequenz sollte keine repetitiven Sequenzen, keine Intronsequenzen, keine Exon-Exon Grenze, nicht den 3' untranslatierten Bereich oder das Start-Codon erfassen (Dykxhoorn et al., 2003). Außerdem soll die siRNA nur für ein Gen spezifisch sein und nicht aufgrund homologer Sequenzen eine ganze Genfamilie oder ein anderes in der Sequenz homologes Gen ausschalten (McManus und Sharp, 2002). Dennoch ist es unklar ob die siRNA-Sequenz, die Ziel-mRNA Sekundärstruktur oder die Bindung RNA-bindender Proteine der ausschlaggebende Faktor der Effektivität der siRNA ist (Dykxhoorn et al., 2003).

Für diese Arbeit werden die in 2.1.4 beschriebenen siRNAs gegen LRRK2 (Habig et al., 2008) und/oder ARHGEF7 genutzt. Sie wurden von der Firma Qiagen entwickelt und synthetisiert und über qRT-PCR (siehe 2.2.8) auf ihre Effektivität der genspezifischen RNAi getestet.

Mit Hilfe der Nucleofector™ Technologie von Amaxa (Köln, D) ist es möglich eine hohe Transfektionsrate schwer transfizierbarer SH-SY5Y-Zellen zu erreichen.

Die Nucleofector™ Technologie basiert auf Elektroporation der Zellen und dem dadurch möglichen Eindringen von Fremd-Nukleinsäuren in die Zelle. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran einem elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch sie für einen kurzen Zeitpunkt porös wird. Durch die entstehenden Öffnungen können Moleküle (zum Beispiel DNA oder siRNA) in die Zelle und auch in den Zellkern eindringen (Sharp et al., 2001).

Zur Transfektion wird für SH-SY5Y-Zellen die Cell Line Nucleofector™ Solution V mit dem Programm G-04 genutzt. Es wird nach den Angaben des Herstellers verfahren. Bei Einzeltransfektionen werden 2 µg siRNA (entspricht 8 µl der 20 µM siRNA Stock Lösung) transfiziert (Habig et al., 2008; Habig et al., 2009). Bei Doppeltransfektionen nutzt man pro siRNA 2 µg. Die Analyse der Zellen erfolgt nach 48 h.

Wird an siRNA behandelten Zellen die Apoptoserate mit dem Cell Death Detection ELISA^{Plus} Assay bestimmt (siehe 2.2.10), so wird die Analyse im 96-well Format durchgeführt. Dafür werden die elektroporierten SH-SY5Y-Zellen (insgesamt 600 µl mit 2×10^6 Zellen) zu je 6 µl (entspricht 2×10^4 Zellen) in ein well der 96-well Kulturschale plattiert, in welchem 94 µl SH-SY5Y Medium vorgelegt wurden (Habig et al., 2009).

2.2.3.2 Transfektion von HEK-293-Zellen mit Plasmiden

Die Transfektion von HEK-293-Zellen wird mit Hilfe des Lipofectamine™2000 von Invitrogen erreicht. Diese Technologie basiert auf einer Lipid-Transfektion und nutzt die Tatsache, dass kationische Lipidkomplexe mit der hydrophoben negativ geladenen Zellmembran interagieren und durch diese in die Zelle eindringen können (Sharp et al., 2001). Die Transfektion wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die optimale Konfluenz (80%) der Zellen vor der Transfektion wird erreicht, wenn in einer 6-well Kulturschale 24 h vor Transfektion $1,6 \times 10^6$ HEK-293-Zellen pro well ausplattiert werden. Für die Einzelplasmidtransfektion werden 2 µg Plasmid und 5 µl Lipofectamine™2000 und für die Doppelplasmidtransfektion in der Regel 2 µg je Plasmid und 10 µl Lipofectamine™2000 eingesetzt. Damit ein Vergleich von Proteinexpressionsveränderungen möglich ist, muss die transfizierte Menge an Plasmid aufgrund der Stärke der jeweiligen Expression angepasst werden (siehe Tabelle 2.20). Nach 48 h Inkubation können die Zellen lysiert und analysiert werden.

Tabelle 2.20: Menge an transfizierten Plasmiden

Plasmid V5-markiert	µg transfiziert	Plasmid myc-markiert	µg transfiziert
pCMV_L_VC	2 µg	pcDNA3.1_6xmyc	4 µg
pCMV_L_VC_ARHGEF7	2 µg	pCMV_L_VN_Roc-COR-PK	2 µg
pCMV_L_VC_ARHGEF7_Gefdead	3 µg	pcDNA3.1_Roc-COR-PKmyc	2 µg
pCMV_L_VC_ACTB	1 µg	pcDNA3.1_LRRK2-WTmyc	4 µg
pCMV_L_VC_CDC42	4 µg	pcDNA3.1_LRRK2-G2019Smyc	3 µg
pcDNA3.1V5HisB	2 µg	pcDNA3.1_LRRK2-K1906Mmyc	2 µg
pcDNA3.1V5HisB_ARHGEF7	0,5 µg	pcDNA3.1_LRRK2-R1441Cmyc	2 µg
pcDNA3.1V5HisB_ACTB	1 µg	pcDNA3.1_LRRK2-T1348Nmyc	6 µg
pcDNA3.1V5HisB_CDC42	4 µg		

2.2.4 RNA-Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation von Zellen aus der 6-well Kulturschale erfolgt mit Hilfe des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen und dem entsprechendem Protokoll des Herstellers. Das Elutionsvolumen beträgt 30 µl. Wird Protein und RNA aus einer 6-well Schale gewonnen, so wird das gewonnene Zellpellet beim Waschen mit PBS auf 2 Reaktionsgefäße verteilt, pelletiert und 1 Pellet für die RNA-Isolation und 1 Pellet für die Proteinlyse verwendet.

Für die RNA-Isolation aus der 96-well Platte wurden 12 wells gepoolt und die RNA mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben isoliert. Dabei wurde auf den DNase Verdau auf der Säule verzichtet. Das Elutionsvolumen beträgt bei dieser Isolation 14 µl.

Die RNA-Isolation aus Gehirnen von 7 Tage alten LRRK2-Knockdown Tieren (siehe 2.1.2) erfolgt mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Dabei wurde von Dr. Saskia Biskup das Gesamthirn dieser Tiere präpariert und bei -80°C gefroren. Dieses kann dann mit dem Ultra-Thorax homogenisiert und die RNA mit Hilfe einer Phenol/Guanidin basierten Lyse der Zellen mit anschließender Silica-Membran basierten Säulenaufreinigung isoliert werden. Das Elutionsvolumen der RNA beträgt hierbei 30 µl.

2.2.4.2 RNA Quantitäts- und Qualitätsbestimmung

Die RNA-Konzentration wird mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 der Firma NanoDrop Technologies gemessen.

Die Qualität einer isolierten RNA wird über Kapillarelektrophorese im Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) bestimmt. Dazu wird das RNA6000 Nano Reagents&Supplies Kit derselben Firma verwendet. Ist die Konzentration der Probe geringer als 5 ng/µl so wird das RNA6000 Pico Reagents&Supplies Kit verwendet. Bei der Analyse wird die RNA der Größe nach in dem RNA6000 Nano LabChip aufgetrennt. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes und der Bioanalyzer-BioSizing Software. Es werden die im Handbuch des Kits beschriebenen Schritte durchgeführt. Bei einer Probe mit guter RNA-Qualität erscheint im Elektropherogramm der 18S rRNA-Peak und der 28S rRNA-Peak ohne Vorpeaks mit einem Mengenverhältnis von 2:3. Die von der Software berechnete RIN-Nummer ist ein weiteres Qualitätsmerkmal (0 = sehr schlechte Qualität, 10 = höchste Qualität).

2.2.5 Mikroarray Expressionsanalyse

2.2.5.1 Grundlagen

Der Begriff „Array“ kommt aus dem militärischen Umfeld und bedeutet Aufstellung oder Ansammlung. DNA-Arrays, die seit 1990 die Hochdurchsatz-Expressionsanalyse ermöglichen (Woo et al., 2004), bestehen aus einer großen Anzahl regelmäßig und systematisch aufgebracht DNA Moleküle auf einem festen Träger (aufgebracht oder direkt darauf synthetisiert). Der Durchmesser jedes „Spots“ ist kleiner als 250 µm und beinhaltet nur eine Sorte von DNA-Molekülen (Sonde genannt), welche auf diesem Fleck in großer Anzahl

vorkommen. Hunderte bis tausende solcher „Spots“ bilden den DNA-Mikroarray, wobei dieser zur Genotypisierung, Genkartierung, Genstrukturanalyse oder DNA-Protein-Interaktionsstudien genutzt werden. Am häufigsten werden mit den Mikroarrays aber Genexpressionsniveaus untersucht. Es gibt 3 Arten von DNA-Arrays, wobei diese sich in der aufgetragenen DNA unterscheiden (Woo et al., 2004). Der am seltensten genutzte genomische Mikroarray hat genomische DNA-Abschnitte mit einer Länge von mehreren Kilobasenpaaren auf seiner Oberfläche immobilisiert. Weit häufiger werden cDNA-Mikroarrays genutzt, wobei auf diesen cDNAs mit einer Länge zwischen 100 bp und 2000 bp aufgebracht sind, welche meist über PCR amplifiziert wurden. Da in dieser Arbeit die am häufigsten verwendeten Oligonukleotid-Mikroarrays, welche DNA-Moleküle mit 20-30 bp Länge tragen (Irizarry et al., 2003), genutzt werden, stehen diese im Mittelpunkt der Betrachtung.

2.2.5.2 Affymetrix GeneChip® Arrays

Der GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array von Affymetrix (Inc, USA), welcher ein Oligonukleotid-Mikroarray ist, kann das Transkriptionsniveau über das komplette humane Genom mit nur einer Hybridisierung erfassen. Er hat mehr als 54000 „Probesets“ auf der Oberfläche immobilisiert, welche mehr als 47000 bekannte Transkripte und Transkriptvarianten erfassen.

Dabei besteht ein „Probeset“ bei diesem Oligonukleotid-Mikroarray aus 11 verschiedenen Sonden mit einer Länge von 25 bp, die einen ca. 300 bp großen DNA-Bereich eines Transkripts abdecken (Irizarry et al., 2003). Durch diese verschiedenen Sonden des Sets wird die Sensitivität und Spezifität für ein Transkript erhöht. Um Kreuzhybridisierungen zu erkennen und im Ergebnis verrechnen zu können, wird zu jeder Probe eine „mismatch“-Sonde auf dem Chip immobilisiert, welche bis auf eine Fehlpaarung in ihrer Sequenzmitte dieselbe Sequenz wie ihr Gegenstück hat (Irizarry et al., 2003). Auch werden für manche Transkripte mehrere „Probesets“ auf den Chip gebracht um zum Beispiel Expressionsunterschiede zu bestätigen. Die GeneChip-Technologie schafft diese große Anzahl an Probesets auf dem Chip zu immobilisieren, da sie diese direkt auf einem Quarz (SiO) Chip unter der Nutzung photolithographischer und chemischer Prozesse synthetisiert (Fodor et al., 1991).

Die Arbeitsschritte der Expressionsanalyse sind ausführlich im GeneChip® ExpressionAnalysis Technical Manual von Affymetrix beschrieben und werden nach dieser Anleitung durchgeführt. Es wird das „One-Cycle“ Protokoll von Affymetrix bearbeitet.

Grundsätzlich ist die RNA-Qualitätskontrolle und Quantitätsbestimmung (siehe 2.2.4.2) Voraussetzung. Die anschließende cDNA-Synthese jeder Probe (3 Experimentproben und 3 Kontrollproben) erfolgt mit Hilfe des T7/Oligo(dT)Primers und der SuperScript II, wodurch zunächst ein cDNA Einzelstrang von der mRNA hergestellt wird und nachfolgend der dazu gehörige Zweitstrang gebildet wird. Aus der Doppelstrang cDNA stellt man bei der nachfolgenden *In Vitro* Transkription durch Zugabe Biotin markierter Nukleotide biotinylierte cRNA her.

Die cRNA-Konzentration bestimmt man mit dem BioPhotometer bei einer OD von 260 nm. Nachfolgend fragmentiert man 20 µg der cRNA und kontrolliert den Erfolg mit dem RNA6000 Nano LabChip im Agilent 2100 Bioanalyzer. Anschließend werden 15 µg fragmentierte cRNA in die Hybridisierung mit dem Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) eingesetzt. Nach der Hybridisierung wird der Array mit Hilfe der GeneChip® Fluidics Station (Affymetrix) automatisch gewaschen und gefärbt. Die Färbung erfolgt dabei zuerst mit Streptavidin-Phycoerythrin (Molecular Probes) wobei das Streptavidin an das Biotin der cRNA binden kann. Nachfolgend wird mit einem biotinylierten Anti-Streptavidin-Antikörper (Vector Laboratories) und schließlich noch mal mit Streptavidin-Phycoerythrin gefärbt um das Signal zu verstärken.

Die Detektion des Phycoerythrin-Signals erfolgt dann bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und Emissionswellenlänge von 570 nm im GeneArray® Scanner. Dabei ist das ausgesendete Licht proportional zur gebundenen Menge cRNA an jeder Stelle des Arrays.

Die Verarbeitung der Rohdaten erfolgt mit der GeneChip Operating Software von Affymetrix, wobei dabei mit dem MAS5 Algorithmus die Signalwerte jedes Probesets berechnet werden.

Die anschließende Datenanalyse erfolgt mit der ArrayAssist 4.0 Software (Stratagene), wodurch nach GCRMA Normalisierung alle differentiell regulierten Transkripte mit einem „Fold Change“ größer als 1,5 oder kleiner als -1,5 und einem p-Wert kleiner als 0,05 erhalten werden.

2.2.5.3 Illumina BeadChip Arrays

Die BeadArray-Technologie der Firma Illumina wird für die gesamtgenomische Expressionsanalyse der LRRK2-Knockdown Mäuse genutzt. Im Vergleich zur GeneChip-Technologie (Affymetrix) ist vor allem der Mikroarray Aufbau der BeadArray-Technologie unterschiedlich. Die Grundlage des „BeadChip“ sind Silizium-Kügelchen (Beads) mit einer Größe von 3 µm. An jedes Kügelchen werden hunderttausende identische Oligonukleotide gekoppelt. Diese bestehen aus einer 29 bp langen Adresssequenz und einer 50 bp langen Sondensequenz. Die Adresssequenz ist nötig, um die spätere Position des Kügelchens auf dem Array zu erkennen und die Sondensequenz ist verantwortlich für die Messung der Expressionsstärke eines Transkriptes aus der Probe.

Auf dem genutzten MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChip kommt jedes Kügelchen etwa 30 mal vor, so dass 720000 Beads auf einem BeadChip aufgetragen sind. Dabei werden 24000 Transkripte in ihrem Expressionsprofil erfasst. Die verschiedenen Bead-Typen (mit verschiedenen Sonden und dem jeweiligen Adresscode pro Sonde) werden gemischt und auf den Silizium-Chip verteilt, in welchem zuvor zur Kügelchengröße passende gleichmäßig angeordnete Vertiefungen geätzt worden sind. Damit kommt es zu einer zufälligen Verteilung der Beads auf dem Chip, wo sie durch Van-der-Waals-Kräfte und hydrostatische Interaktionen gehalten werden. Durch diese Vorgehensweise wird eine interne technische Replikation und über den Vergleich und die Durchschnittsbestimmung der 30 Beads eines Typs eine Reproduzierbarkeit gewährleistet (Barnes et al., 2005).

Eine weitere Besonderheit ist, dass der MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChip Array 8 BeadChips enthält und damit 8 Proben gleichzeitig unter den gleichen Bedingungen analysieren kann. Genexpressionsergebnisse der Illumina®-Plattform wurden außerdem mit denen von Affymetrix GeneChips verglichen und zeigten in verschiedenen Studien vergleichbare Ergebnisse (Barnes et al., 2005; Lenk et al., 2007).

Als Grundlage der Prozessierung der Proben dient auch hier die RNA-Qualitätskontrolle und die Quantitätsbestimmung (siehe 2.2.4.2). Die Prozessierung der MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChip Arrays beginnt mit der cDNA Synthese nach dem Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit Instruction Manual, dafür werden 500 ng RNA eingesetzt. Nachfolgend wird mit Hilfe der DNA-Polymerase die Zweitstrangsynthese durchgeführt. Nach Aufreinigung der ds cDNA erfolgt mit dem gleichen Kit die *In Vitro* Transkription, wobei in diesem Schritt Biotin-markierte NTPs in die entstehende cRNA eingebaut werden.

Nach Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der cRNA werden 1,5 µg jeder Probe für die Hybridisierung mit den MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChips genutzt. Dabei kam das Whole Genome Expression Kit (Illumina) zum Einsatz und alle Schritte wurden nach dem Illumina® Whole-Genome Gene Expression with IntelliHyb Seal System Manual durchgeführt. Die Färbung der Arrays erfolgt mit Streptavidin-Cy3. Das Scannen der BeadArrays geschieht im BeadArray Reader GX (Illumina), wobei das detektierte Lichtsignal proportional zur gebundenen cRNA Menge an jeder Stelle des Arrays ist.

Die Qualitätskontrolle und die „quantile“ Normalisierung mit Hintergrundkorrektur (Bolstad et al., 2003) der Rohdaten erfolgt mit Hilfe der BeadStudio 3 Software (Illumina). Anschließend wird die Software Bioconductor und R 2.8.1 (www.bioconductor.org) mit den Paketen „beadarray“, „genefilter“ und „limma“ angewendet (Gentleman et al., 2004). Zunächst werden im Paket „beadarray“ alle Werte die negativ sind, durch die Hälfte des kleinsten positiven Wertes ersetzt und eine Log-Transformation zur Basis 2 aller Werte durchgeführt (Dunning et al., 2007). Mit dem Paket „genefilter“ werden dann alle Sonden gefiltert, die mindestens einmal einen Detektions-p-Wert kleiner als 0,05 aufweisen. Im Paket „limma“ wird der Vergleich als Kontrastmatrize definiert auf welchen ein lineares Modell angepasst wurde und die Standardfehler über ein empirisches Bayesisches Modell moderiert werden (Smyth et al., 2005; Smyth, 2004). Über einen T-Test ermittelt man nachfolgend p-Werte. Alle Transkripte mit einem p-Wert kleiner als 0,05 werden als signifikant erachtet. Der erhaltene Log₂ Wert (SLR) der Regulationsstärke aller signifikanten Transkripte wird in einen „Fold Change“ umgerechnet (2^{SLR} bei positiven SLR Werten und $-1/[2^{\text{SLR}}]$ bei negativen SLR Werten). Es werden alle Transkripte mit einem „Fold Change“ größer als 1,5 oder kleiner als -1,5 und einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant reguliert erachtet. Die Annotationen zu jedem Transkript erhält man über die Pakete „Annotation DBI“ und „IlluminaMousev1probeID.db“.

2.2.5.4 Experimentaufbau

In dieser Arbeit werden Mikroarray-Expressionsanalysen mit beiden vorher beschriebenen Technologien durchgeführt. Die Tabelle 2.21 veranschaulicht alle benutzten Arrays und den dazugehörigen Experimentaufbau. Sowohl die Etablierung des ARHGEF7-Einzel-Knockdowns als auch der ARHGEF7-LRRK2-Doppelknockdown in SH-SY5Y-Zellen wurde durch die Diplomandin Sandra Gellhaar durchgeführt. Die experimentelle Durchführung der Array Prozessierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Microarray Facility Tübingen (Dr. Bonin).

Tabelle 2.21: Mikroarray-Experimentaufbau

Mikroarray-Experiment	Material	Experiment	Kontrolle	Array-Technologie	Array-Typ	Publikation
hLRRK2 KD I5R_085	SH-SY5Y-Zellen	siLRRK2 48h (n=3)	control siRNA 48h (n=3)	Affymetrix	U133 Plus 2.0 Array	(Habig et al., 2008)
LRRK2 und ARHGEF7 Doppel KD M8R_001	SH-SY5Y-Zellen	(A) siARHGEF7 48h (n=3) (B) siARHGEF7 + siLRRK2 48h (n=3)	control siRNA 48h (n=3)	Affymetrix	U133 Plus 2.0 Array	-
mLRRK2 KD I8R_042	murines Gesamtgehirn	C57/Bl6 LRRK2 +/-, 7 Tage alt (n=3, Geschwister) (Hitz et al., 2009)	C57/Bl6 WT, 7 Tage alt (n=3, Geschwister)	Illumina	MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChip	-
hSNCA KD I5R_005	SH-SY5Y-Zellen	siSNCA 48h (n=3)	control siRNA 48h (n=3)	Affymetrix	U133 Plus 2.0 Array	(Habig et al., 2009)

2.2.6 Funktionelle Analyse von Expressionsprofilen

2.2.6.1 GO-Kategorisierung

Die GO-(Gene Ontology) Kategorisierung wird mit der BiblioSphere PathwayEdition Software (Genomatix Software GmbH) durchgeführt. Dazu werden die Probeset IDs der differentiell regulierten Transkripte in die Software integriert. Für die annotierten Gene werden nachfolgend die GO-Kategorien biologischer Prozesse identifiziert (Ashburner et al., 2000). Dabei muss beachtet werden, dass 1 Gen durch mannigfaltige Funktionen zu mehreren Kategorien zuordenbar sein kann. Für jede GO-Kategorie wird ein Z-Wert berechnet, welcher die Signifikanz der GO-Kategorie widerspiegelt. In der durchgeführten Analyse wurden alle GO-Kategorien mit einem Z-Wert größer als 3.9 betrachtet.

2.2.6.2 Funktions- und Netzwerkanalyse

Die Funktions- und Netzwerkanalyse differentiell regulierter Transkripte, welche in Mikroarray-Experimenten identifiziert werden, wird mit der Ingenuity Pathways Analysis Software durchgeführt. Dafür werden die Probeset IDs, der Fold Change und der p-Wert der differentiell regulierten Transkripte in die Software implementiert. Diese ordnet nachfolgend den Probeset IDs (wenn bekannt) die Gen-Namen und die Gen-Funktionen zu, wobei die „Ingenuity Pathways Knowledge Base“ als zugrunde liegende Datenbank genutzt wird.

Die Funktionsanalyse geschieht auf 2 Wegen. Zum einen werden die Transkripte betrachtet, welchen eine biologische Funktion zuordenbar ist. Die zweite Analyse betrachtet Transkripte, welche mit kanonischen Signalwegen assoziiert sind.

Dabei wird die Signifikanz der Assoziation des Transkriptes mit dem kanonischen Signalweg auf 2 Wegen berechnet.

- (1) Es wird ein Verhältnis der Anzahl der Gene eines Datensets, welche zu dem Signalweg gehören und der Gesamtzahl der Gene dieses Signalwegs gebildet.
- (2) Der Fischer's Exact Test wird benutzt um einen p-Wert zu berechnen, welcher die Wahrscheinlichkeit angibt, dass die Assoziation zwischen den Genen des Datensets und dem kanonischen Signalweg nur zufällig geschieht.

Für die Signifikanzanalyse der biologischen Funktion wird nur Variante (2) angewandt.

Die Software lässt auch den direkten Vergleich zweier Datensätze (unabhängig aus welcher Spezies sie gewonnen wurden) zu, wobei die Grundfunktionen gleich bleiben.

Möchte man direkt zwei Datensätze miteinander vergleichen um die Anzahl der Transkripte zu erhalten, welche in beiden Datensätzen differentiell reguliert sind, so kann dies über die Gensymbole erreicht werden. Betrachtet man 2 Datensätze aus dem gleichen Organismus ist dies direkt z.B. mit Hilfe mit Microsoft[®] Access durchführbar. Vergleicht man allerdings 2 Datensätze aus unterschiedlichen Organismen, so müssen vorher die Gensymbole des einen Organismus (z.B. *Mus musculus*) in die entsprechenden orthologen Gensymbole des anderen Organismus (z.B. *Homo sapiens*) konvertiert werden. Dafür kann die NETAFFX Datenbank von Affymetrix (siehe 2.1.3) genutzt werden. Hier können Gensymbole differentiell regulierter Transkripte eingeladen und eine Liste der orthologen Gensymbole exportiert werden. Nachfolgend ist der Vergleich beider Datensätze möglich.

Die Genregulationsnetzwerke werden ebenso mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt. Durch den Informationsgewinn zu jedem Gen mit Hilfe der „Ingenuity Pathways Knowledge Base“ können Netzwerke der differentiell regulierten Transkripte erstellt werden. Alle gezeigten Verbindungen beruhen auf mindestens einer Referenz.

2.2.7 Synthese von cDNA

Die cDNA wird mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben synthetisiert. Dafür kommen in der Regel 1 µg RNA zum Einsatz. Aufgrund geringer RNA-Ausbeute im 96 well Format werden nach dem Apoptose-Analyse 250 ng RNA für die cDNA-Synthese genutzt.

2.2.8 Quantitative RT-PCR

2.2.8.1 Grundlagen

Die Quantifizierung von mRNA ist mit Hilfe der quantitativen reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) möglich. Dabei kommt SYBR Green zum Einsatz. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich unspezifisch in die kleine Rinne doppelsträngiger DNA einbaut (Pfaffl, 2001). Durch diesen Einbau steigt die Fluoreszenz, welche bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen wird, extrem an (Wong und Medrano, 2005). Mit jedem Amplifikationszyklus einer PCR-Reaktion steigt die Menge an ds DNA um den Faktor 2 an und damit auch die am Ende der Amplifikation erreichte Fluoreszenz.

Erst nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen überschreitet die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz (Wong und Medrano, 2005). An diesem Punkt wird die Hintergrundphase durch die frühe Exponentialphase abgelöst. Danach folgt die Exponentialphase und am Ende dieser Phase erreicht die PCR-Reaktion die Plateauphase, da einige Reaktionskomponenten limitierend werden (Wong und Medrano, 2005). In der frühen Exponentialphase wird die Analyse der Ausgangs-cDNA Menge durchgeführt, da hier die PCR-Effizienz optimal und konstant ist. Dafür wird über die zweite Ableitung der Amplifikationskurve durch die Light Cycler 480 Software ein Crossing point (Cp) berechnet. Diese Methode ist ausführlich im Light Cycler 480 Instrument - Operator's Manual Version 1.5 beschrieben. Der virtuelle Cp-Wert bestimmt den Zyklus der PCR-Reaktion, bei welchem sich das Amplifikations-Fluoreszenzsignal der PCR deutlich vom Hintergrund-Fluoreszenzsignal abhebt (Wong und Medrano, 2005). Proben mit einer hohen Ausgangs-cDNA Menge erreichen das Überschreiten des Hintergrundsignals schon mit einer geringeren Zyklusanzahl (geringerer Cp-Wert), als Proben mit weniger Ausgangs-cDNA Menge (Bustin, 2000). Der Cp-Wert gibt damit Aufschluss über die Ausgangs-cDNA Menge jeder Probe. Da die cDNA über reverse Transkription der mRNA gewonnen wird (2.2.7) ist ein Rückschluss auf die mRNA-Menge und damit auf das Expressionsniveau eines Genes möglich.

Wenn Gen-Expressionsniveaus von Proben verglichen werden sollen, müssen Unterschiede in der Präparation der Proben abgeglichen werden. Die dafür nötige Normalisierung wird mit Referenzgenen durchgeführt. Da in jeder Zelle und bei jedem Experiment möglicherweise auch die Referenzgene in ihrer Expression beeinflusst werden können, werden mehrere Referenzgene analysiert. Der GeNorm Algorithmus, welcher in der qBase Software implementiert ist, kann einen M-Wert der Referenzgene ermitteln, wobei der geringste M-Wert das beste (stabilste) Referenzgen auszeichnet. Mit einem oder mit mehreren Referenzgenen kann dann die Normalisierung durchgeführt werden (Vandesompele et al., 2009).

2.2.8.2 Primerentwurf und Etablierung

Für jedes zu analysierende Gen ist es nötig ein Primerpaar zu entwerfen, welches eine optimale PCR-Effizienz (optimal = 2) besitzt. Der Primerentwurf für die qRT-PCR wird mit der Primerentwurf-Software Primer 3 (siehe 2.2) durchgeführt. Auf dieser Internetseite kann die cDNA-Sequenz des zu amplifizierenden Gens (aus der Ensembl Datenbank, siehe 2.1.3) eingefügt und nach passenden Primern gesucht werden.

Das resultierende PCR-Fragment sollte mindestens eine Exon/Exon Grenze mit einer minimalen Intronlänge von 500 bp überspannen. Befinden sich in der Probe Reste genomischer DNA, so sind diese, wenn sie amplifiziert werden, deutlich an ihrer unterschiedlichen Fragmentlänge in Bezug zur eigentlichen cDNA-Zielsequenz identifizierbar (Sharp et al., 2001). Das mit den Primern vervielfältigte PCR-Fragment sollte 80-150 bp lang sein. Das Primerpaar ist optimal zur Amplifikation nutzbar, wenn die Schmelzpunkte der Vorwärts- und Rückwärtsprimer ähnlich sind und im Bereich von 60°C liegen.

Außerdem sollte der GC-Gehalt der Primer in etwa gleich sein (Bustin, 2000). Die optimale Primerlänge beträgt 20 bp. Um die Schmelztemperatur und den GC-Gehalt der Primer anzupassen, kann es nötig sein die Primer zu verlängern. Ist ein passendes Primerpaar und das daraus resultierende cDNA-Fragment gefunden, so wird dies in der NCBI-Datenbank (siehe 2.1.3) mit den bekannten Genomsequenzen abgeglichen. Dieser Abgleich soll verhindern, dass es andere genomische DNA-Bereiche gibt, die dem Fragment entsprechen und in der qRT-PCR nicht von dem gewünschten cDNA-Fragment unterschieden werden können.

Die genutzten Primerpaare für die qRT-PCR (synthetisiert durch die Firma Metabion als 100 µM Stocklösung) sind im Materialteil (siehe 2.1.4) zusammengefasst. Zur Nutzung werden die Primer 1:20 verdünnt. Bei der Validierung des siLRRK2 Mikroarray-Experiments kommen auch vorentworfenen Primerpaare der Firma Qiagen zum Einsatz, wobei deren Bestellnummer unter 2.1.4 aufgelistet oder publiziert sind (Habig et al., 2008).

Die selbstentworfenen und vorentworfenen Primerpaare müssen mit Hilfe einer Standardkurve auf ihre PCR-Effizienz getestet werden. Zusätzlich wird die spezifische Amplifikation der gewünschter cDNA über eine Schmelzpunktanalyse bestimmt. Dabei werden in jedem qRT-PCR-Ansatz pro Zielgen 2 Negativkontrollen mitgeführt. Zum Ersten die Rt- Kontrolle um Kontaminationen mit genomischer DNA zu erkennen und zum Zweiten ddH₂O um Kontaminationen der Chemikalien oder der Primer auszuschließen.

Für den qRT-PCR-Lauf wird zunächst die mRNA mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Qiagen) in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.7), welche nachfolgend in die Analyse mit dem LightCycler[®]480 im 384er Format der Firma Roche eingesetzt werden kann. Die qRT-PCR-Reaktion wird mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben angesetzt, wobei das Reaktionsvolumen auf 10 µl reduziert wird. Die Analyse der Daten erfolgt mit der LightCycler[®]480 Software, welche im LightCycler[®]480 Instrument - Operator's Manual Version 1.5 beschrieben ist.

Der qRT-PCR-Lauf wird mit dem in Tabelle 2.22 gezeigten PCR-Programm gestartet.

Tabelle 2.22: qRT-PCR Programm

Programm Name	Zyklenzahl	Temperatur (°C)	Dauer (hh:mm:ss)	Steigung (°C/s)	Akquisition
Denaturierung	1	95	00:15:00	4,6	-
Amplifikation	55	94	00:00:15	2,5	-
		55	00:00:30	2,4	-
		75	00:00:30	4,6	einmal
Schmelzkurve	1	95	00:00:15	4,6	-
		65	00:00:20	2,6	-
		95	-	-	kontinuierlich
Kühlung	1	40	00:00:30	2	-

Nach der PCR-Reaktion wird eine Schmelzkurve aufgezeichnet. Dabei werden die DNA-Fragmente erst bei 95°C denaturiert und anschließend auf 65°C abgekühlt, wobei sich doppelsträngige Fragmente bilden.

Nachfolgend werden die Proben langsam auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz gemessen. Bei einer bestimmten Temperatur (Schmelzpunkt) trennt sich der Doppelstrang. Dadurch wird das vorher eingebaute SYBR Green frei und verliert extrem an Fluoreszenzintensität. Die LightCycler® 480 Software stellt in einem Diagramm die Änderung der relativen Fluoreszenz (y-Achse) gegenüber der Temperatur (x-Achse) dar, wodurch die Schmelzkurve entsteht. Wurde in der vorhergehenden PCR nur ein spezifisches Produkt gebildet, so gibt es nur 1 Schmelzpunkt und damit nur 1 Peak. Sind Fragmente unterschiedlicher Größe vorhanden, so sind in der Schmelzkurve mehrere Peaks zu erkennen.

Die Effizienz einer PCR sollte 2 sein, da theoretisch bei einer perfekt optimierten PCR mit jedem Zyklus jedes DNA-Fragment in der exponentiellen Phase verdoppelt wird. In Wirklichkeit läuft eine PCR mit einer geringeren Effizienz (Pfaffl, 2004). Mit Hilfe einer Standardkurve ist es möglich die Effizienz einer PCR zu bestimmen. Die Effizienz berechnet sich dabei aus dem Anstieg der Kurve. Dieser Anstieg zeigt wie schnell die DNA Konzentration mit der Zyklenzahl zunimmt (Pfaffl, 2001).

Für die Bestimmung der Effizienz wird eine 1:10 Mischung aller cDNAs des Experiments hergestellt. Daraus kann danach eine 1:50, 1:250 und 1:1250 Verdünnung pipettiert werden. Mit diesen Verdünnungen wird eine Standardkurve erstellt, indem man sie als Proben in die PCR einsetzt. Es wird dabei eine Doppelbestimmung jeder Verdünnung durchgeführt. Die LightCycler® 480 Software berechnet danach die Effizienz (E) der Standardkurve nach den im LightCycler® 480 Instrument-Operator's Manual Version 5.1 beschriebenen Kriterien. Dabei wird die Formel $E = 10^{(-1/\text{Anstieg})}$ verwendet (Pfaffl, 2001).

2.2.8.3 Bestimmung der relativen Expression

Nachdem die Primer für die qRT-PCR der Zielgene und der Referenzgene etabliert wurden, ist die Messung von Proben mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) möglich. Von jeder Probe (1:20 verdünnt) wird in technischen Triplikaten von jedem Zielgen und von jedem Referenzgen eine Cp-Wert-Bestimmung durch die LightCycler® 480 Software durchgeführt.

Die Berechnung der relativen Expression zwischen unbehandelten Proben (Kontrolle) und behandelten Proben (Experiment) erfolgt mit der von Pfaffl (2001) beschriebenen Formel.

$$\text{Relative Expression} = \frac{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}^{(\text{Kontrolle-Experiment})}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}^{(\text{Kontrolle-Experiment})}}}$$

In dieser Formel werden, neben den Cp-Werten der Proben für Referenz- und Zielgene, auch die PCR-Effizienzen (E) in die Berechnung der relativen Expression mit einbezogen. Diese Berechnungsart wurde sowohl bei der qRT-PCR-Validierung des siLRRK2 Mikroarray-Experiments als auch für die qRT-PCR-Messungen nach dem Apoptose-Analyse durchgeführt.

Für die Validierung des murinen LRRK2 KD Mikroarray-Experimentes werden die Cp-Werte aus der LightCycler[®]480 Software exportiert und in die qBase Software importiert. In dieser Software berechnet man mit 3 Referenzgenen die effizienzkorrigierte normalisierte Expression aller Proben. Nachfolgend werden für jedes Zielgen die normalisierten Expressionen der 3 LRRK2 KD Tiere gemittelt und zu der gemittelten normalisierten Expressionen der 3 WT Tiere in Relation gesetzt, wodurch man die relative Expression erhält.

2.2.9 Proteinbasierte Methoden

2.2.9.1 Proteinisolation

Die Lyse der Zellen zur Proteinisolation kann mit 3 verschiedenen Puffersystemen durchgeführt werden.

Für die Analyse endogener Proteinmengen wird RIPA-Puffer ohne SDS zur Proteinisolation benutzt (siehe 2.1.11) (Kazerounian und Aho, 2003). Dafür werden die Zellen einer Vertiefung einer 6-well Kulturschale entweder trypsiniert (siehe 2.2.1.1), pelletiert und nach dem Waschen mit PBS in 150 µl RIPA-Puffer aufgenommen oder (nach einmaligem Waschen mit PBS) mit dem Zellschaber direkt in dem gleichen Volumen RIPA-Puffer auf Eis abgeschabt. Nachfolgend werden die Zellen 30 min auf Eis lysiert und dabei aller 10 min gevortext. Anschließend werden die nicht lysierbaren Zellbestandteile bei 13000 rpm, 30 min bei 4°C pelletiert und der Proteinüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für Koimmunopräzipitationsexperimente wird die Zellyse, wie oben beschrieben, mit dem NP40-Lysepuffer durchgeführt (siehe 2.2.11).

Die Proteine der LRRK2-GTP-Bindungsstudien und der LRRK2-GTP-Austauschanalysen werden mit dem Lysepuffer-G gewonnen (West et al., 2007). Dafür werden die Zellen wie oben beschrieben von der Schale in 150 µl Lysepuffer-G abgeschabt und nachfolgend 1 h bei 4°C rotierend (12 rpm) inkubiert. Anschließend wird durch 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm der Proteinüberstand gewonnen.

2.2.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Lösung kann mit Hilfe der Bradford Methode bestimmt werden. Sie beruht darauf, dass Coomassie Brilliant Blue (enthalten im Bio-Rad Protein Assay) an Proteine bindet (Sharp et al., 2001). Setzt man bestimmte Proteinkonzentrationen (BSA 1:40 in verschiedenen Verdünnungen) in die Analyse ein, so kann man eine Standardkurve erstellen. Die Analyse erfolgt in 96-er Gewebekulturschalen (Nunc). Um Pipettierfehler auszugleichen und den optimalen Detektionsbereich der Standardkurve zu erreichen, werden die Standards in Triplikaten und die Proben jeweils als Doppelbestimmung in einer 1:10 und einer 1:50 Verdünnung gemessen.

Nachdem in die Gewebekulturschale ddH₂O (97 µl) und Probe (3 µl) (oder Standard) in einem Endvolumen von 100 µl pipettiert wurden, gibt man 100 µl einer 40%igen Bradford-Reagenz Lösung (BIO-RAD) hinzu. Nach 5 min Inkubation wird die Platte kurz zentrifugiert und die entstandene Farbintensität bei einer Wellenlänge von 595 nm im Sirius HT Synergy HT Plate Reader gemessen. Die Software KC4 erstellt eine Standardkurve, wobei über einen Leerwert eine Wellenlängen-Korrektur (bei 900 nm und 977 nm) durchgeführt wird. Anhand der Standardkurve und Einberechnung des Verdünnungsfaktors ist hinterher den Proben eine Proteinkonzentration [µg/µl] zuordenbar.

2.2.9.3 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation wird als Methode zur Identifizierung interagierender Proteine genutzt. Dabei wird eines der beiden Proteine über einen Antikörper an Agarosebeads gekoppelt und mit einem Antikörper gegen das zweite Protein analysiert ob dieses gemeinsam mit dem ersten Protein aus dem Proteinlysate präzipitiert werden kann.

In dieser Arbeit wird sowohl V5-Agarose als auch myc-Agarose (Sigma) genutzt. Zur Vorbereitung der Koimmunopräzipitation werden HEK-293-Zellen mit Plasmiden doppeltransfiziert (siehe 2.2.3.2) und nach 48 h die Proteine mit NP40-Lysepuffer isoliert (siehe 2.2.9.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.9.2) werden 1000 µg Proteinlysate in die Koimmunopräzipitation eingesetzt. Dafür zentrifugiert man je 40 µl Agarosebeads bei 1000xg 30 sec, pipettiert den Überstand ab und wäscht die Agarosebeads anschließend mit 1 ml PBS bei 4°C rotierend (12 rpm) 5 min. Nachfolgend werden die Agarosebeads bei 1000xg 30 sec pelletiert, das PBS abgenommen und 1000 µg Proteinlysate auf die Agarosebeads gegeben. Das Volumen des Ansatzes wird mit PBS auf 200 µl aufgefüllt und 4 µl 25x complete Stocklösung (Roche) zur Protease-Inhibition zugegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei 4°C rotierend (12 rpm) inkubiert.

Anschließend werden die Agarosebeads bei 1000xg 1 min pelletiert und einmal mit 250 µl NP40-Lysepuffer 5 min rotierend bei 4°C gewaschen. Der Waschschritt wird dreimal mit PBS wiederholt. Nachfolgend wird 21 µl 2x Lämmli-Puffer auf das Pellet gegeben und die Probe bei 95°C 5 min gekocht. Direkt im Anschluss wird die Probe 15 sec gevortext und auf Eis gestellt. Die Probe wird 30 sec bei 13000rpm zentrifugiert bevor 20 µl Überstand auf das SDS-Gel aufgetragen wird.

2.2.9.4 GTP-Bindungsanalyse und GTP-Austauschanalyse

Die LRRK2-GTP-Bindungsanalyse wird basierend auf dem Protokoll von West et al. (2007) durchgeführt. Dafür werden transfizierte HEK-293-Zellen (siehe 2.2.3.2) mit 150 µl Lysepuffer-G lysiert (siehe 2.2.9.1) und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.2.9.2). Nachfolgend werden 20 µl Gamma-aminohexyl-GTP-Sepharose (Jena Biosciences) pro Probe vorgelegt und 500 µg Proteinlysate zugegeben. Das Volumen wird mit Lysepuffer-G auf 200 µl gebracht und die Probe 3 h bei 4°C und 12 rpm inkubiert. Nachfolgend wird für 1 h 2 mM GDP hinzugegeben. Anschließend pelletiert man die Sepharose bei 1000xg 1 min und verwirft den Überstand.

Das Waschen der Sepharose erfolgt 1x mit 500 µl Lysepuffer-G und 3x mit 500 µl PBS 5 min rotierend bei 4°C mit anschließender Zentrifugation bei 1000xg 30 sec. Das gewaschene Pellet wird mit 21 µl 2x Lämmli-Puffer versetzt, 10 min bei 70°C inkubiert, anschließend 15 sec gevortext und auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen von 20 µl Überstand auf das SDS-Gel wird die Probe 1 min bei 13000 rpm bei 4°C inkubiert.

Die LRRK2-GTP-Austauschanalyse basiert auf der GTP-Bindungsanalyse. Allerdings werden hier pro Bedingung 4 wells einer 6 well Schale transfiziert und die Proteinlysate anschließend vereint, damit eine ausreichend hohe Proteinmenge gewonnen wird. Anschließend werden je 300 µg Proteinlysate pro GTP-Immunopräzipitation (für jede Konzentration des Kompetitors eine) verteilt. Die Inkubationszeit des Proteinlysats an die Gamma-aminohexyl-GTP-Sepharose wird auf 1 h reduziert. Nachfolgend erfolgt für eine weitere Stunde die Konkurrenz mit verschiedenen Mengen an GTP als Kompetitor (0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 4 mM). Als Referenzprobe wird ein Ansatz ohne Kompetitor mitgeführt.

2.2.9.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgt mit Hilfe der eindimensionalen diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Ornstein L. (1964) und Davis B.J. (1964) unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli 1970).

Das Gel besteht bei der SDS-Gelelektrophorese aus einem Trenngel, dessen Acrylamid-Konzentration in Abhängigkeit vom aufzutrennenden Molekulargewicht des Zielproteins gewählt wurde, und einem Sammelgel (4%). Nach Zusammenbau des Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresesystems der Firma Bio-Rad erfolgt zunächst das Gießen des Trenngels (siehe 2.1.11) wobei TEMED (Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) als letztes hinzugefügt werden. Durch TEMED als Katalysator und APS als Radikalbildner erfolgt eine radikalische Polymerisation des Acrylamids. Das Trenngel wird so weit gegossen, dass für das Sammelgel noch ca. 1 cm unter den Taschen zur Verfügung steht. Um eine scharfe Linie zwischen Trenngel und Sammelgel zu erhalten, wird das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach 45 min Polymerisationszeit des Trenngels, kann das Sammelgel pipettiert werden (siehe 2.1.11). Auch hier werden TEMED und APS erst am Ende hinzugegeben.

Das Sammelgel wird über das Trenngel pipettiert (Isopropanol vorher entfernen) und der Kamm, welcher die Probenaschen ausspart hineingesetzt. Auch das Sammelgel benötigt 30 min zur Polymerisation.

Das Proteinlysate muss vor dem Auftrag aufs Gel vorbereitet werden. Dazu werden 60 µg Proteinlysate (bestimmt durch Bradford-Proteinbestimmung siehe 2.2.9.2) mit 5x Lämmli-Puffer (siehe 2.1.11) verdünnt und mit 1x PAGE-Puffer (siehe 2.1.11) auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Der gesamte Ansatz wird nachfolgend für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Durch das im Lämmli-Puffer enthaltene SDS und β-Mercaptoethanol sowie durch das Kochen werden die Proteine und die Disulfidbrücken denaturiert. Eine Besonderheit sind Proteinlysate, welche LRRK2 enthalten. Diese dürfen nicht erhitzt werden, da LRRK2 durch seine Hitzeinstabilität sonst nicht mehr detektierbar ist. Nach kurzer Zentrifugation wird der gesamte Ansatz auf das SDS-Gel aufgetragen. Eine Tasche des Gels wird mit 5 µl des Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards (Bio-Rad) befüllt, um später die Größe der Proteine bestimmen zu können.

Die Gelelektrophorese erfolgt am PowerPac Basis (Bio-Rad) zunächst bei 80 V und wird, sobald sich die Proteine im Trenngel befinden, auf 120 V erhöht. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern zur Anode (Sharp et al., 2001). Anhand der gefärbten Banden des Standards, ist es möglich die Auftrennung der Proteine abzuschätzen. Wenn sich die Proteine genügend getrennt haben, wird die Gelelektrophorese beendet.

2.2.9.6 Western Transfer

Der Western Transfer ist eine Methode um Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Membran zu transferieren. Dabei wird der SERVA Blue Blot WET 100 benutzt. Um die Schwämme, die Filter (Gel-Blotting-Papier 9 x 9 cm) und die Nitrocellulose Membran (Optitran BA-S83 Reinforced NC 6 x 8 cm) auf die Transfer-Bedingungen einzustellen, werden diese in 1x Transferpuffer (siehe 2.1.11) 15 min äquilibriert. Das Methanol im Transferpuffer wirkt als Brückenagens um eine Verbindung zwischen der hydrophoben Membran und dem Wasser (ebenfalls im Transferpuffer) zu garantieren.

Um den Western Transfer aufzubauen, wird die Nitrocellulose-Membran auf zwei Filterpapiere und einen Schwamm gelegt. Das vom Sammelgel abgesonderte Trenngel wird auf der Membran positioniert. Nachfolgend werden wieder zwei Filterpapiere und ein Schwamm aufgelegt und die Presse geschlossen. Die Presse wird in den Tank-Blot gehängt, so dass die Membran näher an der Anode ist als das Gel (Sharp et al., 2001). Dadurch werden die durch das SDS negativ geladenen Proteine im Gel, sobald Strom anliegt, in Richtung des positiven Pols (Anode) und somit auf die Membran transferiert (Sharp et al., 2001). Der Western Transfer erfolgt bei 80 V für 2 h bei 4°C am Consort E835 Electrophoresis PowerSupply.

2.2.9.7 Immunologische Detektion von Proteinen nach dem Western Transfer

Die Membran wird nach dem Western Transfer für 2 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) in Blockierungslösung (siehe 2.1.11) inkubiert. Dadurch werden noch vorhandene hydrophobe Bereiche der Membran mit Casein (aus dem Slimfast oder Naturaflor) bedeckt (Sharp et al., 2001). Unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Membran und dem Antikörper, welcher hydrophobe Bereiche besitzt, können damit verhindert werden. Die Membran wird anschließend einmal mit 1x TBS-T Lösung (siehe 2.1.11) gewaschen. Danach wird für 2 h unter Schütteln der primäre Antikörper (siehe 2.1.8) auf die Membran gegeben. Das Waschen der Membran erfolgt anschließend viermal für 10 min mit 1x TBS-T Lösung. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase gekoppelt, siehe 2.1.8) für 75 min unter Schütteln bei Raumtemperatur, erfolgen wiederum 3 Waschschrte für 10 min mit 1x TBS-T Lösung und 1 Waschschrte für 10 min mit 1x TBS Lösung.

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt mit dem ECL Kit oder für schwer detektierbare Proteine mit dem ECL-plus Kit (Amersham) nach Angaben des Herstellers und mit Hilfe des CURIX 60 Entwicklungsgerätes (Agfa-Gevaert).

Nach der Detektion der Antikörper, können diese wieder von der Membran entfernt werden. Dazu werden 20 ml Stripping Puffer (siehe 2.1.11) benutzt, welcher für 20 min unter Schütteln auf der Membran bleibt. Nach dreimaligem Waschen der Membran in 1x TBS Lösung wird die Membran wieder mit Blockierungslösung beschichtet. Nachfolgend können die auf der Membran gebundenen Proteine mit einem weiteren Antikörper detektiert werden.

2.2.9.8 Quantifizierung von Proteinbanden

Für die Quantifizierung von Proteinbanden nach dem Western Transfer wird der Film mit Hilfe des HP Scanjet 3970 eingescannt und als Tiff-Datei gespeichert. Die quantitative Auswertung der Bandenintensitäten erfolgt mit der AlphaEaseFC™ Software Version 4.0.1 (Alpha Innotech Corporation). Mit Hilfe des „Spot Denso“ Werkzeugs dieser Software kann die Pixeldichte der spezifischen Banden ermittelt werden. Nachfolgend wird von der Pixelanzahl der Bande noch die Pixelanzahl des Hintergrundes in der gleichen Spur subtrahiert. Anschließend zu dieser Hintergrundkorrektur wird die hintergrundkorrigierte Pixeldichte eines Referenzproteins (oder wenn dies nicht möglich ist von einer unspezifischen Bande) ermittelt und dies zur Normalisierung der Pixeldichte der spezifischen Banden genutzt. Unter Nutzung der normalisierten Pixeldichte können die einzelnen spezifischen Banden ins Verhältnis gesetzt werden, um die Banden miteinander zu vergleichen und eine relative Aussage zu erhalten.

2.2.10 Apoptose-Analyse

Die Apoptose-Analyse erfolgt in dieser Arbeit mit dem Cell Death Detection ELISA^{Plus} Assays der Firma Roche. Diese Analyse detektiert, auf dem Prinzip des colorimetrischen Ein-Schritt-Sandwich-Assays, die relative Menge der bei der Apoptose entstehenden

Nukleosomen aus dem Überstand einer Probe. Dabei kommt eine 96-well Mikrotiterplatte zum Einsatz, die mit Streptavidin beschichtet ist. Ein zugegebener Anti-Histon-Biotin-Antikörper kann an die Nukleosomen aus der Probe sowie an das Streptavidin binden. Ein Anti-DNA-Peroxidase-Antikörper bindet an den ersten Antikörper. Die gebundenen Antikörper setzen nachfolgend das ABTS-Substrat in einer enzymatischen Reaktion in einen Farbstoff um, dessen Absorption bei 405 nm im Sirius HT Synergy HT Plate Reader gemessen wird.

Für diese Analyse werden SH-SY5Y-Zellen mit siRNA transfiziert (siehe 2.2.3.1) und nachfolgend in einer Dichte von 2×10^4 Zellen in einer 96-well Gewebekulturschale in einem Volumen von 100 µl ausplattiert. Die Zellen werden 48 h bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Erfolgt eine Toxinbehandlung, so werden die Toxine entsprechend den Zeit- und Konzentrations-Angaben (siehe 2.1.10.1) vor Ablauf der 48 h auf die Zellen gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 200 µl entsteht.

Nachfolgend geschieht die Durchführung des Cell Death Detection ELISA nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltenen Extinktionswerte werden gegen den Leerwert Hintergrund korrigiert und nachfolgend zu der jeweiligen Referenzprobe (z.B. control siRNA Transfektion) in Relation gesetzt.

2.2.11 Immunfluoreszenzanalyse

Die kurzzeitige und spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Fluoreszenz unterscheidet sich von der Phosphoreszenz durch die Dauer der Lichtemission, welche bei der Fluoreszenz ohne Nachleuchten 10^{-8} Sekunden beträgt (Sharp et al., 2001). Das Licht absorbierende Molekül dabei heißt Fluorochrom. Jedes Fluorochrom hat ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum, welche von der Struktur des Moleküls abhängig sind (Lichtman und Conchello, 2005). Eine selektive Beobachtung von Proteinen wird ermöglicht, wenn ein sekundärer Antikörper mit einem Fluorochrom markiert wird und dieser einen, für das zu detektierende Protein spezifischen primären Antikörper erkennt. Zur Analyse wird das LSM 510 (Laser Scanning Microscope, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) und die Fluorochrome Cy2 und Cy3, welche zur Gruppe der Cyanine gehören, benutzt. Die in Tabelle 2.23 aufgeführten Einstellungen müssen vorgenommen werden, damit die behandelte Probe mit gefiltertem Licht der entsprechenden Absorptionswellenlänge bestrahlt wird. Besondere Bedeutung haben ebenso die Emissionsfilter, welche für die absorbierte Wellenlänge des Lichts undurchlässig sind, jedoch Licht der emittierten Wellenlänge durchlassen.

Tabelle 2.23: Einstellungen des LSM510

Fluorochrom	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]	Laser	Hauptfarbenteiler	Emissionsfilter
Cy2	488	510	Argon	HFT 488/543	LP 505
Cy3	543	570	Helium/Neon	NFT545	LP 585

Die konfokale Mikroskopie bietet den Vorteil, dass nur das emittierte Licht einer einzigen Ebene erfasst wird. Das Präparat wird von einer Laserlichtquelle zeilenweise abgerastert und das von der Probe emittierte Licht durch Verwendung entsprechender Filter detektiert. Licht, welches nicht aus der Fokusebene stammt, wird durch eine konfokale Lochblende (Pinhole) von dem Detektor abgeschirmt.

Die von einem Sekundärelektronenvervielfacher detektierten Pixel werden digitalisiert und mit Hilfe der LSM 510 Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) dargestellt (Handbuch LSM 510). Da das verwendete Mikroskop keine Filter für die Detektion der Dapi Färbung besitzt, ist die gleichzeitige Detektion der Kernfärbung nicht möglich. Diese kann aber über die Anregung mit einer Quecksilberdampflampe separat betrachtet und zur Kontrolle der Zellebene genutzt werden.

Die Probenvorbereitung beginnt mit der Kultivierung von $0,187 \times 10^6$ SH-SY5Y-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in einer 6-well Gewebekulturschale. Nach 2 Tagen Kultivierung wird das SH-SY5Y-Medium durch SH-SY5Y-Medium mit Retinolsäure (siehe 2.2.1.2) ersetzt und dieses alle 2 Tage gewechselt, was zur Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen führt. Nach 6 Tagen werden die Zellen 5 min mit 2 ml PBS unter Schütteln gewaschen. Anschließend wird 4%ige PFA-Lösung für 10 min unter Schütteln bei Raumtemperatur (RT) auf die Zellen gegeben, um sie am Deckglas zu fixieren.

Um die Zellmembran für den primären Antikörper durchgängig zu machen, werden die Zellen erst für 5 Minuten mit 2 ml eiskaltem Methanol bei -20°C und anschließend bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit 1 ml PBS für 5 min gewaschen wurden, werden die Zellen jedes Deckglases mit 100 μl eines 10%igen normalen Eselserums (NDS) in einer feuchten Kammer für 30 min inkubiert. Dadurch werden unspezifische Bindungen des spezifischen primären Antikörpers durch die im Serum enthaltenen Proteine abgeblockt.

Anschließend erfolgt über Nacht die Inkubation mit einer bestimmten Konzentration des primären Antikörpers (siehe 2.1.8), welche ebenso in einer feuchten Kammer aber bei 4°C durchgeführt wird. Hierbei können gleichzeitig 2 Antikörper, sofern sie aus unterschiedlichen Spezies stammen, genutzt werden. Danach wird das Deckglas aus der feuchten Kammer in eine 6-well Schale überführt und in dieser dreimal 5 min bei RT mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend folgt die Inkubation mit 100 μl fluorochrom-markierter sekundärer Antikörper-Lösung in PBS und 10% NDS in der feuchten Kammer für 1 h bei 37°C . Ab diesem Punkt wird unter Lichtausschluss gearbeitet, damit die Fluoreszenz nicht ausbleicht. Nachfolgend wird das Deckglas dreimal mit 1 ml PBS unter Schütteln gewaschen um überschüssigen sekundären Antikörper zu entfernen. Die Dapi Kernfärbung erfolgt für 10 min in einer 0,1%igen Dapi-PBS-Lösung bei RT unter Schütteln.

Das Deckglas wird anschließend mit einem Tropfen DABCO/Mowiol (25 mg DABCO auf 1 ml Mowiol) auf einem Objektträger eingedeckelt und mit Nagellack umrahmt um die Probe vor Austrocknung zu schützen. Nach 24 h Trocknungszeit im Dunkeln kann die Probe am Mikroskop betrachtet werden.

3. Ergebnisse

Die Ursachen der Entstehung des Parkinson-Syndroms (PS) sind weitgehend unklar. Die Analyse der biologischen Funktion der Proteine, welche mit der familiären Form des PS assoziiert sind, könnte Signalkaskaden aufklären, die auch bei der Pathogenese der sporadisch auftretenden PS-Form eine Relevanz haben. Unter diesen Proteinen hat die Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) eine Sonderstellung, da Mutationen in deren Gen nicht nur verantwortlich für 5-6% der autosomal dominanten, sondern auch für 1-2% der sporadischen Parkinson-Erkrankungen sind (Biskup und West, 2008).

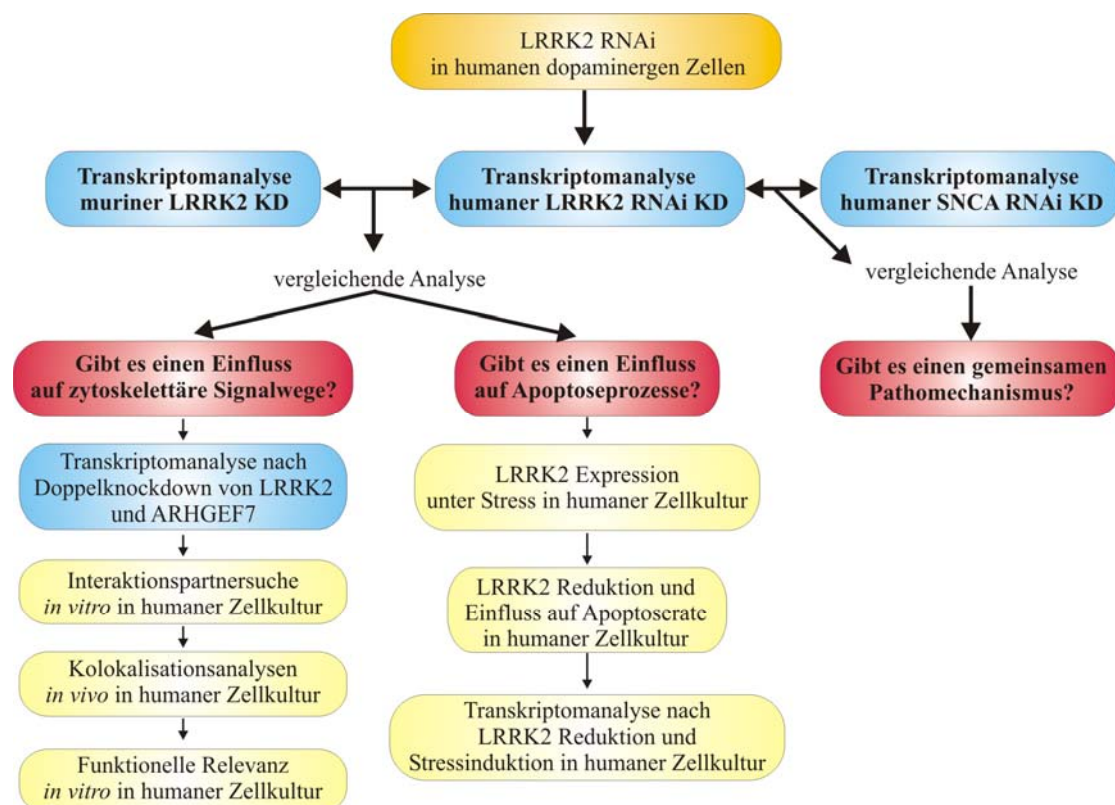


Abbildung 3.1: Übersichtsdarstellung der Analysen und die dabei betrachteten Fragestellungen

In dieser Arbeit kommen verschiedene Transkriptomanalysen zum Einsatz (blau). Die detaillierte Analyse der differenziell regulierten Transkripte soll verschiedene Fragestellungen (rot) beantworten.

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die biologische Funktion von LRRK2 analysiert werden. Dabei basieren die Analysen auf der gesamtgenomischen Expressionsanalyse zweier Modelle, in welchen das LRRK2-Expressions- und Proteinniveau reduziert vorliegen („Knockdown“, KD) (siehe Abbildung 3.1). Von diesen ausgehend soll aufgeklärt werden, ob der Verlust von LRRK2 einen Einfluss auf Apoptoseprozesse hat. Des Weiteren wird analysiert, ob die Reduktion von LRRK2 Auswirkungen auf zytoskelettäre Signalkaskaden zeigt. Mit Hilfe des Vergleiches zwischen dem RNAi-vermittelten LRRK2 KD und der Transkriptomanalyse eines Alpha-Synuklein (SNCA) RNAi-vermittelten KD (Habig et al., 2009), soll untersucht werden, ob es gemeinsame PS-Pathomechanismen zwischen SNCA und LRRK2 gibt.

3.1 Gesamtgenomische Analyse humaner LRRK2-Knockdown-Zellen

3.1.1 RNA-Interferenz von LRRK2

Die Reduktion des Transkriptions- als auch Translationsniveaus eines Gens und die Analyse der dadurch ausgelösten Signalkaskaden kann Einblicke in die biologische Funktion dieses Gens liefern. Der Knockdown des in der Pathogenese des PS wichtigen Gens *LRRK2* wurde mit RNA-Interferenz erreicht. Als Zellkulturmodell kamen humane neuronale, dopaminerge Zellen (SH-SY5Y) zum Einsatz. Um die Reduktion effektiv (>70%) zu erreichen, wurden zwei verschiedene siRNAs gegen unterschiedliche Bereiche von *LRRK2* (siLRRK2-1= WD40, 7321 bp - 7342 bp; siLRRK2-2= N-Terminus, 1570 bp - 1591 bp) entworfen und getestet (siehe 2.2.3.1). Dazu wurde ihre Repressions-Aktivität auf RNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR, siehe 2.2.8) analysiert (Abbildung 3.2 A). Die siLRRK2-1 war mit ihrer Repressionsfähigkeit von 75% (\pm 7%) effektiver als die siLRRK2-2 (62% \pm 5%). Auch die Analyse der Reduktion auf Proteinebene mit Hilfe von SDS-Page (siehe 2.2.9.5), Western Transfer (siehe 2.2.9.6) und Immundetektion (siehe 2.2.9.7) konnte die Effektivität der siLRRK2-1 verdeutlichen (Abbildung 3.2 B). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit der effektiveren siLRRK2-1 durchgeführt.

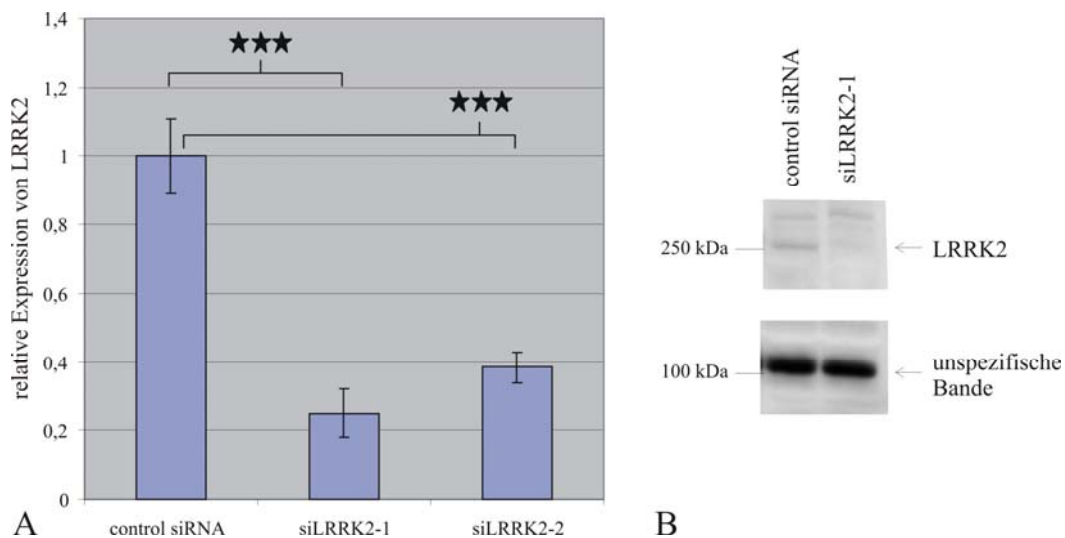


Abbildung 3.2: Effizienz der RNA-Interferenz von LRRK2

A: Effektivitätsbestimmung auf Transkriptionsebene mit qRT-PCR. SH-SY5Y-Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNAs gegen *LRRK2* transfiziert. *PDHB* wurde als Referenzgen zur Normalisierung genutzt. Die Analyse erfolgte in drei unabhängigen Replikaten (\pm SEM). ***p-Wert \leq 0,001 (Habig et al., 2008)

B: Repressions-Aktivität der siLRRK2-1 auf Translationsebene. Das Bild entspricht dem Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen. Es wurden 60 μ g Proteinlysate auf ein 6% SDS-Gel aufgetragen. Das endogene LRRK2-Protein in SH-SY5Y-Zellen wurde mit dem Novus LRRK2 267-Antikörper detektiert. Die dabei auftretende unspezifische Bande wurde als Ladekontrolle benutzt.

3.1.2 Mikroarray-Experiment von LRRK2-Knockdown-Zellen

Einen umfassenden Einblick in Regulationskaskaden, welche durch die LRRK2-Reduktion beeinflusst werden, bekommt man unter anderem mit gesamtgenomischen Expressionsprofilen. Diese wurden beim humanen siLRRK2-Experiment unter Nutzung des Affymetrix Whole Genome U133plus2 Arrays, welcher 45.000 Transkripte erfasst, erstellt (siehe 2.2.5.2).

Im Vergleich von drei control siRNA zu drei siLRRK2-1 transfizierten SH-SY5Y-Zellen, sind 187 Transkripte differenziell reguliert („Fold Change“ $\geq |1,5|$; p-Wert $\leq 0,05$), von denen 93 mit einer Repression und 94 mit einer Hochregulation auf den Verlust von LRRK2 reagierten. Die Gesamtliste der differenziell regulierten Gene wird im Zusatzmaterial 1 der Publikation von Häbig et al. zur Verfügung gestellt (Häbig et al., 2008).

3.1.2.1 Funktionelle Analysen

Von den 187 differenziell regulierten Transkripten konnten mit Hilfe der BiblioSphere PathwayEdition Software (Genomatix Software GmbH) 131 Transkripte in die „Gene Ontology“ (GO)-Analyse eingeschlossen werden (siehe 2.2.6.1). Bei 65 dieser Gene war eine Zuordnung zu GO-Kategorien möglich (Abbildung 3.3). Die differenziell regulierten Gene verteilen sich auf 16 Kategorien mit einem Z-Wert größer als 3,9. Je größer der Z-Wert, desto signifikanter ist diese Kategorie in der Analyse beeinflusst.

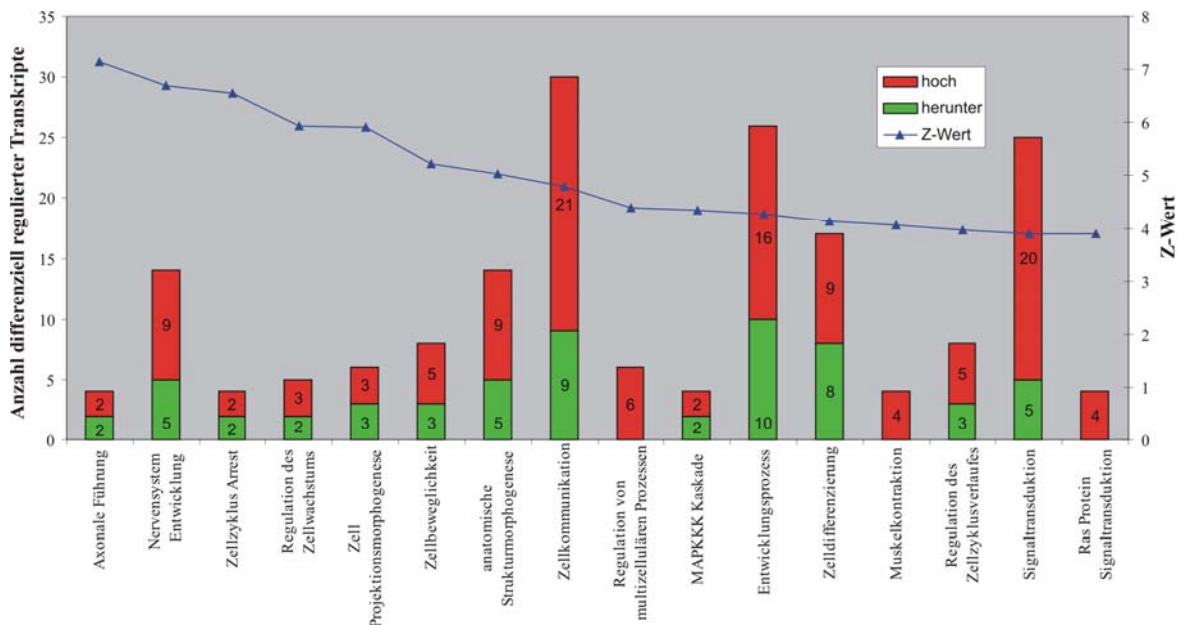


Abbildung 3.3: GO-Kategorisierung der differenziell regulierten Gene

Die differenziell regulierten Gene, nach der Repression von LRRK2 in SH-SY5Y-Zellen, wurden nach ihrer GO-Funktion in Kategorien aufgeteilt. Die Anzahl der veränderten Gene jeder Kategorie sind als Balken (grün = reprimiert, rot = hochreguliert) dargestellt. Der für jede Kategorie spezifische Z-Wert ist als Dreieck dargestellt (Häbig et al., 2008).

Die höchste Signifikanz (Z-Wert 7,1) erreicht die Kategorie „Axonale Führung“ mit den vier differenziell regulierten Transkripten *APBB2* (*amyloid beta [A4] precursor protein-binding, family B, member 2*; „Fold Change“ 1,789; p-Wert 0,002), *GNAO1* (*guanine nucleotide binding protein alpha activating activity polypeptide O*; 1,762; 0,004), *SEMA4F* (*semaphorin 4F*; -1,611; 0,002) und *CXCR4* (*chemokine [C-X-C motif] receptor 4*; -1,912; 0,002). Die zweithöchste Signifikanz (Z-Wert 6,6) erreicht die Kategorie „Nervensystem Entwicklung“ mit 14 differenziell regulierten Genen. In den drei Kategorien „Zellkommunikation“ (30), „Entwicklungsprozesse“ (26) und „Signaltransduktion“ (25) sind die meisten differenziell regulierten Transkripte dieser Analyse angesiedelt.

Besonders hervorzuheben sind die vier differentiell regulierten Transkripte in der GO-Kategorie MAPKKK-Kaskade: *CAMKK2* (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta*; 1,829; 0,048), *FGF2* (*fibroblast growth factor 2 [basic]*; 1,596; 0,027), *CXCR4* (1,912; 0,002) und *ZAK* (*sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK*; -1,987; 0,048). Des Weiteren konnten vier Transkripte dieser Analyse der Ras Protein Signaltransduktion zugeordnet werden. Unter ihnen befinden sich neben *FGF2* drei hochregulierte Guanidin-Austauschfaktoren: *ARHGEF7* (*Rho guanine nucleotide exchange factor [GEF] 7*; 2,007; 0,022), *ARHGEF9* (1,582; 0,048) und *ARHGEF12* (1,56; 0,009). Die Auflistung aller differentiell regulierten Transkripte in allen beeinflussten GO-Kategorien wird im Zusatzmaterial 2 der Publikation von Häbig et al. zur Verfügung gestellt (Habig et al., 2008).

Die Nutzung der Ingenuity Pathways Analysis Software (Ingenuity Systems) ermöglicht die Einordnung der differentiell regulierten Transkripte eines Datensatzes in kanonische Netzwerke (siehe 2.2.6.2). Es war möglich 151 der 187 differentiell regulierten Transkripte in die Software zu implementieren und 84 von diesen konnten kanonische Netzwerke zugeordnet werden. Es wurden acht beeinflusste kanonische Netzwerke mit einem $-\log(p\text{-Wert}) \geq 0,98$ und einem Ratio $\geq 0,017$ identifiziert (Abbildung 3.4).

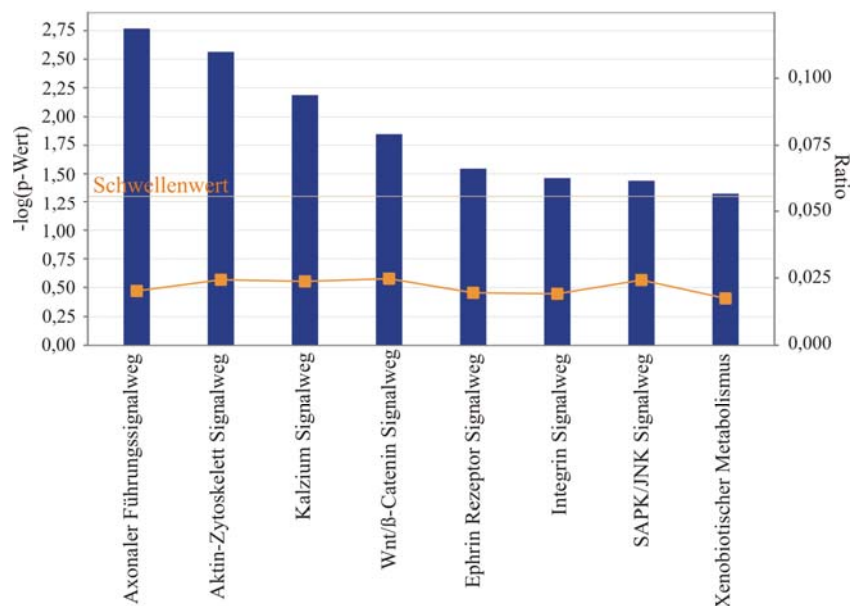


Abbildung 3.4: Differenziell regulierte Gene in kanonischen Netzwerken

Die Analyse der kanonischen Netzwerke, welche durch die LRRK2-Reduktion in SH-SY5Y-Zellen beeinflusst wurden, erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software. Der Fischer's Exact Test wurde benutzt, um einen p-Wert zu errechnen (Balken). Als Ratio (Quadrat) wird das Verhältnis der Anzahl der differentiell regulierten Gene in dem kanonischen Netzwerk zu der Gesamtanzahl der Gene, welche dieses Netzwerk bilden, dargestellt (Habig et al., 2008).

Hierbei ist hervorzuheben, dass vier beeinflusste kanonische Netzwerke für die Aufrechterhaltung des Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung sind: „Axonaler Führungssignalweg“, „Aktin-Zytoskelett-Signalweg“, „Ephrin Rezeptor Signalweg“ und

„Integrin Signalweg“. In all diesen Netzwerken ist das hochregulierte Transkript *CDC42* (*cell division cycle 42*; 2,47; 0,01) vertreten.

Zusätzlich hat es auch Funktionen im SAPK/JNK-Signalweg. Der hochregulierte Guanidin-Austauschfaktor *ARHGEF7* (2,007; 0,022) beeinflusst die Zytoskelett-Signalwege: „Axonaler Führungssignalweg“, „Aktin-Zytoskelett-Signalweg“ und den „Integrin Signalweg“.

Auch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei axonaler Führung und bei dem Auswachsen von Neuriten (Endo und Rubin, 2007). Durch die Repression von LRRK2 sind vier Transkripte dieses Signalweges in ihrer Expression beeinflusst. Zu ihnen gehören *PPP2R2A* (*Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha isoform*; 1,594; 0,0003), *CSNK1G1* (*casein kinase 1, gamma 1*; 1,863; 0,016), *DVL2* (*dishevelled, dsh homolog 2*; 1,528; 0,003) und *GNAO1* (1,762; 0,004). Besonders hervorzuheben ist im Ephrin-Rezeptor-Signalweg das differentiell regulierte Transkript *EFNB2* (*ephrin-B2*; 1,524; 0,029). Im Integrin-Signalweg ist ein entscheidendes differentiell reguliertes Transkript *ITGB5* (*integrin, beta 5*; 1,832; 0,0007).

3.1.2.2 Netzwerk-Analyse

Die Ingenuity Pathways Analysis Software (Ingenuity Systems) wurde zusätzlich genutzt, um Verbindungen zwischen den differentiell regulierten Transkripten zu erkennen und in Netzwerken aufzuzeigen (siehe 2.2.6.2). Hierbei konnten von den 151 implementierbaren, differentiell regulierten Transkripten des Datensets 88 in Netzwerke verknüpft werden.

Das erste erstellte Netzwerk (Abbildung 3.5) zeigt den Einfluss der LRRK2-Reduktion auf differentiell regulierte Transkripte in Apoptose-Signalkaskaden. Ein Hauptmediator dieses Netzwerkes ist das in diesem Datenset nicht regulierte *TP53* (*tumor protein p53*).

Auffallend ist, dass acht reprimierte Transkripte (*MGMT* [*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*], *RRM2B* [*ribonucleotide reductase M2 B*], *MPHOSPH9* [*M-phase phosphoprotein 9*], *ING3* [*inhibitor of growth family, member 3*], *NDN* [*necdin homolog*], *ZMAT3* [*p53 target zinc finger protein*], *TDG* [*thymine-DNA glycosylase*], *AUH* [*AU RNA binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase*]) als auch zehn hochregulierte Transkripte (*NQO1* [*NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*], *MAP4* [*microtubule-associated protein 4*], *PDE4B* [*phosphodiesterase 4B*], *CCDC99* [*coiled-coil domain containing 99*], *CHD3* [*chromodomain helicase DNA binding protein 3*], *CDC42* [*cell division cycle 42*], *NFE2L3* [*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3*], *SEPT6* [*septin 6*], *RAG2* [*recombination activating gene 2*], *PTBP2* [*polypyrimidine tract binding protein 2*]) von *TP53* direkt oder indirekt beeinflusst werden können oder dieses beeinflussen.

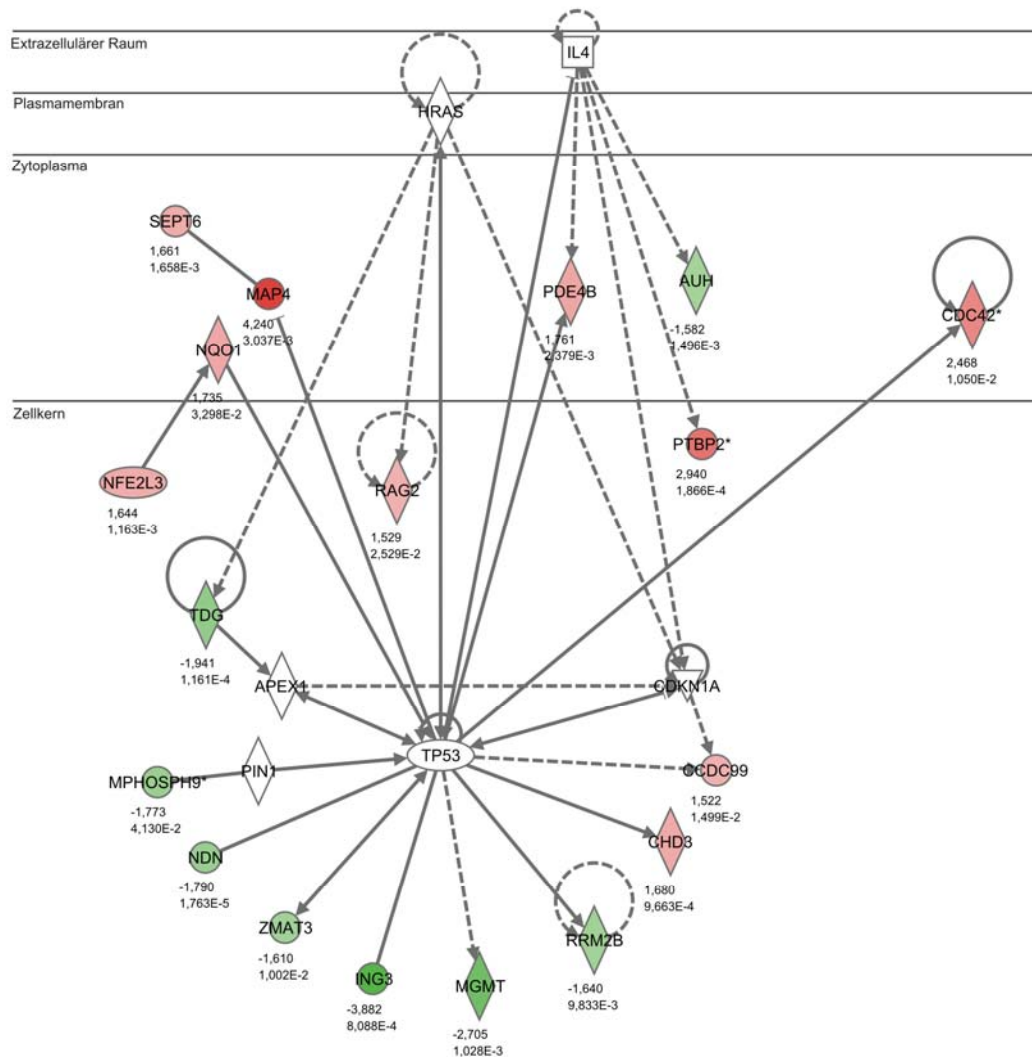


Abbildung 3.5: Netzwerk 1 - Einfluss von LRRK2 in Apoptose-Signalkaskaden

Das Netzwerk wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt und besteht aus 24 Genen, von denen nach LRRK2-Reduktion in SH-SY5Y-Zellen zehn hochreguliert (rot) und acht reprimiert (grün) sind. Sechs nicht regulierte Gene wurden in das Netzwerk integriert, um Verbindungen zwischen den differenziell regulierten Genen herzustellen. Der „Fold Change“ und der p-Wert der Mikroarray-Analyse sind unter den Gensymbolen dargestellt. (Habig et al., 2008)

Das Netzwerk um *TP53* hat über *CDC42* und *MAP4* auch Verbindung zu zytoskelettären Signalkaskaden. Das Netzwerk in Abbildung 3.6 zeigt die differenziell regulierten Transkripte, welche durch die Reduktion von LRRK2 auf zytoskelettäre Signalwege Einfluss haben könnten.

Die prominenten Hauptmediatoren in diesem Netzwerk sind *CDC42*, *ARHGEF7* und *FGF2*. Es zeigt sich der Einfluss von *FGF2* auf Transkripte mit G-Protein gekoppelter Rezeptor-Aktivität in der Plasmamembran: *CHRM3* (cholinergic receptor, muscarinic 3; 1,877; 0,0006) und *CXCR4* (chemokine [C-X-C motif] receptor 4; -1,911; 0,002). Betrachtet man beide Proteine im Hinblick auf kanonische Netzwerke, so spielt *CXCR4* eine Rolle bei axonaler Führung und dem Ephrin-Rezeptor-Signalweg und *CHRM3* hat Einfluss auf den Aktin-Zytoskelett-Signalweg.

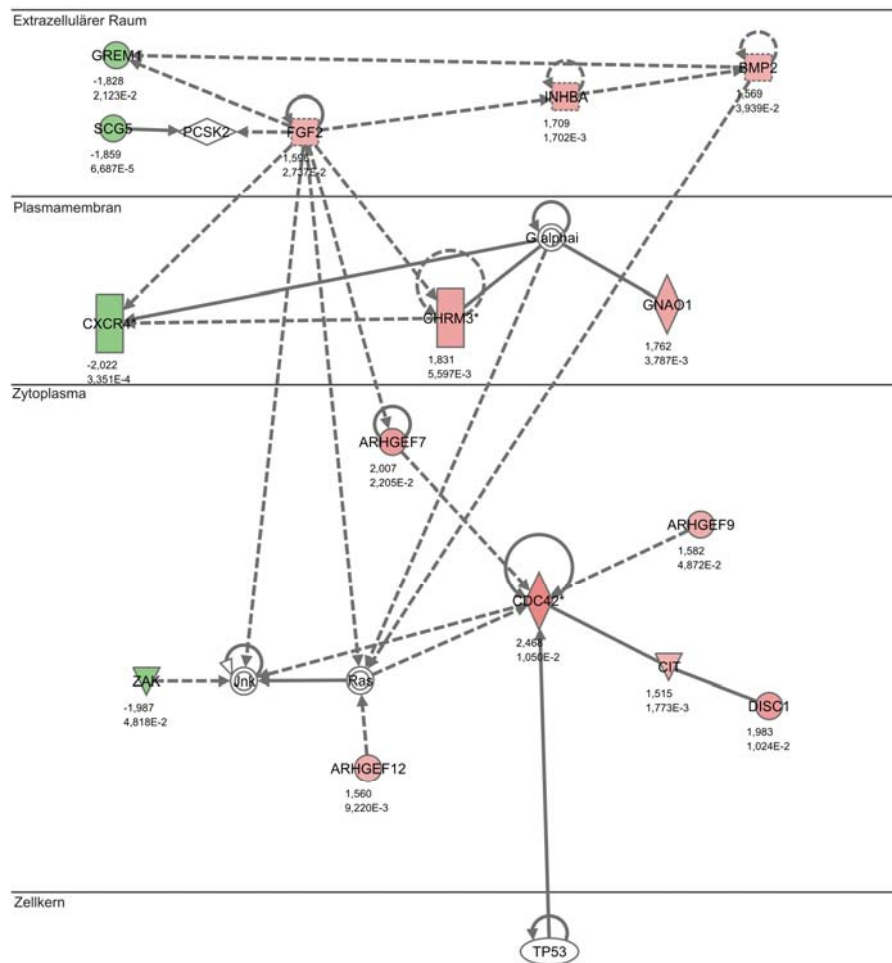


Abbildung 3.6: Netzwerk 2 - Einfluss von LRRK2 in Zytoskelett-Signalkaskaden

Das Netzwerk wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt und besteht aus 20 Genen, von denen nach LRRK2-Reduktion in SH-SY5Y-Zellen elf hochreguliert (rot) und vier reprimiert (grün) sind. Fünf nicht regulierte Gene wurden in das Netzwerk integriert, um Verbindungen zwischen den differentiell regulierten Genen herzustellen. Der „Fold Change“ und der p-Wert der Mikroarray-Analyse sind unter den Gensymbolen dargestellt. (Habig et al., 2008)

Im extrazellulären Raum sind die Transkripte *SCG5* (*secretory granule neuroendocrine protein 1*; -1,86; 0,00007), *INHBA* (*inhibin beta A*; 1,71; 0,002), *GREM1* (*gremlin 1*; -1,83; 0,02) and *BMP2* (*bone morphogenetic protein 2*; 1,568; 0,039) durch die Reduktion von LRRK2 dereguliert. Jedes der vier Transkripte ist direkt oder indirekt mit *FGF2* verknüpft. Die Regulationskaskaden um *FGF2* beeinflussen auch Transkripte im Zytoplasma. So liegt der direkt mit *FGF2*-assoziierte *ARHGEF7* hochreguliert vor. *ARHGEF7* ist ein Guanidin-Austauschfaktor für die kleine GTPase *CDC42*, welche ebenfalls nach Reduktion von LRRK2 hochreguliert wird. *CDC42* kann auch durch *ARHGEF9* beeinflusst werden. Dieser Guanidin-Austauschfaktor ist ebenso hochreguliert. Dies gilt auch für *ARHGEF12*, welches der Guanidin-Austauschfaktor der kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie ist. Aufgrund der vielfältigen zytoskelettären Regulationskaskaden können nicht alle Gene dieser Prozesse, welche der Knockdown von LRRK2 beeinflusst hat, in das Netzwerk implementiert werden. Die Tabelle 3.1 stellt einen Überblick der zwei reprimierten und 20 hochregulierten Transkripte mit zytoskelettärem Einfluss dar.

Tabelle 3.1: Differenziell regulierte Gene nach LRRK2-RNAi mit Einfluss auf Zytoskelett-Signalkaskaden

Gen Symbol	Gen Name	Affymetrix -ID	„Fold Change“	p-Wert	Prozess	Quelle
APBB2	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)	213419_at	1,789	0,0021	Aktinfilament basierte Bewegung	(Standen et al., 2003)
ARHGEF12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	201335_s_at	1,56	0,0092	Signalweiterleitung von Semaphorin-Rezeptoren, Aktivierung von Rho, Reorganisation des Zytoskeletts	(Aurandt et al., 2002)
ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	242999_at	2,007	0,0221	Aktivierung von Rac1 und CDC42, Bindung von PAKs, Neuriten Wachstum	(Feng et al., 2006; Manser et al., 1998)
ARHGEF9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	203264_s_at	1,582	0,0487	Aktivierung von CDC42	(Reid et al., 1999)
ARGBP2	Sorbin and SH3 domain containing 2	227826_s_at	1,7767	0,002	Gerüstprotein zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts	(Cestra et al., 2005)
BMP2	bone morphogenetic protein 2	205289_at	1,569	0,0394	Aktivierung von Integrinen, Stimulierung von Dendriten-Initiation	(Hocking et al., 2008; Lai et al., 2008)
CACNA1G	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit	210380_s_at	1,589	0,0039	Wichtiger Kanal zur Auslösung eines Aktionspotentials	(Chemin et al., 2002)
CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	210787_s_at	1,829	0,0485	Aktivierung von CaMK, welche mit neuronalen Transkriptionskaskaden und synaptischer Plastizität assoziiert sind.	(Wayman et al., 2008)
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	210232_at	2,468	0,0105	Reaktion auf extrazelluläre Stimuli, Organisation des Aktin-Zytoskeletts, Polymerisierung von Aktin, Filopodien-Bildung	(Koh, 2006)
CHRM3	cholinergic receptor, muscarinic 3	1559633_a_at	1,831	0,0056	Rezeptor für Acetylcholin, Aktivierung von Rho und Integrinen	(Chernyavsky et al., 2004)
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	209201_x_at	-2,022	0,0003	Bindung des CXCL12 Liganden führt zu zytoskelettaler Reorganisation, erhöhte Integrin-Expression	(Patrussi und Baldari, 2008)
EFNB2	ephrin-B2	202668_at	1,549	0,0003	Ligand für Ephrin-Rezeptoren, axonale Führung, synaptische Plastizität	(Grunwald et al., 2004)
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	204421_s_at	1,596	0,0274	Neuronale Differenzierung, Neuriten Wachstum	(Shin et al., 2006; Shin et al., 2004; Yang et al., 2008)
GNAO1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	204762_s_at	1,762	0,0038	Zytoskelettäre Reorganisation	(Vanhuwe et al., 2002)
ITGB5	integrin, beta 5	201124_at	1,832	0,0007	Zelladhäsionsrezeptor wichtig für axonale Führung	(Huber et al., 2003)
KIF21B	kinesin family member 21B	204411_at	1,547	0,0056	Mikrotubuli basierter Transport von synaptischen Vesikeln	(Nakamura et al., 2002)
MAP4	microtubule-associated protein 4	235066_at	4,240	0,003	Mikrotubuli Stabilisierung	(Holmfeldt et al., 2003; Iida et al., 2002)
PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	201957_at	2,091	0,0023	Regulation von Myosin	(Hartshorne et al., 1998)
SEMA4F	semaphorin 4F	210124_x_at	-1,611	0,0015	Axonale Führung, Regulation von glutamergen Synapsen	(Schultze et al., 2001)
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	206117_at	1,792	0,026	Stabilisierung von Aktinfilamenten	(Ishikawa und Kohama, 2007)
TPM3	tropomyosin 3	224164_at	1,628	0,0135		
TPM4	tropomyosin 4	209344_at	2,535	0,0001		

3.1.2.3 Validierung des Mikroarray-Experiments der LRRK2-Knockdown-Zellen

Die Validierung der 16 differenziell regulierten Transkripte des LRRK2-RNAi-Mikroarray-Experiments erfolgte mittels qRT-PCR (siehe 2.2.8). Diese Transkripte stehen in biologischem Zusammenhang zueinander, was in Abbildung 3.7 verdeutlicht wird.

Zur Normalisierung wurde das Transkriptionsniveau von *PDHB* (*pyruvate dehydrogenase beta*) genutzt, da dieses im Vergleich zu *SDHA* (*succinate dehydrogenase complex, subunit a*) über den GeNorm Algorithmus sich als das bessere Referenzgen herausstellte. Es konnten 14 von 16 Transkripten in ihrer Expressionsregulation bestätigt werden (Abbildung 3.8). Damit wurde im Vergleich zum Mikroarray-Experiment eine Validierungsrate von 87,5% erreicht.

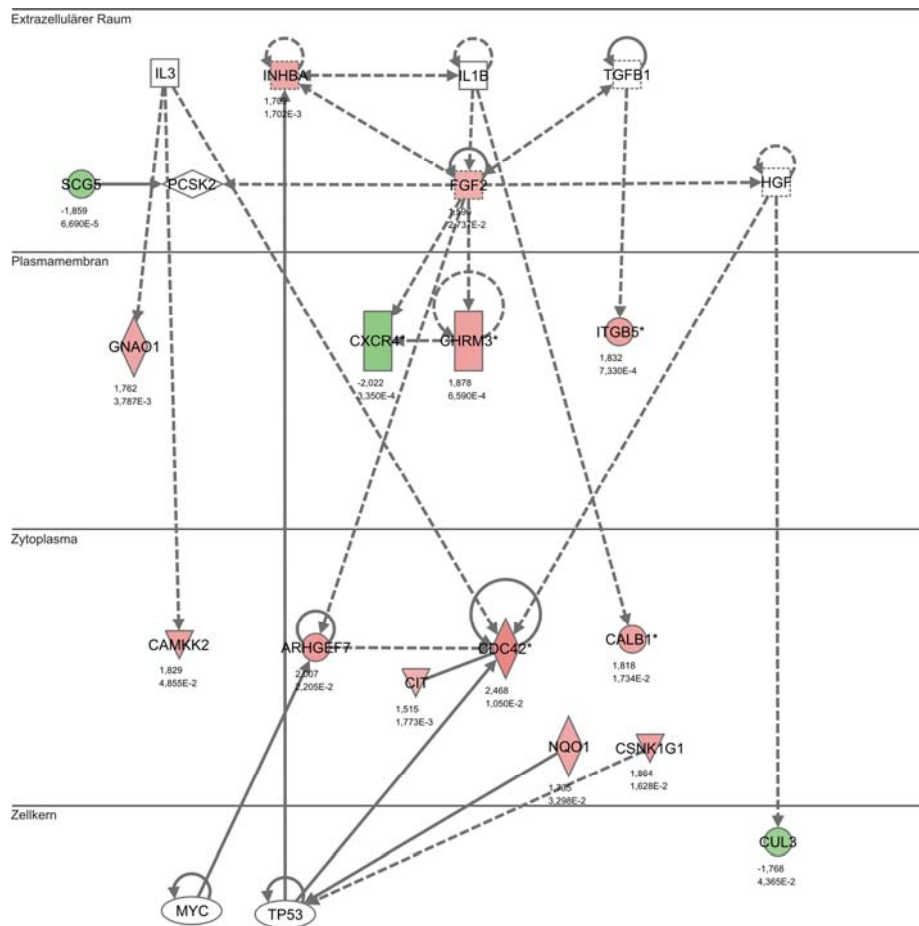


Abbildung 3.7: Netzwerk der Validierung mit qRT-PCR

Das Netzwerk wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt und besteht aus 22 Genen, von denen nach LRRK2-Reduktion in SH-SY5Y-Zellen zwölf hochreguliert (rot) und drei reprimiert (grün) sind. Sieben nicht regulierte Gene wurden in das Netzwerk integriert, um Verbindungen zwischen den differenziell regulierten Genen herzustellen. Der „Fold Change“ und der p-Wert der Mikroarray-Analyse sind unter den Gensymbolen dargestellt. 16 der dargestellten Transkripte wurden für die qRT-PCR Validierung (Abbildung 3.8) genutzt (Habig et al., 2008).

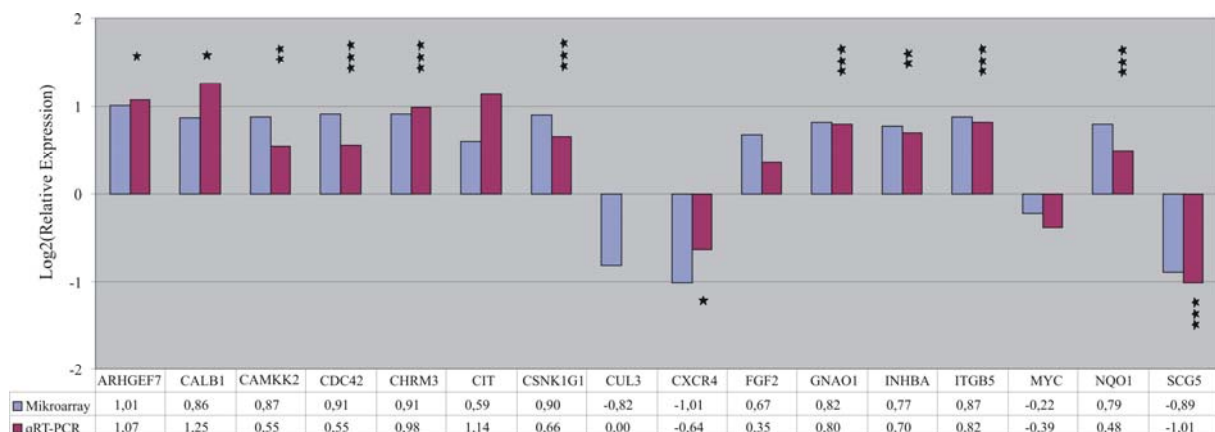


Abbildung 3.8: Validierung mit qRT-PCR

16 Transkripte aus dem Validierungsnetzwerk (Abbildung 3.7) wurden für die Validierung mit qRT-PCR genutzt. Dargestellt ist der Log2 der relativen Expression dieser 16 Transkripte von siLRRK2 behandelten SH-SY5Y-Zellen in Bezug zu control siRNA-behandelten Zellen mit PDHB als Referenzen. Die mit der Mikroarray-Analyse gemessene Expression konnte bei 14 der 16 Transkripte (außer CUL3, MYC) bestätigt werden (Habig et al., 2008). *p-Wert ≤ 0.05 **p-Wert ≤ 0.01 ***p-Wert ≤ 0.001

Betrachtet man die Expression von *FGF2*, so konnte die Hochregulation im Mikroarray-Experiment über die qRT-PCR validiert werden, zeigte jedoch nicht den gleichen Umfang. Die nicht validierten Transkripte sind *CUL3* (*cullin 3*) und *MYC* (*oncogene myc*). Im Mikroarray-Experiment wurde keine signifikante Veränderung der *MYC*-Expression in LRRK2-reprimierten Zellen festgestellt. Die qRT-PCR zeigte allerdings eine tendenzielle Repression dieses Transkriptes.

Diese Analyse stellte heraus, dass im humanen Zellkulturmodell mit Hilfe von RNAi LRRK2 in seiner Expression reduziert werden kann. Betrachtet man die Transkripte, welche auf die Repression von LRRK2 reagieren, so haben diese Einfluss auf zytoskelettäre Signalkaskaden sowie apoptotische Prozesse der Zelle.

3.2 Zellkulturbasierte Analyse von LRRK2-Knockdown-Zellen

3.2.1 LRRK2-Expression unter Stressbedingungen

Der Knockdown von LRRK2 mit Hilfe von RNAi konnte aufzeigen, dass besonders Apoptose-Signalkaskaden und zytoskelettäre Signalwege durch den Verlust von LRRK2 beeinflusst werden. Um diese genauer zu analysieren wurden acht verschiedene Stress induzierende Toxine und ihre Wirkung auf die dopaminerge humane SH-SY5Y Zelllinie betrachtet (für Konzentrationsangaben und Einwirkzeit der Toxine siehe 2.1.10.1). Mit Hilfe der qRT-PCR wurde zunächst das *LRRK2* Transkriptionsniveau unter Gabe dieser Toxine untersucht (Abbildung 3.9).

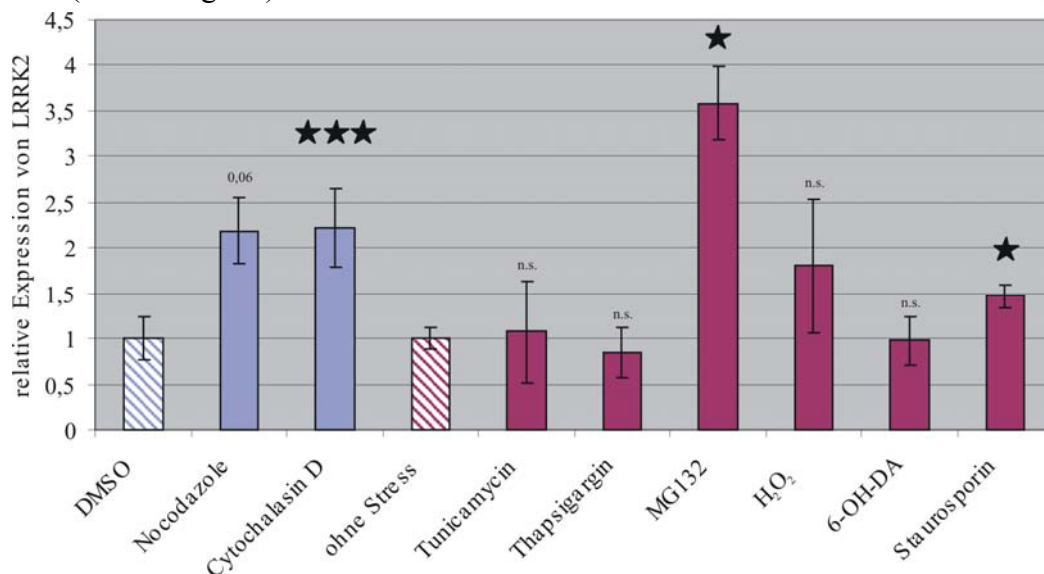


Abbildung 3.9: LRRK2-Expression unter Stress-induzierenden Toxinen

Analyse der *LRRK2*-Expression in Stress induzierten SH-SY5Y-Zellen in Bezug zu SH-SY5Y-Zellen ohne Stressinduktion über qRT-PCR. Die Toxine Nocodazole und Cytochalasin D sind in DMSO gelöst (blauer Balken) und die *LRRK2*-Expression wird in Relation zu DMSO behandelten Zellen betrachtet. Alle weiteren Toxine (roter Balken) sind in H₂O gelöst und werden auf H₂O behandelte Zellen bezogen. *PDHB* wurde zur Normalisierung genutzt. Konzentrationsangaben und Einwirkzeiten siehe 2.1.10.1. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten (\pm SEM). n.s.= nicht signifikant; *p-Wert $\leq 0,05$; ***p-Wert $\leq 0,001$ (Student's T-Test)

Es zeigte sich, dass die ER-Stress auslösende Toxine Tunicamycin und Thapsigargin keine Expressionsveränderung von *LRRK2* induzieren. Ebenso können die oxidativen Stressauslösenden Substanzen 6-OH-DA und H₂O₂ keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *LRRK2* auslösen. Eine deutliche und signifikante Erhöhung der *LRRK2*-Transkriptmenge auf eine relative Expression von 3,58 (±0,39) in Bezug zu SH-SY5Y-Zellen ohne Stresseinwirkung konnte durch den Proteasom-Inhibitor MG132 erreicht werden. Auch der unspezifische Kinase-Inhibitor Staurosporin führte zu einer schwach (1,46 ± 0,13), aber signifikant erhöhten relativen Expression von *LRRK2*.

Betrachtet man die Wirkung der Zytoskelett beeinflussenden Toxine Nocodazole (n= 3) und Cytochalasin D (n= 4), so führen beide Toxine zu einer erhöhten Expression (2,19 ± 0,37; 2,22 ± 0,43) von *LRRK2*. Die Expressionserhöhung unter dem Mikrotubulidepolymerisierenden Nocodazole verpasst mit einem p-Wert von 0,06 die Signifikanzschwelle. Unter dem Aktinfilamente-depolymerisierenden Toxin Cytochalasin D hingegen, erreicht die erhöhte *LRRK2*-Expression einen signifikanten p-Wert.

3.2.2 *LRRK2*-Knockdown und sein Einfluss auf Apoptose

Nachfolgend stellt sich die Frage, ob eine Reduktion von *LRRK2* nicht nur zu einer Expressionsveränderung bestimmter Apoptose-assoziierten Transkripte, sondern auch zu einer Veränderung der Apoptoserate von SH-SY5Y-Zellen führt. Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA Assays (Roche) kann die Menge apoptotischer Zellen über die Menge der bei Apoptoseprozessen frei werdenden Nukleosomen colorimetrisch bestimmt werden (siehe 2.2.10). Ohne Stressinduktion führt die Reduktion von *LRRK2* durch RNAi, verglichen zu control siRNA-behandelten SH-SY5Y-Zellen, zu keiner signifikant veränderten Apoptosemenge (Abbildung 3.10).

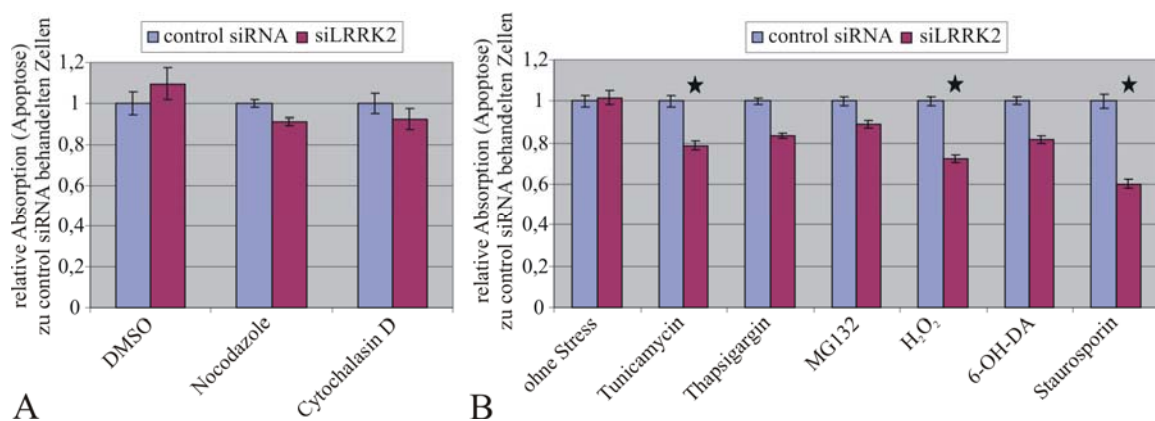


Abbildung 3.10: Apoptose-Analyse unter *LRRK2*-Knockdown und Stress-induzierenden Toxinen

A: Relative Apoptoserate unter zytoskelettalem Stress durch Nocodazole und Cytochalasin D

B: Relative Apoptoserate unter ER-Stress durch Tunicamycin und Thapsigargin, proteasomalem Stress durch MG132, oxidativem Stress durch H₂O₂ und 6-OH-DA und dem Kinase-Inhibitor Staurosporin.

Die Analyse erfolgte mit dem Cell Death Detection ELISA Assays (Roche) in drei unabhängigen Experimenten (±SEM). Die Messung der Absorption bei 405 nm in siLRRK2-transfizierten SH-SY5Y-Zellen wird in Relation zu control siRNA-transfizierten Zellen unter den gleichen Stressbedingungen betrachtet. Die statistische Signifikanzberechnung dieses Vergleiches erfolgte mit dem Student's T-Test. Konzentrationsangaben und Einwirkzeiten der Toxine siehe 2.1.10.1. *p-Wert ≤ 0,05

Um zu analysieren, ob der Verlust von LRRK2 bei Stressbedingungen die Apoptoseprozesse der Zelle beeinflussen kann, wurde diese Analyse unter den schon in 3.2.1 benutzten Toxinen wiederholt. Es konnte gezeigt werden, dass die RNAi-vermittelte Reduktion von LRRK2 unter den Toxinen so effektiv möglich ist wie ohne Stressbedingungen (Daten nicht gezeigt). Die Nutzung der zytoskelettären Stressoren Nocodazole und Cytochalasin D hat unter LRRK2-Repression im Vergleich zu control siRNA-behandelten Zellen keinen Einfluss auf die Menge der apoptotischen Zellen (Abbildung 3.10 A). Die Verwendung der ER-Stress-auslösenden Toxine Tunicamycin und Thapsigargin führt zu einer Reduktion der Apoptose in LRRK2-reprimierten Zellen (Abbildung 3.10 B). Dabei erreicht aber nur die 21,2%ige Reduktion ($\pm 2,3\%$) der Apoptose in Tunicamycin-gestressten und LRRK2-reduzierten Zellen im Vergleich zu Tunicamycin-gestressten, control siRNA-behandelten Zellen eine Signifikanz. Die Apoptoserate unter proteasomalem Stress durch MG132 zeigt keinen signifikanten Einfluss unter LRRK2-Reduktion. Setzt man SH-SY5Y-Zellen oxidativem Stress durch H_2O_2 oder 6-OH-DA aus und reduziert die LRRK2-Expression, so zeigt sich, dass im Vergleich zu Zellen mit normalem LRRK2-Niveau weniger Zellen apoptotisch reagieren. Eine signifikante Reduktion um 27,7% ($\pm 1,8\%$) ist dabei bei H_2O_2 als Stress-Induktor zu erkennen. Die stärkste signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen (39,7% \pm 2,2%) kann erreicht werden, wenn zusätzlich zur Reduktion von LRRK2 noch Kinasen durch Staurosporin gehemmt werden.

3.2.3 Transkriptbasierte Analyse des LRRK2-Knockdowns

Die signifikante Reduktion apoptotischer Zellen unter bestimmten Stressbedingungen bei gleichzeitiger LRRK2-Reduktion wirft die Frage auf, welche Transkripte apoptotischer Signalkaskaden eine veränderte Regulation zeigen. Die Mikroarray-Analyse detektierte eine LRRK2 KD-vermittelte Reduktion der *MAPK8*, ohne dass Stress induziert wurde. Zusätzlich wurde durch den LRRK2-Verlust eine Hochregulation von *FGF2*, *ARHGEF7* und *CDC42* ausgelöst. In Abbildung 3.11 wird verdeutlicht, in welche apoptotischen Signalwege diese vier differentiell regulierten Transkripte eingreifen.

Anschließend soll das Expressionsniveau dieser vier Transkripte sowie die Expression zusätzlicher Transkripten, mit Hilfe der qRT-PCR (siehe 2.2.8) unter Stressinduktion und LRRK2-Repression analysiert werden. Dabei werden die Stressarten betrachtet, welche unter LRRK2-Reduktion zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose führten: H_2O_2 , Tunicamycin und Staurosporin (siehe 3.2.2).

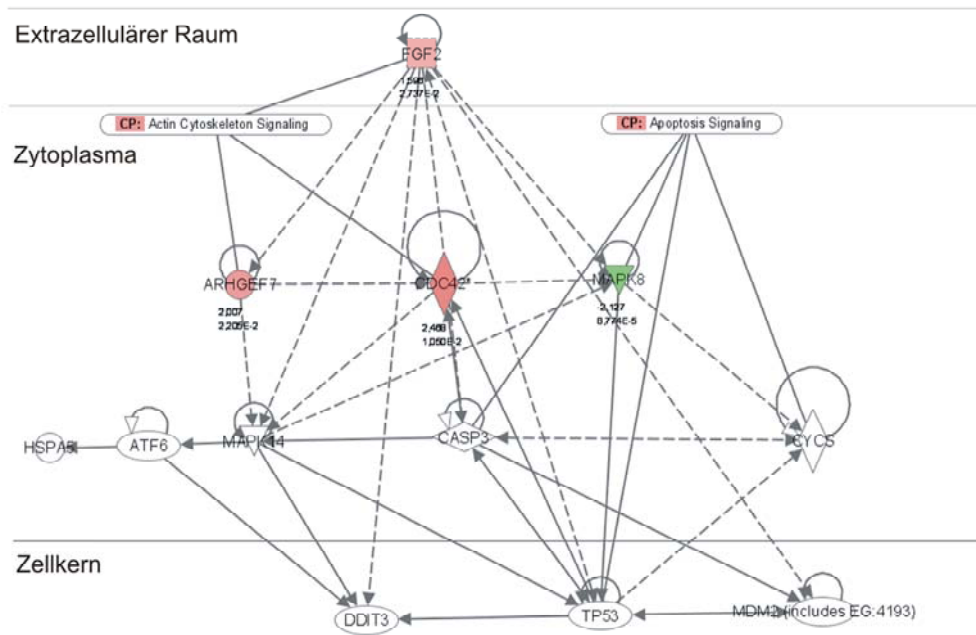


Abbildung 3.11: Netzwerk zur Analyse apoptotischer Signalkaskaden

Das Netzwerk wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt und besteht aus zwölf Genen, von denen nach LRRK2-Reduktion in SH-SY5Y-Zellen drei hochreguliert (rot) und eines reprimiert (grün) sind. Acht nicht regulierte Gene wurden in das Netzwerk integriert, um Verbindungen zwischen den differentiell regulierten Genen darzustellen. Der Einfluss von Genen in die kanonischen Netzwerke (CP) der Apoptose Signalkaskade und des Aktin-Zytoskelett-Signalwegs sind verdeutlicht. Der „Fold Change“ und der p-Wert der Mikroarray-Analyse sind unter den Gensymbolen dargestellt.

Die Analysen wurden in drei unabhängigen Replikaten durchgeführt und es wurde ermittelt (siehe Abbildung 3.12) wie sich Toxin.gestresste, control siRNA-behandelte SH-SY5Y-Zellen (schwarz weißer Balken) im Vergleich zu ungestressten, control siRNA-behandelten Zellen (schwarzer Balken) verhalten. Der Vergleich dieser Regulation mit der Regulation gestresster LRRK2-reduzierter SH-SY5Y-Zellen (grau weißer Balken) in Relation zu ungestressten, LRRK2-reduzierten SH-SY5Y-Zellen (grauer Balken) zeigt, ob LRRK2 einen Einfluss auf eines der gemessenen Transkripte ausübt.

$$\frac{\text{norm. Expression control siRNA + Toxin} \quad \square}{\text{norm. Expression control siRNA} \quad \blacksquare} \quad \text{im Vergleich zu} \quad \frac{\text{norm. Expression LRRK2 siRNA + Toxin} \quad \square}{\text{norm. Expression LRRK2 siRNA} \quad \blacksquare}$$

Abbildung 3.12: Berechnung der relativen Expressionen der Transkripte bei Stressinduktion

Zur Berechnung der normalisierten (norm.) Expression der Transkripte in jeder Bedingung wurde das Referenzgen *PDHB* genutzt. Ansonsten wurde die Berechnung wie in 2.2.8.3 beschrieben durchgeführt.

Zunächst wird der Effekt von H₂O₂-vermitteltem, oxidativem Stress bei gleichzeitiger LRRK2-Reduktion untersucht (Abbildung 3.13).

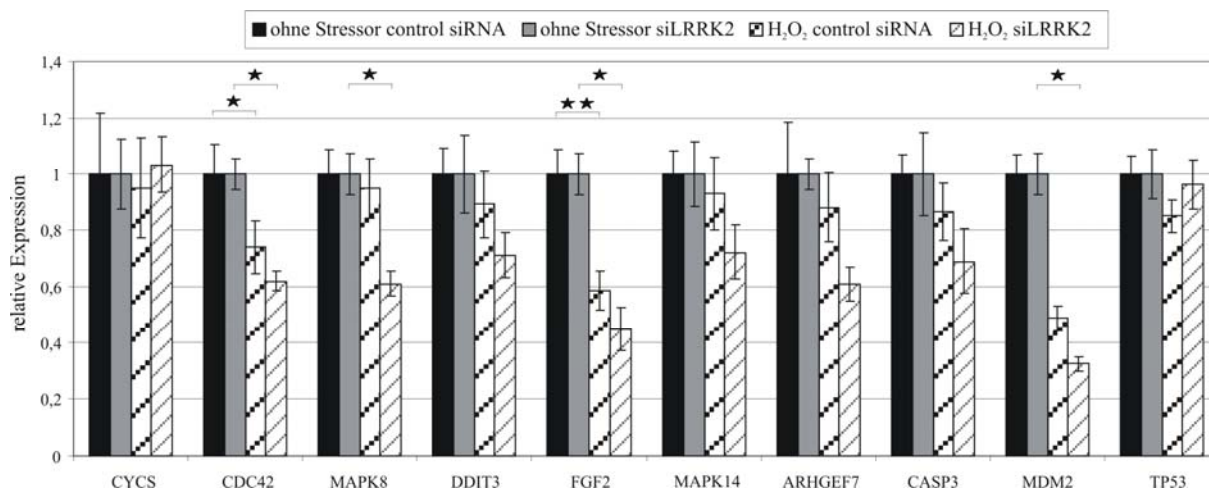


Abbildung 3.13: qRT-PCR nach LRRK2-Knockdown und oxidativem Stress

SH-SY5Y-Zellen wurden für 4 h mit 250 μ M H₂O₂ als Induktor für oxidativen Stress behandelt. Die relative Expression von zehn Transkripten wurde mit qRT-PCR analysiert (drei unabhängige Replikate \pm SEM). Dabei ist zum einen die relative Expression von control siRNA-behandelten Zellen mit H₂O₂ (schwarz weiß) in Bezug zu control siRNA-behandelten Zellen ohne Stress (schwarz) dargestellt. Zum anderen zeigt die Abbildung die gleiche Relation zwischen H₂O₂-gestressten (grau weiß) und ungestressten (grau) Zellen bei LRRK2-Reduktion durch siLRRK2. *PDHB* wurde zur Normalisierung genutzt. *p-Wert \leq 0,05; **p-Wert \leq 0,01 (Student's T-Test)

Die Transkription von *CYCS* (*cytochrome c, somatic*) und *TP53* (*tumor protein p53*) liegt in allen Bedingungen unverändert vor. Der H₂O₂-Stress hingegen reduziert die Expression von *CDC42* und *FGF2* unter control siRNA- und siLRRK2-Behandlung. Eine mehr als 15%ige Reduktion der Expression zwischen control siRNA-Behandlung mit H₂O₂-Stress und LRRK2-Reduktion mit H₂O₂-Stress liegt bei den Transkripten *DDIT3* (oder *CHOP*, *GADD153*, *DNA-damage-inducible transcript 3*; -18,1%), *CASP3* (*caspase 3*; -17,4%) und *MDM2* (*Mdm2 p53 binding protein*; -16,3%) vor. Noch deutlicher ausgeprägt zeigt sich dieser Unterschied in der Transkription der *MAPK8* (*mitogen-activated protein kinase 8*; -33,7%), *MAPK14* (oder *p38 Mapk*, *mitogen-activated protein kinase 14*; -20,6%) und *ARHGEF7* (-27,0%).

Nachfolgend wurde der Effekt von Tunicamycin-vermitteltem ER-Stress bei gleichzeitiger LRRK2-Reduktion untersucht (Abbildung 3.14). Dabei wurde statt *MDM2* die Transkription von *HSPA5* (oder *BIP*, *heat shock 70kDa protein 5*) gemessen, da dieses in engerem Zusammenhang zu ER-Stress-vermittelter Apoptose steht.

In control siRNA-behandelten Zellen führt ER-Stress durch Tunicamycin (schwarz weiß) im Vergleich zu control siRNA-behandelten Zellen ohne Stress (schwarz) zu einer Steigerung der Expression der Transkripte *MAPK8*, *MAPK14*, *ARHGEF7*, *CASP3*, *TP53*, *DDIT3* und *HSPA5*. Die Transkription von *CYCS*, *CDC42* und *FGF2* hingegen reduziert sich in diesem Vergleich. Betrachtet man nachfolgend das Expressionsniveau dieser Transkripte bei LRRK2-Reduktion im Vergleich zu Tunicamycin-Behandlung (grau weiß) und keiner Stressinduktion (grau), so zeigt sich nur bei *CYCS* und *TP53* eine ähnliche Expressionsveränderung wie bei control siRNA-behandelten Zellen. Bei *CDC42* kommt es im Vergleich zu control siRNA-

Behandlung mit Tunicamycin bei der LRRK2-Reduktion mit Tunicamycin-Stress zu einem Unterschied von -20,4%. Die *FGF2*-Expression ist in diesem Vergleich in LRRK2-reduzierten Zellen um 18,2% geringer.

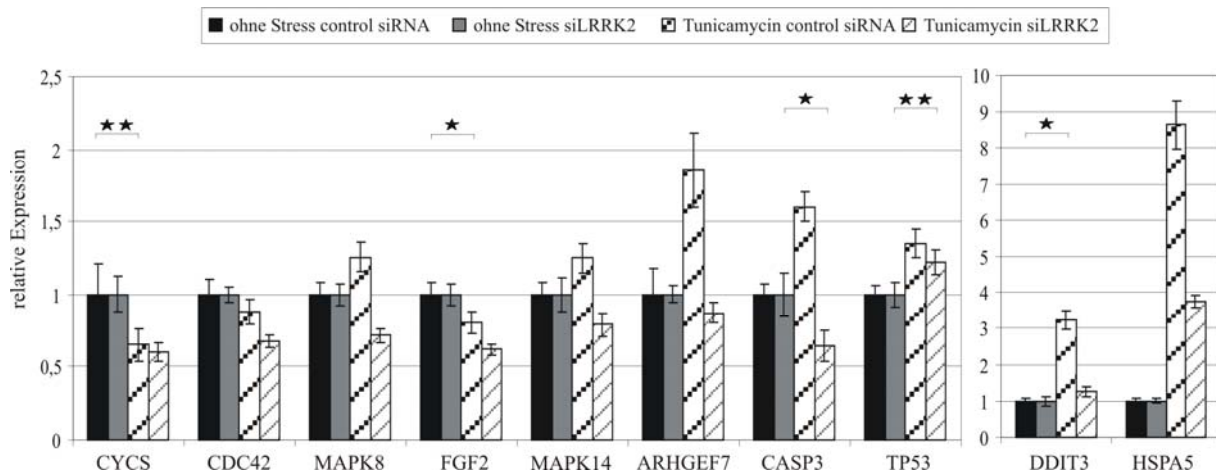


Abbildung 3.14: qRT-PCR nach LRRK2-Knockdown und ER-Stress

SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h mit 2 µg/ml Tunicamycin als ER-Stress Induktor behandelt. Die relative Expression von zehn Transkripten wurde mit qRT-PCR analysiert (3 unabhängige Replikate ±SEM). Dabei ist zum einen die relative Expression von control siRNA-behandelten Zellen mit Tunicamycin (schwarz weiß) in Bezug zu control siRNA-behandelten Zellen ohne Stress (schwarz) dargestellt. Zum anderen zeigt die Abbildung die gleiche Relation zwischen Tunicamycin gestressten (grau weiß) und ungestressten (grau) Zellen bei LRRK2-Reduktion durch siLRRK2. *PDHB* wurde zur Normalisierung genutzt. *p-Wert ≤ 0,05; **p-Wert ≤ 0,01 (Student's T-Test)

Einen deutlichen Effekt der LRRK2-Reduktion in der Tunicamycin-vermittelten Apoptosesignalkaskade zeigen die Transkripte *MAPK8*, *MAPK14*, *ARHGEF7* und *CASP3*. Die Expression dieser vier Transkripte steigt deutlich bei Tunicamycin Stress. Liegt LRRK2 reduziert vor, so sind diese Veränderungen nicht mehr detektierbar. Es kommt hingegen zu einer Reduktion dieser Transkripte auf eine Menge, welche geringer ist, als es bei LRRK2-Reduktion ohne Stressinduktion detektiert wurde. Am deutlichsten wird der Verlust von LRRK2 aber bei der Expressionsanalyse von *DDIT3* und *HSPA5*. Das Expressionsniveau von *DDIT3* erreicht unter control siRNA-Bedingungen bei Tunicamycin-Stress 323,3% des Normalniveaus. Reduziert man aber LRRK2 unter Tunicamycin-Stress, so liegt die Hochregulation von *DDIT3* nur noch 23,4% über dem Niveau bei LRRK2-Reduktion ohne Stressinduktion. Noch dramatischer ist dieser Effekt bei *HSPA5* zu erkennen. Unter normalen Bedingungen steigt bei Tunicamycin-Stress die *HSPA5*-Expression auf 8,64. Diese erreicht mit 3,73 deutlich weniger als 50% des Expressionsniveaus, wenn LRRK2 reduziert vorliegt und ER-Stress ausgelöst wird.

Diese Transkriptanalyse wurde auch bei Staurosporin-Stress durchgeführt. Obwohl unter dieser Stress-Bedingung ebenso eine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen bei LRRK2-Reduktion vorlag (siehe 3.2.2), zeigte sich im Expressionsniveau von *CYCS*, *CDC42*, *MAPK8*, *DDIT3*, *FGF2*, *MAPK14*, *ARHGEF7*, *CASP3* und *TP53* keine deutliche Veränderung zwischen control siRNA-behandelten Zellen unter Staurosporin Stress und LRRK2-reduzierten Zellen unter Staurosporin Stress (Daten nicht gezeigt).

In dem Netzwerk der Abbildung 3.11 wurde verdeutlicht, dass die differentiell hochregulierten Transkripte des LRRK2 KDs *CDC42*, *ARHGEF7* und *FGF2* nicht nur in Apoptose-Signalkaskaden eingreifen, sondern auch eine wichtige Funktion beim Aktin-Zytoskelett-Signalweg besitzen. Die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D bewirkte einen Expressionsanstieg von LRRK2 (siehe 3.2.1). Dabei konnte aber keine Veränderung der Menge an apoptotischen Zellen detektiert werden (siehe 3.2.2).

Um zu analysieren, wie die oben genannten Transkripte auf den LRRK2-Verlust zusätzlich zu der Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts reagieren, soll ihre Expression in der qRT-PCR gemessen werden. Auch wird die Expression von *CASP3*, *TP53* und *ACTB* unter dieser Bedingung analysiert (Abbildung 3.15).

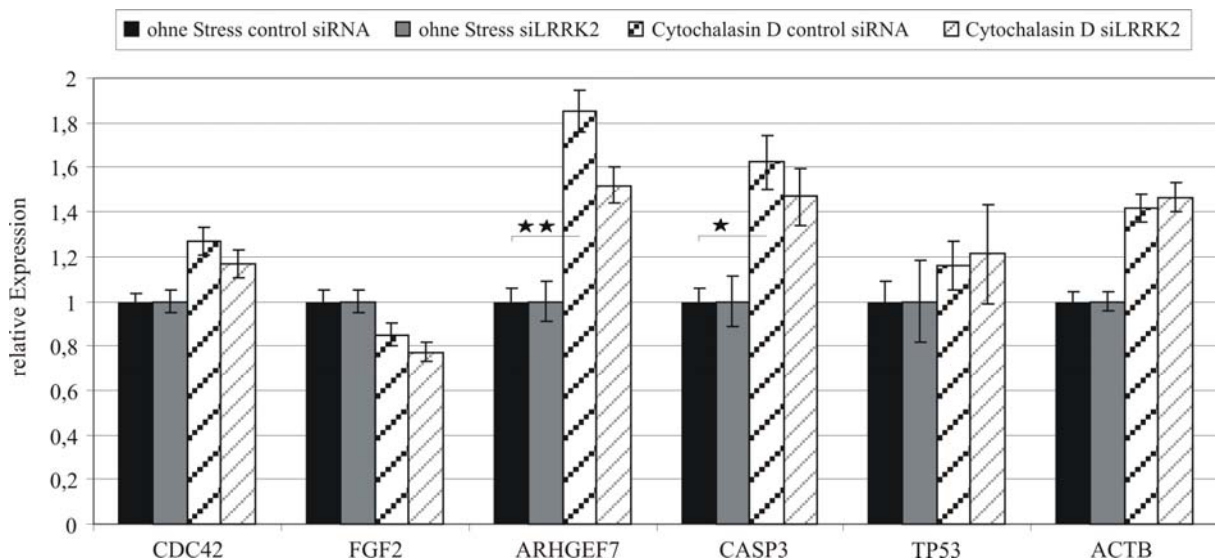


Abbildung 3.15: qRT-PCR nach LRRK2-Knockdown und zytoskelettalem Stress

SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h mit 1 μ M Cytochalasin D als Aktin depolymerisierendes Agens behandelt. Die relative Expression von sechs Transkripten wurde mit qRT-PCR analysiert (4 unabhängige Replikate \pm SEM). Dabei ist zum einen die relative Expression von control siRNA-behandelten Zellen mit Cytochalasin D (schwarz weiß) in Bezug zu control siRNA-behandelten Zellen ohne Stress (schwarz) dargestellt. Zum anderen zeigt die Abbildung die gleiche Relation zwischen Cytochalasin D-gestressten (grau weiß) und ungestressten (grau) Zellen bei LRRK2-Reduktion durch siLRRK2. *PDHB* wurde zur Normalisierung genutzt. *p-Wert \leq 0,05; **p-Wert \leq 0,01 (Student's T-Test)

Deutlich kann herausgestellt werden, dass nur *FGF2* unter Cytochalasin D-Stress eine schwache Expressionsreduktion zeigt, unabhängig davon, ob LRRK2 reduziert wird (grau weiß) oder nicht (schwarz weiß). Die anderen fünf Transkripte *CDC42*, *ARHGEF7*, *CASP3*, *P53* und *ACTB* zeigen, vergleicht man control siRNA-behandelte Zellen unter Cytochalasin D Behandlung (schwarz weiß) mit ungestressten control siRNA-behandelten Zellen (schwarz), eine Hochregulation ihrer Expression. Die Repression von LRRK2 hat keinen deutlichen Einfluss auf die Wirkung von Cytochalasin D auf die Expression der Transkripte *CDC42*, *CASP3*, *P53* und *ACTB*.

Die 1,8fache Hochregulation von *ARHGEF7* unter Cytochalasin D-Stress und normaler LRRK2-Expression (schwarz weiß) in Bezug zu ungestressten Zellen (schwarz) reduziert sich auf eine 1,5fache Hochregulation, wenn LRRK2 unter Cytochalasin D-Stress reduziert vorliegt (grau weiß), in Bezug zu LRRK2-reduzierten Zellen ohne Stressinduktion (grau).

Betrachtet man zusammenfassend nur die im LRRK2 KD hochregulierten Transkripte *CDC42*, *FGF2* und *ARHGEF7*, so führen oxidativer Stress, ER-Stress sowie zytoskelettaler Stress zu einer verringerten Reaktion in der Expressionsstärke bei LRRK2-reduzierten Zellen im Vergleich zu control siRNA-transfizierten Zellen unter der gleichen Stressbedingung. Dabei ist die Reaktion bei *CDC42* und *FGF2* weniger stark ausgeprägt als bei *ARHGEF7*. Alle drei Transkripte können über ihren Einfluss auf die *MAPK14* direkt Apoptose-Signalwege beeinflussen, wobei die *MAPK14*-Expression auf mRNA Ebene nach LRRK2-Reduktion nicht differentiell reguliert erscheint (siehe Abbildung 3.11).

3.3 Gemeinsame Regulationskaskaden des LRRK2- und SNCA-Knockdowns

Der Einfluss von Apoptose-Signalwegen in der Pathogenese des PS wird intensiv diskutiert (siehe 1.1.4.5). Auch die gesamtgenomische Analyse des Alpha-Synuklein (SNCA) KDs in humanen dopaminergen Neuroblastomzellen zeigte deutlich den Einfluss des Verlustes dieses Proteins auf apoptotische Signalkaskaden (Habig et al., 2009). Der Vergleich zwischen dem LRRK2 KD in SH-SY5Y-Zellen mit dem SNCA KD in den gleichen Zellen, kann helfen, gemeinsame, die Pathogenese des PS beeinflussende, Signalkaskaden aufzudecken.

Der 90%ige SNCA KD, mit Hilfe von RNAi, beeinflusste 357 Transkripte in ihrer Regulation (275 reprimiert, 82 hochreguliert). Zur Detektion dieser kam ebenfalls der Affymetrix Whole Genome U133plus2 Array zum Einsatz (Habig et al., 2009). Vergleicht man beide Datensätze, so finden sich vier Transkripte in beiden Analysen differentiell reguliert (Abbildung 3.16). Der „Fold Change“ wie auch der p-Wert beider Experimente und die biologische Funktion dieser Transkripte sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt.

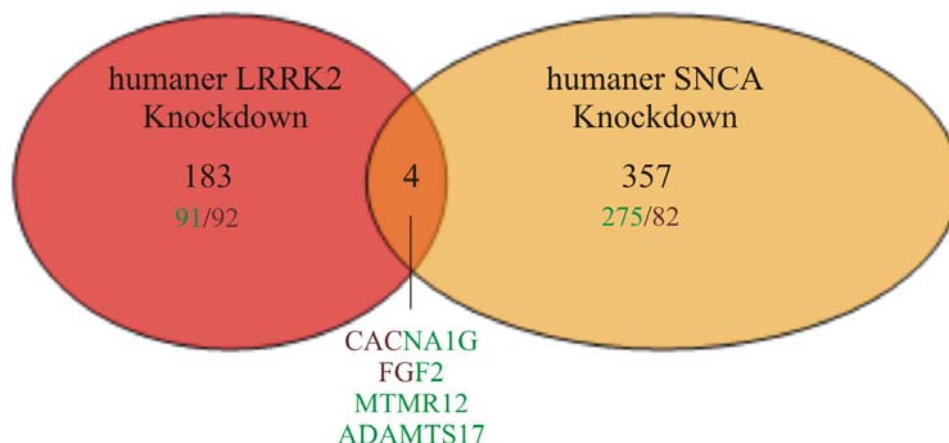


Abbildung 3.16: Venn-Diagramm des LRRK2- und SNCA-Knockdowns

Das Venn-Diagramm zeigt die differentiell regulierten Transkripte des RNAi-vermittelten LRRK2- (rot) und SNCA-(orange) Knockdowns in SH-SY5Y-Zellen. Die Analyse der differentiell regulierten Transkripte erfolgte mit Affymetrix Whole Genome U133plus2 Arrays. Die reprimierten Transkripte sind in grün und die hochregulierten Transkripte in rot dargestellt. Der Überlapp beider Analysen besteht in vier Transkripten (CACNA1G, FGF2, MTMR12, ADAMTS17), welche durch ihre Schriftfarbe ihre Regulation in dem jeweiligen Mikroarray-Experiment zeigen.

Tabelle 3.2: Gemeinsam differenziell regulierte Gene des LRRK2- und SNCA-Knockdowns

Gen Symbol	Gen Titel	GO biologischer Prozess	Probe Set ID siLRRK2	p-Wert siLRRK2	„Fold Change“ siLRRK2	Probe Set ID siSNCA	p-Wert siSNCA	„Fold Change“ siSNCA	Entrez Gen ID
CACNA1G	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit	cation transport /// calcium ion transport	210380_s_at	0,00385	1,589	207869_s_at	0.0382	-1,783	8913
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	regulation of progression through cell cycle /// activation of MAPK activity /// angiogenesis /// chemotaxis /// signal transduction /// Ras protein signal transduction /// cell-cell signaling /// nervous system development /// muscle development	204421_s_at	0,02737	1,596	204422_s_at	0.0408	-1,727	2247
MTMR12	myotubularin related protein 12	phospholipid dephosphorylation	225232_at	0,00051	-1,501	225232_at	0.00877	-1,675	54545
ADAMTS17	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17	proteolysis	1552727_s_at	0,00766	-1,653	1552725_s_at	0.0151	-1,695	170691

Von den vier Transkripten sind *MTMR12* (*myotubularin related protein 12*) und *ADAMTS17* (*ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17*) in beiden Experimenten reduziert. Im SNCA KD reduziert und im LRRK2 KD hochreguliert liegen die Transkripte *CACNA1G* (*calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit*) und *FGF2* (*fibroblast growth factor 2*) vor.

Der Vergleich des LRRK2 KDs mit dem SNCA KDs auf Genebene erbrachte nur eine geringe Überlappung gemeinsam differenziell regulierter Transkripte. Vergleicht man die Zugehörigkeit der differentiell regulierten Transkripte zu biologischen Funktionen, welche durch den Verlust dieser Parkinson-assoziierten Gene betroffenen sind, so erkennt man eine große Übereinstimmung in 21 biologischen Funktionen (Abbildung 3.17) (siehe 2.2.6.2).

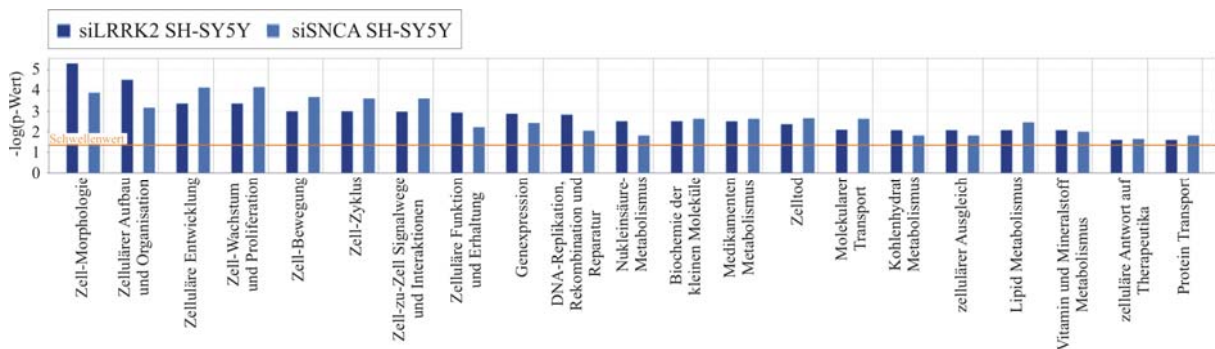


Abbildung 3.17: Funktionelle Übereinstimmung von LRRK2- und SNCA-Knockdown

Die Analyse der biologischen Funktionen, welche durch die LRRK2- (dunkelblau) und SNCA- (hellblau) Reduktion in SH-SY5Y-Zellen beeinflusst wurden, erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software. Der Fischer's Exact Test wurde benutzt, um einen p-Wert für jede Funktion zu errechnen. Gezeigt sind die Funktionen, welche in beiden Analysen auftraten und den p-Wert von 0,05 überschreiten, geordnet nach ihrer Signifikanz im siLRRK2-Experiment.

Auffallend ist, dass Zelltod-Prozesse nur eine untergeordnete Rolle einzunehmen scheinen. Betrachtet man allerdings die Anzahl differentiell regulierter Transkripte dieser biologischen Funktion, so sind es im LRRK2 KD 32 und im SNCA KD 26 differentiell regulierte Transkripte. Die prominentesten Transkripte in Apoptose-Signalkaskaden finden sich im SNCA KD mit der Repression von *BAD*, *CYCS*, *FGF2* und *MDM2*. Im LRRK2 KD ist ebenso *FGF2* reguliert, allerdings entgegengesetzt zum SNCA KD-Experiment. Zusätzlich, als bekanntes Apoptose beeinflussendes Transkript, ist die *MAPK8* reprimiert.

Die drei biologischen Funktionen mit der höchsten Signifikanz im LRRK2 KD sind (i) Zell-Morphologie (p-Wert = 0,0000051; 20 differentiell regulierte Transkripte), (ii) zellulärer Aufbau und Organisation (0,000003; 20) und (iii) zelluläre Entwicklung (0,00045; 14). In diesen Gruppen befinden sich elf Transkripte, welche auf alle drei biologischen Funktionen Einfluss nehmen (*BMP2*, *CDC42*, *CHRM3*, *CXCR4*, *FGF2*, *GNAO1*, *INHBA*, *ITGB5*, *NDN*, *TNC*, *TPM1*).

Im SNCA KD sind die drei biologischen Funktionen mit der höchsten Signifikanz (i) Zell-Wachstum und Proliferation (0,000007; 30), (ii) zelluläre Entwicklung (0,000007; 25) und (iii) Zell-Morphologie (0,00013; 22). Auch hier überlappen zwölf differentiell regulierte Transkripte in ihrer Zugehörigkeit zu allen drei biologischen Funktionen (*CSF1*, *ERBB4*, *FGF2*, *HGF*, *ID2*, *JAG1*, *LIFR*, *MDM2*, *MET*, *RBL1*, *SKP2*, *TBX3*).

Vergleicht man beide Datensätze über die betroffenen kanonischen Signalwege, welche differentiell regulierte Transkripte enthalten, so gibt es acht Übereinstimmungen (Abbildung 3.18) (siehe 2.2.6.2).

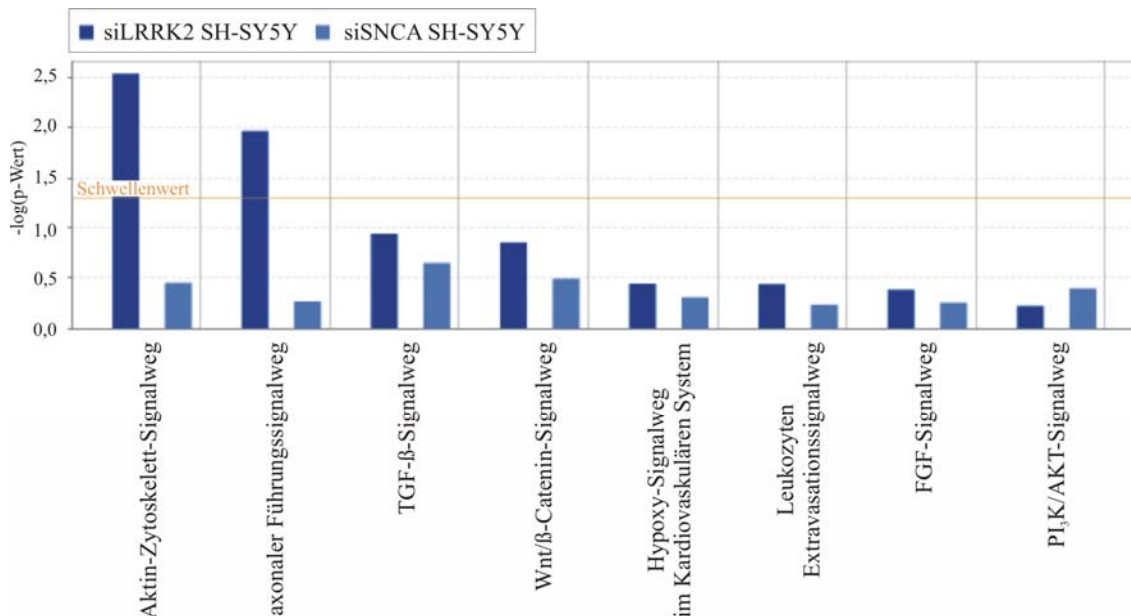


Abbildung 3.18: Vergleich veränderter kanonischer Netzwerke im LRRK2- und SNCA-Knockdown

Die Analyse der kanonischen Netzwerke, welche durch die LRRK2- (dunkelblau) und SNCA- (hellblau) Reduktion in SH-SY5Y-Zellen beeinflusst wurden, erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software. Der Fischer's Exact Test wurde benutzt, um einen p-Wert für jede Funktion zu errechnen. Gezeigt sind die Funktionen, welche in beiden Analysen auftraten und den p-Wert von 0,05 überschreiten, geordnet nach ihrer Signifikanz im siLRRK2-Experiment.

Dabei zeigen der Aktin-Zytoskelett-Signalweg (siLRRK2 7, siSNCA4 4) und der axonale Führungssignalweg (7, 4) in beiden Analysen die höchste Anzahl an Transkripten in diesen kanonischen Netzwerken. Jeweils drei oder weniger differentiell regulierte Transkripte sind in den zusätzlich gezeigten kanonischen Netzwerken TGF- β -Signalweg (2, 2), Wnt/ β -Catenin-Signalweg (3, 3), Hypoxy-Signalweg (1, 1), Leukozyten-Extravasationssignalweg (2, 2), FGF-Signalweg (1, 1) und der PI₃K/AKT-Signalweg (1, 2) zu finden.

Die differentiell regulierten Transkripte, der in Abbildung 3.18 gezeigten kanonischen Netzwerke, sind in Tabelle 3.3 mit ihrer Regulationsstärke und den jeweiligen p-Werten aufgelistet.

Der Vergleich zwischen dem Knockdown zweier Hauptmediatoren der PS-Pathogenese, LRRK2 und SNCA, verdeutlicht den Einfluss beider Proteine in zelluläre Entwicklungs- und Morphologieprozesse, in Apoptose-Signalwege aber vor allem auch in Signalwege, welche das Aktin-Zytoskelett beeinflussen.

Tabelle 3.3: Regulierte Gene des LRRK2- und SNCA-Knockdowns in kanonischen Netzwerken

kanonischer Signalweg	siLRRK2				siSNCA4			
	Gen-Symbol	Gen-Name	Fold-Change	p-Wert	Gen-Symbol	Gen-Name	Fold-Change	p-Wert
Aktin-Zytoskelett-Signalweg	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	2,007	0,022	GRLF1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	1,613	0,040
	ARHGEF12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	1,560	0,009	MYH10	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	-1,629	0,034
	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	2,468	0,010	VAV2	vav 2 oncogene	-1,538	0,012
	CHRM3	cholinergic receptor, muscarinic 3	1,878	0,001	FGF2	fibroblast growth factor 2	-1,727	0,041
	FGF2	fibroblast growth factor 2	1,596	0,027				
	ITGB5	integrin, beta 5	1,832	0,0007				
	PPP1R12B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	2,091	0,002				
axonaler Führungssignalweg	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	2,007	0,022	DPYSL5	dihydropyrimidinase-like 5	-1,555	0,032
	ARHGEF12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	1,560	0,009	NCK1	NCK adaptor protein 1	-1,637	0,039
	BMP2	bone morphogenetic protein 2	1,569	0,039	ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1	8,841	0,022
	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	2,468	0,010	SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2	-2,513	0,017
	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	-2,022	0,000				
	EFNB2	ephrin-B2	1,549	0,000				
	SEMA4F	semaphorin 4F	-1,611	0,002				
TGF- β -Signalweg	BMP2	bone morphogenetic protein 2	1,569	0,039	SMAD2	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)	-1,529	0,040
	INHBA	inhibin, beta A	1,709	0,002	SMAD9	SMAD, mothers against DPP homolog 9 (Drosophila)	-3,236	0,010
Wnt / β -Catenin-Signalweg	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	2,468	0,010	CSNK1A1	casein kinase 1, alpha 1	-2,227	0,035
	GNAO1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	1,762	0,004	MDM2	Mdm2, p53 binding protein	-2,008	0,012
	PPP2R2A	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	1,595	0,000	RARA	retinoic acid receptor, alpha	1,645	0,034
Hypoxy-Signalweg	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1,735	0,033	MDM2	Mdm2, p53 binding protein	-2,008	0,012
Leukozyten Extravasations-Signalweg	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	-2,022	0,000	GRLF1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	1,613	0,040
	MLLT4	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4	1,536	0,004	VAV2	vav 2 oncogene	-1,538	0,012
FGF-Signalweg	FGF2	fibroblast growth factor 2	1,596	0,027	FGF2	fibroblast growth factor 2	-1,727	0,041
PI3K/AKT-Signalweg	PPP2R2A	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	1,595	0,001	BAD	BCL2-antagonist of cell death	-2,058	0,008
					MDM2	Mdm2, p53 binding protein	-2,008	0,012

3.4 Gesamtgenomische Analyse des ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdowns

Die Analyse der differentiell regulierten Transkripte nach LRRK2 KD in SH-SY5Y-Zellen zeigte einen deutlichen Einfluss von LRRK2 in zytoskelettäre Signalwege. Das Protein ARHGEF7 scheint dabei eine große Rolle zu spielen. Es reagiert nicht nur unter LRRK2 KD mit einer Hochregulation, sondern verändert sich in seiner Expression auch abhängig von bestimmten Stressbedingungen (siehe 3.2.3). ARHGEF7 ist der Guanidin-Austauschfaktor von CDC42, welches ebenfalls im LRRK2 KD hochreguliert erscheint. Es stellt sich nun die Frage, welche Signalkaskaden primär durch den Verlust von LRRK2 beeinflusst werden und welche erst sekundär durch die Hochregulation von ARHGEF7 modifiziert werden. Vor allem ist es wichtig zu analysieren, ob die kleine GTPase CDC42, welche in viele unterschiedliche Signalkaskaden eingreift, direkt durch LRRK2 in ihrer Expression beeinflusst wird.

Die Analyse wurde durch die Diplomandin Sandra Gellhaar in SH-SY5Y-Zellen mit Hilfe eines Doppel-Knockdowns von LRRK2 und ARHGEF7 durchgeführt (siehe 2.2.3.1). Die Effektivität des Einzel-Knockdowns von ARHGEF7 und LRRK2 sowie die Effektivität beider gemeinsam konnte mit der qRT-PCR (siehe 2.2.8) bestätigt werden (Abbildung 3.19).

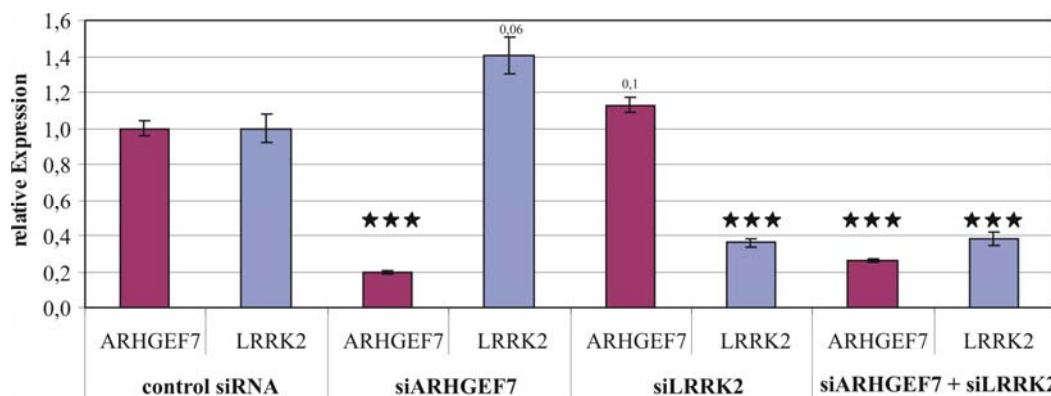


Abbildung 3.19: Analyse der Effizienz der RNA-Interferenz von ARHGEF7 gemeinsam mit LRRK2

Effektivitätsbestimmung der RNAi mit qRT-PCR. SH-SY5Y-Zellen wurden mit siRNAs gegen *LRRK2* und *ARHGEF7* einzeln und zusammen transfiziert. Die relative Expression von *ARHGEF7* (roter Balken) und *LRRK2* (blauer Balken) in Bezug zu control siRNA-transfizierten Zellen ist dargestellt. *PDHB* wurde als Referenzgen zur Normalisierung genutzt. Die Analyse erfolgte in drei unabhängigen Replikaten durch die Diplomandin Sandra Gellhaar (\pm SEM). ***p-Wert $\leq 0,001$ (Student's T-Test).

Es zeigte sich unter *ARHGEF7-Reduktion* ($0,19 \pm 0,01$) eine schwache Hochregulation der *LRRK2*-Transkription ($1,40 \pm 0,10$). Auch konnte bei *LRRK2-Reduktion* ($0,36 \pm 0,02$) entsprechend dem Eingangsexperiment, wenn auch in geringerem Umfang, die Hochregulation vom *ARHGEF7* ($1,13 \pm 0,04$) erkannt werden. Der Doppel-Knockdown beider Transkripte war möglich, dennoch erreichte ihr Umfang nicht in vollem Maße die Effizienz des Einzel-Knockdowns (*ARHGEF7* $0,26 \pm 0,01$; *LRRK2* $0,38 \pm 0,04$).

Nachfolgend wurde mit Hilfe von Affymetrix Whole Genome U133plus2 Arrays das gesamtgenomische Expressionsprofil von ARHGEF7 KD SH-SY5Y-Zellen und von ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdown-Zellen erstellt (siehe 2.2.5.2). Die differentiell regulierten Transkripte mit einem „Fold Change“ $\geq |1,5|$ und einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden mit dem Initialexperiment des LRRK2 Einzel-Knockdowns verglichen (Abbildung 3.20).

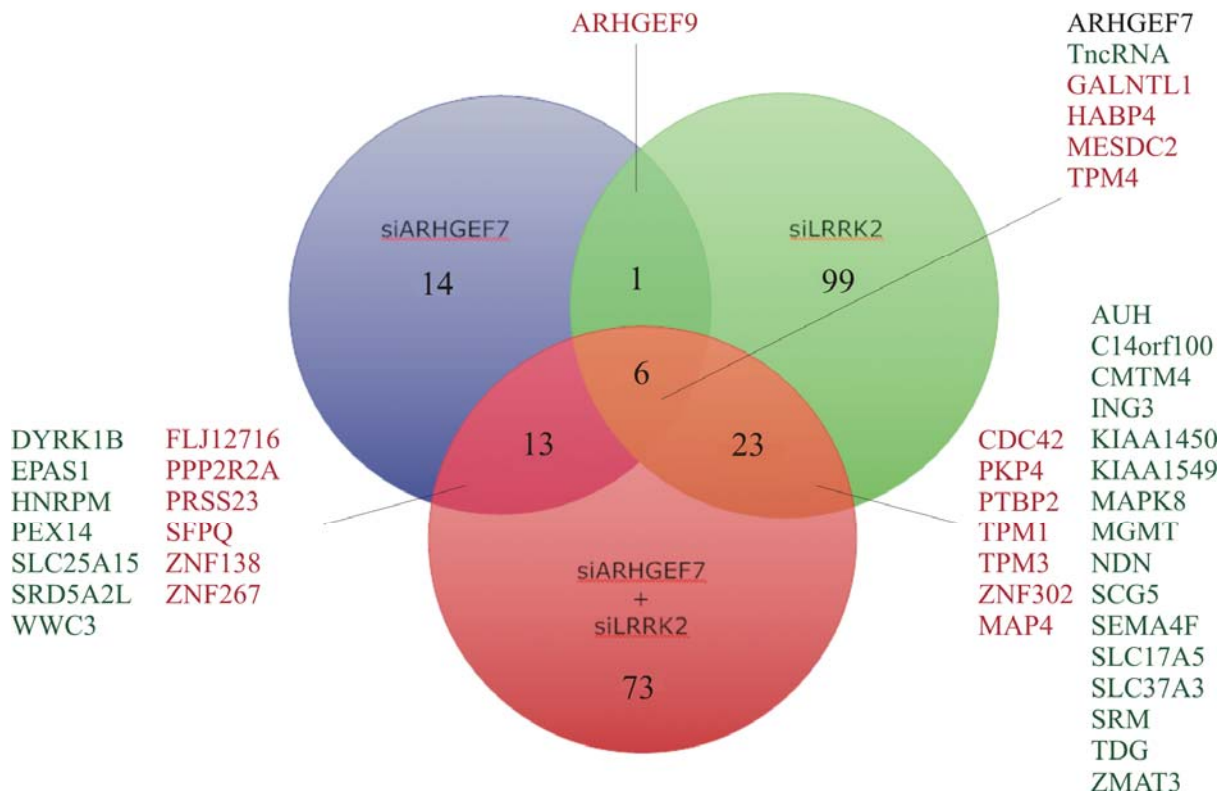


Abbildung 3.20: Venn-Diagramm des ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdowns

Mit Hilfe von RNAi wurde in SH-SY5Y-Zellen LRRK2 (grün im Venn-Diagramm), ARHGEF7 (blau im Venn-Diagramm) und beide gemeinsam (rot im Venn-Diagramm) reprimiert und mit Affymetrix Whole Genome U133plus2 Arrays die dadurch differentiell regulierten Transkripte analysiert. Die Anzahl der differentiell regulierten Transkripte sind im Venn-Diagramm dargestellt. Die in den Vergleichen gemeinsam differentiell regulierten Transkripte sind aufgelistet. Ihre Schriftfarbe verdeutlicht die Regulation (grün= reprimiert, rot= hochreguliert, schwarz= unterschiedlich reguliert) in dem Vergleich.

Der ARHGEF7 Einzel-Knockdown führte zu 50 differentiell regulierten Probesets (26 hochreguliert, 24 reprimiert), wovon 34 (18, 16) einem Gensymbol zugeordnet werden konnten (siehe Anhang 7.1.1). Der Doppel-Knockdown von ARHGEF7 und LRRK2 resultierte in 152 differentiell regulierten Probesets (58, 94). In diesem Datenset war es möglich zu 115 (45, 70) dieser Probesets ein Gensymbol zuzuordnen (siehe Anhang 7.1.2). Das Initialexperiment des LRRK2 Einzel-Knockdowns enthielt 187 (94, 93) differentiell regulierte Probesets mit 129 (74, 55) zuordenbaren Gensymbolen.

Betrachtet man die Überlagerung der differentiell regulierten Transkripte, so sind sechs Transkripte in allen drei Experimenten differentiell reguliert (siehe Anhang 7.1.6). Davon ist wie zu erwarten war, *ARHGEF7* im siLRRK2-Experiment hochreguliert und in den beiden anderen durch die siRNA reprimiert. In allen drei Vergleichen ist nur die *TncRNA* (*trophoblast-derived noncoding RNA*) reprimiert. Es gibt vier differentiell hochregulierte Transkripte, welche in allen drei Datensätzen vorkommen: *GALNTL1* (*UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase-like 1*), *HABP4* (*hyaluronan binding protein 4*), *MESDC2* (*mesoderm development candidate 2*) und *TPM4* (*tropomyosin 4*).

Vergleicht man den ARHGEF7 KD mit dem LRRK2 KD so überlagern sich sieben Gene, von denen sechs auch im Doppel-Knockdown zu finden sind (siehe Anhang 7.1.3). Das übrig bleibende Gen ARHGEF9 ist in beiden Bedingungen hochreguliert.

Der Vergleich zwischen dem ARHGEF7 KD und dem ARHGEF7 - LRRK2 Doppel-Knockdown weist 19 differentiell regulierte Transkripte auf (siehe Anhang 7.1.4). Zieht man hier ebenfalls die sechs Transkripte ab, welche auch im LRRK2 Einzel-Knockdown reguliert sind, so erkennt man 13 differentiell regulierte Transkripte (sechs hochreguliert, sieben reprimiert).

Besondere Aufmerksamkeit erlangen die 29 differentiell regulierten Transkripte des Vergleiches zwischen LRRK2 Einzel-Knockdown und ARHGEF7 - LRRK2 Doppel-Knockdown (siehe Anhang 7.1.5). Von diesen sind 23 (7, 16) nicht im ARHGEF7 Einzel-Knockdown zu finden. Sie zeigen auch in beiden Vergleichen die gleichartige Regulation, obwohl die ARHGEF7-Regulation in dem Vergleich verschiedenartig ist (LRRK2 KD - ARHGEF7 hochreguliert, LRRK2 - ARHGEF7 Doppel-Knockdown - ARHGEF7 reprimiert). Damit scheinen diese Transkripte unabhängig von der ARHGEF7-Regulation nur von der LRRK2-Repression beeinflusst zu werden.

Die Abbildung 3.21 A zeigt ein Netzwerk aus 24 der 29 differentiell regulierten Transkripte, welche in diesem Vergleich in beiden Datensätzen vorkommen. Die fehlenden fünf Transkripte konnten nicht in das Netzwerk implementiert werden (*TncRNA*, *GALNTL1*, *KIAA1450*, *NDN*, *TDG*). In Abbildung 3.21 B ist die Regulation dieser Transkripte im siARHGEF7-Experiment und in Abbildung 3.21 C im siLRRK2-Experiment dargestellt.

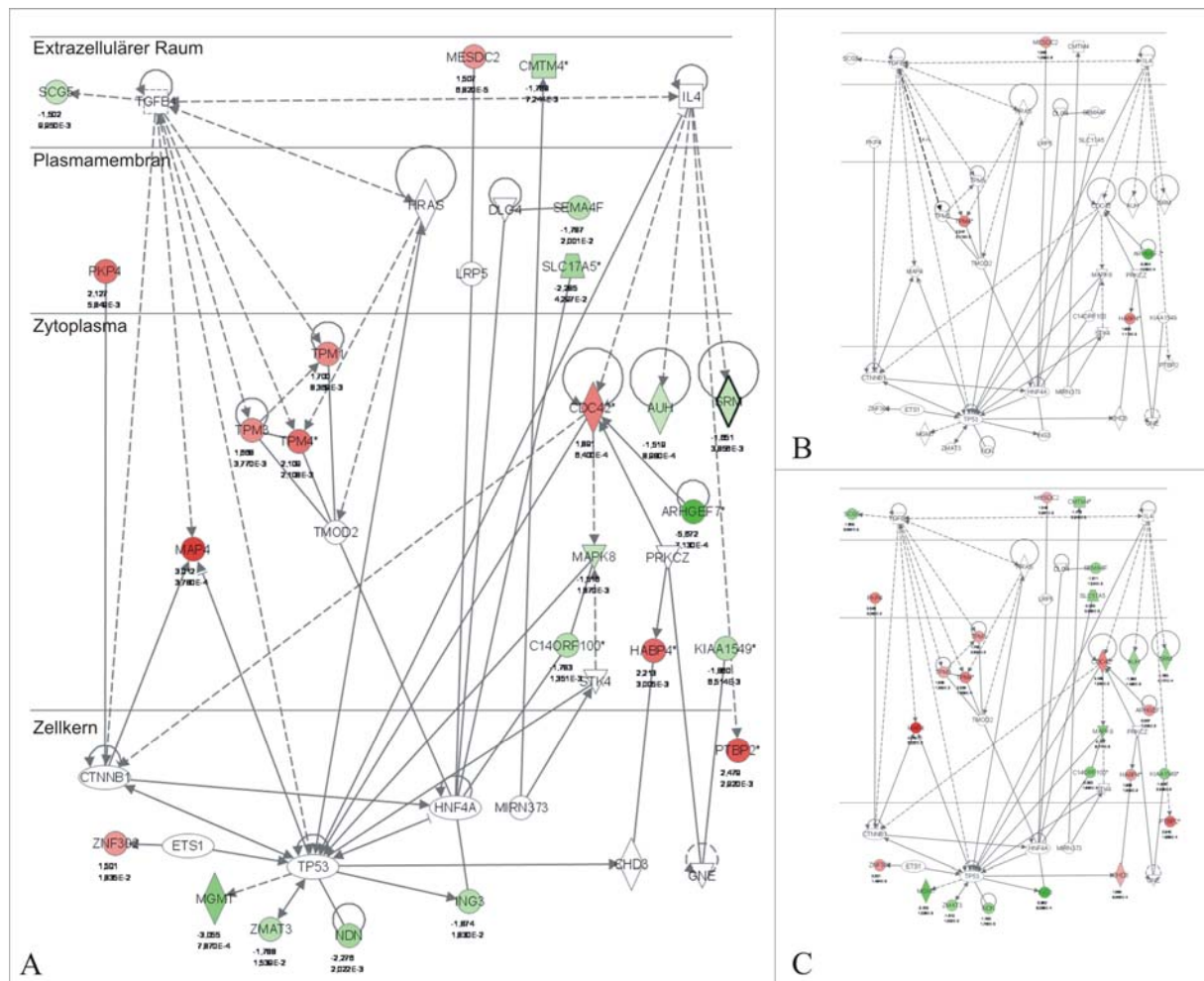


Abbildung 3.21: Netzwerk des ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdowns

Das Netzwerk wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt und besteht aus 39 Genen. Hochregulierte Gene sind in rot und reprimierte Gene sind in grün dargestellt. Nicht regulierte Gene wurden in das Netzwerk integriert, um Verbindungen zwischen den differenziell regulierten Genen zu generieren. Der „Fold Change“ und der p-Wert der Mikroarray-Analyse ist unter den Gensymbolen dargestellt.

A= Differenziell regulierte Transkripte des LRRK2 - ARHGEF7 Doppel-Knockdowns in SH-SY5Y-Zellen (24)

B= Differenziell regulierte Transkripte des ARHGEF7-Knockdowns in SH-SY5Y-Zellen (4)

C= Differenziell regulierte Transkripte des LRRK2-Knockdowns in SH-SY5Y-Zellen (25)

Besonders erwähnenswert erscheinen in diesem Vergleich die Apoptose relevanten, reprimierten Gene *C14orf100* (oder Jamp, JNK1-associated membrane protein), *ING3* (inhibitor of growth family, member 3), *MAPK8* (Mitogen-activated protein kinase 8, Synonym: *JNK1*), *MGMT* (O-6-methylguanin-DNA methyltransferase), *NDN* (necdin homolog) und *ZMAT3* (zinc finger, matrin type 3). Es fallen zusätzlich die Zytoskelett-assoziierten Transkripte *CDC42*, *MAP4*, *TPM1*, *TPM3*, *TPM4* und *SEMA4F* auf, von denen nur *SEMA4F* reprimiert vorliegt.

Die Ergebnisse zeigen, dass LRRK2 nicht nur im alleinigen KD die Expressionsveränderung von Transkripten des Zytoskeletts bewirkt, sondern auch im Doppel-Knockdown mit ARHGEF7. Nachfolgend soll geklärt werden, ob LRRK2 direkt mit Zytoskelett-beinflussenden Proteinen interagiert.

3.5 LRRK2-Interaktionspartnersuche mit Proteinen des zytoskelettalen Signalwegs

Die Repression von LRRK2 in SH-SY5Y-Zellen zeigt einen deutlichen Einfluss des LRRK2-Verlustes auf zytoskelettäre Signalkaskaden. Zwei bedeutende Transkripte dieser Signalkaskaden sind neben der Aktin-Zytoskelett-Komponente Beta-Aktin CDC42 und ARHGEF7, wobei die beiden letztgenannten durch den LRRK2-Verlust hochreguliert werden. Die Abbildung 3.22 veranschaulicht, welche Analysen durchgeführt werden, um eine Interaktion zwischen diesen Zytoskelett-regulierenden Proteinen und LRRK2 zu identifizieren. Weiterhin wird verdeutlicht, welche Fragestellungen durch Folgeexperimente analysiert werden.

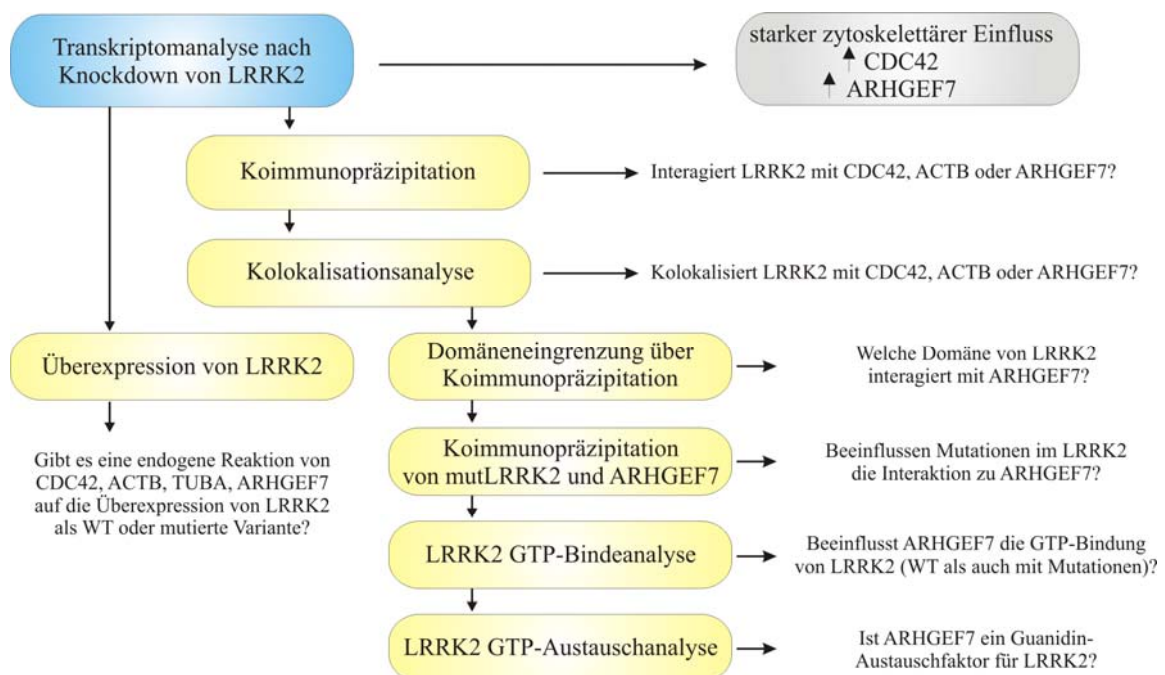


Abbildung 3.22: Übersichtsdarstellung der Interaktionsanalysen

Die Basis der Interaktionsanalyse sind die Ergebnisse der LRRK2-Knockdown-Transkriptomanalyse (blau). Die daraus resultierenden Analysen (gelb) und die damit zu beantwortenden Fragestellungen sind in diesem Schema dargestellt.

Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen kann man beispielsweise mit Hilfe einer Koimmunopräzipitation nachweisen. Aufgrund der gewonnenen Daten aus der siLRRK2-Mikroarray-Analyse und der Transkriptionsanalyse nach Stressinduktion wurde ARHGEF7 als Kandidatenprotein der direkten LRRK2-Interaktion ausgewählt. Da LRRK2 eine GTPase ist und unter bestimmten Umständen einen GEF zur Aktivierung benötigen könnte, ist eine Interaktion möglich. CDC42 wurde als zweiter potentieller Interaktor von LRRK2 ausgewählt, da diese kleine GTPase durch den LRRK2-Verlust hochreguliert wird. Dies scheint unabhängig von ARHGEF7 zu geschehen, welches durch das ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdown-Experiment gezeigt werden konnte. Das enge Zusammenspiel von CDC42 und ARHGEF7 ist entscheidend für das Aktin-Zytoskelett der Zelle und dies wird für die Aufrechterhaltung von Neuronen dringend benötigt (siehe 1.3.2). Das Protein Beta-Aktin (ACTB) macht den Hauptbestandteil der Mikrofilamente aus. Aus diesem Grund soll auch die Interaktion zwischen LRRK2 und Beta-Aktin getestet werden.

3.5.1 Koimmunopräzipitationsanalyse

Als Basis der Koimmunopräzipitationsanalysen mussten die potentiellen Interaktoren kloniert werden. Hierfür wurden die cDNA-Sequenzen von ARHGEF7, ACTB und CDC42 aus SH-SY5Y-Zellen amplifiziert, in Vektoren kloniert und dabei mit einer V5-Markierung versehen (siehe 2.2.2). Die generierten Konstrukte wurden mit Hilfe der Sequenzierung auf ihre Korrektheit kontrolliert (siehe 2.2.2.12). Die gemeinsame Überexpression von LRRK2 (pcDNA3.1_LRRK2-WTmyc) mit den potentiellen Interaktoren (pCMV_L_VC_ARHGEF7, pCMV_L_VC_CDC42, pCMV_L_VC_ACTB) wurde in HEK-293-Zellen mit einer Lipid-basierten Transfektionsmethode durchgeführt (siehe 2.2.3.2). Als Negativkontrolle bei der Koimmunopräzipitation diente die gleichzeitige Überexpression von LRRK2 mit einem leeren V5-Vektor (pCMV_L_VC). Für die Koimmunopräzipitation wurde V5-Agarose verwendet, so dass der V5-markierte potentielle Interaktor an die Agarose gekoppelt wird und daran, bei positiver Interaktion, das myc-markierte LRRK2 detektierbar ist (siehe 2.2.9.3). Das Ergebnis dieser drei Koimmunopräzipitationsexperimente ist in Abbildung 3.23 dargestellt. Dieses Ergebnis konnte auch mit den pcDNA3.1 Vektoren der Interaktoren (pcDNA3.1V5HisB_ARHGEF7, pcDNA3.1V5HisB_CDC42, pcDNA3.1V5HisB_ACTB) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

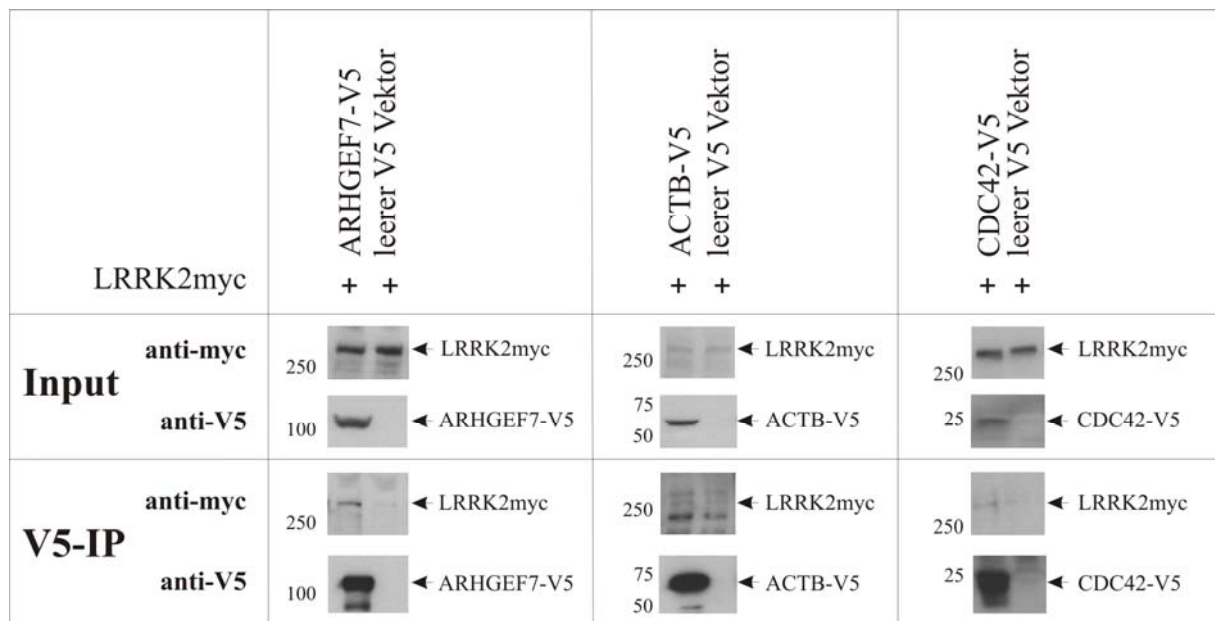


Abbildung 3.23: LRRK2-Interaktion mit Kandidatenproteinen

Koimmunopräzipitation in HEK-293-Zellen. Überexpression von LRRK2myc gemeinsam mit den Interaktionspartnern ARHGEF7-V5, ACTB-V5, CDC42-V5. 60 µg des Zelllysats wurden als Input-Kontrolle auf das SDS-Gel geladen. 1000 µg Zelllysat wurden für die V5-Agarose-vermittelte Koimmunopräzipitation genutzt.

15 µl der gewaschenen Koimmunopräzipitation wurden auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle dient ein Zelllysats mit LRRK2myc-Überexpression und leerem V5-Vektor. Die Detektion von LRRK2 erfolgte mit dem myc-Antikörper, die Detektion der Interaktoren mit dem V5-Antikörper. Das Bild entspricht dem Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

Das Ergebnis verdeutlicht, dass LRRK2 *in vitro* mit dem Guanidin-Austauschfaktor ARHGEF7 interagiert. Zusätzlich kann LRRK2 mit der kleinen GTPase CDC42 interagieren. Auch eine *in vitro* Interaktion von LRRK2 mit Beta-Aktin wurde mit dieser Methode gezeigt. Protein-Protein-Interaktionen können in ihrer Funktion besser aufgeklärt werden, wenn die Position der Interaktion auf Domänen eingegrenzt werden kann. Dies erscheint besonders bei LRRK2 wichtig, da es viele verschiedene Proteindomänen besitzt, für welche mannigfaltige Funktionen bekannt sind.

Die Domäneneingrenzung der LRRK2-ARHGEF7-Interaktion wurde mit einem LRRK2-Konstrukt begonnen, welches nur die myc-markierte Roc-COR-PK-Domäne (pCMV_L_VN_Roc-COR-PK) besitzt (Abbildung 4.24). Die Koimmunopräzipitation an V5-Agarose zeigt deutlich eine Interaktion von ARHGEF7 (pCMV_L_VC_ARHGEF7) mit diesem LRRK2-Konstrukt, welches die Hauptzymdomänen besitzt. Dieses Ergebnis konnte unter der Nutzung der Vektoren pcDNA3.1_Roc-COR-PKmyc und pcDNA3.1V5HisB_ARHGEF7 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

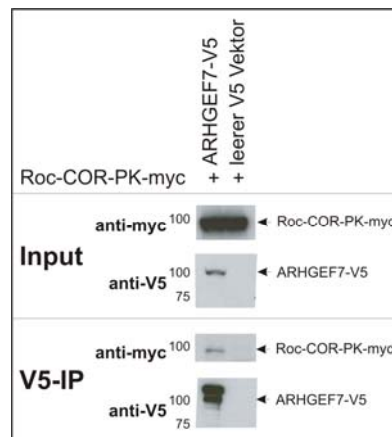


Abbildung 3.24: LRRK2- und ARHGEF7-Domäneneingrenzung

Koimmunopräzipitation in HEK-293-Zellen. Überexpression der Roc-COR-PKmyc-Domäne von LRRK2 gemeinsam mit dem Interaktionspartner ARHGEF7-V5. 60 µg des Zelllysats wurden als Input-Kontrolle auf das SDS-Gel geladen. 1000 µg Zelllysats wurden für die V5-Agarose-vermittelte Koimmunopräzipitation genutzt.

15 µl der gewaschenen Koimmunopräzipitation wurden auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle dient ein Zelllysats mit Roc-COR-PKmyc-Überexpression und leerem V5-Vektor. Die Detektion des LRRK2 Teilkonstrukts erfolgte mit dem myc-Antikörper, die Detektion von ARHGEF7-V5 mit dem V5-Antikörper. Das Bild entspricht dem Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

3.5.2 Kolokalisationssanalyse

Eine endogene Interaktion ist nur wahrscheinlich, wenn beide Interaktionspartner sich in räumlicher Nähe in der Zelle zueinander befinden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse und konfokaler Mikroskopie ist es möglich, die endogene Lokalisation von Proteinen zu analysieren (siehe 2.2.11). Färbt man dabei zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlich fluoreszierenden Sekundärantikörpern, so kann man in einer Zelle sehen, ob sich beide in gleichen Kompartimenten befinden. Diese Analyse ist nur aussagekräftig, wenn die Antikörper spezifisch sind und keine unspezifischen Proteine detektieren. Dies wurde mit SDS-Page (siehe 2.2.9.5), Western Transfer (siehe 2.2.9.6) und immunologischer Detektion (siehe 2.2.9.7) überprüft (Daten nicht gezeigt).

Für diese Analyse wurden SH-SY5Y-Zellen genutzt, welche mit Retinolsäure ausdifferenziert wurden, damit sie lange Neuriten und Wachstumskegel bilden (siehe 2.2.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.25 verdeutlicht.

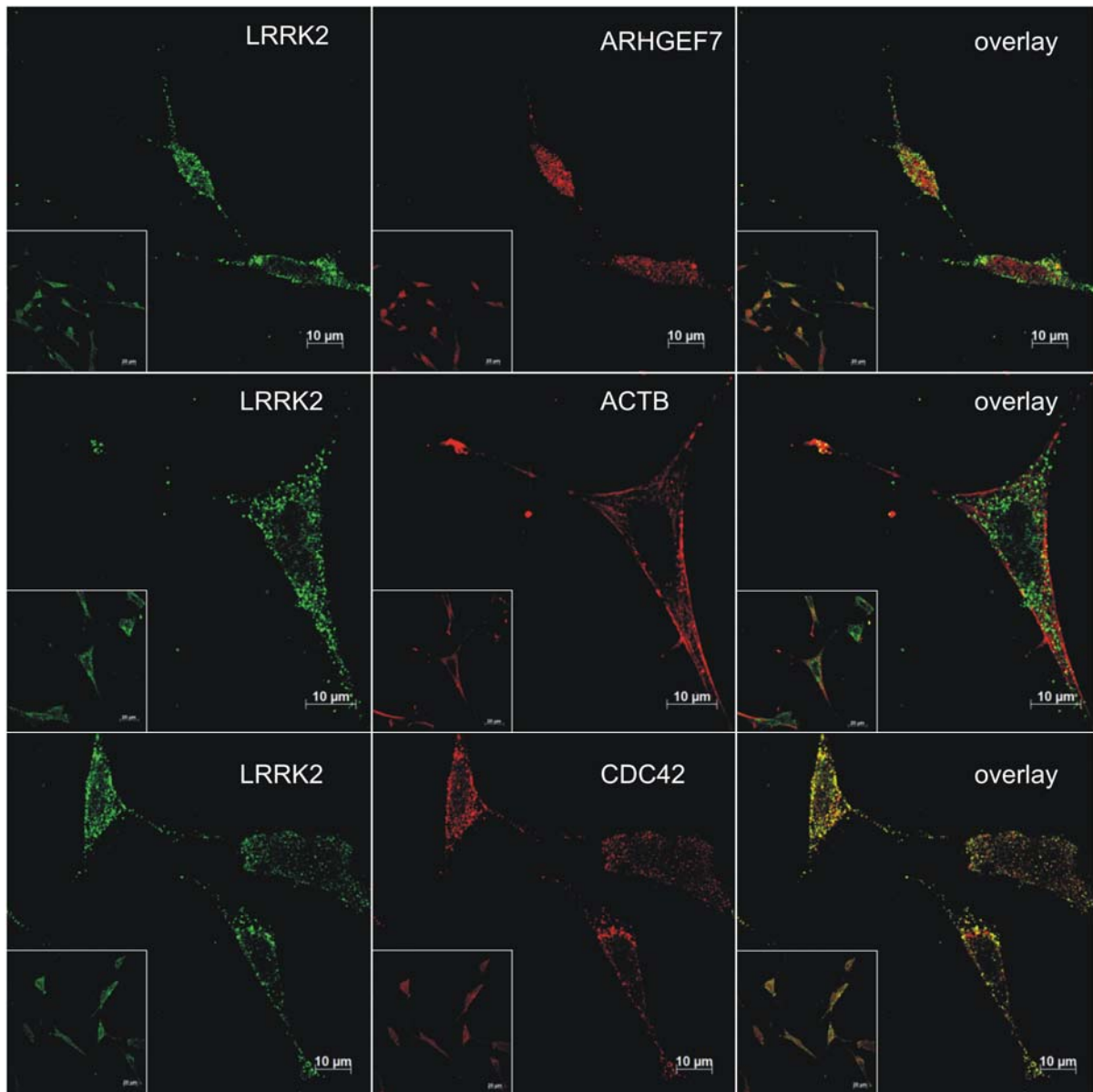


Abbildung 3.25: LRRK2-Kolokalisation mit Kandidatenproteinen

Immunfluoreszenzanalyse durch konfokale Mikroskopie (LSM510, Zeiss) in mit Retinolsäure differenzierten SH-SY5Y-Zellen. Endogene Detektion von LRRK2-CY2 gemeinsam mit der endogenen Detektion von ARHGEF7-CY3, Beta-Aktin-CY3 oder CDC42-CY3. Vergrößerung = 63x.

Die Lokalisation des endogenen LRRK2 beschränkt sich auf das Zytoplasma der Zelle und zeigt ein punktförmiges Muster wie es in der Literatur beschrieben ist (Biskup et al., 2006). Auch kann es als punktförmige Struktur in den Neuriten und im Wachstumskegel identifiziert werden. Die endogene Detektion von ARHGEF7 ist vor allem im Zellkörper zu sehen, auch wenn geringe Mengen an ARHGEF7 in den Neuriten erkennbar sind. Auch kann nicht deutlich zwischen einer zytoplasmatischen oder nukleären Lokalisation unterschieden werden. Dennoch überlagert sich das zytoplasmatische Signal von LRRK2 partiell mit dem von ARHGEF7, so dass von einer partiellen endogenen Kolokalisation gesprochen werden kann.

Die Färbung von Beta-Aktin zeigt das erwartete Muster über das gesamte Zytoplasma der Zelle mit einer starken Färbung des Wachstumskegels und der membranständigen Bereiche der Zelle. Genau in diesen Bereichen kommt es partiell zur Kolo­kalisierung mit LRRK2, die vor allem im Wachstumskegel deutlich zu erkennen ist.

Die Detektion von endogenem CDC42 in differenzierten SH-SY5Y-Zellen beschränkt sich auf zytoplasmatische Bereiche und die Neuriten der Zelle in einem punktförmigen Muster. Dieses punktförmige Muster kolo­kalisiert nahezu vollständig mit der endogenen Färbung von LRRK2.

3.5.3 Analyse des Einflusses von mutiertem LRRK2

Es konnte eine Interaktion zwischen LRRK2 und CDC42, Beta-Aktin und ARHGEF7 identifiziert werden. Die endogene Kolo­kalisationsanalyse zeigt, dass eine partielle Kolo­kalisierung dieser Proteine mit LRRK2 vorliegt. Nachfolgend stellt sich die Frage, ob die Überexpression von LRRK2 das endogene Proteinniveau der drei neu identifizierten Interaktionspartner verändern kann und ob Mutationen in LRRK2 dieses beeinflussen (Abbildung 3.26). Zusätzlich wurde der bekannte Interaktionspartner von LRRK2 Alpha-Tubulin (TUBA) in die Analyse integriert, um nicht nur Einflüsse auf Aktin-Zytoskelettkomponenten, sondern auch auf diesen Mikrotubuli-Bestandteil zu erkennen.

Bei dieser Analyse wurden die LRRK2-Mutationen G2019S, K1906M, R1441C und T1348N untersucht. Dabei ist die G2019S Mutation die häufigste pathogene Mutation in diesem Protein und führt zu einer erhöhten Kinase-Aktivität (Gloeckner et al., 2006; Greggio et al., 2006; Luzon-Toro et al., 2007; West et al., 2005; West et al., 2007). Die K1906M und T1348N Mutationen sind synthetisch erschaffene Mutationen, welche einen Funktionsverlust von LRRK2 bewirken (Ito et al., 2007; West et al., 2007). Das Methionin an Position 1906 führt zu einer reduzierten Kinase-Aktivität. Die T1348N Mutation bewirkt den Verlust der GTP-Bindungsmöglichkeit und induziert damit den Verlust der GTP-Hydrolyse und Kinase-Funktion von LRRK2 (Ito et al., 2007). Bei der in der Bevölkerung vorkommenden, pathogenen R1441C Mutation kommt es zur Reduktion der GTP-Hydrolysefähigkeit ohne Bindungsbeeinflussung zu GTP (Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007).

Dabei wurden die G2019S, K1906M und R1441C Mutationen über IVM (siehe 2.2.2.13) am pcMV_L_VN_Roc-COR-PK Konstrukt generiert und anschließend wieder über EcoNI und PacI in den pcDNA3.1_LRRK2 Voll­längen-Vektor umkloniert. Die T1348N Mutation wurde über BsrGI und PacI aus dem Ursprungsvektor pcMV_LRRK2_T1348N-Flag (zur Verfügung gestellt von Dr. Christian Klein) geschnitten und in den pcDNA3.1_LRRK2-WTmyc Vektor umkloniert. Dadurch wurde der pcDNA3.1_LRRK2-T1348Nmyc Vektor generiert.

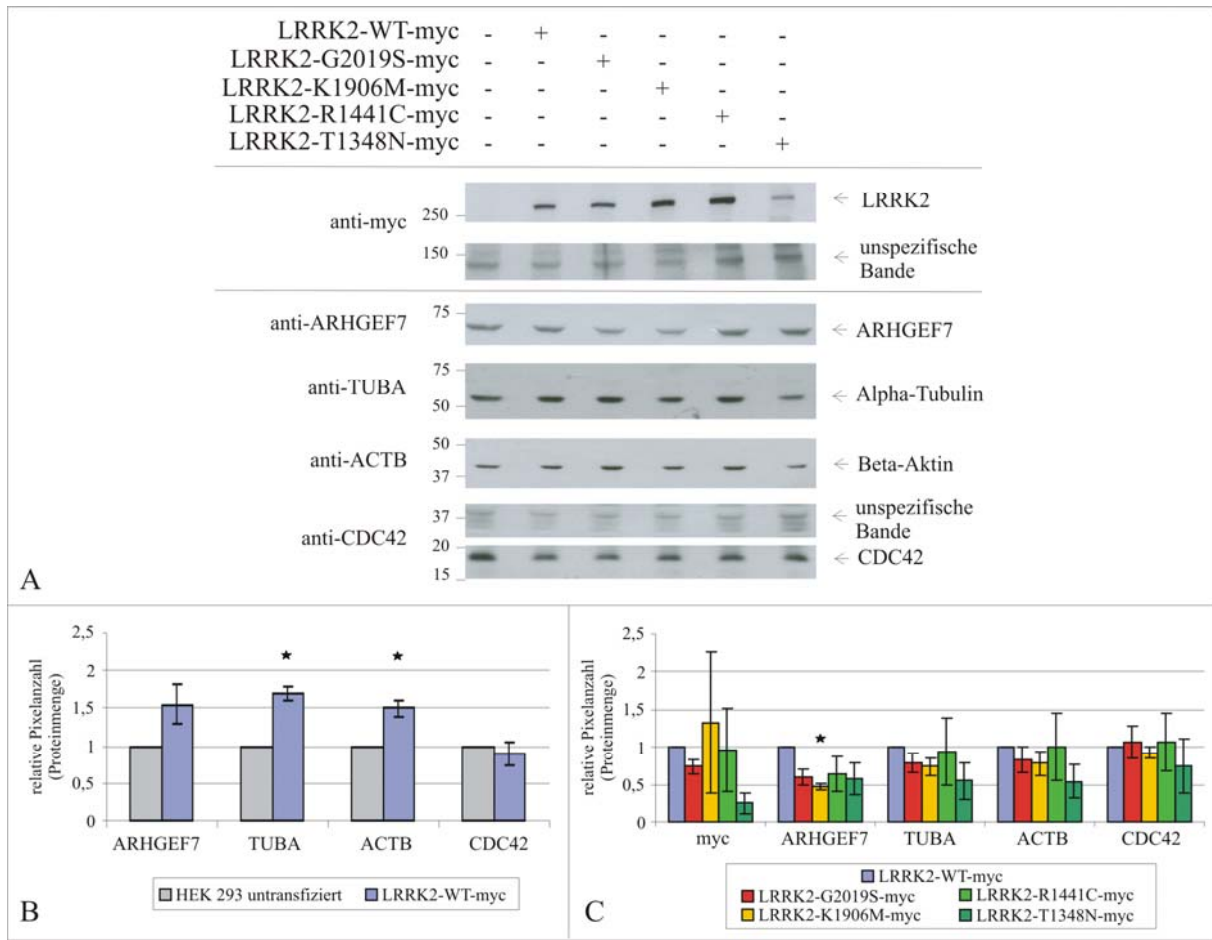


Abbildung 3.26: Einfluss von LRRK2 mit Mutationen auf die endogene Expression von Interaktoren

A= Immundetektion in HEK-293-Zellen. Überexpression von LRRK2-WT-myc sowie die Mutationen LRRK2-G2019S-myc, LRRK2-K1906M-myc, LRRK2-R1441C-myc, LRRK2-T1348N-myc. 60 µg des Zelllysats wurden auf ein 6% und auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion von LRRK2 erfolgte mit dem myc-Antikörper auf dem 6% SDS-Gel. Die unspezifische Bande bei 130 kDa wurde als Ladekontrolle für dieses Gel benutzt. Die endogene Detektion von ARHGEF7, Alpha-Tubulin, Beta-Aktin und CDC42 erfolgte auf dem 12% SDS-Gel. Die unspezifische Bande bei 38 kDa des CDC42 Antikörpers wurde als Ladekontrolle für dieses Gel benutzt. Das Bild entspricht dem Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

B= Quantifizierung der Pixelanzahl der Proteinbanden aus A, Spur 1 und 2. Relative Pixelanzahl von LRRK2-WT-myc überexprimierenden Zellen zu untransfizierten HEK-293-Zellen (Spur 1).

C= Quantifizierung der Pixelanzahl der Proteinbanden aus A, Spur 2, 3, 4, 5, 6. Relative Pixelanzahl in mutierten LRRK2-myc-überexprimierenden Zellen zu LRRK2-WT-myc-Zellen (Spur 2). Die Analyse erfolgte in drei unabhängigen Replikaten (±SEM). *p-Wert ≤ 0,05 (Student's T-Test).

Betrachtet man zunächst die Überexpression von LRRK2-WT-myc (Spur 2) in HEK-293-Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Spur 1), so erkennt man eine verstärkte Expression von Beta-Aktin und Alpha-Tubulin (Abbildung 3.26 A). Dies zeigt sich auch in der Quantifizierung mittels Pixeldichtemessung der Proteinbanden (Abbildung 3.26 B) (siehe 2.2.9.8). ARHGEF7 und CDC42 zeigen keine signifikante Proteinexpressionsveränderung.

Vergleicht man anschließend das Proteinexpressionsniveau in Zellen mit mutiertem LRRK2-myc (Spur 3, 4, 5, 6) in Bezug zu LRRK2-WT-myc-überexprimierenden Zellen (Spur 2), so kann unter der Einwirkung der Kinase-inaktiven K1906M LRRK2-Mutation eine signifikante Reduktion von ARHGEF7 auf 47% ± 3% detektiert werden (Abbildung 3.26 A, Quantifizierung 3.26 C).

Deutlich ist zu erkennen, dass die LRRK2-Überexpression zwischen den einzelnen Mutationen sowie in den verschiedenen Experimenten stark schwankt. Dies erschwert eine Aussage über die Regulationen der detektierten endogenen Reaktionen.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Interaktion zwischen ARHGEF7 und LRRK2 durch Mutationen im LRRK2 beeinflusst werden kann. Die Koimmunopräzipitationsanalyse (siehe 2.2.9.3) mit den oben beschriebenen Mutationen G2019S, K1906M, R1441C und T1348N im Vergleich zum LRRK2-WT-myc Protein wird in Abbildung 3.27 dargestellt. Deutlich ist die Koimmunopräzipitation von LRRK2-WT-myc mit ARHGEF7-V5 zu erkennen. Vergleicht man nun die verschiedenen LRRK2-Mutationen miteinander, so erkennt man bei allen die positive Interaktion mit ARHGEF7.

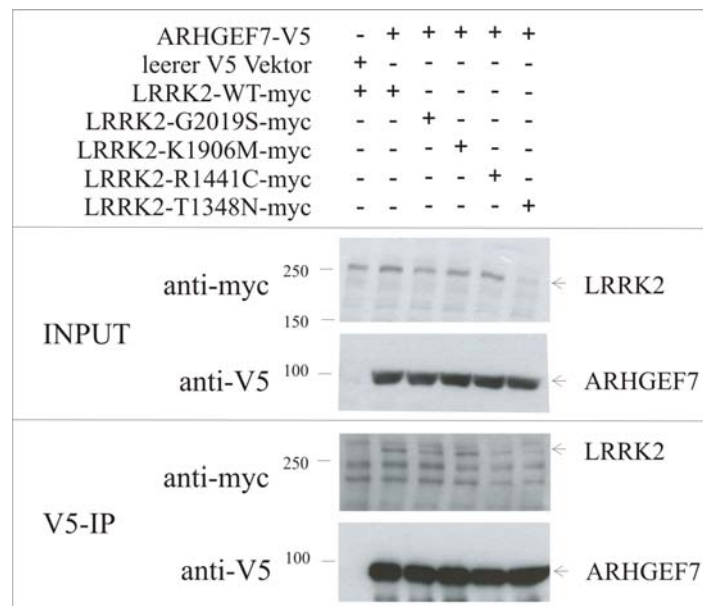


Abbildung 3.27: ARHGEF7-Interaktion mit mutiertem LRRK2

Koimmunopräzipitation in HEK-293-Zellen. Überexpression von LRRK2-WT-myc sowie LRRK2-myc Konstrukte mit den Mutationen G2019S, K1906M, R1441C und T1348N gemeinsam mit dem Interaktionspartner ARHGEF7-V5 (pCMV_L_VC_ARHGEF7). Als Negativkontrolle dient ein Zelllysats mit LRRK2-WT-myc-Überexpression und leerem V5-Vektor (pCMV_L_VC). 60 µg des Zelllysats wurden als Input-Kontrolle auf das SDS-Gel geladen. 1000 µg des Zelllysats wurden für die V5-Agarose-vermittelte Koimmunopräzipitation (V5-IP) genutzt. 15 µl der gewaschenen Koimmunopräzipitation wurden auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion von LRRK2 erfolgte mit dem myc-Antikörper, die Detektion von ARHGEF7 mit dem V5-Antikörper. Das Bild entspricht dem Ergebnis dreier unabhängiger Versuche.

Für die Quantifizierung und damit für die Aussage des Bindungspotentials von ARHGEF7 an die verschiedenen LRRK2 Varianten wurde das in Abbildung 3.28 dargestellte Verhältnis berechnet. Zunächst wird nach Abzug der Pixeldichte des Hintergrundes (PixD HG) und Relation auf eine unspezifische (unsp.) myc Bande (siehe 2.2.9.8) für jede LRRK2-Mutation das Verhältnis der Inputbande zur LRRK2-WT-Bande berechnet (= Ratio 1). Dies gibt eine Aussage über die unterschiedliche Expression der LRRK2-Konstrukte. Nachfolgend wurde für jede LRRK2-Mutation das Verhältnis der IP-Bande zur LRRK2-WT-Bande bestimmt (=Ratio 2). Natürlich kann nicht vernachlässigt werden, wieviel ARHGEF7-V5 an die V5-Agarose gebunden ist.

Aus diesem Grund wird für jede LRRK2-Mutationsbedingung das Verhältnis der ARHGEF7-V5-Bande zur LRRK2-WT-Bedingung berechnet (= Ratio 3). Das Bindungspotential von ARHGEF7 und LRRK2 unter bestimmten Mutationsbedingungen wird dann zunächst aus dem Verhältnis von Ratio 2 (LRRK2-Mutation V5-IP/WT-LRRK2) zu Ratio 1 (LRRK2-Mutation im Input/WT-LRRK2) bestimmt. Nachfolgend muss dies noch auf die V5-Kopplung (Ratio 3) normalisiert werden. Durch diese umfangreiche Relativierung wurde in die Berechnung zum einen die unterschiedlichen Expressionsniveaus von LRRK2 als auch die verschiedenen Mengen an V5-Kopplung, welche die Grundlage der LRRK2-Präzipitation darstellen, einbezogen.

$\text{Ratio 1} = \frac{\text{mutLRRK2} \frac{\text{PixD myc-Input Bande} - \text{PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande} - \text{PixD HG}}}{\text{WT LRRK2} \frac{\text{PixD myc-Input Bande} - \text{PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande} - \text{PixD HG}}}$	$\text{Ratio 2} = \frac{\text{mutLRRK2} \frac{\text{PixD myc-IP Bande} - \text{PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande} - \text{PixD HG}}}{\text{WT LRRK2} \frac{\text{PixD myc-IP Bande} - \text{PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande} - \text{PixD HG}}}$
$\text{Ratio 3} = \frac{\text{mutLRRK2} \frac{\text{PixD V5-IP Bande} - \text{PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande} - \text{PixD HG}}}{\text{WT LRRK2} \frac{\text{PixD V5-IP Bande} - \text{PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande} - \text{PixD HG}}}$	$\text{mutLRRK2/LRRK2 WT} = \frac{\text{Ratio 2}}{\text{Ratio 1}} \cdot \frac{\text{Ratio 1}}{\text{Ratio 3}}$

Abbildung 3.28: Berechnung des Bindungspotentials zwischen ARHGEF7 und LRRK2

Ratio 1 = Relation der myc-Input Bande zwischen mutiertem LRRK2 (mutLRRK2) und WT LRRK2

Ratio 2 = Relation der myc-IP Bande zwischen mutiertem LRRK2 und WT LRRK2

Ratio 3 = Relation der V5-IP Bande zwischen mutiertem LRRK2 und WT LRRK2

Von jeder Pixeldichte (PixD) einer Bande wird die PixD des Hintergrunds (HG) subtrahiert und diese auf eine unspezifische Bande, welche als Ladekontrolle dient, normalisiert.

Die mehrmalige Durchführung dieses Experiments mit der entsprechenden Quantifizierung zeigte bei LRRK2 mit den Mutationen G2019S, K1906M und T1348N keine signifikante Änderung der ARHGEF7-Bindung im Vergleich zur WT-Interaktion. Allerdings konnte ein Trend der reduzierten LRRK2-R1441C-Bindung zu ARHGEF7-V5 ($0,59 \pm 0,17$ SEM; $n=4$; p -Wert 0,14) detektiert werden.

Das inverse Experiment mit myc-Agarose ist in Abbildung 3.29 gezeigt. Auch hier konnte (i) die Interaktion zwischen LRRK2 (pcDNA3.1_LRRK2-WT) und ARHGEF7 (pCMV_L_VC_ARHGEF7) bestätigt und (ii) ebenso eine reduzierte Bindung von ARHGEF7 und LRRK2-R1441C (pcDNA3.1_LRRK2-R1441C) identifiziert werden.

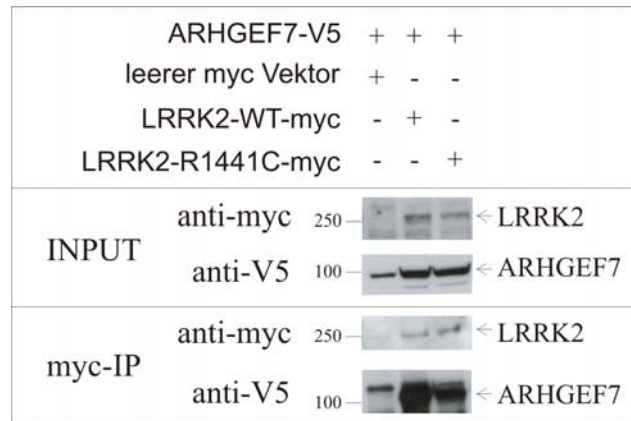


Abbildung 3.29: ARHGEF7-Interaktion mit R1441C LRRK2

Koimmunopräzipitation in HEK-293-Zellen. Überexpression von pcDNA3.1_LRRK2-WT-myc sowie pcDNA3.1_LRRK2-R1441C-myc gemeinsam mit dem Interaktionspartner ARHGEF7-V5 (pCMV_L_VC_ARHGEF7). Als Negativkontrolle dient ein Zelllysats mit ARHGEF7-V5 Überexpression und leerem myc-Vektor. 60 µg des Zelllysats wurden als Input-Kontrolle auf das SDS-Gel geladen. 1000 µg Zelllysats wurden für die myc-Agarose-vermittelte Koimmunopräzipitation genutzt. 15 µl der gewaschenen Koimmunopräzipitation wurde auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion von LRRK2 erfolgte mit dem myc-Antikörper, die Detektion von ARHGEF7 mit dem V5-Antikörper.

Anschließend wurde analysiert, ob eine Interaktion von LRRK2 mit ARHGEF7 das GTP-Bindungspotential von LRRK2 beeinflusst (Abbildung 3.30) (siehe 2.2.9.4). Dazu wurden in HEK-293-Zellen WT LRRK2 und mutiertes LRRK2 (G2019S, K1906M, R1441C und T1348N) gemeinsam mit einem leeren V5-Vektor (als Referenz) und ARHGEF7-V5 überexprimiert. Die Zelllysate wurden zu GTP-Sepharose gegeben und die Menge an GTP-Sepharose-präzipitiertem LRRK2 immunologisch detektiert.

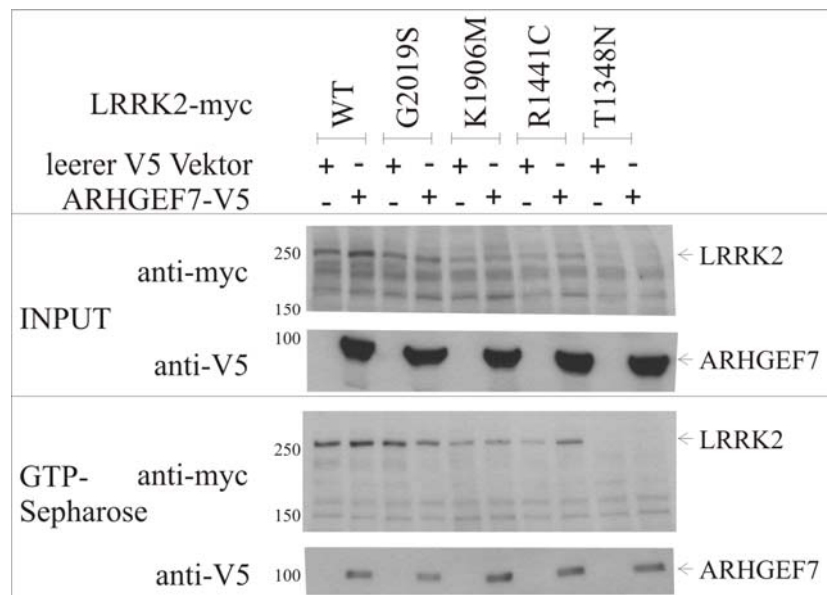


Abbildung 3.30: GTP-Bindungseinfluss von ARHGEF7 auf mutiertes LRRK2

GTP-Bindungsstudien in HEK-293-Zellen. Überexpression von LRRK2-WT-myc sowie die Überexpression der LRRK2-Mutationen G2019S, K1906M, R1441C und T1348N gemeinsam mit dem Interaktionspartner ARHGEF7-V5 (pCMV_L_VC_ARHGEF7) oder leerem V5-Vektor als Referenzkontrolle. 60 µg des Zelllysats wurden als Input-Kontrolle auf das 6%ige SDS-Gel geladen. 500 µg Proteinlysats wurden in die GTP-Bindungsanalyse eingesetzt. Mit 21 µl 2x Lämmli wurden GTP-Bindeproteine isoliert und 20 µl auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion von LRRK2 erfolgte mit dem myc-Antikörper, die Detektion von ARHGEF7 mit dem V5-Antikörper.

Über die Input-Kontrolle wurde zusätzlich noch die Überexpression der Konstrukte kontrolliert. Für eine quantitative Aussage über die Menge an GTP-Sepharose-gebundenem LRRK2 wurde eine Quantifizierung der Bandenintensität durchgeführt (siehe 2.2.9.8). Dazu wurde das in Abbildung 3.31 dargestellte Verhältnis gebildet.

Dabei wird zunächst in der Input-Detektion das Verhältnis der LRRK2myc-Bande mit ARHGEF7 zur Bande mit leerem V5-Vektor gebildet (Ratio 1). Das gleiche wurde in der GTP-Sepharose-Detektion durchgeführt (Ratio 2). Das Verhältnis zwischen dem GTP-Sepharose Verhältnis (Ratio 2) zu dem Input Verhältnis (Ratio 1) gibt Auskunft über die Veränderung der GTP-Bindung von LRRK2 durch ARHGEF7.

Ratio 1 =	$\frac{\text{LRRK2 + ARHGEF7}}{\text{LRRK2 + leerer V5 Vektor}}$	$\frac{\text{PixD myc-Input Bande - PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande - PixD HG}}$	
		$\frac{\text{PixD myc-Input Bande - PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande - PixD HG}}$	GTP Bindung
			$\frac{\text{LRRK2 + ARHGEF7}}{\text{LRRK2 + leerer V5 Vektor}} = \frac{\text{Ratio 2}}{\text{Ratio 1}}$
Ratio 2 =	$\frac{\text{LRRK2 + ARHGEF7}}{\text{LRRK2 + leerer V5 Vektor}}$	$\frac{\text{PixD GTP-IPmyc Bande - PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande - PixD HG}}$	
		$\frac{\text{PixD GTP-IPmyc Bande - PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande - PixD HG}}$	

Abbildung 3.31: Berechnung des GTP-Bindungspotentials von LRRK2 unter ARHGEF7-Einfluss

Ratio 1 = Relation der myc-Input Bande zwischen LRRK2 mit ARHGEF7 und LRRK2 mit leerem V5-Vektor

Ratio 2 = Relation der GTP-IP Bande zwischen LRRK2 mit ARHGEF7 und LRRK2 mit leerem V5-Vektor

Der Einfluss von ARHGEF7 auf die GTP-Bindung von LRRK2 berechnet sich durch das Verhältnis von Ratio 2 zu Ratio 1. Von jeder Pixeldichte (PixD) einer Bande wird die PixD des Hintergrundes (HG) subtrahiert und diese auf eine unspezifische Bande, welche als Ladekontrolle dient, normalisiert.

Nach der Durchführung dieser Analyse in drei biologischen Replikaten konnte gezeigt werden, dass die ARHGEF7-V5-Zugabe in der LRRK2 WT-Situation (im Verhältnis zur Zugabe von leerem V5-Vektor) bei 0,84 (mit einer Standardabweichung von ± 0,27), bei LRRK2 G2019S bei 1,66 (± 1,09) und bei LRRK2 K1906M bei 1,47 (± 0,69) liegt. Dabei erreicht keine dieser Bedingungen signifikante Änderungen. Es konnte keine Bindung von T1348N LRRK2 an GTP-Sepharose festgestellt werden wie dies aufgrund der Daten in der Literatur erwartet wurde (Ito et al., 2007).

Eine signifikante Änderung des GTP-Bindungspotentials wurde in R1441C-transfizierten Zellen unter ARHGEF7-Einfluss identifiziert. Hierbei verstärkt sich das LRRK2 R1441C Potential zur Bindung an GTP-Sepharose unter ARHGEF7-Anwesenheit um das 2,1fache (± 0,27; p-Wert = 0,02) im Vergleich zur Anwesenheit bei leerem V5-Vektor.

Nachfolgend stellte sich die Frage, ob ARHGEF7 den Guanidin-Austausch an LRRK2 und damit seine GTP-Bindung unter Konkurrenz mit freiem GTP beeinflussen kann (siehe Abbildung 3.32).

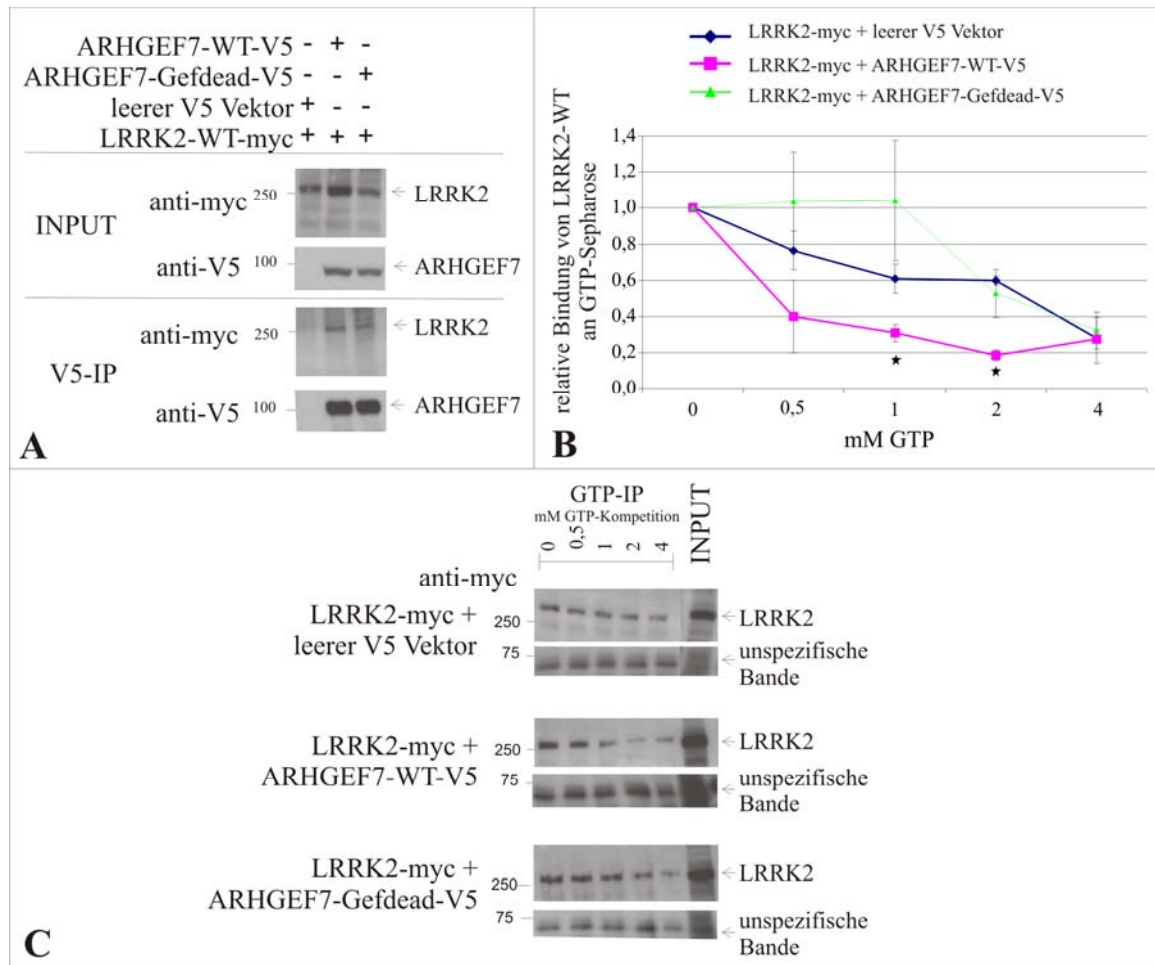


Abbildung 3.32: GTP-Austauschanalyse von LRRK2 unter ARHGEF7-Einfluss

A: Immunopräzipitationsanalyse mit GEF-inaktiven ARHGEF7 und LRRK2

Nach Überexpression von pcDNA3.1_LRRK2-WT-myc gemeinsam mit pCMV_L_VC_ARHGEF7 oder dem mutierten und damit GEF-inaktiven pCMV_L_VC_ARHGEF7_Gefdead Konstrukt in HEK-293-Zellen erfolgte die Koimmunopräzipitation an V5-Agarose mit 1000 µg Proteinlysat. Als Negativkontrolle wurde ein Zelllysat mit LRRK2-WT-myc-Überexpression und leerem V5-Vektor (pCMV_L_VC) genutzt. 20 µl der gewaschenen Koimmunopräzipitation wurden auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion von LRRK2 erfolgte mit dem myc-Antikörper, die Detektion von ARHGEF7 mit dem V5-Antikörper.

B: Quantifizierung der GTP-Austauschanalyse (C). Die y-Achse zeigt die relative Bindung von LRRK2-WTmyc an GTP-Sepharose unter Konkurrenz mit freiem GTP in verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) in Relation zu Bindung von LRRK2-WT-myc an GTP-Sepharose ohne Zusatz von GTP. Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM dreier unabhängiger Replikate. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-Test. *p-Wert ≤ 0,05 in Bezug zu leerem V5-Vektor

C: GTP-Austauschanalyse nach Überexpression von pcDNA3.1_LRRK2-WT-myc in HEK-293-Zellen unter Zugabe von ARHGEF7-WT-V5 (pCMV_L_VC_ARHGEF7) oder ARHGEF7-Gefdead-V5 (pCMV_L_VC_ARHGEF7_Gefdead). Als Referenzansatz dient die Zugabe von leerem V5-Vektor (pCMV_V_VC). 60 µg des Zelllysats wurden als Input-Kontrolle auf das 6%ige SDS-Gel geladen. 400 µg Proteinlysat wurden in die GTP-Austauschanalyse eingesetzt. Nach 1 h Inkubation wurden die angegebenen Konzentrationen von freiem GTP auf die Proben gegeben und die Inkubation für 1 h fortgesetzt. Mit 20 µl 2x Lämmli wurden anschließend GTP-Bindeproteine isoliert und komplett auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion von LRRK2 erfolgte mit dem myc-Antikörper. Das Bild entspricht dem Ergebnis dreier unabhängiger Wiederholungen.

Zunächst wurde dafür ein ARHGEF7 Konstrukt über IVM (siehe 2.2.2.13) generiert (ARHGEF7-Gefdead-V5), welches durch den Austausch zweier aufeinander folgender Leucine in der Dbl Homologie Domäne (DH)-Domäne keine GEF-Aktivität mehr besitzt (Manser et al., 1998). Die Koimmunopräzipitation in HEK-293-Zellen von LRRK2-WT-myc

und ARHGEF7-Gefdead-V5 mit Hilfe von V5-Agarose zeigt, dass diese Mutation keinen Einfluss auf die Bindung zu LRRK2 hat (siehe Abbildung 3.32 A).

In der GTP-Austauschanalyse (siehe Abbildung 3.32 C) in HEK-293-Zellen kam dann ein leerer V5-Vektor, ARHGEF7-WT-V5 und ARHGEF7-Gefdead-V5 gemeinsam mit der Überexpression von LRRK2-WT-myc zum Einsatz.

Der Vergleich zwischen leeren V5-Vektor und ARHGEF7-WT-V5 zeigt, dass unter Zugabe dieses GEFs geringe Mengen an freiem GTP ausreichen, um LRRK2-WT-myc von der GTP-Sepharose zu verdrängen. Das detektierte myc-Signal an der GTP-Sepharose erreicht unter ARHGEF7-WT-V5 Zugabe schon bei etwa 0,5-1 mM freiem GTP 50% des Signals ohne GTP-Kompetition (0 mM GTP).

Bei Zugabe leeren V5-Vektors wird dies erst zwischen 2-4 mM GTP erreicht. Kommt ARHGEF7-Gefdead-V5 zum Einsatz, so zeigt dieser nicht den Effekt wie ARHGEF7-WT-V5, sondern ähnelt eher der Zugabe leeren V5-Vektors.

Dieses Experiment wurde in drei unabhängigen Replikaten durchgeführt und die Quantifizierung der Pixeldichte (siehe Abbildung 3.32 B) zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der Zugabe von leerem V5-Vektor und ARHGEF7-WT-V5 bei Zugabe von 1 mM und 2 mM freiem GTP, welcher bei Überexpression von ARHGEF7-Gefdead-V5 nicht mehr erkennbar ist. Die Abbildung 3.33 veranschaulicht die Durchführung der Quantifizierung. Aus diesem Grund kann darauf geschlossen werden, dass ARHGEF7 die Kompetition von LRRK2 zu freiem GTP erhöht.

Bindung von LRRK2-WT an GTP-Sepharose unter GTP-Kompetitionseinfluss	=	$\frac{x \text{ mM GTP}}{0 \text{ mM GTP}} \cdot \frac{\text{PixD GTP-IP Bande} - \text{PixD HG}}{\text{PixD unsp.-Input Bande} - \text{PixD HG}}$
---	---	--

Abbildung 3.33: Berechnung der GTP-Bindung von LRRK2 unter GTP-Kompetition

Der Einfluss der GTP-Kompetition auf die GTP-Bindung von LRRK2 berechnet sich durch das Verhältnis der Pixeldichte (PixD) der GTP-IP Bande bei GTP-Zugabe zur Pixeldichte der GTP-IP Bande ohne Zugabe von freiem GTP. Von jeder Pixeldichte (PixD) einer Bande wird die PixD des Hintergrundes (HG) subtrahiert und diese auf eine unspezifische Bande, welche als Ladekontrolle dient, normalisiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass

- (i) das Interaktionspotential zwischen ARHGEF7 und LRRK2 R1441C im Vergleich zum Interaktionspotential zwischen ARHGEF7 und LRRK2 WT verringert ist,
- (ii) sich das GTP-Bindungspotential von LRRK2 R1441C bei Anwesenheit von ARHGEF7 um das Doppelte steigert und
- (iii) die Zugabe von ARHGEF7 die Kompetition von LRRK2 WT mit freiem GTP verstärkt.

3.6 Gesamtgenomische Analyse von LRRK2-Knockdown-Mäusen

3.6.1 Mikroarray-Experiment des murinen LRRK2-Knockdowns

Die Analyse des LRRK2 KDs im humanen Zellkulturmodell zeigte deutlich den Einfluss von LRRK2 in apoptotische und zytoskelettäre Signalwege. Dennoch begrenzt sich dieses Modell auf einen bestimmten Zelltyp und bildet nicht die Komplexität eines neuronalen Netzwerkes ab. Für das Verständnis der biologischen Funktion von LRRK2 ist dies aber eine wichtige Voraussetzung.

Aus diesem Grund wurde die gesamtgenomische Expressionsanalyse an LRRK2 KD Mäusen wiederholt. Diese wurden von D. Vogt-Weisenhorn, W. Wurst und F. Giesert generiert und charakterisiert und von S. Biskup genotypisiert. Es wurde RNA aus dem gesamten Gehirn von sieben Tage alten Mäusen isoliert (siehe 2.2.4.1). Der Vergleich der Expression von 25000 Transkripten zwischen drei Wildtyp Mäusen mit drei homozygot LRRK2-reprimierten Mäusen erfolgte mit MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChip Illumina Arrays (siehe 2.2.5.3). Es wurden 375 differentiell regulierte Transkripte mit einem „Fold Change“ $\geq |1,5|$ und einem p-Wert $\leq 0,05$ identifiziert, von denen 193 reprimiert und 182 hochreguliert waren (siehe Anhang 7.2).

Von diesen differentiell regulierten Transkripten wurden zehn Transkripte ausgewählt und ihr Expressionsniveau mit Hilfe der qRT-PCR gemessen (siehe 2.2.8) (Abbildung 3.34).

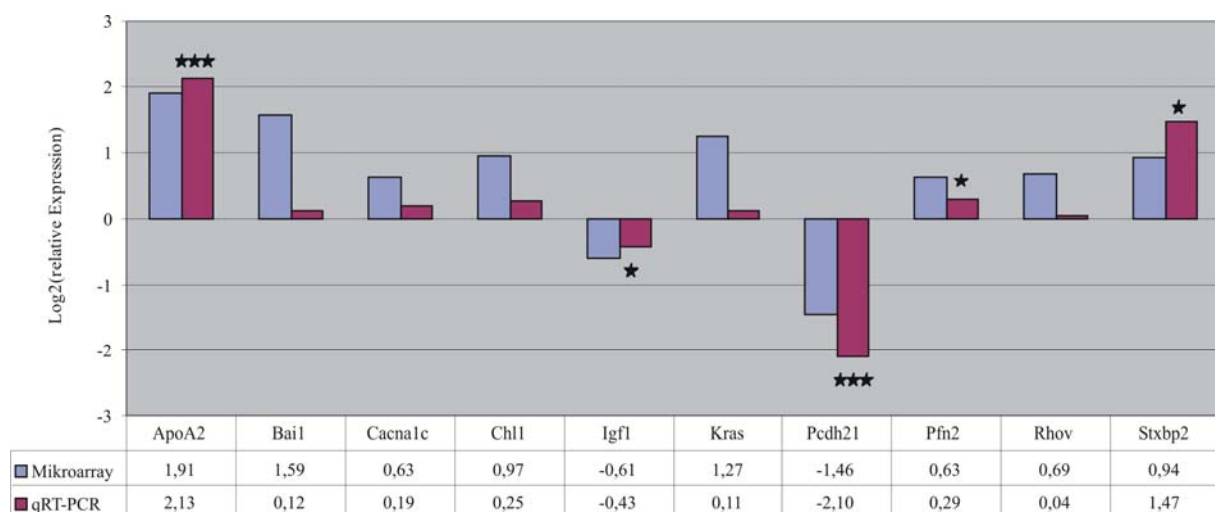


Abbildung 3.34: Validierung des murinen LRRK2-Knockdowns mit qRT-PCR

Es wurden zehn differentiell regulierte Transkripte (p-Wert $\leq 0,05$) aufgrund ihrer biologischen Relevanz für die Validierung ausgewählt. Dargestellt ist der Log2 der relativen Expression dieser zehn Transkripte im murinen LRRK2 KD (n=3) in Bezug zu WT Tieren (n=3). Die Normalisierung wurde mit *PDHB*, *SDHA* und *TBP* als Referenzgene durchgeführt. Die mit der Mikroarray-Analyse gemessene Expression konnte bei fünf der zehn Transkripte (*ApoA2*, *Igf1*, *Pcdh21*, *Pfn2*, *Stxbp2*) signifikant bestätigt werden. Die restlichen fünf Transkripte konnten in der Regulationsrichtung, aber nicht im Regulationsumfang bestätigt werden. *p-Wert $\leq 0,05$ ***p-Wert $\leq 0,001$

Als Referenzgene wurden *PDHB*, *HMBS*, *TBP* und *SDHA* gemessen. Mit Hilfe des GeNorm Algorithmuses in der qBase v1.3.3 Software wurden *PDHB*, *TBP* und *SDHA* als beste Referenzgene identifiziert und zur Normalisierung der zehn Targetgene herangezogen.

Die Validierung bestätigte die Expressionsänderungen von *APOA2* (*apolipoprotein A-II*), *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*), *PCDH21* (*protocadherin 21*), *PFN2* (*profilin 2*), *STXBP2* (*syntaxin binding protein 2*) in ihrer Signifikanz und Regulationsstärke. Die restlichen fünf Transkripte *BAIL* (*brain-specific angiogenesis inhibitor 1*), *CACNA1C* (*calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit*), *CHL1* (*cell adhesion molecule with homology to LICAM*), *KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) und *RHOV* (*ras homolog gene family, member V*) wurden in ihrer Regulationsrichtung bestätigt, aber nicht in dem Umfang, den die Mikroarray-Analyse gezeigt hat.

3.6.2 Funktionelle Analyse differenziell regulierter Gene des murinen LRRK2-Knockdowns

Die Analyse des Einflusses der differentiell regulierten Transkripte in biologische Funktionen und kanonische Netzwerke erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software (siehe 2.2.6.2). Es konnten 327 Transkripte in die Analyse integriert werden, von denen zu 188 Transkripten Funktionen und zu 219 Transkripten kanonische Signalwege zuordenbar sind.

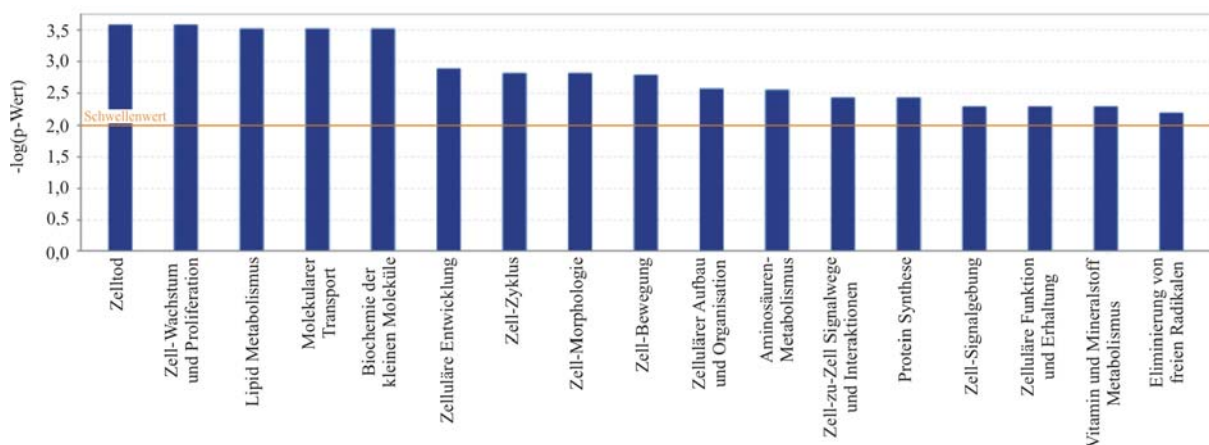


Abbildung 3.35: Beeinflusste biologische Funktionen durch murinen LRRK2-Knockdown

Die Analyse der biologischen Funktionen, welche durch den murinen LRRK2-Knockdown beeinflusst wurden, erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software. Der Fischer's Exact Test wurde benutzt, um einen p-Wert für jede Funktion zu errechnen.

Analysiert man den Einfluss des murinen LRRK2 KDs in biologische Funktionen (siehe Abbildung 3.35), so erreicht die Anzahl differentiell regulierter Transkripte beim Zelltod (53) den höchsten Signifikanzwert (p-Wert= 0,000246). Gleich darauf folgen Zell-Wachstum und Proliferation (13), Lipid-Metabolismus (26), molekularer Transport (26) und Biochemie der kleinen Moleküle (37).

Es können 20 kanonische Netzwerke mit einem p-Wert $\leq 0,275$ identifiziert werden, in welchen differentiell regulierte Transkripte des murinen LRRK2 KDs zu finden sind (Abbildung 3.36). Die höchste Signifikanz (p-Wert 0,00159) hat dabei das kanonische Netzwerk um synaptische Langzeitdepression.

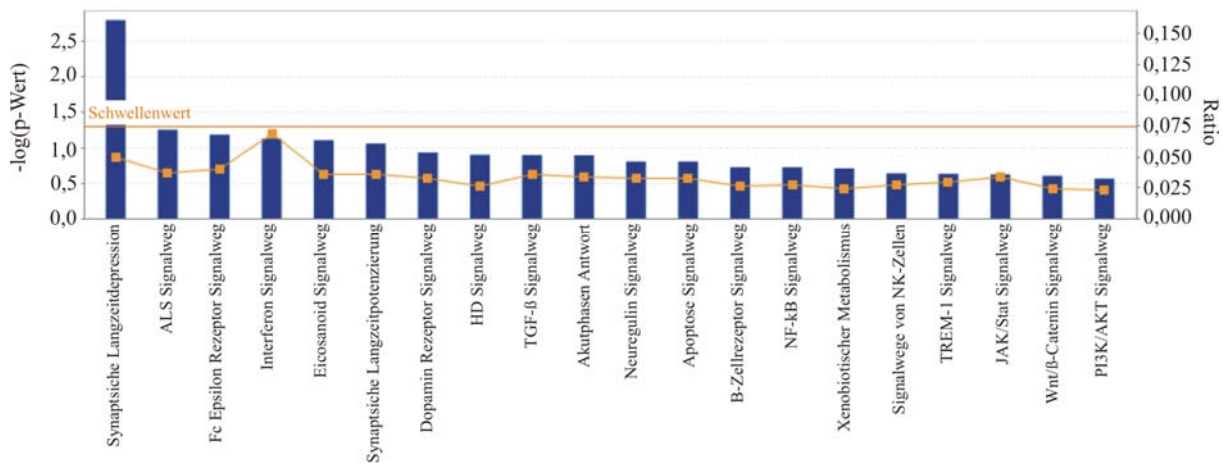


Abbildung 3.36: Beeinflusste kanonische Signalwege durch murinen LRRK2-Knockdown

Die Analyse der kanonischen Netzwerke, welche durch die LRRK2-Reduktion im murinen Modell beeinflusst wurden, erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software. Der Fischer's Exact Test wurde benutzt, um einen p-Wert zu errechnen (Balken). Als Ratio (Quadrate) wird das Verhältnis der Anzahl der differentiell regulierten Gene in dem kanonischen Netzwerk zu der Gesamtanzahl der Gene, welche dieses Netzwerk bilden, dargestellt. HD=Huntington Erkrankung, ALS= Amyotrophische Laterale-Sklerose, NK-Zellen= natürliche Killerzellen

Das Modell der synaptischen Langzeitdepression in einer Purkinje Zelle wird als zelluläres Modell des Informationsspeichers und der synaptischen Plastizität gesehen und ist in Abbildung 3.37 dargestellt. Um zu erkennen, an welchen Stellen die Reduktion von LRRK2 einen Einfluss ausüben könnte, sind in dieser Abbildung die im murinen LRRK2 KD reprimierten Gene grün und die hochregulierten Gene rot dargestellt. An einer Purkinje Zelle können parallele Fasern „parallel fibers“ und „climbing fibers“ Synapsen bilden. Dabei sind parallele Fasern Axone, welche ihre Signale über Glutamat und Stickstoffmonoxid übermitteln. Die „climbing“ Fasern hingegen vermitteln ihre Signale über CRF (corticotropin-releasing factor) und IGF-1 (insulin-like growth factor 1). Durch den murinen KD von LRRK2 ist das Expressionsprofil von *IGF-1* reduziert („Fold Change“ -6,45; p-Wert 0,025). Es scheinen in diesem Netzwerk auch die Signalkaskaden an der Postsynapse gestört zu sein, was die Reduktion der *PKCQ* (*protein kinase C, theta*; -1,760; 0,04) und *PPM1J* (*protein phosphatase 1J*; -1,895; 0,007) und die Hochregulation von *PLCB2* (*phospholipase C, beta 2*; 1,589; 0,045), *PLA2G6* (*phospholipase A2, group VI*; 1,896; 0,006), *PNPLA3* (*patatin-like phospholipase domain containing 3*; 1,866; 0,005), *KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; 2,404; 0,013) und *RYR1* (*ryanodine receptor 1, skeletal*; 2,502; 0,04) vermuten lässt.

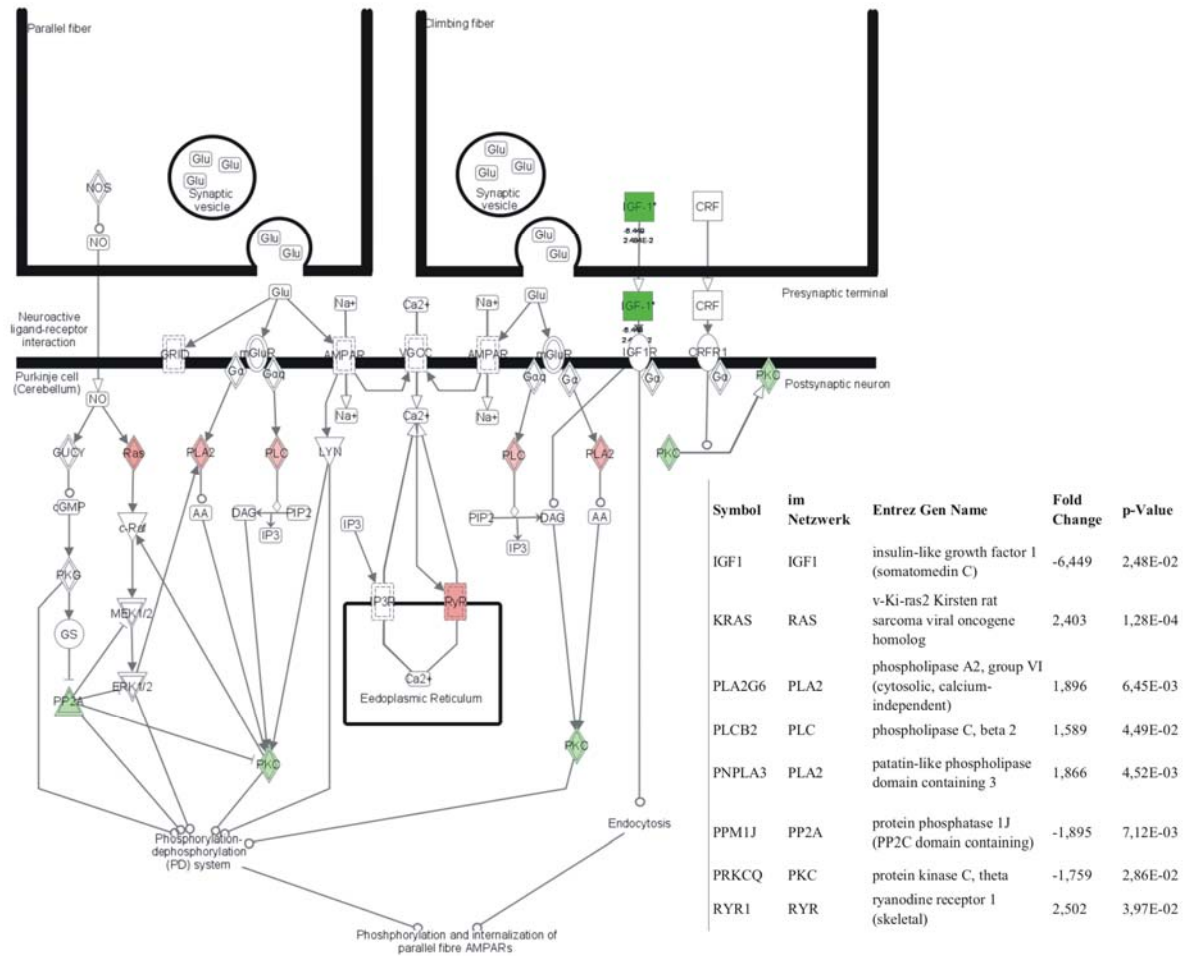


Abbildung 3.37: Einfluss des murinen LRRK2-Knockdowns in synaptische Langzeitdepression

Kanonisches Netzwerk der Langzeitdepression in einer Purkinje Zelle. Die Ingenuity Pathways Analysis Software wurde genutzt, um die differentiell regulierten Transkripte des murinen LRRK2-Knockdowns in diesem Netzwerk zu kennzeichnen (rot = hochreguliert, grün = reprimiert). Die vollständigen Namen, die Regulationsstärken mit Signifikanz sowie die im Netzwerk genutzten Synonyme der differentiell regulierten Transkripte sind in der Liste dargestellt. Glu = Glutamat, NO = Stickstoffmonoxid

Dennoch sind nicht alle 25 differentiell regulierten Transkripte mit Einfluss auf synaptische Prozesse dieses Datensets in dieses kanonische Netzwerk implementierbar. Aus diesem Grund werden die zehn reprimierten und zwölf hochregulierten Transkripte mit Einfluss auf synaptische Signalkaskaden in Tabelle 3.4 zusammengefasst dargestellt. Unter ihnen befindet sich auch das in den Mäusen reprimierte LRRK2, da es assoziiert mit synaptischen Vesikeln vorliegt, auch wenn seine Funktion an diesem Ort noch unklar ist.

Tabelle 3.4: Differenziell regulierte Gene synaptischer Prozesse des murinen LRRK2-Knockdowns

Symbol	Gen Titel	„Fold Change“	p-Wert	molekulare Funktion	Entrez ID
Igf1	insulin-like growth factor 1	-6,449	0,025	anti-apoptosis /// nervous system development /// glial cell differentiation	16000
Th	tyrosine hydroxylase	-2,952	0,040	synaptic transmission, dopaminergic /// dopamine biosynthetic process from tyrosine	21823
Syng2	synaptogyrin 2	-2,068	0,009	protein targeting /// synaptic vesicle	20973
Ppm1j	protein phosphatase 1J	-1,895	0,007	protein amino acid dephosphorylation	71887
Rassf4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	-1,871	0,009	neuropeptide signaling pathway /// negative regulation of cell cycle	213391
Apod	apolipoprotein D	-1,848	0,011	transport /// remodelling synaptic connections	11815
Prkcg	protein kinase C, theta	-1,760	0,029	protein amino acid phosphorylation /// intracellular signaling cascade /// immunological synapse	18761
Slc6a1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1	-1,687	0,018	neurotransmitter transport	232333
Rassf4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	-1,676	0,001	neuropeptide signaling pathway /// negative regulation of cell cycle	213391
Lrrk2	leucine-rich repeat kinase 2	-1,559	0,021	protein amino acid phosphorylation /// small GTPase mediated signal transduction /// synaptic vesicle	66725
Cacna1c	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	1,543	0,027	voltage-gated calcium channel activity /// synaptic transmission	12288
Cacna1b	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	1,546	0,028	voltage-gated calcium channel activity /// calcium ion transport /// neurotransmitter secretion	12287
Chrb3	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3	1,547	0,027	ion transport /// synaptic transmission, cholinergic	108043
Svap1	Synapse associated protein 1	1,556	0,040	synapse associated	67043
Dlgap2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	1,573	0,021	protein targeting /// cell-cell signaling /// postsynaptic membrane	244310
Plcb2	phospholipase C, beta 2	1,589	0,045	lipid metabolic process /// intracellular signaling cascade /// calcium ion binding	18796
Rhov	ras homolog gene family, member V	1,611	0,014	small GTPase mediated signal transduction /// endosome	228543
Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3	1,866	0,005	lipid metabolic process /// triacylglycerol biosynthetic process	116939
Pla2g6	phospholipase A2, group VI	1,896	0,006	lipid metabolic process /// metabolic process /// lipid catabolic process	53357
Stxbp2	syntaxin binding protein 2	1,915	0,002	vesicle docking during exocytosis /// vesicle-mediated transport	20911
Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	2,404	0,000	Ras protein signal transduction /// actin cytoskeleton organization and biogenesis /// regulation of synaptic transmission /// GABAergic positive regulation of Rac protein signal transduction	16653
Ryr1	ryanodine receptor 1, skeletal muscle	2,502	0,040	transport /// calcium ion transport /// muscle contraction /// voltage-gated calcium channel activity	20190

Eine hohe Bedeutung hat der Dopamin-Metabolismus in der Pathogenese des PS. Ein Hauptenzym dieses Metabolismus ist die Tyrosin-Hydroxylase (TH), welche die Synthese von L-DOPA, die Vorstufe von Dopamin, aus L-Tyrosin katalysiert (Abbildung 3.38).

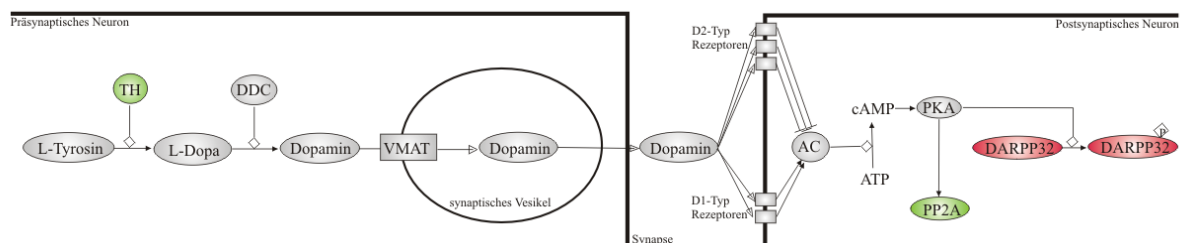


Abbildung 3.38: Einfluss des murinen LRRK2-Knockdowns in Dopamin-Rezeptor-Signalwege

Kanonisches Netzwerk der Dopamin-Rezeptor-Signaltransduktion. Dieses Netzwerk wurde basierend auf dem Dopamin-Rezeptor-Signalweg der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt. Die differentiell regulierten Transkripte des murinen LRRK2-Knockdowns sind farblich in diesem Netzwerk gekennzeichnet (rot = hochreguliert, grün = reprimiert). Die Regulationsstärken mit Signifikanz finden sich im Text. Abkürzungen: TH= Tyrosin-Hydroxylase, L-Dopa= L-3,4-dioxyphenylalanin, DDC, DOPA-Decarboxylase; VMAT, vaskulärer Monoamin-Transporter, AC = Adenylat-Zyklase, PKA = Protein Kinase A, PP2A = Protein Phosphatase Typ 2A, DARPP32= dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein 32

Im murinen LRRK2-Knockdown (mLRRK2 KD) liegt die Tyrosin-Hydroxylase auf Transkriptionsebene reduziert vor (-2,952; 0,04). Die Freisetzung von Dopamin im synaptischen Spalt führt zur Bindung dieses Neurotransmitter sowohl an D1-Typ als auch D2-Typ Rezeptoren. Dies aktiviert die Adenylat-Zyklase, welche die Bildung von cAMP fördert. Durch cAMP wird die Protein Kinase A aktiviert, welche den Protein Phosphatase 1 Inhibitor durch Phosphorylierung aktiviert, wodurch weitläufige Signalkaskaden aktiviert werden.

Eine Untereinheit dieses wichtigen Signalmoleküls (*PPP1R1B*; *protein phosphatase 1 , inhibitor subunit 1B* oder *DARPP-32, dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein 32*; 1,732; 0,028) liegt in Gehirnen von LRRK2 KD Mäusen hochreguliert vor. Die Protein Kinase A kann unter normalen Bedingungen zusätzlich zur Aktivierung von Protein Phosphatasen des Typs 2A führen, welche wiederum die Aktivität der TH beeinflussen können (Zhang et al., 2007). Im mLRRK2 KD liegt ein Mitglied der Protein Phosphatasen dieses Typs reprimiert vor (Synonym *PPM1J, protein phosphatase 1J*; -1,895; 0,007).

In der Pathogenese des PS wird der Einfluss von Eisen-Akkumulationen diskutiert (Rhodes und Ritz, 2008). Auch in Gehirnen von LRRK2 KD Mäusen könnte man eine Deregulation dieses Stoffwechselweges vermuten. So ist das Eisentransportprotein Transferrin (*TRF*; -2,53; 0,002) reprimiert, sowie dessen Rezeptor *TRFR2 (transferrin receptor 2*; 1,75; 0,04) hochreguliert. Zusätzlich finden sich zwei Transkripte hochreguliert, welche ebenfalls für den Eisentransport wichtig sind: *Slc39a14 (solute carrier family 39, member 14*; 2,789; 0,049) und *1300017J02Rik* (1,977; 0,026).

Im komplexen System verschiedener Gehirnareale scheinen also besonders Zelltodprozesse, synaptische Transmissionen, der Dopamin-Metabolismus und Eisentransportprozesse verändert zu sein, wenn eine Reduktion des murinen LRRK2 vorliegt. Im Nachfolgenden soll untersucht werden, ob es Signalkaskaden gibt, welche im hLRRK2 KD als auch im mLRRK2 KD reguliert vorliegen.

3.6.3 Vergleich zwischen humanen LRRK2-Knockdown und murinen LRRK2-Knockdown

Der Vergleich zwischen den 187 differentiell regulierten Transkripten des humanen LRRK2-Knockdown- (hLRRK2 KD) Modells (erstellt mit Affymetrix Whole Genome U133plus2 Arrays) und den 375 differentiell regulierten Transkripten aus dem murinen LRRK2-Knockdown- (mLRRK2 KD) Experiment (erstellt mit MouseRef-8 v1.1 Expression BeadChip Illumina Arrays) wurde über das Gensymbol der Transkripte durchgeführt. Dabei wurden, die zu den murinen Transkripten orthologen humanen Gensymbole ermittelt und für den Abgleich genutzt.

Es konnte *BRAP (BRCA1 associated protein)* als in beiden Experimenten reguliertes Gen identifiziert werden (Abbildung 3.38). Dieses Gen ist in beiden Datensätzen durch den Verlust von LRRK2 reprimiert, wobei die Regulationsstärke ebenfalls in der Abbildung 3.39 verdeutlicht wird.

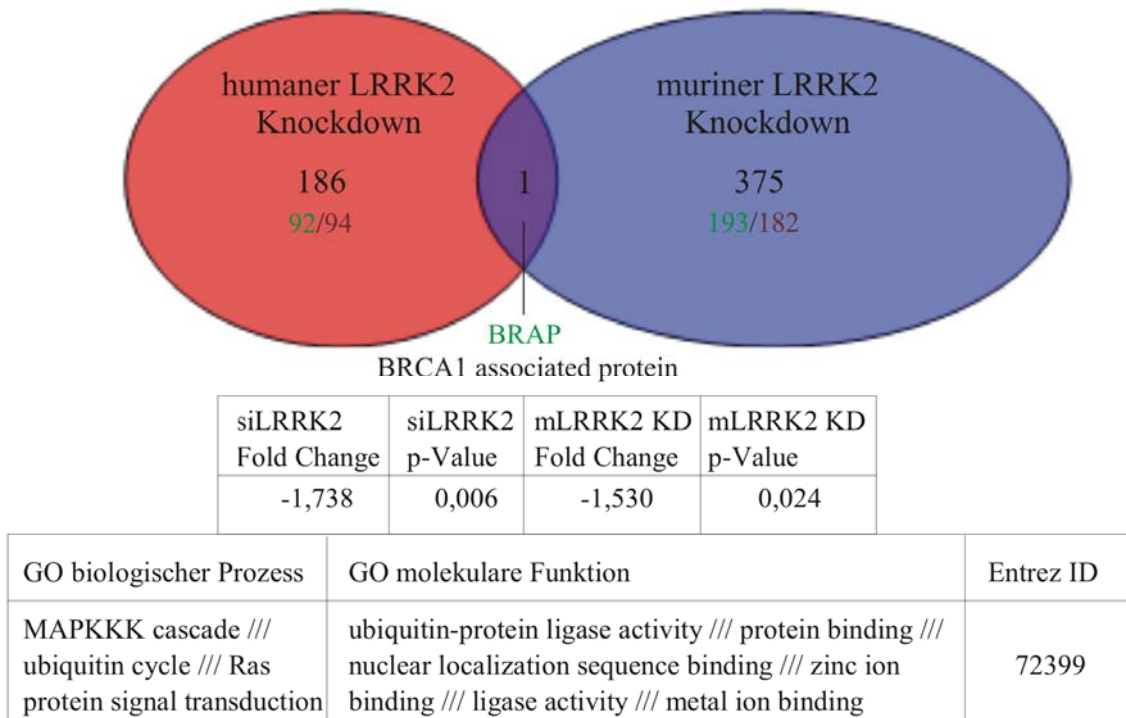


Abbildung 3.39: Venn-Diagramm des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns

In humanen dopaminergen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) (rot) und in Mäusen (blau) wurde LRRK2 reprimiert. In beiden Bedingungen wurde eine gesamtgenomische Expressionsanalyse durchgeführt. Die Anzahl der differentiell regulierten Transkripte (grün reprimiert, rot hochreguliert) jedes Datensets sind im Venn-Diagramm dargestellt. Als überlappendes Gen wurde *BRAP* identifiziert, welches in beiden Datensätzen reprimiert vorliegt.

Die Funktion von BRAP wird in der Aufrechterhaltung der Regulation des Transportes nukleärer Proteine gesehen. Es hat aber zusätzlich Funktionen in der Modulation der Sensitivität der MAP-Kinase-Kaskade über den RAF-MEK-Komplex (Matheny et al., 2004). Dies ist auch in Abbildung 3.40 dargestellt. Zusätzlich werden in dieser Abbildung die deregulierten Signalkaskaden von murinem (A) und humanem (B) LRRK2 KD verdeutlicht. Anhand des Netzwerkes in Abbildung 3.40 erkennt man, dass durch den LRRK2 KD in beiden Modellen unterschiedliche Transkripte in ihrer Regulation betroffen sind, welche aber in gleiche Signalkaskaden wirken können.

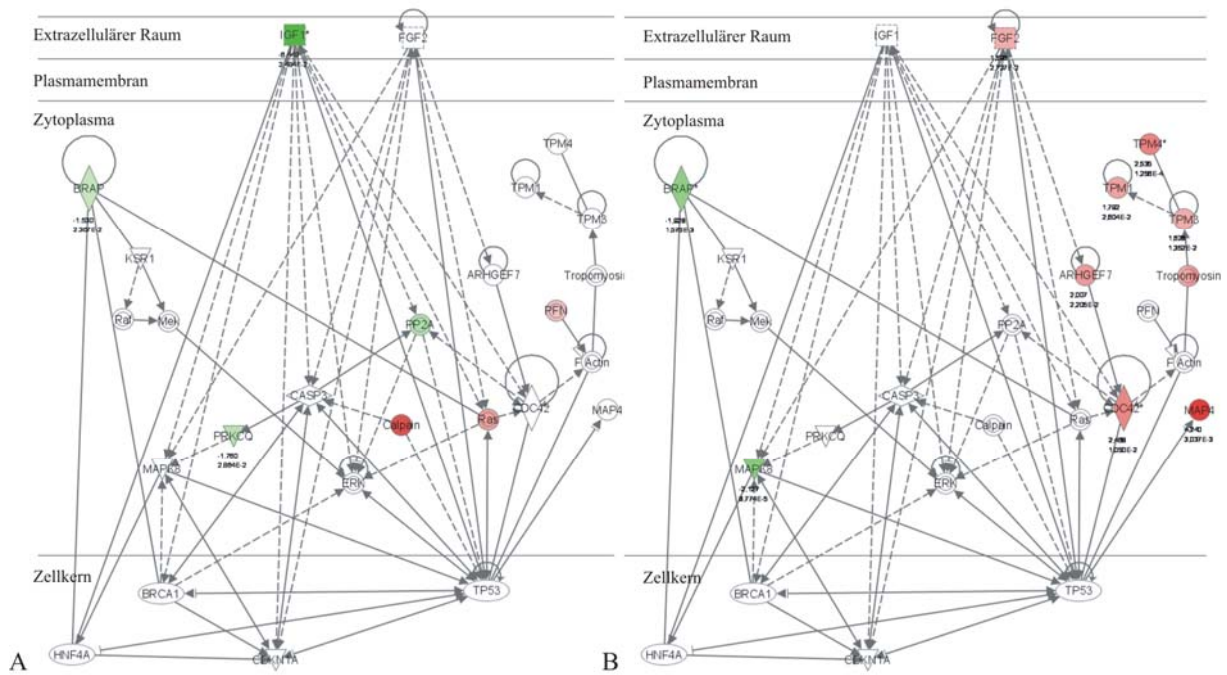


Abbildung 3.40: Einfluss von BRAP in zelluläre Signalkaskaden

Das Netzwerk stellt den Einfluss von BRAP in zelluläre Signalkaskaden dar. Es wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software generiert und mit den Expressionswerten der differentiell regulierten Transkripte des jeweiligen Datensets hinterlegt (grün = reprimiert, rot = hochreguliert).

A= muriner LRRK2-Knockdown
 B= humaner LRRK2-Knockdown

Vergleicht man zusätzlich die Funktionen der differentiell regulierten Transkripte aus beiden Analysen, so wird deutlich eine Überlagerung in 15 biologischen Funktionen sichtbar (Abbildung 3.41).

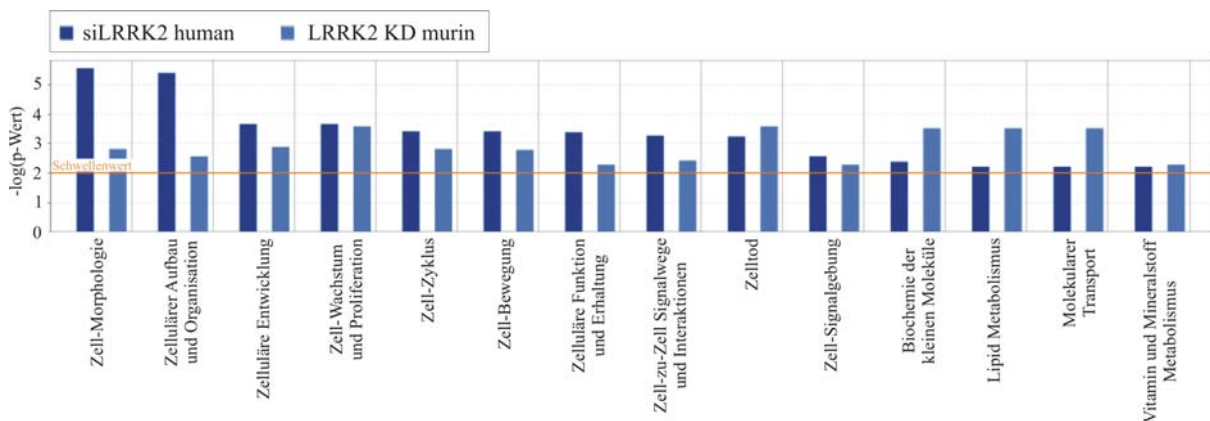


Abbildung 3.41: Funktionelle Überlagerung des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns

Die Analyse der biologischen Funktionen, welche durch den humanen LRRK2 (dunkelblau) und murinen LRRK2 (hellblau)-Knockdown beeinflusst wurden, erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software. Der Fischer's Exact Test wurde benutzt, um einen p-Wert für jede Funktion zu errechnen. Gezeigt sind die Funktionen, welche in beiden Analysen auftraten und den p-Wert von 0,01 überschreiten, geordnet nach ihrer Signifikanz im humanen LRRK2-Knockdown-Experiment.

Der Vergleich der Netzwerke, welche differentiell regulierte Transkripte enthalten, zeigt, dass 13 gleiche kanonische Netzwerke im humanen und murinen LRRK2 KD deregulierte Transkripte umfassen (Abbildung 3.42).

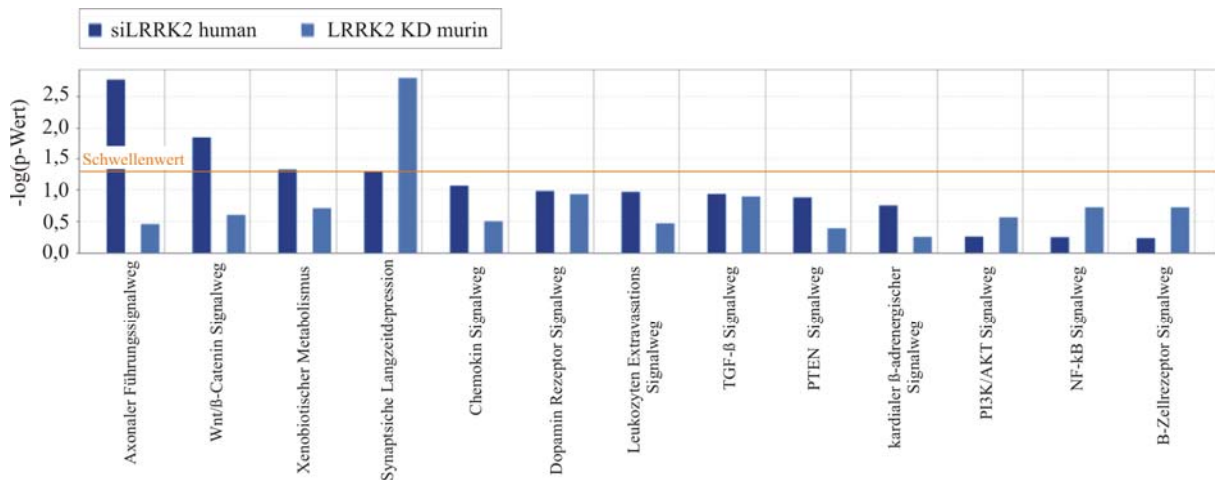


Abbildung 3.42: Beeinflusste kanonische Netzwerke des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns

Die Analyse der kanonischen Netzwerke, welche durch den humanen LRRK2- (dunkelblau) und murinen LRRK2- (hellblau) Knockdown beeinflusst wurden, erfolgte mit der Ingenuity Pathways Analysis Software. Der Fischer's Exact Test wurde benutzt, um einen p-Wert für jede Funktion zu errechnen. Geordnet sind die kanonischen Netzwerke nach ihrer Signifikanz im humanen LRRK2-Knockdown-Experiment.

Die höchste Signifikanz im mLRRK2 KD erreichte der kanonische Signalweg der synaptischen Langzeitdepression mit acht differentiell regulierten Transkripten (p-Wert 0,0016) im Vergleich zu drei differentiell regulierten Transkripten dieses Netzwerkes im hLRRK2 KD (*CACNA1G*, *GNAO1*, *PPP2R2A*, p-Wert 0,05). Die höchste Signifikanz beim hLRRK2 KD erreicht der axonale Führungssignalweg mit acht differentiell regulierten Transkripten (p-Wert 0,0017). Beim mLRRK2 KD hingegen sind in diesem Netzwerk sieben Transkripte dereguliert (p-Wert 0,35).

Betrachtet man allerdings die biologischen Funktionen der differentiell regulierten Transkripte des murinen Datensets, so findet man insgesamt 33 Transkripte, welche auf die Funktion des Zytoskeletts Einfluss nehmen können. Die Regelkreise sind dabei so vielfältig, dass sie im kanonischen Netzwerk nicht erfasst werden können. Aus diesem Grund sind die differentiell regulierten Transkripte mit Einfluss auf zytoskelettäre Signalkaskaden dieses Datensets in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Im hLRRK2 KD (siehe Tabelle 3.1) waren in diesen Signalkaskaden 22 Transkripte differentiell reguliert.

Tabelle 3.5: Differenziell regulierte Gene mit Zytoskelettfunktion im murinen LRRK2-Knockdown

Symbol	Gen Titel	„Fold Change“	p-Wert	molekulare Funktion	Entrez ID
Igf1	insulin-like growth factor 1	-6,449	0,02484	anti-apoptosis /// nervous system development	16000
Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4	-3,734	0,0443	diacylglycerol biosynthetic process /// activation of phospholipase C activity /// actin binding	58809
Adams4	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	-2,779	0,00021	skeletal development /// proteolysis /// proteolysis /// proteolysis /// integrin-mediated signaling pathway	240913
Mag	myelin-associated glycoprotein	-2,3917	0,0238	cell adhesion /// myelin sheath	17136
Prph	peripherin	-2,2405	0,00045	intermediate filament cytoskeleton organization and biogenesis	19132
Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	-1,9972	0,015	cell surface receptor linked signal transduction /// cytoskeleton	14130
Tekt5	tektin 5	-1,9049	0,00063	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	70426
Adams2	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	-1,826	0,00344	proteolysis /// integrin-mediated signaling pathway	216725
Prkcq	protein kinase C, theta	-1,7598	0,02864	protein amino acid phosphorylation /// intracellular signaling cascade /// positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process	18761
Ntn4	netrin 4	-1,7401	0,00973	neuron remodeling, increased neurite length and number	57764
Kif2c	kinesin family member 2C	-1,7309	0,01276	microtubule-based movement	73804
Tmod1	tropomodulin 1	-1,716	0,04856	myofibril assembly /// muscle thick filament assembly /// actin binding /// tropomyosin binding	21916
Afap111	actin filament associated protein 1-like 1	-1,6954	0,03538	actin filament association	106877
Fgd2	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	-1,6802	0,01509	regulation of Rho protein signal transduction /// cytoskeleton	26382
Rtkn	rhotekin	-1,6784	0,04942	Rho protein signal transduction /// regulation of anti-apoptosis	20166
Kif4	kinesin family member 4	-1,6366	0,01308	microtubule-based process /// microtubule-based movement	16571
Nusap1	nucleolar and spindle associated protein 1	-1,5859	0,0333	establishment of mitotic spindle localization /// positive regulation of mitosis /// cell division /// microtubule binding	108907
Inpp1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	-1,5623	0,0093	inositol trisphosphate metabolic process /// actin binding	16332
Plekkg2	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2	-1,5206	0,01656	intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction	101497
Myo1g	myosin IG	-1,5177	0,02143	myosin complex	246177
Pfn2	profilin 2	1,54237	0,02384	cytoskeleton organization and biogenesis /// actin cytoskeleton organization and biogenesis	18645
Kifc2	kinesin family member C2	1,54631	0,04139	microtubule-based process /// microtubule-based movement	16581
Myo19	myosin XIX	1,57451	0,04785	myosin complex	66196
Tekt2	tektin 2	1,58162	0,03236	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	24084
Plcb2	phospholipase C, beta 2	1,58939	0,04485	lipid metabolic process /// intracellular signaling cascade	18796
Rhov	ras homolog gene family, member V	1,6106	0,01444	small GTPase mediated signal transduction /// Cdc42 homologous protein	228543
Shroom1	shroom family member 1	1,7096	0,00535	cell morphogenesis /// actin filament bundle formation /// myosin II complex	71774
Fmpd3	FERM and PDZ domain containing 3	1,7789	0,00371	cytoskeleton	245643
Chl1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	1,95785	0,00408	neuron migration /// cell adhesion /// axon guidance /// neurite development /// dendrite	12661
Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	2,40368	0,00013	Ras protein signal transduction /// actin cytoskeleton organization and biogenesis /// regulation of synaptic transmission /// GABAergic positive regulation of Rac protein signal transduction	16653
Chl1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	2,64084	0,01517	neuron migration /// cell adhesion /// axon guidance /// neurite development /// dendrite	12661
Plexc1	plexin C1	3,08932	0,00596	signal transduction /// multicellular organismal development	54712
Ctnna2	catenin (cadherin associated protein), alpha 2	4,37792	0,00022	cell adhesion /// brain morphogenesis /// cadherin binding /// lamellipodium	12386
Adam1a	a disintegrin and metalloproteinase domain 1a	4,59802	0,04682	proteolysis /// integrin-mediated signaling pathway	280668

Der Vergleich beider Datensätze zeigt den Einfluss von LRRK2 in Integrin-basierte Signalwege anhand der differentiell regulierten Transkripte im hLRRK2 KD (*BMP2*, *CHRM3*, *CXCR4*, *ITGB5*) und der differentiell regulierten Transkripte im mLRRK2 KD (*ADAMTS4*, *ADAMTS2*, *ADAM1A*).

Auch scheinen Rho-Signalkaskaden durch den LRRK2-Verlust in beiden Modellen dereguliert vorzuliegen. So sind im hLRRK2 KD die Guanidin-Austauschfaktoren *ARHGEF7*, *9* und *12* sowie *CHRM3* hochreguliert. Im mLRRK2 KD sind die Transkripte *FGD2*, *RTKN* und *PLEKHG2* reprimiert. Besondere Aufmerksamkeit erlangen die Expressionsveränderungen der kleinen GTPasen. So ist im hLRRK2 KD *CDC42* hochreguliert. Im mLRRK2 KD ist neben *KRAS* auch das CDC42 homologe Protein *RHOV* hochreguliert.

Das Zusammenspiel der drei Komponenten des Zytoskeletts (i) Mikrotubuli (ii) Intermediärfilamente und (iii) Aktinfilamente ist bei der Funktion eines Neurons entscheidend. Die Reduktion von LRRK2 führt zur differentiellen Regulation von Transkripten, welche alle drei Zytoskelett-Bestandteile beeinflussen.

So sind im hLRRK2 KD *MAP4* als Mikrotubuli-Bindeprotein und das Mikrotubuli-Motorprotein *KIF21B* hochreguliert. Im mLRRK2 KD ist die mRNA der Mikrotubuli-Bindeproteine *TEKT5*, *NUSAP1* und *TEKT2* differentiell reguliert. Zusätzlich sind die Mikrotubuli-Motorproteine *KIF2c* (Chromosom 4; kinesin family member 2C; -1,731; 0,013), *KIF4* (kinesin family member 4; -1,6366; 0,013) und *KIFc2* (Chromosom 15; kinesin family member C2; 1,5463; 0,041) reguliert. Die Beeinflussung der Intermediärfilamente ist nur im mLRRK2 KD durch die Repression von *PRPH* (*Peripherin*) zu vermuten. Peripherin ist ein Typ III Intermediärfilament-Protein, welches die Stabilität und Biogenese von Neurofilamenten verändern kann. Am umfangreichsten sind in beiden LRRK2 KD-Modellen Bindeproteine von Aktinfilamenten oder für die Organisation dieser Filamente essentielle Bestandteile dereguliert. Im hLRRK2 KD führt der Verlust von LRRK2 zur Hochregulation von *APBB2*, *ARGBP2*, *CDC42*, *PPP1R12B*, *TPM1*, *TPM3*, *TPM4*. Betrachtet man die deregulierten Transkripte im mLRRK2 KD so sind neben dem reprimierten Aktinfilament-Motorprotein *MYO1G* noch die Aktin-Bindeproteine *RNASE4* und *AFAP111* sowie das Tropomyosin- und Aktin-Bindeprotein *TMOD1* in ihrer Expression reduziert. Hochreguliert liegen hingegen *Profilin 2* (*PFN2*) sowie *SHROOM1* und *MYO19* (*myosin XIX*; 1,575; 0,0478) durch den Verlust von LRRK2 vor.

Der humane und der murine LRRK2-Knockdown veränderte die Expression einer Vielzahl von Transkripten mit zytoskelettärem Zusammenhang. Damit scheint die biologische Funktion dieses Proteins eng mit diesem Signalweg verknüpft zu sein.

4. Diskussion

4.1 Einfluss des LRRK2-Knockdowns auf Apoptoseprozesse

4.1.1 Gesamtgenomische Expressionsanalyse des humanen LRRK2-Knockdowns unter Betrachtung der Apoptose-Signalkaskaden

Die Ursachen des Parkinson-Syndroms (PS) sind bisher nur in Ansätzen bekannt. So werden der Einfluss der Alterung, der Umweltfaktoren, der mitochondrialen Dysfunktion, der Apoptose, des oxidativen Stresses, der Proteinhäufungen und der Eisen-Akkumulation als unterschiedliche Pathomechanismen diskutiert (Moore et al., 2005; Rhodes und Ritz, 2008). Eine große Hoffnung liegt in der Aufklärung der biologischen Funktion der Proteine, welche in der familiären Form des PS eine wichtige Rolle spielen. Unter diesen befindet sich die Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*). Im Vergleich zu den anderen bisher bekannten genetischen Faktoren des PS sind Mutationen in diesem Gen die häufigste Ursache des familiären PS (Biskup und West, 2008). Die Symptome gleichen denen des sporadischen PS, so dass ein gemeinsamer Pathomechanismus zwischen familiären und sporadisch auftretenden PS vermutet wird (Healy et al., 2008).

Da gestörte Apoptoseprozesse als mögliche Mechanismen der Parkinson-Pathogenese diskutiert werden (Gerlach et al., 2007), soll in diesem Teil der Arbeit analysiert werden, ob der LRRK2-Verlust einen Einfluss auf Apoptoseprozesse in der Zelle hat. Betrachtet man post mortem Gehirne der PS-Patienten, so wurde als ein Kennzeichen der Apoptose nukleäre Kondensation in nigralen, Neuromelanin enthaltenden Neuronen detektiert (Tatton, 2000). In der Substantia nigra wurden zusätzlich eine erhöhte Caspase 3-Aktivität und eine erhöhte BAX-Expression identifiziert (Hartmann et al., 2000; Hartmann et al., 2001; Tatton, 2000). Beides sind Proteine, welche Hauptmediatoren der intrinsischen Apoptose-Signalkaskade darstellen (siehe Abbildung 4.1).

Der Einfluss des Parkinson-assoziierten Proteins LRRK2 auf intrinsische und extrinsische Apoptoseprozesse wird von einigen Gruppen in Betracht gezogen (Ho et al., 2009; Iaccarino et al., 2007). Beide Apoptose-Signalwege sind in Abbildung 4.1 veranschaulicht. Es wurde die Interaktion zwischen LRRK2 und FADD sowie die dadurch induzierte Aktivierung der CASP8 gezeigt (Ho et al., 2009). Diese Interaktion scheint durch LRRK2-Mutationen erhöht, wodurch ein Neurodegenerationsmechanismus durch verstärkte CASP8-Aktivität induziert werden könnte (Ho et al., 2009). Auch in post mortem Gehirnen der PS-Patienten mit G2019S- oder R1441C-Mutation konnte eine erhöhte CASP8-Aktivierung gezeigt werden (Ho et al., 2009).

Dennoch scheint LRRK2 nicht allein über den extrinsischen Signalweg zu wirken, sondern ebenso über den intrinsischen Signalweg Apoptoseprozesse beeinflussen zu können. In Studien mit humanen und murinen Zellen wurde herausgestellt, dass die LRRK2-vermittelte Toxizität die Cytochrom C-Freisetzung und die CASP3-Aktivierung induziert, welches unter Apaf1-Abhängigkeit geschah (Iaccarino et al., 2007).

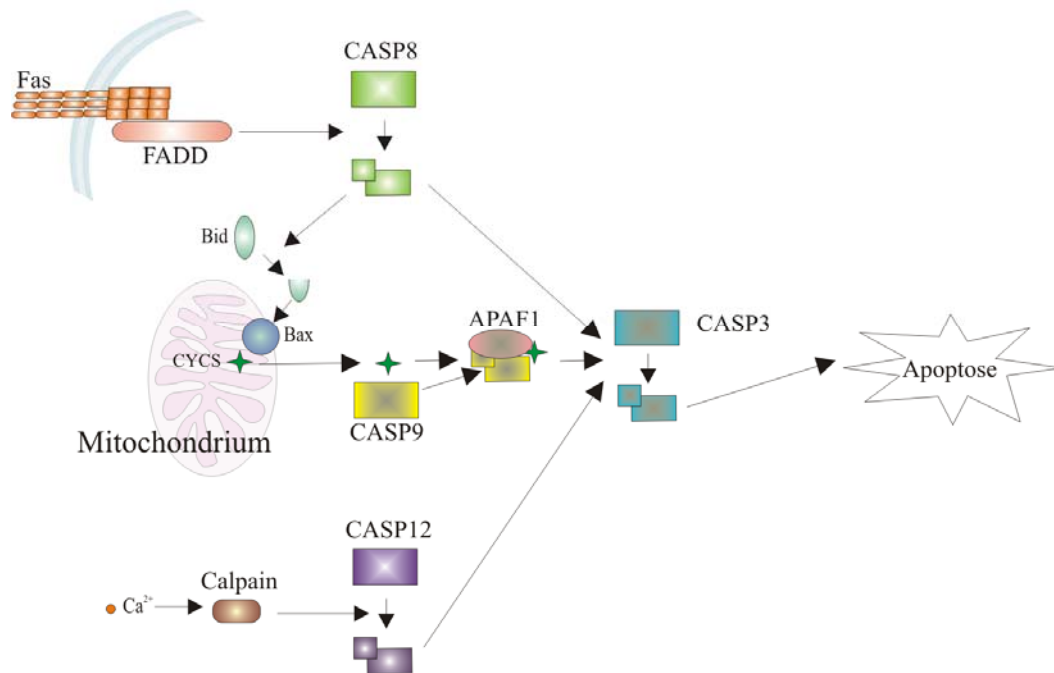


Abbildung 4.1: Darstellung intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalkaskaden

Oben: Extrinsischer Apoptose-Signalweg. Über die Fas-Rezeptor-Aktivierung wird die Spaltung der Caspase 8 induziert. Diese kann die Spaltung der Caspase 3 einleiten, wodurch Apoptose ausgelöst wird. Aktivierte Caspase 8 kann auch Bid durch Spaltung aktivieren und damit auf den intrinsischen Apoptose-Signalweg wirken. Mitte: Intrinsischer Apoptose-Signalweg. Ein Apoptosestimulus bewirkt die BAX-Aktivierung und dadurch die Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium. Dieses bildet mit gespalteener Caspase 9 und Apaf1 das Apoptosom, welches die Caspase 3 aktiviert und Apoptose induziert. Unten: Eine Erhöhung der Kalziumkonzentration (zum Beispiel durch ER-Stress) induziert die Spaltung der Caspase 12, welche durch die Spaltung der Caspase 3 Apoptose induziert.

Die Bedeutung des LRRK2-Verlustes auf Apoptoseprozesse soll in dieser Arbeit auf drei Ebenen diskutiert werden. Dabei stellt die Basis der Diskussion das gesamtgenomische Expressionsprofil humaner dopaminergere Zellen dar, in welchen durch RNAi eine Reduktion der LRRK2-Expression durchgeführt wurde („Knockdown“). Der Verlust dopaminergere Neuronen in der Substantia nigra ist ein Kennzeichen der PS-Pathogenese. Deshalb wird die humane dopaminerge Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y für die Analyse des LRRK2-Knockdowns (KD) genutzt. Aufbauend auf der Expressionsanalyse wird in der gleichen Zelllinie mit Hilfe von Apoptose-Untersuchungen die Bedeutung des LRRK2-Verlustes funktionell analysiert.

Über den Vergleich der differentiell regulierten Transkripte in Apoptose-Signalkaskaden des Expressionsprofils des humanen LRRK2 KD-Zellkulturmodells (hLRRK2 KD) mit dem gesamtgenomischen Expressionsprofil der Gehirne der LRRK2 KD-Mäuse (mLRRK2 KD) wird die dritte Ebene der Diskussion erreicht.

Der Einsatz der RNA-Interferenz (RNAi) machte den LRRK2-KD in humaner Zellkultur möglich. Im Vergleich zweier siRNAs mit unterschiedlichen Zielsequenzen in verschiedenen LRRK2-Domänen zeigte die siRNA, welche in der C-terminalen WD40-Domäne bindet, die höhere Effektivität.

Es ist bekannt, dass Unterschiede in der siRNA-Zielsequenz zu verschieden starken Knockdown-Effekten führen (Holen et al., 2002). Der LRRK2-KD mit dieser siRNA war nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene erfolgreich. Unspezifische „Off-Target“-Effekte konnten aufgrund der control siRNA-Nutzung, welche keinen Effekt auf die LRRK2-Expression zeigte, ausgeschlossen werden.

Unter diesen Voraussetzungen war eine gesamtgenomische Expressionsanalyse LRRK2-defizienter, humaner dopaminergischer Zellen möglich. Sie resultierte in 187 differentiell regulierten Transkripten mit einem „Fold Change“ $\geq |1,5|$ und einem p-Wert $\leq 0,05$. Die Validierungsrate mit der qRT-PCR von 87,5% entspricht den Erfahrungen, welche in der Literatur angegeben sind (Luu-The et al., 2005).

Betrachtet man die bisher publizierten Daten, welche LRRK2 mit Apoptoseprozessen in Zusammenhang bringen, so wurde gezeigt, dass in SH-SY5Y-Zellen eine erhöhte LRRK2-Kinase-Funktion zur Erhöhung der Apoptose und eine Reduktion der Kinase-Funktion zur Neuroprotektion führt (Smith et al., 2006; Smith et al., 2005). Andere Studien zeigen im Gegensatz dazu, dass in humaner Zellkultur die WT LRRK2-Überexpression (nicht aber die Überexpression der Y1699C oder G2019S mutierten LRRK2-Varianten) vor Apoptose schützt, welche durch oxidativen Stress ausgelöst wird. Dieser Mechanismus scheint über die LRRK2-Kinase-Aktivität vermittelt zu werden und die ERK-Signalkaskade zu induzieren (Liou et al., 2008). ERK1/2 und p53 stehen in engem Zusammenhang zueinander, da sie sich gegenseitig beeinflussen können. So ist bekannt, dass sie miteinander interagieren (Persons et al., 2000), p53 die ERK1/2-Aktivität reduzieren kann (Yin et al., 2003) und ERK1/2 die p53-Phosphorylierung erhöht (She et al., 2000).

Aber nicht nur die ERK1/2-MAPK-Kaskade scheint durch LRRK2, welche Sequenzhomologie zu MLKs (einer Untergruppe der MAPKKK) besitzt, induzierbar zu sein. Die Studien von Glöckner et al. konnten zeigen, dass LRRK2 als MAPKKK wirkt, indem es *in vitro* nicht nur MKK3/6, sondern auch MKK4/7 phosphorylieren kann (Gloeckner et al., 2009). Die MKK3/6-Signalkaskade resultiert in der Aktivierung der p38 MAPK (oder MAPK14 genannt). Die MKK4/7-Aktivierung führt zur JNK1/2-Phosphorylierung (oder MAPK8 genannt). Beide Signalkaskaden resultieren in der Regulation von Entzündung, Apoptose, Wachstum und Differenzierung (Mielke und Herdegen, 2000). Diese Vielfalt biologischer Antworten wird durch die verschiedenen Transkriptionsfaktoren ermöglicht, welche durch die MAPK14 oder die MAPK8 aktiviert werden.

Die gesamtgenomische Expressionsanalyse des hLRRK2 KD konnte den Einfluss des LRRK2-Verlustes in MAPKKK-Kaskaden verdeutlichen (Abbildung 4.2). Besondere Aufmerksamkeit erhalten dabei die differentiell regulierten Transkripte *MAPK8*, *CDC42* und *FGF2*, welche Einfluss auf Apoptose-Signalwege ausüben können.

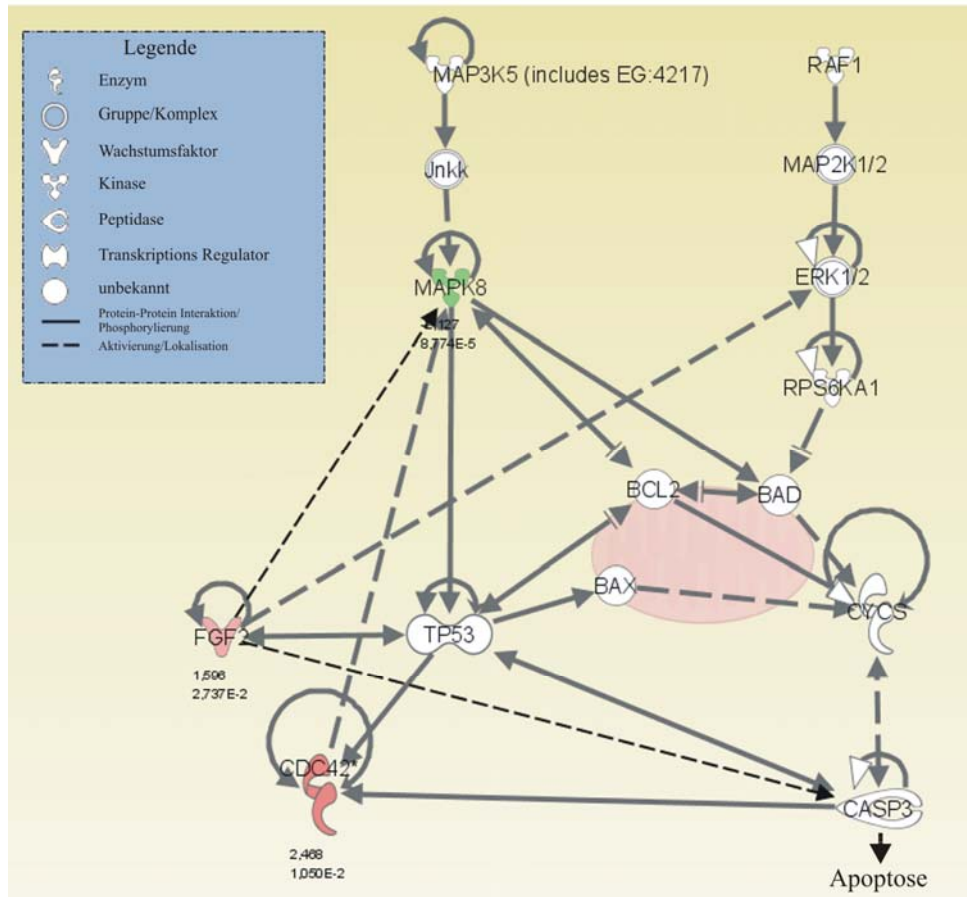


Abbildung 4.2: Einfluss der MAPKKK-Kaskaden auf Apoptoseprozesse

Diese Signalkaskade zeigt vereinfacht zwei verschiedene, dreistufige MAPK-Signalkaskaden. Für Erläuterungen und Quellenangaben siehe Text. Unter LRRK2-Reduktion in SH-SY5Y-Zellen reagieren die rot eingefärbten Transkripte mit einer Hochregulation, die grün eingefärbten Transkripte mit einer Repression. Die Abbildung wurde mit dem Pathdesigner der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt.

FGF2 ist ein Wachstumsfaktor, welcher durch die LRRK2 Repression hochreguliert wird. Er kann zur ERK1/2-Aktivierung und damit, über die BAD-Inhibierung, zur stärkeren Blockade apoptotischer Prozesse führen (Guttmann-Raviv et al., 2007; Tan et al., 1999; Zhang et al., 2001). Es ist bekannt, dass LRRK2 neben ERK5 auch den ERK1/2-Signalweg aktivieren kann (Liu et al., 2008; West et al., 2007). Neben seiner aktivierenden Wirkung auf ERK1/2 kann *FGF2* auch Einfluss auf Apoptoseprozesse über die Aktivierung der CASP3, der MAPK8 oder über die p53-Expressionsveränderung erreichen (Liu et al., 1999; Westwood et al., 2002).

Auf eine Reduktion des LRRK2-Niveaus reagiert die Zelle mit einer Reduktion der *MAPK8*. Möglicherweise hat der LRRK2-Verlust direkt den Verlust der Phosphorylierung der Zielproteine wie MKK4/7 zur Folge. Nachfolgend könnte ein Einfluss auf die Expression seines Zielproteins *MAPK8*, welches beim LRRK2 KD reduziert vorliegt, induziert worden sein. Auch dieses könnte eine Veränderung der p53-Phosphorylierung zur Folge haben, da p53 ein Zielprotein der MAPK8-vermittelten Phosphorylierung ist (Mielke und Herdegen, 2000).

Die im hLRRK2 KD reduziert vorliegende *MAPK8* wird auch durch die kleine GTPase CDC42 reguliert. *CDC42* selbst wird durch den LRRK2-Verlust hochreguliert. Eine CDC42-Inhibierung induziert Apoptose über die p53-Aktivierung (Rul et al., 2002), wobei auch eine Bindung zwischen CDC42 und p53 beschrieben ist (Stelzl et al., 2005). CDC42 wirkt aber zusätzlich über die reduzierte Aktivierung der MAPK14 und der MAPK8 antiapoptotisch auf Apoptose-Signalkaskaden (Gerwins et al., 1997; Tu und Cerione, 2001; Wery-Zennaro et al., 2000). Die MAPK8 kann sowohl über die BAD-Aktivierung, durch BCL2-Inhibierung, als auch über die p53-Aktivierung zur vermehrten Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien und damit zur Aktivierung der CASP3 mit nachfolgenden Apoptoseprozessen führen (Lei et al., 2002; Strasser et al., 2000). Durch die Reduktion der *MAPK8* könnten demnach im siLRRK2-Zellkulturmodell Apoptoseprozesse reguliert vorliegen.

Die Regulationsrichtung der *MAPK8*, des *FGF2* und der kleinen GTPase *CDC42* lassen eine antiapoptotische Funktion des LRRK2-Verlustes vermuten. Da aber nur wenige Apoptose relevante Transkripte differentiell reguliert vorliegen, scheint dieser Effekt gering zu sein.

4.1.2 Funktionelle Apoptose-Analyse des humanen LRRK2-Knockdowns

Die funktionelle Analyse des hLRRK2 KD-Modells befasste sich zunächst mit der Analyse der Apoptoserate zwischen LRRK2-defizienten und control siRNA-behandelten Zellen. Es konnte keine signifikante Veränderung der Menge apoptotischer Zellen zwischen beiden Behandlungen detektiert werden. Damit scheint der Effekt der LRRK2-Reduktion auf Apoptose-Ereignisse minimal zu sein, welches die gesamtgenomische Expressionsanalyse schon vermuten ließ.

Anschließend wurde untersucht, ob Stress-induzierende Toxine zu einer LRRK2-Expressionsveränderung führen können. Deutlich konnte herausgestellt werden, dass der Proteasom-Inhibitor MG132 sowie der Kinase-Inhibitor Staurosporin zu einer Erhöhung des *LRRK2* RNA-Expressionsniveaus führen. Das LRRK2-Protein wird durch den proteasomalen Abbauweg abgebaut (Wang et al., 2008). Wenn dieser Prozess gestört ist wie es durch MG132 induziert wird, so reichern sich nicht nur LRRK2, sondern auch andere Proteine in der Zelle an. Es ist im Moment unklar, warum die Zelle mit einer vermehrten *LRRK2*-Expression darauf reagiert.

Das Toxin Staurosporin inhibiert unspezifisch eine Vielzahl an Kinasen, unter ihnen auch LRRK2 (Covy und Giasson, 2009). Möglicherweise versucht die Zelle den Verlust der LRRK2 Kinase-Funktion durch eine Erhöhung der *LRRK2*-Expression auszugleichen.

Da die dopaminerge Zelle auf bestimmte Toxine mit einer LRRK2-Expressionsveränderung reagierte, wurde anschließend untersucht, ob unter LRRK2-Reduktion und der Gabe Stress-induzierender Toxine eine veränderte Anzahl apoptotischer Zellen zu beobachten ist. Deutlich wurde gezeigt, dass unter dem ER-Stress-induzierenden Toxin Tunicamycin, unter dem

oxidativem Stress-induzierenden Toxin H_2O_2 sowie unter dem Kinase-inhibierenden Toxin Staurosporin der LRRK2-Verlust antiapoptotische Folgen hat und damit schützend auf dopaminerge Zellen wirkt. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Daten von Smith et al. (2006), welcher eine Reduktion der LRRK2-Kinase-Aktivität mit einer Neuroprotektion korreliert.

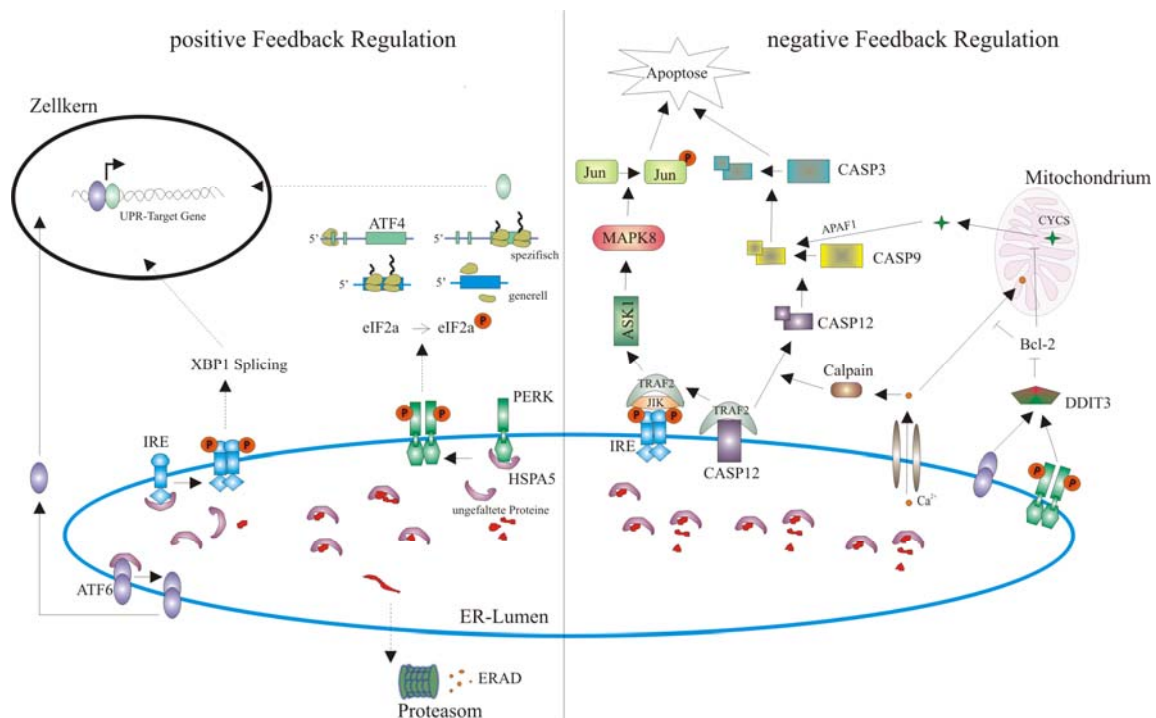


Abbildung 4.3: Positive und negative Rückkopplungs-Regulation bei ER-Stress

ER-Stress führt zum Überschuss fehlgefalteter Proteine, welche durch das Hitzeschockprotein HSPA5 (BIP) wieder in die richtige Konformation gebracht werden können. Dabei können positive Rückkopplungs-Signalkaskaden, welche diesen Prozess unterstützen (links) oder negative Rückkopplungs-Signalkaskaden, welche die Zelle in die Apoptose führen (rechts), auftreten.

Positive Rückkopplungs-Regulation: HSPA5 blockiert nicht mehr die UPR-Sensoren IRE (inositol-requiring enzym 1), PERK (eukaryotic translation initiation factor 2- α kinase 3) und ATF6 (activating transcription factor 6). IRE und PERK können dadurch oligomerisieren und werden autophosphoryliert. IRE katalysiert nachfolgend das XBP1-Splicing, welches im Kern zur Transkription UPR-spezifischer Transkripte führt. Aktiviertes PERK phosphoryliert eIF2 α . Dies stoppt die generelle Proteinsynthesemaschinerie, damit die Zelle sich von ungefalteten Proteinen erholen kann. Es führt aber auch zur spezifischen Synthese bestimmter Proteine, welche für die positive UPR-Antwort benötigt werden (z.B. ATF4). Freies ATF6 kann gespalten werden, wodurch das Spaltprodukt in den Kern transferiert werden kann, wo es gemeinsam mit XBP1 und ATF4 die Expression der Transkripte der positiven UPR-Antwort steuert. Durch diese Prozesse können mehr Proteasomen zur Verfügung gestellt werden, welche die ERAD (ER-assoziierte Degradation) fehlgefalteter Proteine bewerkstelligen.

Negative Rückkopplungs-Regulation: Sobald die Zelle es nicht mehr schafft fehlgefaltete Proteine korrekt zu falten oder zu degradieren, erhalten Bak und Bax in der ER-Membran eine andere Konformation und lösen einen Ca^{2+} -Ausfluss aus. Dies aktiviert Calpain, welches zur Spaltung der CASP12 führt. Die dadurch aktive CASP12 kann über die Aktivierung der CASP9 und nachfolgend der CASP3 zur Apoptose führen. IRE1 kann über seine Interaktion mit TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) die ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) aktivieren, welche die MAPK8 phosphoryliert, wodurch Apoptose induziert wird. DDIT3 (CHOP) ist ein Ziel von ATF6 und PERK und kann BCL2 inhibieren, wodurch dessen Funktion als antiapoptotisches Protein blockiert wird (Wu und Kaufman, 2006).

Der Zusammenhang zwischen ER-Stress und der Pathogenese des PS wird diskutiert. (Lindholm et al., 2006). So führt der Verlust des PS-assoziierten Gens Parkin zu ER-Stress (Imai und Takahashi, 2004). Zusätzlich induzieren die Parkinson-Symptome-auslösenden Neurotoxine MPTP, dessen Metabolit MPP⁺ und 6-OH-DA in neuronalen Zellen nicht nur oxidativen Stress, sondern auch ER-Stress. Dabei werden besonders die Komponenten der Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR, „unfolded protein response“) hochreguliert (Lindholm et al., 2006). Zum einen kann nachfolgend eine positive Rückkopplungs-Regulation auftreten, wodurch die Zelle darin unterstützt wird, fehlgefaltete Proteine wieder in die richtige Konformation zu bringen oder abzubauen. Zum anderen besteht für die Zelle die Möglichkeit, die Apoptose einzuleiten. Die dabei vorherrschenden Regulationskaskaden sind in Abbildung 4.3 dargestellt (Wu und Kaufman, 2006).

Aus diesem Grund wurden die zugrunde liegenden Signalkaskaden untersucht, welche nach LRRK2-KD und Tunicamycin-Stress in SH-SY5Y-Zellen zur antiapoptotischen Wirkung führen. Der ER-Stress-Induktor Tunicamycin führt über die Inhibition der UDP-N-acetylglucosamine zur Blockade der Protein-N-Glykosylierung, was wiederum die UPR auslöst (Price und Tsvetanova, 2007).

In Tunicamycin-gestressten, dopaminergen Zellen (unter control siRNA-Behandlung) konnte mit Hilfe der qRT-PCR in dieser Arbeit eine Erhöhung der Expression der Transkripte *DDIT3*, *HSPA5*, *CASP3*, *MAPK14* und *MAPK8* detektiert werden. Dies scheint die normale Reaktion der Zelle auf diese Art des ER-Stresses zu sein, da auch andere Arbeitsgruppen die Expressionserhöhung dieser Transkripte detektieren konnten (Chan et al., 2004; Nguyen et al., 2004; Zinszner et al., 1998). Zusätzlich wurde in den Analysen dieser Arbeit nach Tunicamycin-Stress auch eine Hochregulation der *ARHGEF7*-Expression detektiert. Es ist bekannt, dass *ARHGEF7* über einen *CDC42/Rac/PAK*-Signalweg zur Aktivierung der *MAPK14* führt und deren Translokation in den Kern induziert (Lee et al., 2001). Eine Aktivierung der *MAPK14* induziert Apoptose (Tibbles und Woodgett, 1999).

Liegt LRRK2 in diesen Stress-induzierten Zellen reduziert vor, so kommt es zur reduzierten Aktivierung dieser sechs Transkripte (*DDIT3*, *HSPA5*, *CASP3*, *MAPK14*, *MAPK8* und *ARHGEF7*). Betrachtet man diese einzeln, so wird *DDIT3* weniger stark aktiviert, wodurch *BCL2* nicht so stark gehemmt wird. Dies könnte zur reduzierten Apoptose geführt haben. Auch die geringere Expression der *MAPK14*, der *MAPK8* und der *CASP3* spricht für die verringerte Apoptose-Induktion bei LRRK2-defizienten Zellen unter Tunicamycin-Stress. Die *HSPA5*-Expression liegt auch bei Zellen mit reduziertem LRRK2-Niveau und ER-Stress über dem Normalniveau, erreicht aber nicht die Höhe der Zellen mit normalem LRRK2-Expressionsumfang. Möglicherweise sind Zellen mit reduzierter LRRK2-Expression weniger anfällig gegenüber ER-Stress und benötigen weniger *HSPA5*, um fehlgefaltete Proteine in die richtige Konformation zu bringen. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass die Menge apoptotischer Zellen unter Tunicamycin-Stress und LRRK2-Reduktion weniger stark ausfällt.

Eine andere Erklärung ist eventuell, dass als Folge der LRRK2-Reduktion der ER-Stress-induzierte Signalweg auch über die MAKKK-Kaskade dereguliert werden kann. Ein LRRK2-Verlust unter dieser Stressbedingung könnte eine Veränderung der Phosphorylierung der MKK3/6 zur Folge haben. Diese MAPKK konnte als LRRK2-*in vitro*-Substrat identifiziert werden (Gloeckner et al., 2009). Da die MKK3/6 direkt die Phosphorylierung der MAPK14 und damit auch die Phosphorylierung dessen Substrates DDIT3 induziert, könnte hier ein Zusammenhang zur antiapoptotischen Wirkung der LRRK2-Reduktion unter ER-Stress bestehen. Inwieweit ER-Stress die LRRK2-Funktionen beeinflusst oder ob ER-Stress bei der LRRK2-vermittelten Pathogenese des PS eine Rolle spielt, wurde noch nicht detailliert untersucht. Aus diesem Grund müssen weitere Analysen in LRRK2-basierten Zellkultur- und Tiermodellen folgen, um diese Fragestellung zu beantworten.

Die dopaminergen Neuronen der Substantia nigra, welche während der Pathogenese des PS degenerieren, sind besonders anfällig gegenüber oxidativen Stress (siehe 1.1.4.3) (Gerlach et al., 2007). Auch sind einige Studien publiziert, in welchen die LRRK2-Funktion mit oxidativem Stress in Zusammenhang gestellt wird. So konnten Tan et al. die G2385R-LRRK2-Mutation mit einer verstärkten Apoptose in HEK-293-Zellen unter H₂O₂-Stress im Vergleich zu WT LRRK2 verknüpfen (Tan et al., 2007). Auch die Studien von Liou et al. stellten heraus, dass LRRK2-Kinase-aktive Mutanten (Y1699C, G2019S) bei oxidativem Stress nicht vor Apoptose schützen, obwohl dies das WT LRRK2-Protein erreichen kann (Liou et al., 2008).

Im hLRRK2 KD kommt es unter oxidativem Stress zum antiapoptotischen Effekt auf dopaminerge Zellen. Der oxidative Stress-Induktor H₂O₂ führt in control siRNA-behandelten Zellen zur Apoptose-Induktion. Dies erkennt man an der Reaktion des Transkriptionsniveaus der *CDC42*, des *MDM2* und des *FGF2*. All diese sind Transkripte, welche antiapoptotische Wirkung entfalten können (Gerwins et al., 1997; Guttman-Raviv et al., 2007; Piette et al., 1997; Wery-Zennaro et al., 2000).

Es ist auffällig, dass keines der gemessenen Transkripte in seiner Expression in control siRNA-behandelten Zellen unter H₂O₂-Stress steigt. Eine Aktivierung, zum Beispiel durch Phosphorylierung, der proapoptotischen Proteine MAPK8, MAPK14, CASP3 oder p53 kann aber mit dieser Analyse nicht detektiert werden. Es ist auch bekannt, dass H₂O₂ die Expression der *MAPK8* nicht verändert, aber deren Aktivität erhöhen kann (Nishida et al., 2000; Yoshino et al., 2004). Auch ist eine Aktivierung der MAPK14, CASP3 und p53 auf Proteinebene durch H₂O₂ in der Literatur beschrieben (Dumont et al., 1999; Nishida et al., 2000; Xie et al., 2001).

Der LRRK2-Verlust unter oxidativem Stress führt zu einer deutlich reduzierten Expression des *ARHGEF7* und der *MAPK8* im Vergleich zu ebenso gestressten control siRNA-behandelten Zellen. Dies führt zu der Annahme, dass die schützende Wirkung der LRRK2-

Reduktion unter oxidativem Stress durch die Expressionsreduktion der *MAPK8* geschehen könnte (siehe Abbildung 4.4).

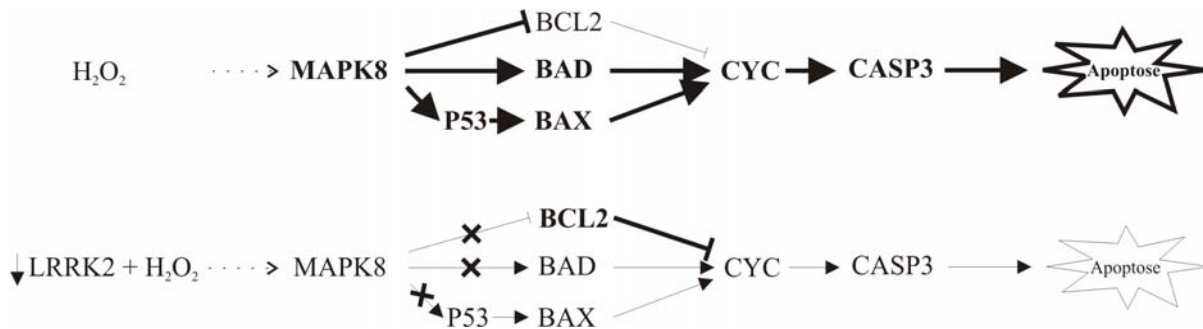


Abbildung 4.4: Einfluss der MAPK8 auf Apoptose-Signalkaskaden

Oben: Oxidativer Stress durch H_2O_2 führt zur Aktivierung der MAPK8, welche durch Phosphorylierung eine inhibierende Wirkung auf BCL2 und aktivierende Wirkung auf BAD und BAX hat. Dadurch wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt, welches zur Aktivierung der CASP3 mit nachfolgender Apoptose-Induktion führt.

Unten: Unter LRRK2-Reduktion und H_2O_2 in humanen SH-SY5Y-Zellen kommt es zur Reduktion der MAPK8 im Vergleich zu LRRK2-defizienten Zellen ohne H_2O_2 Behandlung. Dadurch kann weniger BAD und weniger p53 aktiviert werden. Zusätzlich wirkt auch weniger inhibitorische Wirkung auf BCL2, wodurch dieses die Freisetzung von Cytochrom C und damit Apoptose blockieren kann.

Unter oxidativem Stress (in Abbildung 4.4, oben) kommt es zur Erhöhung der Aktivität der MAPK8, welche das antiapoptotische Protein BCL2 hemmt und die proapoptotischen Proteine BAD und p53 aktiviert. Nachfolgend wird CYCS aus den Mitochondrien freigesetzt, welches über die Aktivierung der Caspase 3 proapoptotisch wirkt (Lei et al., 2002; Strasser et al., 2000). Unter LRRK2-Reduktion (Abbildung 4.4, unten) kommt es unter H_2O_2 -Stress zur RNA-Expressionsverringerng der MAPK8. Vermutlich ist dies dadurch weniger stark aktivierbar und seine stimulierende Wirkung auf die proapoptotischen Proteine BAD und p53 findet nicht oder weniger statt. Zusätzlich wird bei fehlendem MAPK8-Signal auch keine BCL2-Hemmung induziert, wodurch dieses antiapoptotisch wirksam werden kann.

Die MAPK8 ist ein Substrat der MKK4/7, welches ein LRRK2-Substrat ist (Gloeckner et al., 2009; Mielke und Herdegen, 2000). Möglicherweise führt der LRRK2-Verlust besonders unter oxidativem Stress zur reduzierten MKK4/7-Phosphorylierung, wodurch weniger MAPK8 aktiviert wird und keine proapoptotische Wirkung mehr entfalten kann.

Damit ist eine Reduktion der MAPK8-Funktion sowohl durch transkriptionelle als auch posttranslationale Kontrolle eine potentielle Ursache der reduzierten Menge apoptotischer Zellen unter LRRK2-Reduktion und oxidativem Stress.

Dennoch muss in weiteren Analysen geklärt werden, warum sowohl unter oxidativem Stress bei reduziertem LRRK2-Expressionsniveau in SH-SY5Y-Zellen (wie in dieser Arbeit) als auch unter der gleichen Stressbedingung bei LRRK2-Überexpression in HEK-293-Zellen (Liou et al., 2008) eine antiapoptotische Wirkung auf Zellen ausgeübt wird.

4.1.3 Vergleich des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns bei Apoptoseprozessen

Im hLRRK2 KD-Modell in dopaminergen Neuronen wurde unter bestimmten Stressbedingungen eine antiapoptotische Wirkung des LRRK2-Verlustes detektiert. Das Gehirn besteht aus einem komplexen neuronalen Netzwerk verschiedenster Zellen, so dass der Einfluss des LRRK2-Verlustes auf Apoptoseprozesse im Zellkulturmodell nicht direkt auf Apoptoseprozesse im Gehirn übertragbar ist.

Aus diesem Grund wurde ein gesamtgenomisches Expressionsprofil sieben Tage alter LRRK2-Knockdown-Mäuse (mLRRK2 KD) erstellt und die differentiell regulierten Transkripte mit dem hLRRK2 KD-Modell verglichen. Im mLRRK2 KD waren 375 Gene differentiell reguliert („Fold Change \geq 1,5; p-Wert \leq 0,05), von denen 193 reprimiert und 182 hochreguliert vorlagen. Der Vergleich mit den 187 differentiell regulierten Transkripten des hLRRK2 KD erbrachte eine deutliche Überschneidung dieser Transkripte in biologischen Funktionen sowie in ihrem Einfluss auf kanonische Netzwerke. Es konnte allerdings nur *BRAP* (*BRCA1 associated protein 1*) als Transkript identifiziert werden, welches in beiden Expressionsprofilen differentiell reprimiert vorkam.

Die Abbildung 4.5 zeigt *BRAP* in einem Netzwerk differentiell regulierter Transkripte beider Expressionsanalysen (Abbildung 4.5 A= hLRRK2 KD, B= mLRRK2 KD). Betrachtet man die biologische Funktion des BRAP-Proteins, so kann es die nukleäre Zielsequenz des BRCA1 (Breast cancer 1 gene) binden und dessen Transport regulieren (Li et al., 1998). BRCA1 ist ein nukleäres Phosphoprotein, welches die genomische Stabilität aufrechterhält und als Tumorsuppressor wirken kann (Jhanwar-Uniyal, 2003). Es kann das Tumorsuppressor-Protein p53 (Gen= *TP53*) direkt binden, es aktivieren und seine Expression erhöhen (Somasundaram et al., 1999; Zhang et al., 1998b). Aber es besteht auch eine gegenseitige Beeinflussung, indem p53 die Expression von *BRCA1* reprimiert (Arizti et al., 2000).

Der Einfluss des *TP53*-Expressionsniveaus auf die Degeneration dopaminergener Neuronen im Gehirn PS-Betroffener wird diskutiert (Mogi et al., 2007). Es gibt Untersuchungen, welche zeigen, dass der p53-Phosphorylierungsstatus am Zelltod dopaminergener Neuronen ursächlich ist (Nair, 2006; Nair et al., 2006). In der Substantia nigra von post mortem Gehirnen der PS-Patienten wurde eine erhöhte *BAX*-Expression identifiziert (Hartmann et al., 2001; Tatton, 2000). Eine erhöhte *BAX*-Expression, welche zur Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran und damit zur Induktion der intrinsischen Apoptose-Signalkaskade führen kann, wird möglicherweise durch p53 induziert (Parone et al., 2002; Tatton et al., 2003).

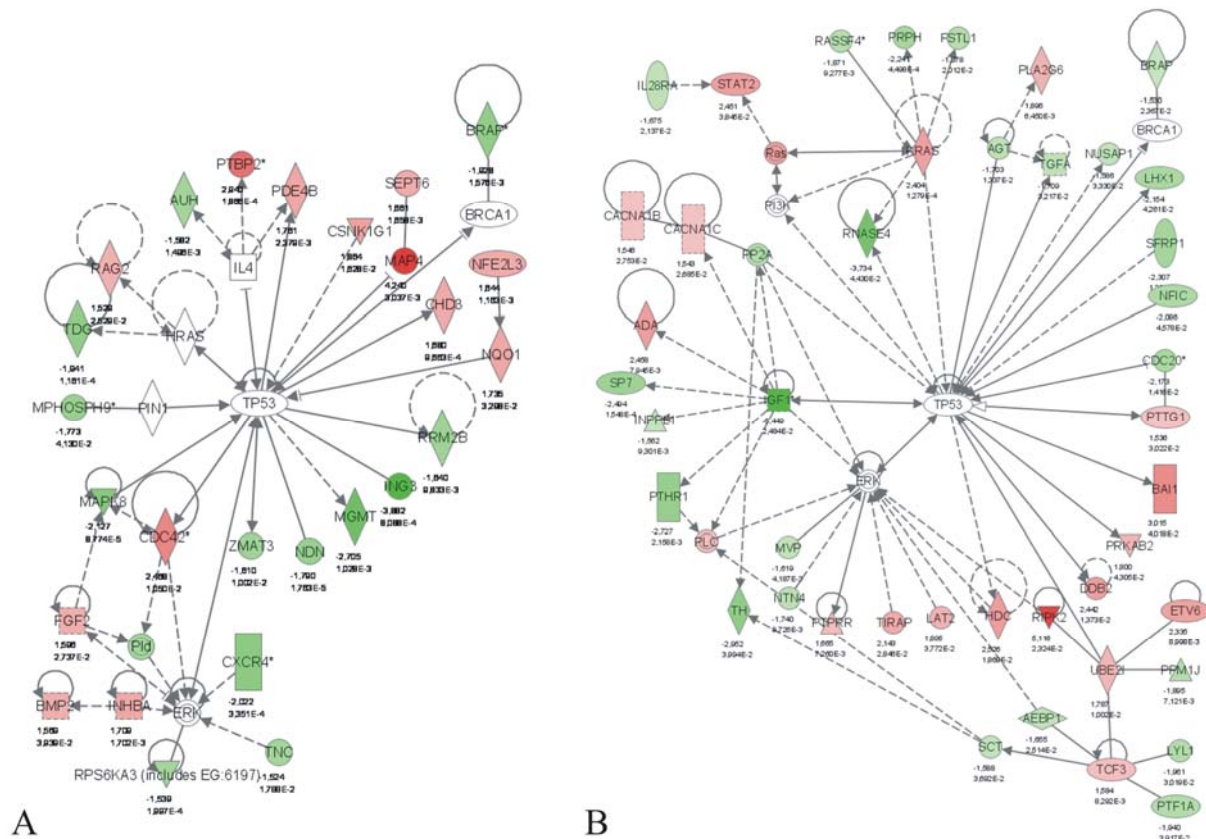


Abbildung 4.5: Einfluss des LRRK2-Knockdowns auf TP53-Signalkaskaden

Das Tumorstprotein p53 (*TP53*) spielt eine wichtige Rolle in Apoptose-Signalkaskaden (Vazquez et al., 2008). Eine große Transkript-Anzahl um diesen Transkriptionsregulator sind im humanen LRRK2 KD (A) und im murinen LRRK2 KD (B) hoch- (rot) oder herunterreguliert (grün). Direkte Interaktionen sind mit durchgezogenen Linien, und indirekte Interaktionen mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Die Netzwerke wurden mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang den Einfluss des LRRK2-Verlustes auf p53-gekoppelte Signalkaskaden, so sind im murinen und im humanen LRRK2 KD-Modell Transkripte, welche p53 beeinflussen und von diesem beeinflusst werden, dereguliert (Abbildung 4.5). *TP53* selbst ist in keinem der beiden Modellen dereguliert, wobei dessen Aktivierung vor allem über Phosphorylierung gesteuert wird. Ob LRRK2 diese Funktion übernimmt, ist bisher noch nicht untersucht worden.

In Hinblick auf die Regulationsrichtung der differentiell regulierten Transkripte mit p53-Assoziation ist bemerkenswert, dass sie in vielen Fällen die Richtung der Förderung der Tumorentstehung zeigt. Dennoch ist dies nicht uneingeschränkt gültig, da es auch Transkriptionsveränderungen gibt, welche der Tumorentstehung entgegenwirken.

Für die Förderung der Tumorentstehung durch den LRRK2-Verlust im humanen LRRK2 KD-Modell können fünf Beispiele genannt werden.

- (1) Im hLRRK2 KD liegt *RRM2B* reprimiert vor. Der homozygote RRM2B-Knockout (*ribonucleotide reductase M2 B*) führt zur Fibroblasten-Immortalisierung (Kimura et al., 2003).
- (2) MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) kann die Bildung von Lymphomen reduzieren (Allay et al., 1999). Es wird durch den hLRRK2 KD in seiner Expression reduziert, kann damit eventuell diese Funktion nur eingeschränkt übernehmen.
- (3) Für die Tumorgenese der Lymphome ist RAG2 (recombination activating gene 2) entscheidend. Es ist im hLRRK2 KD hochreguliert.
- (4) Eine erhöhte mRNA-Expression des *NQO1* (*NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*) wird in Dickdarm und Lungen Karzinomen detektiert (Bey et al., 2007; Gavert et al., 2007). Auch im hLRRK2 KD ist die *NQO1*-mRNA hochreguliert.
- (5) Der Knockdown der MAPK8 (mitogen-activated protein kinase 8) führt in Mäusen zu Hauttumor-Induktion (She et al., 2002). Die Expression der *MAPK8* ist unter LRRK2-Reduktion ebenso reprimiert. Möglicherweise spricht auch die im zellulären Modell detektierte reduzierte Apoptoserate unter LRRK2-Reduktion bei Stressinduktion durch H₂O₂, Tunicamycin und Staurosporin für das Szenario, dass der LRRK2-Verlust möglicherweise nicht nur antiapoptotisch, sondern auch onkogen wirksam sein könnte.

Eine ähnliche Tendenz ist ebenso im murinen LRRK2 KD-Modell erkennbar. Dabei können sieben Beispiele genannt werden.

- (1) Durch die LRRK2-Reduktion kommt es zur Expressionserhöhung von *STAT2* (*signal transducer and activator of transcription 2*). Eine kontinuierliche Induktion STAT-vermittelter Signalkaskaden kann zur Onkogenese führen (Bowman et al., 2000).
- (2) Durch den LRRK2-Verlust wird eine Hochregulation der *KRAS*-mRNA (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) induziert. In Säugetieren besteht die Ras-Proteinfamilie, welche zu den kleinen GTPasen zählt, aus drei Proteinen: Ha-Ras, Ki-Ras, and N-Ras. Eine hohe biologische Bildung der Ras-Proteine und dominant aktive KRAS-Mutanten erhöhen die Induktion von Tumoren (Kato et al., 1997; Velu et al., 1989). Zusätzlich ist aber bekannt, dass transgenes humanes Ras in Mäusen die Neurodegeneration dopaminerger Neurone der Substantia nigra reduziert (Heumann et al., 2000). Die Expression des humanen KRAS-Proteins in pyramidalen Zellen des Isokortex und in Neuronen des entorhinalen Kortex ist assoziiert mit der Alzheimer Krankheit (Luth et al., 2000).
- (3) Der LRRK2-Knockdown führt zur *PLA2G6*-Hochregulation (*phospholipase A2, group VI*). Eine Hochregulation der *PLA2G6*-mRNA wird auch in gutartigen Tumoren der Gebärmutter (uterine Leiomyoma) detektiert (Li und Zhang, 2002).
- (4) Die mRNA von *UBE2I* (*ubiquitin-conjugating enzyme E2I*) ist unter LRRK2-Reduktion im murinen Modell hochreguliert. In Knochenmarkszell-Lysaten der Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie findet man ebenso eine erhöhte *UBE2I*-Expression (Geletu et al., 2007).

- (5) Eine Assoziation der Myeloischen Leukämie und ETV6 (ets variant 6) wird postuliert (Schmid und Carson, 2001). Die Expression eines chimären Proteins aus ETV6 und PSGFRB (PSGF receptor beta) erhöht die Bildung des B-Zell und T-Zell Non-Hodgkin Lymphoms (Tomasson et al., 1999). Das Ausschalten dieses Proteins führt zur gesteigerten Neuronen-Apoptose (Wang et al., 1997). Damit könnte möglicherweise eine erhöhte *ETV6*-Expression wie es im murinen LRRK2 KD-Modell detektiert wurde die Apoptose unterdrücken und zur Tumorentstehung beitragen.
- (6) Ein ähnlicher Regulationsmechanismus könnte durch die verstärkte *TCF3*-Expression (*transcription factor 3*) ausgelöst werden. *TCF3* liegt durch den LRRK2-Verlust hochreguliert vor. Es ist bekannt, dass die Überexpression eines chimären TCF3-HGF-Proteins zur Reduktion der Apoptose führt und bei einem chimären Protein aus TCF3 und PBX1A eine gesteigerte Bildung von Lymphomen induziert wird (Altura et al., 1998; Feldman et al., 1997).
- (7) Im murinen LRRK2 KD ist die *RASSF4*-mRNA (*ras association domain family member 4*) reprimiert. Das kodierende Protein ist bekannt für seine Fähigkeit das Tumorentstehung zu reduzieren (Eckfeld et al., 2004).

Somit sind im humanen und murinen LRRK2 KD-Modell differentiell regulierte Transkripte zu finden, welche in ihrer Regulationsrichtung, möglicherweise die Tumorentstehung fördern könnten.

Dennoch gibt es auch Gegenbeispiele des möglichen induktiven Einflusses der LRRK2-Reduktion auf die Tumorentstehung. So sind zwei wichtige Wachstumsfaktoren *TGFA* (*transforming growth factor, alpha*) und *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*) im mLRRK2 KD-Modell reprimiert. In Nierenzell-Karzinomen kann eine verstärkte *TGFA*-mRNA-Expression detektiert werden (Petrides et al., 1990). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die transgene Proteinexpression dieses Wachstumsfaktors die Bildung von Brusttumoren steigert (Pierce et al., 1995). Auch der Wachstumsfaktor *IGF1* wurde in Prostata-, Brust- und Dickdarmkrebs als hochreguliert identifiziert (Chan et al., 1998; Thomas, 2002).

Es wird postuliert, dass LRRK2 durch einen Funktionszugewinn der Kinase-Funktion die PS-Pathogenese induziert (Greggio et al., 2006; Smith et al., 2005; West et al., 2007). Dies wird in Zellkultur-basierten Studien deutlich. So kommt es in LRRK2-G2019S, -R1441C sowie LRRK2-Y1699C transfizierten SH-SY5Y-Zellen und primären kortikalen Neuronenkulturen zu erhöhter Neurodegeneration, begleitet durch Apoptoseprozesse (Smith et al., 2005). Die Reduktion der LRRK2-Expression in Neuronen führte hingegen zu einem vermehrten Auswachsen der Neuriten (MacLeod et al., 2006). Aus diesem Grund ist ein möglicher Therapieansatz, die LRRK2-Kinase-Funktion zu hemmen, um LRRK2-induzierte Neurodegeneration zu inhibieren oder sogar rückgängig zu machen.

Die in dieser Arbeit aufgestellten Expressionsprofile in einer dopaminergen Zelllinie unter LRRK2-Verlust und in Gesamtgehirn eines murinen LRRK2-Knockdown-Modells, weisen allerdings auf eine mögliche Gefahr der Kinase-Funktionsunterdrückung hin. Es kommt bei LRRK2-Verlust zu einer Deregulation der Transkripte, welche in der detektierten Regulationsrichtung möglicherweise zur Tumorentstehung oder ungehemmten Zellwachstum führen könnten. Damit scheint für das Überleben der Zelle eine exakte Regulation des LRRK2-Expressionsniveaus ausschlaggebend zu sein.

Der Vergleich des humanen und murinen LRRK2 KD-Modells kann möglicherweise auch helfen die Frage zu klären, ob die LRRK2-Funktion eher im extrinsischen oder im intrinsischen Apoptose-Signalweg zu finden ist. Für beide Signalkaskaden sind Hinweise der LRRK2-Funktion schon publiziert (Ho et al., 2009; Iaccarino et al., 2007). Im murinen und humanen LRRK2-KD wurde keine Veränderung des Expressionsprofils prominenter Moleküle dieser Apoptose-Signalkaskaden identifiziert. Die Aktivierung dieser Signalwege geschieht aber primär über proteolytische Spaltung der Procaspasen zu aktiven Caspasen, so dass nicht zwingend mit einer Expressionsveränderung bei Beeinflussung dieser Kaskaden gerechnet werden kann.

Besonders auffällig ist im mLRRK2 KD die Hochregulation der Protease *Calpain 3*. Calpaine werden bei erhöhter Kalziumkonzentration aktiviert und können nachfolgend zur Spaltung und Aktivierung der CASP12 führen (Nakagawa und Yuan, 2000). Damit kann ein Apoptoseweg induziert werden, welcher unabhängig des intrinsischen und extrinsischen Signalweges geschieht. Calpain 1 ist an der Spaltung des PS-assoziierten Alpha-Synukleins beteiligt (Mishizen-Eberz et al., 2005). Eine erhöhte *Calpain 2*-Expression konnte im Mesenzephalon der PS-Patienten gefunden werden, wobei eine Calpain Immunoreaktivität auch in Lewy-Körperchen auftritt (Mouatt-Prigent et al., 1996). Allgemein scheint die Kalzium-induzierte Calpain-Aktivierung ein gemeinsamer Regulationsmechanismus in akuten und in chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington oder Parkinson zu sein (Vosler et al., 2008). Aber nicht nur die Calpain-Aktivierung ist ein Kalzium-induzierter Pathomechanismus. Zusätzlich führt eine veränderte Kalzium-Homöostase zu mitochondrialer und ER-Dysfunktion, Glutamat-Exzitotoxizität, Verlust der Kalzium-Puffereigenschaften und Veränderungen des Kalzium-Einstroms in Neuronen (Wojda et al., 2008).

Grundsätzlich scheint der LRRK2-Verlust im humanen sowie im murinen Modell zu Veränderungen der Kalzium-Homöostase zu führen. So ist *Calbindin 1 (CALB1)* im humanen LRRK2 KD hochreguliert. Calbindin 1 ist ein Kalzium-Bindeprotein, dessen mRNA-Transkription bei den neurodegenerativen Erkrankungen Huntington und Alzheimer reduziert vorliegt (Connor und Dragunow, 1998; Hodges et al., 2006). Ebenso ist das mRNA-Niveau der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Kinase-Kinase 2 beta (CAMKK2) bei Huntington im

Kortex reduziert (Hodges et al., 2006). Betrachtet man die Regulation dieser *CAMKK2* im humanen LRRK2 KD, so ist sie entgegengesetzt dazu hochreguliert.

Eine gestörte Kalzium-Homöostase kann durch eine Veränderung der Kalzium-abhängigen Kanäle induziert werden. Im hLRRK2 KD-Modell liegt die Beta-Untereinheit des Kalzium sensitiven Kaliumkanals *KCNMB4* hochreguliert vor. Betrachtet man spannungsabhängige Kalziumkanäle, so ist im humanen LRRK2-Knockdown der *CACNA1G* (*calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit*) hochreguliert. Im murinen LRRK2-Knockdown hingegen sind *CACNA1C* und *CACNA1B* hochreguliert.

Die genannten differentiell regulierten Transkripte aus beiden Modellen zeigen, dass der LRRK2-Verlust möglicherweise die Kalzium-Homöostase der Zelle beeinflussen kann, welche entscheidend für die Aufrechterhaltung der Neuronenfunktionen ist.

4.1.4 Zusammenfassung: LRRK2 und seine Bedeutung für Apoptoseprozesse

In humanen dopaminergen Zellen induziert der LRRK2-Verlust keine Veränderung der Menge apoptotischer Zellen. Dennoch weisen einige differentiell regulierte Transkripte des gesamtgenomischen Expressionsprofils auf eine LRRK2-Funktion in Apoptose-Signalwegen hin. Induziert man in den LRRK2-reduzierten humanen dopaminergen Zellen mit bestimmten Toxinen (Tunicamycin, H₂O₂ und Staurosporin) eine Stresssituation, so kommt es zu einer schützenden Wirkung des LRRK2-Verlustes auf die Zellen.

Der Vergleich des humanen LRRK2-Modells mit dem gesamtgenomischen Expressionsprofil des murinen LRRK2-Knockdown-Modells verdeutlicht den Einfluss des LRRK2-Verlustes auf p53-assoziierte Signalkaskaden, in welche auch das gemeinsam regulierte Protein BRAP1 Einfluss hat. Dabei zeigte in beiden Modellen die detaillierte Betrachtung der Expressionsrichtung der differentiell regulierten Transkripte, um das Tumormprotein p53, einen möglichen onkogenen Einfluss des LRRK2-Verlustes.

Die gesamtgenomischen Expressionsanalysen beider Modelle sind limitierend in ihrer Aussage ob LRRK2 über den intrinsischen oder extrinsischen Apoptose-Signalweg die Apoptose induzieren kann. Dennoch konnte herausgestellt werden, dass Transkripte, welche die zelluläre Kalzium-Homöostase, welche entscheidende Bedeutung auf die neuronale Funktionstüchtigkeit besitzt, durch den LRRK2-Verlust in beiden Modellen dereguliert vorliegen.

4.2 Vergleich des LRRK2- und SNCA-Knockdowns in humaner Zellkultur

4.2.1 Einfluss von LRRK2 und SNCA auf Apoptoseprozesse

Die Neuropathologie LRRK2-assoziiierter Parkinson-Fälle ähnelt dem sporadischen PS mit dem Hauptmerkmal Alpha-Synuklein (SNCA) positiver Lewy-Körperchen, wobei auch Fälle mit variabler Pathologie beschrieben sind (Biskup und West, 2008).

In diesem Teil der Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob der SNCA-Knockdown in humaner dopaminergem Zellkultur (Habig et al., 2009) Signalkaskaden beeinflusst, welche auch durch den LRRK2-Verlust dereguliert werden (Habig et al., 2008). Die Besonderheit dieses Vergleiches spiegelt sich in vier Dingen wieder: (a) Nutzung der gleichen Zelllinie, (b) gleicher experimenteller Aufbau, (c) gleiche Mikroarray-Plattform und (d) gleicher Typ von Mikroarrays.

Die relativ große Anzahl differentiell regulierter Transkripte beider Experimente in Zelltod-Prozessen (LRRK2 KD: 32 von 187; SNCA KD: 26 von 357) führte zu der Frage, ob beide Proteine gleichartigen Einfluss auf Apoptoseprozesse besitzen.

Wie in Abschnitt 4.1 dieser Arbeit diskutiert wurde, induziert der LRRK2-Verlust keine Veränderung der Anzahl apoptotischer Zellen. Dies ist ebenso bei dem SNCA-Knockdown beobachtbar (Habig et al., 2009). Unter oxidativem Stress wirkt sich der LRRK2-Verlust allerdings schützend auf dopaminerge Zellen aus. Die gleichen Bedingungen führen nach der SNCA-Reduktion zum entgegengesetzten proapoptotischen Effekt (Habig et al., 2009).

Dies ist der erste Hinweis, dass der Verlust beider Parkinson-assoziierten Proteine scheinbar entgegengesetzte Regulationsmechanismen aktivieren kann.

Den zweiten Hinweis erhält man bei der Betrachtung der überlappenden differentiell regulierten Transkripte. Neben den zwei gleichartig regulierten Transkripten *MTMR12* und *ADAMTS17* fällt die entgegengesetzte Regulationsrichtung von *CACNA1G* und *FGF2* auf.

Dabei ist *CACNA1G* eine Untereinheit eines Kalzium Kanals und spielt eine entscheidende Rolle beim Ca^{2+} -Ionen Transport, der für die zelluläre Kalzium-Homöostase und die Signalweiterleitung in Neuronen ausschlaggebend ist (Perez-Reyes, 2006).

FGF2 ist ein Wachstumsfaktor, welcher über seine Regulationsfähigkeit der MAP-Kinasen, Ras-Signaltransduktionskaskaden und Caspasen nicht nur die Proliferation und neuronale Differenzierung, sondern auch apoptotische Prozesse steuern kann (Alzheimer und Werner, 2002). Dieser Wachstumsfaktor ist auch ein vielversprechender Kandidat für alternative Therapie-Strategien des PS (Grothe und Timmer, 2007). Er und seine hochaffinen Rezeptoren werden in der Substantia nigra und im Striatum exprimiert. Im LRRK2 KD wurde eine erhöhte Expression von *FGF2* detektiert. Es ist beschrieben, dass während der Entwicklung ein erhöhtes *FGF2*-Niveau zu reduzierter Dichte dopaminergem Neuronen führt und nach Neurotoxin-Induktion mehr Neuronen vor Zelltod geschützt sind (Grothe und Timmer, 2007). Im Gegensatz dazu liegt im SNCA KD *FGF2* reduziert vor.

Eine reduzierte FGF2 Menge resultiert während der Entwicklung in einer erhöhten Anzahl dopaminerger Neurone, welche aber nach Neurotoxin-Induktion einen verstärkten Zelltod zeigen. Es wird postuliert, dass während der Entwicklung FGF2 durch andere Liganden der FGF-Familie kompensiert werden kann, dies im erwachsenen Organismus aber nicht mehr der Fall ist (Grothe und Timmer, 2007). Sowohl LRRK2 als auch SNCA lösen nach heutigem Kenntnisstand das PS möglicherweise über einen Funktionszugewinn aus (Eriksen et al., 2003; West et al., 2007). Warum der LRRK2- und SNCA-Verlust in dopaminergen Zellen zur entgegengesetzten *FGF2*-Regulation führt, ist noch unklar. Dieser Unterschied macht deutlich wie wichtig die detaillierte Kenntnis über Signalkaskaden, in welche die PS-assoziierten Transkripte Einfluss nehmen ist, bevor mit einer Therapie begonnen werden kann.

Die entgegengesetzten Regulationsmechanismen zwischen dem LRRK2 KD und dem SNCA KD, die in Apoptose-Signalwegen deutlich werden, sind auch im Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu erkennen. Die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade hat neben der Förderung der Proliferation auch einen antiapoptotischen Effekt auf Zellen (Doubravska et al., 2008). Besonders Casein-Kinasen, welche im LRRK2 KD und im SNCA KD entgegengesetzt zueinander reguliert sind, werden mit antiapoptotischen Prozessen assoziiert (Knippschild et al., 2005). Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss des LRRK2- und SNCA-Verlustes auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vergleichend diskutiert.

4.2.2 Einfluss von LRRK2 und SNCA auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist eine wichtige zelluläre Signalkaskade, die über die Wnt-Proteine, welches extrazelluläre Wachstumsfaktoren sind, verschiedene Zellfunktionen wie Zelldifferenzierung, Zellpolarität und Zellproliferation steuert (Schlessinger et al., 2009).

Die Grundsätze dieses Signalweges (siehe Abbildung 4.6) liegen in der Bindung des Wnt-Liganden an seinen Rezeptor Frizzled. Dadurch wird das Protein Dishevelled aktiviert. Dieses kann inhibierend auf einen Proteinkomplex, bestehend aus GSK-3 β , APC und Axin, einwirken. Dieser Proteinkomplex und Casein-Kinasen sind dafür zuständig β -Catenin über Phosphorylierung dem Abbau zuzuführen. Ist dieser Proteinkomplex bei auftretendem Wnt-Signal gehemmt, sammelt sich β -Catenin in der Zelle an. Dieses kann nachfolgend in den Zellkern transloziert werden und die Zielgen-Transkription steuern (Schlessinger et al., 2009). Casein-Kinasen spielen demnach eine entscheidende Rolle bei dem β -Catenin-Abbau (Gao et al., 2002).

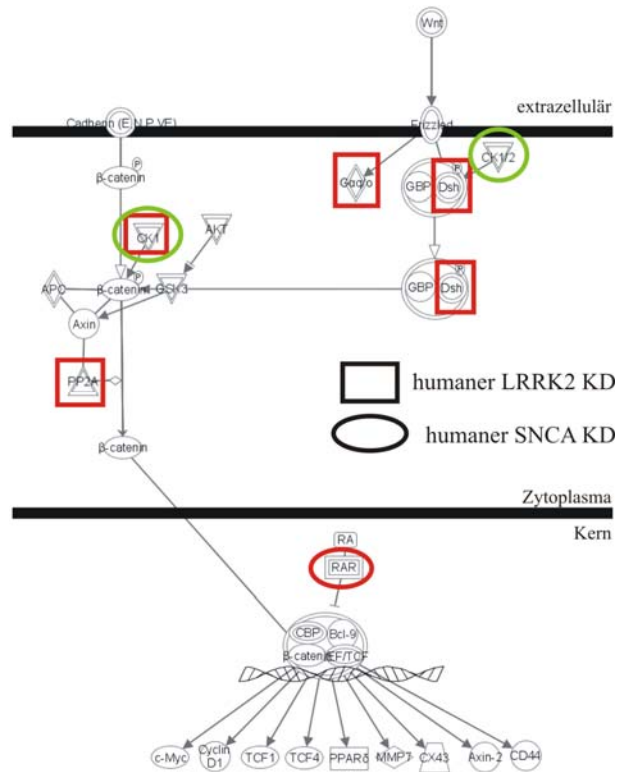


Abbildung 4.6: Einfluss des LRRK2- und SNCA-Knockdowns auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg

Das dargestellte kanonische Netzwerk des Wnt/β-Catenin-Signalweges wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt und zur Reduktion der Komplexität auf die im Text diskutierten Moleküle eingeschränkt. Die im humanen LRRK2 KD regulierten Transkripte sind mit einem Quadrat und die im SNCA KD regulierten Transkripte mit einer Ellipse umrahmt. Die Farbe des Rahmens stellt die Hochregulation (rot) oder Repression (grün) dieses Transkriptes dar. Literaturangaben siehe Text.

Im SNCA KD ist die *Casein Kinase 1A1* reprimiert (*CSNK1A1*), welches möglicherweise zum reduzierten β-Catenin-Abbau führen könnte. Im LRRK2 KD ist entgegengesetzt dazu die *CSNK1G1* hochreguliert, wodurch es zum vermehrten β-Catenin-Abbau kommen könnte. Damit sieht man in beiden Zellkultursystemen unterschiedliche Reaktionen auf den Verlust des PS-assoziierten Proteins. Zusätzlich zur Regulation der Casein-Kinase resultiert der LRRK2 KD in der Hochregulation von *PPP2R2A* und *DVL2*. Im SNCA KD erfolgt eine *RARA*-Hochregulation, möglicherweise um im Zellkern die Bildung des β-Catenin Transkriptionskomplexes zu inhibieren (Easwaran et al., 1999).

Damit wird auch anhand des Wnt/β-Catenin-Signalweges deutlich, dass der Verlust der beiden Parkinson-assoziierten Proteine LRRK2 und SNCA unterschiedliche Regulationsmechanismen nach sich zieht.

4.2.3 Einfluss von LRRK2 und SNCA auf Zytoskelettprozesse

Die Analyse der kanonischen Signalwege, welche in beiden Knockdown-Experimenten differentiell regulierte Transkripte enthalten, brachte Übereinstimmung in acht Signalkaskaden. Dabei sind die signifikantesten Signalkaskaden (i) der Aktin-Zytoskelett-Signalweg und (ii) Signalkaskaden der axonalen Führung. Die strikte Trennung dieser beiden Signalkaskaden ist aber schlecht möglich, da die präzise Aktinpolymerisierung und -Depolymerisierung und die Adhäsion, Zelladhäsions-Lockerung sowie ihre neue Readhäsion für die axonale Führung und Zellbewegung unerlässlich sind.

Die Regulation der axonalen Führung wird über extrazelluläre Signale (Netrin, Slit, Semaphorin, Ephrin), welche auf Rezeptoren der Zelloberfläche binden (Netrin Rezeptoren, Robo-Proteine, Plexine, Ephrin Rezeptoren) gewährleistet (Huber et al., 2003). Im Vergleich der beiden Zellkulturmodelle führt der SNCA KD zur *ROBO1*-Hochregulation, welcher der Rezeptor für Slit Moleküle ist (Kidd et al., 1998). Der LRRK2 KD hingegen resultiert in der *SEMA4F*-Hochregulation. Semaphorine binden an Plexine, welche an der zytosolischen Seite an ARHGEF12 binden können (Aurandt et al., 2006; Aurandt et al., 2002). Dieser Guanidin-Austauschfaktor ist ebenfalls in diesem Modell hochreguliert. Signale, welche über diese Oberflächenrezeptoren weitergeleitet werden, wirken meist auf die kleinen GTPasen RhoA, CDC42 und Rac (Ridley, 2006).

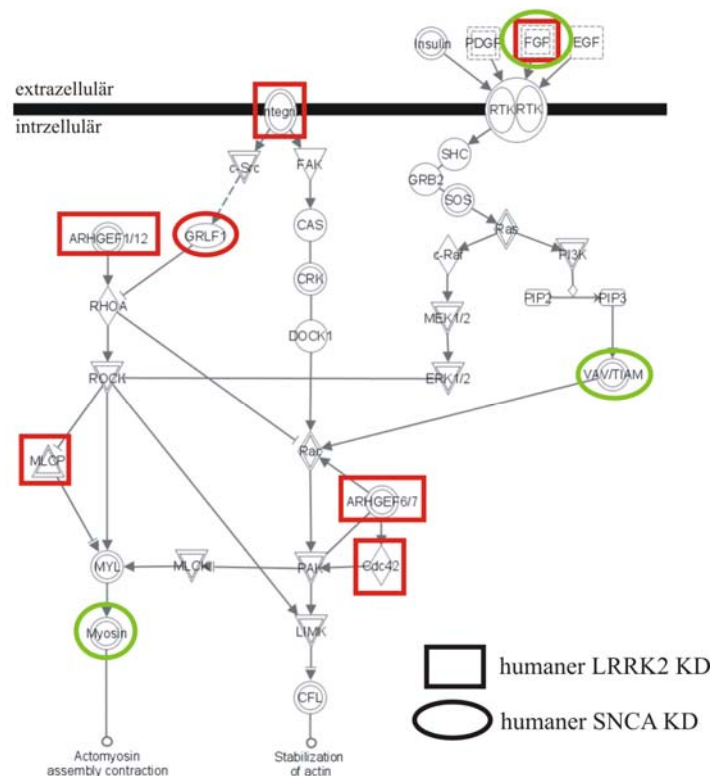


Abbildung 4.7: Einfluss des LRRK2- und SNCA-Knockdowns auf Aktin-Zytoskelett-Signalwege

Das dargestellte kanonische Netzwerk der Aktin-Zytoskelett-Signalwege wurde mit der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt und zur Reduktion der Komplexität auf die im Text diskutierten Moleküle eingeschränkt. Die im humanen LRRK2 KD regulierten Transkripte sind mit einem Quadrat und die im SNCA KD regulierten Transkripte mit einer Ellipse umrahmt. Die Farbe des Rahmens stellt die Hochregulation (rot) oder Repression (grün) dieses Transkripts dar. Literaturangaben siehe Text.

Kleine GTPasen können auch wie in Abbildung 4.7 verdeutlicht durch andere Klassen von Transmembranrezeptoren wie Integrin-Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Alberts et al., 2004).

Der Wachstumsfaktor *FGF2*, welcher ein Ligand der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist, liegt im LRRK2 KD hochreguliert und im SNCA KD entgegengesetzt dazu reprimiert vor. Wird dieser Rezeptor-Typ aktiviert, so kann über die mehrstufige Ras-Aktivierung die PI₃-Kinase aktiviert werden (Juliano, 2002). Das dadurch gebildete PIP₃ kann VAV2 aktivieren (Turner und Billadeau, 2002). VAV2 liegt im SNCA KD reduziert vor, welches eventuell für eine reduzierte Rac-Aktivierung sorgt. Im LRRK2 KD könnte im Gegensatz dazu die erhöhte *ITGB5*-, *ARHGEF7*- und *CDC42*-Expression Rac und PAK möglicherweise vermehrt aktivieren.

Eine weitere potentiell entgegengesetzte Wirkung lässt sich in den Regulationskaskaden um RhoA detektieren. Im LRRK2 KD führt die *ARHGEF12*-Hochregulation möglicherweise zu einer erhöhten RhoA-Aktivität (Booden et al., 2002). Im SNCA KD wird *GRLF1* hochreguliert, welcher zur RhoA-Inhibierung führen könnte (Kusama et al., 2006). RhoA hat die Fähigkeit die Rac-Aktivität zu inhibieren, so dass die detektierten Regulationsrichtungen der Rac-Regulation beider Zellkulturmodelle entgegengesetzt zueinander stehen könnten (Li et al., 2002).

Bisher ist der SNCA-Einfluss auf das Zytoskelett wenig untersucht. Eine Studie von 2004 zeigte, dass das retrograde Transportsystem über Mikrotubuli entscheidende Bedeutung bei der SNCA Aggregatbildung hat und dies möglicherweise schützend für die Zelle ist (Hasegawa et al., 2004). Dennoch wurde ein direkter Einfluss der SNCA Funktion auf das Zytoskelett noch nicht beschrieben.

Der LRRK2-Einfluss auf das Zytoskelett und dem damit verbundenen Neuritenwachstum wird sowohl über seine Interaktion mit Mikrotubuli als auch durch funktionelle Analysen gestützt und diskutiert (Gandhi et al., 2008; MacLeod et al., 2006). Da der LRRK2-Zytoskelett-Einfluss ein wesentlicher Aspekt der LRRK2-Funktion zu sein scheint, wird er ausführlich anhand der Daten dieser Arbeit in Abschnitt 4.3 diskutiert.

4.2.4 Zusammenfassung: Gemeinsamkeiten von LRRK2- und SNCA-Regulationskaskaden

Der Vergleich zwischen dem LRRK2- und SNCA-Knockdown-Experiment, welches in dem gleichen Zellkultursystem unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, machte deutlich, dass es nur vier differentiell regulierte Transkripte gibt, die in beiden Experimenten reguliert vorliegen. Darunter befindet sich der gegenläufig regulierte Wachstumsfaktor *FGF2*, welcher nicht nur in Apoptoseprozessen, sondern auch bei zytoskelettaler Organisation eine wichtige Rolle spielt.

Betrachtet man die Signalkaskaden, welche durch den Verlust der zwei PS-assozierten Gene differentiell reguliert werden, so konnte gezeigt werden, dass ähnliche Signalkaskaden betroffen sind. Allerdings ist bemerkenswert, dass die Auswirkungen der Regulationsrichtung der differentiell regulierten Transkripte in den betrachteten Signalkaskaden (Apoptose, Wnt/ β -Catenin-Signalweg und Zytoskelett) in entgegengesetzten Wirkungen resultieren.

Damit stellte der Vergleich beider KD-Experimente heraus, dass ein gemeinsamer Wirkungsmechanismus auf Transkriptionsebene nicht erkennbar ist, wenn die Zelle auf den LRRK2- oder SNCA-Verlust reagieren muss. Ob gemeinsame Regulationskaskaden auf Proteinebene bestehen, kann durch gesamtgenomische RNA-Expressionsprofile nicht erfasst werden und muss durch weitere Experimente geklärt werden.

4.3 Einfluss des LRRK2-Knockdowns auf zytoskelettale Signalkaskaden

4.3.1 Gesamtgenomische Expressionsanalyse des humanen LRRK2-Knockdowns unter Betrachtung zytoskelettaler Signalkaskaden

Die LRRK2-Funktion in zytoskelettalen Signalkaskaden zeichnet sich aufgrund bestehender Veröffentlichungen immer deutlicher ab. So konnten Studien in dopaminergem Zellkultur und in primären Neuronen zeigen, dass das Neuritenwachstum bei erhöhter Kinase-Funktion reduziert und bei reduzierter Kinase-Funktion verstärkt vorliegt (MacLeod et al., 2006; Plowey et al., 2008). Zusätzlich wurde eine Interaktion zwischen LRRK2 und Mikrotubuli identifiziert, welches ebenso seine funktionelle Relevanz bei der zytoskelettären Organisation vermuten lässt (Gandhi et al., 2008). Weitere Studien im *C.elegans*-Modell zeigen, dass die Expression des WT LRRK-1 sowie des G2019S analogen LRRK-1 zu abweichender Axon-Wegfindung führt (Samann et al., 2009). In diesem Teil der Arbeit soll die detaillierte Betrachtung der genomischen Expressionsanalyse LRRK2-defizienter humaner dopaminergem Zellen herausstellen, welchen Einfluss der LRRK2-Verlust auf das Zytoskelett der Zelle besitzt.

In der Zelle gibt es drei Zytoskelett-Komponenten: (i) Mikrotubuli, (ii) Intermediärfilamente und (iii) Aktinfilamente. Der LRRK2-Knockdown betrifft Transkripte, welche mit allen drei Komponenten in Verbindung stehen.

Eine funktionelle Relevanz der LRRK2-Reduktion auf Mikrotubuli-basierte Prozesse ist durch die identifizierte Bindung zwischen LRRK2 und Mikrotubuli zu vermuten (Gandhi et al., 2008). Die durch den LRRK2-Knockdown differentiell regulierten Transkripte, welche die Mikrotubuli-Funktion beeinflussen können, sind *MAP4*, *KIF21B* und *ATGA4*. Dabei ist das hochregulierte *MAP4* ein positiver Regulator der Mikrotubuli-Stabilität und das hochregulierte *KIF21B* ein Mikrotubuli-Motorprotein (Marszalek et al., 1999; Zhang et al., 1998). An diese Zytoskelett-Komponente kann ebenso, dass in seiner Expression reduzierte, *ATGA4* binden (Tanida et al., 2004).

Der LRRK2-Einfluss auf Intermediärfilamente wurde bisher in nur einer Veröffentlichung vermutet. In dieser wurde eine *in vitro*-Interaktion zwischen LRRK2 und Vimentin beschrieben (Dachsel et al., 2007). Vimentin ist eine wichtige Komponente der Intermediärfilamente (Styers et al., 2006). Es liegt im humanen LRRK2 KD-Experiment nicht reguliert vor. Aber es wurde eine *FGF2*-Hochregulation detektiert, wobei dieser Wachstumsfaktor die Vimentin-Expression beeinflussen kann (Dell'Era et al., 2002). Demnach scheint LRRK2 keinen deutlichen Einfluss auf Intermediärfilamente auszuüben.

Betrachtet man nach LRRK2-Reduktion die differentiell regulierten Transkripte, welche das Aktin-Zytoskelett betreffen, so fällt besonders die Hochregulation der kleinen GTPase *CDC42* auf. Diese kleine GTPase reguliert die Zellmorphologie, die Zellbeweglichkeit und den Zellzyklus (Erickson et al., 1996; Yang et al., 2006). *CDC42* ist ein Schlüsselprotein der durch den LRRK2 KD differentiell regulierten kanonischen Signalwege.

Zusätzlich konnte ein Netzwerk differentiell regulierter Transkripte generiert werden, in welchem CDC42 eine zentrale Stellung einnimmt. Die CDC42-Funktion bei dem Neuritenwachstum wird in Abbildung 4.8 verdeutlicht. Dabei kann CDC42 zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und aktiven GTP-gebundenen Konformation wechseln. Der dafür nötige Nukleotid-Austausch wird neben anderen Guanidin-Austauschfaktoren durch ARHGEF9 und ARHGEF7 katalysiert und beide werden durch den LRRK2 KD hochreguliert (Feng et al., 2006; Manser et al., 1998; Reid et al., 1999). ARHGEF7 hat eine besondere Stellung, da er durch das ebenfalls im LRRK2-Knockdown hochregulierte *FGF2* phosphoryliert und dadurch aktiviert und zu den Wachstumskegeln rekrutiert wird (Shin et al., 2002; Shin et al., 2004).

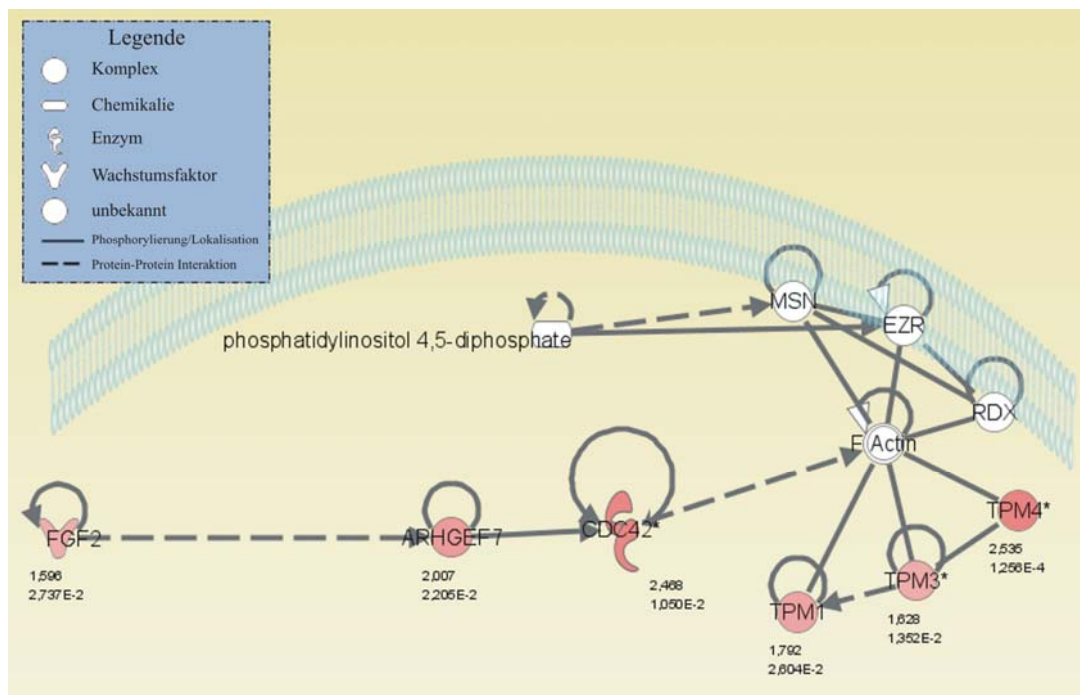


Abbildung 4.8: Signalkaskade der Aktinpolymerisierung durch CDC42

Diese Signalkaskade zeigt vereinfacht die FGF2-vermittelte ARHGEF7-Aktivierung und dessen Rekrutierung zur Plasmamembran. Dort aktiviert er als Guanidin-Austauschfaktor die kleine GTPase CDC42, wodurch die Aktinpolymerisierung induziert wird. Tropomyosine (TPM) stabilisieren Aktinfilamente. Die PIP₂ aktivierten ERM-Proteine Ezrin, Radixin und Moesin verankern die Aktinfilamente an der Plasmamembran (Quellenangaben siehe Text). Unter LRRK2-Reduktion reagieren die rot eingefärbten Transkripte mit einer Hochregulation. Die Abbildung wurde mit dem Pathdesigner Werkzeug der Ingenuity Pathways Analysis Software erstellt.

An dem Wachstumskegel erfolgt danach die CDC42-Aktivierung, welches eine erhöhte Aktinpolymerisierung und eine Bündelung der Filamente mit nachfolgender Filopodien-Bildung induziert (Koh, 2006). Eine vermehrte Bildung polymeren Aktins kann in der Zelle mit Hilfe der Tropomyosine vor Cofilin-Abbau geschützt und damit stabilisiert werden (Ishikawa und Kohama, 2007). Im LRRK2 KD liegen drei verschiedene Tropomyosine hochreguliert vor: *TPM1*, *TPM3* und *TPM4*.

Aufgrund der Regulationsrichtungen der beschriebenen differentiell regulierten Transkripte ist folgendes Szenario in LRRK2-defizienten Zellen vorstellbar:

Eine LRRK2-Reduktion führt möglicherweise durch die *FGF2*-Hochregulation zur vermehrten Translokation von ARHGEF7 und CDC42 an die Wachstumskegel der Neurite. Die erhöhte Expression beider Proteine könnte eine verstärkte CDC42-Aktivierung durch ARHGEF7 nach sich ziehen. Dies verursacht möglicherweise, durch die CDC42-induzierte erhöhte Aktinpolymerisierung, ein verstärktes Auswachsen der Neurite.

Die Studien von MacLeod zeigen, dass ein shVektor-basierter LRRK2-Knockdown in SH-SY5Y-Zellen zu einer erhöhten Neuritenlänge und häufigeren Neuritenverzweigungen führt (MacLeod et al., 2006). Ob aber die Translokation des ARHGEF7 und des CDC42 wie die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen eine Rolle dabei spielt, muss in weiteren funktionellen Studien analysiert werden. Ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen LRRK2 und dem Aktin-Zytoskelett der Zelle ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Über die Fähigkeit des LRRK2-Proteins *in vitro* Ezrin, Radixin und Moesin zu phosphorylieren, welche für die Fixierung des Aktin-Zytoskeletts an der Zellmembran zuständig sind, ist aber sein Einfluss auf diese Zytoskelett-Komponente zu vermuten (Jaleel et al., 2007; Tsukita, 1996).

Damit scheint der LRRK2-Verlust im humanen Zellkulturmodell vor allem Transkripte zu regulieren, welche die Funktion der Mikrotubuli und der Aktinfilamente beeinflussen. Dabei scheint die Wirkung auf Aktinfilamente beeinflussende Transkripte umfangreicher ausgeprägt zu sein.

4.3.1.1 Funktionelle Analyse des LRRK2-Knockdowns unter zytoskelettalem Stress

Aufgrund des deutlichen Einflusses des LRRK2-Verlustes auf zytoskelettäre Signalkaskaden, wurde eine funktionelle Analyse dopaminerger Zellen durchgeführt. Es wurde zunächst analysiert, ob nach Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts und des Mikrotubuli-Netzwerkes die Zelle mit einer Veränderung der LRRK2-Expression reagiert.

Dabei kam das Aktin-depolymerisierende Toxin Cytochalasin D und das Mikrotubuli-depolymerisierende Toxin Nocodazole zum Einsatz (Barth et al., 2004; Cooper, 1987). Deutlich konnte gezeigt werden, dass bei beiden Zytoskelett destabilisierenden Toxinen das LRRK2-RNA-Expressionsniveau steigt. Dennoch ist davon auszugehen, dass dies nicht die einzige Reaktion der Zelle ist und auch andere Transkripte mit einer Expressionsveränderung reagieren. Das LRRK2-Expressionsniveau wird allerdings nicht bei allen Stresssituationen der Zelle (wie für Tunicamycin, Thapsigargin, H₂O₂ und 6-OH-DA gezeigt wurde) hochreguliert, so dass eine gewisse Spezifität der zellulären Reaktion zu vermuten ist.

Demnach beeinflusst die LRRK2-Repression die Transkription der Gene zytoskelettärer Signalkaskaden. Zusätzlich hat die Zerstörung des Zytoskeletts eine LRRK2-Hochregulation auf RNA-Ebene zur Folge.

Die Analyse ist dennoch limitierend in ihrer Aussage, ob das erhöhte LRRK2-Expressionsniveau der Depolymerisierung der Zytoskelettstruktur entgegenwirkt oder aber diese zusätzlich fördert. In weiteren Experimenten sollte mit Hilfe LRRK2-spezifischer Antikörper analysiert werden, ob die LRRK2-RNA-Expressionserhöhung auch eine vermehrte LRRK2-Protein-Expressionserhöhung nach sich zieht.

Betrachtet man nachfolgend die Transkript-Expression zytoskelettaler Signalkaskaden in dopaminergen Zellen unter Cytochalasin D-Behandlung, so erkennt man, dass durch die Depolymerisierung der Aktinfilamente das Expressionsniveau von *ACTB*, *ARHGEF7* und *CASP3* steigt. Die *ACTB*-Expressionserhöhung dient möglicherweise der Bereitstellung monomeren Aktins, um den Verlust der Aktinpolymerisierung auszugleichen. Um eine stärkere Aktinpolymerisierung (als Ausgleichsmechanismus zur Depolymerisierung) zu induzieren ist aktives CDC42 ausschlaggebend (Koh, 2006). Die CDC42-Aktivierung kann durch *ARHGEF7* erfolgen (Manser et al., 1998). Dies ist möglicherweise der Grund, warum unter Cytochalasin D-Stress dieser Guanidin-Austauschfaktor hochreguliert ist. Cytochalasin D führt auch zur Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien, welches die Aktivierung der *CASP3* nach sich zieht (Paul et al., 2002). Möglicherweise induziert dies auch eine Hochregulation dieser Caspase wie es in diesem Modell identifiziert wurde.

Anschließend stellte sich die Frage, ob unter dem gleichen Stress in LRRK2-defizienten Zellen diese Veränderungen ebenso zu detektieren sind. Deutlich konnte gezeigt werden, dass *ACTB* und *CASP3* genauso reagieren. Die *ARHGEF7*-Expression wird auch erhöht, aber sie erreicht nicht das Ausmaß der control siRNA-behandelten Zellen unter Cytochalasin D-Stress. Allein der LRRK2-Verlust führt in den SH-SY5Y-Zellen schon zu einer erhöhten *ARHGEF7*-Transkription. Möglicherweise ist bei Cytochalasin D-Stress keine so starke Aktivierung des *ARHGEF7* mehr nötig, um die Aktin-Depolymerisierung auszugleichen. Dies ist ein Hinweis auf den direkten Zusammenhang zwischen der LRRK2 und der *ARHGEF7*-Funktion in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts der Zelle.

Der LRRK2-KD resultiert in einer Hochregulation des *CDC42* und des *ARHGEF7* sowie der Deregulation zytoskelettaler Signalkaskaden. Ob die Veränderungen dieser Signalkaskaden direkt durch den LRRK2-Verlust geschehen oder sekundär durch die *ARHGEF7*-Regulation ausgelöst werden, soll durch den gemeinsamen KD des LRRK2 und des *ARHGEF7* analysiert werden.

4.3.1.2 Gesamtgenomische Analyse des ARHGEF7 - LRRK2 Doppel-Knockdowns

Der LRRK2-KD führt unter anderem zur Hochregulation des *CDC42* und des *ARHGEF7*. Das gemeinsame Reprimieren von LRRK2 und ARHGEF7 hatte das Ziel, primäre durch den LRRK2-Verlust-induzierte Veränderungen in Signalkaskaden, von sekundären abzugrenzen. Die gemeinsame siRNA-vermittelte Repression beider Transkripte konnte mit geringem Effizienzverlust im Vergleich zum Einzelknockdown erreicht werden.

Der Vergleich des gesamtgenomischen Expressionsprofils humaner dopaminerge Zellen mit (i) reduzierter ARHGEF7-Expression und (ii) gleichzeitiger LRRK2 und ARHGEF7 Reduktion mit dem Ausgangsexperiment der alleinigen LRRK2-Reduktion machte folgende Aspekte deutlich:

(A) Der ARHGEF7-Einzelknockdown überschneidet sich mit der LRRK2-Einzelrepression in sieben Transkripten. Von diesen überlagern sich sechs Transkripte auch im Dreifachvergleich und werden in (D) diskutiert. Damit ist die *ARHGEF9*-Hochregulation sowohl im LRRK2 KD als auch im ARHGEF7 KD die einzige Überlagerung dieser beiden Experimente. Allgemein kann festgestellt werden, dass der alleinige ARHGEF7-KD kaum Transkripte mit zytoskelettaler Relevanz differentiell reguliert. Verstärkt differentiell reguliert werden aber Transkripte mit Funktionen für die Organisation der Zellen und mit Funktionen für Zellwachstum und Proliferation. Eine detaillierte Betrachtung der differentiell regulierten Transkripte dieser gesamtgenomischen Expressionsanalyse ist in der Arbeit der Diplomandin Sandra Gellhaar durchgeführt worden.

(B) Betrachtet man die 13 Transkripte, welche nur in dem Vergleich zwischen ARHGEF7 KD und ARHGEF7-LRRK2 Doppel-Knockdown differentiell reguliert auftreten, so erkennt man unter ihnen fünf Gene, welche Transkriptionsprozesse beeinflussen (*ZNF267*, *ZNF138*, *PEX14*, *EPAS1*, *DYRK1B*). Auch sind zwei Transkripte, die mit Splicing-Mechanismen assoziiert sind, differentiell reguliert (*HNRPM*, *SFPQ*). Die in diesem Vergleich differentiell regulierten Transkripte werden wahrscheinlich primär durch den ARHGEF7 KD vermittelt und nicht durch den LRRK2 KD in ihrer Expression verändert.

(C) Der LRRK2-ARHGEF7 Doppel-Knockdown zeigt eine Überlagerung 23 differentiell regulierter Transkripte mit dem LRRK2 Einzel-KD. Unter ihnen befinden sich die mit dem Zytoskelett-assoziierten Transkripte *CDC42*, *MAP4*, *TPM1*, *TPM3*, *TPM4* und *SEMA4*. Sie scheinen primär durch den LRRK2-Verlust ihre Expression zu verändern. Würde ARHGEF7 direkt Einfluss auf deren Expression nehmen, würde man vermuten, dass sie in beiden Vergleichen entgegengesetzt zueinander reguliert werden würden, da ARHGEF7 auch entgegengesetzt reguliert ist. Da dies nicht der Fall ist, erhöht dies die Möglichkeit, dass der LRRK2-Verlust, ARHGEF7-unabhängig, die kleine GTPase *CDC42* sowie die *Tropomyosine* und das Mikrotubuli-assoziierte Protein *MAP4* in ihrer Expression beeinflusst.

(D) Der Dreifachvergleich zeigt sechs Transkripte, welche durch den alleinigen LRRK2-Verlust, ARHGEF7 oder durch die Repression beider Proteine differentiell reguliert werden. Darunter sind neben *ARHGEF7* die Transkripte: *TncRNA*, *GALNTL1*, *HABP4*, *MESDC2* und *TPM4*.

Besondere Aufmerksamkeit erlangt die Hochregulation des *Tropomyosin 4*. Bisher sind für das kontraktile System fünf Tropomyosine bekannt. Das Zytoskelett hingegen benötigt für seine Organisation und Koordination über 40 Tropomyosin Isoformen (Gunning et al., 2008). Aktinfilamente können durch Tropomyosine stabilisiert werden (Ishikawa und Kohama, 2007). Tropomyosine haben über die Interaktion mit Aktin-bindenden Proteinen einen wichtigen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett. So verhindert die Bindung des Tropomodulins an Tropomyosin die Depolymerisierung am Minus-Ende der Aktinfilamente (Gunning et al., 2008). Tropomyosine regulieren zusätzlich die Interaktion zwischen Aktin und seinem Motorprotein Myosin. In kultivierten Neuronen konzentriert sich das hier regulierte *TPM4* am Wachstumskegel und ist angereichert in Bereichen, welche wachsende Neurite enthalten (Had et al., 1994).

Der Vergleich des separaten ARHGEF7-KD mit dem gemeinsamen KD von ARHGEF7 und LRRK2 verdeutlichte, dass der Einfluss des LRRK2-KD auf das Zytoskelett nicht nur ein sekundärer Effekt durch die ARHGEF7-Regulation sein kann. Dennoch scheinen auch gemeinsame Regulationskaskaden dieser beiden Proteine eine wichtige Rolle bei Regulationsprozessen des Zytoskeletts zu spielen.

4.3.2 Vergleich des humanen und murinen LRRK2-Knockdowns in zytoskelettalen Prozessen

Im humanen dopaminergen Zellkulturmodell wurde der Einfluss des LRRK2-Verlustes auf zytoskelettale Prozesse deutlich. Die komplexen zytoskelettalen Signalkaskaden im neuronalen Netzwerk des Gehirns kann das Expressionsprofil dieser Zellkultur allerdings kaum widerspiegeln. Aus diesem Grund wird in diesem Teil der Arbeit besonderes Augenmerk auf das Expressionsprofil des Gehirns sieben Tage alter LRRK2 KD-Mäuse gelegt. Dabei werden Veränderungen zytoskelettaler Signalkaskaden betrachtet und der murine LRRK2 KD-Effekt im Vergleich zum humanen Zellkulturmodell diskutiert.

4.3.2.1 LRRK2-Knockdown und die Beeinflussung synaptischer Prozesse

Die Organisation des Zytoskeletts ist entscheidend an synaptischen Prozessen beteiligt (Alberts et al., 2004). Aus diesem Grund soll in diesem Abschnitt die Reaktion der Zelle auf den LRRK2-Verlust bei synaptischen Prozessen diskutiert werden. Die Neuronen-Funktion beruht auf der Freisetzung Neurotransmitter-tragender Vesikel über Exozytose. In Lokalisationsstudien wurde LRRK2 an Transportvesikeln und Endosomen detektiert (Biskup et al., 2006). Interaktionsanalysen zeigten eine Bindung zwischen LRRK2 und der kleinen GTPase Rab5b, welche als Regulator des endozytotischen vesikulären Transports von der Plasmamembran zu frühen Endosomen beteiligt ist (Shin et al., 2008).

Zusätzlich konnte herausgestellt werden, dass LRRK2 über seine Bindung an Rab5b nur die endozytotischen Prozesse beeinflusst und keine Wirkung auf die Funktionsfähigkeit der Exozytose besitzt. Dabei wird bei Überexpression sowie bei LRRK2-Repression die synaptische Vesikelendozytose verlangsamt (Shin et al., 2008). Studien am orthologen *C. elegans* LRK-1 zeigen, dass LRK-1 für die korrekte und polarisierte Sortierung der synaptischen Vesikel nötig ist. Dabei kann LRK-1 synaptische Vesikel von dem Dendritenspezifischen Transport ausschließen (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007).

Die Neurotransmitterfreisetzung an der Synapse ist in einem Neuron streng reguliert (Alberts et al., 2004). Damit die Vesikelfreisetzung schnell und auf ein bestimmtes Signal geschehen kann, sind sechs grundsätzliche Schritte nötig, welche in Abbildung 4.9 verdeutlicht werden.

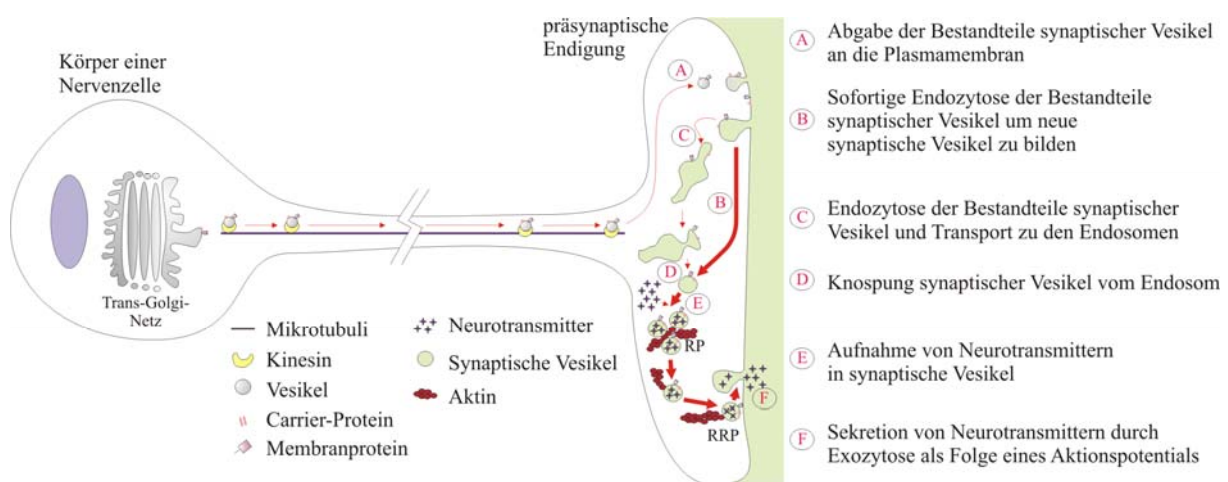


Abbildung 4.9: Die Bildung synaptischer Vesikel

Nervenzellen müssen schnell auf Aktionspotentiale antworten. Aus diesem Grund können Neurotransmittertragende synaptische Vesikel direkt in präsynaptischen Endigungen gebildet, in „reserve pools“ (RP) gespeichert und aus dem „readily releasable pool“ zur Neurotransmitterfreisetzung genutzt werden. (modifiziert nach Alberts et al., 2004)

Der LRRK2-Knockdown im humanen sowie im murinen Modell führt zur differentiellen Regulation der Transkripte, welche drei dieser Schritte beeinflussen können. Aus diesem Grund werden sie nacheinander betrachtet.

(1) Transport von Vesikelvorläufern zur Plasmamembran

Der gerichtete Vesikelvorläufer-Transport geschieht über Mikrotubuli-Motorproteine, den Kinesinen. Damit Nervenzellen schnell und fortwährend auf ein Signal antworten können, wäre der stete Transport vom Zellkörper bis zu den Nervenendigungen zu zeitintensiv. Aus diesem Grund verschmelzen die ankommenden Vesikel an den Endigung des Neurons mit der Plasmamembran und geben Bestandteile synaptischer Vesikel an die Plasmamembran ab. Von dieser können dann nachfolgend über sofortige Endozytose wieder neue synaptische Vesikel gebildet und zu frühen Endosomen transportiert werden (Alberts et al., 2004).

Die direkte LRRK2-Mikrotubuli-Bindung wurde von Gandhi et al. verdeutlicht (Gandhi et al., 2008). Der LRRK2-Knockdown führt im murinen Modell zur Reduktion der Expression der Mikrotubuli-Motorproteine *KIF4* (*kinesin family member 4*) und *KIF2c* (Chromosom 4; *kinesin family member 2C*). Hingegen ist *KIFc2* (Chromosom 15; *kinesin family member C2*) hochreguliert. Im hLRRK2 KD ist *KIF21B* (*kinesin family member 21B*) hochreguliert und *D2LIC* (*dynein 2 light intermediate chain*) reprimiert. Damit könnte der LRRK2-Verlust den Vesikeltransport zur Synapse beeinflussen.

(2) Aufnahme von Neurotransmittern in synaptische Vesikel

Die frühen Endosomen dienen als Station zur Knospung neuer synaptischer Vesikel, die nachfolgend Neurotransmitter aufnehmen können. In dopaminergen Neuronen, welche bei dem PS selektiv degenerieren, wird Dopamin in die Vesikel aufgenommen. Durch den LRRK2-Verlust könnte dieser Prozess verändert werden, da im hLRRK2 KD-Modell *SLC18A1* (*solute carrier family 18 [vesicular monoamine], member 1; Synonym = VMAT1*) reprimiert vorliegt (Eiden et al., 2004). Im mLRRK2 KD-Expressionsprofil ist die *Tyrosin-Hydroxylase*-Expression (*TH*) und die Expression der *Protein Phosphatase 1J* (*PPM1J*) reduziert, welches für einen potentiellen Einfluss des LRRK2-Verlustes auf die Neurotransmitteraufnahme in synaptische Vesikel sprechen könnte.

(3) Exozytose synaptischer Vesikel

Als Folge eines Aktionspotentials können gefüllte Vesikel über Exozytose Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freisetzen (Alberts et al., 2004). Da dies in Nervenzellen schnell geschehen muss, gibt es einen „readily releasable pool“ (RRP) und einen „reserve pool“ (RP) von Vesikeln (siehe Abbildung 4.10). Dabei sind Vesikel im RP über kurze Aktinfilamente und Synapsin miteinander verbunden und in Clustern organisiert, welche über längere Aktinfilamente mit der aktiven Zone verbunden sind. Mit Hilfe des Myosin V können Vesikel entlang der Aktinfilamente transportiert werden (Cingolani und Goda, 2008).

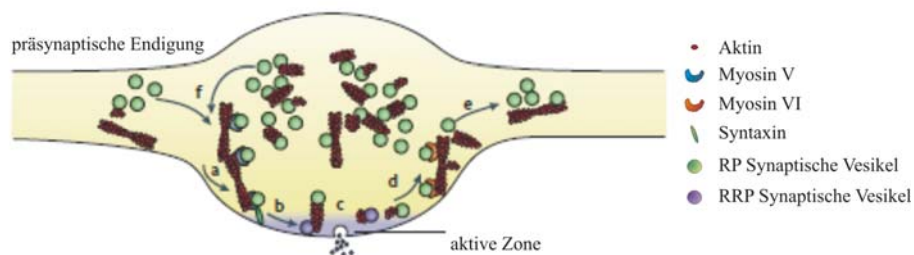


Abbildung 4.10: Aktin und der synaptische Vesikel-Zyklus

a) Synaptische Vesikel des „reserve pools“ (RP) werden an Aktinfilamenten mit Myosin V zur aktiven Zone transportiert. Syntaxine erleichtern das Andocken an dieser und damit das b) Auffüllen des „readily releasable pools“ (RRP). c) Nach Fusion der Vesikel mit der Membran der aktiven Zone können Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. d) Das Recycling der Vesikel geschieht ebenfalls Aktin-abhängig mit Hilfe des Myosin VI, wobei die Vesikel entweder (e) die präsynaptische Endigung verlassen oder (f) wieder in den RP zurückgeführt werden. (modifiziert nach Cingolani und Goda, 2008)

Die zentralen Schritte der Exozytose könnten durch den LRRK2-Verlust beeinträchtigt werden. So kommt es im mLRRK2 KD zur Expressionsveränderung der Aktin-Motorproteine *MYO19* und *MYO1G*. In beiden untersuchten LRRK2 KD-Modellen zeigen kalziumabhängigen Kanäle, welche für die Generierung eines Aktionspotentials entscheidend sind, eine Deregulation. So löst der LRRK2-Verlust im humanen Modell eine Hochregulation des *KCNMB4* und des *CACNA1G* und im murinen Modell eine Hochregulation des *CACNA1C* und des *CACNA1B* aus. Die Zielerkennung zwischen Vesikel und Membran wird über v-Snare-Proteine am Vesikel (wie Synaptobrevin oder Synaptotagmin) und t-Snare-Proteine an der Zielmembran (wie Snap25 oder Syntaxin) gewährleistet (Alberts et al., 2004). Dieser Prozess ist möglicherweise ebenso durch den LRRK2-Verlust beeinflusst. So ist hLRRK2 KD das v-Snare-Protein auf mRNA-Ebene *VAMP1* hochreguliert (Voets et al., 2001). Im mLRRK2 KD sind die Syntaxin- (t-Snare protein) bindenden Proteine *SLC6A1* und *STXBP2* dereguliert.

Die detaillierte Betrachtung differentiell regulierter Transkripte des murinen und humanen LRRK2 KD-Experimentes stellt den Einfluss des LRRK2-Verlustes auf synaptische Prozesse, welche in engem Zusammenhang zur Koordination des Zytoskeletts stehen, heraus. Deutlich wird ebenso, dass im humanen System die Deregulationen der Transkripte des synaptischen Systems nicht so prominent sind wie sie im murinen System ausfallen. Die Ursache dafür kann im Komplexitätsunterschied der beiden Modelle liegen. Die Expressionsanalyse des Zellkulturmodells erfasst nur einen Neuronentyp, die des murinen Modells allerdings das komplette Gehirn mit allen kommunizierenden Neuronentypen.

4.3.2.2 LRRK2-Knockdown und die Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts

Der LRRK2-Verlust beeinflusst möglicherweise Zytoskelett-abhängige Prozesse synaptischer Regulationskaskaden. Der Einfluss der LRRK2-Defizienz auf andere Aktin-Zytoskelettprozesse der Zelle ist Thema dieses Abschnittes. Dabei wird die Betrachtung der differentiell regulierten Transkripte des murinen und humanen LRRK2 KD auf vier Themengebiete fokussiert.

(1) Einfluss des LRRK2-Verlustes auf Zelladhäsionsrezeptoren

Die Entwicklung des Nervensystems ist abhängig von der korrekten Projektion der Axone über lange Distanzen bis zu deren endgültigem Zielort. Dabei hat der Zelladhäsionsrezeptor tragende Wachstumskegel am Ende des Axons eine entscheidende Bedeutung (Alberts et al., 2004). Zwei wichtige Zelladhäsionsrezeptoren der Zelle sind Cadherine und Integrine. Die Cadherine vermitteln den direkten Zellkontakt und Integrine stellen den Zell-Matrixkontakt her. Letztere sind besonders bei der Ausbildung der Fokalkontakte entscheidend. Der Aufbau beider Zelladhäsionsrezeptoren ist in Abbildung 4.11 dargestellt (Juliano, 2002).

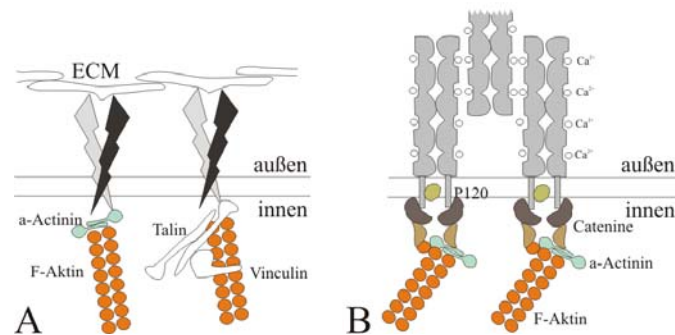


Abbildung 4.11: Zelladhäsionsrezeptoren und deren Verbindung zum Aktin-Zytoskelett

A) Integrin-Rezeptoren vermitteln den Kontakt zwischen der Zelle und extrazellulären Matrixproteinen (ECM). Sie sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit. Der zyttoplasmatische Teil des Rezeptors interagiert zum Beispiel mit α -Actinin oder Talin, welche die Signalweiterleitung zum Aktin-Zytoskelett vermitteln und als Gerüstproteine für weitere Signalmoleküle dienen.

B) Cadherin-Rezeptoren sind homodimere Transmembranproteine, welche Kalzium-abhängig den Zell-Zell-Kontakt vermitteln. Sie binden mit ihrem zyttoplasmatischen Teil β -Catenine, welche direkt eine Interaktion mit α -Cateninen eingehen. Die Signalweiterleitung zum Aktin-Zytoskelett erfolgt dann direkt über die Bindung des α -Catenins an F-Aktin oder über α -Actinin. (modifiziert nach Juliano, 2002)

In den zwei hier untersuchten LRRK2 KD-Modellen erkennt man den Einfluss des LRRK2-Verlustes auf Integrin-vermittelte Prozesse. So ist eine Untereinheit der Integrin-Rezeptoren, das *ITGB5* (*integrin, beta 5*) sowie *FGF2* und *BMP2* im hLRRK2 KD hochreguliert. Dabei kann FGF2 die Integrin-Expression erhöhen (Dell'Era et al., 2002; Tang et al., 2004). BMP2 kann Integrine über die AKT/ERK oder die PI₃-Kinase/AKT-Signalkaskade aktivieren (Fong et al., 2008; Lai et al., 2008).

In beiden Modellen sind Integrin bindende ADAM (a disintegrin and metallopeptidase) Transmembranglykoproteine differentiell reguliert (hLRRK2 KD= *ADAMTS17*; mLRRK2 KD= *ADAMTS4*, *ADAMTS2*, *ADAM1A*). Zusätzlich ist im mLRRK2 KD-Modell das neuronale Zelladhäsionsmolekül *CHL1* differentiell hochreguliert. Dieses Protein ist über die Bindung zu Integrinen wichtig für die axonale Lenkung (Schlatter et al., 2008).

Im komplexen murinen KD-Modell sind neben den Integrin-Prozessen vor allem Cadherin-Prozesse beeinflusst. Cadherin-Rezeptoren sind kalziumabhängige Rezeptoren, welche den Zell-Zell-Kontakt vermitteln und ihre Signalweiterleitung zu dem Aktin-Zytoskelett über Catenine und deren Interaktion mit α -Actinin bewerkstelligen (Abbildung 4.11 B). Dabei reagieren zwei Cadherine auf den LRRK2-Verlust mit einer RNA-Expressionsreduktion: zum einen *Protocadherin 21* (*PCDH21*) und zum anderen *CELSR1* (*cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1*). Des Weiteren ist auch die Alpha-Untereinheit der Catenine (*CTNNA2, catenin alpha 2*) differentiell hochreguliert.

(2) Einfluss des LRRK2-Verlustes auf PIP₂/IP₃-Signalkaskaden

Die Proteinlipase C (PLC) ist ein entscheidendes Enzym bei der IP₃- und Diacylglycerol-(DAG) Generierung. Sie wird durch die Aktivität der G-Proteine gesteuert (siehe Abbildung 4.12). Die G-Proteine werden durch Reaktionen an G-Protein gekoppelten Rezeptoren

reguliert. Im hLRRK2 KD liegen drei G-Protein gekoppelte Rezeptoren differentiell reguliert vor (*CXCR4*, *CHRM3*, *AGTRL1*) und im mLRRK2 KD sind fünf dieser Rezeptoren (*PTHRI*, *LGR5*, *GPRC5B*, *GPR19*, *BAIL*) in ihrer Expression verändert.

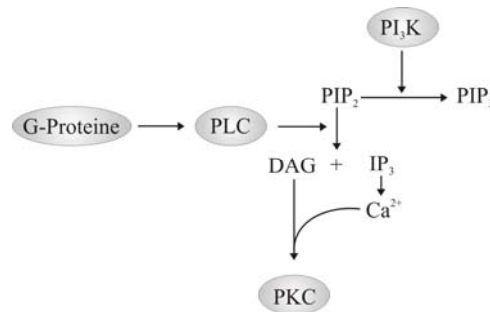


Abbildung 4.12: Regulationsmechanismen um PIP₂

Aktivierte G-Proteine sind für die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) von entscheidender Bedeutung. Diese spaltet PIP₂ zu Diacylglycerol (DAG) und IP₃. Das durch IP₃ freigesetzte Ca²⁺ wird von der DAG benötigt um die Protein Kinase C zu aktivieren. Die Phosphorylierung des PIP₂ zu PIP₃ wird in der Zelle durch die PI₃-Kinase (PI₃K) durchgeführt.

Das gebildete IP₃ setzt nachfolgend Ca²⁺ aus dem ER frei. Das membranverankerte DAG kann gemeinsam mit dem freiwerdenden Ca²⁺ die Proteinkinase C (PKC) aktivieren (Alberts et al., 2004). Die PKC ist entscheidend bei der Formierung der Aktin-Stressfasern, Filopodien und Lamellipodien (Tang et al., 1997; Wonerow et al., 2003).

In beiden LRRK2 KD-Modellen erkennt man den Einfluss auf diese PIP₂/IP₃-Signalkaskade und deren assoziierten Transkripte. So ist im mLRRK2 KD die *PLCB2* (*phospholipase C, beta 2*) hochreguliert und die *PKCQ* (*protein kinase C, theta*) reprimiert.

Die PKC hat die Fähigkeit ERM-Proteine zu phosphorylieren. Die Abbildung 4.13 verdeutlicht, dass durch die Phosphorylierung deren Konformation so verändert wird, dass sie Bindungen zu Plasmamembranproteinen und F-Aktin eingehen können, wodurch das Zytoskelett an der Membran verankert wird (Larsson, 2006). LRRK2 kann ebenso ERM-Proteine *in vitro* phosphorylieren (Jaleel et al., 2007). Welche zytoskelettären Signalkaskaden dadurch aktiviert oder inhibiert werden, ist noch nicht geklärt.

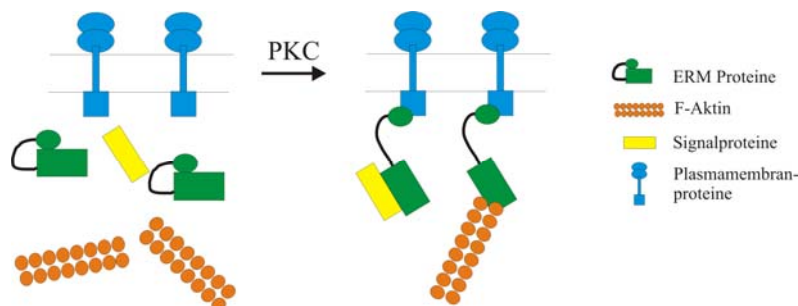


Abbildung 4.13: Einfluss der PKC auf ERM-Proteine

Der inaktive Zustand der ERM-Proteine ist durch eine intramolekulare Interaktion der N-terminalen mit der C-terminalen Domäne gekennzeichnet. Eine Phosphorylierung der ERM-Proteine durch die PKC zerstört diese Interaktion. Dadurch kann die N-terminale Domäne an Plasmamembranproteine und die C-terminale Domäne an F-Aktin binden. Zusätzlich können ERM-Proteine in dieser Konformation auch andere Signalproteine binden (Larsson, 2006).

Im hLRRK2 KD ist der Einfluss auf die PIP₂/IP₃-Signalkaskade weniger deutlich ausgeprägt. Dies resultiert möglicherweise aus der geringeren Zell-Zell Kommunikation, in dem aus einer Neuronenart bestehenden Zellkulturmodell, wenn man es mit dem komplexen Neuronennetzwerk des analysierten Gehirns des mLRRK2 KD-Modells vergleicht.

(3) Einfluss des LRRK2-Verlustes auf Signalkaskaden der kleinen GTPasen

Die Familie der kleinen GTPasen spielt eine prominente Rolle als Mediatoren der Signale, welche von den meisten Richtungssignal-Rezeptoren des Wachstumskegels generiert werden. Dabei können die GTPasen entweder direkt an den Rezeptoren gekoppelt vorliegen oder ihre Signale über GEFs, GAPs oder andere Adapter- oder Signalmoleküle erhalten (Huber et al., 2003). Sie vermitteln nachfolgend den Aktinfilament Auf- und Abbau über die Kontrolle der Aktin-Polymerisierung, -Verzweigung und -Depolymerisierung. Zusätzlich kontrollieren sie auch die Aktin-Myosin-abhängige Kontraktionsfähigkeit. Damit sind die kleinen GTPasen entscheidend an dem Wachstum der Neurite sowie der Funktionsfähigkeit und die Richtungsfindung des Wachstumskegels beteiligt (Huber et al., 2003). Aus diesem Grund sind sie für die neuronale Entwicklung unentbehrlich (Govek et al., 2005).

In beiden LRRK2 KD-Modellen sind kleine GTPasen in ihrer Expression beeinträchtigt. So ist im hLRRK2 KD *CDC42* differentiell hochreguliert. Die *CDC42*-Funktion und die Funktion ihres ebenso hochregulierten GEFs *ARHGEF7* wurde in Abschnitt 4.3.1 schon eingehend besprochen. Besondere Aufmerksamkeit erlangen die differentiell regulierten kleinen GTPasen im mLRRK2 KD. So ist das *CDC42*-homologe Protein *RHOV* (*ras homolog gene; Synonym CHP: Cdc42 homologous protein*) unter LRRK2-Verlust hochreguliert. Diese kleine GTPase hat ebenso wie *CDC42* eine Wirkung auf *PAK1* als Signalmolekül (Weisz Hubsman et al., 2007). Damit scheint, nicht nur im humanen, sondern auch im murinen Modell, der LRRK2-Verlust eine Veränderung der Expression der kleinen GTPasen und deren Signalkaskaden zu induzieren.

(4) Einfluss des LRRK2-Verlustes auf die Aktin-Zytoskelettstruktur

Der Einfluss des LRRK2-Verlustes auf die Aktinfilamentstruktur wird in den zwei untersuchten Modellen ebenfalls deutlich. Den markantesten Effekt könnte die Expressionserhöhung von *PFN2* (*profilin 2*) im mLRRK2 KD haben. Profilin katalysiert die Reaktion des ADP-Aktins zu ATP-Aktin und ist wichtig für den Transport des monomeren ATP-Aktins zu den freien Enden der Aktinpolymere, wo es wieder für die Polymerisierung zur Verfügung gestellt wird (Pollard et al., 2000). Im mLRRK2 KD-Modell ist zusätzlich *TMOD1* (*tropomodulin 1*) differentiell reguliert. Tropomoduline binden in Anwesenheit der Tropomyosine an das langsam wachsende Ende der Aktinfilamente und blockieren diese (Kostyukova, 2008). Damit hat es Einfluss auf die Aktinnetzwerk-Regulation. In Studien von Sussman et al. konnte gezeigt werden, dass die *TMOD1*-Reduktion zu einer Verlängerung der Aktinfilamente führte (Sussman et al., 1998).

Die Regulationsrichtungen des PFN2 (hochreguliert) und des TMOD1 (reprimiert) verdeutlichen die Notwendigkeit der Untersuchung des Neuritenwachstums in dem mLRRK2 KD-Modell. Die PFN2-Regulation resultiert möglicherweise in einer Steigerung der Aktinpolymerisierung, welche Neuritenwachstum zur Folge haben könnte. Die TMOD1-Repression könnte den entgegengesetzten Phänotyp hervorrufen. Im hLRRK2 KD-Modell stützt die Hochregulation der Aktinfilamente-stabilisierenden Tropomyosine die These, dass der LRRK2-Verlust möglicherweise eine Steigerung der Aktinpolymerisierung und damit Neuritenwachstum auslöst.

An dem Vergleich der gesamtgenomischen Expressionsprofile des mLRRK2 KD-Modells und des hLRRK2 Modells in Bezug auf Zytoskelett-assoziierte Signalkaskaden wird die Limitierung der gesamtgenomischen Expressionsprofile deutlich. Die Wirkungen der differentiell regulierten Transkripte sind vielfältig und mögliche aufgestellte Thesen können erst durch funktionelle Analysen gestützt werden. Die Expressionsprofile sind dennoch eine gute Basis, um Thesen der biologischen Funktion von Proteinen zu generieren.

4.3.3 Interaktionspartneranalyse

Die gesamtgenomischen Expressionsprofile verdeutlichen den Einfluss des LRRK2-Verlustes auf das Zytoskelett im humanen sowie im murinen Modell. Aus diesem Grund wurde auf Basis des Expressionsprofils des humanen LRRK2 KD-Modells eine LRRK2-Interaktionspartnersuche gestartet.

4.3.3.1 Beta-Aktin

Die Zelle hat mit Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli drei wesentliche Zytoskelett-Komponenten. Die Expressionsanalyse nach LRRK2-Verlust stellte heraus, dass Transkripte mit Funktionen in Mikrotubuli-Organisation und vor allem Transkripte mit Funktionen für das Aktin-Zytoskelett dereguliert vorlagen.

LRRK2 interagiert mit Alpha- und Beta-Tubulin als Bestandteil der Mikrotubuli (Gandhi et al., 2008). Die Koimmunopräzipitationsanalyse dieser Arbeit konnte herausstellen, dass auch eine Interaktion mit der Mikrofilament-Komponente Beta-Aktin vorliegt. Eine partielle Kolokalisation zwischen Beta-Aktin und LRRK2 in differenzierten SH-SY5Y-Zellen in Wachstumskegeln und an der Zellmembran wurde verdeutlicht. Damit scheint LRRK2 seine Funktion nicht spezifisch an Mikrotubuli auszuüben, sondern auch die Mikrofilamente beeinflussen zu können. In Studien von MacLeod et al. wurde gezeigt, dass die Neuritenlänge und Neuritenverzweigungen primärer kortikaler Kulturen stark reduziert ist, wenn man die Kinase-aktive LRRK2-G2019S-Mutante überexprimiert. Der gegenteilige Effekt tritt auf, wenn man Kinase-inaktives LRRK2 nutzt oder LRRK2 mit Hilfe von shVektoren depletiert (MacLeod et al., 2006). Beim Neuritenwachstum und der Bildung der Neuritenverzweigungen spielt vor allem das Aktin-Zytoskelett eine wichtige Rolle, wobei neu gebildete Neuriten durch Mikrotubuli verstärkt und stabilisiert werden (Dent et al., 2003).

Betrachtet man die endogene Proteinkonzentration des Alpha-Tubulins und des Beta-Aktins, so werden beide bei WT LRRK2-Überexpression in HEK-293-Zellen hochreguliert. Die Nutzung des mutierten LRRK2-Proteins ergibt keine signifikante Änderung der Proteinexpression beider Proteine im Vergleich zu WT LRRK2.

Nach der Publikation von Gandhi et al. 2008 ist die Roc-Domäne des LRRK2 für die Interaktion mit Mikrotubuli verantwortlich. Weitere Interaktionsstudien mit den einzelnen LRRK2-Domänen müssen zeigen, in welcher LRRK2-Domäne die LRRK2-Beta-Aktin-Interaktion stattfindet. Zusätzliche Experimente sind notwendig um zu analysieren, ob die Interaktion zwischen LRRK2 und Beta-Aktin auch *in vivo* auftritt und welche funktionelle Relevanz sie hat.

4.3.3.2 CDC42

Durch die Betrachtung der differentiell regulierten Transkripte des humanen LRRK2 KD-Modells ist die prominente Rolle der kleinen GTPase CDC42 aufgefallen. Mit Hilfe der Koimmunopräzipitationsanalysen konnte eine *in vitro* Interaktion zwischen CDC42 und LRRK2 identifiziert werden.

Die endogenen Koloalisationsexperimente beider Proteine in differenzierten SH-SY5Y-Zellen zeigten eine starke Überlagerung der Lokalisation im Zytoplasma und den Dendriten der Zellen. Studien von Osmani et al. zeigen, dass die CDC42-Lokalisation nach Aktivierung durch ARHGEF7 vom Zytoplasma zur Zellspitze hin verändert wird (Osmani et al., 2006). Es wurde in Dendriten von Melanozyten auch eine CDC42-Lokalisation ähnlich eines vesikulären Musters entlang der kompletten Länge dieser Dendriten detektiert (Scott et al., 2002). Zusätzlich konnte in älteren Analysen gezeigt werden, dass CDC42 am Golgi Apparat lokalisiert ist und bei der Auslieferung neu synthetisierter Proteine zur Plasmamembran beteiligt ist. Dabei wurde herausgestellt, dass der Aktivierungszustand des CDC42 seine subzelluläre Lokalisation beeinflusst (Erickson et al., 1996).

Auch das in dieser Arbeit detektierte punktförmige Muster der endogenen LRRK2-Expression im gesamten Zytoplasma und axonalen sowie dendritischen Strukturen differenzierter SH-SY5Y-Zellen ist aus der Literatur bekannt (Biskup und West, 2008). Aufgrund der Analyse publizierter Daten erkennt man, dass sich die endogene Expression beider Proteine in verschiedenen Gehirnbereichen partiell überlagert. CDC42 wird im neuronalen Gewebe erwachsener Ratten im Hippokampus, Zerebellum, Thalamus und Neokortex exprimiert (Olenik et al., 1997). Die LRRK2-Expression wurde im Kortex, Striatum, Hippokampus, Zerebellum und in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra detektiert (Biskup et al., 2006; Han et al., 2008; Melrose et al., 2007; Simon-Sanchez et al., 2006; Taymans et al., 2006). Diese Arbeit konnte zusätzlich herausstellen, dass die LRRK2-Überexpression als WT-Protein sowie der LRRK2-Mutanten zu keiner signifikanten Änderung der CDC42-Proteinexpression führt.

In weiteren Experimenten ist die Untersuchung der endogenen Interaktion beider Proteine essentiell. Zusätzlich sind Analysen notwendig, um die LRRK2-Domäne zu identifizieren, welche mit CDC42 direkt interagiert.

4.3.3.3 ARHGEF7

LRRK2 hat durch die Vereinigung einer GTPase- und Kinase-Domäne in einem Protein eine Sonderstellung. *In vitro*-Studien zeigten, dass LRRK2 sowohl GTPase- als auch Kinase-Funktion ausüben kann und die GTPase-Funktion die Kinase-Funktion beeinflusst (Gloeckner et al., 2006; Guo et al., 2007; Ito et al., 2007; Smith et al., 2006; West et al., 2005; West et al., 2007). Aufgrund Sequenzhomologie zu anderen GTPasen und Kristallstrukturanalysen wird diskutiert, ob die interne GTPase-Funktion dieses Multidomänenproteins einen Guanidin-Austauschfaktor (GEF) benötigt oder nicht.

Dafür spricht, dass (im Vergleich zu Ras) LRRK2 *in vitro* nur eine schwache GTP-Hydrolyse-Aktivität besitzt (Guo et al., 2007; Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007). Dadurch wird vermutet, dass erst durch aktivierende Faktoren wie LRRK2 spezifische GAPs (GTPase aktivierende Proteine) oder GEFs eine volle LRRK2-Aktivität *in vivo* möglich ist (West et al., 2007). Dagegen sprechen Studien an LRRK Roc-COR-Teilstrukturen aus Thermobakterien. Diese Teilstrukturen zeigen eine schnelle GDP-Dissoziationsrate. Aus diesem Grund wird vermutet, dass sie möglicherweise keinen GEF benötigen, um den Nukleotid-Austausch zu katalysieren (Gotthardt et al., 2008). Allerdings ist das in diesen Studien genutzte LRRK ein paraloges und kein orthologes Protein zu dem humanen LRRK2, wodurch die Rückschlüsse auf das humane LRRK2 einschränkt sind (Marin, 2008).

Bisher ist noch kein GEF oder GAP für LRRK2 bekannt. Im hLRRK2 KD Experiment wurden drei verschiedene ARHGEFs (7/9/12) als hochreguliert identifiziert. Möglicherweise versucht die Zelle mit der Hochregulation der GEFs die noch vorhandenen 20% LRRK2-Proteine verstärkt zu aktivieren, um deren Funktion aufrecht zu erhalten. Aus diesem Grund wurde die Interaktion zwischen dem am stärksten hochregulierten ARHGEF7 und LRRK2 untersucht.

Deutlich konnte mit Hilfe Koimmunopräzipitationsanalysen herausgestellt werden, dass LRRK2 mit ARHGEF7 *in vitro* interagiert. Die zelluläre LRRK2-Lokalisation wird als punktförmiges Muster im gesamten Zytoplasma, sowie in axonalen und dendritischen Strukturen der Neurite, unter Kolokalisation mit Transport-Vesikeln, Endosomen, synaptischen Vesikeln und dem Zytoskelett, beschrieben (Biskup und West, 2008). Dieses Muster kann auch in SH-SY5Y-Zellen bestätigt werden. Sowohl in undifferenzierten T47D-Zellen als auch in PC12-Zellen ist ARHGEF7 diffus in zytoplasmischen und nukleären Bereichen verteilt. Nach Differenzierung dieser zwei Zelltypen, kann aber deutlich die Lokalisation an fokalen Adhäsionskomplexen und an den Lamellipodien der Wachstumskegel detektiert werden (Nola et al., 2008; Shin et al., 2002). In den untersuchten differenzierten SH-SY5Y-Zellen ist eine diffuse zytoplasmatische sowie eine nukleäre Lokalisation detektierbar. Möglicherweise ist die Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen nicht ausreichend weit fortgeschritten, um die ARHGEF7-Translokation zum Wachstumskegel deutlich zu erkennen.

Vergleicht man die Lokalisation der Interaktoren ARHGEF7 und LRRK2, so gibt es eine partielle Kolokalisation, wodurch eine endogene Interaktion nicht ausgeschlossen wird. Diese muss aber über „Pulldown“-Experimente an endogenen Proteinen noch gezeigt werden.

Betrachtet man die Lokalisation beider Proteine im Gehirn, so ist LRRK2 im Kortex, Striatum, Hippokampus, Zerebellum und in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra zu finden (Biskup et al., 2006; Han et al., 2008; Melrose et al., 2007; Simon-Sanchez et al., 2006; Taymans et al., 2006). Die Lokalisation begrenzt sich dabei auf das Soma der Nervenzellen und auf dendritische axonale Strukturen. ARHGEF7 wird ebenso in verschiedenen Gehirnregionen exprimiert. Unter ihnen Kortex, Zerebellum und Hippokampus, wobei dabei keine Kolokalisation mit Glia-Markern erkennbar ist. Den Expressionshöhepunkt im Ratten Gehirn erreicht es mit dem postnatalen Tag 7. Danach fällt das ARHGEF7-Expressionsniveau bis zum Erwachsenenalter kontinuierlich ab (Park et al., 2003). In diesen Zeitraum (embryonaler Tag 17 bis postnataler Tag 28) fällt ebenso die LRRK2-Expression (Biskup et al., 2007). In kultivierten hippokampalen Neuronen befindet sich ARHGEF7 in Dendriten und Axonen als punktförmige Struktur, wobei es teilweise mit präsynaptischen Markern kolokalisiert. Bei Aktivierung des ARHGEF7 wird es zu den Fokalkontakten transloziert (Manser et al., 1998). Diese Aktivierung geschieht durch Phosphorylierung (Shin et al., 2002). Ob LRRK2 eine Kinase ist, welche ARHGEF7 phosphorylieren und damit aktivieren kann, muss noch untersucht werden.

Die Analyse der Domänen-Interaktion zeigte, dass neben dem Volllängen LRRK2-Protein auch eine verkürzte Form des Proteins, welche die Roc-COR-PK-Domänen enthält, ARHGEF7 präzipitieren kann. Damit scheint die Interaktion beider Proteine in den Hauptenzymdomänen des LRRK2-Proteins stattzufinden. Die Einzelanalyse der Roc-, COR- und PK-Domäne des LRRK2-Proteins auf ihre Interaktion mit ARHGEF7 war nicht möglich. Der Grund dafür liegt an der unspezifischen Bindung aller Einzeldomänen an die Agarosematrix, welche für die Koimmunopräzipitationsanalysen genutzt wurde.

In weiteren Analysen muss an stringenteren Koimmunopräzipitationsbedingungen gearbeitet werden, um die Interaktionsdomäne weiter einzugrenzen. Zusätzlich sind weitere Interaktionsstudien mit den einzelnen ARHGEF7-Domänen erstrebenswert.

Des Weiteren wurde herausgestellt, dass bei LRRK2-Überexpression (WT und Mutanten) das endogene ARHGEF7-Proteinniveau bei Nutzung der Kinase-defizienten K1906M LRRK2-Mutante (Ito et al., 2007; West et al., 2007) um 53% ($\pm 3\%$) reduziert vorlag. Dies spricht möglicherweise für die Interaktion zur Vermittlung der räumlichen Nähe, um ARHGEF7 zu phosphorylieren. Da aber der ARHGEF7 Antikörper nicht spezifisch phosphoryliertes ARHGEF7 detektieren kann und auch kein phosphospezifischer ARHGEF7 Antikörper verfügbar ist, kann im Moment über diese These, mit der genutzten Methode, keine Aussage getroffen werden.

Deutlich konnte gezeigt werden, dass alle LRRK2-Mutanten, unabhängig ihrer Effekte auf Kinase- oder GTPase-Funktion, die Bindung an ARHGEF7 aufrechterhalten. Der Vergleich des Bindungspotentials zwischen ARHGEF7 und WT LRRK2 mit dem Bindungspotential zwischen ARHGEF7 und der GTP-Hydrolyse-defizienten R1441C LRRK2-Mutante, verdeutlichte einen Trend zur Reduktion des Bindungspotentials bei der letztgenannten Bedingung. Diese konnte auch im inversen Experiment mit myc-Agarose bestätigt werden. Vergleichende Koimmunopräzipitationsstudien zwischen mutierten Proteinen geben aber nur Hinweise auf ein verändertes Bindungspotential. Für eine Quantifizierung der Bindungsstärke müssen diese Analysen mit aufgereinigten Proteinen durchgeführt werden.

Das reduzierte Bindungspotential zwischen ARHGEF7 und LRRK2-R1441C und den möglicherweise ableitbaren Folgen ist in Abbildung 4.14 veranschaulicht.

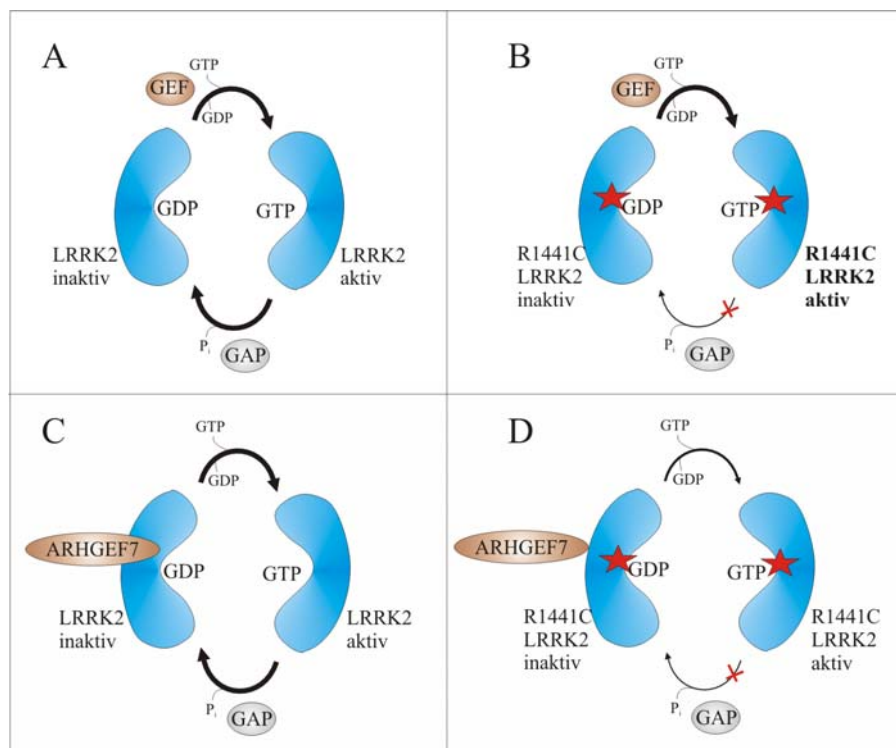


Abbildung 4.14: Einfluss der ARHGEF7-Bindung auf die LRRK2-R1441C-Mutante

A: Die LRRK2-Aktivierung benötigt den Guanidin-Austausch von GDP zu GTP. Der Einfluss eines GEFs wird dabei diskutiert. Die GTP-Hydrolyse, um die inaktive GDP-gebundene LRRK2 Form zu erhalten, wird möglicherweise durch einen GAP bewerkstelligt (West et al., 2007). Die LRRK2-Dimerstruktur wird in dieser Abbildung nicht betrachtet.

B: Die LRRK2-R1441C-Mutante hat eine reduzierte Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse (Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007), so dass möglicherweise mehr aktives GTP-gebundenes LRRK2 in der Zelle vorliegt.

C: Diese Arbeit konnte zeigen, dass der Guanidin-Austauschfaktor ARHGEF7 *in vitro* an LRRK2 in der Roc-COR-PK-Domäne bindet.

D: Es wurde ein reduziertes Bindungspotential zwischen ARHGEF7 und LRRK2-R1441C detektiert. Möglicherweise resultiert dies aus dem vermehrten Vorhandensein GTP-gebundenen LRRK2-R1441C-Proteins, welches vermindert in den GDP-gebundenen Zustand übergeht, an welchem ARHGEF7 als GEF binden kann.

Der Aktivierungszyklus der internen GTPase-Funktion des LRRK2-Proteins wird möglicherweise durch GEFs und GAPs aufrechterhalten (siehe Abbildung 4.14 A) (West et

al., 2007). Es ist bekannt, dass die LRRK2-R1441C-Mutante GTP binden kann, aber in ihrer Hydrolysefähigkeit des GTPs zu GDP eingeschränkt ist (siehe Abbildung 4.14 B) (Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007). Dabei resultiert die Verringerung der GTP-Hydrolyse möglicherweise aus der Destabilisierung des GTPase-Dimers, da die R1441C-Mutation genau an der Verbindungsstelle zweier LRRK2-Monomere ist (Deng et al., 2008). Die reduzierte GTP-Hydrolyse resultiert wahrscheinlich in einer erhöhten Menge an aktivem GTP-gebundenen LRRK2.

Diese Arbeit verdeutlichte eine *in vitro* Interaktion zwischen LRRK2 und ARHGEF7 (siehe Abbildung 4.14 C). Vergleicht man das Bindungspotential zwischen ARHGEF7 und LRRK2-WT mit dem Bindungspotential des ARHGEF7 und LRRK2-R1441C, so ist das Bindungspotential der letztgenannten Bedingung reduziert (siehe Abbildung 4.14 D). Dies könnte über die bevorzugte Bindung der GEFs an GDP-gebundene GTPasen, um diese in einen GTP-gebundenen Zustand zu überführen, erklärbar sein. Das LRRK2-R1441C-Protein liegt, aufgrund der reduzierten GTP-Hydrolysefähigkeit, im Vergleich zum LRRK2 WT-Protein vermehrt in der GTP-gebundenen Form vor (Ito et al., 2007; Lewis et al., 2007; Li et al., 2007). Dies ist möglicherweise eine Erklärung warum ein reduziertes Bindungspotential zwischen LRRK2-R1441C und ARHGEF7 detektierbar ist.

Nachfolgend wurde die LRRK2-Bindung an GTP-Sepharose unter ARHGEF7-Zugabe (im Vergleich zu keiner ARHGEF7 Zugabe) untersucht. Dabei kamen LRRK2 WT, die Kinase-aktivere G2019S-Mutation, die Kinase-defiziente K1906M-Mutation, die GTP-Hydrolyse-defiziente R1441C-Mutation und die GTP-Bindungsinaktive T1348N-Mutation zum Einsatz. In dieser Arbeit konnte, entsprechend den Ergebnissen der Literatur, gezeigt werden, dass keine Bindung der GTP-Bindungsinaktiven LRRK2-T1348N-Mutation an die GTP-Sepharose detektierbar ist (Ito et al., 2007; West et al., 2007).

Die dreimalige Durchführung dieses Experiments konnte herausstellen, dass die GTP-Hydrolyse-defiziente LRRK2-R1441C-Mutante ein signifikant verändertes GTP-Bindungspotential unter ARHGEF7-Zugabe zeigt. Dabei steigt bei ARHGEF7-Anwesenheit das GTP-Bindungspotential des LRRK2-R1441C-Proteins auf das doppelte Niveau wie es ohne ARHGEF7 detektiert wurde. In Abbildung 4.15 wird eine potentielle These veranschaulicht, warum es zu diesem Anstieg kommen könnte. Möglicherweise kann ARHGEF7 trotz des reduzierten Bindungspotentials an LRRK2-R1441C einen Guanidin-Austausch durchführen, welcher zur vermehrten Bindung des LRRK2-R1441C-Proteins an die GTP-Sepharose führt. Da die Hydrolyse des GTP-gebundenen LRRK2-R1441C-Proteins zu GDP-gebundenem LRRK2-R1441C in der Mutante nur ineffektiv möglich ist, reichert sich LRRK2-R1441C an der GTP-Sepharose an.

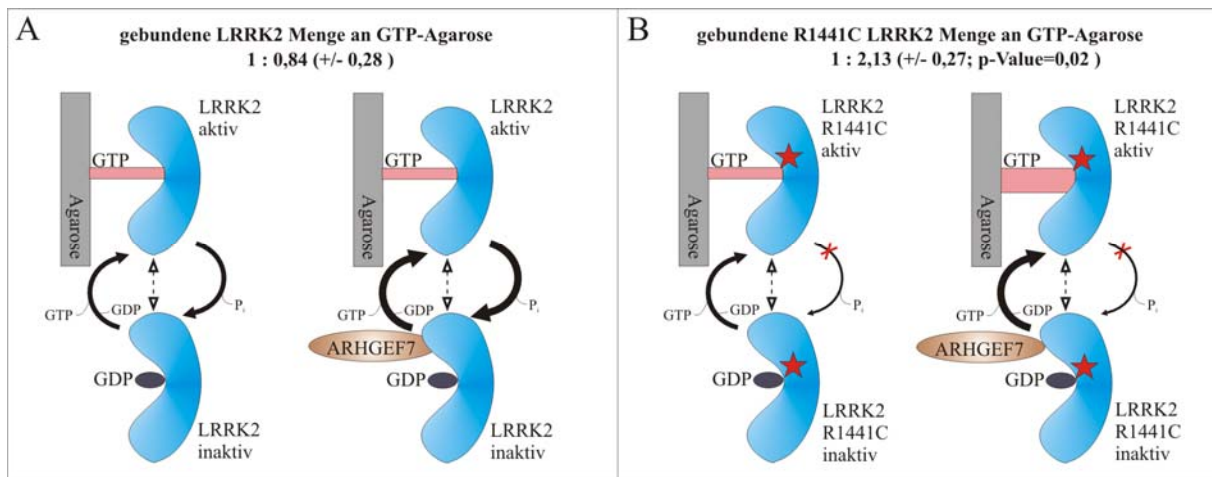


Abbildung 4.15: Einfluss des ARHGEF7 auf die LRRK2-GTP-Bindung

A: Die GTP-Bindung von LRRK2-WT wird an dessen Präzipitation mit Hilfe der GTP-Sepharose gemessen. Der Austausch von GDP zu GTP führt zur LRRK2-Bindung an die Sepharose. Setzt man die LRRK2-WT-GTP-Bindung unter ARHGEF7-Zusatz ins Verhältnis zu der GTP-Bindung ohne ARHGEF7-Zusatz, so gibt es keine signifikante Änderung. Die LRRK2-Dimerstruktur wird in dieser Abbildung nicht betrachtet.

B: Die GTP-Bindung von R1441C-mutiertem LRRK2 zeigt unter ARHGEF7-Zusatz ein erhöhtes LRRK2-R1441C-GTP-Bindungspotential im Vergleich zu der Bedingung ohne ARHGEF7. Dies resultiert möglicherweise aus der reduzierten Hydrolysefähigkeit von LRRK2-R1441C, gepaart mit der steten Aktivierung durch ARHGEF7 und der dadurch stärker werdenden Bindung an GTP-Sepharose.

Guanidin-Austauschfaktoren fördern die Reaktion inaktiver GDP-gebundener GTPasen zu aktiven GTP-gebundenen GTPasen (Wiesmuller und Wittinghofer, 1994). Da LRRK2 *in vitro* als funktionsfähige GTPase identifiziert wurde (Guo et al., 2007; West et al., 2007), soll die GTP-Austauschanalyse dieser Arbeit die Frage klären, ob ARHGEF7 den GDP-GTP-Austausch am LRRK2 bewerkstelligen kann.

Dafür wurde die relative LRRK2-Menge bestimmt, welche unter bestimmten Konzentrationen freien kompetitiven GTPs an GTP-Sepharose bindet. Fördert ein GEF den Umsatz des GDPs zu GTP, so wird die GTPase unter geringeren GTP-Kompetitor-Konzentrationen von der GTP-Sepharose verdrängt, als dies ohne GEF der Fall ist. Die Analysen von Smith et al. und West et al. zeigten, dass LRRK2 die Bindung zu GTP der Bindung zu GDP bevorzugt. Zusätzlich kann LRRK2 durch freies GTP von der GTP-Sepharose verdrängt werden (Smith et al., 2006; West et al., 2007). Dies ist als Schema in Abbildung 4.16 A veranschaulicht. Die LRRK2-Verdrängung von der GTP-Sepharose durch freies GTP konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die GTP-Austauschanalyse verdeutlicht weiterhin, dass die ARHGEF7-Zugabe signifikant die LRRK2-Kompetition mit freiem GTP erhöht. Damit ist weniger freies GTP nötig, um LRRK2 von der GTP-Sepharose zu verdrängen wie es die Abbildung 4.16 B veranschaulicht. Um zu zeigen, dass diese Wettbewerbssteigerung spezifisch auf die ARHGEF7-GEF-Funktion zurückzuführen ist, wurde ein ARHGEF7-Gefdead-Protein in die Analyse eingesetzt. Dieses mutierte ARHGEF7-Protein hat, durch den Austausch zweier Leucine in der DH-Domäne, die GEF-Funktion verloren (Manser et al., 1998). Deutlich konnte herausgestellt werden, dass unter ARHGEF7-Gefdead-Zugabe die LRRK2-Kompetitionsfähigkeit ein ähnliches Niveau erreicht wie unter Zusatz des leeren Vektors.

Die Koimmunopräzipitationsanalyse zeigt, dass dies nicht daraus resultiert, dass die Bindung zwischen ARHGEF7-Gefdead und LRRK2 reduziert ist.

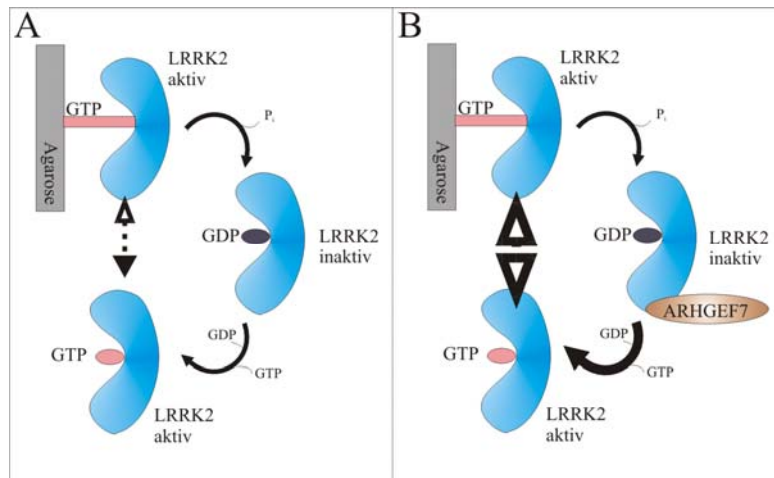


Abbildung 4.16: LRRK2-GTP-Austauschanalyse unter ARHGEF7-Einfluss

A: Die GTP-Austauschanalyse analysiert die LRRK2-Menge, welche unter Zusatz verschiedener Konzentrationen freien GTPs, an GTP-Sepharose gebunden ist. Eine Grundvoraussetzung dabei ist der kontinuierliche Umsatz GTP-gebundener, aktiver LRRK2-Proteine zu inaktiver, GDP-gebundener LRRK2-Proteine und entgegengesetzt. Dabei ist bekannt, dass LRRK2 durch freies GTP von der Sepharose verdrängt werden kann (Smith et al., 2006; West et al., 2007).

B: Die ARHGEF7-Zugabe kann den Umsatz inaktiver GDP-gebundener LRRK2-Proteine zu aktiven GTP-gebundenen LRRK2-Proteinen steigern. Dadurch sind (im Vergleich zu A) geringere Konzentrationen freien GTPs nötig, um eine LRRK2-Verdrängung von der GTP-Sepharose zu erreichen.

Mit diesen Ergebnissen ist ARHGEF7 der erste identifizierte Guanidin-Austauschfaktor, welcher an LRRK2 binden kann. Die Ergebnisse der GTP-Bindeanalyse und der GTP-Austauschanalyse führen zusätzlich zu der Schlussfolgerung, dass ARHGEF7 *in vitro* die Funktion eines Guanidin-Austauschfaktors an dem LRRK2-Protein übernehmen kann.

4.3.3.4 Modell der LRRK2-Interaktion mit Zytoskelett-Proteinen

In dieser Arbeit wurde *in vitro* eine Interaktion des LRRK2-Proteins mit dem Guanidin-Austauschfaktor ARHGEF7 sowie mit CDC42 und Beta-Aktin identifiziert. Zusätzlich konnte verdeutlicht werden, dass bei LRRK2-Verlust das FGF2-, ARHGEF7- und CDC42-Expressionsniveau steigt. Durch vorangegangene Studien im Jahr 2006 durch MacLeod et al., wurde in kortikaler Neuronenkultur gezeigt, dass bei reduzierter LRRK2-Kinase-Aktivität, sowie bei LRRK2-Repression die Neuritenlänge und die Verzweigungshäufigkeit zunimmt. Die Bildung von Neuriten, ihre Verlängerung und die Bildung von Verzweigungen ist stark abhängig von dem Zusammenspiel zwischen Aktin-Zytoskelett und Mikrotubuli (Dehmelt und Halpain, 2004). Im Jahr 2008 zeigte die Arbeit von Gandhi et al., dass LRRK2 mit Mikrotubuli interagiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen eine *in vitro*-Interaktion zwischen LRRK2 und Beta-Aktin, zwischen LRRK2 und ARHGEF7 sowie zwischen LRRK2 und CDC42. Die Signalübermittlung der Prozesse am Wachstumskegel erfolgt zum großen Teil über die kleinen GTPasen Rho, Rac und CDC42 (Koh, 2006).

Dabei kann ARHGEF7 die kleine GTPase CDC42 aktivieren, wobei ARHGEF7 zuvor durch Phosphorylierung aktiviert und zu den Wachstumskegeln transloziert werden muss (Feng et al., 2006; Koh, 2006; Manser et al., 1998). CDC42 kann nachfolgend, ebenso wie ARHGEF7, PAK aktivieren (Bagrodia und Cerione, 1999). Es hat aber zusätzlich die Möglichkeit im Zusammenspiel mit WASP und Arp2/3 die Lamellipodien und Filopodienformation durch Aktinpolymerisierung zu fördern (Pollard et al., 2000). PAK kann die leichte Kette der Myosine phosphorylieren, womit die Lamellipodien Bildung gefördert wird (Zhang et al., 2005). Auch kann PAK die LIMK phosphorylieren, welche Aktin-destabilisierende Cofiline durch Phosphorylierung inhibiert (Pollard et al., 2000). Diese Signalkaskaden verdeutlichen die Abhängigkeit der Funktionen des Wachstumskegels und damit der Neuriten-Funktionen der kleinen GTPasen, ihren GEFs und der Aktinpolymerisierung.

Möglicherweise stellt wie in Abbildung 4.17 verdeutlicht LRRK2 ein Gerüstprotein an der Plasmamembran dar, um Aktinfilamente, CDC42 und ARHGEF7 in räumliche Nähe zueinander zu bringen. Diese Nähe ist nötig, damit ARHGEF7 als GEF für CDC42 wirken kann (Manser et al., 1998). Aktiviertes CDC42 kann die Polymerisierung der Aktinfilamente induzieren und damit Filopodienformation vorantreiben (Koh, 2006). Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass ARHGEF7 *in vitro* auch als GEF für LRRK2 wirken kann. Welche Folgen dies für die LRRK2-Funktion als mögliches Gerüstprotein hat, muss in weiteren Studien geklärt werden.

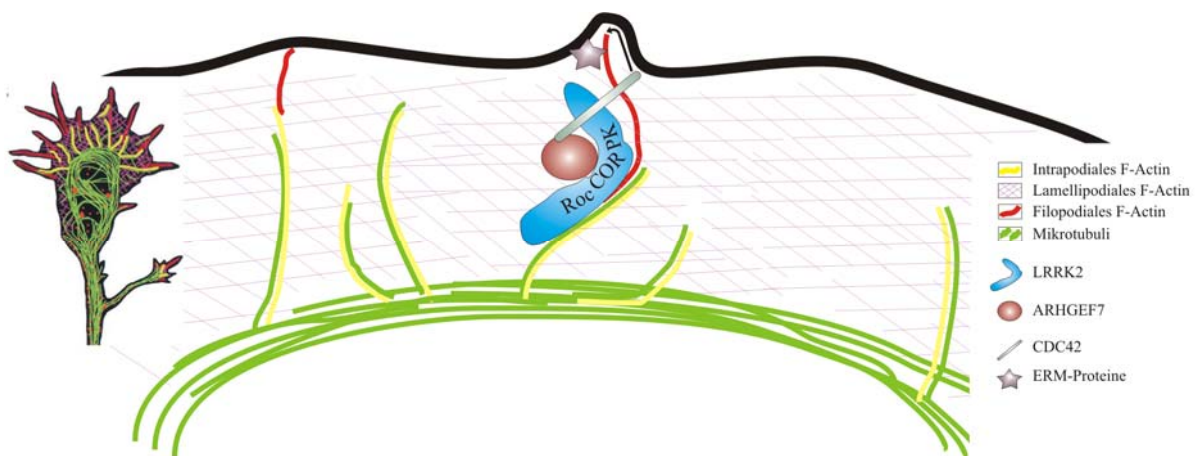


Abbildung 4.17: Modell der LRRK2-Wirkung als Gerüstprotein am Wachstumskegel

Am Wachstumskegel befinden sich Mikrotubuli (grün) in der zentralen Region des Wachstumskegels. Sie erstrecken sich auch in Bereiche der Lamellipodien und Filopodien, wobei sie dabei mit Intrapodiale F-Aktin kolokalisieren. F-Aktin bildet ein Geflecht im Lamellipodium und feste Bündel in den sich bildenden Filopodien (Dent et al., 2003). Proteine der ERM-Familie verankern im phosphorylierten, aktivierten Zustand Aktinfilamente an der Plasmamembran (Bretscher et al., 2002). Sie können durch LRRK2 phosphoryliert werden (Jaleel et al., 2007). Die LRRK2-Bindung über die Roc-Domäne an Mikrotubuli (Gandhi et al., 2008) und an Aktin führt zu einem stabilen Gerüst, an welchem ARHGEF7 als GEF die kleine GTPase CDC42 aktivieren kann (Manser et al., 1998). Diese führt durch die Induktion der Aktinpolymerisierung zur Filopodienformation (Koh, 2006).

Für diese These spricht, dass die LRRK2-Lokalisation als membranassoziiert beschrieben wird (Biskup et al., 2006). Ein weiteres Indiz dieser These ist, dass der LRRK2-Verlust wie die Expressionsanalysen dieser Arbeit herausstellen zur vermehrten Expression der Tropomyosine führt, möglicherweise um vorhandene oder neu gebildete Aktinfilamente zu stabilisieren. Zum zweiten können wie durch Jaleel et al. 2007 gezeigt wurde Ezrin, Radixin und Moesin durch LRRK2 *in vitro* phosphoryliert werden. Die Proteine dieser ERM-Familie sind entscheidend für die Verankerung der Aktinfilamente an der Plasmamembran (Bretscher et al., 2002). Die Position an welcher LRRK2 Moesin *in vitro* phosphoryliert befindet sich an der Interaktionsposition von Aktin und Moesin (Jaleel et al., 2007). Inwieweit dies die Aktin-Verankerung mit der Zellmembran und weitere Signalkaskaden beeinflusst, ist noch ungeklärt. Dieses Modell ist limitiert in der Aussage, ob und in welchem Umfang die LRRK2-Dimerisierung dessen Funktion bei dem Neuritenwachstum beeinflusst, da dazu noch keine Daten publiziert sind.

Zusätzlich scheint das Modell einige Aspekte nur eingeschränkt abzubilden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei einer Depolymerisierung der Mikrotubuli sowie der Mikrofilamente die endogene LRRK2-mRNA-Expression ansteigt. Auch steigt bei LRRK2-Überexpression die endogene Beta-Aktin- und Alpha-Tubulin-Proteinmenge. Welche Signalkaskaden bei beiden Prozessen induziert werden, muss in Folgeexperimenten geklärt werden. Möglicherweise ist die fein abgestimmte LRRK2-Expression ausschlaggebend für die korrekte Entwicklung und Aufrechterhaltung einer neuronalen Zelle.

Das erstellte Modell lässt möglicherweise die These zu, dass LRRK2 das gemeinsame Zusammenspiel der Mikrotubuli und Aktinfilamente am Wachstumskegel beeinflusst. Gemeinsame Regelkreise und Moleküle, welche diese Hauptbestandteile des Zytoskeletts verbinden, werden von vielen Wissenschaftlern vermutet, aber die Mechanismen sind kaum verstanden (Dehmelt und Halpain, 2004; Dent und Gertler, 2003; Zhou und Cohan, 2004).

4.3.4 Zusammenfassung: LRRK2 und seine Bedeutung für zytoskelettäre Prozesse

Die Analyse des Expressionsprofils des humanen und murinen LRRK2 KD-Modells stellte deutlich den Einfluss des LRRK2-Verlustes in zytoskelettale Signalkaskaden dar. So konnte gezeigt werden, dass Transkripte der Zytoskelett-abhängigen synaptischen Regulation durch den LRRK2-Knockdown in ihrer Expression beeinflusst werden. Dies schien im komplexeren, murinen Modell stärker ausgeprägt zu sein. Des Weiteren war der Einfluss des LRRK2-Verlustes auf vier komplexe Signalkaskaden zur Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion, welche eng mit Aktin-Zytoskelettprozessen in Zusammenhang stehen, erkennbar. Unter ihnen ist der Einfluss des LRRK2-Verlustes auf Integrin- und Cadherin-Zelladhäsionsrezeptoren, wobei Cadherin-vermittelte Prozesse nur im murinen Modell dereguliert vorlagen.

Kleine GTPasen bestimmen entscheidend die Aktin-Zytoskelettstruktur mit. In beiden Modellen waren durch den LRRK2-Knockdown Transkripte differentiell reguliert, welche die Aktin-Zytoskelett-Struktur und -Organisation beeinflussen.

Diese Expressionsanalysen und die bisherigen Interaktionsanalysen von Gandhi et al., welche LRRK2 als Interaktor der Mikrotubuli identifizieren konnte, waren die Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsanalysen mit drei Komponenten der Aktin-Zytoskelett-Signalkaskaden: CDC42, Beta-Aktin und ARHGEF7. Dabei wurde die kleine GTPase CDC42 und Beta-Aktin als Interaktor des LRRK2-Proteins gefunden. Des Weiteren wurde ARHGEF7, welcher ein Guanidin-Austauschfaktor der kleinen GTPase CDC42 ist, als LRRK2-Interaktor identifiziert. Die weiterführenden Interaktionsanalysen, GTP-Bindungsstudien und GTP-Austauschanalysen lassen vermuten, dass ARHGEF7 auch in seiner Funktion als Guanidin-Austauschfaktor auf LRRK2 wirken kann. Diese These muss aber durch weitere Experimente untermauert werden. Es konnte ein Modell aufgestellt werden, nach welchem LRRK2 als Gerüstprotein am Wachstumskegel der Neurone die Aktinpolymerisierung und damit die Filopodienbildung beeinflusst. Damit man mit diesem Modell detaillierte LRRK2-Funktionen beschreiben kann, sind allerdings weitere funktionelle Analysen nötig.

Diese müssen klären, ob (i) ARHGEF7 auch *in vivo* als GEF für LRRK2 wirkt und wie dies die LRRK2-Funktion als Kinase beeinflusst und/oder ob (ii) LRRK2 als Kinase den GEF7 phosphorylieren und damit aktivieren kann, ob (iii) die CDC42-Aktivität durch LRRK2 direkt beeinflussbar ist und ob (iiii) LRRK2 direkt über seine Aktin-Bindung dessen Polymerisierung beeinflusst.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Das Parkinson-Syndrom ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Aus diesem Grund ist die Erforschung ihrer Pathogenese von zentraler Bedeutung. In dieser Arbeit wurde die biologische Funktion der Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) untersucht. Dieses Protein, welches 2004 identifiziert wurde, ist nicht nur verantwortlich für 5-6% der autosomal dominanten, sondern auch für 1-2% der sporadischen Parkinson-Syndrome.

Diese Arbeit beschreibt erstmals die gesamtgenomischen Auswirkungen des Verlustes von LRRK2 in humanen dopaminergen Zellen und gibt damit einen Einblick in LRRK2-abhängige Signalkaskaden. Dieser Verlust („Knockdown“) konnte auf RNA- und Proteinebene mit Hilfe von RNA-Interferenz erreicht werden. Die Analyse der Gene und Signalkaskaden, welche durch den Verlust von LRRK2 differentiell reguliert werden, führt in dieser Arbeit zu der Betrachtung von drei grundlegenden Fragestellungen.

Apoptoseprozesse werden mit der Pathogenese des Parkinson-Syndroms in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund befasst sich die erste Fragestellung dieser Arbeit mit dem Einfluss von LRRK2 auf Apoptose-Signalkaskaden. Das gesamtgenomische Expressionsprofil des humanen Zellkulturmodells zeigt einen deutlichen Einfluss des LRRK2-Verlustes auf p53-abhängige Signalkaskaden. Dabei ist das Tumorprotein p53 ein entscheidender Regulator der Apoptoseprozesse. Auch die gesamtgenomische Expressionsanalyse von Gehirnen LRRK2-defizienter Tiere bestätigt dieses Ergebnis. Die anschließende funktionelle Analyse im humanen LRRK2-Knockdown-Modell verdeutlicht eine antiapoptotische Wirkung des LRRK2-Verlustes, welcher bei ER-Stress, oxidativem Stress und Kinase-Inhibition auftritt.

Während der Pathogenese des Parkinson-Syndroms kommt es zur Bildung von Lewy-Körperchen, welche als Hauptbestandteil das Protein Alpha-Synuklein beinhalten. Alpha-Synuklein und LRRK2 sind Proteine, welche mit der autosomal dominanten, familiären Form des Parkinson-Syndroms assoziiert sind. Es gibt bisher noch keine Analysen, ob beide Proteine über ihre biologischen Funktionen einen gemeinsamen Pathogenesemechanismus ausüben. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit das Transkriptom von Alpha-Synuklein-reduzierten, humanen dopaminergen Zellen mit dem Transkriptom von LRRK2-reduzierten, humanen dopaminergen Zellen vergleichend analysiert. Deutlich kann herausgestellt werden, dass es Signalkaskaden gibt, welche durch den Verlust beider Proteine dereguliert vorliegen. Die Betrachtung der differentiell regulierten Transkripte verdeutlicht allerdings oft entgegengesetzte Regulationsrichtungen, so dass diese Analysen gegen einen direkten gemeinsamen Pathogenesemechanismus sprechen.

Die dritte Fragestellung dieser Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von LRRK2 auf zytoskelettäre Prozesse. Durch die veröffentlichte Interaktion von LRRK2 mit Mikrotubuli und den Einfluss von LRRK2 auf die Neuritogenese, ist eine biologische Funktion von LRRK2 in Zytoskelett-Signalkaskaden zu vermuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die mRNA-LRRK2-Expression in Zellkultur unter zytoskelettalem Stress ansteigt. Die gesamtgenomischen Expressionsprofile des humanen wie auch des murinen LRRK2-Knockdown-Modells verdeutlichen, dass besonders Aktin-Zytoskelett-assoziierte Signalkaskaden durch den LRRK2-Verlust dereguliert vorliegen. Besondere Aufmerksamkeit erlangen im humanen Modell nach LRRK2-Verlust die differentiell regulierten Transkripte CDC42 und ARHGEF7. Beide Proteine spielen eine prominente Rolle in Aktin-Zytoskelett-Regulationskaskaden und werden deshalb gemeinsam mit Beta-Aktin auf eine Interaktion mit LRRK2 getestet. Alle drei Proteine zeigen *in vitro* eine Interaktion sowie *in vivo* eine Kolo-kalisation mit LRRK2. LRRK2 besitzt sowohl eine GTPase- als auch eine Kinase-Funktion, welche sich gegenseitig beeinflussen können. Die weitere Charakterisierung der Interaktion zwischen LRRK2 und ARHGEF7 verdeutlicht, dass die Interaktion in diesen zwei Hauptenzymdomänen von LRRK2 stattfindet. Bisher wurde noch kein Guanidin-Austauschfaktor (GEF) von LRRK2 identifiziert, welcher zur Aktivierung der GTPase-Funktion von LRRK2 nötig sein könnte. Die funktionellen *in vitro* Studien dieser Arbeit zeigen, dass der Guanidin-Austauschfaktor ARHGEF7 das Potential hat, als GEF am LRRK2 wirken zu können, womit dies die Erstbeschreibung eines GEFs am LRRK2 darstellt. In weiteren Bindungsstudien zwischen der GTP-Hydrolyse-defizienten, pathogenen LRRK2 R1441C Mutation und ARHGEF7 kann verdeutlicht werden, dass ein reduziertes Bindungspotential zwischen ihnen vorliegt und dass die GTP-Bindung der R1441C Variante von LRRK2 durch ARHGEF7 ansteigt. Durch die identifizierte Bindung von LRRK2 an CDC42, Beta-Aktin und ARHGEF7 wird in dieser Arbeit eine mögliche Funktion von LRRK2 als Gerüstprotein bei dem Neuritenwachstum herausgestellt und diskutiert.

Diese Arbeit verdeutlicht damit zum ersten Mal, dass gesamtgenomische Expressionsprofile die Basis für Interaktionsstudien sein können, wodurch thesengetrieben funktionelle Analysen möglich werden, welche die biologische Funktion von Proteinen aufzuklären helfen.

5.2 Ausblick

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht den Einfluss des LRRK2-Verlustes in Aktin-Zytoskelett-assoziierte Signalkaskaden. Dabei wurden Beta-Aktin, CDC42 und ARHGEF7 als neue Interaktionspartner von LRRK2 identifiziert. Diese Interaktionen und ihre funktionellen Auswirkungen müssen durch weitere Analysen näher charakterisiert werden.

Dabei kann unter Nutzung humaner Zellkultur für jeden Interaktor die Interaktionsstelle auf einzelne LRRK2-Domänen eingegrenzt werden. Betrachtet man die LRRK2 - ARHGEF7 Interaktion, so muss analysiert werden, ob die Kinase-Aktivität von LRRK2 auch ARHGEF7 als Zielprotein hat. Des Weiteren ist es wichtig, neben der Funktion von ARHGEF7 als Guanidin-Austauschfaktor von LRRK2, zu untersuchen, welche Auswirkungen die Interaktion auf die intrinsische LRRK2-Kinase-Aktivität hat. Die funktionelle Relevanz der Interaktion von CDC42 und LRRK2 kann ebenfalls in humaner Zellkultur analysiert werden. Dabei muss die Frage im Vordergrund stehen, ob der CDC42-Aktivierungszustand durch den LRRK2-Verlust beeinflusst werden kann und welche nachfolgenden Signalkaskaden dadurch induziert werden. Dabei ist als wesentlicher Aspekt zu analysieren, ob durch den LRRK2-Verlust oder durch die LRRK2-Überexpression der Aktinpolymerisierungszustand verändert wird, ob pathogene Mutationen in LRRK2 dies beeinträchtigen und ob dies direkt über die Interaktion zu LRRK2 reguliert wird.

Zusätzlich zu Untersuchungen in humaner Zellkultur sind Analysen mit aufgereinigten Proteinen notwendig, um Bindungsstärken zwischen WT LRRK2 und den gefundenen Interaktionspartnern mit den Bindungsstärken zu pathogenen LRRK2-Varianten vergleichen zu können.

Ein wesentlicher Faktor ist die *in vivo* Relevanz dieser detektierten Interaktionen. Aus diesem Grund sind endogene Interaktionsanalysen im Mausmodell unabdingbar.

Die Charakterisierung primärer Neuronenkulturen, welche aus dem murinen LRRK2-Knockdown-Modell generiert werden können, ist ein wesentlicher Aspekt, um den *in vivo* Einfluss des LRRK2-Verlustes auf das Aktin-Zytoskelett zu analysieren. Dabei ist an diesen Kulturen die Analyse der Neuritenlänge, -verzweigung und -anzahl möglich und kann vergleichend zu WT Kulturen betrachtet werden. Dies wird zusätzlich helfen, die phänotypische Relevanz des LRRK2-Verlustes auf die Neuritogenese zu studieren. Die korrekte Lokalisation der Proteine am Wachstumskegel der Neurite hat einen starken Einfluss auf deren Funktionsausübung. Aus diesem Grund sind *in vivo* Lokalisationsanalysen der identifizierten Interaktoren in den primären Neuronenkulturen des LRRK2-Knockdown-Modells notwendig.

Die weitere Charakterisierung der identifizierten, interagierenden Proteine gepaart mit Analysen, welche deren funktionelle Relevanz und deren *in vivo* Bedeutung aufklären, wird helfen, die biologische Funktion von LRRK2 zu erfassen. Dies kann die Grundlage darstellen, um die LRRK2-vermittelte Pathogenese des Parkinson-Syndroms zu verstehen und neue Therapieansätze zu gewinnen.

5.3 Summary

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease. Therefore further knowledge of the pathogenesis of this disease is necessary. In this study the biological function of the Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), which was identified in 2004, is analysed. Mutations in LRRK2 contribute to 5-6% of all cases of autosomal-dominant as well as to 1-2% of cases of sporadic Parkinson's disease. This study elucidates for the first time the whole genome consequences caused by RNA-interference mediated knockdown of LRRK2 on protein and RNA level in human dopaminergic cells. This enables insights in LRRK2 dependent signaling cascades. Analyses of differentially regulated transcripts and signaling cascades, influenced by the loss of LRRK2, highlight 3 cardinal questions, which will be analysed in this study.

Apoptosis has been proposed to contribute to neuronal loss in Parkinson's disease. Therefore the impact of the knockdown of LRRK2 on apoptosis signaling is examined. Whole genome expression analysis of the LRRK2 knockdown in the human cell culture model reveals a deregulation of p53 depending signaling cascades. The tumor protein p53 is an important regulator of programmed cell death. This result could be confirmed by means of whole genome expression analysis of brains of LRRK2 knockdown mice. Further analysis in the human LRRK2 knockdown model indicates an anti apoptotic effect of the loss of LRRK2 under condition of ER-stress, oxidative stress and kinase inhibition.

Pathological the Parkinson's disease is characterised by the presence of Lewy bodies in surviving neurons, which contains alpha-synuclein (SNCA). SNCA as well as LRRK2 is a protein associated with autosomal-dominant Parkinson's disease. Until now there is no investigation, if the biological function of both proteins contributes to the same pathogenesis inducing pathway. These study compares the differentially regulated transcripts of whole genome expression analysis of both SNCA knockdown and LRRK2 knockdown in human dopaminergic cells. The data highlight that there are common signaling cascades, which contain differentially regulated genes in both experiments. Nevertheless the direction of regulation is conflictive. Therefore a common mechanism of SNCA and LRRK2, which probably lead to neurodegeneration in Parkinson's disease, could not be detected.

The third topic, analysed in this study, is the impact of LRRK2 on cytoskeleton signaling cascades. It is conceivable that LRRK2 have a direct or indirect role in cytoskeleton maintenance because of its published interaction with microtubule and its influence on neuritogenesis. This study shows that the mRNA expression level of LRRK2 is induced under condition of cytoskeleton stress. The microarray analysis in LRRK2 siRNA treated human dopaminergic cells as well as whole genome expression analysis of murine LRRK2 knockdown brains reveal numerous differentially regulated transcripts involved in actin cytoskeleton signal transduction pathways. Detailed analyses point at special impact of the differentially up regulated transcripts CDC42 and ARHGEF7.

Because of their major role in actin cytoskeleton signaling cascades, they are analysed for interaction with LRRK2 additionally to Beta-Actin. All three tested proteins highlight an *in vitro* interaction and an *in vivo* colocalisation with LRRK2. The multidomain protein LRRK2 harbours a kinase and GTPase domain and published results show, that the kinase activity is regulated via the intrinsic GTPase activity. The interaction of ARHGEF7 with LRRK2 occurs in these major protein domains. Although suggesting that LRRK2 requires co-factors like guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GTPase activating proteins (GAPs) for its GTPase activity, none of them are known until now. The *in vitro* data of this study reveal the potential of ARHGEF7 to be the first identified GEF for LRRK2. Further analysis between probably pathogenic LRRK2 variants and ARHGEF7 emphasize a reduced binding between the GTP hydrolysis deficient LRRK2 R1441C variant and ARHGEF7, additionally to an induced GTP binding capacity of the R1441C variant during the presence of ARHGEF7. By means of the new identified LRRK2 interacting proteins, the impact of LRRK2 as scaffold during neurite outgrowth is discussed.

This work illustrates for the first time, that whole genome expression analyses could be the basis for interaction partner studies and lead to functional scientific hypotheses, which are essential for elucidation of the biological function of proteins.

7. Anhang

7.1 Differentiell regulierte Transkripte des ARHGEF7 - LRRK2 Doppel-Knockdowns

7.1.1 siARHGEF7 vs control

Probe Set ID	Gen Symbol	Gen Titel	p-Value	Fold Change	GO biologischer Prozess
226898_s_at	SFPQ	Splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	0,0467	3,3598	DNA repair /// DNA recombination /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// mRNA processing /// mRNA processing /// response to DNA damage stimulus /// RNA splicing /// RNA splicing
209344_at	TPM4	tropomyosin 4	0,0021	2,0471	cell motility
237444_at		Transcribed locus	0,0152	1,9077	---
233919_s_at	HABP4	hyaluronan binding protein 4	0,0111	1,8629	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
219540_at	ZNF267	zinc finger protein 267	0,0059	1,8107	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development
228128_x_at	PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	0,0179	1,8072	proteolysis /// female pregnancy /// female pregnancy /// cell differentiation
234747_at	FLJ12716	FLJ12716 protein	0,0289	1,7892	---
204475_at	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	0,0127	1,7292	proteolysis /// proteolysis /// metabolic process /// collagen catabolic process
232341_x_at	HABP4	hyaluronan binding protein 4	0,0369	1,7248	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
228013_at	PPP2R2A	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	0,0007	1,7159	---
224940_s_at	PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	0,0098	1,7098	proteolysis /// female pregnancy /// female pregnancy /// cell differentiation
226279_at	PRSS23	protease, serine, 23	0,0162	1,6814	proteolysis
228507_at		CDNA FLJ37884 fis, clone BRSTN2012451	0,0494	1,6779	---
244743_x_at	ZNF138	zinc finger protein 138 /// similar to Zinc finger protein 431 /// similar to Zinc finger protein 431	0,0305	1,6488	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent
206291_at	NTS	neurotensin	0,0288	1,6427	signal transduction /// regulation of blood vessel size
224941_at	PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	0,0080	1,6333	proteolysis /// female pregnancy /// female pregnancy /// cell differentiation
1559343_at	SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	0,0216	1,5990	RNA splicing /// mRNA metabolic process
230418_s_at	GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	0,0299	1,5959	---
224675_at	MESDC2	mesoderm development candidate 2	0,0013	1,5949	mesoderm development
212481_s_at	TPM4	tropomyosin 4	0,0008	1,5736	cell motility
210697_at	ZNF257	zinc finger protein 257	0,0497	1,5586	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// proteolysis
243366_s_at	CERKL	Ceramide kinase-like	0,0339	1,5576	---

ANHANG

1565823_at		Transcribed locus	0,0342	1,5472	cytokinesis /// cell cycle /// protein heterooligomerization /// cell division
203634_s_at	CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	0,0168	1,5297	glucose metabolic process /// lipid metabolic process /// fatty acid metabolic process /// fatty acid beta-oxidation /// transport /// eating behavior /// regulation of insulin secretion
1567107_s_at	TPM4	tropomyosin 4	0,0015	1,5204	cell motility
203263_s_at	ARHGEF9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	0,0491	1,5202	intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction
204954_s_at	DYRK1B	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B	0,0233	-1,5028	protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// positive regulation of transcription, DNA-dependent
227585_at			0,0104	-1,5097	---
238859_at	DNAJC9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	0,0073	-1,5108	---
218800_at	SRD5A2L	steroid 5 alpha-reductase 2-like	0,0140	-1,5166	lipid metabolic process
235799_at	NSL1	NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	0,0458	-1,5181	cell cycle /// chromosome segregation /// mitosis /// methylation /// cell division
229252_at	ATG9B	ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae)	0,0111	-1,5422	autophagic vacuole formation
226644_at	MIB2	mindbomb homolog 2 (Drosophila)	0,0257	-1,5496	ubiquitin cycle /// Notch signaling pathway /// positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
218653_at	SLC25A15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	0,0024	-1,5609	---
53720_at	FLJ11286	hypothetical protein FLJ11286	0,0187	-1,5646	---
240908_at	PDCD6	Programmed cell death 6	0,0499	-1,5873	---
203503_s_at	PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	0,0063	-1,6323	transport /// peroxisome organization and biogenesis /// protein transport /// protein import into peroxisome matrix /// negative regulation of gene-specific transcription /// negative regulation of transcription factor activity /// protein homooligomeriz
222137_at	CC2D1A	coiled-coil and C2 domain containing 1A	0,0201	-1,6888	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade /// positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
238320_at	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	0,0318	-1,6937	---
33760_at	PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	0,0043	-1,7317	transport /// peroxisome organization and biogenesis /// protein transport /// protein import into peroxisome matrix /// negative regulation of gene-specific transcription /// negative regulation of transcription factor activity /// protein homooligomeriz
225273_at	WWC3	WWC family member 3	0,0085	-1,7620	---
227107_at		Transcribed locus	0,0003	-2,0363	---

200879_s_at	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	0,0240	-2,0687	two-component signal transduction system (phosphorelay) /// angiogenesis /// response to hypoxia /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// transcription from RNA polymerase II promoter /// signal transduction /// signal transduc
214918_at	HNRPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,0153	-2,1794	nuclear mRNA splicing, via spliceosome /// RNA splicing
236372_at		Transcribed locus	0,0000	-2,3004	---
235295_at		Transcribed locus	0,0004	-2,3894	---
229642_at	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	0,0094	-2,4148	signal transduction /// intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction
242999_at	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	0,0004	-5,3935	signal transduction /// intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction
202547_s_at	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	0,0001	-5,4894	signal transduction /// intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction
202548_s_at	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	0,0004	-5,6042	signal transduction /// intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction

7.1.2 siARHGEF7 + siLRRK2 vs control

Probe Set ID	Gen Symbol	Gen Titel	p-Value	Fold Change	GO biologischer Prozess
235066_at	MAP4	microtubule-associated protein 4	0,0004	3,0117	negative regulation of microtubule depolymerization
226898_s_at	SFPQ	Splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	0,0285	3,0040	DNA repair /// DNA recombination /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// mRNA processing /// mRNA processing /// response to DNA damage stimulus /// RNA splicing /// RNA splicing
1554614_a_at	PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2	0,0029	2,4792	mRNA processing /// RNA splicing
209291_at	ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	0,0421	2,3245	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// neuroblast proliferation /// positive regulation of cell proliferation /// negative regulation of transcription /// regulation of transcription /// negative regulation of neuron differentiat
233919_s_at	HABP4	hyaluronan binding protein 4	0,0030	2,2132	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
239678_at	---	Transcribed locus	0,0019	2,1946	---
213813_x_at	---	---	0,0427	2,1793	mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay /// transcription /// mRNA processing /// RNA splicing /// RNA splicing
214874_at	PKP4	plakophilin 4	0,0058	2,1274	cell adhesion /// cell adhesion
226279_at	PRSS23	protease, serine, 23	0,0011	2,1220	proteolysis
209344_at	TPM4	tropomyosin 4	0,0021	2,1088	cell motility
228013_at	---	MRNA	0,0002	2,0166	---
219540_at	ZNF267	zinc finger protein 267	0,0038	2,0021	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development
230418_s_at	GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	0,0093	1,9635	---
218683_at	PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2	0,0022	1,9170	mRNA processing /// RNA splicing
210232_at	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	0,0006	1,8910	nuclear migration /// establishment and/or maintenance of cell polarity /// small GTPase mediated signal transduction /// actin cytoskeleton organization and biogenesis /// macrophage differentiation /// positive regulation of pseudopodium formation /// n
232341_x_at	HABP4	hyaluronan binding protein 4	0,0331	1,8611	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
231953_at	BPTF	bromodomain PHD finger transcription factor	0,0484	1,8367	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// chromatin remodeling /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// brain development /// chromatin modification /// positive regulation of gene-specific transc
229139_at	JPH1	junctophilin 1	0,0027	1,8335	muscle development
227140_at	---	CDNA FLJ11041 fis, clone PLACE1004405	0,0178	1,8266	---

235773_at	ZIK1	zinc finger protein interacting with K protein 1 homolog (mouse)	0,0254	1,8107	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
242775_at	---	Transcribed locus	0,0164	1,8065	---
211406_at	IER3IP1	immediate early response 3 interacting protein 1	0,0333	1,8027	---
227913_at	EXOSC3	Exosome component 3	0,0021	1,8016	rRNA processing
214230_at	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	0,0006	1,7176	nuclear migration /// establishment and/or maintenance of cell polarity /// small GTPase mediated signal transduction /// actin cytoskeleton organization and biogenesis /// macrophage differentiation /// positive regulation of pseudopodium formation /// n
243302_at	---	Transcribed locus	0,0058	1,7151	---
206117_at	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	0,0084	1,6996	cell motility /// regulation of muscle contraction /// regulation of heart contraction
1567107_s_at	TPM4	tropomyosin 4	0,0009	1,6812	cell motility
224164_at	TPM3	tropomyosin 3	0,0038	1,6682	cell motility /// regulation of muscle contraction
234747_at	C4orf41	chromosome 4 open reading frame 41	0,0001	1,6591	---
237444_at	---	Transcribed locus	0,0173	1,6408	---
214001_x_at	---	CDNA: FLJ21700 fis, clone COL09849, highly similar to HSU14972 Human ribosomal protein S10 mRNA	0,0246	1,6401	---
236132_at	---	---	0,0035	1,6385	cell motility /// cytoskeletal anchoring /// cytoskeletal anchoring /// intercellular junction assembly
228507_at	---	CDNA FLJ37884 fis, clone BRSTN2012451	0,0378	1,6373	---
244743_x_at	LOC730295 /// LOC731265 /// ZNF138	zinc finger protein 138 /// similar to Zinc finger protein 431	0,0148	1,6308	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent
1554547_at	FAM13C1	family with sequence similarity 13, member C1	0,0472	1,6167	---
212481_s_at	TPM4	tropomyosin 4	0,0025	1,6165	cell motility
206343_s_at	NRG1	neuregulin 1	0,0253	1,6111	nervous system development /// regulation of blood pressure /// embryonic development /// glucose transport /// negative regulation of transcription /// cell differentiation /// myelination /// cellular protein complex disassembly
220682_s_at	---	---	0,0180	1,5726	---
1565823_at	7-Sep	Septin 7	0,0059	1,5598	cytokinesis /// cell cycle /// protein heterooligomerization /// cell division
201344_at	UBE2D2	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	0,0110	1,5581	protein modification process /// ubiquitin-dependent protein catabolic process /// ubiquitin cycle /// post-translational protein modification /// regulation of protein metabolic process
226784_at	TWISTNB	TWIST neighbor	0,0225	1,5536	transcription

214157_at	GNAS	GNAS complex locus	0,0132	1,5528	protein targeting /// signal transduction /// signal transduction /// G-protein coupled receptor protein signaling pathway /// G-protein signaling, adenylate cyclase activating pathway /// G-protein signaling, adenylate cyclase activating pathway /// aden
240486_at	HELZ	Helicase with zinc finger	0,0455	1,5521	---
242807_at	FSD1L	fibronectin type III and SPRY domain containing 1-like	0,0311	1,5507	---
227763_at	LYPD6	LY6/PLAUR domain containing 6	0,0356	1,5491	---
242277_at	---	Transcribed locus	0,0038	1,5453	---
230109_at	PDE7B	phosphodiesterase 7B	0,0038	1,5384	signal transduction /// signal transduction /// synaptic transmission
236622_at	PIGM	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M	0,0248	1,5376	GPI anchor biosynthetic process
205741_s_at	DTNA	dystrobrevin, alpha	0,0005	1,5307	striated muscle contraction /// signal transduction /// synaptic transmission /// neuromuscular synaptic transmission
236648_at	---	Transcribed locus	0,0021	1,5298	---
215905_s_at	WDR57	WD repeat domain 57 (U5 snRNP specific)	0,0302	1,5211	RNA processing /// mRNA processing /// RNA splicing /// RNA splicing
235777_at	ANKRD44	ankyrin repeat domain 44	0,0469	1,5209	---
204049_s_at	PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	0,0050	1,5190	---
217824_at	UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	0,0074	1,5148	ubiquitin cycle /// post-translational protein modification /// regulation of protein metabolic process
229589_x_at	BIVM	Basic, immunoglobulin-like variable motif containing	0,0327	1,5136	---
225894_at	SYNPO2	synaptopodin 2	0,0002	1,5125	---
224675_at	MESDC2	mesoderm development candidate 2	0,0001	1,5073	mesoderm development
228393_s_at	ZNF302	zinc finger protein 302	0,0184	1,5010	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
227713_at	KATNAL1	katanin p60 subunit A-like 1	0,0007	-1,5003	---
223153_x_at	TMUB1	transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1	0,0418	-1,5010	protein modification process
232034_at	LOC203274	hypothetical protein LOC203274	0,0397	-1,5018	---
203889_at	SCG5	secretogranin V (7B2 protein)	0,0100	-1,5023	transport /// intracellular protein transport /// intracellular protein transport /// neuropeptide signaling pathway /// peptide hormone processing /// peptide hormone processing /// regulation of hormone secretion /// regulation of hormone secretion
218800_at	SRD5A3	steroid 5 alpha-reductase 3	0,0142	-1,5041	lipid metabolic process
203503_s_at	PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	0,0066	-1,5047	transport /// peroxisome organization and biogenesis /// protein transport /// protein import into peroxisome matrix /// negative regulation of gene-specific transcription /// negative regulation of transcription factor activity /// protein homooligomeriz

218653_at	SLC25A15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier)	0,0014	-1,5047	---
1562012_at	---	---	0,0105	-1,5063	---
234987_at	---	Full-length cDNA clone CS0DI067YM20 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)	0,0380	-1,5068	---
225725_at	---	CDNA clone IMAGE:5261213	0,0176	-1,5117	---
222758_s_at	TMEM132A	transmembrane protein 132A	0,0180	-1,5125	---
235118_at	---	CDNA clone IMAGE:4811412	0,0067	-1,5136	---
229664_at	---	Primary neuroblastoma cDNA, clone:Nbla11051, full insert sequence	0,0019	-1,5157	protein amino acid phosphorylation /// cell motility /// response to stress /// signal transduction /// JNK cascade /// JUN phosphorylation /// response to UV /// negative regulation of apoptosis
218500_at	C8orf55	chromosome 8 open reading frame 55	0,0153	-1,5170	---
205052_at	AUH	AU RNA binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase	0,0009	-1,5189	mRNA catabolic process /// metabolic process /// branched chain family amino acid catabolic process
202708_s_at	HIST2H2BE	histone cluster 2, H2be	0,0154	-1,5200	nucleosome assembly /// nucleosome assembly /// defense response to bacterium
223304_at	SLC37A3	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	0,0015	-1,5231	transport /// carbohydrate transport
232775_at	---	---	0,0120	-1,5246	---
227988_s_at	VPS13A	vacuolar protein sorting 13 homolog A (S. cerevisiae)	0,0365	-1,5336	transport /// Golgi to endosome transport /// protein localization /// protein localization /// protein transport
202079_s_at	TRAK1	trafficking protein, kinesin binding 1	0,0217	-1,5372	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// protein amino acid O-linked glycosylation /// protein targeting
228352_at	UNC13D	unc-13 homolog D (C. elegans)	0,0295	-1,5381	exocytosis
224860_at	C9orf123	chromosome 9 open reading frame 123	0,0425	-1,5382	---
202701_at	BMP1	bone morphogenetic protein 1	0,0340	-1,5384	skeletal development /// skeletal development /// cartilage condensation /// ossification /// proteolysis /// proteolysis /// multicellular organismal development /// multicellular organismal development /// cell differentiation /// cartilage development
225009_at	CMTM4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4	0,0074	-1,5394	chemotaxis
235035_at	SLC35E1	solute carrier family 35, member E1	0,0425	-1,5487	transport
33760_at	PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	0,0062	-1,5489	transport /// peroxisome organization and biogenesis /// protein transport /// protein import into peroxisome matrix /// negative regulation of gene-specific transcription /// negative regulation of transcription factor activity /// protein homooligomeriz

229569_at	---	CDNA clone IMAGE:5263455	0,0041	-1,5505	---
227257_s_at	C10orf46	chromosome 10 open reading frame 46	0,0288	-1,5510	ubiquitin-dependent protein catabolic process
209808_x_at	ING1	inhibitor of growth family, member 1	0,0037	-1,5538	cell cycle /// negative regulation of cell proliferation /// negative regulation of cell growth /// negative regulation of cell cycle
213182_x_at	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	0,0088	-1,5568	regulation of cyclin-dependent protein kinase activity /// G1 phase of mitotic cell cycle /// negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// cell cycle /// cell cycle arrest /// cell cycle arrest /// negative regulation of cell p
228126_x_at	CTXN1	cortixin 1	0,0457	-1,5592	---
221640_s_at	LRDD	leucine-rich repeats and death domain containing	0,0169	-1,5661	apoptosis /// signal transduction /// signal transduction
203998_s_at	SYT1	synaptotagmin I	0,0496	-1,5699	detection of calcium ion /// transport /// synaptic transmission /// neurotransmitter secretion /// neurotransmitter secretion /// regulation of exocytosis /// protein homooligomerization
225426_at	---	Transcribed locus	0,0045	-1,5767	---
222524_s_at	ASB6	ankyrin repeat and SOCS box-containing 6	0,0121	-1,5793	proteolysis /// ubiquitin cycle /// transport /// intracellular signaling cascade /// protein transport /// Wnt receptor signaling pathway /// regulation of Wnt receptor signaling pathway /// mRNA transport /// intracellular protein transport across a mem
204954_s_at	DYRK1B	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B	0,0298	-1,5831	protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// positive regulation of transcription, DNA-dependent
228502_at	---	CDNA: FLJ22648 fis, clone HSI07329	0,0492	-1,5832	---
227845_s_at	SHD	Src homology 2 domain containing transforming protein D	0,0271	-1,5857	---
225191_at	CIRBP	cold inducible RNA binding protein	0,0246	-1,5858	response to stress /// response to cold /// response to cold
155544_a_at	CADM2	cell adhesion molecule 2	0,0281	-1,5894	---
206421_s_at	SERPINB7	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	0,0300	-1,5914	---
203743_s_at	TDG	thymine-DNA glycosylase	0,0042	-1,5932	DNA repair /// base-excision repair /// mismatch repair /// response to DNA damage stimulus /// metabolic process
204911_s_at	TRIM3	tripartite motif-containing 3	0,0245	-1,5976	nervous system development
221214_s_at	NELF	nasal embryonic LHRH factor	0,0269	-1,6090	---
214805_at	EIF4A1	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	0,0474	-1,6102	translation

209965_s_at	RAD51L3	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	0,0009	-1,6103	DNA metabolic process /// DNA repair /// DNA repair /// base-excision repair /// DNA recombination /// response to DNA damage stimulus /// meiotic recombination
239135_at	FLJ11151	hypothetical protein FLJ11151	0,0424	-1,6144	---
219520_s_at	WWC3	WWC family member 3	0,0433	-1,6340	---
242366_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:3858719, mRNA	0,0493	-1,6402	---
228512_at	PTCD3	Pentatricopeptide repeat domain 3	0,0201	-1,6491	---
236047_at	C8orf5	chromosome 8 open reading frame 5	0,0071	-1,6503	---
201516_at	SRM	spermidine synthase	0,0039	-1,6509	spermidine biosynthetic process
232051_at	CCDC102A	coiled-coil domain containing 102A	0,0022	-1,6626	---
225922_at	KIAA1450	KIAA1450 protein	0,0081	-1,6697	---
239454_at	SCARF2	scavenger receptor class F, member 2	0,0145	-1,6770	cell adhesion /// heterophilic cell adhesion
226584_s_at	FAM110A	family with sequence similarity 110, member A	0,0172	-1,6852	---
225157_at	MLXIP	MLX interacting protein	0,0053	-1,6869	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription
238320_at	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	0,0395	-1,7006	---
225529_at	CENTB5	centaurin, beta 5	0,0403	-1,7068	regulation of ARF GTPase activity
1555948_s_at	FAM120A	family with sequence similarity 120A	0,0436	-1,7175	---
225239_at	---	CDNA FLJ26120 fis, clone SYN00419	0,0466	-1,7212	---
223215_s_at	C14orf100	chromosome 14 open reading frame 100	0,0017	-1,7222	---
238885_at	KIAA1549	KIAA1549 protein	0,0224	-1,7314	regulation of transcription, DNA-dependent
225273_at	WWC3	WWC family member 3	0,0062	-1,7352	---
212210_at	INTS1	integrator complex subunit 1	0,0376	-1,7623	snRNA processing
223349_s_at	BOK	BCL2-related ovarian killer	0,0463	-1,7771	apoptosis /// apoptosis /// induction of apoptosis /// induction of apoptosis /// regulation of apoptosis
227107_at	---	Transcribed locus	0,0001	-1,7790	---
223547_at	C14orf100	chromosome 14 open reading frame 100	0,0014	-1,7830	---
208124_s_at	SEMA4F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F	0,0200	-1,7870	cell-cell signaling /// multicellular organismal development /// nervous system development /// nervous system development /// axon guidance /// cell differentiation
219628_at	ZMAT3	zinc finger, matrin type 3	0,0154	-1,7879	regulation of cell growth /// transport /// apoptosis /// response to DNA damage stimulus /// protein transport /// intracellular protein transport across a membrane
224998_at	CMTM4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4	0,0072	-1,7893	chemotaxis
1558738_at	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	0,0149	-1,8101	mRNA processing /// apoptosis /// anti-apoptosis /// RNA splicing /// RNA splicing /// regulation of apoptosis

223575_at	KIAA1549	KIAA1549 protein	0,0011	-1,8431	regulation of transcription, DNA-dependent
223441_at	SLC17A5	solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	0,0131	-1,8470	transport /// anion transport /// carbohydrate transport
236372_at	---	Transcribed locus	0,0016	-1,8500	---
232921_at	KIAA1549	KIAA1549 protein	0,0065	-1,8595	regulation of transcription, DNA-dependent
231863_at	ING3	inhibitor of growth family, member 3	0,0183	-1,8741	regulation of cell growth /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// chromatin modification
214918_at	HNRPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,0023	-1,9103	nuclear mRNA splicing, via spliceosome /// RNA splicing
226460_at	KIAA1450	KIAA1450 protein	0,0114	-1,9125	---
200879_s_at	EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	0,0301	-1,9249	two-component signal transduction system (phosphorelay) /// angiogenesis /// response to hypoxia /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// transcription from RNA polymerase II promoter /// signal transduction /// signal transduc
231513_at	---	Transcribed locus	0,0244	-1,9389	---
214744_s_at	---	---	0,0042	-1,9726	translation /// ribosomal protein import into nucleus
232879_at	CRTC3	CREB regulated transcription coactivator 3	0,0398	-2,0304	---
208258_s_at	GAS2L1	growth arrest-specific 2 like 1	0,0465	-2,0544	cell cycle arrest
209550_at	NDN	needin homolog (mouse)	0,0020	-2,2761	regulation of cell growth /// neuron migration /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// nervous system development /// axonal fasciculation /// central nervous system development /// respiratory gaseous exchange /// negative re
221041_s_at	SLC17A5	solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	0,0430	-2,2850	transport /// anion transport /// carbohydrate transport
213552_at	GLCE	glucuronic acid epimerase	0,0091	-2,3175	glycosaminoglycan biosynthetic process /// heparan sulfate proteoglycan biosynthetic process /// heparan sulfate proteoglycan biosynthetic process /// heparin biosynthetic process /// heparin biosynthetic process
243976_at	---	CDNA FLJ39332 fis, clone OCBBF2017069	0,0005	-2,3341	---
223641_at	---	CDNA FLJ36838 fis, clone ASTRO2011426	0,0000	-2,3678	---
235295_at	---	Transcribed locus	0,0004	-2,4664	---
242999_at	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	0,0021	-2,8761	signal transduction /// intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction
204880_at	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	0,0008	-3,0547	DNA ligation /// DNA repair /// DNA dealkylation /// proteolysis /// response to DNA damage stimulus /// regulation of caspase activity
202548_s_at	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	0,0010	-5,1174	signal transduction /// intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction
202547_s_at	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	0,0007	-5,6719	signal transduction /// intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction

7.1.3 Überlagerung siARHGEF7 vs control und siLRRK2 vs control

Gen Symbol	Gen Titel	siARHGEF7 ProbeSet-ID	siARHGEF7 p-Value	siARHGEF7 Fold Change	siLRRK2 ProbeSet-ID	siLRRK2 p-Value	siLRRK2 Fold Change	im 3er Vergleich
ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	242999_at	0,0004	-5,3935	242999_at	0,0221	2,0069	+
ARHGEF9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	203263_s_at	0,0491	1,5202	203264_s_at	0,0487	1,5825	
GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	230418_s_at	0,0299	1,5959	230418_s_at	0,0108	1,7073	+
HABP4	hyaluronan binding protein 4	233919_s_at	0,0111	1,8629	233919_s_at	0,0024	1,8659	+
MESDC2	mesoderm development candidate 2	224675_at	0,0013	1,5949	224675_at	0,0059	1,5487	+
TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	238320_at	0,0318	-1,6937	234989_at	0,0268	-2,0309	+
TPM4	tropomyosin 4	209344_at	0,0021	2,0471	209344_at	0,0001	2,5355	+

7.1.4 Überlagerung siARHGEF7 vs control und siARHGEF7 + siLRRK2 vs control

Gen Symbol	Gen Titel	siARHGEF7 ProbeSet-ID	siARHGEF7 p-Value	siARHGEF7 Fold Change	siARHGEF7 +siLRRK2 ProbeSet-ID	siARHGEF7 +siLRRK2 p-Value	siARHGEF7 +siLRRK2 Fold Change	im 3er Vergleich
ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	229642_at	0,0094	-2,4148	202547_s_at	0,0007	-5,6719	+
DYRK1B	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B	204954_s_at	0,0233	-1,5028	204954_s_at	0,0298	-1,5831	
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	200879_s_at	0,0240	-2,0687	200879_s_at	0,0301	-1,9249	
FLJ12716	FLJ12716 protein	234747_at	0,0289	1,7892	234747_at	0,0001	1,6591	
GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	230418_s_at	0,0299	1,5959	230418_s_at	0,0093	1,9635	+
HABP4	hyaluronan binding protein 4	233919_s_at	0,0111	1,8629	233919_s_at	0,0030	2,2132	+
HNRPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	214918_at	0,0153	-2,1794	214918_at	0,0023	-1,9103	
MESDC2	mesoderm development candidate 2	224675_at	0,0013	1,5949	224675_at	0,0001	1,5073	+
PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	203503_s_at	0,0063	-1,6323	33760_at	0,0062	-1,5489	
PPP2R2A	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	228013_at	0,0007	1,7159	228013_at	0,0002	2,0166	
PRSS23	protease, serine, 23	226279_at	0,0162	1,6814	226279_at	0,0011	2,1220	
SFPQ	Splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	226898_s_at	0,0467	3,3598	226898_s_at	0,0285	3,0040	
SLC25A15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15	218653_at	0,0024	-1,5609	218653_at	0,0014	-1,5047	
SRD5A2L	steroid 5 alpha-reductase 2-like	218800_at	0,0140	-1,5166	218800_at	0,0142	-1,5041	
TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	238320_at	0,0318	-1,6937	238320_at	0,0395	-1,7006	+
TPM4	tropomyosin 4	209344_at	0,0021	2,0471	212481_s_at	0,0025	1,6165	+
WWC3	WWC family member 3	225273_at	0,0085	-1,7620	219520_s_at	0,0433	-1,6340	
ZNF138	zinc finger protein 138 /// similar to Zinc finger protein 431 /// similar to Zinc finger protein 431	244743_x_at	0,0305	1,6488	244743_x_at	0,0148	1,6308	
ZNF267	zinc finger protein 267	219540_at	0,0059	1,8107	219540_at	0,0038	2,0021	

7.1.5 Überlagerung siARHGEF7 + siLRRK2 vs control und siLRRK2 vs control

Gen Symbol	Gene Titel	siLRRK2 ProbeSet-ID	siLRRK2 p-Value	siLRRK2 Fold Change	siARHGEF7 +siLRRK2 ProbeSet-ID	siARHGEF7 +siLRRK2 p-Value	siARHGEF7 +siLRRK2 Fold Change	im 3er Vergleich
ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	242999_at	0,0221	2,0069	242999_at	0,0021	-2,8761	+
AUH	AU RNA binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase	205052_at	0,0015	-1,5822	205052_at	0,0009	-1,5189	
C14orf100	chromosome 14 open reading frame 100	223547_at	0,0002	-2,0925	223215_s_at	0,0017	-1,7222	
CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	210232_at	0,0105	2,4678	210232_at	0,0006	1,8910	
CMTM4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4	225009_at	0,0029	-1,7116	225009_at	0,0074	-1,5394	
GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	230418_s_at	0,0108	1,7074	230418_s_at	0,0093	1,9635	
HABP4	hyaluronan binding protein 4	233919_s_at	0,0024	1,8659	233919_s_at	0,0030	2,2132	+
ING3	inhibitor of growth family, member 3	231863_at	0,0008	-3,8820	231863_at	0,0183	-1,8741	
KIAA1450	KIAA1450 protein	226460_at	0,0002	-1,9416	225922_at	0,0081	-1,6697	
KIAA1549	KIAA1549 protein	223575_at	0,0033	-1,9459	223575_at	0,0011	-1,8431	
MAP4	microtubule-associated protein 4	235066_at	0,0030	4,2403	235066_at	0,0004	3,0117	
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	229664_at	0,0001	-2,1270	229664_at	0,0019	-1,5157	
MESDC2	mesoderm development candidate 2	224675_at	0,0060	1,5487	224675_at	0,0001	1,5073	+
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	204880_at	0,0010	-2,7048	204880_at	0,0008	-3,0547	
NDN	necdin homolog (mouse)	209550_at	0,0000	-1,7900	209550_at	0,0020	-2,2761	
PKP4	plakophilin 4	214874_at	0,0308	2,5261	214874_at	0,0058	2,1274	
PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2	1554614_a_at	0,0002	2,9397	1554614_a_at	0,0029	2,4792	
SCG5	secretogranin V (7B2 protein)	203889_at	0,0001	-1,8588	203889_at	0,0100	-1,5023	

ANHANG

SEMA4F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F	210124_x_at	0,0015	-1,6112	208124_s_at	0,0200	-1,7870	
SLC17A5	solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	223441_at	0,0033	-2,0054	223441_at	0,0131	-1,8470	
SLC37A3	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3	223304_at	0,0007	-1,8480	223304_at	0,0015	-1,5231	
SRM	spermidine synthase	201516_at	0,0004	-1,7847	201516_at	0,0039	-1,6509	
TDG	thymine-DNA glycosylase	203743_s_at	0,0001	-1,9409	203743_s_at	0,0042	-1,5932	
TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	234989_at	0,0268	-2,0309	238320_at	0,0395	-1,7006	+
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	206117_at	0,0260	1,7918	206117_at	0,0084	1,6996	
TPM3	tropomyosin 3	224164_at	0,0135	1,6284	224164_at	0,0038	1,6682	
TPM4	tropomyosin 4	209344_at	0,0001	2,5355	209344_at	0,0021	2,1088	+
ZMAT3	zinc finger, matrin type 3	219628_at	0,0100	-1,6100	219628_at	0,0154	-1,7879	
ZNF302	zinc finger protein 302	228393_s_at	0,0015	2,0009	228393_s_at	0,0184	1,5010	

7.1.6 Überlagerung des siARHGEF7 vs control und siARHGEF7 + siLRRK2 vs control und siLRRK2 vs control (3er Vergleich)

Gene Symbol	Gene Title	si ARH GEF7 Probe Set-ID	si ARH GEF7 p-Value	si ARH GEF7 Fold Change	si LRRK2 Probe Set-ID	si LRRK2 p-Value	si LRRK2 Fold Change	si ARHGEF7 +siLRRK2 ProbeSet-ID	si ARHGEF7 +siLRRK2 p-Value	si ARHGEF7 +siLRRK2 Fold Change
ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	242999_at	0,0004	-5,3935	242999_at	0,0221	2,0069	242999_at	0,0021	-2,8761
GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	230418_s_at	0,0299	1,5959	230418_s_at	0,0108	1,7074	230418_s_at	0,0093	1,9635
HABP4	hyaluronan binding protein 4	233919_s_at	0,0111	1,8629	232341_x_at	0,0163	1,8685	233919_s_at	0,0030	2,2132
MESDC2	mesoderm development candidate 2	224675_at	0,0013	1,5949	224675_at	0,0060	1,5487	224675_at	0,0001	1,5073
TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	238320_at	0,0318	-1,6937	234989_at	0,0268	-2,0309	238320_at	0,0395	-1,7006
TPM4	tropomyosin 4	209344_at	0,0021	2,0471	212481_s_at	0,0014	1,9321	209344_at	0,0021	2,1088

7.2 Differentiell regulierte Transkripte mLRRK2 KD vs WT

Illumina ID	Gen Symbol	Gen Titel	Fold Change	p-Value	GO biologischer Prozess
6860309	Ascc2	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	6581,76	0,022	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
1770324	EG368203	predicted gene, EG368203	4726,31	0,022	
1940279	Ogg1	8-oxoguanine DNA-glycosylase 1	3098,62	0,013	DNA repair /// DNA repair /// DNA repair /// base-excision repair /// base-excision repair /// base-excision repair /// nucleotide-excision repair /// response to DNA damage stimulus /// metabolic process
2480132	Elf2	E74-like factor 2	2703,49	0,028	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
4560133	2410018M08Rik	RIKEN cDNA 2410018M08 gene	2077,84	0,026	---
4010524	Zfp326	zinc finger protein 326	1070,94	0,030	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// positive regulation of transcription
2340364	Mtf1	metal response element binding transcription factor 1	866,41	0,042	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// response to oxidative stress /// positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// response to cadmium ion
6350671	Hils1	histone H1-like protein in spermatids 1	745,40	0,036	chromatin silencing /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// germ cell development /// spermatogenesis /// chromatin modification /// cell differentiation /// chromosome condensation
2260725	Ssbp2	single-stranded DNA binding protein 2	268,02	0,043	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent
6770037	Ccl21c	chemokine (C-C motif) ligand 21c (leucine)	13,920	0,004	
6100184	Rfx3	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)	6,871	0,013	
4480154	1700003M02Rik	RIKEN cDNA 1700003M02 gene	6,787	0,027	---
2690035	Pou4f3	POU domain, class 4, transcription factor 3	5,441	0,016	regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// sensory perception of sound /// sensory perception of sound /// vestibulocochlear nerve development /// retinal ganglion cell axon guidance ///
6290632	Ripk2	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	5,116	0,023	protein amino acid phosphorylation /// apoptosis /// T cell proliferation /// regulation of apoptosis /// positive regulation of apoptosis /// positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade /// regulation of caspase activity /// positive regulat
4730332	Spat7	spermatogenesis associated 7	5,032	0,003	---
6940047	Capn3	calpain 3	4,773	0,006	carbohydrate metabolic process /// glucose metabolic process /// proteolysis /// proteolysis /// myofibril assembly /// sarcomere organization
3800022	Adam1a	a disintegrin and metallopeptidase domain 1a	4,598	0,047	proteolysis /// proteolysis /// integrin-mediated signaling pathway /// binding of sperm to zona pellucida /// fusion of sperm to egg plasma membrane
6200113	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	4,468	0,021	---
1230068	D1Ert53e	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 53, expressed	4,402	0,012	---
1090463	Ctnna2	catenin (cadherin associated protein), alpha 2	4,378	0,000	cell adhesion /// brain morphogenesis
6510364	Apoa2	apolipoprotein A-II	3,761	0,009	negative regulation of cytokine secretion during immune response /// protein folding /// fatty acid metabolic process /// transport /// lipid transport /// lipid transport /// cholesterol metabolic process /// cholesterol metabolic process /// response to
3390091	NA	NA	3,722	0,039	
70364	Olf320	olfactory receptor 320	3,394	0,030	
6130372	NA	NA	3,182	0,034	
2630279	NA	NA	3,138	0,002	
5860315	Plxnc1	plexin C1	3,089	0,006	signal transduction /// multicellular organismal development /// multicellular organismal development

6650138	Lass4	LAG1 homolog, ceramide synthase 4	3,030	0,000	regulation of transcription, DNA-dependent /// lipid biosynthetic process /// sphingolipid biosynthetic process /// ceramide biosynthetic process
6350053	Bai1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1	3,015	0,040	G-protein coupled receptor protein signaling pathway /// neuropeptide signaling pathway /// negative regulation of angiogenesis
1400446	Cyp2b19	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 19	2,917	0,049	oxidation reduction
3870541	NA	NA	2,907	0,000	
4590358	Ccdc64b	coiled-coil domain containing 64B	2,876	0,007	---
670300	Slc39a14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	2,789	0,049	transport /// ion transport /// iron ion transport /// zinc ion transport /// zinc ion transport /// metal ion transport
2650593	Farsa	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	2,692	0,005	translation /// tRNA aminoacylation for protein translation /// tRNA aminoacylation for protein translation /// phenylalanyl-tRNA aminoacylation /// phenylalanyl-tRNA aminoacylation
5130044	Slc26a4	solute carrier family 26, member 4	2,665	0,001	transport /// sensory perception of sound /// sulfate transport /// organ morphogenesis /// inorganic anion transport
3850338	Fmo2	flavin containing monooxygenase 2	2,646	0,038	oxygen and reactive oxygen species metabolic process /// oxidation reduction
50072	Chl1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	2,641	0,015	neuron migration /// cell adhesion /// homophilic cell adhesion /// multicellular organismal development /// nervous system development /// axon guidance /// behavior /// cell differentiation /// neurite development
2120619	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	2,580	0,031	response to virus /// defense response to virus /// defense response to virus
4570100	Wdr55	WD repeat domain 55	2,577	0,016	---
4670176	Ccl21b	chemokine (C-C motif) ligand 21b	2,577	0,001	
1410064	NA	NA	2,565	0,049	
5890184	NA	NA	2,544	0,034	
4150463	Hdc	histidine decarboxylase	2,526	0,019	amino acid and derivative metabolic process /// amino acid metabolic process /// histidine catabolic process /// histidine catabolic process /// carboxylic acid metabolic process /// catecholamine biosynthetic process
3710086	Ryr1	ryanodine receptor 1, skeletal muscle	2,502	0,040	transport /// ion transport /// ion transport /// cation transport /// calcium ion transport /// calcium ion transport /// cellular calcium ion homeostasis /// muscle contraction /// regulation of muscle contraction
3850520	D030011O10Rik	RIKEN cDNA D030011O10 gene	2,489	0,005	---
4010332	A930034L06Rik	RIKEN cDNA A930034L06 gene	2,474	0,004	---
60070	NA	NA	2,469	0,048	
2120403	Ada	adenosine deaminase	2,458	0,008	purine nucleotide metabolic process /// immune response /// nucleotide metabolic process /// purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process
840446	NA	NA	2,456	0,049	
3780519	Stat2	signal transducer and activator of transcription 2	2,451	0,038	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// signal transduction /// regulation of transcription
4850184	Ddb2	damage specific DNA binding protein 2	2,442	0,014	DNA repair /// pyrimidine dimer repair /// response to DNA damage stimulus
4590133	NA	NA	2,405	0,006	
2060170	Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	2,404	0,000	small GTPase mediated signal transduction /// Ras protein signal transduction /// Ras protein signal transduction /// positive regulation of cell proliferation /// visual learning /// actin cytoskeleton organization and biogenesis /// regulation of synapt
5860368	Nfya	nuclear transcription factor-Y alpha	2,403	0,046	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// positive regulation of transcription, DNA-dependent /// positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
5890041	NA	NA	2,365	0,000	

610524	Etv6	ets variant gene 6 (TEL oncogene)	2,335	0,009	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// cellular process /// cell differentiation /// regulation of cell cycle
2120301	Ctrl	chymotrypsin-like	2,296	0,040	proteolysis /// proteolysis /// proteolysis /// digestion
5360647	NA	NA	2,292	0,028	
4200161	Wdr45l	Wdr45 like	2,280	0,016	---
1660156	NA	NA	2,276	0,021	
60593	Dera	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog (C. elegans)	2,269	0,046	metabolic process /// deoxyribonucleotide catabolic process
5080170	Fras1	Fraser syndrome 1 homolog (human)	2,257	0,017	morphogenesis of an epithelium /// cell communication
510706	NA	NA	2,251	0,046	
6380136	Adpgk	ADP-dependent glucokinase	2,241	0,036	carbohydrate metabolic process /// glycolysis
3830286	Xkr6	X Kell blood group precursor related family member 6 homolog	2,219	0,023	---
6040338	A330021E22Rik	RIKEN cDNA A330021E22 gene	2,200	0,024	---
1170725	Crocc	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin	2,183	0,015	cell cycle /// cell projection organization and biogenesis /// centrosome organization and biogenesis
3060093	Uap1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	2,170	0,025	metabolic process /// metabolic process
360193	NA	NA	2,168	0,000	
1980619	Mmp11	matrix metalloproteinase 11	2,167	0,036	proteolysis /// collagen catabolic process
60129	Tirap	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein	2,143	0,028	inflammatory response /// immune response /// signal transduction /// cell surface receptor linked signal transduction /// cell surface receptor linked signal transduction /// I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade /// I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade /// act
2350112	Lhx9	LIM homeobox protein 9	2,107	0,039	regulation of transcription, DNA-dependent /// cell proliferation /// male gonad development /// female gonad development /// regulation of transcription
4810458	Me3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	2,069	0,030	pyruvate metabolic process /// malate metabolic process /// malate metabolic process /// metabolic process /// oxidation reduction
3450008	Arl11	ADP-ribosylation factor-like 11	2,068	0,041	
4010452	Ddhd2	DDHD domain containing 2	2,062	0,019	lipid catabolic process
6200168	Pou6f1	POU domain, class 6, transcription factor 1	2,056	0,001	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription
1050364	BC023179	cDNA sequence BC023179	2,037	0,009	regulation of transcription, DNA-dependent
6380280	NA	NA	2,011	0,006	
7100095	1300017J02Rik	RIKEN cDNA 1300017J02 gene	1,977	0,026	iron ion transport /// iron ion transport /// cellular iron ion homeostasis /// cellular iron ion homeostasis
6900725	NA	NA	1,967	0,016	
2120632	Rnf25	ring finger protein 25	1,962	0,002	ubiquitin cycle /// ubiquitin cycle
1500021	Chl1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM	1,958	0,004	neuron migration /// cell adhesion /// homophilic cell adhesion /// multicellular organismal development /// nervous system development /// axon guidance /// behavior /// cell differentiation /// neurite development
4060465	Cpne7	copine VII	1,940	0,001	---
5130546	NA	NA	1,933	0,041	
6400170	Cpsf31	cleavage and polyadenylation specific factor 3-like	1,932	0,036	snRNA processing /// snRNA processing
2320204	Npas4	neuronal PAS domain protein 4	1,931	0,029	two-component signal transduction system (phosphorelay) /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// signal transduction /// regulation of transcription /// positive regulation of transcription /// positive regulation of transcript
4850095	Arrdc1	arrestin domain containing 1	1,918	0,039	---
2360594	Stxbp2	syntaxin binding protein 2	1,915	0,002	transport /// vesicle docking during exocytosis /// protein transport /// vesicle-mediated transport
2360148	Amy1	amylase 1, salivary	1,896	0,050	carbohydrate metabolic process /// metabolic process
6040161	Pla2g6	phospholipase A2, group VI	1,896	0,006	lipid metabolic process /// metabolic process /// lipid catabolic process
5340440	Lat2	Linker for activation of T cells family, member 2	1,895	0,038	immune response /// intracellular signaling cascade /// calcium-mediated signaling /// B cell activation /// mast cell degranulation /// B cell receptor signaling pathway
4050132	NA	NA	1,868	0,007	

5050551	Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3	1,866	0,005	lipid metabolic process /// metabolic process /// lipid catabolic process /// triacylglycerol biosynthetic process /// triacylglycerol biosynthetic process /// triacylglycerol catabolic process /// triacylglycerol catabolic process
1770070	Pycr2	pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2	1,861	0,026	proline biosynthetic process /// proline biosynthetic process /// metabolic process /// amino acid biosynthetic process /// oxidation reduction
1240025	Ankrd10	ankyrin repeat domain 10	1,858	0,013	regulation of transcription, DNA-dependent
2570435	Mybbp1a	MYB binding protein (P160) 1a	1,855	0,028	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// nucleocytoplasmic transport /// negative regulation of transcription /// respiratory electron transport chain
5570022	Spag1	sperm associated antigen 1	1,846	0,005	single fertilization
2650020	Nudt6	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	1,843	0,011	---
630017	Bpnt1	bisphosphate 3'-nucleotidase 1	1,840	0,050	regulation of transcription, DNA-dependent
7000706	Lars2	leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial	1,839	0,011	translation /// tRNA aminoacylation for protein translation /// leucyl-tRNA aminoacylation /// leucyl-tRNA aminoacylation
3610047	Setd4	SET domain containing 4	1,828	0,039	---
5700341	Necab3	N-terminal EF-hand calcium binding protein 3	1,824	0,047	antibiotic biosynthetic process /// protein metabolic process /// protein metabolic process
1090088	Prpf39	PRP39 pre-mRNA processing factor 39 homolog (yeast)	1,817	0,009	RNA processing /// mRNA processing /// RNA splicing
6980300	Prkab2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	1,800	0,043	fatty acid biosynthetic process /// fatty acid biosynthetic process /// response to stress /// lipid biosynthetic process
460471	NA	NA	1,795	0,001	
6350717	NA	NA	1,793	0,043	
2680056	Ube2i	ubiquitin-conjugating enzyme E2I	1,787	0,010	protein modification process /// ubiquitin-dependent protein catabolic process /// ubiquitin cycle /// cell cycle /// chromosome segregation /// mitosis /// multicellular organismal development /// post-translational protein modification /// regulation of
6200601	Rpl38	ribosomal protein L38	1,787	0,035	
2340347	NA	NA	1,783	0,001	
4780041	Frmppd3	FERM and PDZ domain containing 3	1,779	0,004	signal transduction
6660110	Nhedc2	Na ⁺ /H ⁺ exchanger domain containing 2	1,779	0,010	transport /// ion transport /// sodium ion transport /// regulation of pH /// proton transport
6760176	NA	NA	1,771	0,028	
6760121	D130059P03Rik	RIKEN cDNA D130059P03 gene	1,759	0,001	---
4760397	Trfr2	transferrin receptor 2	1,754	0,043	proteolysis /// cellular iron ion homeostasis
3140736	Nme4	non-metastatic cells 4, protein expressed in	1,750	0,016	GTP biosynthetic process /// UTP biosynthetic process /// CTP biosynthetic process /// nucleotide metabolic process
110348	Cnksr2	connector enhancer of kinase suppressor of Ras 2	1,743	0,007	protein kinase cascade /// regulation of signal transduction
7050088	NA	NA	1,738	0,037	
5550324	Ppp1r1b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B	1,732	0,028	transcription /// signal transduction /// negative regulation of female receptivity /// negative regulation of female receptivity
5390324	Mbd6	methyl-CpG binding domain protein 6	1,719	0,045	---
4200332	Neto1	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	1,713	0,022	protein targeting
4780037	Shroom1	shroom family member 1	1,710	0,005	cell morphogenesis /// actin filament bundle formation
5290364	D12Ert647e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 647, expressed	1,705	0,043	---
4150332	Trim32	tripartite motif-containing 32	1,705	0,007	ubiquitin cycle
3190079	Emid1	EMI domain containing 1	1,692	0,005	phosphate transport
4780010	NA	NA	1,689	0,005	
6100706	NA	NA	1,670	0,043	
4920019	Zfp811	zinc finger protein 811	1,668	0,015	regulation of transcription, DNA-dependent
130121	Ptprr	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	1,665	0,007	in utero embryonic development /// protein amino acid dephosphorylation /// transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway /// dephosphorylation

6100161	Pdlim5	PDZ and LIM domain 5	1,653	0,042	---
6100279	Hebp1	heme binding protein 1	1,648	0,005	heme metabolic process
6760605	Mkx	mohawk	1,643	0,039	regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// muscle development /// regulation of transcription
5910278	Capsl	calcyphosine-like	1,643	0,006	---
5720097	Lcn8	lipocalin 8	1,635	0,022	transport
2630102	4833420G17Rik	RIKEN cDNA 4833420G17 gene	1,634	0,011	---
5570136	Pcnx12	pecanex-like 2 (Drosophila)	1,634	0,028	---
6420040	4931406I20Rik	RIKEN cDNA 4931406I20 gene	1,632	0,045	---
5570279	Cdc26	cell division cycle 26	1,627	0,006	protein folding /// ubiquitin cycle /// cell cycle /// mitosis /// cell division
3140435	Cecr5	cat eye syndrome chromosome region, candidate 5 homolog (human)	1,624	0,012	metabolic process
110592	Mybbp1a	MYB binding protein (P160) 1a	1,623	0,020	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// nucleocytoplasmic transport /// negative regulation of transcription /// respiratory electron transport chain
3360520	Lix1	limb expression 1 homolog (chicken)	1,621	0,018	---
3120398	Sdhb	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)	1,619	0,049	tricarboxylic acid cycle /// tricarboxylic acid cycle /// transport /// oxidation reduction
6110114	2410091C18Rik	RIKEN cDNA 2410091C18 gene	1,613	0,001	---
3120292	C030046I01Rik	RIKEN cDNA C030046I01 gene	1,613	0,005	---
2340504	Cox7b	cytochrome c oxidase subunit VIIb	1,611	0,019	
5860100	Rhov	ras homolog gene family, member V	1,611	0,014	small GTPase mediated signal transduction /// small GTPase mediated signal transduction
5090630	NA	NA	1,609	0,044	
2810021	Psmc6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	1,605	0,017	protein catabolic process
3710494	Atp9b	ATPase, class II, type 9B	1,597	0,034	transport /// metabolic process /// phospholipid transport
1580358	NA	NA	1,596	0,008	
5270121	Rbm5	RNA binding motif protein 5	1,594	0,008	cell cycle /// negative regulation of cell cycle
5910411	Gpr19	G protein-coupled receptor 19	1,593	0,024	signal transduction /// G-protein coupled receptor protein signaling pathway
6980079	Acbd4	acyl-Coenzyme A binding domain containing 4	1,593	0,028	---
360132	Plcb2	phospholipase C, beta 2	1,589	0,045	lipid metabolic process /// signal transduction /// intracellular signaling cascade /// lipid catabolic process /// sensory perception of bitter taste
3840458	Fbx18	F-box and leucine-rich repeat protein 8	1,586	0,047	ubiquitin cycle
3440484	Clk4	CDC like kinase 4	1,586	0,036	protein amino acid phosphorylation /// peptidyl-tyrosine phosphorylation /// protein amino acid autophosphorylation
5080022	Tcf3	transcription factor 3	1,584	0,008	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// determination of anterior/posterior axis, embryo /// Wnt receptor signaling pathway /// negative regulation of transcription, DNA-dependent /// positive regulation of transcription from RNA
780577	Kctd9	potassium channel tetramerisation domain containing 9	1,583	0,037	potassium ion transport
780068	Tekt2	tektin 2	1,582	0,032	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis /// ciliary or flagellar motility /// cell projection organization and biogenesis /// sperm motility
7050064	Tm2d3	TM2 domain containing 3	1,581	0,019	---
2630047	9130401M01Rik	RIKEN cDNA 9130401M01 gene	1,578	0,018	---
2470685	Ublcp1	ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase 1	1,578	0,018	protein modification process
5420725	NA	NA	1,577	0,007	

1410520	Myo19	myosin XIX	1,575	0,048	---
6840154	Dlgap2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	1,573	0,021	protein targeting /// cell-cell signaling
3940020	NA	NA	1,573	0,037	
4610577	NA	NA	1,562	0,050	
630685	2310047O13Rik	RIKEN cDNA 2310047O13 gene	1,561	0,006	apoptosis
6200114	Ttc14	tetratricopeptide repeat domain 14	1,557	0,012	---
1410500	Syap1	Synapse associated protein 1	1,556	0,040	---
4120438	Emp1	Epithelial membrane protein 1	1,555	0,011	cell growth
60400	4632433K11Rik	RIKEN cDNA 4632433K11 gene	1,550	0,008	---
1170278	Pfkip	Phosphofructokinase, platelet	1,550	0,043	glycolysis /// glycolysis
430441	Chrb3	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3	1,547	0,027	transport /// transport /// ion transport /// ion transport /// synaptic transmission /// synaptic transmission, cholinergic
3170500	Kifc2	kinesin family member C2	1,546	0,041	microtubule-based process /// microtubule-based movement
1740010	Cacna1b	calcium channel, voltage- dependent, N type, alpha 1B subunit	1,546	0,028	transport /// ion transport /// calcium ion transport /// calcium ion transport /// neurotransmitter secretion /// locomotory behavior /// regulation of heart contraction /// regulation of blood pressure
6290403	Cacna1c	calcium channel, voltage- dependent, L type, alpha 1C subunit	1,543	0,027	transport /// ion transport /// calcium ion transport /// calcium ion transport /// calcium ion transport /// cellular calcium ion homeostasis /// smooth muscle contraction /// synaptic transmission /// adult walking behavior /// regulation of blood press
5700026	Pfn2	profilin 2	1,542	0,024	cytoskeleton organization and biogenesis /// actin cytoskeleton organization and biogenesis
1190341	Traf7	Tnf receptor-associated factor 7	1,536	0,025	activation of MAPKKK activity /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// ubiquitin cycle /// apoptosis /// apoptosis /// protein ubiquitination /// regulation of apoptosis /// positive regulation of MAPKKK cascade
520463	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1	1,536	0,030	DNA metabolic process /// DNA repair /// response to DNA damage stimulus /// cell cycle /// chromosome segregation /// mitosis /// cellular process /// homologous chromosome segregation /// chromosome organization and biogenesis /// cell division
5290070	Trfr2	transferrin receptor 2	1,524	0,040	proteolysis /// cellular iron ion homeostasis
70131	Pbxip1	pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1	1,519	0,010	
5700605	Insig2	insulin induced gene 2	1,518	0,017	lipid metabolic process /// response to sterol depletion /// steroid metabolic process /// cholesterol metabolic process
6840647	Tbx6	T-box 6	1,516	0,037	mesoderm formation /// cell fate specification /// transcription /// regulation of transcription, DNA- dependent /// multicellular organismal development /// regulation of transcription
3390452	Tspo	translocator protein	-1,516	0,007	---
2970358	Myo1g	myosin IG	-1,518	0,021	---
4070408	Hist2h2aa1	histone cluster 2, H2aa1	-1,520	0,008	
940129	Gent1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	-1,520	0,019	---
1980161	Plekhg2	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2	-1,521	0,017	intracellular signaling cascade /// regulation of Rho protein signal transduction
3520372	2810003C17Rik	RIKEN cDNA 2810003C17 gene	-1,522	0,018	---
3610398	6330527O06Rik	RIKEN cDNA 6330527O06 gene	-1,522	0,024	---
7100292	NA	NA	-1,522	0,018	
2680136	Spon2	spondin 2, extracellular matrix protein	-1,524	0,042	immune response /// cell adhesion /// multicellular organismal development
450338	Aqp1	aquaporin 1	-1,528	0,010	transport /// water transport /// water transport
3290280	Igf1	insulin-like growth factor 1	-1,529	0,006	anti-apoptosis /// nervous system development /// organ morphogenesis /// glial cell differentiation /// positive regulation of granule cell precursor proliferation /// water homeostasis /// mammary gland development /// regulation of steroid hormone rece

1500541	Brap	BRCA1 associated protein	-1,530	0,024	MAPKKK cascade /// ubiquitin cycle /// Ras protein signal transduction
4230129	Colec10	collectin sub-family member 10	-1,531	0,042	phosphate transport /// defense response /// heterophilic cell adhesion /// embryonic development
2230497	Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	-1,537	0,025	---
6250132	NA	NA	-1,540	0,002	
6590112	Tssc1	tumor suppressing subtransferable candidate 1	-1,541	0,033	---
6520138	Lass6	LAG1 homolog, ceramide synthase 6	-1,542	0,039	regulation of transcription, DNA-dependent /// lipid biosynthetic process /// sphingolipid biosynthetic process /// ceramide biosynthetic process
5860491	NA	NA	-1,543	0,011	
4230059	NA	NA	-1,550	0,021	
6350739	NA	NA	-1,553	0,024	
4670079	Rnf181	ring finger protein 181	-1,554	0,011	---
4670707	Lrrk2	leucine-rich repeat kinase 2	-1,559	0,021	protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// small GTPase mediated signal transduction /// protein amino acid autophosphorylation
2510685	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein-like 1	-1,560	0,018	regulation of cell growth
110717	Inpp1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	-1,562	0,009	regulation of transcription, DNA-dependent /// immune response /// cell adhesion /// intracellular signaling cascade /// inositol trisphosphate metabolic process
1570064	As3mt	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase	-1,564	0,003	metabolic process /// toxin metabolic process /// toxin metabolic process /// arsonoacetate metabolic process /// arsonoacetate metabolic process /// response to arsenic /// response to arsenic /// response to arsenic
2480372	Scn11a	sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha	-1,565	0,040	transport /// ion transport /// sodium ion transport
2970577	Kcmf1	potassium channel modulatory factor 1	-1,565	0,012	
6550161	Acy1	aminoacylase 1	-1,566	0,039	proteolysis /// proteolysis /// amino acid metabolic process /// amino acid metabolic process
4070609	BC034090	cDNA sequence BC034090	-1,568	0,031	---
3520273	Phxr2	per-hexamer repeat gene 2	-1,571	0,035	---
2760114	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	-1,571	0,013	signal transduction /// G-protein coupled receptor protein signaling pathway
450465	NA	NA	-1,576	0,003	
4070711	Ucp2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	-1,576	0,016	response to superoxide /// transport /// mitochondrial transport
3170575	Fkbp11	FK506 binding protein 11	-1,577	0,003	protein folding
5050450	Lcn9	lipocalin 9	-1,580	0,014	transport
2470324	Nav2	neuron navigator 2	-1,583	0,021	---
2690047	H2afj	H2A histone family, member J	-1,583	0,018	nucleosome assembly
7040692	Glo1	glyoxalase 1	-1,584	0,001	carbohydrate metabolic process /// carbohydrate metabolic process /// anti-apoptosis
3120435	Nusap1	nucleolar and spindle associated protein 1	-1,586	0,033	mitotic sister chromatid segregation /// cytokinesis after mitosis /// cell cycle /// mitosis /// mitotic chromosome condensation /// establishment of mitotic spindle localization /// positive regulation of mitosis /// cell division
2230348	Sct	secretin	-1,588	0,037	---
50088	H2-T22	Histocompatibility 2, T region locus 10	-1,589	0,023	defense response /// immune response /// antigen processing and presentation
3710600	NA	NA	-1,590	0,002	
4570296	NA	NA	-1,591	0,014	
5910301	Lgi3	leucine-rich repeat LGI family, member 3	-1,597	0,023	---
520519	Sash3	SAM and SH3 domain containing 3	-1,602	0,006	---
3440017	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	-1,606	0,015	ubiquitin cycle /// cell cycle /// mitosis /// cell division
5390438	Nkx2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	-1,608	0,009	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// vasculogenesis /// heart looping /// heart morphogenesis /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// multicellu

4280400	Sh3tc2	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2	-1,610	0,004	---
670279	Wdr7	WD repeat domain 7	-1,610	0,025	proteolysis
4850091	2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 gene	-1,611	0,045	---
450100	Pdlim1	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	-1,612	0,017	
4480239	Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	-1,615	0,005	response to oxidative stress /// response to oxidative stress
3930279	NA	NA	-1,617	0,008	
520041	NA	NA	-1,617	0,027	
5080746	Gal3st1	galactose-3-O-sulfotransferase 1	-1,618	0,006	galactosylceramide biosynthetic process /// spermatogenesis /// biosynthetic process /// glycolipid biosynthetic process /// myelination
4010253	Mvp	major vault protein	-1,619	0,004	---
2450091	Aig1	androgen-induced 1	-1,619	0,020	---
70687	Hist1h3d	histone cluster 1, H3d	-1,629	0,026	
4120286	Txnl4a	thioredoxin-like 4A	-1,631	0,019	mRNA processing /// cell cycle /// mitosis /// metabolic process /// RNA splicing /// cell division
1410465	Kif4	kinesin family member 4	-1,637	0,013	microtubule-based process /// microtubule-based movement
4200673	Dlx2	distal-less homeobox 2	-1,638	0,006	regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// cell differentiation /// regulation of transcription /// positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
460541	Mrpl49	mitochondrial ribosomal protein L49	-1,640	0,004	translation
730195	Lcor1	Ligand dependent nuclear receptor corepressor-like	-1,648	0,028	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// transcription from RNA polymerase II promoter
3870082	Esrrb	estrogen related receptor, beta	-1,652	0,022	in utero embryonic development /// trophectodermal cellular morphogenesis /// trophectodermal cell proliferation /// embryonic placenta development /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// stem cell maintenance
6450707	Aebp1	AE binding protein 1	-1,655	0,025	regulation of transcription, DNA-dependent /// proteolysis /// proteolysis /// cell adhesion /// cell adhesion
670338	Cldn11	claudin 11	-1,657	0,047	cell adhesion /// spermatogenesis /// axon ensheathment /// calcium-independent cell-cell adhesion
730672	Fa2h	fatty acid 2-hydroxylase	-1,658	0,013	fatty acid biosynthetic process /// transport /// metabolic process /// lipid biosynthetic process /// oxidation reduction
520315	Galnt10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	-1,659	0,010	protein amino acid O-linked glycosylation
5340537	C630035N08Rik	RIKEN cDNA C630035N08 gene	-1,661	0,038	---
1230292	Pemt	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	-1,661	0,032	phospholipid metabolic process /// phosphatidylcholine biosynthetic process /// phospholipid biosynthetic process
3120044	Pcsk9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	-1,666	0,009	kidney development /// kidney development /// liver development /// liver development /// proteolysis /// lipid metabolic process /// triacylglycerol metabolic process /// phospholipid metabolic process /// induction of apoptosis /// steroid metabolic pro
4060576	Sp8	trans-acting transcription factor 8	-1,666	0,001	dorsal/ventral pattern formation /// proximal/distal pattern formation /// embryonic limb morphogenesis
3940746	Pscd4	pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains 4	-1,669	0,008	regulation of ARF protein signal transduction
1940563	Spc24	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	-1,672	0,001	cell cycle /// mitosis /// cell division
3120605	6230409E13Rik	RIKEN cDNA 6230409E13 gene	-1,675	0,040	---
4920242	Il28ra	interleukin 28 receptor alpha	-1,675	0,021	---
510372	Rassf4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	-1,676	0,001	cell cycle /// signal transduction /// neuropeptide signaling pathway /// negative regulation of cell cycle

6380082	Rtkn	rhotekin	-1,678	0,049	apoptosis /// signal transduction /// signal transduction /// Rho protein signal transduction /// regulation of anti-apoptosis
5340195	Fgd2	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	-1,680	0,015	regulation of Rho protein signal transduction
6590286	Tgif1	TG interacting factor 1	-1,686	0,003	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription
940168	Slc6a1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1	-1,687	0,018	transport /// neurotransmitter transport
2630452	NA	NA	-1,693	0,026	
6760091	Afap111	actin filament associated protein 1-like 1	-1,695	0,035	---
6020040	Cdkn2b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	-1,700	0,017	
3710128	Ugt8a	UDP galactosyltransferase 8A	-1,701	0,046	metabolic process /// glycolipid biosynthetic process /// myelination
7000575	Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	-1,703	0,013	ovarian follicle rupture /// blood vessel development /// ureteric bud branching /// ureteric bud branching /// kidney development /// regulation of systemic arterial blood pressure by circulatory renin-angiotensin /// angiotensin mediated vasoconstriction
1570332	Tgfa	transforming growth factor alpha	-1,709	0,032	activation of MAPK activity /// activation of MAPK activity /// angiogenesis /// cell proliferation /// positive regulation of epidermal growth factor receptor activity /// positive regulation of epidermal growth factor receptor activity /// positive regu
5340156	Mrpl49	mitochondrial ribosomal protein L49	-1,712	0,007	translation
3440619	Cdca2	cell division cycle associated 2	-1,712	0,018	cell cycle /// mitosis /// cell division
3850100	Tmod1	tropomodulin 1	-1,716	0,049	myofibril assembly /// muscle thick filament assembly
6620292	Mest	mesoderm specific transcript	-1,720	0,001	---
4050731	Noxo1	NADPH oxidase organizer 1	-1,722	0,007	superoxide metabolic process /// cell communication /// oxidation reduction
6940082	Kif2c	kinesin family member 2C	-1,731	0,013	microtubule-based movement
4780427	NA	NA	-1,733	0,000	
6940398	Ntn4	netrin 4	-1,740	0,010	neuron remodeling
3830551	Itih3	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 3	-1,741	0,039	hyaluronan metabolic process
840632	Nudt15	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15	-1,741	0,042	response to reactive oxygen species /// purine deoxyribonucleoside triphosphate catabolic process
4200112	Irx3	Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)	-1,752	0,005	regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription
460092	NA	NA	-1,753	0,017	
3520672	BC004004	cDNA sequence BC004004	-1,757	0,020	---
3870193	Prkcg	protein kinase C, theta	-1,760	0,029	protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// intracellular signaling cascade /// intracellular signaling cascade /// positive regulation of T cell proliferation /// positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process
7040687	NA	NA	-1,763	0,031	
6520403	NA	NA	-1,783	0,005	
510619	Tlx3	T-cell leukemia, homeobox 3	-1,788	0,022	cell fate specification /// cell fate specification /// neuron migration /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// central nervous system development /// respiratory gaseous exchange /// neuron differentia
3830465	Hadh	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	-1,794	0,048	lipid metabolic process /// fatty acid metabolic process /// metabolic process
1230722	NA	NA	-1,808	0,027	
6510348	Celsr1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)	-1,809	0,044	gastrulation with mouth forming second /// establishment of planar polarity /// neural tube closure /// homophilic cell adhesion /// signal transduction /// signal transduction /// G-protein coupled receptor protein signaling pathway /// G-protein coupled

3440494	Hus1	Hus1 homolog (<i>S. pombe</i>)	-1,816	0,027	DNA damage checkpoint /// double-strand break repair via homologous recombination /// DNA repair /// protein amino acid phosphorylation /// protein amino acid phosphorylation /// response to DNA damage stimulus /// response to DNA damage stimulus /// nega
6370133	Adamts2	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	-1,826	0,003	proteolysis /// integrin-mediated signaling pathway /// spermatogenesis /// collagen fibril organization /// lung development /// collagen catabolic process /// skin development /// protein maturation via proteolysis
6400609	Mipep	mitochondrial intermediate peptidase	-1,829	0,028	proteolysis
2450041	Nlk	nemo like kinase	-1,834	0,021	
4920441	Apod	apolipoprotein D	-1,848	0,011	transport
4210167	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	-1,850	0,028	steroid biosynthetic process /// metabolic process /// cholesterol metabolic process /// lipid biosynthetic process /// sterol biosynthetic process
6130403	NA	NA	-1,871	0,046	
6290040	Rassf4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	-1,871	0,009	cell cycle /// signal transduction /// neuropeptide signaling pathway /// negative regulation of cell cycle
6450592	Hoxb2	homeo box B2	-1,872	0,011	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// multicellular organismal development /// pattern specification process /// organ morphogenesis /// reg
2900113	Fstl1	follicle-stimulating-like 1	-1,878	0,020	---
2850148	Txnl1	thioredoxin-like 1	-1,879	0,001	transport /// cell redox homeostasis /// oxidation reduction
3940332	C130021I20Rik	Riken cDNA C130021I20 gene	-1,888	0,003	---
6520546	Ppmlj	protein phosphatase 1J	-1,895	0,007	protein amino acid dephosphorylation
4230161	Tekt5	tektin 5	-1,905	0,001	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis
6590338	Cd5	CD5 antigen	-1,905	0,030	induction of apoptosis by extracellular signals /// T cell costimulation
5270632	NA	NA	-1,932	0,043	
6450377	Ptf1a	pancreas specific transcription factor, 1a	-1,940	0,039	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// embryonic development /// tissue development /// tissue
3780403	NA	NA	-1,953	0,008	
1780215	Gcnt1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	-1,954	0,022	---
2900242	Lyl1	lymphoblastoid leukemia	-1,961	0,030	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription
6290563	Alg8	asparagine-linked glycosylation 8 homolog (yeast, alpha-1,3-glucosyltransferase)	-1,995	0,000	protein amino acid N-linked glycosylation
780750	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	-1,997	0,015	negative regulation of type I hypersensitivity /// negative regulation of inflammatory response to antigenic stimulus /// phagocytosis, engulfment /// defense response /// immune response /// cell surface receptor linked signal transduction /// immunoglob
6510390	Saa3	serum amyloid A 3	-2,000	0,049	acute-phase response
460138	Mboat2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	-2,002	0,002	---
1170075	NA	NA	-2,020	0,028	
6620411	Ptgis	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-2,034	0,014	prostaglandin biosynthetic process /// fatty acid biosynthetic process /// lipid biosynthetic process /// oxidation reduction
2760068	Tmem125	transmembrane protein 125	-2,055	0,011	---
6220309	NA	NA	-2,058	0,038	
3840184	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	-2,058	0,006	antibody-dependent cellular cytotoxicity /// positive regulation of type IIa hypersensitivity /// positive regulation of type III hypersensitivity /// positive regulation of type I hypersensitivity /// positive regulation of type I hypersensitivity /// se
6100110	Txndc11	thioredoxin domain containing 11	-2,064	0,030	cell redox homeostasis
4050332	Syngn2	synaptogyrin 2	-2,068	0,009	protein targeting

5690026	Nfic	nuclear factor I/C	-2,086	0,046	DNA replication /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// odontogenesis of dentine-containing teeth
1090332	Chtf18	CTF18, chromosome transmission fidelity factor 18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,087	0,025	---
1230053	Axud1	AXIN1 up-regulated 1	-2,120	0,049	apoptosis
1690100	Lhx1	LIM homeobox protein 1	-2,154	0,043	urogenital system development /// ureteric bud development /// gastrulation with mouth forming second /// ectoderm formation /// endoderm formation /// kidney development /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// cell-cell signa
6220088	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,173	0,014	ubiquitin cycle /// cell cycle /// mitosis /// cell division
4730373	Dclre1b	DNA cross-link repair 1B, PSO2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,178	0,011	DNA repair /// nucleotide-excision repair /// response to DNA damage stimulus
4780465	Olf653	olfactory receptor 653	-2,190	0,000	
6550072	Pmp22	peripheral myelin protein	-2,202	0,028	cell cycle /// cell cycle arrest /// myelin formation
2470369	Folr1	folate receptor 1 (adult)	-2,218	0,026	posttranslational protein targeting to membrane /// folic acid metabolic process
6660440	NA	NA	-2,224	0,001	
2060136	Prph	peripherin	-2,241	0,000	intermediate filament cytoskeleton organization and biogenesis
1980148	9930021D14Rik	RIKEN cDNA 9930021D14 gene	-2,248	0,015	
580671	Mboat2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	-2,290	0,004	---
6980315	Sfrp1	secreted frizzled-related protein 1	-2,307	0,001	somitogenesis /// multicellular organismal development /// anterior/posterior pattern formation /// Wnt receptor signaling pathway /// cell differentiation
5570446	Gulp1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1	-2,322	0,024	transport /// lipid transport /// phagocytosis /// phagocytosis, engulfment /// phagocytosis, engulfment /// apoptosis /// intracellular signaling cascade /// metabolic process
1980605	NA	NA	-2,349	0,008	
6420408	NA	NA	-2,364	0,040	
6450154	Hoxd3	homeo box D3	-2,371	0,028	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// pattern specification process /// organ morphogenesis /// thyroid gland development /// regulation of transcription
2370037	Mag	myelin-associated glycoprotein	-2,392	0,024	cell adhesion
6020400	Lgr5	leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5	-2,406	0,036	signal transduction /// G-protein coupled receptor protein signaling pathway
5670019	Gstm6	glutathione S-transferase, mu 6	-2,424	0,029	metabolic process
1740433	Wdr54	WD repeat domain 54	-2,439	0,024	---
4230484	V1rh2	vomeronal 1 receptor, H2	-2,493	0,028	
1050315	Sp7	trans-acting transcription factor 7	-2,494	0,000	osteoblast differentiation /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
1050193	Trf	transferrin	-2,533	0,002	response to hypoxia /// transport /// ion transport /// iron ion transport /// iron ion transport /// cellular iron ion homeostasis /// cellular iron ion homeostasis /// acute-phase response /// response to organic cyclic substance /// ferric iron transpo
3360647	Pthr1	parathyroid hormone receptor 1	-2,727	0,002	skeletal development /// ossification /// chondrocyte differentiation /// chondrocyte differentiation /// osteoblast development /// cellular calcium ion homeostasis /// signal transduction /// G-protein coupled receptor protein signaling pathway /// G-pr
6510494	Pcdh21	protocadherin 21	-2,754	0,001	cell adhesion /// homophilic cell adhesion /// homophilic cell adhesion /// visual perception /// cellular process /// photoreceptor cell maintenance /// response to stimulus
430435	Adamts4	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	-2,779	0,000	skeletal development /// proteolysis /// proteolysis /// proteolysis /// integrin-mediated signaling pathway
2810601	St3gal3	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	-2,942	0,047	protein amino acid glycosylation

2100056	Th	tyrosine hydroxylase	-2,952	0,040	response to hypoxia /// synaptic transmission, dopaminergic /// dopamine biosynthetic process from tyrosine /// dopamine biosynthetic process from tyrosine /// dopamine biosynthetic process from tyrosine /// synaptic transmission /// heart development
6290300	Dguok	deoxyguanosine kinase	-2,976	0,024	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process /// nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process /// protein amino acid phosphorylation
4120497	Tcfap2c	transcription factor AP-2, gamma	-3,036	0,003	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription from RNA polymerase II promoter /// cell differentiation
2680114	Dbpht2	DNA binding protein with his-thr domain	-3,068	0,025	---
1410446	Arl5a	ADP-ribosylation factor-like 5A	-3,091	0,026	small GTPase mediated signal transduction /// small GTPase mediated signal transduction
3170731	Fgl2	fibrinogen-like protein 2	-3,106	0,049	signal transduction /// cytolysis
7000059	Mobp	myelin-associated oligodendrocytic basic protein	-3,116	0,031	---
3940114	Efcab2	EF-hand calcium binding domain 2	-3,140	0,036	---
5340400	Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	-3,386	0,002	acute-phase response
1500022	Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4	-3,734	0,044	angiogenesis /// angiogenesis /// response to hypoxia /// positive regulation of endothelial cell proliferation /// diacylglycerol biosynthetic process /// activation of phospholipase C activity /// multicellular organismal development /// central nervous
3390280	NA	NA	-3,976	0,008	
2100707	Eomes	eomesodermin homolog (Xenopus laevis)	-3,991	0,001	mesoderm formation /// blastocyst development /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// cell differentiation /// regulation of transcription
4540706	NA	NA	-4,129	0,000	
5900014	Rec8	REC8 homolog (yeast)	-4,611	0,000	chromosome segregation /// meiosis /// meiosis
4540047	NA	NA	-5,466	0,000	
4480400	Casc4	cancer susceptibility candidate 4	-5,630	0,003	---
2900050	Spock1	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1	-5,805	0,036	---
3130377	Igf1	insulin-like growth factor 1	-6,449	0,025	anti-apoptosis /// nervous system development /// organ morphogenesis /// glial cell differentiation /// positive regulation of granule cell precursor proliferation /// water homeostasis /// mammary gland development /// regulation of steroid hormone rece
6550433	Hnrpa3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	-8,487	0,047	mRNA processing /// RNA splicing
2900538	Hoxb5	homeo box B5	-40,59	0,002	transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// pattern specification process /// organ morphogenesis /// endothelial cell differentiation /// regulat
4200044	Chchd3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	-1260,9	0,050	---
6840026	Hoxa5	homeo box A5	-1551,2	0,033	skeletal development /// transcription /// regulation of transcription, DNA-dependent /// multicellular organismal development /// pattern specification process /// thyroid gland development /// multicellular organism growth /// regulation of transcriptio
2760138	4921523A10Rik	RIKEN cDNA 4921523A10 gene	-2954,5	0,039	
5900301	Hoxd4	homeo box D4	-3303,7	0,019	
940497	Stard7	START domain containing 7	-4723,6	0,028	---
6020605	Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1	-63505,6	0,002	glutathione metabolic process
3450091	NA	NA	-85617,4	0,001	

8. Literaturverzeichnis

- Aarsland, D., Andersen, K., Larsen, J.P., Lolk, A. and Kragh-Sorensen, P. (2003) Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol*, **60**, 387-392.
- Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M. and Wood, N.W. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 207-219.
- Adams, J.R., van Netten, H., Schulzer, M., Mak, E., McKenzie, J., Strongosky, A., Sossi, V., Ruth, T.J., Lee, C.S., Farrer, M., Gasser, T., Uitti, R.J., Calne, D.B., Wszolek, Z.K. and Stoessl, A.J. (2005) PET in LRRK2 mutations: comparison to sporadic Parkinson's disease and evidence for presymptomatic compensation. *Brain*, **128**, 2777-2785.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. *WILEY-VCH Verlag*, **4. Auflage**, 1-1801.
- Alzheimer, C. and Werner, S. (2002) Fibroblast growth factors and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol*, **513**, 335-351.
- Arizti, P., Fang, L., Park, I., Yin, Y., Solomon, E., Ouchi, T., Aaronson, S.A. and Lee, S.W. (2000) Tumor suppressor p53 is required to modulate BRCA1 expression. *Mol Cell Biol*, **20**, 7450-7459.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. and Sherlock, G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, **25**, 25-29.
- Aslanidis, C. and de Jong, P.J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res*, **18**, 6069-6074.
- Aurandt, J., Li, W. and Guan, K.L. (2006) Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of plexin-B1. *Biochem J*, **394**, 459-464.
- Aurandt, J., Vikis, H.G., Gutkind, J.S., Ahn, N. and Guan, K.L. (2002) The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12085-12090.
- Bagrodia, S. and Cerione, R.A. (1999) Pak to the future. *Trends Cell Biol*, **9**, 350-355.
- Barnes, M., Freudenberg, J., Thompson, S., Aronow, B. and Pavlidis, P. (2005) Experimental comparison and cross-validation of the Affymetrix and Illumina gene expression analysis platforms. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5914-5923.
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M.R. and Stiles, B.G. (2004) Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 373-402, table of contents.
- Bartholini, G., Burkard, W.P. and Pletscher, A. (1967) Increase of cerebral catecholamines caused by 3,4-dihydroxyphenylalanine after inhibition of peripheral decarboxylase. *Nature*, **215**, 852-853.
- Beal, M.F. (2003) Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **53 Suppl 3**, S39-47; discussion S47-38.
- Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R.W. and Turnbull, D.M. (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet*, **38**, 515-517.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. and Seitelberger, F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*, **20**, 415-455.

- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Bialecka, M., Hui, S., Klodowska-Duda, G., Opala, G., Tan, E.K. and Drozdziak, M. (2005) Analysis of LRRK 2 G 2019 S and I 2020 T mutations in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **390**, 1-3.
- Biggins, C.A., Boyd, J.L., Harrop, F.M., Madeley, P., Mindham, R.H., Randall, J.I. and Spokes, E.G. (1992) A controlled, longitudinal study of dementia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **55**, 566-571.
- Birkmayer, W. and Hornykiewicz, O. (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia.]. *Wien Klin Wochenschr*, **73**, 787-788.
- Birkmayer, W. and Mentasti, M. (1967) [Further experimental studies on the catecholamine metabolism in extrapyramidal diseases (Parkinson and chorea syndromes)]. *Arch Psychiatr Nervenkr*, **210**, 29-35.
- Biskup, S., Moore, D.J., Celsi, F., Higashi, S., West, A.B., Andrabi, S.A., Kurkinen, K., Yu, S.W., Savitt, J.M., Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Emson, P.C., Torp, R., Ottersen, O.P., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (2006) Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol*, **60**, 557-569.
- Biskup, S., Moore, D.J., Rea, A., Lorenz-Deperieux, B., Coombes, C.E., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and West, A.B. (2007) Dynamic and redundant regulation of LRRK2 and LRRK1 expression. *BMC Neurosci*, **8**, 102.
- Biskup, S. and West, A.B. (2008) Zeroing in on LRRK2-linked pathogenic mechanisms in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*.
- Bogaerts, V., Theuns, J. and van Broeckhoven, C. (2008) Genetic findings in Parkinson's disease and translation into treatment: a leading role for mitochondria? *Genes Brain Behav*, **7**, 129-151.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M. and Speed, T.P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, **19**, 185-193.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A. and Heutink, P. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, **299**, 256-259.
- Booden, M.A., Siderovski, D.P. and Der, C.J. (2002) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol*, **22**, 4053-4061.
- Bosgraaf, L. and Van Haastert, P.J. (2003) Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1643**, 5-10.
- Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R. and Lipton, S.A. (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med*, **10 Suppl**, S2-9.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. and Jove, R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene*, **19**, 2474-2488.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., Schultz, C., de Vos, R.A. and Jansen, E.N. (1995) Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, **46**, 15-31.
- Braak, H., Del Tredici, K., Bratzke, H., Hamm-Clement, J., Sandmann-Keil, D. and Rub, U. (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol*, **249 Suppl 3**, III/1-5.
- Bras, J., Simon-Sanchez, J., Federoff, M., Morgadinho, A., Januario, C., Ribeiro, M., Cunha, L., Oliveira, C. and Singleton, A.B. (2008) Lack of replication of association between GIGYF2 variants and Parkinson disease. *Hum Mol Genet*.

- Bretscher, A., Edwards, K. and Fehon, R.G. (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 586-599.
- Brice, A. (2005) Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain*, **128**, 2760-2762.
- Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, **25**, 169-193.
- Carney, D.S., Davies, B.A. and Horazdovsky, B.F. (2006) Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol*, **16**, 27-35.
- Cestra, G., Toomre, D., Chang, S. and De Camilli, P. (2005) The Abl/Arg substrate ArgBP2/nArgBP2 coordinates the function of multiple regulatory mechanisms converging on the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1731-1736.
- Chan, S.L., Fu, W., Zhang, P., Cheng, A., Lee, J., Kokame, K. and Mattson, M.P. (2004) Herp stabilizes neuronal Ca²⁺ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, **279**, 28733-28743.
- Chemin, J., Monteil, A., Perez-Reyes, E., Bourinet, E., Nargeot, J. and Lory, P. (2002) Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (alpha(1G), alpha(1H) and alpha(1I)) to neuronal excitability. *J Physiol*, **540**, 3-14.
- Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Wess, J., Karlsson, E. and Grando, S.A. (2004) Novel signaling pathways mediating reciprocal control of keratinocyte migration and wound epithelialization through M3 and M4 muscarinic receptors. *J Cell Biol*, **166**, 261-272.
- Chesselet, M.F. and Delfs, J.M. (1996) Basal ganglia and movement disorders: an update. *Trends Neurosci*, **19**, 417-422.
- Choi, J., Levey, A.I., Weintraub, S.T., Rees, H.D., Gearing, M., Chin, L.S. and Li, L. (2004) Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem*, **279**, 13256-13264.
- Chung, K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2001) Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med*, **7**, 1144-1150.
- Cingolani, L.A. and Goda, Y. (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 344-356.
- Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M. and Lansbury, P.T., Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*, **294**, 1346-1349.
- Cooper, J.A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*, **105**, 1473-1478.
- Covy, J.P. and Giasson, B.I. (2009) Identification of compounds that inhibit the kinase activity of leucine-rich repeat kinase 2. *Biochem Biophys Res Commun*, **378**, 473-477.
- Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1998) How do intracellular proteolytic systems change with age? *Front Biosci*, **3**, d25-43.
- Dachsel, J.C., Taylor, J.P., Mok, S.S., Ross, O.A., Hinkle, K.M., Bailey, R.M., Hines, J.H., Szutu, J., Madden, B., Petrucelli, L. and Farrer, M.J. (2007) Identification of potential protein interactors of Lrrk2. *Parkinsonism Relat Disord*, **13**, 382-385.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F. and George, J.M. (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, **273**, 9443-9449.
- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M. and Kopin, I.J. (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*, **1**, 249-254.

- de la Fuente-Fernandez, R., Schulzer, M., Mak, E., Kishore, A. and Calne, D.B. (1998) The role of the Lewy body in idiopathic Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*, **4**, 73-77.
- Dehmelt, L. and Halpain, S. (2004) Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol*, **58**, 18-33.
- Dell'Era, P., Coco, L., Ronca, R., Sennino, B. and Presta, M. (2002) Gene expression profile in fibroblast growth factor 2-transformed endothelial cells. *Oncogene*, **21**, 2433-2440.
- Deng, J., Lewis, P.A., Greggio, E., Sluch, E., Beilina, A. and Cookson, M.R. (2008) Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1499-1504.
- Dent, E.W. and Gertler, F.B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, **40**, 209-227.
- Dent, E.W., Tang, F. and Kalil, K. (2003) Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist*, **9**, 343-353.
- Di Fonzo, A., Dekker, M.C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E.H., Correia Guedes, L., Szczerbinska, A., Zhao, T., Dubbel-Hulsman, L.O., Wouters, C.H., de Graaff, E., Oyen, W.J., Simons, E.J., Breedveld, G.J., Oostra, B.A., Horstink, M.W. and Bonifati, V. (2009) FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, **72**, 240-245.
- Di Fonzo, A., Rohe, C.F., Ferreira, J., Chien, H.F., Vacca, L., Stocchi, F., Guedes, L., Fabrizio, E., Manfredi, M., Vanacore, N., Goldwurm, S., Breedveld, G., Sampaio, C., Meco, G., Barbosa, E., Oostra, B.A. and Bonifati, V. (2005) A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet*, **365**, 412-415.
- Di Fonzo, A., Tassorelli, C., De Mari, M., Chien, H.F., Ferreira, J., Rohe, C.F., Riboldazzi, G., Antonini, A., Albani, G., Mauro, A., Marconi, R., Abbruzzese, G., Lopiano, L., Fincati, E., Guidi, M., Marini, P., Stocchi, F., Onofri, M., Toni, V., Tinazzi, M., Fabbrini, G., Lamberti, P., Vanacore, N., Meco, G., Leitner, P., Uitti, R.J., Wszolek, Z.K., Gasser, T., Simons, E.J., Breedveld, G.J., Goldwurm, S., Pezzoli, G., Sampaio, C., Barbosa, E., Martignoni, E., Oostra, B.A. and Bonifati, V. (2006) Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet*, **14**, 322-331.
- Diener, H.-C. and Putzki, N. (2008) Leitlinien für die Diagnostik und Therapie in der Neurologie. *Georg Thieme Verlag*, **4. überarb. Auflage**, 1-48.
- Dooneief, G., Mirabello, E., Bell, K., Marder, K., Stern, Y. and Mayeux, R. (1992) An estimate of the incidence of depression in idiopathic Parkinson's disease. *Arch Neurol*, **49**, 305-307.
- Doty, R.L., Deems, D.A. and Stellar, S. (1988) Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology*, **38**, 1237-1244.
- Double, K.L., Gerlach, M., Schunemann, V., Trautwein, A.X., Zecca, L., Gallorini, M., Youdim, M.B., Riederer, P. and Ben-Shachar, D. (2003) Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem Pharmacol*, **66**, 489-494.
- Doubravska, L., Simova, S., Cermak, L., Valenta, T., Korinek, V. and Andera, L. (2008) Wnt-expressing rat embryonic fibroblasts suppress Apo2L/TRAIL-induced apoptosis of human leukemia cells. *Apoptosis*, **13**, 573-587.
- Dunning, M.J., Smith, M.L., Ritchie, M.E. and Tavare, S. (2007) beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics*, **23**, 2183-2184.
- Dupre, N., Riviere, J.B., Myers, R.H., Provencher, P., Pourcher, E., Emond, F. and Rouleau, G.A. (2007) LRRK2 is not a significant cause of Parkinson's disease in French-Canadians. *Can J Neurol Sci*, **34**, 333-335.

- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. and Sharp, P.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 457-467.
- Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin and Byers, S. (1999) Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol*, **9**, 1415-1418.
- Eckfeld, K., Hesson, L., Vos, M.D., Bieche, I., Latif, F. and Clark, G.J. (2004) RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res*, **64**, 8688-8693.
- Eiden, L.E., Schafer, M.K., Weihe, E. and Schutz, B. (2004) The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch*, **447**, 636-640.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. and Comella, J.X. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, **75**, 991-1003.
- Endo, Y. and Rubin, J.S. (2007) Wnt signaling and neurite outgrowth: insights and questions. *Cancer Sci*, **98**, 1311-1317.
- Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T. and Matsushima, N. (2004) Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins*, **54**, 394-403.
- Erickson, J.W., Zhang, C., Kahn, R.A., Evans, T. and Cerione, R.A. (1996) Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, **271**, 26850-26854.
- Factor, S.A. (2008) Current status of symptomatic medical therapy in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, **5**, 164-180.
- Farrer, M., Gwinn-Hardy, K., Muentner, M., DeVrieze, F.W., Crook, R., Perez-Tur, J., Lincoln, S., Maraganore, D., Adler, C., Newman, S., MacElwee, K., McCarthy, P., Miller, C., Waters, C. and Hardy, J. (1999) A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet*, **8**, 81-85.
- Fazio, C., Agnoli, A., Casacchia, M., Reitano, M., Ruggieri, S., Barba, C. and Volante, F. (1972) Treatment of Parkinson's disease with L-DOPA and an association L-DOPA plus a DOPA decarboxylase inhibitor. *Z Neurol*, **202**, 347-355.
- Fenelon, G., Mahieux, F., Huon, R. and Ziegler, M. (2000) Hallucinations in Parkinson's disease: prevalence, phenomenology and risk factors. *Brain*, **123** (Pt 4), 733-745.
- Feng, J. (2006) Microtubule: a common target for parkin and Parkinson's disease toxins. *Neuroscientist*, **12**, 469-476.
- Feng, Q., Baird, D., Peng, X., Wang, J., Ly, T., Guan, J.L. and Cerione, R.A. (2006) Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat Cell Biol*, **8**, 945-956.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. and Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, **251**, 767-773.
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S. and Obata, F. (2002) A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol*, **51**, 296-301.

- Funayama, M., Hasegawa, K., Ohta, E., Kawashima, N., Komiyama, M., Kowa, H., Tsuji, S. and Obata, F. (2005) An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol*, **57**, 918-921.
- Gallo, K.A. and Johnson, G.L. (2002) Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 663-672.
- Gandhi, P.N., Wang, X., Zhu, X., Chen, S.G. and Wilson-Delfosse, A.L. (2008) The Roc domain of leucine-rich repeat kinase 2 is sufficient for interaction with microtubules. *J Neurosci Res*.
- Gandhi, S. and Wood, N.W. (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No. 2**, 2749-2755.
- Gao, Z.H., Seeling, J.M., Hill, V., Yochum, A. and Virshup, D.M. (2002) Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1182-1187.
- Gasser, T., Muller-Myhsok, B., Wszolek, Z.K., Oehlmann, R., Calne, D.B., Bonifati, V., Bereznoi, B., Fabrizio, E., Vieregge, P. and Horstmann, R.D. (1998) A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet*, **18**, 262-265.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y. and Zhang, J. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, **5**, R80.
- Gerlach, M., Double, K., Riederer, P., Hirsch, E., Jellinger, K., Jenner, P., Trautwein, A. and Youdim, M.B. (1997) Iron in the Parkinsonian substantia nigra. *Mov Disord*, **12**, 258-260.
- Gerlach, M., Reichmann, H. and Riederer, P. (2007) Die Parkinson-Krankheit. *SpringerWienNewYork*, **vierte Auflage**, 1-453.
- Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H. and Youdim, M.B. (1991) MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol*, **208**, 273-286.
- Gerwins, P., Blank, J.L. and Johnson, G.L. (1997) Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J Biol Chem*, **272**, 8288-8295.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, **290**, 985-989.
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem*, **276**, 2380-2386.
- Gibb, W.R. and Lees, A.J. (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **51**, 745-752.
- Gibb, W.R. and Lees, A.J. (1989) The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **15**, 27-44.
- Gilks, W.P., Abou-Sleiman, P.M., Gandhi, S., Jain, S., Singleton, A., Lees, A.J., Shaw, K., Bhatia, K.P., Bonifati, V., Quinn, N.P., Lynch, J., Healy, D.G., Holton, J.L., Revez, T. and Wood, N.W. (2005) A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet*, **365**, 415-416.
- Gingras, A.C., Raught, B., Gygi, S.P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S.K., Polakiewicz, R.D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R. and Sonenberg, N. (2001) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev*, **15**, 2852-2864.

- Gingras, A.C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, **68**, 913-963.
- Gloeckner, C.J., Kinkl, N., Schumacher, A., Braun, R.J., O'Neill, E., Meitinger, T., Kolch, W., Prokisch, H. and Ueffing, M. (2006) The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet*, **15**, 223-232.
- Gloeckner, C.J., Schumacher, A., Boldt, K. and Ueffing, M. (2009) The Parkinson disease-associated protein kinase LRRK2 exhibits MAPKKK activity and phosphorylates MKK3/6 and MKK4/7, in vitro. *J Neurochem*.
- Goedert, M. (1999) Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1101-1118.
- Golbe, L.I. and Mouradian, M.M. (2004) Alpha-synuclein in Parkinson's disease: light from two new angles. *Ann Neurol*, **55**, 153-156.
- Gordon-Weeks, P.R. (2004) Microtubules and growth cone function. *J Neurobiol*, **58**, 70-83.
- Gotthardt, K., Weyand, M., Kortholt, A., Van Haastert, P.J. and Wittinghofer, A. (2008) Structure of the Roc-COR domain tandem of *C. tepidum*, a prokaryotic homologue of the human LRRK2 Parkinson kinase. *Embo J*, **27**, 2239-2249.
- Govek, E.E., Newey, S.E. and Van Aelst, L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*, **19**, 1-49.
- Greggio, E., Jain, S., Kingsbury, A., Bandopadhyay, R., Lewis, P., Kaganovich, A., van der Brug, M.P., Beilina, A., Blackinton, J., Thomas, K.J., Ahmad, R., Miller, D.W., Kesavapany, S., Singleton, A., Lees, A., Harvey, R.J., Harvey, K. and Cookson, M.R. (2006) Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis*, **23**, 329-341.
- Greggio, E., Zambrano, I., Kaganovich, A., Beilina, A., Taymans, J.M., Daniels, V., Lewis, P., Jain, S., Ding, J., Syed, A., Thomas, K.J., Baekelandt, V. and Cookson, M.R. (2008) The Parkinson's disease associated Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intra-molecular autophosphorylation. *J Biol Chem*.
- Gregory, A., Westaway, S.K., Holm, I.E., Kotzbauer, P.T., Hogarth, P., Sonek, S., Coryell, J.C., Nguyen, T.M., Nardocci, N., Zorzi, G., Rodriguez, D., Desguerre, I., Bertini, E., Simonati, A., Levinson, B., Dias, C., Barbot, C., Carrilho, I., Santos, M., Malik, I., Gitschier, J. and Hayflick, S.J. (2008) Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2). *Neurology*, **71**, 1402-1409.
- Grothe, C. and Timmer, M. (2007) The physiological and pharmacological role of basic fibroblast growth factor in the dopaminergic nigrostriatal system. *Brain Res Rev*, **54**, 80-91.
- Groves, M.R. and Barford, D. (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 383-389.
- Grunwald, I.C., Korte, M., Adelman, G., Plueck, A., Kullander, K., Adams, R.H., Frotscher, M., Bonhoeffer, T. and Klein, R. (2004) Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci*, **7**, 33-40.
- Gunning, P., O'Neill, G. and Hardeman, E. (2008) Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev*, **88**, 1-35.
- Guo, L., Gandhi, P.N., Wang, W., Petersen, R.B., Wilson-Delfosse, A.L. and Chen, S.G. (2007) The Parkinson's disease-associated protein, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), is an authentic GTPase that stimulates kinase activity. *Exp Cell Res*, **313**, 3658-3670.
- Guttmann-Raviv, N., Shraga-Heled, N., Varshavsky, A., Guimaraes-Sternberg, C., Kessler, O. and Neufeld, G. (2007) Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel

- endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J Biol Chem*, **282**, 26294-26305.
- Haass, C. and Kahle, P.J. (2001) Neuroscience. Parkin and its substrates. *Science*, **293**, 224-225.
- Habig, K., Walter, M., Poths, S., Riess, O. and Bonin, M. (2008) RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. *Neurogenetics*, **9**, 83-94.
- Habig, K., Walter, M., Stappert, H., Riess, O. and Bonin, M. (2009) Microarray expression analysis of human dopaminergic neuroblastoma cells after RNA interference of SNCA--a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res*, **1256**, 19-33.
- Had, L., Faivre-Sarrailh, C., Legrand, C., Mery, J., Brugidou, J. and Rabie, A. (1994) Tropomyosin isoforms in rat neurons: the different developmental profiles and distributions of TM-4 and TMBr-3 are consistent with different functions. *J Cell Sci*, **107 (Pt 10)**, 2961-2973.
- Hanrott, K., Gudmunsen, L., O'Neill, M.J. and Wonnacott, S. (2006) 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem*, **281**, 5373-5382.
- Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P.P., Muriel, M.P., Vyas, S., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Turmel, H., Srinivasan, A., Ruberg, M., Evan, G.I., Agid, Y. and Hirsch, E.C. (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2875-2880.
- Hartmann, A., Michel, P.P., Troadec, J.D., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B.A., Ruberg, M., Agid, Y. and Hirsch, E.C. (2001) Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J Neurochem*, **76**, 1785-1793.
- Hartshorne, D.J., Ito, M. and Erdodi, F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil*, **19**, 325-341.
- Hasegawa, T., Matsuzaki, M., Takeda, A., Kikuchi, A., Akita, H., Perry, G., Smith, M.A. and Itoyama, Y. (2004) Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res*, **1013**, 51-59.
- He, Y., Francis, F., Myers, K.A., Yu, W., Black, M.M. and Baas, P.W. (2005) Role of cytoplasmic dynein in the axonal transport of microtubules and neurofilaments. *J Cell Biol*, **168**, 697-703.
- Healy, D.G., Falchi, M., O'Sullivan, S.S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C.P., Goldwurm, S., Ferreira, J.J., Tolosa, E., Kay, D.M., Klein, C., Williams, D.R., Marras, C., Lang, A.E., Wszolek, Z.K., Berciano, J., Schapira, A.H., Lynch, T., Bhatia, K.P., Gasser, T., Lees, A.J. and Wood, N.W. (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, **7**, 583-590.
- Henchcliffe, C. and Beal, M.F. (2008) Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol*, **4**, 600-609.
- Hicks, A.A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H.S., Sainz, J., Frigge, M.L., Kong, A., Gulcher, J.R., Stefansson, K. and Sveinbjornsdottir, S. (2002) A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **52**, 549-555.
- Higashi, S., Biskup, S., West, A.B., Trinkaus, D., Dawson, V.L., Faull, R.L., Waldvogel, H.J., Arai, H., Dawson, T.M., Moore, D.J. and Emson, P.C. (2007) Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain. *Brain Res*, **1155**, 208-219.

- Hirokawa, N. and Noda, Y. (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev*, **88**, 1089-1118.
- Hirsch, E., Graybiel, A.M. and Agid, Y.A. (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, **334**, 345-348.
- Hitz, C., Steuber-Buchberger, P., Delic, S., Wurst, W. and Kuhn, R. (2009) Generation of shRNA transgenic mice. *Methods Mol Biol*, **530**, 101-129.
- Ho, C.C., Rideout, H.J., Ribe, E., Troy, C.M. and Dauer, W.T. (2009) The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J Neurosci*, **29**, 1011-1016.
- Hocking, J.C., Hehr, C.L., Chang, R.Y., Johnston, J. and McFarlane, S. (2008) TGFbeta ligands promote the initiation of retinal ganglion cell dendrites in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci*, **37**, 247-260.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E. and Prydz, H. (2002) Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1757-1766.
- Holmfeldt, P., Brattsand, G. and Gullberg, M. (2003) Interphase and monoastral-mitotic phenotypes of overexpressed MAP4 are modulated by free tubulin concentrations. *J Cell Sci*, **116**, 3701-3711.
- Huang, Y., Cheung, L., Rowe, D. and Halliday, G. (2004) Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, **46**, 44-70.
- Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D. and Cloutier, J.F. (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci*, **26**, 509-563.
- Iaccarino, C., Crosio, C., Vitale, C., Sanna, G., Carri, M.T. and Barone, P. (2007) Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum Mol Genet*, **16**, 1319-1326.
- Iida, J., Itoh, T.J., Hotani, H., Nishiyama, K., Murofushi, H., Bulinski, J.C. and Hisanaga, S. (2002) The projection domain of MAP4 suppresses the microtubule-bundling activity of the microtubule-binding domain. *J Mol Biol*, **320**, 97-106.
- Imai, Y., Gehrke, S., Wang, H.Q., Takahashi, R., Hasegawa, K., Oota, E. and Lu, B. (2008) Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in Drosophila. *Embo J*, **27**, 2432-2443.
- Imai, Y. and Takahashi, R. (2004) How do Parkin mutations result in neurodegeneration? *Curr Opin Neurobiol*, **14**, 384-389.
- Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B. and Speed, T.P. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, **31**, e15.
- Ishikawa, R. and Kohama, K. (2007) Actin-binding proteins in nerve cell growth cones. *J Pharmacol Sci*, **105**, 6-11.
- Ito, G., Okai, T., Fujino, G., Takeda, K., Ichijo, H., Katada, T. and Iwatsubo, T. (2007) GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry*, **46**, 1380-1388.
- Jaleel, M., Nichols, R.J., Deak, M., Campbell, D.G., Gillardon, F., Knebel, A. and Alessi, D.R. (2007) LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochem J*, **405**, 307-317.
- Jhanwar-Uniyal, M. (2003) BRCA1 in cancer, cell cycle and genomic stability. *Front Biosci*, **8**, s1107-1117.
- Juliano, R.L. (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **42**, 283-323.

- Kahle, P.J., Haass, C., Kretschmar, H.A. and Neumann, M. (2002) Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J Neurochem*, **82**, 449-457.
- Kalinderi, K., Fidani, L., Bostantjopoulou, S., Katsarou, Z. and Kotsis, A. (2007) The G2019S LRRK2 mutation is uncommon amongst Greek patients with sporadic Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, **14**, 1088-1090.
- Kaluz, S. and Flint, A.P. (1994) Ligation-independent cloning of PCR products with primers containing nonbase residues. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4845.
- Kazerounian, S. and Aho, S. (2003) Characterization of periphilin, a widespread, highly insoluble nuclear protein and potential constituent of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem*, **278**, 36707-36717.
- Khan, N.L., Jain, S., Lynch, J.M., Pavese, N., Abou-Sleiman, P., Holton, J.L., Healy, D.G., Gilks, W.P., Sweeney, M.G., Ganguly, M., Gibbons, V., Gandhi, S., Vaughan, J., Eunson, L.H., Katzenschlager, R., Gayton, J., Lennox, G., Revesz, T., Nicholl, D., Bhatia, K.P., Quinn, N., Brooks, D., Lees, A.J., Davis, M.B., Piccini, P., Singleton, A.B. and Wood, N.W. (2005) Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain*, **128**, 2786-2796.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. and Tear, G. (1998) Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell*, **92**, 205-215.
- Kimura, T., Takeda, S., Sagiya, Y., Gotoh, M., Nakamura, Y. and Arakawa, H. (2003) Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat Genet*, **34**, 440-445.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, **392**, 605-608.
- Klockgether, T. (2004) Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell Tissue Res*, **318**, 115-120.
- Knippschild, U., Wolff, S., Giamas, G., Brockschmidt, C., Wittau, M., Wurl, P.U., Eismann, T. and Stoter, M. (2005) The role of the casein kinase 1 (CK1) family in different signaling pathways linked to cancer development. *Onkologie*, **28**, 508-514.
- Kobe, B. and Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 725-732.
- Koh, C.G. (2006) Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development. *Neurosignals*, **15**, 228-237.
- Kostyukova, A.S. (2008) Tropomodulins and tropomodulin/tropomyosin interactions. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 563-569.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L. and Riess, O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, **18**, 106-108.
- Kutsche, K., Yntema, H., Brandt, A., Jantke, I., Nothwang, H.G., Orth, U., Boavida, M.G., David, D., Chelly, J., Fryns, J.P., Moraine, C., Ropers, H.H., Hamel, B.C., van Bokhoven, H. and Gal, A. (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet*, **26**, 247-250.
- Lai, T.H., Fong, Y.C., Fu, W.M., Yang, R.S. and Tang, C.H. (2008) Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins. *Prostate*, **68**, 1341-1353.
- Lang, A.E. and Lozano, A.M. (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, **339**, 1044-1053.

- Langelier, E., Suetterlin, R., Hoemann, C.D., Aebi, U. and Buschmann, M.D. (2000) The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem*, **48**, 1307-1320.
- Larsson, C. (2006) Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal*, **18**, 276-284.
- Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., Tsiaras, W.G., Pezzoli, G., Brice, A. and Smith, R.J. (2008) Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, **82**, 822-833.
- Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, **8**, 397-403.
- Lee, S.B., Kim, W., Lee, S. and Chung, J. (2007) Loss of LRRK2/PARK8 induces degeneration of dopaminergic neurons in Drosophila. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 534-539.
- Lei, K., Nimmual, A., Zong, W.X., Kennedy, N.J., Flavell, R.A., Thompson, C.B., Bar-Sagi, D. and Davis, R.J. (2002) The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol*, **22**, 4929-4942.
- Lenk, G.M., Tromp, G., Weinsheimer, S., Gatalica, Z., Berguer, R. and Kuivaniemi, H. (2007) Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Genomics*, **8**, 237.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D. and Polymeropoulos, M.H. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, **395**, 451-452.
- Lesage, S., Ibanez, P., Lohmann, E., Pollak, P., Tison, F., Tazir, M., Leutenegger, A.L., Guimaraes, J., Bonnet, A.M., Agid, Y., Durr, A. and Brice, A. (2005) G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **58**, 784-787.
- Lewis, P.A., Greggio, E., Beilina, A., Jain, S., Baker, A. and Cookson, M.R. (2007) The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 668-671.
- Li, B. and Zhang, Y.L. (2002) Identification of up-regulated genes in human uterine leiomyoma by suppression subtractive hybridization. *Cell Res*, **12**, 215-221.
- Li, D. and Roberts, R. (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 2085-2097.
- Li, X., Tan, Y.C., Poulou, S., Olanow, C.W., Huang, X.Y. and Yue, Z. (2007) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. *J Neurochem*, **103**, 238-247.
- Li, Z., Aizenman, C.D. and Cline, H.T. (2002) Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo. *Neuron*, **33**, 741-750.
- Lichtman, J.W. and Conchello, J.A. (2005) Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, **2**, 910-919.
- Lim, M.K., Kawamura, T., Ohsawa, Y., Ohtsubo, M., Asakawa, S., Takayanagi, A. and Shimizu, N. (2007) Parkin interacts with LIM Kinase 1 and reduces its cofilin-phosphorylation activity via ubiquitination. *Exp Cell Res*, **313**, 2858-2874.
- Limousin, P., Krack, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Ardouin, C., Hoffmann, D. and Benabid, A.L. (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med*, **339**, 1105-1111.
- Lindholm, D., Wootz, H. and Korhonen, L. (2006) ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*, **13**, 385-392.

- Liou, A.K., Leak, R.K., Li, L. and Zigmond, M.J. (2008) Wild-type LRRK2 but not its mutant attenuates stress-induced cell death via ERK pathway. *Neurobiol Dis*, **32**, 116-124.
- Liu, J.F., Chevet, E., Kebache, S., Lemaitre, G., Barritault, D., Larose, L. and Crepin, M. (1999) Functional Rac-1 and Nck signaling networks are required for FGF-2-induced DNA synthesis in MCF-7 cells. *Oncogene*, **18**, 6425-6433.
- Liu, Z., Wang, X., Yu, Y., Li, X., Wang, T., Jiang, H., Ren, Q., Jiao, Y., Sawa, A., Moran, T., Ross, C.A., Montell, C. and Smith, W.W. (2008) A Drosophila model for LRRK2-linked parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2693-2698.
- Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J. and Wilkinson, K.D. (1990) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J Pathol*, **161**, 153-160.
- Lucking, C.B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Deneffe, P., Wood, N.W., Agid, Y. and Brice, A. (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*, **342**, 1560-1567.
- Luth, H.J., Holzer, M., Gertz, H.J. and Arendt, T. (2000) Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly co-localized with p21ras and p16INK4a. *Brain Res*, **852**, 45-55.
- Luu-The, V., Paquet, N., Calvo, E. and Cumps, J. (2005) Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques*, **38**, 287-293.
- Luzon-Toro, B., Rubio de la Torre, E., Delgado, A., Perez-Tur, J. and Hilfiker, S. (2007) Mechanistic insight into the dominant mode of the Parkinson's disease-associated G2019S LRRK2 mutation. *Hum Mol Genet*, **16**, 2031-2039.
- MacLeod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K. and Abeliovich, A. (2006) The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*, **52**, 587-593.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell*, **1**, 183-192.
- Marin, I. (2006) The Parkinson disease gene LRRK2: evolutionary and structural insights. *Mol Biol Evol*, **23**, 2423-2433.
- Marin, I. (2008) Ancient origin of the Parkinson disease gene LRRK2. *J Mol Evol*, **67**, 41-50.
- Mata, I.F., Kachergus, J.M., Taylor, J.P., Lincoln, S., Aasly, J., Lynch, T., Hulihan, M.M., Cobb, S.A., Wu, R.M., Lu, C.S., Lahoz, C., Wszolek, Z.K. and Farrer, M.J. (2005) Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics*, **6**, 171-177.
- Mata, I.F., Wedemeyer, W.J., Farrer, M.J., Taylor, J.P. and Gallo, K.A. (2006) LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci*, **29**, 286-293.
- Matheny, S.A., Chen, C., Kortum, R.L., Razidlo, G.L., Lewis, R.E. and White, M.A. (2004) Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature*, **427**, 256-260.
- McManus, M.T. and Sharp, P.A. (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, **3**, 737-747.
- McNaught, K.S. and Jenner, P. (2001) Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **297**, 191-194.
- Mezey, E., Dehejia, A., Harta, G., Papp, M.I., Polymeropoulos, M.H. and Brownstein, M.J. (1998) Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? *Nat Med*, **4**, 755-757.

- Mielke, K. and Herdegen, T. (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol*, **61**, 45-60.
- Miklossy, J., Arai, T., Guo, J.P., Klegeris, A., Yu, S., McGeer, E.G. and McGeer, P.L. (2006) LRRK2 expression in normal and pathologic human brain and in human cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol*, **65**, 953-963.
- Mishizen-Eberz, A.J., Norris, E.H., Giasson, B.I., Hodara, R., Ischiropoulos, H., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. and Lynch, D.R. (2005) Cleavage of alpha-synuclein by calpain: potential role in degradation of fibrillized and nitrated species of alpha-synuclein. *Biochemistry*, **44**, 7818-7829.
- Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 57-87.
- Mouatt-Prigent, A., Agid, Y. and Hirsch, E.C. (1994) Does the calcium binding protein calretinin protect dopaminergic neurons against degeneration in Parkinson's disease? *Brain Res*, **668**, 62-70.
- Mouatt-Prigent, A., Karlsson, J.O., Agid, Y. and Hirsch, E.C. (1996) Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience*, **73**, 979-987.
- Muller, A., Reichmann, H., Livermore, A. and Hummel, T. (2002) Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients. *J Neural Transm*, **109**, 805-811.
- Muller, T., Kuhn, W., Buttner, T. and Przuntek, H. (1997) Distorted colour discrimination in Parkinson's disease is related to severity of the disease. *Acta Neurol Scand*, **96**, 293-296.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, **24**, 17-27.
- Mutch, W.J., Strudwick, A., Roy, S.K. and Downie, A.W. (1986) Parkinson's disease: disability, review, and management. *Br Med J (Clin Res Ed)*, **293**, 675-677.
- Nagase, T., Seki, N., Tanaka, A., Ishikawa, K. and Nomura, N. (1995) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IV. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0121-KIAA0160) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res*, **2**, 167-174, 199-210.
- Nakagawa, T. and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, **150**, 887-894.
- Nakamura, N., Miyake, Y., Matsushita, M., Tanaka, S., Inoue, H. and Kanazawa, H. (2002) KIF1Bbeta2, capable of interacting with CHP, is localized to synaptic vesicles. *J Biochem*, **132**, 483-491.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Nguyen, D.T., Kebache, S., Fazel, A., Wong, H.N., Jenna, S., Emadali, A., Lee, E.H., Bergeron, J.J., Kaufman, R.J., Larose, L. and Chevet, E. (2004) Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, **15**, 4248-4260.
- Nichols, W.C., Pankratz, N., Hernandez, D., Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Halter, C.A., Michaels, V.E., Reed, T., Rudolph, A., Shults, C.W., Singleton, A. and Foroud, T. (2005) Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet*, **365**, 410-412.

- Nishida, M., Maruyama, Y., Tanaka, R., Kontani, K., Nagao, T. and Kurose, H. (2000) G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species. *Nature*, **408**, 492-495.
- Nutt, J.G. and Fellman, J.H. (1984) Pharmacokinetics of levodopa. *Clin Neuropharmacol*, **7**, 35-49.
- Nuytemans, K., Rademakers, R., Theuns, J., Pals, P., Engelborghs, S., Pickut, B., de Pooter, T., Peeters, K., Mattheijssens, M., Van den Broeck, M., Cras, P., De Deyn, P.P. and van Broeckhoven, C. (2008) Founder mutation p.R1441C in the leucine-rich repeat kinase 2 gene in Belgian Parkinson's disease patients. *Eur J Hum Genet*, **16**, 471-479.
- Obeso, J.A., Olanow, C.W. and Nutt, J.G. (2000) Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, **23**, S2-7.
- Olanow, C.W. (2004) The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu Rev Med*, **55**, 41-60.
- Olanow, C.W. and Tatton, W.G. (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 123-144.
- Olenik, C., Barth, H., Just, I., Aktories, K. and Meyer, D.K. (1997) Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1, and Cdc42 in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **52**, 263-269.
- Osmani, N., Vitale, N., Borg, J.P. and Etienne-Manneville, S. (2006) Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol*, **16**, 2395-2405.
- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., Johnson, J., Martinez, J.R., Nicholl, D., Carrera, I.M., Pena, A.S., de Silva, R., Lees, A., Marti-Masso, J.F., Perez-Tur, J., Wood, N.W. and Singleton, A.B. (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, **44**, 595-600.
- Paisan-Ruiz, C., Lang, A.E., Kawarai, T., Sato, C., Salehi-Rad, S., Fisman, G.K., Al-Khairallah, T., St George-Hyslop, P., Singleton, A. and Rogaeva, E. (2005) LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology*, **65**, 696-700.
- Pankratz, N., Nichols, W.C., Uniacke, S.K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P.M. and Foroud, T. (2002) Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet*, **71**, 124-135.
- Parkinson, J. (1817) An essay on the shaking palsy. *London: Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones*.
- Patrussi, L. and Baldari, C.T. (2008) Intracellular mediators of CXCR4-dependent signaling in T cells. *Immunol Lett*, **115**, 75-82.
- Perez-Reyes, E. (2006) Molecular characterization of T-type calcium channels. *Cell Calcium*, **40**, 89-96.
- Perry, G., Zhu, X., Babar, A.K., Siedlak, S.L., Yang, Q., Ito, G., Iwatsubo, T., Smith, M.A. and Chen, S.G. (2008) Leucine-rich repeat kinase 2 colocalizes with alpha-synuclein in Parkinson's disease, but not tau-containing deposits in tauopathies. *Neurodegener Dis*, **5**, 222-224.
- Pestonjamasp, K., Amieva, M.R., Strassel, C.P., Nauseef, W.M., Furthmayr, H. and Luna, E.J. (1995) Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Mol Biol Cell*, **6**, 247-259.
- Petrides, P.E., Bock, S., Bovens, J., Hofmann, R. and Jakse, G. (1990) Modulation of pro-epidermal growth factor, pro-transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor gene expression in human renal carcinomas. *Cancer Res*, **50**, 3934-3939.

- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Pfaffl, M.W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Anätze zur exakten mRNA Quantifizierung *BIOspektrum*, **1**.
- Piette, J., Neel, H. and Marechal, V. (1997) Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, **15**, 1001-1010.
- Plowey, E.D., Cherra, S.J., 3rd, Liu, Y.J. and Chu, C.T. (2008) Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem*.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., Wood, N.W., Martins, L.M. and Downward, J. (2007) The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol*, **9**, 1243-1252.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 545-576.
- Polster, B.M. and Fiskum, G. (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem*, **90**, 1281-1289.
- Polymeropoulos, M.H. (2000) Genetics of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **920**, 28-32.
- Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., Lazzarini, A.M., Nussbaum, R.L. and Duvoisin, R.C. (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, **274**, 1197-1199.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. and Nussbaum, R.L. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, **276**, 2045-2047.
- Premont, R.T., Perry, S.J., Schmalzigaug, R., Roseman, J.T., Xing, Y. and Claing, A. (2004) The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal*, **16**, 1001-1011.
- Price, N.P. and Tsvetanova, B. (2007) Biosynthesis of the tunicamycins: a review. *J Antibiot (Tokyo)*, **60**, 485-491.
- Pridgeon, J.W., Olzmann, J.A., Chin, L.S. and Li, L. (2007) PINK1 Protects against Oxidative Stress by Phosphorylating Mitochondrial Chaperone TRAP1. *PLoS Biol*, **5**, e172.
- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A.M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C.G., Behrens, M.I. and Kubisch, C. (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, **38**, 1184-1191.
- Rattan, S.I. and Derventzi, A. (1991) Altered cellular responsiveness during ageing. *Bioessays*, **13**, 601-606.
- Reid, T., Bathoorn, A., Ahmadian, M.R. and Collard, J.G. (1999) Identification and characterization of hPEM-2, a guanine nucleotide exchange factor specific for Cdc42. *J Biol Chem*, **274**, 33587-33593.
- Rhodes, S.L. and Ritz, B. (2008) Genetics of iron regulation and the possible role of iron in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **32**, 183-195.
- Ridley, A.J. (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*, **16**, 522-529.

- Riederer, P. and Wuketich, S. (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm*, **38**, 277-301.
- Roberts, P.J. and Der, C.J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **26**, 3291-3310.
- Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, **6**, 3343-3353.
- Rosenberger, G., Jantke, I., Gal, A. and Kutsche, K. (2003) Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet*, **12**, 155-167.
- Ross, C.A. and Poirier, M.A. (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 891-898.
- Ross, O.A., Toft, M., Whittle, A.J., Johnson, J.L., Papapetropoulos, S., Mash, D.C., Litvan, I., Gordon, M.F., Wszolek, Z.K., Farrer, M.J. and Dickson, D.W. (2006) Lrrk2 and Lewy body disease. *Ann Neurol*, **59**, 388-393.
- Rul, W., Zugasti, O., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T.F., Lenormand, P., Fort, P. and Hibner, U. (2002) Activation of ERK, controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, is required for anoikis. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 145-148.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sakaguchi-Nakashima, A., Meir, J.Y., Jin, Y., Matsumoto, K. and Hisamoto, N. (2007) LRK-1, a *C. elegans* PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr Biol*, **17**, 592-598.
- Samann, J., Hegemann, J., Gromoff, E.V., Eimer, S., Baumeister, R. and Schmidt, E. (2009) *Caenorhabditis elegans* LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. *J Biol Chem*.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, **54**, 823-827.
- Schlatter, M.C., Buhusi, M., Wright, A.G. and Maness, P.F. (2008) CHL1 promotes Sema3A-induced growth cone collapse and neurite elaboration through a motif required for recruitment of ERM proteins to the plasma membrane. *J Neurochem*, **104**, 731-744.
- Schlessinger, K., Hall, A. and Tolwinski, N. (2009) Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev*, **23**, 265-277.
- Schmid, M. and Carson, D. (2001) Cell Cycle Regulation and Hematological Disorders. *Williams Hematology*, **6th Edition**, 131-140.
- Schultze, W., Eulenburg, V., Lessmann, V., Herrmann, L., Dittmar, T., Gundelfinger, E.D., Heumann, R. and Erdmann, K.S. (2001) Semaphorin4F interacts with the synapse-associated protein SAP90/PSD-95. *J Neurochem*, **78**, 482-489.
- Scott, G., Leopardi, S., Printup, S. and Madden, B.C. (2002) Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J Cell Sci*, **115**, 1441-1451.
- Sharp, P., Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. (2001) Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley and Sons, Inc.*, **Vol.1-4**.
- She, Q.B., Chen, N., Bode, A.M., Flavell, R.A. and Dong, Z. (2002) Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, **62**, 1343-1348.
- She, Q.B., Chen, N. and Dong, Z. (2000) ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem*, **275**, 20444-20449.

- Sherman, M.Y. and Goldberg, A.L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, **29**, 15-32.
- Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S. and Selkoe, D.J. (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science*, **293**, 263-269.
- Shin, E.Y., Lee, C.S., Cho, T.G., Kim, Y.G., Song, S., Juhn, Y.S., Park, S.C., Manser, E. and Kim, E.G. (2006) betaPak-interacting exchange factor-mediated Rac1 activation requires smgGDS guanine nucleotide exchange factor in basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem*, **281**, 35954-35964.
- Shin, E.Y., Woo, K.N., Lee, C.S., Koo, S.H., Kim, Y.G., Kim, W.J., Bae, C.D., Chang, S.I. and Kim, E.G. (2004) Basic fibroblast growth factor stimulates activation of Rac1 through a p85 betaPIX phosphorylation-dependent pathway. *J Biol Chem*, **279**, 1994-2004.
- Shin, N., Jeong, H., Kwon, J., Heo, H.Y., Kwon, J.J., Yun, H.J., Kim, C.H., Han, B.S., Tong, Y., Shen, J., Hatano, T., Hattori, N., Kim, K.S., Chang, S. and Seol, W. (2008) LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. *Exp Cell Res*, **314**, 2055-2065.
- Simon-Sanchez, J. and Singleton, A.B. (2008) Sequencing analysis of OMI/HTRA2 shows previously reported pathogenic mutations in neurologically normal controls. *Hum Mol Genet*, **17**, 1988-1993.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blacato, J., Hardy, J. and Gwinn-Hardy, K. (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, **302**, 841.
- Smith, R., Brundin, P. and Li, J.Y. (2005a) Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1901-1912.
- Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (2006) Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci*, **9**, 1231-1233.
- Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Moore, D.J., Liang, Y., West, A.B., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (2005b) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18676-18681.
- Smyth, G., Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., Irizarry, R. and Huber, W. (2005) Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York, 397-420.
- Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, **3**, Article3.
- Sofic, E., Lange, K.W., Jellinger, K. and Riederer, P. (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, **142**, 128-130.
- Sommer, U., Hummel, T., Cormann, K., Mueller, A., Frasnelli, J., Kropp, J. and Reichmann, H. (2004) Detection of presymptomatic Parkinson's disease: combining smell tests, transcranial sonography, and SPECT. *Mov Disord*, **19**, 1196-1202.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. and Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840.
- Standen, C.L., Perkinson, M.S., Byers, H.L., Kesavapany, S., Lau, K.F., Ward, M., McLoughlin, D. and Miller, C.C. (2003) The neuronal adaptor protein Fe65 is phosphorylated by mitogen-activated protein kinase (ERK1/2). *Mol Cell Neurosci*, **24**, 851-857.

- Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F.H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koepfen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksoz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., Birchmeier, W., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, **122**, 957-968.
- Stenmark, H. and Olkkonen, V.M. (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3007.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G. and Vrana, K.E. (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res*, **55**, 659-665.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, **69**, 217-245.
- Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J.B. and Kruger, R. (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, **14**, 2099-2111.
- Styers, M.L., Kowalczyk, A.P. and Faundez, V. (2006) Architecture of the vimentin cytoskeleton is modified by perturbation of the GTPase ARF1. *J Cell Sci*, **119**, 3643-3654.
- Sussman, M.A., Baque, S., Uhm, C.S., Daniels, M.P., Price, R.L., Simpson, D., Terracio, L. and Kedes, L. (1998) Altered expression of tropomodulin in cardiomyocytes disrupts the sarcomeric structure of myofibrils. *Circ Res*, **82**, 94-105.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. and Takahashi, R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, **8**, 613-621.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **135**, 397-402.
- Tan, E.K., Zhao, Y., Skipper, L., Tan, M.G., Di Fonzo, A., Sun, L., Fook-Chong, S., Tang, S., Chua, E., Yuen, Y., Tan, L., Pavanni, R., Wong, M.C., Kolatkar, P., Lu, C.S., Bonifati, V. and Liu, J.J. (2007) The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence. *Hum Genet*, **120**, 857-863.
- Tang, C.H., Yang, R.S., Huang, T.H., Liu, S.H. and Fu, W.M. (2004) Enhancement of fibronectin fibrillogenesis and bone formation by basic fibroblast growth factor via protein kinase C-dependent pathway in rat osteoblasts. *Mol Pharmacol*, **66**, 440-449.
- Tang, S., Morgan, K.G., Parker, C. and Ware, J.A. (1997) Requirement for protein kinase C theta for cell cycle progression and formation of actin stress fibers and filopodia in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **272**, 28704-28711.
- Tanida, I., Sou, Y.S., Ezaki, J., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. and Kominami, E. (2004) HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem*, **279**, 36268-36276.
- Tatton, N.A. (2000) Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, **166**, 29-43.
- Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*, **53 Suppl 3**, S61-70; discussion S70-62.
- Tibbles, L.A. and Woodgett, J.R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 1230-1254.

- Tomasson, M.H., Williams, I.R., Hasserjian, R., Udomsakdi, C., McGrath, S.M., Schwaller, J., Druker, B. and Gilliland, D.G. (1999) TEL/PDGFBetaR induces hematologic malignancies in mice that respond to a specific tyrosine kinase inhibitor. *Blood*, **93**, 1707-1714.
- Treiman, M., Caspersen, C. and Christensen, S.B. (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 131-135.
- Tsukita, S. (1996) [ERM (ezrin/radixin/moesin) as crosslinkers between actin filaments and plasma membranes]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **41**, 1899-1905.
- Tu, S. and Cerione, R.A. (2001) Cdc42 is a substrate for caspases and influences Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 19656-19663.
- Turner, M. and Billadeau, D.D. (2002) VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, **2**, 476-486.
- Uemura, K., Kuzuya, A. and Shimohama, S. (2004) Protein trafficking and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, **1**, 1-10.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W.P., Latchman, D.S., Harvey, R.J., Dallapiccola, B., Auburger, G. and Wood, N.W. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, **304**, 1158-1160.
- van Egmond, W.N., Kortholt, A., Plak, K., Bosgraaf, L., Bosgraaf, S., Keizer-Gunnink, I. and van Haastert, P.J. (2008) Intramolecular activation mechanism of the dictyostelium LRRK2-homolog Roco protein GbpC. *J Biol Chem*.
- Vandesompele, J., Kubista, M. and Pfaffl, M.W. (2009) Reference Gene Validation Software for Improved Normalisation. *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, **Chapter 4**, 47-64.
- Vanhauwe, J.F., Thomas, T.O., Minshall, R.D., Tiruppathi, C., Li, A., Gilchrist, A., Yoon, E.J., Malik, A.B. and Hamm, H.E. (2002) Thrombin receptors activate G(o) proteins in endothelial cells to regulate intracellular calcium and cell shape changes. *J Biol Chem*, **277**, 34143-34149.
- Vaucheret, H. (2005) RNA polymerase IV and transcriptional silencing. *Nat Genet*, **37**, 659-660.
- Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J. and Bond, G.L. (2008) The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 979-987.
- Vosler, P.S., Brennan, C.S. and Chen, J. (2008) Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, **38**, 78-100.
- Wang, D., Tang, B., Zhao, G., Pan, Q., Xia, K., Bodmer, R. and Zhang, Z. (2008a) Dispensable role of Drosophila ortholog of LRRK2 kinase activity in survival of dopaminergic neurons. *Mol Neurodegener*, **3**, 3.
- Wang, L., Xie, C., Greggio, E., Parisiadou, L., Shim, H., Sun, L., Chandran, J., Lin, X., Lai, C., Yang, W.J., Moore, D.J., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Chiosis, G., Cookson, M.R. and Cai, H. (2008b) The chaperone activity of heat shock protein 90 is critical for maintaining the stability of leucine-rich repeat kinase 2. *J Neurosci*, **28**, 3384-3391.
- Warner, T.T. and Schapira, A.H. (2003) Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **53 Suppl 3**, S16-23; discussion S23-15.
- Wayman, G.A., Lee, Y.S., Tokumitsu, H., Silva, A. and Soderling, T.R. (2008) Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, **59**, 914-931.

- Weisz Hubsman, M., Volinsky, N., Manser, E., Yablonski, D. and Aronheim, A. (2007) Autophosphorylation-dependent degradation of Pak1, triggered by the Rho-family GTPase, *Chp. Biochem J*, **404**, 487-497.
- Wery-Zennaro, S., Zugaza, J.L., Letourneur, M., Bertoglio, J. and Pierre, J. (2000) IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38 MAPK-dependent pathways in keratinocytes. *Oncogene*, **19**, 1596-1604.
- West, A.B., Moore, D.J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W.W., Ross, C.A., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16842-16847.
- West, A.B., Moore, D.J., Choi, C., Andrabi, S.A., Li, X., Dikeman, D., Biskup, S., Zhang, Z., Lim, K.L., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2007) Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet*, **16**, 223-232.
- Westwood, G., Dibling, B.C., Cuthbert-Heavens, D. and Burchill, S.A. (2002) Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway. *Oncogene*, **21**, 809-824.
- Wiesmuller, L. and Wittinghofer, F. (1994) Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cell Signal*, **6**, 247-267.
- Wojda, U., Salinska, E. and Kuznicki, J. (2008) Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*, **60**, 575-590.
- Wonerow, P., Pearce, A.C., Vaux, D.J. and Watson, S.P. (2003) A critical role for phospholipase Cgamma2 in alphaIIb beta3-mediated platelet spreading. *J Biol Chem*, **278**, 37520-37529.
- Wong, M.L. and Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, **39**, 75-85.
- Woo, Y., Affourtit, J., Daigle, S., Viale, A., Johnson, K., Naggert, J. and Churchill, G. (2004) A comparison of cDNA, oligonucleotide, and Affymetrix GeneChip gene expression microarray platforms. *J Biomol Tech*, **15**, 276-284.
- Wu, J. and Kaufman, R.J. (2006) From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ*, **13**, 374-384.
- Yamada, T., McGeer, P.L., Baimbridge, K.G. and McGeer, E.G. (1990) Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res*, **526**, 303-307.
- Yang, H., Xia, Y., Lu, S.Q., Soong, T.W. and Feng, Z.W. (2008) Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/ERK, and transcription factor AP-1. *J Biol Chem*, **283**, 5287-5295.
- Yin, Y., Liu, Y.X., Jin, Y.J., Hall, E.J. and Barrett, J.C. (2003) PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature*, **422**, 527-531.
- Yokota, T., Sugawara, K., Ito, K., Takahashi, R., Ariga, H. and Mizusawa, H. (2003) Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 1342-1348.
- Yoshino, O., Osuga, Y., Hirota, Y., Koga, K., Hirata, T., Harada, M., Morimoto, C., Yano, T., Nishii, O., Tsutsumi, O. and Taketani, Y. (2004) Possible pathophysiological roles of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*, **52**, 306-311.
- Yu, L., Gaitatzes, C., Neer, E. and Smith, T.F. (2000) Thirty-plus functional families from a single motif. *Protein Sci*, **9**, 2470-2476.
- Zaarur, N., Meriin, A.B., Gabai, V.L. and Sherman, M.Y. (2008) Triggering aggresome formation. Dissecting aggresome-targeting and aggregation signals in synphilin 1. *J Biol Chem*, **283**, 27575-27584.

- Zabetian, C.P., Samii, A., Mosley, A.D., Roberts, J.W., Leis, B.C., Yearout, D., Raskind, W.H. and Griffith, A. (2005) A clinic-based study of the LRRK2 gene in Parkinson disease yields new mutations. *Neurology*, **65**, 741-744.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Munoz, D.G. and de Yebenes, J.G. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*, **55**, 164-173.
- Zhang, D., Kanthasamy, A., Yang, Y. and Anantharam, V. (2007) Protein kinase C delta negatively regulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis by enhancing protein phosphatase-2A activity in dopaminergic neurons. *J Neurosci*, **27**, 5349-5362.
- Zhang, H., Webb, D.J., Asmussen, H., Niu, S. and Horwitz, A.F. (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci*, **25**, 3379-3388.
- Zhu, X., Babar, A., Siedlak, S.L., Yang, Q., Ito, G., Iwatsubo, T., Smith, M.A., Perry, G. and Chen, S.G. (2006a) LRRK2 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol Neurodegener*, **1**, 17.
- Zhu, X., Siedlak, S.L., Smith, M.A., Perry, G. and Chen, S.G. (2006b) LRRK2 protein is a component of Lewy bodies. *Ann Neurol*, **60**, 617-618; author reply 618-619.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., Stoessl, A.J., Pfeiffer, R.F., Patenge, N., Carbajal, I.C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D.W., Meitinger, T., Strom, T.M., Wszolek, Z.K. and Gasser, T. (2004a) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, **44**, 601-607.
- Zimprich, A., Muller-Myhsok, B., Farrer, M., Leitner, P., Sharma, M., Hulihan, M., Lockhart, P., Strongosky, A., Kachergus, J., Calne, D.B., Stoessl, J., Uitti, R.J., Pfeiffer, R.F., Trenkwalder, C., Homann, N., Ott, E., Wenzel, K., Asmus, F., Hardy, J., Wszolek, Z. and Gasser, T. (2004b) The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet*, **74**, 11-19.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L. and Ron, D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, **12**, 982-995.

Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name: Karina Häbig, geb. Schöbel
 Geburtsdatum: 19.12.1980
 Geburtsort: Elsterwerda
 Familienstand: verheiratet
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1986-1992 Grundschule Ruhland
 1992-2000 Gymnasium Schwarzheide, Abitur

Hochschulausbildung:

10/2000 Grundstudium der Biologie an der Technischen Universität Dresden
 08/2002 Vordiplom
 08/2002 Hauptstudium der Biologie an der Technischen Universität Dresden
 Hauptfach: Genetik
 Nebenfächer: Immunologie und Mikrobiologie
 10/2004-08/2005 Diplomarbeit an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Institut für Humangenetik, in der Abteilung Medizinische Genetik, betreut durch Prof. Dr. Olaf Rieß (Tübingen) und durch Prof. Dr. Michael Göttfert (Dresden)
 09/2005 Erlangen des Diploms an der Technischen Universität Dresden

Wissenschaftliche Erfahrungen:

2002/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Technischen Universität Dresden, Institut für Genetik, Abteilung Molekulare Genetik
 02/2003 – 04/2003 Praktikum an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Institut für Humangenetik, Abteilung Medizinische Genetik; betreut durch Dr. med. Daniela Berg und Prof. Dr. Olaf Rieß: „Mutationsanalyse von Genen des Eisenstoffwechsels bei Parkinsonpatienten“
 07/2003 – 10/2003 Praktikum an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Institut für Gerichtliche Medizin; betreut durch Dr. Martin Manfred Schulz und Prof. Dr. Heinz-Dieter Wehner: „Molekularbiologische Analyse archäologischer Knochenproben“
 10/2004-08/2005 Diplomarbeit an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Institut für Humangenetik, in der Abteilung Medizinische Genetik, betreut durch Prof. Dr. Olaf Rieß (Tübingen) und durch Prof. Dr. Michael Göttfert (Dresden): „Analyse von Pathogenesestoffwechselnetzwerken des Morbus Parkinson“
 10/2005-07/2009 Promotion der Medizinischen Genetik der Universität Tübingen; betreut durch Dr. Michael Bonin und Prof. Dr. Olaf Rieß: „Analyse der biologischen Funktion des Parkinson assoziierten Proteins LRRK2 in Knockdown Modellen“

Publikationen:

- Deplazes, J., Schobel, K., Hochstrasser, H., Bauer, P., Walter, U., Behnke, S., Spiegel, J., Becker, G., Riess, O. and Berg, D. (2004) Screening for mutations of the IRP2 gene in Parkinson's disease patients with hyperechogenicity of the substantia nigra. *J Neural Transm*, **111**, 515-521.
- Krause-Buchholz, U., Schobel, K., Lauffer, S. and Rodel, G. (2005) Saccharomyces cerevisiae translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. *Biol Chem*, **386**, 407-415.
- Schulz, M.M., Schobel, K., Skowronek, M.H. and Wehner, H.D. (2005) [Quantification of human DNA from forensic samples via real time PCR by the help of a telomerase assay]. *Arch Kriminol*, **216**, 89-96.
- Kuhn, M., Haebig, K., Bonin, M., Ninkina, N., Buchman, V.L., Poths, S. and Riess, O. (2007) Whole genome expression analyses of single- and double-knock-out mice implicate partially overlapping functions of alpha- and gamma-synuclein. *Neurogenetics*, **8**, 71-81.
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hubener, J., Boy, J., Ruttiger, L., Habig, K., Poths, S., Bonin, M., Knipper, M., Schmidt, W.J., Wilbertz, J., Wolburg, H., Laccone, F. and Riess, O. (2007) Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci*, **27**, 7418-7428.
- Habig, K., Walter, M., Poths, S., Riess, O. and Bonin, M. (2008) RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. *Neurogenetics*, **9**, 83-94.
- Grundmann, K., Hübener, J., Häbig, K., Reischmann, B., Poths, S., Hauser, T.-K., Magg, J., Riess, O., Bonin, M. and Nguyen, H.P. (2008) Gene expression changes in a transgenic mouse model overexpressing human wildtype and mutant torsinA. *Proteomics Clin. Appl.*, **2**.
- Habig, K., Walter, M., Stappert, H., Riess, O. and Bonin, M. (2009) Microarray expression analysis of human dopaminergic neuroblastoma cells after RNA interference of SNCA--a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res*, **1256**, 19-33.
- Schulz, M.M., Buschner, M., Leidig, R., Wehner, H., Fritz, P., Häbig, K., Bonin, M., Schuetz, M., Thomas, S. and Wehner, F. (2009) A new approach to the investigation of sexual offences - cytoskeleton analysis reveals the origin of cells found on forensic swabs. *Journal of Forensic Sciences*. Accepted Feb.2009

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Analyse der biologischen Funktion des Parkinson assoziierten Proteins LRRK2 in Knockdown Modellen“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde.

Tübingen, den

Unterschrift:
