

Genetische Untersuchungen am Eisenstoffwechsel und deren Bedeutung für die Pathogenese der Parkinson-Erkrankung

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Claudia Funke

aus Sangerhausen

Tübingen

2017

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

Tag der mündlichen Qualifikation: 18.12.2017

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Rieß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Berg

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Tübingen, den 24.03.2017

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Daniela Berg für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses äußerst interessanten und viel versprechenden Themas bedanken. Sie stand jederzeit hinter mir, war immer für Diskussionen offen und hat mich in meinen Projekten jederzeit unterstützt. Vielen Dank dafür, liebe Dany! Darüber hinaus danke ich dir für deine Bewertung meiner Arbeit als Zweitgutachterin.

Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß möchte ich ebenfalls ganz herzlich für seine Tätigkeit als Erstgutachter danken und für seine unermüdlichen hilfreichen Hinweise und Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit einen großen Beitrag geleistet haben.

Ein ganz besonderer Dank richtet sich an Dr. Anne Söhn, die mich zu Beginn meiner Doktorarbeit als direkte Betreuerin im Labor unterstützt hat. Ich habe viel von ihr gelernt und konnte immer mit Fragen zu ihr kommen. Für Anregungen und Diskussionen stand sie mir kompetent zur Seite. Sie ist mir in dieser Zeit menschlich sehr ans Herz gewachsen. Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Jens Schittenhelm aus Tübingen und Prof. Dr. Jing Zhang aus Seattle möchte ich besonders danken, für die immunhistochemischen Färbungen bzw. für die Western-Blot-Analysen.

Ein weiterer Dank gebührt allen Mitarbeitern der Medizinischen Genetik sowie allen Mitarbeitern des Hertie-Institutes für klinische Hirnforschung in Tübingen für die nette und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Dabei möchte ich besonders Dr. Benjamin Schmid danke sagen, da ohne ihn die Laboralltage nicht so lustig und gesangvoll gewesen wären. Ebenso möchte ich mich für die Zusammenarbeit und Unterstützung mit und von Ann-Kathrin Hauser, Julia Vetter und Claudia Schulte bedanken.

Eine große moralische Unterstützung waren und sind alle meine lieben Freunde, die sich über all die Jahre meinen Kummer zu diesem Thema anhören mussten und nie müde wurden mir aufbauende Worte zuzusprechen. Danke Drea, Sabine, Silvi, Netti, Anette, Anke und Laura!!!

Aus tiefstem Herzen möchte ich mich bei meiner lieben Familie bedanken, vor allem bei meinen Eltern, meinen beiden Sonnenscheinchen Moritz und Lisa und nicht zuletzt bei meinem Mann. Ihr habt immer daran geglaubt, dass ich diese Arbeit fertig schreibe, mich jederzeit unterstützt und mir immer Mut zugesprochen. Euch habe ich zu verdanken, dass nach so langer Zeit diese Arbeit ein Ende findet.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Genetics and iron in the systems biology of Parkinson's disease and some related disorders.

Funke C, Schneider SA, Berg D, Kell DB.

Neurochem Int. 2013 Apr; 62(5):637-52. Review ; PMID: 23220386

Genetic analysis of heme oxygenase-1 (HO-1) in German Parkinson's disease patients.

Funke C, Tomiuk J, Riess O, Berg D, Soehn AS.

J Neural Transm (Vienna). 2009 Jul; 116(7):853-9; PMID: 19475336

Genetic analysis of coding SNPs in blood-brain barrier transporter MDR1 in European Parkinson's disease patients.

Funke C, Soehn AS, Tomiuk J, Riess O, Berg D.

J Neural Transm (Vienna). 2009 Apr; 116(4):443-50; PMID: 19255821

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....I-1

Abbildungsverzeichnis.....II-1

Tabellenverzeichnis.....III-1

1. Einleitung.....1

1.1 Morbus Parkinson.....2

1.1.1 Prävalenz.....2

1.1.2 Symptome und Verlauf des Morbus Parkinson.....3

1.1.3 Neurobiologie und Neuropathologie.....4

1.1.4 Therapie.....6

1.1.5 Klassifizierung des Morbus Parkinson.....7

1.1.5.1 Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2).....8

1.2 Eisenhomöostase und Regulation im Körper.....10

1.2.1 Eisenaufnahme in den menschlichen Körper über die Enterozyten.....10

1.2.2 Weitergabe des Eisens in die Blutzirkulation.....11

1.2.3 Verteilung des Eisens in die Körperzellen.....11

1.2.4 Non-transferrin-bound-iron (NTBI).....12

1.2.5 Regulation des zellulären Eisenmetabolismus.....14

1.2.6 Regulation des systemischen Eisenmetabolismus.....16

1.2.7 Hämoxygenase-1 (HO-1)..... 16

1.3 Eisenhomöostase im zentralen Nervensystem (ZNS).....17

1.3.1 Barrieren zwischen der Blutzirkulation und dem zentralen Nervensystem (ZNS).....17

1.3.2 Anatomie der Blut-Hirn-Schranke.....17

1.3.3 Transportmechanismen über die Blut-Hirn-Schranke.....18

1.3.4 Eisenaufnahme ins Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke.....19

1.3.5 Eisenmetabolismus im ZNS..... 20

1.3.6 Verteilung des Eisens im menschlichen Gehirn.....21

Inhaltsverzeichnis

1.4	Morbus Parkinson und Eisenakkumulation im Gehirn.....	21
1.4.1	Hyperechogenität der Substantia nigra.....	23
1.5	Pathomechanismen der Parkinson-Erkrankung.....	24
1.5.1	Mitochondrien und oxidativer Stress.....	25
1.5.2	Ausgewählte Parkinson-assoziierte Gene mit möglicher Eiseninteraktion.....	26
1.5.2.1	alpha-Synuklein.....	26
1.5.2.2	DJ-1.....	27
1.5.2.3	Parkin / PINK1 / Omi.....	27
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	29
2.	Materialien.....	32
2.1	Zellkulturen.....	33
2.2	Oligonukleotide.....	33
2.3	Vektoren/ Konstrukte.....	40
2.4	Enzyme und dazugehörige Puffer.....	41
2.5	Antikörper.....	42
2.6	Chemikalien, Biochemikalien.....	43
2.7	Kits.....	44
2.8	Verwendete Puffer/ Lösungen/ Nährmedien.....	45
2.9	Geräteverzeichnis.....	46
2.10	Verbrauchsmaterialien.....	47
2.11	Software und Internetressourcen.....	48
3.	Methoden.....	49
3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
3.2	In vitro Transkription und Pull Down.....	51
3.3	Agarosegel-Elektrophorese	52
3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	53
3.5	Sequenzierung	53
3.6	SNaPshot®-Methode.....	54
3.7	Fragmentlängenanalyse	55

Inhaltsverzeichnis

3.8	High Resolution Melting	56
3.9	Next Generation Sequencing (NGS).....	57
3.10	Klonierung	58
3.11	Zellkultur	63
3.12	Transfektion von Zellen.....	63
3.13	RNA-Isolation.....	65
3.14	RNA-Qualitätsmessung.....	65
3.15	cDNA- Synthese.....	65
3.16	Quantitative Real Time PCR (RTQ-PCR).....	65
3.17	Proteinisolation aus eukaryotischen Zellen	66
3.18	Protein-Quantifizierung mit dem Bradford- Assay.....	67
3.19	Natrium-dodecylsulfat -Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
3.20	Western Blot.....	68
3.21	Immunhistochemie.....	69
3.22	Immunfluoreszenz.....	69
4.	Ergebnisse.....	71
4.1	Ergebnisse der <i>MDR1</i>-Analysen	73
4.1.1	Allelische und genotypische Gleichartigkeit der Kohorten.....	73
4.1.2	Genotypfrequenzen der polymorphen SNPs bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	75
4.1.3	Haplotypanalyse.....	76
4.2	Ergebnisse der <i>HO-1</i>-Analysen.....	78
4.2.1	SNP-Analyse	78
4.2.2	(GT) <i>n</i> -Fragmentlängenpolymorphismus	78
4.2.3	Vergleichende mRNA-Expressionanalyse für das <i>HO-1</i> -Gen.....	79
4.3	Ergebnisse der Affymetrix-Chip-Daten.....	81
4.4	IREB2.....	83
4.5	IREB2 und alpha-Synuklein	86
4.6	Generierung verschiedener <i>LRRK2</i>-Varianten in SHSY5Y-Zellen.....	95
4.7	LRRK2 – Fibroblasten / Neuronen und SHSY5Y-Zellprojekt	100
4.7.1	Fibroblasten.....	102
4.7.2	SHSY5Y-Zellen.....	104

Inhaltsverzeichnis

4.7.3	Neurone.....	106
4.8	Depression – RBD – Hyposmie – Kohortenvergleich.....	108
5.	Diskussion.....	110
5.1	Ergebnisse der Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Analysen.....	111
5.1.1	<i>MDR1</i>	111
5.1.2	<i>HO-1</i>	112
5.1.3	<i>IREB2</i>	113
5.2	Ergebnisse der Expressionsdaten	114
5.3	Einfluss von IREB2 auf die Pathogenese der Parkinson-Erkrankung.....	115
5.3.1	Immundetektion und Immunhistochemie für IREB2.....	116
5.3.2	<i>IREB2</i> -Expression bei Mitgliedern der A30P-Familie (alpha-Synuklein).....	117
5.3.3	Immunfluoreszenzfärbung von IREB2 und alpha-Synuklein.....	117
5.3.4	Interaktion von IREB2 und alpha-Synuklein.....	118
5.4	Generierung eines Zellkulturmodells für <i>LRRK2</i>-Mutationen.....	120
5.5	Zellkulturexperimente zum Eisenmetabolismus.....	123
5.5.1	Fibroblasten.....	125
5.5.1.1	Transferrinrezeptor-1 (TfR1), DMT1 und Ferroportin-1 (FP1).....	125
5.5.1.2	Ferritin.....	126
5.5.1.3	<i>IREB2</i> , HEPH, HIF1A und HO-1.....	127
5.5.2	SHSY5Y-LRRK2 knock-down.....	128
5.5.2.1	Transferrinrezeptor-1 (TfR1), DMT1 und Ferroportin 1 (FP1).....	128
5.5.2.2	Ferritin (LC).....	129
5.5.2.3	<i>IREB2</i> , HIF1A und HO-1.....	129
5.5.3	Neurone.....	130
5.5.3.1	Transferrinrezeptor-1 (TfR1), DMT1 und Ferroportin 1 (FP1).....	130
5.5.3.2	Ferritin.....	131
5.5.3.3	<i>IREB2</i> , HIF1A und HO-1.....	131
5.6	Genetische Marker in Hochrisikogruppen der Parkinson-Erkrankung.....	132
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	134
6.1	Zusammenfassung.....	135
6.2	Ausblick.....	137
7.	Summary.....	139
8.	Literaturverzeichnis.....	142

Inhaltsverzeichnis

9.	Anhang.....	157
9.1	Ausschnitt aus der Vektor-Sequenz des pEasyFloxD.....	170

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

@	at (bei)
®	registered Trademark
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
A30P	spezifische Mutation im <i>SNCA</i> -Gen
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
BBB / BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin
cDNA	copied DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
CP	Ceruloplasmin
DCytb	membrangebundene Reduktase der Enterozyten
DFO	Deferoxamin, Eisenchelator
d.h.	das heißt
dd	doppelt destilliert
D-MEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Divalenter Metal Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	DesoxyribonukleosidTriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
FC	<i>Fold Change</i>
FCS	Fötales Kälber Serum
Fe	Eisen
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisen
FeCl ₃	Eisen (III)-Chlorid
Fe-S	Eisen-Schwefel-Cluster
FP1	Ferroportin-1
g	Gramm
G2019S	spezifische Mutation im <i>LRRK2</i> -Gen
GFP	Green Fluorescent Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HC	Heavy Chain
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)
HEPH	Hephaestin
HIF1A	Hypoxia-Inducible Factor 1, Alpha Subunit
HO-1	Hämoxygenase 1
holo-TF	holo-Transferrin

Abkürzungsverzeichnis

Inc	Incorporated company
incl.	inklusive
iPS	induzierbare Pluripotente Stammzellen
IRE	Iron Regulatory Element
IRP1 / IREB1	Iron Regulatory Protein 1 / Iron-Responsive Element-Binding Protein 1
IRP2 / IREB2	Iron Regulatory Protein 2 / Iron-Responsive Element-Binding Protein 2
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Kit	gebrauchsfertige Reaktionslösung
l	Liter
LC	Light Chain
LIP	Labiler Eisen-Pool
L-DOPA	L-3,4-dioxyphenylalanin
m	Milli-
MDR1	Multidrug Resistance 1
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
n	Nano-
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OH*	Hydroxyl-Radikal
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-gp	P-Glykoprotein
RBD	REM-sleep Behaviour Disorder (REM-Schlafstörung)
REM	Rapid Eye Movement
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SHSY5Y-Zellen	Zelllinie, die von einem Neuroblastom gewonnen wurde
SLS	Sample loading solution
SN	Substantia nigra
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STABW	Standardabweichung
STEAP3	vesikuläre Reduktase
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transferrin
TFR1	Transferrin-Rezeptor 1
TH	Thyrosin-Hydroxylase
TM	Trade Mark

Abkürzungsverzeichnis

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen SorbitanMonolaurat
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
x g	mal Erdbeschleunigung
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

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Veränderung der Körperhaltung im Verlauf des Morbus Parkinson.....	2
Abbildung 1.2:	A Wesentliche Afferenzen (blau) und Efferenzen (rot) des Striatums.....	5
	B Afferente Verschaltung (blau) im Striatum mit entsprechenden Neurotransmittern.....	5
Abbildung 1.3:	Proteindomänenstruktur von LRRK2.....	9
Abbildung 1.4:	Eisenaufnahme über Enterozyten in den Körper und Verteilung über die Blutzirkulation in die einzelnen Körperzellen.....	13
Abbildung 1.5:	Zelluläre eisenkonzentrationsabhängige Bindung der IRPs mit den IREs.....	14
Abbildung 1.6:	Inaktivierungsmechanismen von IRP1 und IRP2 bei hoher zellulärer Eisenkonzentration.....	15
Abbildung 1.7:	Anatomie der Blut-Hirn-Schranke (A) und Wege der Eisenaufnahme durch die BBB (B).....	18
Abbildung 1.8:	Transkranieller Ultraschall der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	23
Abbildung 1.9:	Übersicht über molekulare Mechanismen in der Pathogenese des Morbus Parkinson mit möglicher Eisenbeteiligung.....	24
Abbildung 2.1:	pGem [®] -T-Vektorkarte	40
Abbildung 2.2:	pEasyFloxxII-Vektorkarte.....	40
Abbildung 2.3:	pLenti6.3/V5-DEST-Vektorkarte.....	41
Abbildung 2.4:	pCMV-XL6-Vektorkarte.....	41
Abbildung 4.1.1:	Vereinfachte Darstellung durchgeführter Experimente	72
Abbildung 4.1.2:	Exonstruktur des <i>MDR1</i> -Gens.....	73
Abbildung 4.1.3:	Verteilung der Genotypen im <i>MDR1</i> -Gen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	74
Abbildung 4.1.4:	Altersabhängige Allelfrequenzen im <i>MDR1</i> -Gen für SNP 1199 und 2677 bei Parkinson-Patienten.....	74
Abbildung 4.2.1:	A Exonstruktur des menschlichen <i>Hämoxygenase-1</i> -Gens.....	78
	B Verteilung der Genotypen für SNP 19 im <i>HO-1</i> -Gen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	78
Abbildung 4.2.2:	A Darstellung der genetischen Variabilität für den (GT) _n -Mikrosatellitenpolymorphismus in der Promotorregion des menschlichen <i>HO-1</i> -Gens.....	79
	B Vergleichende Darstellung der <i>HO-1</i> -Expression.....	79
Abbildung 4.3.1:	A Mittlere normalisierte Expression von <i>IREB2</i> im peripheren Blut.....	82
	B Western Blot-Ergebnis aus der Substantia nigra von Parkinson-Patienten im Vergleich zu Kontrollen für <i>IREB2</i>	82
Abbildung 4.3.2:	A Verteilung der Genotypen für SNP 13180 und B für SNP 2656070 im <i>IREB2</i> -Gen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	83
Abbildung 4.3.3:	Altersabhängige Allelfrequenzen im <i>IREB2</i> -Gen für SNP 13180 und 2656070 bei Parkinson-Patienten.....	83
Abbildung 4.4.1:	A Auszählung der immunhistochemischen Färbung der Substantia nigra mit <i>IREB2</i>	84
	B Immunhistochemische Färbung eines Gehirnschnittes mit <i>IREB2</i> durch die Substantia nigra.....	84
Abbildung 4.4.2:	Western Blot von <i>IREB2</i> an jeweils vier Fibroblasten von Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	85
Abbildung 4.4.3:	Mittlere normalisierte Expression von <i>IREB2</i> im Lymphoblasten.....	86
Abbildung 4.5.1:	A B C D Immunfluoreszenzfärbung von SHSY5Y-Zellen.....	87
	E Immunhistochemische Färbung eines Lewy-Körperchens mit <i>IREB2</i> in der Substantia nigra eines Parkinson-Patienten.....	87
Abbildung 4.5.2:	Sekundärstruktur der mRNA im 5'-UTR Bereich von alpha-Synuklein und Ferritin.....	88
Abbildung 4.5.3:	Pull Down Experiment zum Nachweis einer Bindung der mRNA von alpha-Synuklein mit <i>IREB2</i>	89
Abbildung 4.5.4:	<i>IREB2</i> Pull Down Experiment mit diversen sequenzveränderten mRNAs von alpha-Synuklein ausgehend vom zentralen Loop.....	90
Abbildung 4.5.5:	<i>IREB2</i> Pull Down Experiment mit diversen sequenzveränderten mRNAs von alpha-Synuklein ausgehend vom 5' und 3' Bereich.....	91
Abbildung 4.5.6:	RNA Sekundärstruktur-Vorhersagen für den 5'-UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein (I).....	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.5.7: RNA Sekundärstruktur-Vorhersagen für den 5` - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein (II).....	93
Abbildung 4.5.8: RNA Sekundärstruktur-Vorhersagen für den 5` - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein und Ferritin.....	94
Abbildung 4.5.9: Alpha-Synuklein-Expression nach IREB2-Überexpression.....	95
Abbildung 4.6.1: Zinkfinger basiertes Gene-Editing für das Exon 41 des <i>LRRK2</i> -Gens.....	96
Abbildung 4.6.2: Strategie zur Klonierung des homologen Konstruktes und Generierung von genetisch veränderten SHSY5Y-Zellen.....	97
Abbildung 4.6.3: Nachweis der gewünschten Mutationen in den positiv selektierten SHSY5Y-Zellen über Integrations-PCR und Sequenzierung.....	97
Abbildung 4.6.4: Basensequenzabfolge im <i>LRRK2</i> -Gen.....	98
Abbildung 4.6.5: Western-Blot zur Detektion von LRRK2 und IREB2 verschiedener Zelllysate.....	99
Abbildung 4.7.1: 6-Well-Platte mit Angabe diverser Behandlungen der Zellen.....	101
Abbildung 4.7.2: Expressionsdaten ausgewählter Gene nach Eisenbehandlung der Fibroblasten.....	103
Abbildung 4.7.3: Expressionsdaten ausgewählter Gene nach Eisenbehandlung der SHSY5Y-Zellen.....	105
Abbildung 4.7.4: Expressionsdaten ausgewählter Gene nach Eisenbehandlung der Neurone.....	107
Abbildung 5.1: Vorgang des Nicht homologen End Joinings (NHEJ) und der Homologen Rekombination (HR) nach einem Doppelstrangbruch (DSB) der DNA.....	122

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Monogenetische Formen der Parkinson-Erkrankung	7
Tabelle 2.1:	Primer für die SNaPshot-Analyse im <i>MDR1</i> -Gen	34
Tabelle 2.2:	Primer für die SNaPshot-Analyse, Fragmentlängenanalyse und qRT-PCR im <i>HO-1</i> Gen	35
Tabelle 2.3:	Primer für die Analysen im alpha-Synuklein-Gen (Sequenzen, Pull Down) und Ferritin	36
Tabelle 2.4:	Primer für die Mutagenese-PCRs der verschiedenen LRRK2-Konstrukte	38
Tabelle 2.5:	Primer für die Colony-PCR nach Transformation in pGEM®-T Vektor.....	38
Tabelle 2.6:	Primer für die Integrations-PCR (A).....	38
Tabelle 2.7:	Primer für die Integrations-PCR (B).....	38
Tabelle 2.8:	Primer für die qRT-PCR der Eisenstoffwechselgene.....	39
Tabelle 2.9:	Primer für die qRT-PCR der Haushaltsgene.....	39
Tabelle 2.10:	Primer für das High Resolution Melting der SNPs im <i>IREB2</i> -Gen mit unlabeled probes.....	39
Tabelle 2.11:	Verzeichnis über die verwendeten Enzyme/Puffer.....	41
Tabelle 2.12:	Verzeichnis über die verwendeten Antikörper.....	42
Tabelle 2.13:	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Biochemikalien.....	43
Tabelle 2.14:	Verzeichnis der verwendeten Kits.....	44
Tabelle 2.15:	Verzeichnis über die verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	45
Tabelle 2.16:	Verzeichnis über die verwendeten Geräte.....	46
Tabelle 2.17:	Verzeichnis über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	47
Tabelle 2.18:	Verzeichnis über die verwendeten Software-Programme sowie Internetressourcen.....	48
Tabelle 3.1:	Reaktionsbedingungen für die SNaPshot-PCR.....	55
Tabelle 3.2:	PCR-Bedingungen für die Fragmentlängenanalyse.....	56
Tabelle 3.3:	Reaktionsbedingungen für das High Resolution Melting.....	57
Tabelle 3.4:	Mastermix für die quantitative Real Time PCR.....	66
Tabelle 3.5:	PCR-Programm für die quantitative Real Time PCR.....	66
Tabelle 3.6:	Pipettierschema für den Bradford-Assay.....	67
Tabelle 3.7:	Zusammensetzung des Trenngels.....	68
Tabelle 3.8:	Zusammensetzung des Sammelgels.....	68
Tabelle 4.1.1:	Erhebungsmerkmale der untersuchten Kohorten.....	75
Tabelle 4.1.2:	Genotypfrequenzen der zehn analysierten SNPs im <i>MDR1</i> -Gen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	76
Tabelle 4.1.3:	Beurteilung der am häufigsten vorkommenden Haplotypen.....	77
Tabelle 4.2.1:	Erhebungsmerkmale der analysierten Kohorten für die Fragmentlängenanalyse.....	80
Tabelle 4.2.2:	Erhebungsmerkmale der Parkinson-Patienten und Kontrollen für die SNaPshot-Analyse.....	80
Tabelle 4.2.3:	Erhebungsmerkmale der untersuchten Kohorten für die mRNA-Expressionsanalyse.....	81
Tabelle 5.1:	Ergebnisse der Expressionsanalysen für diverse Eisenstoffwechselgene bei verschiedenen Zelltypen nach Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen.....	124
Tabelle 9.1	Genliste der 266 differentiell exprimierten Gene bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.....	157
Tabelle 9.2	Gene, die auf potentielle Punktmutationen in Hochrisikogruppen der Parkinson-Erkrankung untersucht wurden.....	169

1

Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Der Londoner Arzt James Parkinson berichtete erstmals 1817 in seiner Veröffentlichung „An Essay on the Shaking Palsy“ über Patienten, die unabhängig voneinander ähnliche Symptome aufwiesen, wie sie heute für die Parkinson-Erkrankung bekannt sind und er bezeichnete das Krankheitsbild als Schüttellähmung (Parkinson, 1817).

1.1.1 Prävalenz

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung in der heutigen Gesellschaft mit einer altersabhängigen Prävalenz von 1-2 % in den über 60-Jährigen (Thomas and Beal 2007) und bereits 4 % in den über 85-Jährigen (de Rijk, et al. 2000). Neuere Übersichtsartikel beschreiben die Parkinson-Erkrankung mittlerweile als die häufigste neurodegenerative Erkrankung (Abeliovich and Gitler 2016).

Schätzungen zufolge leben allein in der Europäischen Union mehr als 500 000 Menschen, die an Parkinson erkrankt sind (Gasser 2009). Aufgrund des demografischen Wandels der Bevölkerung, von einer klassischen Pyramidenform (bevölkerungsstarke Jahrgänge im jüngeren Alter) hin zu einer Urnenform (bevölkerungsstarke Jahrgänge im höheren Alter), wird es in Zukunft immer mehr Fälle von Parkinson-Erkrankten geben.

***“How to lose your brain without losing your mind”
Michael J. Fox: “Lucky Man”***

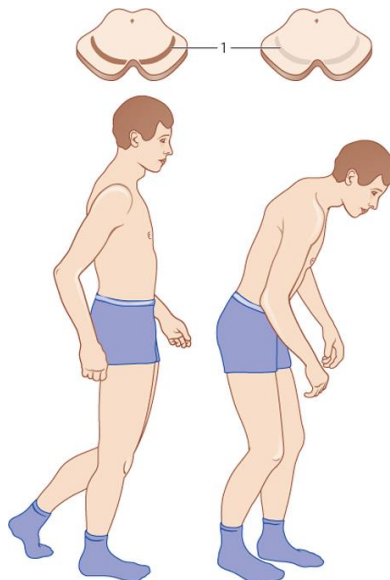


Abbildung 1.1: Veränderung der Körperhaltung im Verlauf des Morbus Parkinson Auf der linken Seite oben ist eine Substantia nigra (SN) ersichtlich (1), welche dopaminerge (dunkle) Neuronen enthält. Links unten ist ein Mann mit normaler Körperhaltung zu sehen. Beim typischen Verlust der dopaminergen Neurone in der SN im Verlauf des Morbus Parkinson, makroskopisch oben rechts in der SN (1) erkennbar, resultiert eine charakteristische, gebückte Haltung (unten rechts) mit kleinschrittigem Gang und Fehlen der Mitschwingung der Arme. (Quelle: Trepel, Neuroanatomie, 2008)

1.1.2 Symptome und Verlauf des Morbus Parkinson

Beim Morbus Parkinson degenerieren die neuromelaninhaltigen, dopaminergen Nervenzellen in der Substantia nigra (SN), mit der Folge einer kontinuierlichen Verminderung des körpereigenen Neurotransmitters Dopamin in den Basalganglien (Gibb 1992; Kastner, et al. 1992). Je fortschreitender der Prozess der Neurodegeneration dieser speziellen neuromelaninhaltigen Neurone, desto geringere Mengen an Dopamin können produziert werden und desto ausgeprägter zeigen sich die typischen Kardinalsymptome der Parkinson-Erkrankung. Als Folge des Dopaminmangels an den Synapsen resultiert ein relatives Ungleichgewicht der verschiedenen Neurotransmitter zueinander, sodass Glutamat und Acetylcholin nun im erhöhten Maße an den Synapsen vorliegen.

Klinisch äußert sich der Morbus Parkinson in verschiedenen motorischen, aber auch nicht motorischen Symptomen (Chaudhuri and Schapira 2009; Maetzler, et al. 2009; Singh, et al. 2007).

Der **Tremor** (lat. tremere = zittern) ist wohl das bekannteste und auffälligste Symptom des Morbus Parkinson, wenn gleich auch nicht alle Parkinson-Patienten dieses Zittern, welches vorwiegend in Ruhe auftritt, aufweisen müssen. Am häufigsten manifestiert er sich an den Händen (ein- oder beidseitig), kann aber auch die Beine, seltener den Kopf und den Unterkiefer betreffen (Klockgether 2004). In der Regel beginnt der Tremor auf einer Seite. Genau auf dieser Seite treten auch das zweite und dritte Kardinalsymptom, der Rigor und die Bradykinese, stärker ausgeprägt auf.

Dem **Rigor** (lat. rigere = starr sein), einem gesteigerten Spannungszustand der Muskulatur, schreibt man die charakteristische vorn über geneigte Körperhaltung mit leicht angebeugten Armen und Beinen (sämtliche große Gelenke in Flexion gehalten) als Ursache zu. Ebenso führt er zu einem verminderten Mitschwingen der Arme beim Gehen (Klockgether 2004). Von den Patienten wird der Rigor als eine Art Taubheit oder als ziehender Schmerz in der betroffenen Extremität oder eben als Steifigkeit empfunden. Als ein ganz typisches Zeichen des Rigors, und schon lange vor dem Auftreten der ersten motorischen Symptome möglich, lässt sich eine Verkleinerung des Schriftbildes mit krakeliger Schrift erkennen (Mikrografie) (Gerlach et al., 2007).

Die **Bradykinese** (lat. brady = langsam; griech. kinesis = Bewegung), als drittes Kardinalsymptom des Morbus Parkinson, ist die Verlangsamung willkürlicher Bewegungen, vor allem deren Initiation, z.B. beim Aufstehen von einem Stuhl oder die ersten Schritte des Gehens (Klockgether 2004). Dies stellt für die Patienten häufig die schwerste Beeinträchtigung dar.

Das vierte Kardinalsymptom, die **posturale Instabilität**, findet sich meist im fortschreitenden Verlauf der Erkrankung. Diese Gleichgewichtsstörung führt zu einer erhöhten Sturzneigung, da die Patienten nicht mehr in der Lage sind, ihr Gleichgewicht bereits bei kleinen Stößen auszubalancieren (Gerlach et al., 2007). Dies empfinden die Patienten als äußerst beunruhigend, da sie sich beispielsweise im Gedränge nur sehr unsicher fortbewegen können.

Einleitung

Neben den motorischen Symptomen des Morbus Parkinson sind auch andere Beeinträchtigungen nachweisbar (Winklhofer and Haass 2010). Hierzu zählt u.a. eine bei nahezu allen Patienten zu findende Riechstörung im Sinne einer Hyposmie. Diese wird u.a. momentan in einer groß angelegten, longitudinalen Studie (TREND = Tübinger Erhebung von Risikofaktoren zur Erkennung von Neurodegeneration) als ein Risikofaktor zur Früherkennung einer Parkinson-Erkrankung diskutiert und untersucht (Gaenslen, et al. 2014). Darüber hinaus leidet eine Vielzahl von Patienten (ca. 40 %) an einer Depression (Gerlach et al., 2007), welche sich bereits schon vor den ersten motorischen Symptomen manifestieren kann und weshalb sie ebenfalls in der TREND-Studie als ein möglicher Risikofaktor zur Früherkennung mit untersucht wird, genauso wie REM (rapid eye movement)-Schlafstörungen, welche auch gehäuft bei Parkinson-Patienten zu finden sind (Abbott and Videnovic 2016). Bei mehr als 20 % aller Patienten manifestiert sich zudem eine Demenz (Aarsland, et al. 2003).

Überdies können im Verlauf der Erkrankung auch vegetative Symptome hinzukommen, wie beispielsweise Kreislaufstörungen, Schweißausbrüche, Miktionschwierigkeiten, Nachlassen der Sexualfunktion oder Obstipation (Chaudhuri and Schapira 2009).

1.1.3 Neurobiologie und Neuropathologie

Ein wesentlicher Befund beim Morbus Parkinson ist der Untergang der dopaminergen, neuromelaninhaltigen Neurone in der Substantia nigra (SN). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind in der Regel bereits als 50-70 % aller dopaminergen Neurone in dieser Region degeneriert (Bernheimer, et al. 1973; Riederer and Wuketich 1976).

„Like a car without motor oil, a brain without dopamine is going to slowly but inevitably break down.“

Michael J. Fox: „Lucky Man“

Die SN erhält Afferenzen aus dem Striatum und dem Kortex. Gleichwohl entsendet sie ihre Efferenzen ebenfalls ins Striatum (Abbildung 1.2A). Diese nigrostriatalen Nervenfasern hemmen, aufgrund des Neurotransmitters Dopamin, die Aktivität der Neurone im Striatum (Abbildung 1.2B). Dieser Hemmung folgt eine Inhibition motorischer Stimuli. Somit ist die SN eine wichtige Struktur für die Initiierung von Bewegung (Trepel, 2008).

Aufgrund dieser fundamentalen Funktion einer intakten SN für die Kontrolle und Modulation von Bewegungsimpulsen und Bewegungsabläufen (Trepel, 2008) lässt sich das Spektrum der Kardinalsymptome der Parkinson-Erkrankung (Tremor, Rigor, Akinese) ableiten (Gibb 1992; Kastner, et al. 1992).

Der Untergang der dopaminergen Neurone in der SN führt zu einer starken Verminderung bis hin zum Ausfall der inhibitorischen nigrostriatalen Projektion. Das Striatum wird somit „enthemmt“ (Trepel, 2008). Dadurch lässt sich die Entstehung der Akinese neurophysiologisch

Einleitung

erklären. Tremor und Rigor sind ebenfalls Resultate des Ausfalls der dopaminergen Hemmung in diversen Gehirnarealen der Formatio reticularis (Trepel, 2008).

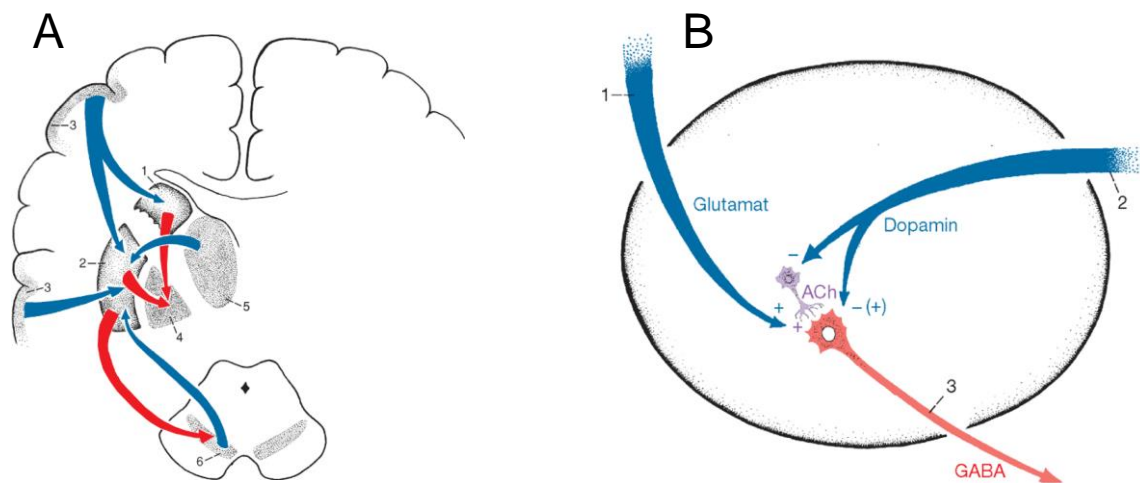


Abbildung 1.2: A Wesentliche Afferenzen (blau) und Efferenzen (rot) des Striatums Das Striatum setzt sich zusammen aus dem Nucleus caudatus (1) und dem Putamen (2). Wichtige, zum Striatum hinführende Nervenfasern (Afferenzen) kommen aus dem Kortex (3), dem Thalamus (5) und der Substantia nigra (6). Vom Striatum wegführende Nervenfasern (Efferenzen) projizieren zum Pallidum (4) und zur Substantia nigra (6). Trepel, Neuroanatomie, 2008 B Afferente Verschaltung (blau) im Striatum mit entsprechenden Neurotransmittern Zum Striatum führende Afferenzen aus dem Kortex (1) sind glutamaterg, afferente Fasern aus der Substantia nigra (2) hingegen dopaminerg. Beide, 1 und 2, projizieren im Striatum auf die Efferenzen (3), welche GABAerg sind. Im Kortex führt dies zu einer Erregung (+), in der Substantia nigra meistens zu einer Hemmung (-). Die Afferenzen der SN können auch auf ein dazwischen geschaltetes acetylcholinerges Neuron (lila) gerichtet sein, welches wiederum erregend (+) mit dem GABAergen Efferenzen des Striatums verbunden ist. Da die Afferenz aus der SN das Striatum hemmt und die Efferenz aus dem Striatum die SN hemmt, besteht zwischen diesen beiden Zentren eine negative reziproke Rückkoppelung. Trepel, Neuroanatomie, 2008

Das Vorkommen von zytoplasmatischen Lewy-Körperchen in noch intakten dopaminergen Neuronen der SN pars compacta ist ein wichtiges, neuropathologisches Kriterium der Parkinson-Krankheit (Braak, et al. 1995; Gibb 1986; Licker, et al. 2009) auch wenn ihr Nachweis kein spezifischer pathologischer Befund ist (Rieß und Schöls, Neurogenetik, 1998). Lewy-Körperchen der SN haben ein typisches Erscheinungsbild mit einem dichten, rundem Kern und einem blassen Halo, welcher diesen Kern umgibt (Gerlach, Reichmann, Riederer, 2007). Aufgrund zahlreicher immunohistochemischer Färbungen konnten nahezu 80 verschiedene Proteine innerhalb der Lewy-Körperchen nachgewiesen werden (Licker, et al. 2009). Eine der wohl wichtigsten Komponenten in der Zusammensetzung der intraneuralen Lewy-Körperchen ist alpha-Synuklein (Spillantini, et al. 1997). Überdies konnten u.a. auch Neurofilamente (Galvin, et al. 1997), Untereinheiten des Proteasoms (Li, et al. 1997), Hitze-Schock-Proteine (Auluck, et al. 2002) und Ubiquitin (Kuzuhara, et al. 1988) nachgewiesen werden – um nur Einige zu nennen. Ebenso interessant ist das Vorhandensein von zwei- und auch dreiwertigem Eisen (Peng, et al. 2010a).

1.1.4 Therapie

Eine kausale Therapie ist trotz intensiver und bereits jahrelanger Forschung nicht verfügbar. Mit Medikamenten wird daher versucht, das Ungleichgewicht der Neurotransmitter mehr ins Gleichgewicht zu bringen und dadurch die Symptome zu lindern. Je eher mit einer solchen Therapie begonnen wird, desto erfolgreicher kann man das Voranschreiten der Symptome bremsen. Dem Ungleichgewicht der Neurotransmitter kann auf drei verschiedenen Wegen entgegen getreten werden:

- erstens durch die Erhöhung der Aktivität der restlichen dopaminergen Neurone,
- zudem durch eine Hemmung der glutamatergen Neurone,
- und zusätzlich durch eine Hemmung der erhöhten Acetylcholinaktivität.

Dafür stehen insgesamt sechs verschiedene Wirkstoffgruppen zur Verfügung.

1. Anticholinergika
2. L-Dopa
3. Dopaminagonisten
4. COMT-Hemmer
5. MAO-B-Hemmer
6. NMDA-Antagonisten

Die seit über 60 Jahren am längsten bekanntesten Medikamente zur Behandlung des Morbus Parkinson sind die Anticholinergika. Sie führen vor allem zu einer Besserung des Tremors (Gerlach et al., 2007). Es wird vermutet, dass sie dem funktionellen Übergewicht acetylcholinergischer zwischengeschalteter Neurone (Abbildung 1.2B) im Striatum, welches aus dem Dopaminmangel resultiert, entgegenwirken. Diese Anticholinergika sind allerdings nur im Frühstadium der Therapie sinnvoll, da es durch die Aufhebung des relativen Übergewichts an Acetylcholin zu einer Steigerung der Aktivität der noch intakten nigrostriatalen dopaminergen Neurone führt und es dafür noch genügend intakter dopaminergener Neurone bedarf.

Mit L-Dopa, dem Goldstandard in der medikamentösen Behandlung des Morbus Parkinson, substituiert man das fehlende Dopamin bei Parkinson-Patienten (Birkmayer and Hornykiewicz 1961). L-Dopa ist, im Gegensatz zu Dopamin, in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und wird anschließend im Gehirn zu Dopamin umgewandelt. Diese Therapie erfolgt immer mit einem sog. Dopa-Decarboxylase-Hemmstoff, der verhindert, dass L-Dopa bereits peripher zu Dopamin umgewandelt wird (Nutt and Fellman 1984). Die Patienten verspüren schon nach wenigen Tagen eine deutliche Besserung der Symptomatik, v.a. die Bradykinese und den Rigor betreffend. Häufig versucht man, gerade bei jüngeren Patienten, die erste L-Dopa Gabe zeitlich hinauszuzögern und beginnt die Therapie erst einmal mit einem Dopaminagonisten, welche ebenfalls in der Lage sind Dopaminrezeptoren zu stimulieren (Enk et al., 2004).

Zur Verlängerung der Wirkdauer von L-Dopa werden zusätzlich auch sog. COMT (Catechol-O-Methyltransferase)-Hemmer eingesetzt (Factor 2008). Diese Verlängerung der Wirkdauer

Einleitung

wird dadurch erzielt, dass die COMT-Hemmer einen sehr wichtigen Abbauprozess von L-Dopa verhindern (Enk et al., 2004).

Die Monoaminoxidase-B (MAO-B) ist ein Enzym, welches Dopamin abbaut. Durch sog. MAO-B-Hemmer erreicht man eine Anreicherung von Dopamin durch die Verhinderung seines Abbaus (Factor 2008). Als letzte Wirkstoffgruppe können NMDA-Antagonisten eingesetzt werden (Gerlach et al., 2007). Ihnen wird eine Abmilderung der Wirkung des übermäßigen Glutamats zugeschrieben und führt so zu einer Verbesserung des Ungleichgewichts der Neurotransmitter zueinander.

Neben der medikamentösen Therapie gibt es bei einigen ausgewählten Patienten die Möglichkeit der Tiefen Hirnstimulation (Revell 2015), bei der operativ Elektroden im Gehirn (Region des Nucleus subthalamicus) platziert werden, welche diese Gehirnregion stimulieren und es somit zu einer positiven Beeinflussung der Symptomatik kommt.

1.1.5 Klassifizierung des Morbus Parkinson

Die Ursachen des Morbus Parkinson können sehr vielfältig sein. Aufgrund der aktuellen Forschungslage geht man von einem komplexen Zusammenspiel von Umweltfaktoren und genetischen Prädispositionen aus, die einen Einfluss auf das älter werdende Gehirn haben (Abeliovich and Gitler 2016; Gasser 2009; Jellinger 2012; Kalia and Lang 2015; Litvan, et al. 2007; Winklhofer and Haass 2010).

In den meisten Fällen, mit ca. 90-95 %, findet man den sporadisch auftretenden, idiopathischen Parkinson (IPS) ohne positive Familienanamnese (Gasser 2015; Jomova, et al. 2010). Jedoch wurden in den letzten 20 Jahren mehrere Gene identifiziert, die für die Entstehung der Erkrankung ursächlich sind und aufgrund der familiären Häufung mendelschen Vererbungsregeln unterliegen (Gasser 2009; Gasser 2015; Gasser, et al. 2011; Kubo, et al. 2006; Tan and Skipper 2007). Diese monogenetischen Parkinson-Fälle zeigen sowohl autosomal-dominante als auch autosomal-rezessive Vererbungsmuster (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Monogenetische Formen der Parkinson-Erkrankung Zusammenstellung der bislang ursächlich nachgewiesenen Gene oder Loci für den Morbus Parkinson (mit Hilfe der *OMIM* Datenbank, der *PD mutation database* sowie (Gasser 2015)), welche mendelschen Vererbungsregeln folgen. Angegeben sind der Vererbungsmodus, einzeln nachgewiesene Mutationen sowie der einsetzende Krankheitsbeginn. Einige PARK-Bezeichnungen sind mit einem Sternchen * markiert. Dabei handelt es sich um Loci, welche mit einer mendelschen Form von Parkinson beschrieben wurden, jedoch nicht unabhängig als „Krankheitsgene“ bestätigt werden konnten (Gasser 2015). AD autosomal dominant; AR autosomal rezessiv

Bezeichnung	Gen	Locus	Mutationen	Vererbung	Krankheitsbeginn
PARK1	<i>SNCA</i>	4q21	A30P, E46K, A53T	AD	früher Beginn bei A53T; später Beginn bei A30P
PARK2	<i>Parkin</i>	6q25	zahlreiche nonsense und missense Mutationen; Deletionen und Duplikationen	AR	juvenil, früher Beginn
PARK3*	unbekannt	2p13	keine gefunden	AD	später Beginn

Einleitung

PARK4	<i>SNCA</i>	4q21	Duplikationen Triplikationen	AD	früher Beginn bei Triplikation; später Beginn bei Duplikation
PARK5*	<i>UCHL1</i>	4p14	I93M (einzelnes Geschwisterpaar)	AD	später Beginn
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35	zahlreiche Punktmutationen, einzelne Exondeletionen	AR	früher Beginn
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36	Punktmutationen, Deletionen	AR	früher Beginn
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q12	zahlreiche Punktmutationen, z.B. G2019S, I2020T, R1441C/G/H	AD, sporadisch	meist später Beginn
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	mehrere Punktmutationen, z.B. F182L, G504R, G877R; auch Deletionen und Duplikationen	AR	juveniler, früher Beginn
PARK10*	unbekannt	1p32	keine gefunden	unklar	später Beginn
PARK11*	<i>GIGYF2</i>	2q36-q37	Punktmutationen	AD	später Beginn
PARK12	unbekannt	Xq21-q25	keine gefunden	unklar	später Beginn
PARK13*	<i>Omi/HTRA2</i>	2p13	G399S, A141S	unklar	später Beginn
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	R741Q, R747W	AR	juveniler Beginn
PARK15	<i>FBXO7</i>	22q12	R378G, R498X, T22M	AR	früher Beginn
PARK16	unbekannt	1q32	keine gefunden	unklar	unklar
PARK17	<i>VPS35</i>	16q11	D620N	AD	später Beginn
PARK18*	<i>EIF4G1</i>	3q27	mehrere Punktmutationen, z.B. R1205H	AD	später Beginn
PARK19	<i>DNAJC6</i>	1p31.3	Q734X, Splice- Mutation	AR	juveniles Alter
PARK20	<i>SYNJ1</i>	21q22.11	R258Q	AR	juveniles Alter
PARK21	<i>DNAJC13</i>	3q22.1	N855S	AD	später Beginn
PARK22	<i>CHCHD2</i>	7p11.2	T61I, R145Q, intronisch	AD	später Beginn
PARK23	<i>VPS13C</i>	15q22.2	meist trunkierende Varianten	AR	früher Beginn

1.1.5.1 Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)

Mutationen im *LRRK2*-Gen sind eine häufige Ursache für autosomal-dominante Formen von Morbus Parkinson (Paisán-Ruíz, et al. 2004; Zimprich, et al. 2004b). In 5-15 % aller familiären (dominanten) Erkrankungsfälle lassen sich Mutationen im *LRRK2*-Gen nachweisen (Berg, et al. 2005). Die am häufigsten nachweisbare G2019S-Mutation im Exon 41 des *LRRK2*-Gens wird auch bei 1-3 % aller sporadisch auftretenden Parkinson-Erkrankungen identifiziert (Gilks, et al. 2005). Aufgrund eines Founder-Effekts findet man diese Mutation sogar bei bis zu 25 % in

Einleitung

erkrankten Ashkenazi-Juden und nordafrikanischen Berbern. Überdies sind eine Reihe weiterer Mutationen im *LRRK2*-Gen bekannt, wie beispielsweise die R1441C/G/H-Mutation, welche hauptsächlich in Spanien zu finden ist oder die I2020T-Mutation (Gasser 2015). Die Klinik der Patienten, welche eine *LRRK2*-Mutation aufweisen, unterscheidet sich nicht von Patienten mit einem sporadisch auftretenden Parkinson ohne bekannte genetische Ursache (Hasegawa and Kowa 1997; Hernandez, et al. 2005; Zimprich, et al. 2004a).

Da im Rahmen dieser Doktorarbeit diverse Zellkultur-Experimente mit *LRRK2* G2019S-Zellen (Fibroblasten, welche von G2019S-Patienten stammen und Neurone, welche aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) differenziert wurden) durchgeführt wurden, soll ein wenig näher auf die Proteinfunktion von LRRK2 eingegangen werden.

Das *LRRK2*-Gen besitzt 51 Exons und kodiert für ein 280kDa großes Multidomänen- und multifunktionales Protein. Es gehört zur Genfamilie der Roco-Gene (Marin 2006). ROCO-Proteine besitzen zwei charakteristische Domänen, die ROC-Domäne (ras of complex) und die COR-Domäne (c-terminal of ROC). Die ROC-Domäne besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, während die Funktion der COR-Domäne bislang nicht bekannt ist (Bosgraaf and Van Haastert 2003). Überdies besitzt das Protein am N-Terminus eine Ankyrin-Domäne (ANK), bestehend aus sieben Ankyrin-Repeats, gefolgt von einer Leucin-reichen Repeat-Domäne (LRR) mit dreizehn Repeats. C-Terminus der COR-Domäne sitzt die wichtige Kinase-Domäne, gefolgt von sieben Repeats der WD40-Domäne (Kumari and Tan 2009; Mata, et al. 2006; Shen 2004; Tsika and Moore 2012).

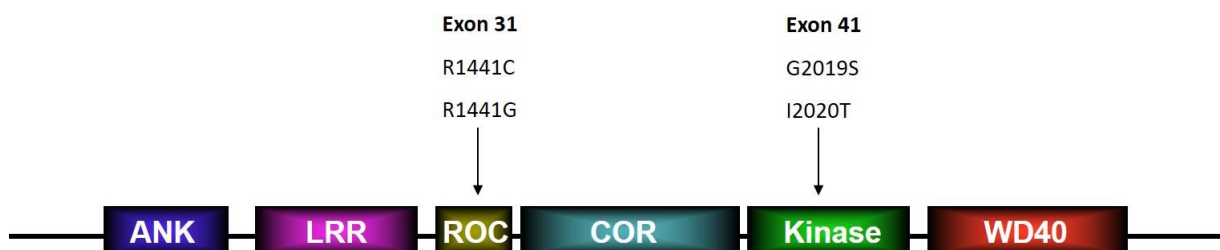


Abbildung 1.3: Proteindomänenstruktur von LRRK2 LRRK2 ist ein großes Multidomänenprotein. Am N-Terminus beginnt es mit der Ankyrin-Domäne (ANK), gefolgt von der Leucin-reichen Repeat-Domäne (LRR), der ras of complex (ROC)-Domäne, der c-terminal of ROC (COR)-Domäne, der Kinase-Domäne und am C-Terminus die WD40-Domäne. Ausgewählte pathogene, auch in Tabelle 1.1 aufgeführte, Mutationen im *LRRK2* sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die meisten pathogenen Mutationen wurden in der wichtigen ROC-COR-Kinase-Region des *LRRK2*-Gens identifiziert (Abb. 1.3), weshalb die meisten Studien zur Funktionalität des Proteins für diese Domänen zu finden sind, u.a. von Greggio, et al. 2008; Greggio, et al. 2006b; Lewis, et al. 2007; Li, et al. 2007; Smith, et al. 2006b. So scheint mutiertes LRRK2 eine erhöhte Kinase-Aktivität aufzuweisen, was den neuronalen Zelltod begünstigt (Smith, et al. 2006c; West, et al. 2007; West, et al. 2005). Die Frage, wie die Kinaseaktivität des LRRK2 reguliert sein könnte, wurde daraufhin in vielen Studien untersucht. Interessanterweise scheint die G2019S-Mutation die Kinaseaktivität selbst zu stimulieren (Greggio, et al. 2006a; Jaleel, et al. 2007;

West, et al. 2007; West, et al. 2005). Heute geht man davon aus, dass die Punktmutationen im *LRRK2*-Gen zu einem *gain-of-function* führen (Cookson 2010).

Der genaue Pathomechanismus, wie mutiertes LRRK2 dazu führt, dass die dopaminergen Neurone der Substantia nigra absterben und es zum Morbus Parkinson kommt, konnte bis heute nicht aufgeklärt werden. Dazu gibt es viele verschiedene Theorien. Beispielsweise soll LRRK2 an der Regulation des Auswachsens der Neurone beteiligt sein und es wurde gezeigt, dass die Neurone durch die G2019S-Mutation deutlich kürzere Fortsätze aufwiesen (MacLeod, et al. 2006; Plowey, et al. 2008). Aber auch Prozesse wie Neuroinflammation (Dzamko, et al. 2015), Autophagy, Defizite im vesikulären Transport und Interaktionen mit Mikrotubuli werden diskutiert, um nur einige zu benennen (Gomez-Suaga, et al. 2012; Law, et al. 2014; Parisiadou and Cai 2010; Sanna, et al. 2012).

1.2 Eisenhomöostase und Regulation im Körper

Eisen ist für den menschlichen Körper unentbehrlich, da es für die Funktion zahlreicher prosthetischer Gruppen unabdingbar ist (Lee, et al. 2006; Rouault 2006) und somit eine fundamentale Rolle in metabolischen Prozessen spielt (Hentze, et al. 2010; Rouault 2013), welche wiederum wichtig für einen gut funktionierenden Organismus sind. Es spielt beispielsweise eine essentielle Rolle in der DNA-Synthese, der Synthese des Hämoglobins und der Atmungskette (Ghosh, et al. 2015). Daher ist die Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase durch die Aufnahme, Verteilung, Speicherung und Abgabe des Eisens aus den Körperzellen streng reguliert, um sowohl eine Depletion als auch einen Überschuss von freiem Eisen mit all seinen schädlichen Folgen für den Organismus zu vermeiden. Im Falle einer insuffizienten Eisenversorgung würden beispielsweise zahlreiche Eisen-abhängige Proteine in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, was zu kognitiven Beeinträchtigungen oder Erkrankungen wie Anämie führen kann (Ghosh, et al. 2015). Im umgekehrten Fall einer zu hohen Eisenkonzentration könnte dies zu einer Oxidation mit nachfolgender Schädigung diverser Proteine, Nukleinsäuren und auch von Lipiden führen (Rouault 2006) und Erkrankungen wie Hämochromatose hervorrufen (Ghosh, et al. 2015). Überdies gibt es einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Konzentration von Eisen im Gehirn mit neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson, der Alzheimer-Erkrankung und der Friedreich-Ataxie (Rouault 2013; Zecca, et al. 2004b).

1.2.1 Eisenaufnahme in den menschlichen Körper über die Enterozyten

Eisen, welches mit der Nahrung aufgenommen wird, kann entweder in dreiwertiger Form vorliegen (Fe^{3+}), wenn es aus pflanzlicher Nahrung aufgeschlossen wird oder in zweiwertiger Form (Fe^{2+}), wenn es aus tierischer Nahrung stammt. Der menschliche Körper kann tierisches, zweiwertiges Eisen wesentlich besser verwerten als pflanzliches dreiwertiges Eisen, da dieses

Einleitung

meist fest gebunden vorliegt. In der Mukosa des Duodenums wird das zweiwertige Eisen mit Hilfe des sog. Divalenten Metal Transporter 1 (DMT1), welcher ein Membrantransporter ist, in die Enterozyten des Darms aufgenommen (Mims and Prchal 2005). Liegt das Eisen in Form von Fe^{3+} vor, muss es vorher in die transportfähige Fe^{2+} - Form reduziert werden, damit es über den DMT1-Transporter aufgenommen werden kann. Dies geschieht mit Hilfe einer membrangebundenen Reduktase, der sog. Dcytb (duodenal cytochrome b), welche besonders stark an den duodenalen Enterozyten exprimiert vorliegt (Choi, et al. 2012; McKie 2008).

Das zweiwertige Eisen in den Enterozyten kann nun verschiedene Wege gehen. Entweder es verbleibt in den Zellen und ist frei zugänglich in den labilen Eisenpool (LIP) der Enterozyten eingeschleust worden, indem es an bislang unbekannte Moleküle bindet. Die zweite Möglichkeit ist eine Speicherung des Eisens in Form von Ferritin, einem Eisenspeicherprotein, in den Enterozyten (Ghosh, et al. 2015). Ebenso kann das zweiwertige Eisen auch über einen basolateralen Eisenexporter weitergegeben werden (Abb. 1.4).

1.2.2 Weitergabe des Eisens in die Blutzirkulation

Im Falle einer Weitergabe des zweiwertigen Eisens der Enterozyten wird das Fe^{2+} nun an der basolateralen Seite der Enterozyten von dem einzig bekannten Eisenexporter, dem Ferroportin-1 (FP1), aufgenommen und in die Blutzirkulation abgegeben (Abboud and Haile 2000; Anderson and Vulpe 2009; Donovan, et al. 2000; McKie, et al. 2000). Bei diesem Transport durch das FP1 wird das zweiwertige Eisen durch eine membrangebundene Ferroxidase, dem sog. Hephaestin (HEPH), zu Fe^{3+} oxidiert (Vulpe, et al. 1999).

Diese dreiwertige Form des Eisens wird nun von dem Serum-Transportprotein Transferrin (Tf) in die Blutzirkulation aufgenommen (Wessling-Resnick 2006) und erreicht auf diesem Weg alle wichtigen Organe des Körpers.

1.2.3 Verteilung des Eisens in die Körperzellen

Über die Bindung des Tf an den Transferrinrezeptor-1 (TfR1), welcher auf der Plasmamembran der Gewebszellen lokalisiert ist, kommt es zur Bildung eines Tf-TfR1-Komplexes. Dieser Komplex wird über einen Endozytoseprozess in die Gewebszelle in Form eines Vesikels (Endosom) internalisiert. Mit Hilfe einer ATPase werden H^+ -Ionen in das Innere des Endosoms gepumpt, was eine Azidifizierung des inneren Milieus bewirkt. Aufgrund des sauren pH-Wertes kommt es zu einer Konformationsänderung des Tf-TfR1-Komplexes, in dessen Folge nun das Fe^{3+} vom Tf in das Vesikel freigegeben und über eine vesikuläre Reduktase, *six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3* (Steap3) in Fe^{2+} reduziert wird (Andrews 2000; Ohgami, et al. 2005; Ohgami, et al. 2006). Nach Freigabe des Eisens aus dem Tf-TfR1-Komplex wird das Tf und der TfR1 wieder recycelt und an die Zelloberfläche zurück transportiert (Ghosh, et al. 2015).

Einleitung

Über den DMT1-Transporter, welcher in der endosomalen Membran sitzt, wird nun das Fe^{2+} ins Cytosol der Zelle transportiert (Fleming, et al. 1998) und steht für alle wichtigen Funktionen der Zelle (z.B. DNA-Synthese oder Häm-Synthese) zur Verfügung (Abb. 1.4). Eisen, welches von der Zelle nicht benötigt wird, kann entweder in Form von Ferritin gespeichert oder über FP1 aus der Zelle ins Plasma ausgeschleust werden (Ghosh, et al. 2015). Hierbei wird es entweder über HEPH oder Ceruloplasmin (CP) in seine dreiwertige Form oxidiert, kann wieder an Tf binden und über den Blutfluss zu anderen Körperzellen transportiert werden (Vulpe, et al. 1999; Wolf, et al. 2006).

1.2.4 Non-transferrin-bound-iron (NTBI)

Normalerweise wird Eisen über den bereits beschriebenen Vorgang der Internalisierung des Tf-TfR1-Komplexes in Körperzellen aufgenommen. Es gibt allerdings auch die Möglichkeit, dass Eisen nicht über Transferrin in die Zelle eingeschleust wird, wenngleich dies unter physiologischen Bedingungen kaum der Fall ist, da Transferrin eine extrem hohe Eisenaffinität aufweist (Anderson and Vulpe 2009).

Diese Erkenntnisse stammen aus Studien, bei denen eine angeborene Defizienz von Transferrin (Hypo- oder Atransferrinämie) zu Grunde lag. Trotz dieses „Nichtbesitzes“ von Transferrin wurde Eisen in den Körperzellen beobachtet, welches sogar sehr schnell in die Zellen eindringt (Bernstein 1987; Hayashi, et al. 1993). Wie es das Eisen schafft durch die Plasmamembran der Zellen zu dringen, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es gibt mehrere denkbare Theorien, über die der Eisentransport möglicherweise bewerkstelligt wird (Barisani and Conte 2002; Liuzzi, et al. 2006). Ein möglicher Kandidat ist DMT1, wenngleich DMT1 knock-out Mäuse trotzdem eine Eisenakkumulation in der Leber zeigten (Gunshin, et al. 2005). Somit muss es auch noch andere Wege geben, über die Eisen in die Zelle gelangen kann.

Einleitung

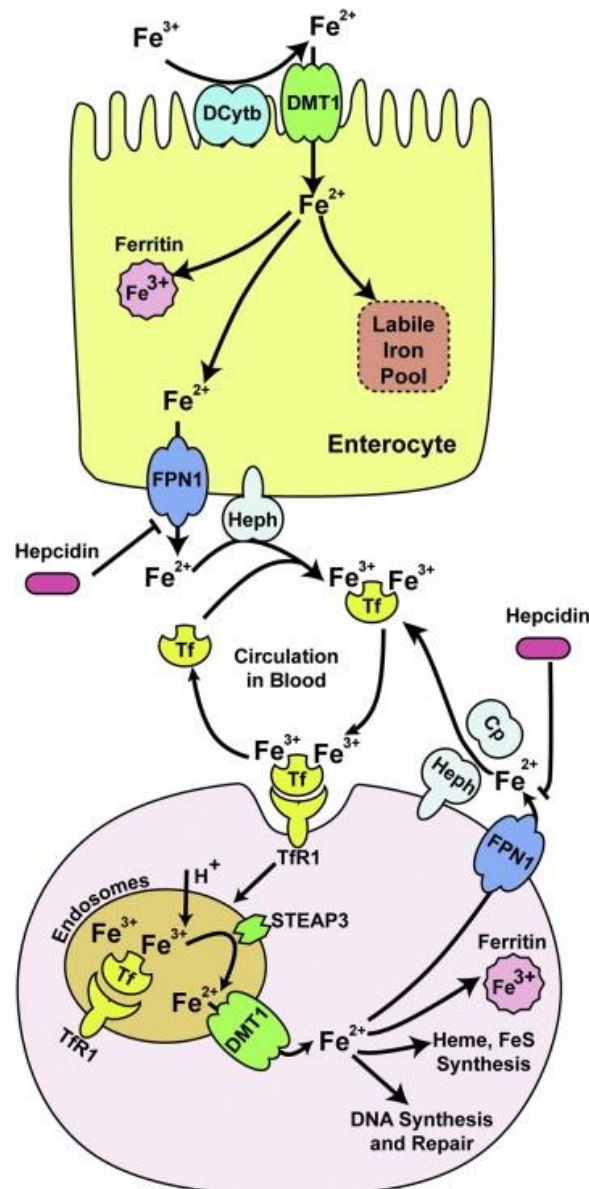


Abbildung 1.4: Eisenaufnahme über Enterozyten in den Körper und Verteilung über die Blutzirkulation in die einzelnen Körperzellen. Von oben nach unten: Mit der Nahrung aufgenommenes Eisen wird, wenn notwendig, mit Hilfe einer membrangebundenen Reduktase (DCytb) in zweiwertiges Eisen reduziert und über den DMT1-Transporter in die Darmzellen eingeschleust. Dort kann Eisen entweder in dem labilen Eisenpool (LIP) der Zelle verbleiben, in Form von Ferritin gespeichert werden oder über einen basolateralen Eisenexporter, dem Ferroportin-1 (FPN1, auch FP1 genannt) aus den Enterozyten in die Blutzirkulation transportiert werden. Dazu wird es über die membrangebundene Ferroxidase Hephaestin (HEPH) in dreiwertiges Eisen oxidiert, damit es im Blut an Transferrin (TF) binden kann. Eisen-gesättigtes Transferrin bindet an einen Transferrinrezeptor-1 (TfR1), welcher sich auf der Oberfläche von Körperzellen befindet. Dieser Tf-TfR1-Komplex wird in die Körperzelle über Endozytose internalisiert. Durch eine vesikuläre ATPase, welche H^+ -Ionen in das Innere des Endosoms einschleust, kommt es zur Azidifizierung innerhalb des gebildeten Endosoms. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Tf und auch des TfR1. Dadurch wird das gebundene Eisen in das Endosom abgegeben. Das dreiwertige Eisen wird über eine vesikuläre Reduktase (STEAP3) in zweiwertiges Eisen reduziert und kann somit über den DMT1-Transporter in der Vesikelwand ins Zytosol der Körperzelle gelangen. Dort kann es entweder für metabolische Prozesse verwendet werden oder in Form von Ferritin gespeichert werden. Ebenso kann es über den Eisenexporter FPN1 in die Blutzirkulation zurück gelangen. Dort wird es entweder über die Ferroxidase HEPH oder Ceruloplasmin (CP) in dreiwertiges Eisen oxidiert, damit es erneut an Tf binden kann und über die Zirkulation andere Zellen erreicht. Das Peptidhormon Hepcidin, welches von der Leber sezerniert wird, reguliert die systemische Eisenhomöostase, indem es posttranslational mit Ferroportin-1 interagiert. Abbildung aus (Ghosh, et al. 2015)

1.2.5 Regulation des zellulären Eisenmetabolismus

Die Regulation der zellulären Eisenhomöostase wird weitgehend von zwei zytoplasmatischen Proteinen reguliert, welche *iron regulatory protein 1* und *2* (IRP1 und IRP2, auch als IREB2 bekannt) genannt werden. Diese binden posttranskriptional an konservierte RNA-Sekundärstrukturen, sogenannte *iron regulatory elements* (IREs), welche sich im 5' oder auch im 3' - UTR Bereich der mRNA ihrer Targetgene befinden und können dadurch ihre Translation in Abhängigkeit der Eisenkonzentration aktivieren oder auch verhindern (Anderson, et al. 2012; Hentze, et al. 2010; Rouault 2006; Wilkinson and Pantopoulos 2014; Zecca, et al. 2004c). Diesem Regulationsmechanismus unterliegen diverse Targetgene, u.a. sowohl die Expression des Eisenimportproteins Transferrinrezeptor-1 (TfR1), sowie die Expressionen des Eisenspeicherproteins Ferritin und des Eisenexportproteins Ferroportin-1 (FP1) (Ghosh, et al. 2015; Muckenthaler, et al. 2008; Recalcati, et al. 2010). Durch eine Bindung von IRP1 oder IRP2 (IREB2) an ein IRE im 5' - UTR Bereich wird die Translationsinitiation der entsprechenden Gene inhibiert. Hingegen führt eine Bindung an die IREs im 3' - UTR Bereich zur Translation der entsprechenden Gene (Muckenthaler, et al. 2008).

Befinden sich die Körperzellen in einem Zustand der Eisendefizienz binden die IRPs sowohl an die IREs im 3' - UTR Bereich von TfR1, als auch an die IREs im 5' - UTR Bereich von Ferritin und Ferroportin-1. Dadurch kommt es zur Translation des TfR1, was zu einer erhöhten Eisenaufnahme in die Zelle befähigt, als auch zur Inhibition der Translation des Eisenspeicherproteins und des Eisenexporters. Im Falle einer Eisen-übersättigten Zelle lösen sich die IRPs von den IREs ihrer Targetgene, sodass nun kein weiteres Eisen mehr in die Zelle eingeschleust wird und überschüssiges Eisen entweder exportiert werden kann bzw. gespeichert wird (Abb. 1.5).

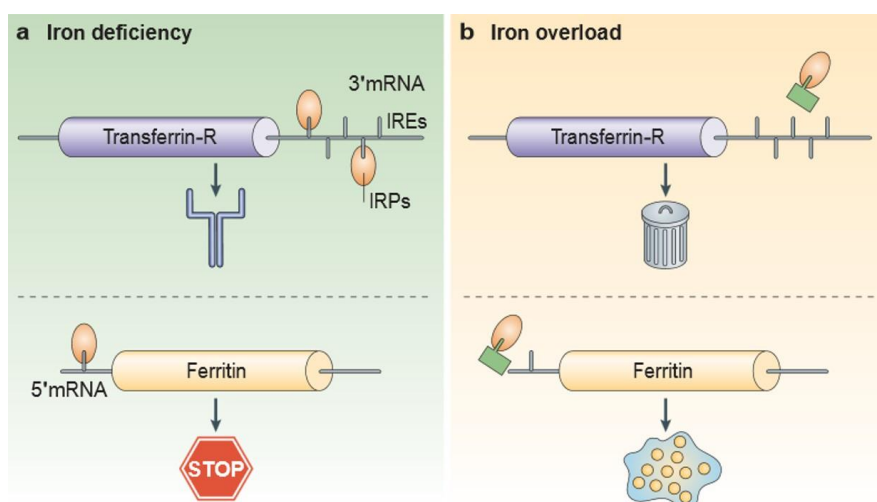


Abbildung 1.5: Zelluläre eisenkonzentrationsabhängige Bindung der IRPs mit den IREs a Im Fall einer geringen zellulären Eisenkonzentration binden IRPs an IREs im 5' und 3' - UTR Bereich der mRNAs ihrer Targetgene. Eine Bindung im 3' - UTR Bereich hat zur Folge, dass das entsprechende Gen (Transferrinrezeptor-1) translatiert werden kann. Durch eine Bindung im 5' - UTR Bereich (Ferritin) wird die Translation inhibiert. Somit wird gewährleistet, dass genügend Eisen in die Zellen aufgenommen werden kann und für metabolische Prozesse

Einleitung

zur Verfügung steht. **b** Im Fall einer übersättigten Zelle mit Eisen geschieht genau das Gegenteil. Die IRPs lösen sich von den IREs und somit werden nun Gene translatiert, welche Eisen speichern können (Ferritin). Im Gegensatz dazu werden Gene, welche Eisen aufnehmen würden (Transferrinrezeptor-1) in ihrer Translation inhibiert. Dadurch wird ein weiteres Beladen der Zelle mit Eisen verhindert. Abbildung aus Zecca, et al. 2004b.

Bei zu hohen Eisenkonzentrationen in der Zelle interagiert IRP2 (und auch apo-IRP1) mit einem Eisen-Sensor Protein, *F-box and leucine-rich repeat protein 5* (FBXL5), welches einen E3-Ligase-Komplex (*SKP1-CUL1-F-box*, SCF) rekrutiert. Dadurch wird IRP2 über Ubiquitinierung dem proteasomalen Abbauweg zugeführt (Salahudeen, et al. 2009; Vashisht, et al. 2009). Das FBXL5-Protein besitzt eine Proteindomäne (hemerythrin-like domain), welche als ein Eisen-Sensor agiert. Eine direkte Bindung von Eisen an diese Domäne stabilisiert FBXL5, wodurch mehr IRP2 abgebaut werden kann. Umgekehrt wird im Falle von zu wenig Eisen FBXL5 instabil und IRP2 bleibt erhalten.

IRP1 unterliegt bei zu hohen zellulären Eisenkonzentrationen einem anderen Regulationsmechanismus. Durch Bindung an ein Eisen-Schwefel-Cluster (4Fe-4S), welches als anorganischer Kofaktor agiert (Maio and Rouault 2016), kann es nicht mehr mit IREs interagieren, da es blockiert ist (Muckenthaler, et al. 2008; Walden, et al. 2006). Im gebundenen Zustand mit dem Eisen-Schwefel-Cluster übernimmt es die Funktion einer cytosolischen Aconitase. Es besitzt somit zwei Funktionen. Sinkt die Eisenkonzentration der Zelle, wird die Bindung mit dem Eisen-Schwefel-Cluster gelöst und es fungiert wieder über die Bindung mit den IREs (Abb. 1.6).

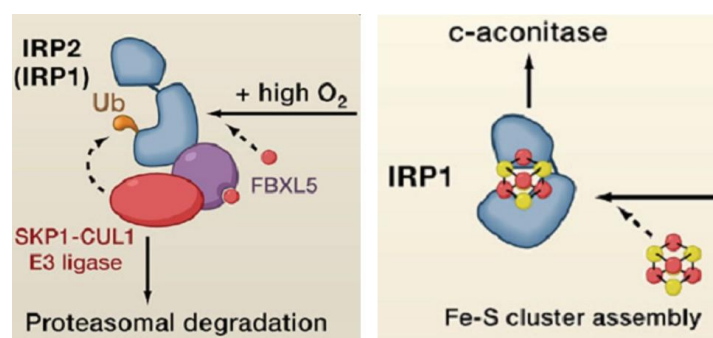


Abbildung 1.6: Inaktivierungsmechanismen von IRP1 und IRP2 bei hoher zellulärer Eisenkonzentration

Links: Im Fall einer zu hohen Eisenkonzentration innerhalb der Zelle werden Regulationsmechanismen aktiviert, um die Aktivität von IRP1 und IRP2 zu regulieren und zu beschränken. IRP2 und apo-IRP1 interagieren dabei mit einem FBXL5-Protein. Dieses Protein, welches die Eisenkonzentration der Zelle messen kann, rekrutiert nach Bindung mit den IRPs einen E3-Ligase-Komplex (SKP1-CUL1-F-box) und sorgt somit dafür, dass IRP2 (und apo-IRP1) über Ubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Rechts: IRP1 wird bei zu hohen Eisenkonzentrationen innerhalb der Zelle an ein Eisen-Schwefel-Cluster gebunden und kann somit nicht mehr an die IREs binden. Zusätzlich agiert es in diesem gebundenen Zustand als cytosolische Aconitase, es hat somit zwei Funktionen. Abbildung aus Hentze, et al. 2010.

Wie wichtig beide IRPs für einen funktionierenden Körper sind, zeigt sich aus Experimenten mit Mäusen. Wenn beide IRPs nicht mehr funktionstüchtig sind, sterben die Mäuse bereits im embryonalen Zustand und sind nicht lebensfähig (Smith, et al. 2006a). Im Gegensatz dazu

überleben die Tiere den *knock-out* von ausschließlich einem IRP und sind auch fertil. Während der *knock-out* von IRP1 bei den Mäusen scheinbar asymptomatisch verläuft (Meyron-Holtz, et al. 2004), zeigen sich beim *knock-out* von IRP2 (*IREB2*) deutliche klinische Veränderungen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Mäuse eine Tendenz zu erhöhter Neurodegeneration aufwiesen, sowie eine abnormale Eisenverteilung im Körper und eine mikrozytische Anämie (Cooperman, et al. 2005; Galy, et al. 2005).

Aufgrund der überaus wichtigen Funktion von IRP2 (*IREB2*) zur Aufrechterhaltung der zellulären Eisenhomöostase könnten genetische Veränderungen in *IREB2* einen Einfluss auf die Eisenregulation ausüben und möglicherweise zur Pathogenese der Eisenakkumulation in der SN beim Morbus Parkinson beitragen. Für Alzheimer-Patienten konnte in einer vorläufigen Studie eine Assoziation zwischen bestimmten Allelen im *IREB2*-Gen mit der Erkrankung nachgewiesen werden (Coon, et al. 2006).

1.2.6 Regulation des systemischen Eisenmetabolismus

Während die zelluläre Eisenhomöostase von IRP1 und IRP2 reguliert wird, erfolgt die Regulation des systemischen Eisenhaushaltes über das Peptidhormon Heparin, welches hauptsächlich von der Leber sekretiert wird (Ganz 2013; Ganz and Nemeth 2012; Hentze, et al. 2010). Heparin reguliert posttranslational die Expression des Eisenexporters Ferroportin-1 (FP1), welcher auf der Plasmamembran der Körperzellen exprimiert ist. Durch eine Bindung des N-Terminus des Heparins an FP1 wird eine Internalisierung des FP1 bewirkt, dem sich eine Ubiquitinierung und eine lysosomale Degradation des FP1 anschließt (Nemeth, et al. 2004). Dadurch kann weniger Eisen aus der Zelle in die Blutzirkulation abgegeben werden (Abb. 1.4). Heparin selbst unterliegt einer komplizierten transkriptionalen Regulation (zusammengefasst in (Hentze, et al. 2010)), auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll.

1.2.7 Hämoxygenase-1 (HO-1)

Hämoxygenase-1 (HO-1) ist ein wichtiges Schlüsselenzym im Katabolismus vom Häm des Hämoglobins. Es katalysiert die oxidative Spaltung von Häm und dabei entsteht Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und zweiwertiges freies Eisen (Shibahara 1994). Möglicherweise schützt HO-1 die Zellen vor oxidativen Stress, indem es das prooxidative Häm in das Pigment Biliverdin und später in Bilirubin umwandelt (Barañano and Snyder 2001; Doré, et al. 1999; Nakagami, et al. 1993; Stocker, et al. 1987). Andererseits sind die zusätzlich entstehenden Produkte des Häm-Abbaus CO und Fe^{2+} in der Lage die Zellen durch oxidativen Stress zu schädigen, indem sie die Fenton-Reaktion begünstigen (Frankel, et al. 2000; Zhang and Piantadosi 1992). In Säugetieren gibt es zwei vorkommende Isoformen, *HO-1* und *HO-2* (Schipper 2004a). Während *HO-1* durch zahlreiche Stimuli induzierbar ist (z.B. durch Häm, H_2O_2 , Dopamin oder UV-Licht), liegt *HO-2* konstitutiv exprimiert vor (Denery 2000; Schipper 2000). Studien von

Schipper und Kollegen konnten HO-1 in den Lewy-Körperchen bei Parkinson-Patienten nachweisen, sowie eine starke Überexpression von HO-1 in den Astrozyten der Substantia nigra bei Parkinson-Erkrankten nachweisen (Schipper, et al. 1998). Daher scheint das Gen *HO-1* eventuell bei der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung eine Rolle zu spielen.

1.3 Eisenhomöostase im zentralen Nervensystem (ZNS)

Seitdem es zunehmend Hinweise dafür gibt, dass Veränderungen im Eisenhaushalt des Gehirns zur Pathogenese zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen beitragen, ist es umso wichtiger geworden, die physiologischen Prozesse im Eisenmetabolismus des Gehirns besser zu verstehen (Rouault 2013). Dabei sei festzuhalten, dass wesentlich mehr über den systemischen Eisenmetabolismus bekannt ist (wie in 1.2 beschrieben) als über den Eisenmetabolismus im menschlichen Gehirn.

1.3.1 Barrieren zwischen der Blutzirkulation und dem zentralen Nervensystem (ZNS)

Für einen gesunden und gut funktionierenden Organismus ist das menschliche Gehirn von größter Bedeutung. Daher gibt es physiologische Diffusionsbarrieren zwischen dem zentralen Nervensystem (ZNS) und der systemischen Blutzirkulation, um ein Eindringen schädlicher Substanzen oder Krankheitserreger in dieses lebenswichtige Organ zu verhindern.

Die erste Barriere, die in dieser Dissertation etwas ausführlicher behandelt wird, ist die Blut-Hirn-Schranke (BBB) (Abbott 2005; Ballabh, et al. 2004; Brightman, et al. 1970), welche in allen Organismen mit einem gut ausgebildeten ZNS nachweisbar ist. Die zweite Barriere wird von den Epithelzellen des Plexus choroideus gebildet und ist bekannt als Blut-Liquor-Schranke (BCSFB) (Abbott, et al. 2010). Eine letztlich nicht zu vernachlässigende Barriere wird durch die gefäßfreie Spinnwebshaut (Arachnoidea mater) zwischen der Dura mater und der Pia mater (Abbott, et al. 2006) erreicht.

1.3.2 Anatomie der Blut-Hirn-Schranke

Für die Aufrechterhaltung der wichtigen Diffusionsbarriere der BBB sind diverse anatomische Besonderheiten in der BBB notwendig. Im Vergleich zu den üblichen Endothelzellen des Körpers besitzen die Endothelzellen der BBB, welche die Wände der Kapillaren auskleiden, keine Fenestrierungen, weisen wesentlich mehr *Tight junctions* (TJs) auf und haben eine geringere pinozytotische Aktivität (Ballabh, et al. 2004). Zusätzlich werden die Endothelzellen von einer Basallamina umgeben sowie in unregelmäßigen Abständen von Perizyten. Darauf befinden sich die „Endfüßchen“ der Astrozyten, welche sich umhüllend um die Endothelzellen anlagern (Abbott, et al. 2010) (Abb. 1.7A).

Einleitung

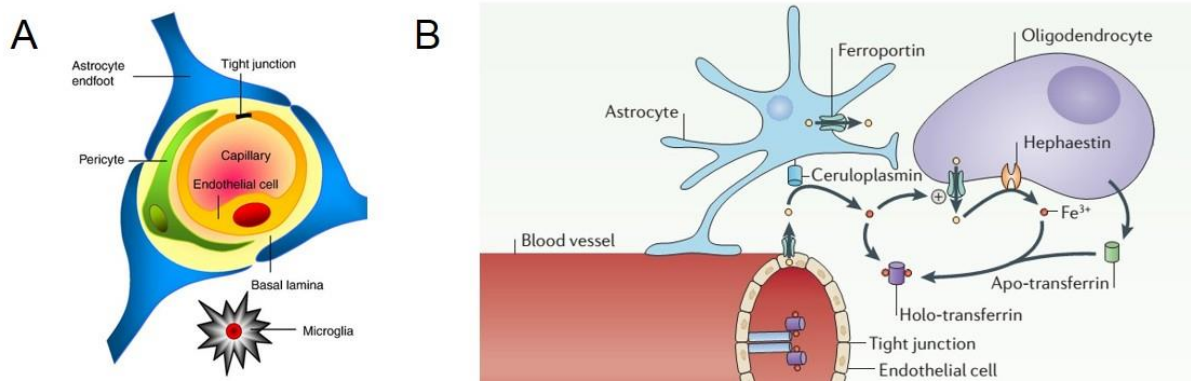


Abbildung 1.7: Anatomie der Blut-Hirn-Schranke (A) und Wege der Eisenaufnahme durch die BBB (B)
In Abbildung A ist die zelluläre Anatomie der Blut-Hirn-Schranke dargestellt. Die nicht fenestrierten Endothelzellen besitzen viele *Tight junctions* und sind von einer Basallamina sowie von Pericyten umgeben. Darauf anliegend findet man die Endfüße der Astrozyten, die sich umhüllend darum anlagern. In Abbildung B ist gezeigt, dass Eisen in den Blutgefäßen gebunden an Transferrin vorliegt. Der Weg aus den Blutgefäßen findet über den Eisenexporter Ferroportin statt. Über die an den Astrozyten befindliche, membrangebundene Ferroxidase Ceruloplasmin wird das zweiwertige Eisen oxidiert und kann in der interstitiellen Flüssigkeit an Transferrin gebunden werden. Transferrin wird hauptsächlich von den Oligodendrozyten synthetisiert und in die interstitielle Flüssigkeit abgegeben. Ebenso befindet sich auch hauptsächlich auf den Oligodendrozyten die Ferroxidase Hephæstine. Abbildung links aus Abbott, et al. 2010, rechts aus Rouault 2013.

1.3.3 Transportmechanismen über die Blut-Hirn-Schranke

Um die BBB zu überwinden gibt es verschiedene Mechanismen in Abhängigkeit von Größe, Polarität und Löslichkeit der Substanzen. Nährstoffe wie beispielsweise Glukose oder Aminosäuren müssen über speziell lösliche Carrier (Solute Carriers, SLC) die BBB überwinden, während große Moleküle wie beispielsweise Transferrin gebundenes Eisen über Endo- bzw. Transzytose aufgenommen werden können (Bradbury 1997; Moos 2002; Zhang and Pardridge 2001). Dabei wird unterschieden, ob der vesikuläre Mechanismus über einen Rezeptor vermittelt wird (receptor-mediated transcytosis, RMT) oder über eine Adsorption stattfindet (adsorptive-mediated transcytosis, AMT) (Abbott, et al. 2010). Aber auch passive Diffusion von fettlöslichen, unpolaren Molekülen (Liu, et al. 2004) und Gasen wie Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid ist bekannt (Abbott, et al. 2010). Ebenso können mononukleäre Zellen über einen Vorgang der Diapedese durch das Cytoplasma der Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke passieren ohne dabei die *Tight junction*-Komplexe öffnen zu müssen, wie es früher vermutet wurde (Engelhardt and Wolburg 2004; Wolburg, et al. 2005).

Darüber hinaus sitzen sogenannte ABC-Transporter in der Endothelmembran und den Plasmamembranen von Astrozyten und Mikrogliazellen der BBB. Diese sind für einen sehr effizienten, aktiven Efflux (ATP-abhängig) von beispielsweise lipidlöslichen Substanzen oder von Medikamenten aus dem Gehirn in die systemische Blutzirkulation verantwortlich (Begley 2004). Sie spielen daher eine sehr wichtige Rolle im Prozess der Detoxifizierung des Gehirns und der Aufrechterhaltung einer vitalen Gehirnfunktion. Der am besten untersuchte ABC-Transporter, der in diesem Zusammenhang identifiziert wurde, ist das p-Glycoprotein (P-gp), welcher vom *MDR1*-Gen kodiert wird. Er erwies sich als ein sehr effizienter Efflux-Transporter,

da er zum einen im hohen Maße in der BBB exprimiert vorliegt, eine hohe Transportaktivität aufweist und zudem eine große Anzahl verschiedener Substanzen aktiv aus dem Gehirn abtransportieren kann (Dallas, et al. 2006). Eine Beeinträchtigung der BBB aufgrund einer Dysfunktion des P-gp könnte zur Pathogenese der Parkinson-Erkrankung beitragen, indem schädliche Substanzen nicht mehr ausreichend aus dem Gehirn abtransportiert werden könnten. Kortekaas und Kollegen fanden 2005 eine signifikante Erhöhung von [¹¹C]-Verapamil im Mittelhirn von Parkinson-Patienten, welches normalerweise von P-gp aus dem Gehirn exportiert wird (Kortekaas, et al. 2005). Daraufhin wurde angenommen, dass die Aktivität von P-gp bei Parkinson-Patienten reduziert ist. In weiteren Studien konnte diese Beobachtung im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung bestätigt werden (Bartels, et al. 2008b). Zudem scheinen drei SNPs im *MDR1*-Gen in der chinesischen Bevölkerung mit der Parkinson-Erkrankung assoziiert (Lee, et al. 2004a) vorzuliegen und ein bestimmter Haplotyp im *MDR1*-Gen soll sogar protektiv im Falle eines Parkinsons sein (Tan, et al. 2005).

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit u.a. der Fragestellung nachgegangen werden, ob sich diese verminderte Aktivität des P-gp auf eine genetische Veränderung im *MDR1*-Gen zurückführen lässt.

1.3.4 Eisenaufnahme ins Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke

Innerhalb des zentralen Nervensystems ist der Eisenzyklus prinzipiell an dieselben Proteine gebunden wie aus der systemischen Eisenzirkulation bekannt (in Kapitel 1.2 beschrieben). Trotzdem gibt es einige Besonderheiten (Rouault 2013).

Auf der luminalen Seite der Endothelzellen der BBB sitzen Transferrinrezeptoren, welche holo-Transferrin (Eisen-gesättigtes Transferrin) binden und somit den Eintritt von Eisen in die Endothelzellen über einen Tf-TfR1-Komplex ermöglichen (Moos 2002). Auf der abluminalen Seite der Endothelzellen der BBB ist der Eisenexporter Ferroportin-1 exprimiert, welcher das Eisen aus der Endothelzelle in die interstitielle Flüssigkeit des Gehirns transportieren kann (McCarthy and Kosman 2013; Wu, et al. 2004). Es sei hierbei zu erwähnen, dass Ferroportin-1 nicht in alle Studien in den Endothelzellen der BBB nachzuweisen war (Moos, et al. 2007). Die Endothelzellen werden von den „Endfüßchen“ der Astrozyten umhüllt (Abbott, et al. 2010), welche eine membrangebundene Form der Ferroxidase Ceruloplasmin (CP) aufweisen. Durch die Oxidation des Eisens über CP wird eventuell die Exportaktivität des Ferroportin-1 der anliegenden Endothelzellen erleichtert (Kono 2012). Eine andere Ferroxidase, das Hephaestin, wird auf anderen speziellen Zellen des ZNS, den Oligodendrozyten, exprimiert (Rouault 2013) (Abb. 1.7B).

In der interstitiellen Flüssigkeit des Gehirns bindet das dreiwertige Eisen dann an Transferrin, welches hauptsächlich von den Oligodendrozyten synthetisiert und ins Interstitium abgegeben wird (Zakin, et al. 2002). Das so gebundene Eisen diffundiert nun als holo-Transferrin durch die interstitielle Flüssigkeit des Gehirnparenchyms zu den Zellen, welche

Eisen über einen Transferrinrezeptor internalisieren können (Bradbury 1997). Neurone und auch Gliazellen erwerben über den Prozess des Tf-TfR1-Komplexes wahrscheinlich einen Großteil ihres Eisenbedarfes (Rouault 2013), wohingegen Astrozyten nicht über einen TfR auf ihrer Membran verfügen und ihr Eisen daher über einen anderen Mechanismus aufnehmen müssen.

Ebenso denkbar ist die Aufnahme von Eisen ins ZNS über die Epithelzellen der Blut-Liquor-Schranke (Rouault and Cooperman 2006).

1.3.5 Eisenmetabolismus im ZNS

Die meisten Zellen des Gehirns decken ihren Eisenbedarf über den bereits beschriebenen Prozess der Eisenaufnahme mit Hilfe des Transferrinrezeptor-1 und des endosomalen DMT1, speichern Eisen in Form von Ferritin und können es über den Eisenexporter Ferroportin-1 wieder aus den Zellen abgeben. Zusätzlich verfügen sie über die mitochondrialen Eisenimporter Mitoferrin-1 und/oder Mitoferrin-2, was ihnen ermöglicht Eisen in die Mitochondrien einzuschleusen (Rouault 2013). Überdies erfolgt die Regulation des zellulären Eisenhaushaltes innerhalb des ZNS ebenfalls über die zwei zytoplasmatischen Proteine IRP1 und IRP2 (Rouault 2006) wie bereits in Kapitel 1.2.5 beschrieben, wenn gleich IRP2 weitaus höher in Zellen des ZNS exprimiert vorliegt als IRP1 (Meyron-Holtz, et al. 2004).

Eine Spezialisierung im menschlichen Gehirn verglichen mit dem systemischen Eisenmetabolismus zeigt sich bei den Ferroxidasen Ceruloplasmin (CP) und Hephaestin (HEPH). Während CP in der systemischen Blutzirkulation ungebunden vorkommt, ist es im Gehirn über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Membran der Astrozyten verankert (Jeong and David 2003) und hauptsächlich dort nachweisbar. Hingegen ist HEPH fast ausschließlich in der Membran der Oligodendrozyten zu finden (Schulz, et al. 2011). Zudem wird Transferrin hauptsächlich von den Oligodendrozyten synthetisiert und in die interstitielle Flüssigkeit abgegeben (Rouault 2013; Zakin, et al. 2002). Da verwundert es nicht, dass Oligodendrozyten eine sehr starke Färbung für Transferrin aufweisen, wohingegen Mikrogliazellen die stärkste Färbung für Ferritin und Neurone besonders stark TfR1 exprimieren (Connor, et al. 1990). Eine weitere Besonderheit der Oligodendrozyten zeigt sich in der Expression des TfR1 (Rouault 2013). Während sie als unreife Zellen den TfR1 auf ihrer Membran exprimieren, konnte dieser Rezeptor auf der Membran reifer Oligodendrozyten nicht nachgewiesen werden. Dieses Fehlen des TfR1, jedoch ein Nachweis von Rezeptoren für H-Ferritin auf der Membran führt zu der Vermutung, dass Oligodendrozyten ihren Eisenbedarf über H-Ferritin decken (Todorich, et al. 2011).

Eine Besonderheit in den neuromelaninhaltigen dopaminergen Neuronen der Substantia nigra sei noch zu erwähnen. In diesen Zellen ist nicht Ferritin der Hauptspeicher für dreiwertiges zelluläres Eisen, sondern Neuromelanin (Weinreb, et al. 2013), welches ein komplexes

polymerisches Molekül ist, das für die dunkle Färbung der dopaminergen Neurone der SN verantwortlich ist (Zecca, et al. 2003).

1.3.6 Verteilung des Eisens im menschlichen Gehirn

In den zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts gab es erstmals eine farblich veröffentlichte Studie, welche eine spezifische Färbung des menschlichen Gehirns für Eisen zeigte. Hervorzuheben sei hier, dass die Verteilung des Eisens im Gehirn sehr unterschiedlich zu sein schien. Somit waren Gehirnareale wie der Globus pallidus, der Nucleus ruber und die Substantia nigra sehr stark angefärbt, was auf eine hohe Menge Eisen hinwies, gefolgt vom Nucleus caudatus, dem Putamen, dem subthalamischen Nucleus und dem Nucleus dentatus des Kleinhirns (Spatz 1922). Auffallend ist hier, dass diese Bereiche des Gehirns für die willkürliche Motorik des Körpers sehr wichtig sind. In folgenden Studien wurde gezeigt, dass die Eisenakkumulation in Gehirnen von Säugetieren mit dem Alter zunimmt (Hallgren and Sourander 1958; Hill and Switzer 1984; Koeppen 2003), was generell erst einmal nicht mit einer pathologischen Entwicklung assoziiert ist. Aus immunhistochemischen Untersuchungen geht hervor, dass das Eisen dort hauptsächlich gespeichert in Form des Eisenspeicherproteins Ferritin vorliegt (Koeppen 2003; Zecca, et al. 2004c). Weshalb die Eisenakkumulation allerdings genau in diesen ausgewählten Hirnarealen stattfindet, konnte bis heute nicht aufgedeckt werden. Es wird spekuliert, dass die hohen Eisenkonzentrationen eventuell als ein ZNS-Eisen-Reservoir fungieren könnten (Sullivan, et al. 2009; Vicente and Costa 2012).

1.4 Morbus Parkinson und Eisenakkumulation im Gehirn

Die Akkumulation von Eisen in spezifischen Regionen des Gehirns wird seit mehreren Jahren als eine mögliche Ursache der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, der Huntington-Erkrankung oder Amyotropher Lateralsklerose, diskutiert (Bartzokis, et al. 2000; Berg, et al. 2002a; Berg, et al. 2001a; Jellinger 1999; Smith, et al. 2004; Zecca, et al. 2004a; Zecca, et al. 2004b).

1988 veröffentlichte eine Studie, dass in *post-mortem* Gewebe der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten 176 % erhöhte Level an totalem Eisen und 225 % mehr dreiwertiges Eisen nachgewiesen wurde als im Vergleich bei gleichaltrigen Kontrollpersonen detektiert werden konnte (Sofic, et al. 1988). Diese hohen Konzentrationen von Eisen in den degenerierenden, neuromelaninhaltigen, dopaminergen Neuronen der Substantia nigra, sowie in den damit assoziierten aktivierten Mikrogliazellen wurde durch histopathologische und biochemische Techniken, sowie später durch bildgebende Verfahren wie MRT und Ultraschall bestätigt (Berg, et al. 2002b; Gerlach, et al. 2006; Gorell, et al. 1995; Götz, et al. 2004; Hare, et al. 2012; Hirsch 2006; Riederer, et al. 1989; Youdim and Riederer 1993). Genauer gesagt konnte eine Verschiebung der Ratio von Fe^{3+} zu Fe^{2+} beobachtet werden. Während diese Ratio bei

Einleitung

gesunden Personen im Verhältnis von 2:1 vorliegt, wurde eine Verschiebung bei Parkinson-Patienten auf 1:2 beobachtet (Sian-Hülsmann, et al. 2011; Sofic, et al. 1988).

Dies legt die Vermutung nahe, dass der erhöhte Eisengehalt in der Substantia nigra eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Parkinson-Erkrankung spielen könnte. Wenngleich die Frage, ob dieser erhöhte Eisengehalt die Ursache oder eine Folge der Zerstörung der dopaminergen Neurone ist, bis heute nicht vollständig geklärt werden konnte (Berg, et al. 2002a; Zecca, et al. 2004b).

Denkbar ist, dass der Prozess der Neurodegeneration durch die erhöhten Eisenkonzentrationen dadurch beschleunigt wird, dass vor allem intrazelluläres Fe^{2+} mit H_2O_2 reagiert und somit die hochreaktiven, zytotoxischen Hydroxylradikale (OH^*) über die Fenton-Reaktion entstehen. Dies wiederum könnte eine vermehrte Reaktion des Haber-Weiss-Zyklus anstoßen, was die Vervielfachung reaktiver Sauerstoffspezies nach sich zieht und somit die Zelle in massiven oxidativen Stress versetzt (Gerlach, et al. 1994; Youdim and Riederer 1993) mit der möglichen Folge des Zelltodes (Berg, et al. 2006; Youdim, et al. 1991). Eine andere Theorie geht davon aus, dass Eisen in den dopaminergen Neuronen der SN direkt an Dopamin binden kann und es so zur Formation toxischer Komplexe kommt (Arreguin, et al. 2009; Paris, et al. 2005). Diese Komplexe aus Dopamin und Eisen können möglicherweise die Formation von reaktiven Hydroxylradikalen beschleunigen.

Weshalb ausgerechnet in den neuromelaninhaltigen, dopaminergen Neuronen der SN der Parkinson-Patienten diese Eisenakkumulation zu finden ist, konnte bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine mögliche Theorie ist, dass dies aus Gefäßveränderungen im Mesencephalon während des Prozesses der Neurodegeneration resultieren könnte (Faucheux, et al. 1999). Ebenso diskutiert wird, ob Neuromelanin, welches in den dopaminergen Neuronen der SN vorkommt, zu dieser hohen Konzentration an Eisen beiträgt, da bekannt ist, dass es eine hervorragende Bindungskapazität für Eisen aufweist (Ben-Shachar, et al. 1991).

Aus einem Parkinson-Tiermodell (MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) weiß man, dass eine Behandlung mit Eisenchelatoren effektiv die Neurodegeneration hinauszögern kann bzw. verhindern konnte (Kaur, et al. 2003). Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass möglicherweise Eisenchelatoren eine Option in der Frühbehandlung des Morbus Parkinson sein könnten (Jomova and Valko 2011; Van der Schyf, et al. 2006; Whitnall and Richardson 2006).

1.4.1 Hyperechogenität der Substantia nigra

Anfang dieses Jahrtausends gab es erste Studien, dass Unterschiede in der Substantia nigra zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollen mit Hilfe des transkraniellen Ultraschalles (TCS) sichtbar gemacht werden konnten (Becker, et al. 1995; Berg, et al. 1999; Berg, et al. 2001b; Berg, et al. 2006; Berg, et al. 2002b). In über 90 % der untersuchten Parkinson-Patienten im Vergleich zu nur 9 % gesunder Kontrollen konnte eine hyperechogene Substantia nigra (SN) detektiert werden (Abb. 1.8) (Berg, et al. 1999; Berg, et al. 2001b).

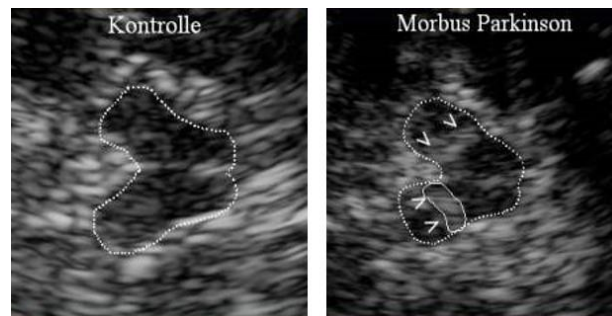


Abbildung 1.8: Transkranieller Ultraschall der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten und Kontrollen

In dieser Abbildung dargestellt, erkennt man einen Ausschnitt des Sichtfensters bei transkranieller Sonografie des Mittelhirns. Links auf dem Bild ist der mesencephale Hirnstamm von einer gesunden Kontrollperson eingekreist. Rechts mit weißen Pfeilen markiert, sieht man eine helle, vergrößerte Struktur innerhalb des mesencephalen Hirnstamms. Dies zeigt die Hyperechogenität der SN eines Parkinson-Patienten. (Bilder von Prof. Dr. Daniela Berg)

Während man zu Beginn dieser Entdeckung noch davon ausging, dass der Grad der Hyperechogenität der SN mit der Schwere und Dauer einer Parkinson-Erkrankung korreliert (Becker, et al. 1995), weiß man heute, dass dies nicht der Fall ist (Berg, et al. 1999).

Einige Studien weisen darauf hin, dass die Hyperechogenität mit der erhöhten Eisenkonzentration der SN bei Parkinson-Patienten assoziiert zu sein scheint (Berg, et al. 2002b; Götz, et al. 2004; Walter, et al. 2002). Mittlerweile ist die Hyperechogenität der SN zu einem sehr nützlichen Marker in der Differentialdiagnose des Morbus Parkinson geworden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte u.a. untersucht werden, ob es eine genetische Veränderung in ausgewählten, am Eisenstoffwechsel und der Blut-Hirn-Schranke (BBB) beteiligten Genen gibt, die auf einen gestörten Eisenmetabolismus hinweisen und somit eher für einen primären Prozess in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung sprechen würden.

1.5 Pathomechanismen der Parkinson-Erkrankung

Zur Aufklärung der zu Grunde liegenden Pathomechanismen beim Morbus Parkinson gibt es viele verschiedene Studien mit diversen Erklärungsansätzen. Dazu zählen beispielsweise die Hypothese einer mitochondrialen Dysfunktion, Defekte im Ubiquitin-Proteasom-System, die Akkumulation von Eisen, die Entwicklung von oxidativem Stress, Excitotoxizität oder auch Entzündungsprozesse – um nur Einige zu benennen (Jenner 1998; Jenner and Olanow 1998; McNaught and Jenner 2001; Youdim, et al. 1989).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nur ausgewählte Prozesse aufgegriffen und näher erläutert werden, bei welchen ein Bezug zum Eisenstoffwechsel hergestellt werden konnte.

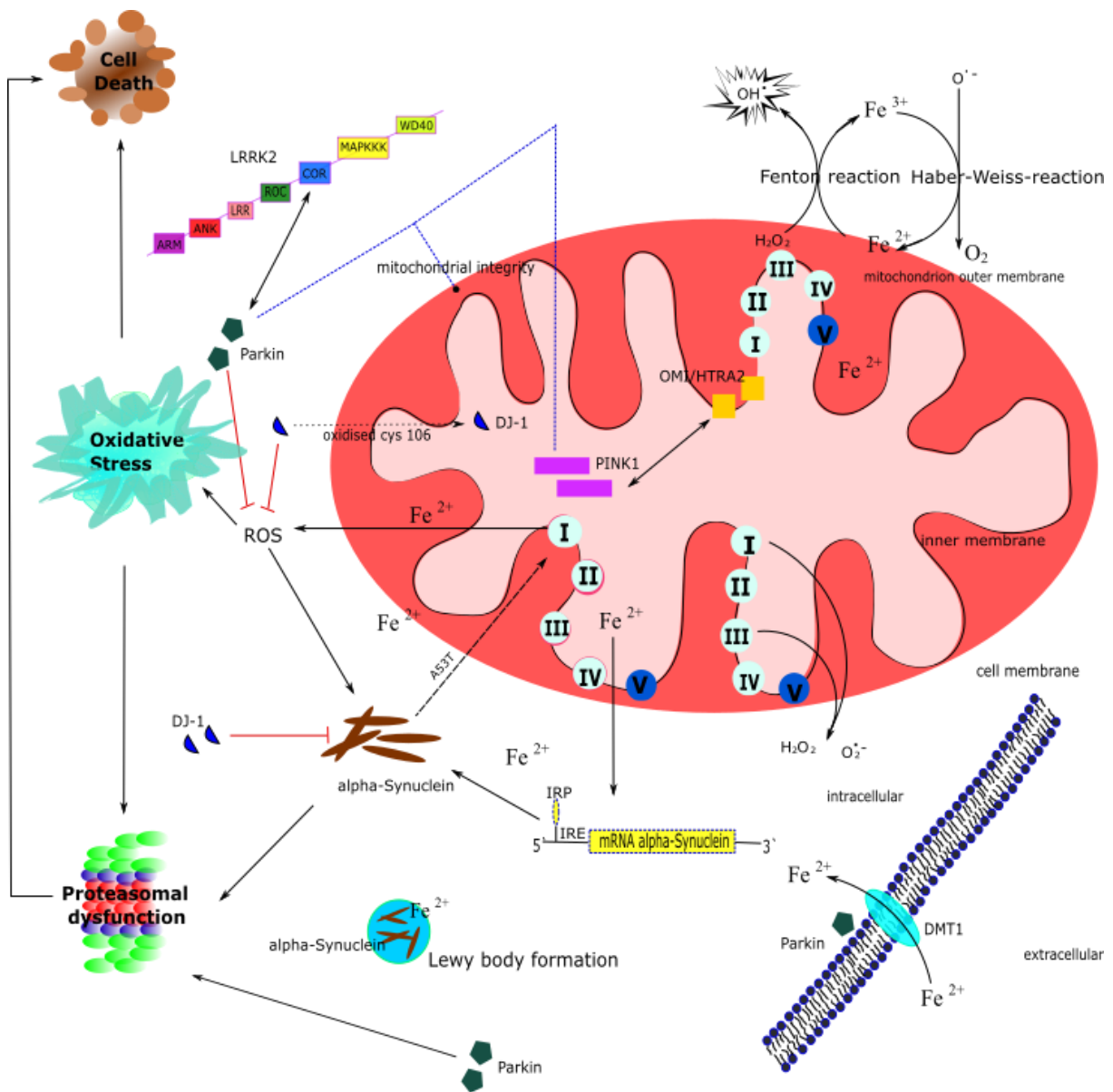


Abbildung 1.9: Übersicht über molekulare Mechanismen in der Pathogenese des Morbus Parkinson mit möglicher Eisenbeteiligung In dieser Abbildung sind ausgewählte, molekulare zelluläre Prozesse dargestellt, welche eine Relevanz bei der Pathogenese des Morbus Parkinson haben sowie einen Bezug zu Eisen.

Einleitung

Zentral von Bedeutung ist das rot dargestellte Mitochondrium mit der eingefalteten inneren Membran. Dort läuft sowohl die Fenton-Reaktion als auch der Haber-Weiss-Zyklus ab. Ebenso sitzen dort die Enzymkomplexe der Atmungskette. Eine Verminderung der Aktivität des Komplex I dieser Atmungskette in den Mitochondrien führt zu einer Beeinträchtigung der Elektronentransportkette und zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese ROS-Produktion wird durch erhöhte Mengen an Fe^{2+} beschleunigt. In Folge dieser Beeinträchtigung des Komplex I kommt es zu einer Akkumulation und Aggregation von alpha-Synuklein. Dies zieht eine Dysfunktion des Proteasoms nach sich und führt letztlich zum Zelltod. Ebenso kann eine Überexpression von alpha-Synuklein die Komplex I-Aktivität der Mitochondrien erniedrigen und somit die ROS-Produktion verstärken. All diese Effekte werden durch eine Überexpression von A53T alpha-Synuklein beschleunigt. Die zelluläre Eisenhomöostase im Körper wird durch das IRE/IRP-System reguliert. In der 5'-untranslatierten Region (5' - UTR) der mRNA von alpha-Synuklein scheint es aufgrund von *in silico* Daten ein IRE zu geben. Dies würde bedeuten, dass die Expression von alpha-Synuklein translational durch das IRE/IRP System reguliert wird und eisenabhängig zur alpha-Synuklein Aggregation beitragen könnte.

Das Chaperon DJ-1 inhibiert die alpha-Synuklein Aggregatformation. Im Fall einer oxidativen Stressreaktion konvertiert DJ-1 in eine saure Variante durch die Oxidation des Cysteins an Position 106. In dieser sauren Form kann DJ-1 ROS absorbieren und somit die Zelle gegen einen Oxidations-induzierten Zelltod schützen. Diese Azidifizierung ist nötig, um DJ-1 zu befähigen in die Mitochondrien zu gelangen.

Parkin hat eine weitreichende, neuroprotektive Kapazität. Aufgrund verschiedener Mutationen ist die E3-Ligase-Aktivität des Parkins allerdings reduziert, welches zu einer Dysfunktion im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) führen kann. Überdies belegen Studien, dass Parkin den Divalenten Metal Transporter-1 (DMT1) über proteasomale Degradation regulieren kann. Zudem scheint Parkin mit LRRK2 zu interagieren. PINK1 und Parkin scheinen in den gleichen molekularen Signalkaskaden zu agieren. Dabei liegt Parkin *downstream* von PINK1 und beide sind wichtig für den Schutz der Integrität der Mitochondrien. Omi/HtrA2 ist eine intermembranöse Protease, welche ebenfalls mit PINK1 interagiert. Beide sind somit Komponenten in der gleichen Stress-Wahrnehmungskaskade. Abbildung selbst erstellt, abgeändert veröffentlicht in Funke, et al. 2013.

1.5.1 Mitochondrien und oxidativer Stress

Die Mitochondrien sind für das Leben essentiell. Sie werden als Kraftwerke der Zellen bezeichnet, da in ihrer inneren Membran die Atmungskette über vier Enzymkomplexe stattfindet, was den Zellen lebenswichtige Energie in Form von ATP liefert. Die Innenmembran der Mitochondrien ist zu sog. Cristae gefaltet und bietet somit mehreren tausend Kopien dieser Atmungskettenenzymkomplexe Platz (Campbell 1997). Überdies produzieren sie die wichtigen Eisen-Schwefel-Cluster Proteine, die im Prozess der Elektronenübertragung und auch bei mehreren enzymatischen Reaktionen unabdingbar sind (Lill, et al. 1999).

Bei der Parkinson-Erkrankung wurde in *post-mortem* Gewebe der SN eine um ca. 30 % verringerte Aktivität des Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette nachgewiesen (Mann, et al. 1994; Schapira, et al. 1990; Schapira, et al. 1989). Aus zahlreichen Studien weiß man, dass eine Inhibition des Komplex I der Atmungskette z.B. durch Behandlung mit MPTP oder Rotenon die klassischen Symptome und die Pathologie der Parkinson-Erkrankung auslösen können (Drechsel and Patel 2008; Miller, et al. 2009; Winklhofer and Haass 2010). Als Konsequenz der Beeinträchtigung des Komplex I in der Elektronentransportkette der Mitochondrien ist der Elektronenfluss beeinträchtigt, was zu einer geringeren ATP-Produktion führt und gleichzeitig zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (Drechsel and Patel 2008; Fabre, et al. 1999; Hantraye, et al. 1996; Pennathur, et al. 1999; Przedborski, et al. 1996). Liegt nun auch noch vermehrt Eisen in diesen Zellen vor, kommt es zusätzlich wie in Kapitel 1.4 beschrieben zur Produktion von ROS, was

die Zellen in massiven oxidativen Stress versetzt. Dies führt in Konsequenz darauf zum programmierten Zelltod, der Apoptose (Burke 2007; Drechsel and Patel 2008; Miller, et al. 2009; Winklhofer and Haass 2010) (Abb. 1.9).

1.5.2 Ausgewählte Parkinson-assoziierte Gene mit möglicher Eiseninteraktion

1.5.2.1 alpha-Synuklein

Die ersten beschriebenen Fälle von genetisch bedingten familiären Parkinson-Erkrankungen (autosomal dominant) wurden durch Mutationen im alpha-Synuklein (*SNCA*-Gen) verursacht (Polymeropoulos, et al. 1997). Heute, fast 20 Jahre später, gibt es unzählige Studien zur Relevanz von alpha-Synuklein in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung. Es handelt sich um ein zytoplasmatisches Protein, welches an der Speicherung und der Regulation von Neurotransmittern beteiligt sein soll, ebenso wie an dem Recycling der Vesikel der Synapsen (Lotharius and Brundin 2002; Vekrellis, et al. 2004). Neben vielen anderen Komponenten ist alpha-Synuklein der Hauptbestandteil in den pathologischen intraneuralen Lewy-Körperchen, welche bei der Parkinson-Erkrankung gefunden werden (Double, et al. 2008). Interessanterweise findet man dort auch dreiwertiges- und zweiwertiges Eisen (Peng, et al. 2010b). Es gibt vielfältig veröffentlichte Interaktionen von alpha-Synuklein und Eisen, wobei nahezu alle zu einer erhöhten Toxizität für die Zelle führen. So führt das Vorliegen von freiem Eisen beispielsweise zu einer erhöhten Aggregation von alpha-Synuklein, was wiederum die Bildung von Lewy-Körperchen unterstützt (Altamura and Muckenthaler 2009; Snyder and Connor 2009b; Zecca, et al. 2004b).

Als erstes soll erwähnt werden, dass in der 5' - untranslatierten Region (5' - UTR) der mRNA von alpha-Synuklein ein IRE aufgrund von *in silico* Daten vermutet wird (Friedrich, et al. 2007). Das bedeutet, dass die Expression von alpha-Synuklein translational durch das IRE/IRP System reguliert würde und somit zu einer eisenabhängigen alpha-Synuklein Aggregation beitragen könnte. Diese Theorie wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit praktisch durch eigene Experimente aufgegriffen und wird im Teil 4 (Ergebnisse) näher betrachtet. Eine Studie, die diese Theorie unterstützt, zeigte die Hochregulation der mRNA-Level von alpha-Synuklein als Reaktion auf einen IRP *knock-down* (Li, et al. 2010b). Überdies wurde alpha-Synuklein als eine zelluläre Ferrireduktase identifiziert, welche dreiwertiges Eisen in zweiwertiges Eisen reduziert (Davies, et al. 2011). Die Autoren vermuten darüber hinaus, dass die Bindung von Eisen an alpha-Synuklein sogar für eine normale Proteinaktivität wichtig sein könnte.

Des Weiteren konnte durch die Überexpression von alpha-Synuklein im Zellkulturexperiment eine Beeinträchtigung der Komplex I-Aktivität in den Mitochondrien beobachtet werden mit nachfolgend erhöhter ROS-Produktion (Devi, et al. 2008). Eine Behandlung von SK-N-SH Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Eisen führte zu einer Eisen-induzierten alpha-Synuklein Aggregation in diesen Zellen (Li, et al. 2010a). Umgekehrt führt die Aggregation von

Einleitung

alpha-Synuklein aufgrund seiner Überexpression zu einer erhöhten Eisentoxizität mit ansteigender ROS-Produktion (He, et al. 2011). Diese Eisen-induzierte Toxizität ließ sich durch Silencing der alpha-Synuklein Expression abschwächen.

Letztlich sei zu erwähnen, dass stabil exprimierende SHSY5Y-Zellen für DMT1 einen dramatischen Anstieg an zweiwertigen Eisen aufwiesen. In Kombination mit mutiertem A53T alpha-Synuklein stieg die Eisen-induzierte Toxizität drastisch an (Chew, et al. 2011).

1.5.2.2 DJ-1

Mutationen im *DJ-1*-Gen sind eine bekannte Ursache in seltenen Fällen von autosomal-rezessiven, früh einsetzenden Morbus Parkinson (Bonifati, et al. 2003). Das Protein DJ-1 inhibiert als Chaperon die alpha-Synuklein Aggregatformation (Shendelman, et al. 2004). Im Fall einer oxidativen Stressreaktion konvertiert DJ-1 in eine saure Variante durch die Oxidation des Cysteins an Position 106. In dieser sauren Form kann DJ-1 ROS absorbieren und somit die Zelle gegen einen Oxidations-induzierten Zelltod schützen (Abb. 1.9). Diese Azidifizierung ist nötig, um DJ-1 zu befähigen in die Mitochondrien zu gelangen (Canet-Avilés, et al. 2004; Lev, et al. 2008; Li, et al. 2005; Waak, et al. 2009). DJ-1 spielt somit indirekt eine Rolle im Zusammenhang mit Eisen bei der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung.

1.5.2.3 Parkin / PINK1 / Omi

Über die Hälfte aller autosomal rezessiven juvenilen Parkinson-Syndrome (ARPD) werden durch diverse Mutationen im *Parkin*-Gen verursacht (Hardy 2010; Hardy, et al. 2009). Normalerweise hat Parkin eine weitreichende, neuroprotektive Kapazität. Aufgrund verschiedener *loss-of-function* Mutationen ist allerdings die E3-Ligase-Aktivität des Parkins reduziert, welches zu einer Dysfunktion im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) führen kann (Winklhofer and Haass 2010). Überdies belegen Studien, dass Parkin den Metalltransport in die Zellen über proteasomale Degradation einer bestimmten Isoform (1B) des Divalenten Metal Transporter-1 (DMT1) regulieren kann (Garrick, et al. 2012; Roth, et al. 2010). DMT1 ist ein sehr wichtiges Transportprotein zur Aufnahme von Eisen in Körperzellen (Abb. 1.9). Ebenso scheint Parkin mit der COR-Domäne des LRRK2-Proteins zu interagieren (Smith, et al. 2005), weshalb auch hier ein indirekter Zusammenhang zur Eisenhomöostase denkbar ist.

Mutationen im *PINK1*-Gen sind die zweithäufigste Ursache für autosomal rezessive, früh beginnende Formen der Parkinson-Erkrankung (Valente, et al. 2004). PINK1 und Parkin scheinen in den gleichen molekularen Signalkaskaden zu agieren. Dabei liegt Parkin *downstream* von PINK1 und beide sind wichtig für den Schutz der Integrität der Mitochondrien (Pisl and Winklhofer 2012) (Abb. 1.9).

Omi/HtrA2 ist eine intermembranöse Protease, welche ebenfalls mit PINK1 interagiert. Beide sind somit Komponenten in der gleichen Stress-Wahrnehmungskaskade (Plun-Favreau, et al. 2007) (Abb. 1.9).

Einleitung

Durch die Tatsache, dass PINK1 und Omi/HtrA2 miteinander interagieren und Bestandteile der Mitochondrien sind, sowie eine Interaktion von PINK1 und Parkin bekannt ist, besteht eine indirekte Verbindung zur Eisenhomöostase und daher seien diese Proteine hier erwähnt.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Beteiligung von Eisen an der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung wird seit vielen Jahren als eine mögliche Ursache diskutiert (Barnham and Bush 2008; Berg, et al. 2002a; Berg, et al. 2001a; Berg, et al. 2006; Berg and Youdim 2006; Boelmans, et al. 2012; Bolognin, et al. 2009; Crichton, et al. 2011; Dexter, et al. 1989; Jomova, et al. 2010; Perez, et al. 2008; Sian-Hülsmann, et al. 2011; Snyder and Connor 2009a; Zecca, et al. 2004b). Durch den Nachweis einer massiv erhöhten Eisenkonzentration in der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Sofic, et al. 1991; Sofic, et al. 1988) wird vermutet, dass hierdurch der oxidative Stress für die Zelle stark zunimmt, da Eisen die Bildung von ROS begünstigt (Berg, et al. 2006; Gerlach, et al. 1994; Youdim, et al. 1991; Youdim and Riederer 1993). Bis heute konnte nicht geklärt werden, ob diese hohen Eisenkonzentrationen eher als Ursache für den Niedergang der dopaminergen Neurone anzusehen ist oder eine Konsequenz des Zelltodes darstellt, wenngleich die Hyperechogenität der SN ein Hinweis auf ein primäres Geschehen sein könnte (Berg, et al. 2002b).

- (1.) Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte deshalb zunächst untersucht werden, ob es eine genetische Veränderung in ausgewählten, am Eisenstoffwechsel und der Blut-Hirn-Schranke (BBB) beteiligten Genen gibt, die auf einen gestörten Eisenmetabolismus hinweisen und somit eher für einen primären Prozess in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung sprechen würden. Dafür wurden *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) in den Genen *MDR1* und *IREB2*, sowie SNPs und ein Fragmentlängenpolymorphismus in der Promotorregion des *HO-1* Gens bei Patienten mit einem idiopathischen Parkinson-Syndrom sowie Kontrollpersonen untersucht und verglichen.
- (2.) Überdies sollte das Expressionsprofil im peripheren Blut von idiopathischen Parkinson-Patienten mit Kontrollpersonen verglichen werden, diverse differentiell exprimierte Gene validiert und für weiterführende Experimente herangezogen werden.

In silico Daten weisen darauf hin, dass alpha-Synuklein im 5' - UTR der mRNA über ein IRE verfügt (Friedlich, et al. 2007). Das würde bedeuten, dass die Expression von alpha-Synuklein posttranskriptional über IRPs reguliert wird und somit einer Eisenabhängigkeit unterliegt.

- (3.) Es galt somit den Nachweis zu erbringen, dass diese Interaktion von alpha-Synuklein und IREB2 tatsächlich *in vitro* existiert. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollte ein Pull Down Experiment durchgeführt werden. Könnte der Nachweis tatsächlich erbracht werden, wäre in einem nächsten Schritt die Frage zu beantworten, welche Basen in der mRNA von alpha-Synuklein für diese Bindung mit IREB2 verantwortlich sind. Zusätzlich könnte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die Veränderung

Einleitung

der Expression von IREB2 im Zellkultorexperiment einen Einfluss auf die alpha-Synuklein Expression ausüben würde.

Die Hyperechogenität der SN findet man nicht nur bei idiopathischen Parkinson-Patienten, sondern auch bei Patienten mit einer G2019S-Mutation im *LRRK2*-Gen (Schweitzer, et al. 2007), was darauf hindeutet, dass auch bei diesen Patienten eine vermehrte Eisenkonzentration in der SN vorliegt.

(4.) Zur funktionellen Untersuchung des Eisenstoffwechsels sollte daher eine SHSY5Y-Zelllinie generiert werden, welche über eine Zinkfingerendonuklease die G2019S-Mutation im Genom integriert trägt. Mit dieser Zelllinie sollten die Expressionen wichtiger, am Eisenstoffwechsel beteiligter Gene in Antwort auf diverse Eisen-Stresssituationen untersucht und mit Wildtyp-SHSY5Y-Zellen verglichen werden. Ebenso wurde ein *LRRK2 knock down* Zellkulturmodell generiert und ebenfalls in diese Stressexperimente integriert.

Falls die Hyperechogenität der SN zusammen mit bisher unbekanntem genetischen Faktoren und klinischen prämotorischen Symptomen richtungsweisend für die Parkinson-Diagnose wäre noch bevor die typischen Symptome wie Tremor, Rigor oder Bradykinese in Erscheinung treten, wäre dies für eine früh beginnende Therapie von größter Bedeutung (Postuma and Berg 2016).

(5.) Daher sollte nach solchen gemeinsamen genetischen Veränderungen in Eisenstoffwechselgenen und Genen der Blut-Hirn-Schranke bei drei verschiedenen Kohorten gesucht werden. Die Kohorten wurden klinisch anhand von Hochrisikosymptomen (Depression, Hyposmie, REM-Schlafstörung) für eine spätere Parkinson-Erkrankung erstellt.

Mit Hilfe all dieser Untersuchungen sollten kleine Puzzle-Teilchen in Beantwortung auf die Fragestellung aufgedeckt werden, welchen Beitrag Eisen in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielt. So beispielsweise, ob der Eisenstoffwechsel bei der Parkinson-Erkrankung primär durch genetische Veränderungen beeinträchtigt zu sein scheint oder sekundär als Prozess der Erkrankung verstanden werden sollte. Zudem sollen die funktionellen Untersuchungen zum Eisenstoffwechsel dazu beitragen, ein Verständnis dafür zu entwickeln, welche Gene wie reguliert werden in Antwort auf verschiedene Eisen-Stresssituationen mit dem Hintergrund verschiedener genetischer Voraussetzungen. Dies würde wiederum Rückschlüsse auf das Krankheitsgeschehen beim Morbus Parkinson zulassen.

Letztlich sind die gewonnenen Daten aus dieser Doktorarbeit nur ein Bruchteil, um der Aufklärung des Krankheitsgeschehen der Parkinson-Erkrankung näher zu kommen. Doch wenn kontinuierlich Aufwand betrieben wird, Detail für Detail aufzudecken und zu verstehen, wird es sicher in Zukunft möglich sein, die Therapieoptionen auszuweiten und in ferner Zukunft sogar kausal therapieren zu können.

„There's always failure. And there's always disappointment. And there's always loss. But the secret is learning from the loss, and realizing that none of those holes are vacuums.“

Michael J. Fox

2

Materialien

2.1 Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit SHSY5Y-Zellen, HEK293-Zellen, Fibroblastenkulturen und Neuronen gearbeitet. Alle dafür verwendeten Nährmedien sind im Folgenden unten aufgeführt.

Medium für humane Fibroblasten

RPMI 1640 Medium (Gibco™)
+ 10% fötales Kälberserum (FBS Gold)
+ 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
+ 1,1% Natrium-Pyruvat (Gibco™)

Medium für die Kultivierung von Neuronen

50% DMEM F12 + 50% Neurobasal medium (Invitrogen)
+ 1:100 N2 (Gibco™)
+ 1:50 B27 (Gibco™)
+ 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

Medium für die Kultivierung von SHSY5Y-Zellen und HEK 293-Zellen

DMEM (Dulbeccos` Modified Eagle Medium)
+ Glutamax (Invitrogen)
+ 10% FCS (Invitrogen)
+ 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

2.2 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried, D) synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/μl geliefert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden für eine Amplifikationen mit dem Light-Cycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, D) die Primer in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt (5 pmol/μl), für alle weiteren PCR-Ansätze in einer 1:10 Verdünnung verwendet (10 pmol/μl). Die cDNA Synthese wurde mit dem QuantiTect® *Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt unter Verwendung spezieller Oligo-dT Primer, die diesem Kit beigelegt sind. Im Folgenden werden alle Oligonukleotide aufgeführt, die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurden.

Materialien

Tabelle 2.1: Primer für die SNaPshot-Analyse im *MDR1*-Gen Aufgrund einer Multiplex-Analyse müssen sich die SNaPshot-Primer in mindestens 5 Basen ihrer Länge unterscheiden. Dies wurde mit dem Anhängen unspezifischer multipler T's (bei forward Primern) bzw. A's (bei reverse Primern) erreicht.

PCR Bedingungen				
SNP	accession number	Sequence (5' → 3')	PCR product	Annealing temperature (T _A)
49	rs28381804	GAGCTGCGTTTCTCTTCAG TTTCAGAGCTGGAGGCTAGAA	172 bp	59°C
131	rs1202183	GGAAAAGCAAATCTTCCATGA CTCTGCTGGCACTTCAGTTG	443 bp	59°C
239	rs9282565	GGAAAAGCAAATCTTCCATGA CTCTGCTGGCACTTCAGTTG	443 bp	59°C
1199	rs2229109	GCCAAGTATTGACAGCTATTCG ACTGTTGTGCTCTTCCACAG	366 bp	59°C
1236	rs1128503	GCCAAGTATTGACAGCTATTCG ACTGTTGTGCTCTTCCACAG	366 bp	59°C
1696	rs28381902	ACCCTGGTTGGAGAGAGAGG AAAGAGGCCCAATGCTTTTA	312 bp	59°C
1777	rs28381914	GGTTTTACAATGCCACAGC AATCCCCAGGTGTTGTTTC	392 bp	59°C
2677	rs2032582	TCAGAAAATAGAAGCATGAGTTGTG CAATGGCCTGAAAAGTAAAA	510 bp	59°C
3151	rs28401798	AAATATCAGCAGCCCACATCAT TCTTACCTCCAGGCTCAGT	1260 bp	59°C
3435	rs1045642	GCTGCTTGATGGCAAAGAA GCATGTATGTTGGCCTCCTT	186 bp	59°C
SNaPshot Bedingungen				
SNP	Exchange	Sequence (5' → 3')	Melting temperature (T _M)	pooled analysis with
49	T/C	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGCAAAGAAGAAGAACTT T	54°C	131, 239, 1236
131	T/C	AAAAAAAAAATATACAACTTGCAAGCCAA	56°C	49, 239, 1236
239	C/A	TTTTTTTTTTTTTTTGGAGAAATGACAGATATCTTTG	56°C	49, 131, 1236
1199	G/A	TTTAAATTCAGAAATGTTCACTTCA	54°C	-
1236	C/T	TTCTGGTAGATCTTGAAGGG	54°C	49, 131, 239
1696	G/A	TTTTTTTTTTTAGCCTTGGACACAGAAAGC	58°C	1777, 2677, 3151, 3435

Materialien

1777	C/T	CTCATCGTTTGTCTACAGTT	56°C	1696, 2677, 3151, 3435
2677	G/A/T	TTTTTTTTTTTTTAGATAAGAAAGAACTAGAAGGT	58°C	1696, 1777, 3151, 3435
3151	C/G	TTTTTTTCCACCCGACCGGACATC	58°C	1696, 1777, 2677, 3435
3435	C/T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTGTACAGGAAGAGA T	56°C	1696, 1777, 2677, 3151

Tabelle 2.2: Primer für die SNaPshot-Analyse, Fragmentlängenanalyse und qRT-PCR im *HO-1* Gen

Aufgrund einer Multiplex-Analyse müssen sich die SNaPshot-Primer in mindestens 5 Basen ihrer Länge unterscheiden. Dies wurde mit dem Anhängen unspezifischer multipler T's (bei vorwärts Primern) bzw. A's (bei reverse Primern) erreicht. Überdies wurde für die Fragmentlängenanalyse ein fluoreszenzmarkierter vorwärts Primer benutzt (Cy5). Die Primer für die qRT-PCR wurden Intron-überspannend ausgewählt, wobei ein mindestens 800 bp großes Intron überspannt werden musste.

PCR Bedingungen				
SNP	accession number	Sequence (5' → 3')	PCR product	Annealing temperature (T _A)
19	rs2071747	CGCCGAGCATAAATGTGAC AGCAGGGTTGGGAGAGAAAG	193 bp	56 °C
317	rs9282702	CCCTGGAGGAGGAGATTGAG TGTTGGGGAAGGTGAAGAAG	336 bp	65 °C
797	rs35980144	CATCAGACACCCTGATGCAC TAAGGAAGCCAGCCAAGAGA	279 bp	65 °C
SNaPshot Bedingungen				
SNP	Exchange	Sequence (5' → 3')	Melting temperature (T _M)	pooled analysis with
19	C/G	TTTTTTTTTTTATGGAGCGTCCGCAACCC	60°C	317, 797
317	A/G	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGCATGGCTGGTGT GTAG	60°C	19, 797
797	A/G	AAGGACCCATCGGAGAAGC	60°C	19, 317
Bedingungen für die Fragmentlängenanalyse				
Microsatellite polymorphism		Sequence (5' → 3')	PCR product	Annealing temperature (T _A)
(GT) _n repeat	Cy5 -	ATCAAGTCCAAGGGGACAG GGGCCAGTGTGGGGTGA	233 bp	64 °C
Bedingungen für die quantitative Real Time PCR				
		Sequence (5' → 3')	PCR product	Annealing temperature (T _A)

Materialien

ATGACACCAAGGACCAGAGC		
	196 bp	58 °C
ATGGCATAAAGCCCTACAGC		

Tabelle 2.3: Primer für die Analysen im *alpha-Synuklein*-Gen (Sequenzen, Pull Down) und *Ferritin* Die verwendeten Primer für die *in vitro* Transkription besitzen eine türkis markierte Sequenz, welche für die T7 Polymerase wichtig ist. In pink dargestellt sind die fünf identischen Basen im IRE-Bereich von alpha-Synuklein mit dem IRE von Ferritin. Gelb und grün dargestellt sind jeweils künstlich veränderte Sequenzen.

PCR Bedingungen	
5'- UTR Bereich	Sequence (5' → 3')
	PCR product
	Annealing temperature (T _A)
iron responsive element (IRE) vorderer Bereich	AGAAGGGGCCCAAGAGAGG TTCTCCACAACCTCCGACTCC
iron responsive element (IRE) hinterer Bereich	CACTTAAAAGAGTCTCACACTTTGG GTCTTCTGCTGCTTCTGC
395 bp °C	
229 bp °C	
in vitro Transkription	
Anzahl veränderter Basen	Sequence (5' → 3')
Original	<p style="margin: 0;">TAATACGACTCACTATAGG GGGAGTGGCCATTTCGACGACAGTGGGTGTAAAGGAATT CATTAGCC</p> <p style="margin: 0;">GGCTAATGAATTCCTTTACACCACTGTCGTCGAATGGCCACTCC CCTATAGTGAGT CGTATTA</p>
5	<p style="margin: 0;">TAATACGACTCACTATAGGGGGAGTGGCCATTTCGACGAGGACTGGGTGTAAAGGAATT TCATTAGCC</p> <p style="margin: 0;">GGCTAATGAATTCCTTTACACCA GGTCC TCGTCGAATGGCCACTCC CCTATAGTGAGT CGTATTA</p>
8	<p style="margin: 0;">TAATACGACTCACTATAGGGGGAGTGGCCATTTCGAATGGGACCCTGGGTGTAAAGGAATT CATTAGCC</p> <p style="margin: 0;">GGCTAATGAATTCCTTTACACCA GGTCCAT TCGAATGGCCACTCC CCTATAGTGAGT CGTATTA</p>
11	<p style="margin: 0;">TAATACGACTCACTATAGGGGGAGTGGCCATTTCGAATGGGACCCTTGTAAGGAATT CATTAGCC</p> <p style="margin: 0;">GGCTAATGAATTCCTTTACACCA AGTGGTCCAT TCGAATGGCCACTCC CCTATAGTGAGT CGTATTA</p>
14	<p style="margin: 0;">TAATACGACTCACTATAGGGGGAGTGGCCATT AACATGGGACCCTTGTAAGGAATT CATTAGCC</p> <p style="margin: 0;">GGCTAATGAATTCCTTTACACCA AGTGGTCCATGTT AATGGCCACTCC CCTATAGTGAGT CGTATTA</p>
17	<p style="margin: 0;">TAATACGACTCACTATAGGGGGAGTGGCCATT AACATGGGACCCTCAGAAAGGAATT CATTAGCC</p>

Materialien

	GGCTAATGAATTCCTTTCTGAGTGGTCCCATGTTAATGGCCACTCCCCCTATAGTGAGT CGTATTA
5 im 5`und 3`Bereich	TAATACGACTCACTATAGGGTTCACGGCCATTGACGACAGCAGTGTGGTGTAAGGAATT CATCCCTT
	AAGGGATGAATTCCTTTACACCACTGTCGTGCAATGGCCGTGAAACCTATAGTGAG TCGTATTA
5 im 5`und 3`Bereich + 5 im Loop	TAATACGACTCACTATAGGGTTCACGGCCATTGACGACAGGACCTGGTGTAAGGAATT CATCCCTT
	AAGGGATGAATTCCTTTACACCAAGTCCTCGTGCAATGGCCGTGAAACCTATAGTGAG TCGTATTA
5 im 5`und 3`Bereich + 17 im Loop	TAATACGACTCACTATAGGGTTCACGGCCATTAAATGGGGACCAGAAAGGAATT CATCCCTT
	AAGGGATGAATTCCTTTCTGAGTGGTCCCATGTTAATGGCCGTGAAACCTATAGTGAG TCGTATTA
Positivkontrolle Ferritin	
Original	TAATACGACTCACTATAGGGGTTTCCTGCTTCAACAGTGCCTGGACGGAAC
	GTTCCGTCCAAGCACTGTTGAAGCAGGAAACCCCTATAGTGAGTCGTATTA
5	TAATACGACTCACTATAGGGGTTTCCTGCTTCAATGACACTTGGACGGAAC
	GTTCCGTCCAAGTGTCATTGAAGCAGGAAACCCCTATAGTGAGTCGTATTA
qPCR	
alpha-Synuclein	TGTAGGCTCCAAAACCAAGG
	CTCCCTCCACTGTCTTCTGG

Materialien

Tabelle 2.4: Primer für die Mutagenese-PCRs der verschiedenen LRRK2-Konstrukte. Farblich markiert sind die Codons, die verändert werden sollten.

gewünschte Mutation	Primersequenz 5' → 3'
D1994A	GCCATGATTATATACCGAGCCCTGAAACCCCAATGTGC
	GCACATTGTGGGGTTTCAGGGCTCGGTATATAATCATGGC
I2020T	AAGATTGCTGACTACGGCACTGCTCAGTACTGCTGTTGTAGAA
	TTCTACAGCAGTACTGAGCAGTGCCGTAGTCAGCAATCTT

Tabelle 2.5: Primer für die Colony-PCR nach Transformation in pGEM[®]-T Vektor. Der forward Primer besitzt die Sequenz des T7-Promotors im Vektor vor Beginn der MCS. Der reverse Primer besitzt die Sequenz des SP6-Promotors, welcher am Ende der MCS im Vektor sitzt.

Vektor	Primersequenz 5' → 3'
pGEM [®] -T	ATTATGCTGAGTGATATCCC
	ATTTAGGTGACACTATAGAA
pEasyFlox II	pEasy Flox II for
	pEasy Flox II rev

Tabelle 2.6: Primer für die Integrations-PCR (A)

	Primersequenz 5' → 3'
A09_LRRK2 HR FW	GTGGGTCAGTCTCCAGAAGG
A10_LRRK2 HR RV	TGCCAGTCATAGCCGAATAG
A11_Ex Neo (Natalja) RV	GTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAG
A16_FW-LRRK2_LiAr_1000	GGCCATAGCGGCCGCGTGGGTCAGTCTCCAGAAGG

Tabelle 2.7: Primer für die Integrations-PCR (B)

LRRK2	Primersequenz 5' → 3'
Exon 41	GCACAGAATTTTTGATGCTTG
	GAGGTCAGTGGTTATCCATCC
Exon 40-42	AGGACAAAGCCAGCCTCACT
	TTGGAAACTTCAAACCCTCTACTATT

Materialien

Tabelle 2.8: Primer für die qRT-PCR der Eisenstoffwechselgene Alle verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie ein mindestens 800bp großes Intron überspannen.

Gen	Primersequenz 5' → 3'
<i>Transferrinrezeptor 1</i>	CTGCTTCCCTTTCCTTGC
	GCCACTTTGTTCAACTCAGG
<i>DMT1</i>	TAACTCGACACTGGCTGTGG
	ATCCCTCCATGACAAACTGG
<i>Ferroportin 1</i>	AACAGCCTCCTTTTGACAGC
	TCAGGATGATTCCACACAGG
<i>Ferritin Heavy Chain</i>	GCCTCTACGTTTACCTGTCC
	CCACCTCGTTGGTTCTGC
<i>Ferritin Light Chain</i>	AGCCAGCTGAAGATGAGTGG
	TCCAGGAAGTCACAGAGATGG
<i>IREB2</i>	TTGATTGGAATTGGCATAGC
	TTCCACATCATCTTCAAACG
<i>HIF1A</i>	AGGATGCTTGCCAAAAGAGG
	TGAAGGGAGAAAATCAAGTCG
<i>HEPH</i>	GTGCCTCACCTGGATCTACC
	TCTACATCCTGGCGTTGAGG
<i>HO-1</i>	ATGACACCAAGGACCAGAGC
	ATGGCATAAAGCCCTACAGC

Tabelle 2.9: Primer für die qRT-PCR der Haushaltsgene Alle verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie ein mindestens 800bp großes Intron überspannen.

Gen	Primersequenz 5' → 3'
<i>β-Aktin</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA
	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
<i>SDHA</i>	AGAAGCCCTTTGAGGAGCA
	CGATTACGGGTCTATATTCCAGA
<i>HMBS</i>	CGCATCTGGAGTTCAGGAGTA
	CCAGGATGATGGCACTGA
<i>PDH</i>	GGTTTCCATTCAAGACCTG
	TGGTTCCATGTCCATTGGT
<i>YWHAZ</i>	TCCAGGGACAGAGTCTCAGC
	TCCATGACTGGATGTTCTGTG
<i>TBP</i>	GAAGTTGGGTTTTCCAGCTAA
	GGAGAACAATTCTGGGTTTGA
<i>GAPD</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC
	GCCCAATACGACCAAATCC

Tabelle 2.10: Primer für das *High Resolution Melting* für SNPs im *IREB2*-Gen mit unlabeled probes Gelb markiert sind jeweils die SNP, die untersucht werden sollten.

SNP	Primersequenz 5' → 3'
rs13180	AAAGTAGATTTTTGCCCCCTTT
	GCCAATTCCAATCAAATGATCT
unlabeled probe	TCATAACTTTCCGCCAAAACAGC-Phosphat
rs2656070	GCCACGTCTGACAAGTTAAT
	AAGTTTTCTATTGGGGTCATGAAT
unlabelled probe	ACCCTGACTCCGACAGACACCTT-Phosphat

2.3 Vektoren/Konstrukte

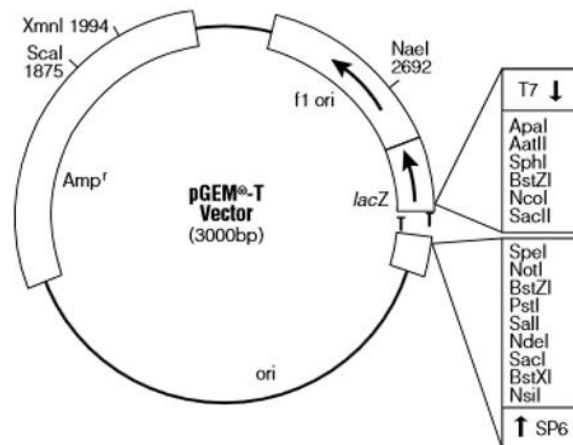


Abbildung 2.1: pGem[®]-T-Vektorkarte Dieser Ausgangsvektor wurde für die erste Klonierung des homologen Konstruktes für das Exon 41 des *LRRK2*-Gens verwendet. Er wurde von der Firma Promega erworben.

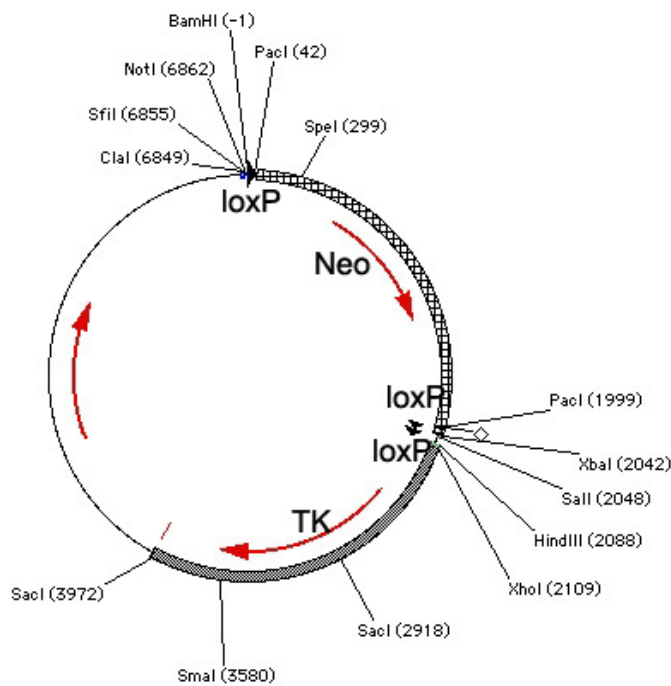


Abbildung 2.2: pEasyFloXII-Vektorkarte Der Vektor pEasyFloXII von Addgene diente als Empfängervektor bei den durchgeführten Klonierungen. Die *Ascl*-Restriktionsschnittstelle ist auf dieser Vektorkarte nicht zu erkennen.

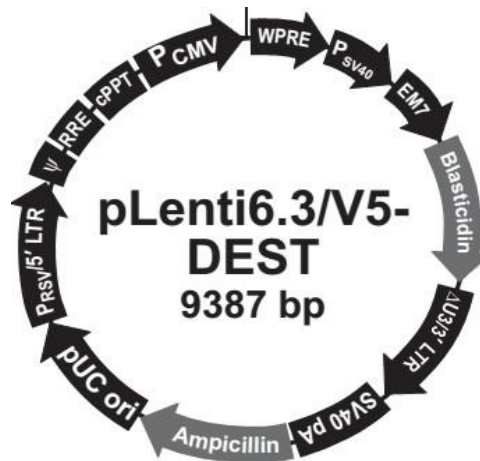


Abbildung 2.3: pLenti6.3/V5-DEST-Vektorkarte Dieser Vektor wurde benötigt, um die Blasticidinresistenz zu klonieren. Er wurde käuflich erworben von der Firma Invitrogen, Life Technologies.

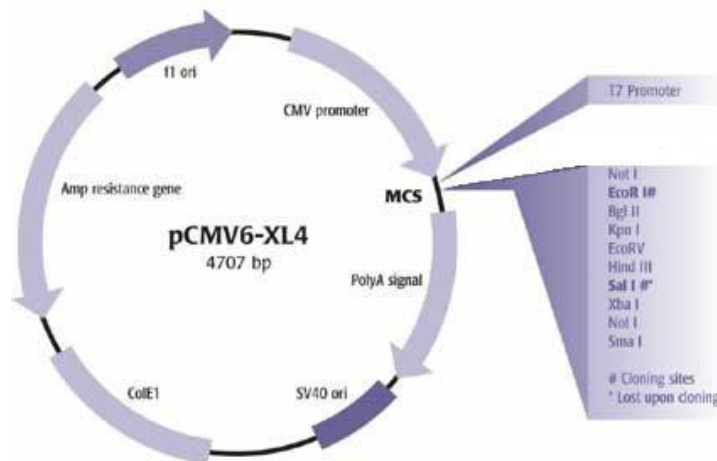


Abbildung 2.4: pCMV6-XL4-Vektorkarte Mit Hilfe dieses Vektors wurde das *IREB2*-Gen in SHSY5Y-Zellen überexprimiert. Er wurde käuflich erworben von der Firma AMS Biotechnology, Abingdon, UK.

Die Sequenzen der verschiedenen homologen Konstrukte können dem Anhang entnommen werden.

2.4 Enzyme und dazugehörige Puffer

Alle verwendeten Enzyme mit ihren jeweiligen Puffern sind der Tabelle 2.11 zu entnehmen.

Tabelle 2.11: Verzeichnis über die verwendeten Enzyme/Puffer

Name	Hersteller
Alkaline Phosphatase, shrimp, 1U/μl, Dephosphorylierungspuffer 10x	Roche, Mannheim, D Promega, Madison, USA
Asc I	New England Biolabs, Frankfurt, D
Exo I (2U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt, D
Pfu-Polymerase, mit 10x Puffer	Promega, Madison, USA
RNase A 1μg/μl	Sigma-Aldrich
RQ1 (DNase)	Promega, Madison, USA
Sfi I	Fermentas

Materialien

T4 Ligase, T4 Ligase Puffer	MBI, Fermentas, St. Leon-Roth
T7 RNA Polymerase, 10fach Puffer	Roche, Penzberg, D
Taq-DNA Polymerase	Biotherm
Xho I (10U/μl)	Fermentas
Zink Finger Nuclease	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

2.5 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper können Tabelle 2.12 entnommen werden.

Tabelle 2.12: Verzeichnis über die verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung	Verwendung
IRP-2 (7H6), sc-33682, mouse monoclonal, anti-human		Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:100	Western Blot
IREB2 rabbit polyclonal, anti-human		Lifespan Biosciences	1:100	Immunfluoreszenz; Immunhistochemie
LRRK2, rabbit monoclonal		MJFF-#5, C68-7	1:200	Western Blot
alpha-Synuklein (15G7), rat monoclonal (ab195561)		Abcam, Cambridge, UK	1:250	Immunfluoreszenz
mouse monoclonal to SENP6, (ab57239)		Abcam, Cambridge, UK	4μg	Western Blot
anti β-Aktin, monoclonal mouse		Sigma, Saint Louis, USA	1:10000	Western Blot
anti-Vinculin (V9131), mouse monoclonal, anti human, bovine, chicken, dog, rat. mouse, turkey, Xenopus		Sigma, Saint Louis, USA	1:20000	Western Blot
	goat, anti-mouse HRP konjugiert	Dianova, Jackson, Immunoresearch, USA	1:10000	Western Blot
	sheep, anti-mouse HRP konjugiert	Amersham	1:2500	Western Blot
	goat, anti-rabbit HRP konjugiert	Dianova, Jackson, Immunoresearch, USA	1:10000	Western Blot
	donkey, anti rabbit IgG, Cy2 markiert	Jackson Immunoresearch	1:2000	Immunfluoreszenz
	donkey, anti rat IgG, Cy3 markiert	Jackson Immunoresearch	1:2000	Immunfluoreszenz

2.6 Chemikalien/Biochemikalien

Alle angewendeten Chemikalien bzw. Biochemikalien sind in Tabelle 2.13 aufgeführt.

Tabelle 2.13: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Biochemikalien

Name	Hersteller
2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dNTPs), 100 mM-Set	Invitrogen, Karlsruhe, D
Accumax™	Millipore, Californien, USA
Acrylamid:N,N'-Methylen-Bisacrylamid; 40 % (w/v), Rotiphorese®Gel 40 (29:1)	Roth, Karlsruhe, D
Agar-Agar	Karlsruhe, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, D
Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Bacto™-Agar Becton	Dickinson Labware, Heidelberg, D
Betain	
Blasticidin S	Invivogen, Hongkong, China
Blocking Solution	Roche
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Sigma, Saint Louis, MO, USA
ChemiBlocker	Millipore, Californien, USA
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe, D
Complete, EDTA-freier Proteasen-InhibitorenCocktail (Tabletten)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Deferoxamine Mesylate	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Saint Louis, MO, USA
DNA Ladepuffer (6x)	Fermentas GmbH, St Leon-Rot, D
DNA-Leiter 1kb, 1 µg/µl	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTP-Mix, 10mM	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dulbecco's Modified EagleMedium (DMEM)+GlutaMAX™	Invitrogen, Karlsruhe, D Biochrom AG, Berlin, D
Dulbecco's Modified EagleMedium (DMEM) flüssig, +4500 mg/l Glukose, +L-Glutamin, – Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin, D
ECL™ Western blotting detection reagent	Amersham, GE Healthcare, München, D
Entwickler G135	Agfa-Gaevert, Mortsel, Belgien
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid 1 % (w/v)	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Ezview™Red Streptavidin Affinity Gel	Sigma, Saint Louis, USA
FeCl ₃	
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, D und Gibco, Life Technologies
Ficoll® Typ 400, 20 % (w/v)-Lösung	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Fixierer RapidfixerG354	Agfa-Gaevert, Mortsel/Belgien
Geneticin® 418 (50mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, D
GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, D
GenomeLab DNA Size Standard Kit-600	Beckman Coulter, Krefeld, D
GenomeLab Sample Loading Solution (SLS)	Beckman Coulter, Krefeld, D
Glycerin 86 % (v/v); Rotipuran®	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
Glycogen (20 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hefe-Extrakt	Becton Dickinson Labware, Heidelberg, D

Materialien

Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, USA
holo Transferrin (human)	Sigma, Saint Louis, USA
IGEPAL® CA-630 (NP-40)	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kanamycinsilfat	Roth, Karlsruhe, D
Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
Lysin	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Mineralöl	Beckman Coulter, D
MgCl ₂	Promega, Mannheim, D
MultiMark® Multi-Colored Standard	Invitrogen, Karlsruhe, D
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdesoxychelate, Minimum 97%	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Natriumdodezylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe, D
Naturaflo Magermilchpulver	Toepfer GmbH, Dietmannsried, D
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml Penicillin-Natriumsalz, 10000 µg/ml Streptomycin-Sulfat)	Invitrogen, Karlsruhe, D
peqGOLD Leiter-Mix (0,5 mg DNA/ml)	peqLab, Erlangen, D
Poly-L-Lysin, 0,01 % (w/v), 70-150 kDa	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, D
Precision PlusProtein™ Standard Dual Color	Bio-Rad, München, D
Protector RNase Inhibitor	Sigma Aldrich
Q-Solution	Qiagen, Hilden, D
Rinderserumalbumin (BSA 100x, 10 mg/ml)	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, D
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine; C ₆ H ₁₆ N ₂)	Roth, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethylaminomethan); Trizma®base	Sigma, Saint Louis, MO, USA
Triton® X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypsin-EDTA (1x), 0,25 % (w/v) Trypsin, 1mM EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween®-20	Merck, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Sigma, Saint Louis, MO, USA

2.7 Kits

Sämtliche verwendeten Kits sind der Tabelle 2.14 zu entnehmen.

Tabelle 2.14: Verzeichnis der verwendeten Kits

Name	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Reagents & Supplies	Agilent Technologies, Inc., USA
Big Dye Terminator Sequencing	Applied Biosystems, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, D
Biotin RNA Labeling Mix	Roche, Penzberg, D
dH5 alpha E.coli	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNA-Größenstandard-Kit 600	GenomeLab™ Beckman Coulter, Krefeld, D
Dneasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
Dneasy mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
Gene-Scan-120 LIZ Size Standard	Applied Biosystems, California, USA
GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld, D

Materialien

GoTaq Polymerase Kit	Promega, Mannheim, D
Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master Kit	Roche Diagnostics
One Shot®TOP10 Chemically Competent E.coli	Invitrogen, Karlsruhe, D
PAXgene Blood RNAKit	PreAnalytiX GmbH, CH
pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega, Madison, USA
Plasmid Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquickGel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquickPCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAshredder™	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect®SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, D
Rnase freies Dnase Set	Qiagen, Hilden, D
RNeasyMini Kit	Qiagen, Hilden, D
SNaPshot Multiplex Kit (ABI PRISM®)	Applied Biosystems, California, USA
SP6/T7 Transkription Kit	Roche

2.8 Verwendete Puffer / Lösungen / Nährmedien

Alle verwendeten Puffer, Nährmedien und andere Lösungen sind in Tabelle 2.15 aufgelistet.

Tabelle 2.15: Verzeichnis über die verwendeten Puffer, Lösungen und Nährmedien

Verwendungszweck	Name	Zusammensetzung
Agarose-Gelelektrophorese	Agarose-Blaupuffer	0.01 % (w/v) Bromphenolblau 8 % (w/v) Ficoll®Typ 400 1x TBE
	10x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
Bakterienkultur	LB-Festagar (autoklaviert)	0,75 % (w/v) Agar-Agar 0,75 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium
	LB Medium (autoklaviert)	10g NaCl 10g Tryptophan 5g Hefeextrakt
	Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml Ampicillin Natriumsalz
In vitro Transkription	Annealing-Puffer	30mM HEPES pH 7,4 100mM KAc 2mM Mg Ac
	RNA binding Puffer (X-link buffer)	20mM HEPES pH 7,5 5mM MgCl ₂ 50mM KCl 150mM NaCl 0,5mM EDTA 0,5mM Dithiothreitol 10% Glycerol
	Proteinisolationspuffer	RNA binding Puffer + Complete (EDTA) + 1% Triton X-100
	Waschpuffer	RNA binding Puffer + 0,5% Triton X-100
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese / Western Blot	5x Lämmli-Puffer	0.5M Tris-HCl, pH 6.8 5% β-Mercaptoethanol 10% Glycerin

Materialien

		10% SDS 1% Bromphenolblaulösung
	1% Bromphenolblaulösung	1g Bromphenolblau/100 ml H ₂ O bidest
	1x Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS
	Stripping-Puffer, pH 2.0	25mM Glycin 1% SDS
	1x Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
	1x TBS, pH 7.5	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
	1x TBS-Tween® 20 (TBST), pH 7.5	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.1% (v/v) Tween 20®
Ethanol-fällung	STOP-Lösung	2 Teile 3M NaAc, pH 5,2 2 Teile 100 mM Na ₂ EDTA*2H ₂ O, pH 8,0 1 Teil Glykogen (20 mg/ml)
	25x Complete Proteasen Inhibitor Cocktail	1 Tablette/ 2 ml H ₂ O bidest
Zelllyse / Proteinisolation	Kazerounian RIPA-Puffer	150 mM NaCl 1% NP-40 (=Igepal) 0,5% Desoxycholat 0,1% Natriumdodezylsulfat (SDS) 50 mM Tris HCL pH 7,5

2.9 Geräteverzeichnis

Alle zum Einsatz gekommenen Geräte sind der Tabelle 2.16 zu entnehmen.

Tabelle 2.16: Verzeichnis über die verwendeten Geräte

Verwendung	Name	Hersteller
Agarosegelkammern	Elektrophoresekammer 40-0708	peqLab, Erlangen, D
	Elektrophoresekammer 40-1214	
Autoklav	Autoklav ELV	Systec, Wettenberg, D
Bakterienschüttelinkubator	Multitron HT Infors	Infors, Einsbach, D
CO ₂ Inkubator	Binder CB210	Binder, Tuttlingen, D
Cross-Linker	BIO-LINK® BLX	Vilber Lourmat, F
Eismaschine		Ziegra Eismaschine, Isernhagen, D
Elektrophorese Spannungsgeber	Bio-Rad PowerPac Basic	Bio-Rad, München, D
Entwicklermaschine	CURIX 60	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Geldokumentation	Biostep Transilluminator	Biostep, Jahnsdorf, D
Heizblock	ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Light Cycler	Light Cycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Magnetrührer	Heidolph MR3000	Neolab, Heidelberg, D
DNA Konzentrationsmessung	Nanodrop (ND1000)	Peqlab, Erlangen, D
PCR Cycler	GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, D Research, Inc.; San Francisco, CA, USA Biorad, München, D
	PTC-200 Peltier Thermal Cycler	
	Thermocycler T100™	

Materialien

pH-Meter	MP 230	Mettler Toledo, Giessen, D
Pipetten	ResearchPipette 10, 100, 1000	Eppendorf, Hamburg, D
	Mehrkanalpipette Research pro 5-100 µL	
	Multipette®plus	
Pipettierhilfen	accu-jet® Pipettierhelfer	BRAND, Wertheim, D
RNA-Messung	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Roboter	QIA CUBE Roboter	Qiagen
Schüttelinkubator	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, D
SDS-PAGE-Apparatur	Mini-PROTEAN®II	Bio-Rad, München, D
	SERVA Blue Vertical 101	SERVA, Heidelberg, D
Sequenziergerät	CEQ 8000 Cycle Sequencer	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
	ABI Sequencer 3110	Applied Biosystems
Sterilbank	HERA Safe	Heraeus Holding, Hanau, D
Vortexer	REAX control	Heidolph, Schwabach, D
Waagen	Precisa XT 6200C-FR	PESA Waagen, BissingenSteinhofen, D
Wärmeschrank Bakterien	Binder BD240	Binder, Tuttlingen, D
Wasseraufbereitungssystem	QuantumTM EX 06196	Millipore, Eschborn, D
Wasserbad	GFL® 1083	GFL, Burgwedel, D
Western-Blot Kammer	SERVA Blue Blot WET 100	SERVA, Heidelberg, D
Western-Blot Spannungsgeber	BluePower Plus	SERVA, Heidelberg, D
Zell-Zählkammer	Neubauer Zählkammer Bright Line Assistent, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Karl Hecht Assistent, Sondheim, D
Zentrifugen	Centrifuge 5415R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, D
	Centrifuge 5417C	
	Centrifuge 5810	

2.10 Verbrauchsmaterialien

Alle genutzten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.17 angegeben.

Tabelle 2.17: Verzeichnis über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
10 ml Stripette	Corning Incorporated, NY, USA
25 ml Stripette	Corning Incorporated, NY, USA
384 PCR Platte	Treff Lab, CH
5 ml Stripette	Corning Incorporated, NY, USA
50 ml Stripette	Corning Incorporated, NY, USA
96F Microwell Platte	Nunc, Rosteilde, Dänemark
Absolute QPCR Seal	Abgene House, Surrey, GB
Cell Scraper (Zellschaber)	Corning Incorporated, NY, USA
Cellstar®, Gewebekulturflasche 175 cm ²	greiner bio-one, Frickenhausen, D
Cellstar®, Gewebekulturplatte 6 well	greiner bio-one, Frickenhausen, D
Cellstar®, Gewebekulturplatte 96 well	greiner bio-one, Frickenhausen, D
Cellstar®, PP –Test tubes 15 ml	greiner bio-one, Frickenhausen, D
Cellstar®, PP –Test tubes 50 ml	greiner bio-one, Frickenhausen, D
Deckgläschen 21x26mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D

Materialien

Easy Peel	Abgene House, Surrey, GB
Einmal-Küvetten aus Polysterol	Roth, Karlsruhe, D
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schnell, Dassel, D
High performance chemiluminescence film	Amersham Biosciences, Buckimhamshire, GB
Light Cycler® 96 und 384 Well Platten	Roche Applied Science (Mannheim, D)
Optitran BA-S83 Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schnell, Whatman, Dassel, D
Parafilm	American National Ban, Chicago, USA
Pasteur Capillary Pipettes	WU, Mainz, D
PAX Gene Blood RNA Tube	PreAnalytiX GmbH, CH
PCR Softstrips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Pipettenspitzen	greiner bio-one, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß 2,2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
TipOne® Bevelled Filter Tips	Starlab GmbH, Ahrensburg, D
Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning Incorporated, NY, USA

2.11 Software und Internetresource

Alle zum Einsatz gekommenen Software-Programme sowie die Nutzung diverser Internet-Seiten sind in Tabelle 2.18 aufgeführt.

Tabelle 2.18: Verzeichnis über die verwendeten Software-Programme sowie Internetressourcen

Name	Internetseite / Hersteller
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Ensemble genome browser	http://www.ensembl.org
Primer 3	http://primer3.ut.ee/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Exome Variant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS/
RNA Sekundärstrukturvorhersage	http://rna.tbi.univie.ac.at/
Inkscape	https://inkscape.org/de/
EndNote X7	Thomson Reuters
Staden Package	http://staden.sourceforge.net/
CEQ™8800 Genetic Analysis Software	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA
AxioVision LE Rel. 4.3	Zeiss, Jena, D
Light Cycler 480® Software	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Microsoft Office	Microsoft Corporation
ArgusX1®	Biostep, Jahnstadt, D
GeneMapper v 3.5	Applied Biosystems
qBase	

3

Methoden

Methoden

Es kam eine Vielzahl von Methoden zum Einsatz, die nachfolgend im Detail erläutert werden. Vereinzelt wurden dabei Sätze aus meiner Diplomarbeit übernommen, wenn es beispielsweise um die Erläuterung eines bestimmten Protokolls geht, welches unverändert sowohl in Diplom- als auch in Doktorarbeit verwendet wurde.

3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur selektiven Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen aus einer heterogenen DNA-Population kommt die Technik der PCR zum Einsatz. Ohne diese Technik wären zahlreiche Experimente dieser Arbeit nicht durchführbar gewesen. Hierbei handelt es sich um eine zyklische Reaktion aus drei aufeinanderfolgenden Schritten mit jeweils spezifischen Temperaturen: Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Annealing spezifischer Primer sowie eine anschließende Elongation der DNA. Durch das wiederholte Durchführen dieser drei Schritte kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der Ausgangs-DNA.

Standardbedingungen für eine PCR

Zusammensetzung:	Programm:
0,4 µl forward Primer (10pmol/µl)	1x 94°C 5min
0,4 µl reverse Primer (10pmol/µl)	
0,4 µl dNTPs (10pmol/µl)	94°C 30 sec
4,0 µl DNA (10ng/µl)	35x ? °C 30sec
4,0 µl Puffer	72°C 1:30min
0,1 µl Taq Polymerase	
10,7 µl H ₂ O	1x 72°C 5min

Aufreinigung des PCR-Produktes

Möchte man die PCR-Produkte beispielsweise sequenzieren, müssen diese speziell aufgereinigt werden. Dies erfolgt über eine Ethanol-fällung. Hierfür wird zunächst ein Gemisch aus Natriumacetat und Ethanol (2ml NaAcetat + 48ml 100% Ethanol) in 2,5 facher Menge zum PCR-Produkt dazugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt von 45 Minuten bei 3220g wird der Überstand abgekippt und das Pellet wird nun mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird dieses Gemisch für 20 Minuten bei 3220g zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Der Waschschrift mit 70% Ethanol und anschließender Zentrifugation wird ein zweites Mal wiederholt. Nachdem der Überstand wieder abgegossen wurde, muss das Pellet vollständig trocknen, bevor es in 15 µl Wasser (Merck, D) aufgenommen und resuspendiert wird. Darin befindet sich nun das aufgereinigte PCR-Produkt.

3.2 *In vitro* Transkription und Pull Down

Zum Nachweis, ob das IREB2-Protein mit einer speziellen Sequenz der RNA von alpha-Synuklein interagiert, wurde zunächst die RNA von alpha-Synuklein künstlich über eine *in vitro* Transkription synthetisiert und nachfolgend ein Pull Down Experiment durchgeführt. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der *in vitro* Transkription bis hin zum Pull Down stichpunktartig aufgeführt.

1. Annealing der RNA-Sonden:

- 47 µl Annealing Puffer
- + 1,5 µl forward RNA Sonde
- + 1,5 µl reverse RNA Sonde
- ➔ diesen 50 µl Ansatz für 5 Minuten bei 95°C inkubieren
- ➔ danach langsam auf 30°C abkühlen lassen (in Alufolie eingewickelt)

2. *In vitro* Transkription (Roche Kit):

- 12 µl von den annealten RNA-Sonden
- + 2 µl RNase freies Wasser
- + 2 µl Biotin RNA labeling Mix 10x
- + 2 µl Transkriptionspuffer 10x
- + 2 µl T7-RNA Polymerase
- ➔ diesen 20 µl Ansatz bei 37°C für 2 Stunden inkubieren
- ➔ danach 1 µl DNase (RQ1, Promega) hinzufügen, um restliche Template-DNA zu entfernen; dafür Inkubation für 15 Minuten bei 37°C
- ➔ Reaktion mit 1 µl 0,5M EDTA (ph 8) abstoppen

3. Proteinisolation aus Zellen

mit speziellen X-linked-Puffer (RNA-binding buffer), dem 0,5% Triton X-100 und Complete (EDTA) zugesetzt wurde

4. *Cross-Link*

- 500 µl RNA binding Puffer ohne Triton
- + x µl Proteinlysate aus Zellen (möglichst 1000 µg)
- + 2 µl *in vitro* transkribierte biotinylierte RNA
- + 10 µl RNase Inhibitor
- ➔ Inkubation für 20 Minuten bei 30°C, dabei soll es zu einer Bindung der RNA mit den Proteinen kommen
- ➔ danach für 10 Minuten unter UV-Licht, damit die Bindung stabil gemacht wird

5. Pull Down

Methoden

- a. zur Cross-Link Reaktion wird 5 µl RNase A hinzugefügt, um restliche RNA zu verdauen, dafür Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT)
 - b. komplette Probe wird mit 40 µl Streptavidin Beads gemischt
 - Inkubation über Nacht (ü.N.) auf einem Drehrad bei 4°C, damit die biotinylierte RNA samt daran hängendem Protein an die Beads gebunden werden
6. Waschen der Streptavidin Beads
- Waschpuffer: X-Link Puffer mit 0,5 % Triton X-100
 - 5 mal mit jeweils 1 ml Waschpuffer Beads resuspendieren, danach für jeweils 1 min bei 10000rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
 - Nun werden die Streptavidin Beads, an denen die biotinylierte RNA mit Proteinen hängt, in 50 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 15 min bei 95°C im Schüttler bei 1400rpm inkubiert; dabei sollte sich alles, was an den beads hängt, ablösen
 - Probe einmal runter zentrifugieren, damit beads sich am Boden befinden
 - Überstand abnehmen und für anschließende SDS-Page mit Western Blot verwenden

3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten kommt die Technik der Agarosegel-Elektrophorese zur Anwendung. Unter Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zur Auftrennung und Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, da die DNA negativ geladen ist. Um DNA-Fragmente einer Größe von 300bp-5000bp ordentlich aufzutrennen, verwendet man in der Regel 0,8-2%ige Agarosegele. Zur Visualisierung der DNA im Agarosegel wird diesem bereits im noch flüssigen Zustand Ethidiumbromid zugefügt, welcher zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert und nach UV-Anregung als violett-rot leuchtende Bande sichtbar wird. Immer häufiger kommt es zur Anwendung wesentlich ungiftigerer Substanzen zur Visualisierung der Nukleinsäuren wie beispielsweise Midori-Green.

Zur Herstellung eines solchen Gels wird die gewünschte Menge an Agarose (Invitrogen, Karlsruhe, D) in 1xTBE- Puffer gelöst, aufgeköcht und in eine Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Der Laufpuffer ist 1x TBE. Die DNA-Proben werden mit 10x Agarose-Blaupuffer versetzt, in die Taschen des Gels aufgetragen und unter Anlegen einer Spannung anhand ihrer Größe aufgetrennt. Nach ausreichender Auftrennung der Proben erfolgt die bildliche Dokumentation mit dem Transilluminator über die Argus- X1R Software (Biostep, Jahnstadt, D).

3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde mit Hilfe des NanoDrop (ND1000, Peqlab, Erlangen, D) Gerätes bestimmt. Hierfür wird nur 1 µl der zu messenden Probe benötigt.

3.5 Sequenzierung

Um die Nukleotidsequenz diverser DNA-Abschnitte zu bestimmen, bedient man sich der Technik der Sequenzierung. Der Unterschied zu einer herkömmlichen PCR liegt hierbei in der zusätzlichen Verwendung von besonderen Didesoxyribonukleotiden (ddNTP`s), denen zwei Sauerstoffatome fehlen und die fluoreszenzmarkiert sind. Kommt es zum Einbau eines ddNTP`s, wird die Synthese des Komplementärstranges unterbunden, da es durch das zweite fehlende Sauerstoffatom nicht zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen weiteren Nukleotiden kommen kann. Die Folge ist ein Kettenabbruch. Durch eine anschließende hochprozentige gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente anhand ihrer Größe und der Fluoreszenzmarkierung der ddNTP`s kann schließlich die Sequenz des DNA-Moleküls mit einer UV-Lampe detektiert werden. Dies geschieht im Sequenziergerät.

Standardbedingungen für eine Sequenzier-PCR (Hertie-Institut für klinische Hirnforschung)

Zusammensetzung:	Programm:
1,5 µl Big Dye	1x 94°C 1min
1,25 µl Puffer	
2,25 µl H ₂ O	30x 94°C 10sec
1,0 µl Primer	30x 60°C 4min
4,0 µl PCR-Produkt/Plasmid	

Standardbedingungen für eine Sequenzier-PCR (Medizinische Genetik Tübingen)

Zusammensetzung:	Programm:
4,0 µl DCTS Quick Start Mix	1x 94°C 1min
4,0 µl Q-Solution	
1,0 µl Primer	30x 96°C 20sec
11,0 µl PCR-Produkt/Plasmid	30x 50°C 20sec
	30x 60°C 4min

Aufreinigung der Sequenzier-PCR Reaktionsprodukte

Es kamen zwei Methoden zur Aufreinigung der Sequenzier-PCR Reaktionsprodukte zur Anwendung. Wurde die Aufreinigung am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen durchgeführt, erfolgte sie wie bereits beschrieben identisch zur Aufreinigung von PCR-Produkten (Abschnitt 3.1). 7 µl dieses aufgearbeiteten Produktes wurden anschließend mit 10 µl Hi-Di-Formamid in eine 96 Well Platte pipettiert und mit dem ABI-Sequencer 3110 (Applied Biosystems) analysiert.

Methoden

In der Medizinischen Genetik, Tübingen erfolgte die Aufreinigung wie folgt (bereits in eigener Diplomarbeit niedergeschrieben):

- 1. Schritt:** Stoppen der Sequenzierreaktion mit einem Stop Mix:
 - 1µl Glycogen (20mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe, D)
 - 2µl 100 mM Na₂EDTA (ph 8,0)
 - 2µl 3 M Na Acetat (pH 5,2)
- 2.Schritt:** 5 µl des Stop Mix in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) vorlegen, 20 µl des Sequenzierproduktes dazu geben, danach 60 µl eiskaltes Ethanol (Merck, Darmstadt, D) (100%) dazu pipettieren
- 3.Schritt:** 45- 60 min bei 4°C und full speed zentrifugieren
- 4.Schritt:** Überstand vorsichtig abkippen, 200 µl eiskaltes Ethanol (70%) dazu geben
- 5.Schritt:** 45- 60 min bei 4°C und full speed zentrifugieren
- 6.Schritt:** Überstand vorsichtig abkippen, 85 µl eiskaltes Ethanol (70%) dazu geben
- 7.Schritt:** 45- 60 min bei 4°C full speed zentrifugieren
- 8.Schritt:** Überstand vorsichtig abkippen, gesamter Alkohol muss entfernt werden
- 9.Schritt:** Reaktionsgefäß für 12,5 min in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, D) bei 30 °C inkubieren
- 10.Schritt:** getrocknetes Pellet in 40 µl SLS (Sample Loading Solution; Beckman Coulter, Krefeld, D) aufnehmen und gut vortexen
- 11.Schritt:** Probe für mind. 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 12.Schritt:** Sequenzierung kann gestartet werden, Proben werden in 96 well Platte pipettiert und mit 1 Tropfen Mineralöl (Beckman Coulter, Krefeld, D) überschichtet

3.6 SNaPshot®-Methode

Zur Analyse mehrerer SNPs in den Genen *MDR1* und *HO-1* wurde die SNaPshot®-Methode verwendet. Die SNaPshot®-Methode eignet sich hervorragend für eine SNP-Analyse in einer Multiplex-Reaktion. Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezielle Sequenzier-PCR, bei der es zur Verlängerung eines gewählten Primers kommt, welcher exakt eine Base vor der zu analysierenden Stelle endet. Im verwendeten Multiplex-Kit (Applied Biosystems) sind ausschließlich fluoreszenzmarkierte didesoxy-Nukleotide (ddNTPs) enthalten, sodass bei der Elongation im Sequenzier-PCR Prozess nur eine einzige Base an den Primer binden kann und die Reaktion danach abbricht. Dies geschieht aufgrund der Tatsache, dass den ddNTPs zwei Sauerstoffatome fehlen und es so nicht mehr zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen weiteren Nukleotiden kommen kann. Bei der Durchführung dieser Reaktion wurde sich an den Angaben des Herstellers orientiert. Eine Besonderheit bei dieser Methode ist, dass mehrere Primer gleichzeitig in einer Reaktion verwendet werden können, wenn sie sich um

Methoden

mindestens 5 Basen ihrer Länge unterscheiden. Dies erreicht man durch Anhängen unspezifischer T's an das 5`Ende bei *forward*-Primern und A's bei *reverse*-Primern.

Nach der PCR-Amplifikation wurden 15 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1 U/µl) und 1 µl Exonuclease I (2 U/µl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einer Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 75°C für 15 Minuten wurde die SNaPshot-PCR in einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt. Der hierfür verwendete Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

- 2 µl SNaPshot® Multiplex Kit (Applied Biosystems)
- 3 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 0,5 µl von jedem SNaPshot Primer (4 pmol/µl).

Die SNaPshot-Primer können dem Materialteil (Kapitel 2) dieser Arbeit entnommen werden. Folgende PCR-Bedingungen kamen zur Anwendung.

Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen für die SNaPshot-PCR

Durchführungsschritt	Anzahl	Zeit	Temperatur
Denaturierung	1x	60 sec	94°C
Amplifikation	25x	10 sec	96°C
		5 sec	50°C
		30 sec	60°C
Kühlung	1x	∞	12°C

Anschließend wurde die SNaPshot-PCR durch Inkubation mit 1 µl SAP (1U/µl) für 1h bei 37°C aufgereinigt. Die SAP wurde danach durch Hitze inaktiviert (75°C für 15 Minuten).

Die Genotypisierung der SNPs erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser (program Array 50 cm, polymer POP6, running time 1,000 s, injection voltage 2 kV, injection time 15 s). Dafür wurde jeweils 1 µl der aufgereinigten SNaPshot PCR Reaktion mit 10 µl Hi-Di Formamid und 0.2 µl GeneScan™-120 LIZ™ Größenstandard, welcher speziell für kleine Fragmente hergestellt wurde, gemischt. Die resultierenden Daten wurden mit der GeneMapper® Software v3.5 ausgewertet.

3.7 Fragmentlängenanalyse

Die Fragmentlängenanalyse wurde eingesetzt, um den (GT)n-Repeat-Polymorphismus in der Promotorregion des *HO-1* Gens zu untersuchen. Dafür wird zunächst der zu untersuchende Bereich durch eine PCR amplifiziert. Die Besonderheit dieser PCR liegt darin, dass am 5` Ende des *forward*-Primers eine Fluoreszenzmarkierung angehängt wird (Cy5), welche später wichtig ist für die Detektion im Sequenziergerät. Das Reaktionsvolumen des PCR-Ansatzes betrug 25 µl und sah wie folgt aus:

Methoden

1 µl DNA
1 µl forward Primer –Cy5 (10 pmol/µl)
1 µl reverse Primer (10 pmol/µl)
2,5 µl 10xPuffer (Genecraft)
0,5 µl dNTPs (10mM, Invitrogen)
2,0 µl Betain (5M, Sigma)
1,5 µl Taq Polymerase (Genecraft)
X µl H₂O

Die PCR Bedingungen können dem folgenden Protokoll entnommen werden.

Tabelle 3.2: PCR-Bedingungen für die Fragmentlängenanalyse

Durchführungsschritt	Anzahl	Zeit	Temperatur
Denaturierung	1x	5 min	94°C
Amplifikation	35x	30 sec	94°C
		30 sec	64°C
		60 sec	72°C
finale Elongation	1x	5 min	72 °C
Kühlung	1x	∞	12°C

Das PCR-Produkt wurde im Verhältnis 1:15 mit Wasser verdünnt. Davon wurden 5 µl mit 34,5 µl SLS-Lösung (Beckman Coulter®) gemischt, sowie 0,5 µl eines internen Standards dazu gegeben (GenomeLab DNA size standard kit – 600, Beckman Coulter®). Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Probe im Sequenziergerät von Beckman Coulter® unter den nachstehenden Bedingungen: Temperatur der Kapillaren 50°C, Denaturierung bei 90°C für 120 sec, Injektionszeit 2 kV für 30 sec, Auftrennung 6kV für 60 min. Mit Hilfe der CEQ™ 8000 Genetic Analysis System Software, Version 9.0 (Beckman Coulter®) wurden die Daten anschließend analysiert und ausgewertet.

3.8 High Resolution Melting

Das *High Resolution Melting* ist eine Methode, bei welcher PCR-Produkte einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen werden. Dabei können kleinste Unterschiede im Schmelzkurvenverhalten der PCR-Produkte einen Hinweis auf eine veränderte Basensequenz im PCR-Produkt geben. Somit eignet sich diese Methode gut, um entweder unbekannte SNPs in Genen zu entdecken oder bereits bekannte SNPs in größeren Kohorten zu screenen. Zur Untersuchung von SNP rs13180 und rs2656070 im *IREB2*-Gen wurde diese Methode verwendet. Dabei wurde dem *High Resolution Melting* PCR-Ansatz zusätzlich eine ungelabelte Sonde in Form eines nicht markierten Primers hinzugefügt, welcher direkt über dem zu

Methoden

untersuchenden SNP an die DNA beim Schritt des Annealing bindet. Damit diese Sonde beim Vorgang der PCR nicht mit elongiert werden kann, muss diese Sonde am 3` Ende durch das Anhängen eines Phosphates blockiert werden. Durch diese Sonde, welche entweder perfekt zur genomischen DNA passt und somit erst später abschmilzt oder einen mismatch aufweist, und somit ein früheres Abschmelzen sichtbar wird, ist die Auswertung möglich. Die Reaktion wurde im Light Cycler® 480 Gerät (Roche) in einer 96 Well Platte durchgeführt. Der PCR-Ansatz (20 µl) sah wie folgt aus:

2,0 µl DNA
0,5 µl forward Primer (1pmol/µl)
1,0 µl reverse Primer (10pmol/µl)
1,0 µl unlabeled probe (10pmol/µl)
10,0 µl High Resolution Melting Master 2x (Roche)
3,1 µl H₂O

Tabelle 3.3: Reaktionsbedingungen für das *High Resolution Melting*

Durchführungsschritt	Anzahl	Zeit	Temperatur
Denaturierung	1x	10 min	95°C
Amplifikation	45x	10 sec	95°C
		15 sec	68°C
		20 sec	72°C
High Resolution Melting	1x	1 min	95°C
		1 min	40°C
		1 sec	50°C
			95°C
Kühlung	1x	∞	40°C

Die Auswertung erfolgte mit der Light Cycler® 480 Software von Roche.

3.9 Next Generation Sequencing (NGS)

Zur Sequenzierung der DNA-Proben aus den drei prämotorischen Kohorten (Hyposmie, Depression und RBD) wurde die Technik des NGS verwendet, da hiermit alle gewünschten Gene in kürzester Zeit analysiert werden konnten. Durchgeführt wurde das Ganze in der CeGaT GmbH von den dortigen Mitarbeitern nach Firma-internen Standardbedingungen. Dafür wurden die kodierenden Bereiche, sowie die angrenzenden Intronbereiche der zu analysierenden Gene mit der Agilent in Solution Technologie angereichert und anschließend mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung auf dem SOLiD 5500xl System (Applied Biosystems / Life Technologies) analysiert. Dabei sollten nach CeGaT GmbH-Standards eine

Abdeckung von mindestens 10 Sequenzen pro Base mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung erreicht werden.

3.10 Klonierung

Unter einer Klonierung versteht man das Einbringen eines DNA-Fragments in einen Vektor, welcher anschließend zur gezielten Vermehrung in einen Wirtsorganismus eingebracht wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Konstrukte homolog zum Exon 41 des *LRRK2*-Gens kloniert, welche anstatt der Wildtyp-Sequenz einmal eine D1994A-Mutation trugen und einmal eine I2020T-Mutation. Die Klonierung begann mit zwei Mutagenese-PCR-Schritten, denen eine gesunde Kontroll-DNA als Ausgangsgrundlage diente. Im ersten Mutagenese-PCR-Schritt wurden zwei PCR-Produkte hergestellt. Der linke Teil des Inserts wurde durch die Wahl der Primer so amplifiziert, dass er am 5` Ende von einer Sfi I-Schnittstelle flankiert war und der rechte Teil des Inserts am 3` Ende von einer Asc I-Schnittstelle. Überdies war zusätzlich über die inneren gewählten Primer die gewünschte Mutation (entweder D1994A oder I2020T) in beiden PCR-Produkten vorhanden. Die Primer können dem Materialteil dieser Arbeit entnommen werden. Für den zweiten Mutagenese-PCR-Schritt wurden nun die aufgereinigten PCR-Produkte (über Ethanol-fällung) der ersten Mutagenese in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und dienten als Template für die zweite Mutagenese. Es wurde nun der Sfi I-Primer als *forward*-Primer verwendet und der Asc I-Primer als *reverse*-Primer. Dadurch entstand ein einziges PCR-Produkt, welches durch die richtigen Enzymschnittstellen flankiert war und zusätzlich die gewünschte Mutation eingebaut hatte. Dieses PCR-Produkt der zweiten Mutagenese wurde mit einem Skalpel aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, D) aufgereinigt.

Mutagenese-PCR

Zusammensetzung:	Programm:
	1x 94°C 2,5min
1,0 µl Sfi I for oder D1994A/I2020T for	
1,0 µl D1994A/I2020T rev oder Asc I rev	94°C 30 sec
0,5 µl dNTPs (10pmol/µl)	35x 60°C 30sec
1,0 µl DNA (10ng/µl)	72°C 1:30min
5,0 µl Puffer	
0,3 µl Taq Polymerase	1x 72°C 5min
16,2 µl H ₂ O	

Dieses aufgereinigte PCR-Produkt der zweiten Mutagenese wurde nun zunächst in einen Vermehrungsvektor, dem pGEM®-T Vektor (Promega) hinein kloniert. Dafür war darauf zu

Methoden

achten, dass das Verhältnis von Vektor zu DNA ungefähr wie 1:3 vorliegt. Für die Einklonierung wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert (Ligationsansatz):

5 µl Rapid Ligation Puffer 2x
50 ng pGEM®-T Vektor
1 µl T4 DNA Ligase
x µl PCR-Produkt
x µl H₂O

Dieser 10 µl Ansatz wurde dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Transformation dieses Ligationsansatzes in One Shot® Top 10 chemisch kompetente Zellen (E.coli, Invitrogen). Dafür wurden 2 µl Ligationsansatz mit 20 µl der E.coli Zellen vorsichtig gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend bekamen die Zellen eine Hitzeschockreaktion für 45 Sekunden mit 42°C, wobei sich kleine Poren in der Membran der Bakterien kurzzeitig öffnen. Danach wurden sie wieder für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Proben für 1 Stunde im Schüttler bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 100 µl des Ansatzes auf einer LB-Platte mit einer Ampicillin-Resistenz (weil pGEM®-T eine Amp-Resistenz besitzt) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Bakterienklone, die auf diesen Platten gewachsen sind, sollten theoretisch das Insert in sich aufgenommen haben, denn nur so ist das Wachstum auf einer sonst toxischen Ampicillinkonzentration zu erklären. Um diese Aufnahme zu überprüfen, erfolgte eine sog. Colony-PCR, die wie folgt zusammengesetzt war.

Colony-PCR (Anneling bei 58°C)

2 µl Puffer
0,2 µl dNTPs
0,2 µl T7 forward Primer
0,2 µl SP6 reverse Primer
0,1 µl taq-Polymerase
7,3 µl Wasser
1 gepickter Bakterienklon

Im pGEM®-T Vektor sind bestimmte Sequenzbereiche flankierend um die Region des einklonierten Inserts gelegt. So ist beispielsweise auf einer Seite ein Sequenzbereich des T7-Promotors und auf der anderen ein Sequenzbereich des SP6-Promotors. Somit kann über Primer, die in dieser Region liegen, die Colony-PCR durchgeführt werden.

Bakterienklone, die das gewünschte Insert aufgenommen haben, wurden in einer LB-Flüssigkultur (Ampicillin 1:1000) über Nacht vermehrt. Davon wurde eine Mini-Präp durchgeführt (Qiagenprotokoll), um das Plasmid aus den Bakterienklonen zu isolieren.

Methoden

Anschließend erfolgte die Sequenzierung des Plasmids, um zu überprüfen, ob die gewünschte Mutation darin enthalten und auch keine zusätzliche Mutation dazu gekommen ist. Nach Sicherstellung dieser Tatsache erfolgte von dem Klon eine starke Vervielfältigung in Form einer über Nacht Kultur in 100ml LB-Medium. Davon wurde am nächsten Tag eine Maxi-Präp mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen durchgeführt, um das Plasmid daraus zu isolieren.

Nun lag das Plasmid in ausreichend hoher Konzentration vor und sollte folglich nun vom Vermehrungsvektor pGEM[®]-T in den Empfängervektor pEasyFloxxII umklont werden. Dafür musste das Insert mit der gewünschten Mutation (D1994A/I2020T) mit Restriktionsenzymen aus dem pGEM[®]-T Vektor herausgeschnitten werden. Gleichzeitig musste auch der Empfängervektor pEasyFloxxII mit denselben Enzymen aufgeschnitten werden. Der Verdau Ansatz sah dabei wie folgt aus:

2 µl NEB 4 Puffer
1 µl AscI (NEB)
1 µl pGEM[®]-T + Insert (D1994A/I2020T) / pEasyFloxxII
15 µl dd H₂O

Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde noch:

1 µl SfiI (Fermentas) und
1 µl BSA (2mg/ml) hinzugegeben.

Dieser Ansatz wurde nochmal eine Stunde bei 50°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Verdauansätze in einem 1,5%igen Agarose-Gel lange aufgetrennt. Die Banden für den pEasyFloxxII Vektor, sowie für das ausgeschnittene D1994A/I2020T Insert wurden aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (Qiagen Kit). Nach Konzentrationsbestimmung erfolgte der Ligationsansatz zwischen dem Insert und dem pEasyFloxxII-Vektor.

2 µl T4 Ligase Puffer (Fermentas)
1 µl T4 Ligase
0,025 pmol Vektor
0,075 pmol Insert
x µl H₂O

Dieser Ansatz wurde mindestens über Nacht bei 16°C inkubiert. Danach erfolgte der ganze Prozess der Transformation in chemisch kompetente Zellen, ausplattieren auf LB Platten (Ampicillin) und dem Picken von Einzelklonen für die Colony-PCR erneut. Natürlich wurden für die Colony-PCR spezifische Primer verwendet, die im pEasyFloxxII-Vektor binden. Ebenso wiederholte sich im Folgenden der Prozess des Anlegens einer über Nacht Kultur in flüssigem LB-Medium, der Vorgang der Mini-Präp, Sequenzierung und ebenso das Vermehren positiv

Methoden

sequenzierter Klone in einer großen LB-Flüssigkultur. Am Ende lag der pEasyFloXII-Vektor mit dem gewünschten Insert in hoher Konzentration vor.

Um ihn nun für eine Transfektion in eukaryotische Zellen verwenden zu können, musste er noch linearisiert werden. Dies wurde durch das einmalige schneiden mit dem Restriktionsenzym XhoI erreicht. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

100 µg Plasmid DNA
10 µl red buffer (Fermentas)
10 µl XhoI (Fermentas)
X µl H₂O

Dieser 100 µl Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend fand eine Hitzeinaktivierung des XhoI bei 80°C für 20 Minuten statt. So konnte er für die Transfektion verwendet werden.

Für das D1994A-Konstrukt muss sichergestellt werden, dass die Mutation homozygot in den eukaryotischen Zellen vorliegt, damit der gewünschte Effekt nicht durch ein zweites Allel kompensiert werden kann. Daher musste zusätzlich das bisher hergestellte Konstrukt (pEasyFloXII+D1994A) so umkloniert werden, dass ein anderes Antibiotikum zur Selektion im Zellkulturmedium eingesetzt werden kann. Es sollte Blasticidin sein. Nur eukaryotische Zellen, welche sowohl auf Ampicillin als auch auf Blasticidin wachsen, sind demnach homozygote Mutanten. Zur Einklonierung der Blasticidinresistenz wurde der pLenti6.3/V5-DEST (Invitrogen) Vektor als Ausgangs-DNA verwendet, weil dieser über eine Blasticidinresistenz verfügt. Es wurden also Primer hergestellt, welche die Blasticidinresistenz, einschließlich des dafür benötigten EM7-Promotors, amplifizierten mit jeweils einem Überhang homolog zum pEasyFloXII Vektor. Die PCR wurde mit einer Pfu-Polymerase durchgeführt:

PCR-Ansatz:	Protokoll:		
2 µl PCR Puffer	1x	94°C	2,0min
0,6 µl forward Primer		94°C	30 sec
0,6 µl reverse Primer	40x	52°C	30sec
0,4 µl dNTPs		72°C	1:30min
0,5 µl Pfu-Polymerase			
1,0 µl pLenti6.3 Vektor			
13,9 µl H ₂ O	1x	72°C	5min

Methoden

Das PCR-Produkt wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Diese Blastocidinresistenz sollte nun in den pEasyFloXII-Vektor inkloniert werden. Dafür muss der Vektor zunächst über eine Elektroporation in DH5 α -elektrisch kompetente E.coli Zellen transformiert werden. Hierfür werden 25-50 μ l DH5 α -Zellen mit 1 μ l pEasyFloXII+D1994A in eine Elektroporationsküvette pipettiert und kurz gemischt. Diese Küvette wird in ein Elektroporationsgerät gestellt und ein elektrischer Impuls ausgelöst, der dafür sorgt, dass die Membran der Bakterien sich kurz öffnet und sie den Vektor somit aufnehmen können. Nach Zugabe von 700 μ l LB Medium wird das gesamte Gemisch in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 Stunde bei 37°C und 400 rpm inkubiert. Anschließend erfolgt das Ausplattieren der Bakterien auf einer LB Platte mit einer Ampicillinresistenz, die der pEasyFloXII-Vektor besitzt. Von den über Nacht gewachsenen Klonen werden einige gepickt und in eine 3 ml LB-Flüssigkultur überführt, welche über Nacht bei 37°C inkubiert wird. Davon werden am nächsten Tag 50 μ l in 1,5 ml LB Medium (+Ampicillin) angeimpft und solange bei 37°C inkubiert bis sie eine optische Dichte von 0,3 erreicht haben (600nm Wellenlänge). Jetzt werden die Bakterien für das weitere Prozedere aufgearbeitet. Hierfür erfolgt eine Zentrifugation für 1 Minute bei 11000 rpm und 4°C. Während der Überstand verworfen wird, wird das Pellet zweimal mit 1ml dd H₂O gewaschen. Zwischendurch erfolgten die gleichen Zentrifugationsschritte. Im restlichen Wasser werden die Bakterien resuspendiert. Im nächsten Schritt werden diese aufgearbeiteten Bakterien mit dem aufgenommenen pEasyFloXII einer erneuten Elektroporation unterzogen. Diesmal wird dem Ansatz der sog. Red-ET-Vektor zugegeben. Dieser soll später über eine homologe Rekombination das Blastocidin einbauen, da er über eine aktive Rekombinase verfügt. Der Elektroporationsansatz mit 2 μ l Red-ET-Vektor, 20 μ l Bakterien und 700 μ l LB-Medium wird 1 Stunde bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend werden 100 μ l auf LB-Platten ausgestrichen, welche sowohl eine Ampicillinresistenz (100 μ g/ml) als auch eine Tetracyclinresistenz (4 μ g/ml) aufweisen, da die Tetracyclinresistenz im Red-ET-Vektor vorhanden ist. Diese werden über Nacht bei 30°C inkubiert. Von positiv gewachsenen Klonen wird eine über Nacht Kultur mit Amp/Tetra angesetzt und bei 30°C geschüttelt. Davon wiederum werden 100 μ l in 1,5 ml LB Medium mit Amp/Tetra bei 30°C solange wachsen gelassen, bis sie eine optische Dichte von 0,3 erreicht haben (600nm). Nun kommt ein wichtiger Schritt: Es werden zu diesem Gemisch 50 μ l 10%ige L-Arabinose hinzugefügt und nochmals 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. In diesem Schritt wird die Arabinose als Substrat verwendet, die Rekombinase zu exprimieren und der Red-ET-Vektor wird abgebaut. Im Folgenden werden die Bakterien wie vorhin beschrieben mit dd H₂O aufgereinigt und nun nochmals elektroporiert. Die aufgereinigten Bakterien enthalten nun den pEasyFloXII mit der gewünschten Mutation sowie eine aktive Rekombinase. Durch die Elektroporation kommt nun noch die Blastocidinresistenz dazu. Dafür werden 2 μ l PCR-Produkt zu den gelösten Bakterien gegeben, elektroporiert, mit 700 μ l LB-Medium versorgt und bei 37°C für 70 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubation findet die homologe Rekombination statt. Die Bakterien werden nun auf LB-Platten ausplattiert, welche eine Ampicillinresistenz (100 μ g/ml) und eine Blastocidinresistenz (100 μ g/ml) aufweisen. Diese werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Klone, die auf diesen Platten gewachsen sind, werden in einer Colony-PCR auf die Integration von Blastocidin hin überprüft und später auch sequenziert. Von den gewünschten

Klonen wird eine Maxi-Präp durchgeführt und eine Linearisierung. Somit kann dieses Konstrukt nun auch für die Transfektion in eukaryotische Zellen verwendet werden mit einer anderen Antibiotikaresistenz.

3.11 Zellkultur

Die Kultivierung der SHSY5Y-Zellen, HEK 293-Zellen, Fibroblasten und Neuronen erfolgt bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank der Firma Binder (Tuttlingen, D). Für eine optimale Nährstoffversorgung der adhärennten Zellen wurde regelmäßig das entsprechende Medium gewechselt. Die Passagierung erfolgt bei einer Konfluenz von 90-95%. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS (Invitrogen, Karlsruhe, D) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Accutax™ (Millipore, Temecula, USA), um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Zum Stoppen dieser Reaktion wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und 1 ml dieser Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche (75 cm², Corning Inc., NY, USA) überführt, die bereits mit 9 ml frischen Kulturmedium befüllt war.

Eine Zellzahlbestimmung wurde mit einer sog. Neubauer Zählkammer (Karl Hecht Assistent, Sondheim, D) durchgeführt.

Zur Selektion von positiven Zellklonen nach Transfektion mit dem Zinkfinger und den gewünschten Konstrukten wurde das Medium entweder mit 50 µg/ml Geneticin (Invitrogen, Karlsruhe, D) oder 5 µg/ml Blastocidin (Invivogen, Hongkong, China) versetzt, je nach Resistenzmarker in dem vorhandenen Konstrukt.

Zum Auslösen von Eisen-Stress wurden die Zellen entweder 24 Stunden mit 1mM Konzentration an FeCl₃ (Sigma, Saint Louis, D), 60 µg/ml holo-Transferrin (Sigma, Saint Louis, D) oder 100 µM DFO (Sigma, Saint Louis, D) behandelt.

3.12 Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Zellen mit Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, D) beruht auf der Verwendung von kationischen Lipiden, die dafür sorgen, dass die Plasmid-DNA gebunden und in die Zelle eingeschleust wird. Die positiv geladenen Komplexe aus Plasmid und kationischen Lipiden binden an diverse negativ geladene Reste auf der Zelloberfläche und werden dann über Phagozytose in die Zelle aufgenommen.

Für eine Transfektion der SHSY5Y-Zellen und HEK-Zellen mit dem homologen Konstrukt (pEasyFloxII mit Insert) und dem Zinkfinger sollten die Zellen eine 70-90 %ige Konfluenz aufweisen. Die Transfektion findet in einer 10 cm Zellkulturplatte statt. Dafür werden vor der Transfektion zwei Falcon-Röhrchen vorbereitet. In das erste Röhrchen werden 1500 µl Opti-

Methoden

MEM® I Reduced Serum Medium (Invitrogen, Karlsruhe, D) mit 60 µl Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, D) vermischt. Im zweiten Röhrchen werden 1500 µl Opti-MEM® mit insgesamt 20 µg Vektor gemischt. Dabei setzen sich die 20 µg Vektor aus einem 1:1:1 Verhältnis zusammen: 6,7 µg Zinkfinger 1 + 6,7 µg Zinkfinger 2 + 6,7 µg Mutationsvektor. Ist alles zusammen pipettiert, wird es gut gevortext und danach für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird der Inhalt aus dem ersten Röhrchen zum Zweiten dazu pipettiert, gut gevortext und erneut bei RT für 20 min inkubiert. In dieser Inkubationszeit wird das Medium der zu transfizierenden Zellen abgesaugt und neues Medium ohne Penicillin und Streptomycin hinzu gegeben. Nach der Inkubationszeit erfolgt dann die tropfenweise Zugabe der Lipofectamin/Opti-MEM/Vektor/Zinkfinger-Mischung zum Medium der Zellen. Der Vorgang der Transfektion wird nach spätestens 8 Stunden beendet, indem das Medium erneut gewechselt und durch herkömmliches Nährstoffmedium ersetzt wird.

24 Stunden nach erfolgter Transfektion begann die Selektion der Zellen mit dem spezifischen Antibiotikum. Dabei sah es zunächst so aus als würden fast alle Zellen sterben und schwammen im Medium herum. Nach Absaugen der toten Zellen und erneuter Zugabe des Selektionsmediums wuchsen jedoch doch ein paar vereinzelt Klone heran. Diese wurden nach mehreren Tagen in eine 24 Well Schale überführt und weiter herangezogen. Ein Teil dieser Zellklone wurde zur DNA Isolation abgenommen, um die erfolgreiche Integration erstens durch eine Integrations-PCR und zweitens durch eine Sequenzierung zu überprüfen.

Die Primer für die Integrations-PCR, sowie für die Sequenzierung können der Tabelle im Materialteil entnommen werden. Die Zusammensetzung ist unten aufgelistet:

Integrations PCR (Annealing 60°C)

4,6 µl Puffer
2,4 µl Q-Solution
1,2 µl DMSO (1:1000)
0,4 µl dNTPs (10mM)
0,4 µl forward Primer (10pmol/µl)
0,4 µl reverse Primer (10pmol/µl)
8,6 µl H₂O
0,1 µl Taq Polymerase
2,0 µl DNA (10ng/µl)

LRRK2 Exon 41 (Annealing 60°C)

4,0 µl Puffer
2,4 µl MgCl₂
0,4 µl dNTPs
0,4 µl Exon 41 forward Primer(10pmol/µl)
0,4 µl Exon 41 reverse Primer (10pmol/µl)
8,3 µl H₂O
0,1 µl Taq Polymerase
4,0 µl DNA (10ng/µl)

Nach erfolgter Integrations-PCR wurde diese auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Wenn es eine positive Bande im Gel zu sehen gab, wurde diese aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und davon eine PCR mit *LRRK2* Exon 41 Primern durchgeführt (oben zu sehen). Das PCR-Produkt wurde durch Ethanol-fällung aufgereinigt und nachfolgend eine Sequenzier-PCR angesetzt, um die Basensequenz zu überprüfen.

Überdies wurden SHSY5Y-Zellen mit einem leeren GFP-Vektor, sowie auch mit einem pCMV-Vektor, welcher *IREB2* überexprimiert, transfiziert. Hierfür wurde der Prozess der Transfektion wie bereits beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde die Transfektion in 6-Well Schalen durchgeführt (je 100000 Zellen einen Tag zuvor ausgesät). Dies änderte das Volumen der einzelnen Reagenzien. Im ersten Gefäß wurden 250 µl Opti-MEM mit 5 µl Lipofectamin zusammen pipettiert und im zweiten Gefäß 250 µl Opti-MEM mit entweder 10 µg GFP oder cDNA *IREB2* (pCMV). Die restlichen Schritte der Transfektion sind mit den bereits beschriebenen Durchführungen identisch. Die Transfektionseffizienz lag bei 50%. Dies wurde durch das grüne Fluoreszenzleuchten unter dem Mikroskop überprüft.

3.13 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus PAXgene-Bluttröhrchen erfolgte mit Hilfe des PAXgene Blood RNA Kits (PreAnalytiX GmbH, CH) unter Anwendung des QIA CUBE Roboters (Qiagen, Hilden, D) nach den Angaben der jeweiligen Hersteller. Die RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden, D) nach den Angaben im Handbuch des Herstellers.

3.14 RNA-Qualitätsmessung

Mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., USA) wurde die jeweilige RNA Qualität, unter zu Hilfenahme eines speziellen Chips (RNA6000 Nano LabChip, Agilent Technologies, Inc., USA), bestimmt. Hierfür wurde das RNA 6000 Nano-Assay der Firma Qiagen (Hilden, D) verwendet.

3.15 cDNA- Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt unter Verwendung spezieller Oligo-dT Primer, die diesem Kit beigelegt sind. Alle durchgeführten Schritte können dabei dem Handbuch des Herstellers entnommen werden.

3.16 Quantitative Real Time-PCR (RTQ-PCR)

Zur quantitativen Messung von Nukleinsäuren kommt die Technik der quantitativen Real Time-PCR zum Einsatz. Dabei werden Expressionstärken gemessener Gene anhand bekannter *housekeeping*-Gene verglichen und berechnet.

Methoden

Nachfolgend aufgeführt ist zum einen die Zusammensetzung des Mastermixes für die qPCR, sowie das durchgeführte PCR-Programm, welches am Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, D) zum Einsatz kam.

Tabelle 3.4: Mastermix für die quantitative Real Time-PCR

verwendete Substanzen	verwendete Menge
H ₂ O	2 µl
Primer (1:20 verdünnt, 5 pmol/µl, <i>forward</i> und <i>reverse</i> zusammen)	1 µl
QuantiTect®SYBR®Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, D)	5 µl
cDNA (1:20 verdünnt)	2 µl

Tabelle 3.5: PCR-Programm für die quantitative Real Time-PCR

Durchführungsschritt	Anzahl	Zeit	Temperatur
Denaturierung	1x	15 sec	95°C
Amplifikation	55x	15 sec	94°C
		40 sec	58°C
		20 sec	72°C
Schmelzkurve	1x	15 sec	95°C
		20 sec	65°C
		bis Ende	95°C
Kühlung	1x	1 sec	40°C

Die Auswertung erfolgte einerseits mit der Light Cycler® 480 Software release 1.3.0705 (Roche Diagnostics, Mannheim, D), andererseits mit der qBase-Software. Die PCR Effizienz des Reaktionsansatzes sollte für weiterführende Analysen zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Anhand einer zusätzlich pipettierten Verdünnungsreihe, aus welcher eine Standardkurve generiert wird, kann anschließend die relative Expression der gemessenen Gene im Abgleich mit den zusätzlich gemessenen *housekeeping*-Genen ermittelt werden. Wichtig ist auch die Ermittlung der Schmelzkurve des PCR-Produktes, anhand derer man erfährt, ob nur das spezifische PCR-Produkt entstanden ist, oder ein zusätzliches Nebenprodukt erzeugt wurde.

3.17 Proteinisolation aus eukaryotischen Zellen

Die adhärennten Zellen wurden mit einem Zell-Schaber (Corning Inc., NY, USA) vom Flaschenboden mechanisch gelöst, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, pelletiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit einem speziellen Lysepuffer (100 µl Kazerounian RIPA-Puffer plus Complete EDTA (Roche Diagnostics, Mannheim, D)) für 30 Minuten inkubiert. Der RIPA-Puffer schließt die Zellen auf. Der Zusatz von Complete (Roche, Mannheim, D) ist wichtig, da er Protease-Inhibitoren enthält. Alle Schritte erfolgten dabei auf Eis. Während der

Methoden

Inkubationszeit von 30 Minuten wurde der Ansatz alle 10 Minuten gevortext, um die Lyseeffizienz zu vergrößern. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 13200 rpm bei 4°C, bei der sich unlösliche Zellbestandteile am Boden des Reaktionsgefäßes absetzten von den Proteinen im Überstand. Der Überstand mit den darin befindlichen Proteinen wurde anschließend quantifiziert.

3.18 Protein-Quantifizierung mit dem Bradford-Assay

Um die Proteinmenge in einem Lysat zu quantifizieren, kann man ein Bradford-Assay anwenden (Bradford 1976). Hierfür versetzt man eine definierte Menge des Proteinlysats mit Bradford-Reagenz und misst anschließend die optische Dichte der Flüssigkeit. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass in dem Bradford-Reagenz der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G enthalten ist, der im sauren Milieu mit Proteinen eine Komplexbildung eingeht. Coomassie Brilliant Blue G hat ein Absorptionsmaximum bei 465 nm (braun). Durch die Bildung des Protein-Farbstoffkomplexes verschiebt sich dieses Absorptionsmaximum auf eine Wellenlänge von 585 nm (blau). Die Stärke der Absorption hängt dabei von der Proteinmenge ab. Über eine Standardkurve kann anschließend die jeweilige Proteinmenge bestimmt werden.

Der hierfür verwendete Proteinstandard (BSA 100x, 10 mg/ml, New England Biolabs, Frankfurt a. Main, D) hat eine Konzentration von 1mg/ml. Das Protein-Bradford Gemisch wird anschließend in Glasküvetten (Roth, Karlsruhe, D) gegeben und im Photometer bei 595 nm gemessen.

Im Folgenden ist ein dazu verwendetes Pipettierschema angegeben.

Tabelle 3.6: Pipettierschema für den Bradford-Assay

Probe	H ₂ O	Bradford Reagenz	Proteinmenge
Nullwert	800 µl	200 µl	-
Standard 1	799 µl	200 µl	1 µl
Standard 2	798 µl	200 µl	2 µl
Standard 5	795 µl	200 µl	5 µl
Standard 10	790 µl	200 µl	10 µl
Standard 15	785 µl	200 µl	15 µl
Proteinlysate	798 µl	200 µl	2 µl

3.19 Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen anhand ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld. Dabei wandern die Proteine von der Kathode zur Anode. Hierfür verwendet man Polyacrylamidgele. Im Allgemeinen kommt eine

Methoden

diskontinuierliche Zonen – Elektrophorese zur Anwendung. Hierfür verwendet man ein weitmaschiges Sammelgel (pH 6,8) und ein engmaschiges Trenngel (pH 8,8). Durch das Sammelgel, welches dem Trenngel vorgeschaltet ist, erreicht man eine einheitliche und gleichmäßige Lauffront aller Proteine vor der eigentlichen Größenauftrennung.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde mit dem Biorad-System (Martinsried, D) gearbeitet. Die jeweiligen Zusammensetzungen der einzelnen Gele sind unten aufgeführt.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des Trenngels

Biochemikalie	6%	8%	10%	12%
30% Acrylamid	1 ml	1,3 ml	1,7 ml	2 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Wasser	2,7 ml	2,3 ml	2 ml	1,7 ml
TEMED	4 µl	2 µl	2 µl	2 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des Sammelgels

Biochemikalie	3%	4%
Wasser	3,14 ml	1,15 ml
30% Acrylamid	500 µl	330 µl
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	500 µl
10% SDS	50 µl	20 µl
TEMED	8 µl	2 µl
10% APS	50 µl	20 µl

3.20 Western Blot

Die Proteingemische, die mit Hilfe der SDS-PAGE anhand ihrer Größe aufgetrennt wurden, werden im Anschluss auf eine spezielle Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S83, Schleicher & Schnell, Dassel, D) geblottet, um für spätere Nachweise Verwendung finden zu können. Dies geschah in der Blotkammer von SERVA (SERVA Blue Blot WET 100, SERVA, Heidelberg, D) für 2h bei 80 V und 4°C oder auch über Nacht bei 4°C und 35 V. Zur Überprüfung des Proteintransfers von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde eine reversible Ponceau S-Färbung durchgeführt. Nach positiver Rot-Färbung der Proteinbanden, wurde Ponceau S mit TBST aus der Membran gewaschen und die Detektion der speziellen Proteine über spezifische Antikörper wurde begonnen.

Methoden

Als erstes müssen dafür zunächst sämtliche unspezifische Bindungen auf der Membran blockiert werden. Dies geschieht entweder durch eine 2 stündige Inkubation der Membran in 20 ml Blocking Puffer, der 5% Magermilch (Natura Flor, Toepfer GmbH, Dietmannsried, D) enthält (gelöst in 1x TBST) oder durch Inkubation in 10%iger Blocking Solution (Roche). Im Anschluss wird der Blocking Puffer kurz mit 1x TBST abgespült und der erste Antikörper dazu gegeben. Jeder Antikörper (AK) hat seine spezifische Verdünnung. Die Membran sollte von mindestens 10 ml Antikörperlösung 2h benetzt sein. Der primäre (erste) Antikörper richtet sich immer gegen ein spezifisches Protein, welches man detektieren möchte. Da die Bindung des ersten Antikörpers allein nur schwer nachweisbar ist, benötigt man zusätzlich einen zweiten (sekundären) Antikörper, der sich gegen den Organismus richtet, in dem der primäre AK hergestellt wurde. Zusätzlich ist der sekundäre AK mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die ein bestimmtes Substrat umsetzen kann und somit die Bindung indirekt nachweist. Der sekundäre AK wird, nach dreimaligen 5 minütigen Waschschritten der Membran mit 1x TBST, dazu gegeben und für 1h mit der Membran inkubiert. Nicht gebundener AK wird danach mit 3x 5 min 1x TBST Waschschritten herunter gewaschen. Zur Detektion der Antikörper wird die Membran für 1 min in ECL Lösung (ECL™ Western-Blot-Detektions-Reagenz, Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) geschwenkt. Diese enthält das Substrat für die Meerrettich-Peroxidase des sekundären AK, welche dieses in Chemilumineszenz umwandelt. Auf die Membran wird im Folgenden in einer Dunkelkammer ein spezieller Film (High performance chemiluminescence film, Amersham Biosciences, Buckimhamshire, GB) für eine gewisse Zeit exponiert und dann entwickelt. Falls der primäre AK spezifisch gebunden hat, erkennt man dies an einer Dunkelfärbung des Films an dieser Stelle.

Soll ein weiteres Protein auf demselben Blot nachgewiesen werden, legt man die Membran für 20 min in Stripping-Puffer, welcher die vorherigen Antikörper aufgrund eines geringen pH-Wertes herunter wäscht. Nach 3- maligen 1x TBST Waschschritten für je 10 min, beginnt die ganze Prozedur wieder beim Blocken.

3.21 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen der Substantia nigra von Parkinson-Patienten und Kontrollen wurden am Institut für Neuropathologie der Uniklinik Tübingen von Prof. Dr. Jens Schittenhelm durchgeführt.

3.22 Immunfluoreszenz

Zur Anfärbung von alpha-Synuklein und IREB2 in SHSY5Y-Zellen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür müssen die SHSY5Y-Zellen auf Deckgläschen anwachsen. Dafür werden diese Deckgläschen vorher mit Poly-L-Lysin im Kühlschrank über Nacht beschichtet und anschließend in jedes Well einer 6-Well Platte gelegt. Darauf wird dann die gewünschte Anzahl an Zellen gegeben und wachsen gelassen. Zur Fixierung der Zellen wird

Methoden

4 %iges PFA benötigt. Zunächst wird eine Präfixierung durchgeführt. Dafür werden 300 µl 4 % PFA in 3 ml Medium zu den Zellen gegeben. Nach Absaugen dieses Gemisches werden sofort 3ml 4 % PFA zur endgültigen Fixierung dazu gegeben. Die Fixierung wird für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend werden die fixierten Zellen auf dem Deckgläschen 4 mal mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Danach kommt das Blocking der unspezifischen Bindungen mit 5 % Chemiblocker mit gleichzeitiger Permeabilisierung der Membran mit 0,1 % Triton X-100 und Inkubation mit dem primären Antikörper in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Ebenso ist das Blocking mit 10 % normalen Eselserum denkbar (NDS). Am nächsten Morgen wurde der Primäantikörper durch viermaliges Waschen mit PBS für 5 Minuten abgewaschen. Anschließend wurde das Deckgläschen mit den darauf befindlichen Zellen mit dem Sekundäantikörper für 1,5 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist Fluoreszenz-markiert (Cy2 oder Cy3), sodass jeder Schritt ab Zugabe des AK unter Lichtausschluss stattfinden sollte. Anschließend wurde der sekundäre AK wieder durch viermaliges Waschen für 5 Minuten mit PBS abgewaschen. Um die Zellkerne der Zellen anzufärben, wurde danach eine 0,1 %ige Dapi-Lösung hinzugegeben, welche für 10 Minuten bei RT mit den Zellen inkubiert wurde. Wiederum erfolgte das Abwaschen mit PBS. Beim letzten Waschschrift wurde das Deckglas ausschließlich mit Wasser gespült, um zu verhindern, dass PBS Kristalle gebildet werden, die das Mikroskopieren beeinflussen könnten. Das Deckgläschen wird nach Trocknung mit einem Tropfen DABCO/Mowiol (25 mg DABCO auf 1 ml Mowiol) auf einem Objektträger eingedeckelt. Mit Nagellack wird das ganze fixiert. Nach Trocknung aller Chemikalien kann man mit einem Fluoreszenzmikroskop die Zellen mikroskopieren.

4

Ergebnisse

Ergebnisse

Während die im Rahmen einer Doktorarbeit immer zahlreich durchgeführten Experimente für den Experimentator selbst logisch und nachvollziehbar sind, soll die unten abgebildete Übersichtsdarstellung (Abbildung 4.1.1) auch für den Leser einen schnellen, ersten Überblick über die durchgeführten Experimente bieten und so für einen direkten Einstieg in die Ergebnisaufbereitung dienen.

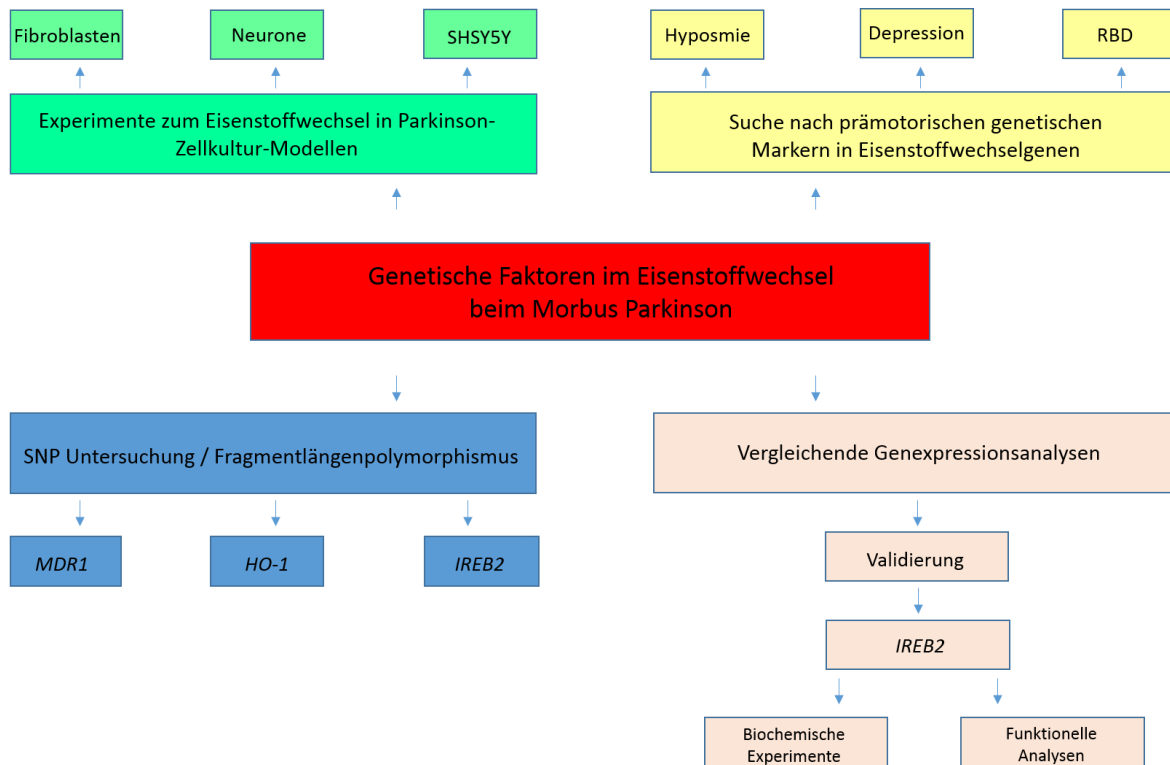


Abbildung 4.1.1: Vereinfachte Darstellung durchgeführter Experimente. Zur Untersuchung der Fragestellung, an welchem Prozess der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung ein gestörter Eisenmetabolismus involviert sein könnte und welche Rolle dieser im Krankheitsprozess spielt, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Eine sehr grobe Übersicht dafür bietet dieses Diagramm, wenngleich einzelne spezielle Untersuchungen hier keine Erwähnung fanden.

Zu Beginn dieser Arbeit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob es eine genetische Veränderung in ausgewählten, am Eisenstoffwechsel und der Blut-Hirn-Schranke (BBB) beteiligten Genen gibt, die auf einen gestörten Eisenmetabolismus hinweisen und somit eher für einen primären Prozess in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung sprechen würden. Dafür wurden Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in den Genen *MDR1* und *HO-1*, sowie ein Fragmentlängenpolymorphismus in der Promotorregion des *HO-1*-Gens bei Patienten mit einem idiopathischen Parkinson-Syndrom (und nachgewiesener hypoechogener SN) sowie Kontrollpersonen untersucht und verglichen.

4.1 Ergebnisse der *MDR1*-Analysen

Eine Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke aufgrund einer Dysfunktion des P-Glykoproteins, welches vom *MDR1*-Gen kodiert wird, könnte zur Pathogenese des Morbus Parkinson und eventuell auch zur Entstehung der Hyperechogenität der SN bei Parkinson-Patienten beitragen. Um zu beurteilen, ob eine mögliche Assoziation von Polymorphismen im *MDR1*-Gen mit einer Hyperechogenität der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten besteht, wurden acht nicht-synonyme, kodierende SNPs in der genomischen Sequenz des *MDR1*-Gens (T49C, T131C, C239A, G1199A, G1696A, C1777T, G2677T/A, C3151G) bei 300 Parkinson-Patienten und 302 Kontrollpersonen untersucht. Darüber hinaus wurden zwei synonyme, ebenfalls kodierende SNPs (C1236T, C3435T) zur Analyse in den erwähnten Kohorten hinzu gezogen, da bestimmte Genotypen dieser SNPs bereits in Assoziation mit der Parkinson-Erkrankung in ethnischen Chinesen publiziert wurden (Lee, et al. 2004a). Die jeweiligen Positionen der untersuchten SNPs mit ihren möglichen Ausprägungen sind in Abbildung 4.1.2 ersichtlich.

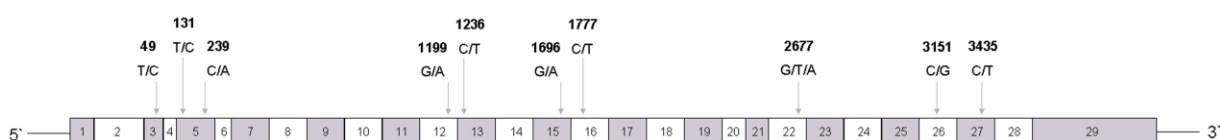


Abbildung 4.1.2: Exonstruktur des *MDR1*-Gens.

Die Abbildung zeigt das *MDR1*-Gen, welches aus 29 Exonen besteht. Die Pfeile markieren die jeweilige Lokalisation und mögliche Genotypen der 10 untersuchten SNPs an ihrer genomischen Position.

4.1.1 Allelische und genotypische Gleichartigkeit der Kohorten

Sechs der analysierten SNPs (T49C, T131C, C239A, G1696A, C1777T und C3151G) stellten sich, trotz vorheriger intensiver Datenbankrecherche, sowohl bei den Parkinson-Patienten (PP) als auch in den Kontrollen (K) als monomorph heraus (Tabelle 4.1.2). Die übrigen vier SNPs (G1199A, C1236T, G2677T/A und C3435T) waren in beiden Kohorten polymorph (Abbildung 4.1.3) und zeigten keine Abweichung von einer Hardy-Weinberg Verteilung (PP $p \geq 0.560$, K $p \geq 0.036$ mit einem Bonferroni korrigiertem $\alpha = 0.013$). Ein Vergleich der Allel- und Genotypenfrequenzen zwischen beiden Kohorten zeigte keine statistisch ermittelbaren Unterschiede, auch nicht nach einer Altersstratifizierung (allelisch $p \geq 0.114$, genotypisch $p \geq 0.112$).

Durch eine Gruppierung der Patienten gemäß ihres Erkrankungsalters (≤ 40 , $> 40 / < 70$, ≥ 70 Jahren) wurde für den SNP C3435T eine signifikante Abweichung der Genotypenverteilung in der Gruppe der über 70 Jahren Erkrankten zur Hardy-Weinberg Verteilung festgestellt ($p = 0.003$). Dabei wurde ein Fehlen von heterozygoten Genotypen (C/T) ermittelt (Abbildung 4.1.4).

Ergebnisse

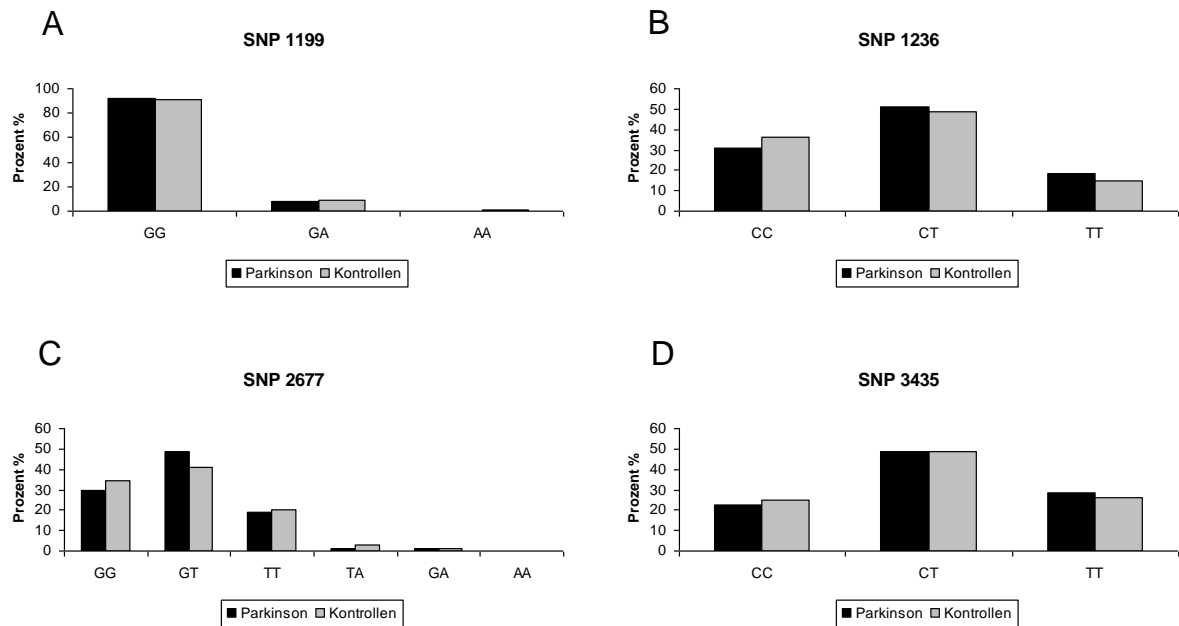


Abbildung 4.1.3: Verteilung der Genotypen im *MDR1*-Gen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen.

In dieser Abbildung sind die polymorphen SNPs 1199, 1236, 2677 und 3435 mit ihrer jeweiligen Verteilung der Genotypen dargestellt. Schwarze Balken zeigen den prozentualen Anteil von Parkinson-Patienten, graue Balken den Anteil von Kontrollen. Die Genotypenverteilung zwischen Patienten und Kontrollen zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede. **A** Der am häufigsten gefundene Genotyp bei SNP 1199 mit ca. 90 % war G/G, sowohl bei den Parkinson-Patienten als auch bei den Kontrollen. **B** Für SNP 1236 war der heterozygote Genotyp C/T am häufigsten. **C** Von sechs möglichen Genotypen für SNP 2677 konnten fünf detektiert werden, wobei Genotyp G/T bei Patienten und Kontrollen am meisten nachgewiesen wurde. **D** Genotyp C/T erwies sich bei SNP 3435 für den am häufigsten gefundenen.

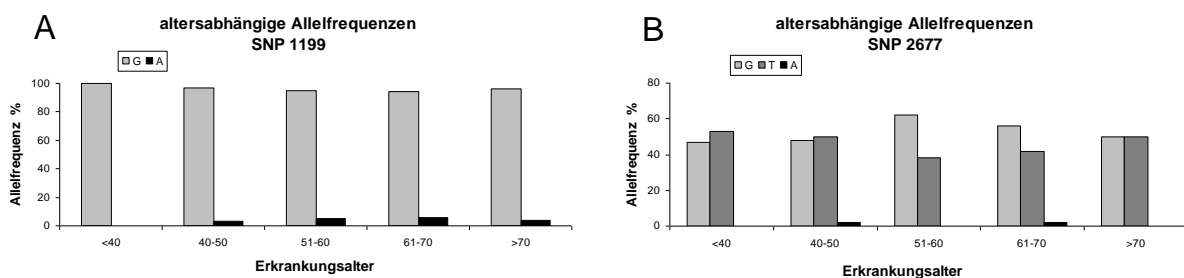


Abbildung 4.1.4: Altersabhängige Allelfrequenzen im *MDR1*-Gen für SNP 1199 und 2677 bei Parkinson-Patienten.

A Unabhängig vom Erkrankungsalter zeigt sich Allel G in jeder Altersgruppe für SNP 1199. Im Gegensatz dazu findet man Allel A nicht in Parkinson-Patienten, deren Erkrankungsalter unter 40 Jahren liegt. **B** Für SNP 2677 konnten drei Allele nachgewiesen werden. Während man Allel G und T in jedem Erkrankungsalter findet, konnte Allel A nicht in der Gruppe der unter 40 Jahren erkrankten Personen und in der über 70 Jahren Erkrankten nachgewiesen werden. Allerdings muss erwähnt werden, dass nur 5 Personen insgesamt, innerhalb der gesamten Kohorte, dieses A Allel tragen.

4.1.2 Genotypfrequenzen der polymorphen SNPs bei Parkinson-Patienten und Kontrollen

Wie in Abbildung 4.1.3A ersichtlich, zeigt sich sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen der Genotyp G/G für SNP G1199A am häufigsten (91,7 % bei PP, 90,7 % bei Kontrollen). Interessanterweise findet sich in der untersuchten Kohorte von 300 Patienten in der Gruppe der unter 40 Jahren Erkrankten kein Patient mit einem A Allel (Abbildung 4.1.4A). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Kohorten konnten für diesen SNP nicht erbracht werden.

Am Locus G2677T/A sind drei Allele nachweisbar und somit sechs mögliche Genotypen zu erwarten. Von diesen sechs möglichen Genotypen konnten fünf aufgedeckt werden, wovon der heterozygote G/T Genotyp in beiden Kohorten am häufigsten gefunden wurde (Abbildung 4.1.3C). Beide Kohorten weisen ähnliche Verteilungsmuster der Genotypen auf, sodass auch in diesem Fall kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen erbracht werden konnte. Vergleichend mit SNP G1199A zeigt sich auch bei SNP G2677T/A ein Fehlen des A Allels in der Gruppe der unter 40 Jahren Erkrankten, aber auch in der Gruppe der über 70 Jahren erkrankten Personen (Abbildung 4.1.4B). Allerdings muss erwähnt werden, dass insgesamt nur fünf Personen überhaupt ein A Allel tragen und der Anteil der sowohl sehr jung- als auch der sehr alt erkrankten Personen in der untersuchten Kohorte von 300 Parkinson-Patienten gering ausfällt (8 % erkrankten mit ≤ 40 Jahren, 7,3 % erkrankten mit ≥ 70 Jahren).

In beiden Kohorten erwies sich am SNP C1236T der Genotyp C/T als der Häufigste mit 51 % bei den Patienten und mit 48,7 % in den Kontrollen (Abbildung 4.1.3B). Eine Stratifizierung nach Erkrankungsalter an diesem SNP erbrachte keine altersabhängigen Unterschiede in der Verteilung der Genotypen.

Auch beim vierten untersuchten polymorphen SNP C3435T im *MDR1*-Gen ist eine gleiche Verteilung der Genotypen in beiden Kohorten ersichtlich. Der häufigste nachgewiesene Genotyp mit ca. 50 % stellt C/T dar (Abbildung 4.1.3D).

Tabelle 4.1.1: Erhebungsmerkmale der untersuchten Kohorten.

Insgesamt wurden 300 Parkinson-Patienten und 302 geschlechts- und altersabgestimmte Kontrollen untersucht. Für beide Kohorten ist die jeweilige Männer/Frauen Rate, das Alter sowie das durchschnittliche Alter angegeben. Für die Mehrheit der Patienten war das Erkrankungsalter gut dokumentiert mit einem durchschnittlichen Diagnosezeitpunkt von 56 Jahren.

	Parkinson-Patienten		Kontrollen	
Gesamtanzahl	300		302	
männlich/weiblich	192	108	198	104
Alter (Jahre)	39 - 90		53 - 84	
durchschnittliches Alter (STABW)	66.4 (10.3)		60.6 (5.2)	
Erkrankungsalter	30 – 86		---	
≤ 40 Jahre	25		---	
> 40 Jahre bis < 70 Jahre	198		---	
≥ 70 Jahre	22		---	

Ergebnisse

Erkrankungsalter unbekannt	55	---
durchschnittliches Erkrankungsalter (STABW)	56.2 (11.0)	---

Tabelle 4.1.2: Genotypfrequenzen der zehn analysierten SNPs im MDR1-Gen bei Parkinson-Patienten und Kontrollen

In dieser Tabelle sind die absoluten und relativen Genotyphäufigkeiten der zehn untersuchten SNPs im *MDR1*-Gen sowohl für Patienten als auch für Kontrollen aufgeführt.

SNP	Genotyp	Parkinson-Patienten			Kontrollen		
		Genotyp-inzidenz	Gesamt-anzahl	Relative Häufigkeit [%]	Genotyp-inzidenz	Gesamt-anzahl	Relative Häufigkeit [%]
49	T/T	300	300	100	302	302	100
131	T/T	300	300	100	298	298	100
239	C/C	300	300	100	297	297	100
1199	G/G	275	300	91.7	274	302	90.7
	G/A	25		8.3	26		8.6
	A/A	0		-	2		0.7
1236	C/C	92	300	30.7	110	302	36.4
	C/T	153		51	147		48.7
	T/T	55		18.3	45		14.9
1696	G/G	300	300	100	296	296	100
1777	C/C	300	300	100	300	300	100
2677	G/G	90	300	30	103	299	34.4
	G/T	146		48.7	123		41.1
	T/T	57		19	60		20.1
	G/A	3		1	9		3
	T/A	4		1.3	4		1.4
3151	C/C	271	271	100	279	279	100
3435	C/C	67	300	22.3	76	302	25.2
	C/T	147		49	147		48.7
	T/T	86		28.7	79		26.1

4.1.3 Haplotypanalyse

Aufgrund der vorliegenden allelischen Möglichkeiten an den vier Genorten (2 Allele für SNP 1199, 2 Allele für SNP 1236, 3 Allele für SNP 2677 und 2 Allele für SNP 3435) sind theoretisch 24 Haplotypen zu erwarten. Auf der Basis der erstellten Genotypdaten wurden allerdings nur

Ergebnisse

12 Haplotypen mit einer Frequenz von $>10^{-5}$ nachgewiesen (10 Haplotypen bei den weiblichen Patienten, 11 Haplotypen bei den männlichen Patienten, 12 Haplotypen bei den weiblichen und männlichen Kontrollen). Bei jeder zur Untersuchung herangezogenen Gruppe (weibliche Patienten, weibliche Kontrollen, männliche Patienten, männliche Kontrollen) waren fünf Haplotypen am häufigsten vertreten (Tabelle 4.1.3). Allein diese fünf Haplotypen können 87-95 % der beobachteten Variabilität erklären.

Um zu ermitteln, ob die vier untersuchten polymorphen SNPs unabhängig voneinander vererbt werden, wurde mit Hilfe der Software ARLEQUIN 3.11 eine Haplotypfrequenzschätzung durchgeführt (mit der Unterstützung von Prof. Dr. Jürgen Tomiuk). Dabei konnte ein Kopplungsungleichgewicht für drei Genorte (SNP C1236T, G2677T/A und C3435T) aufgezeigt werden, die erwähnten Genorte werden also aufgrund ihrer genomischen Nähe zueinander nicht unabhängig, sondern häufiger als zufällig erwartet, gemeinsam vererbt ($p < 0.001$). Die zwei häufigsten Haplotypen beinhalten die Basensequenz G-C-G-C und G-T-T-T für die SNPs 1199, 1236, 2677 und 3435 (Tabelle 4.1.3).

Tabelle 4.1.3: Beurteilung der am häufigsten vorkommenden Haplotypen

Die Tabelle beinhaltet die fünf häufigsten Haplotypen, welche mit Hilfe der Software ARLEQUIN 3.11 ermittelt wurden. Aufgrund dieser fünf gezeigten Haplotypen kann bereits 87-95 % der beobachteten Variabilität erklärt werden. Die häufigsten Haplotypen sind G-C-G-C und G-T-T-T für die SNPs 1199, 1236, 2677 und 3435.

Haplotyp	Gruppe			
	<i>weibliche Patienten</i> [Frequenz]	<i>weibliche Kontrollen</i> [Frequenz]	<i>männliche Patienten</i> [Frequenz]	<i>männliche Kontrollen</i> [Frequenz]
Basensequenz (SNP G1199A, C1236T, G2677T/A, C3435T)				
G-C-G-C	0.382	0.372	0.386	0.407
G-T-T-T	0.404	0.309	0.390	0.356
G-C-G-T	0.110	0.109	0.120	0.102
A-C-G-C	0.028	0.052	0.046	0.037
G-C-T-T	0.024	0.032	0.009	0.033

4.2 Ergebnisse der *HO-1*-Analysen

4.2.1 SNP-Analyse

Um heraus zu finden, ob eine mögliche Assoziation zwischen der Parkinson-Erkrankung und einer genetischen Variation im *Hämoxygenase-1* (*HO-1*)-Gen besteht, wurden drei nicht-synonyme, kodierende SNPs im *HO-1*-Gen bei 300 Parkinson-Patienten und 301 Kontrollen (Tabelle 4.2.2) mittels SNaPshot-Analyse untersucht. Aus Abbildung 4.2.1A ist die Exonstruktur des *HO-1*-Gens ersichtlich und durch Pfeile werden die jeweiligen genomischen Positionen und mögliche Genotypen der drei SNPs (C19G, A317G, A797G) markiert.

Trotz vorheriger intensiver Datenbankrecherche erwiesen sich zwei SNPs (A317G und A797G) in beiden Kohorten als monomorph mit dem einheitlichen Genotyp G/G für beide SNPs. Der Genlocus C19G zeichnete sich als polymorph ab. Die Verteilung der Genotypen entspricht dabei in beiden Kohorten einer Hardy-Weinberg-Verteilung ($p \approx 1.000$). Sowohl die Allelfrequenzen ($p = 0.705$) wie auch die Genotypfrequenzen ($p = 0.693$) unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen. Der am häufigsten nachgewiesene Genotyp mit einer Frequenz von 90 % in den Kontrollen ($n = 271$) und 89 % bei den Patienten ($n = 267$) war G/G. Der heterozygote Genotyp G/C repräsentierte mit 10 % ($n = 30$) den zweiten nachweisbaren Genotyp in Kontrollen und mit 11 % ($n = 33$) bei den Patienten. Homozygote Genotypen C/C waren in beiden Kohorten nicht detektierbar (Abbildung 4.2.1B).

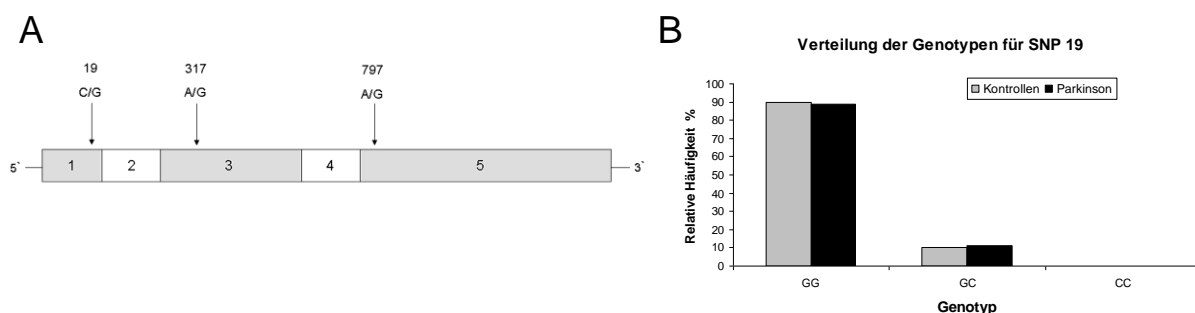


Abbildung 4.2.1: **A** Exonstruktur des menschlichen *Hämoxygenase-1*-Gens. Das humane *HO-1*-Gen besteht aus 5 Exonen. Die Pfeile markieren die jeweilige Lokalisation und mögliche Genotypen der drei untersuchten SNPs an ihrer genomischen Position. **B** Verteilung der Genotypen für SNP 19 im *HO-1*-Gen bei Parkinson-Patienten (schwarze Balken) und Kontrollen (graue Balken). Der am häufigsten detektierte Genotyp G/G am polymorphen SNP 19 des *HO-1*-Gens zeigt eine annähernd gleiche Verteilung bei Parkinson-Patienten und Kontrollen, sodass keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden.

4.2.2 (GT)_n-Fragmentlängenpolymorphismus

Um der Fragestellung nachzugehen, ob ein bestimmtes Allel am Locus des (GT)_n-Mikrosatellitenpolymorphismus der Promotorregion des *HO-1*-Gens mit der Parkinson-Erkrankung assoziiert vorliegen könnte, wurden 827 Parkinson-Patienten und 814 Kontrollen (Tabelle 4.2.1) in dieser Region mit Hilfe der Fragmentlängenanalyse untersucht. Dieser

Ergebnisse

Genlocus erwies sich als äußerst variabel mit möglichen Repeatlängen von 13 bis hin zu 42 GT-Wiederholungen pro Allel (Abbildung 4.2.2A). Die am häufigsten vorhandenen Allele in beiden herangezogenen Kohorten wiesen 23 und 30 GT-Wiederholungen auf. Dabei ließen sich für die Allel- und Genotypfrequenzen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen feststellen (Allelfrequenzen: $p = 0.675$; Genotypfrequenzen: $p = 0.748$). Darüber hinaus entsprechen die Genotypverteilungen der zu erwartenden Hardy-Weinberg-Verteilung ($p > 0.292$).

Bei einer vergleichenden Analyse, in welcher das Erkrankungsalter der Patienten (soweit bekannt) mit einer bestimmten Repeatlänge eines Allels hinsichtlich einer möglichen Assoziation untersucht wurde, ergab sich kein Hinweis darauf, dass zwischen beiden genannten Merkmalen eine Korrelation besteht (Daten nicht gezeigt).

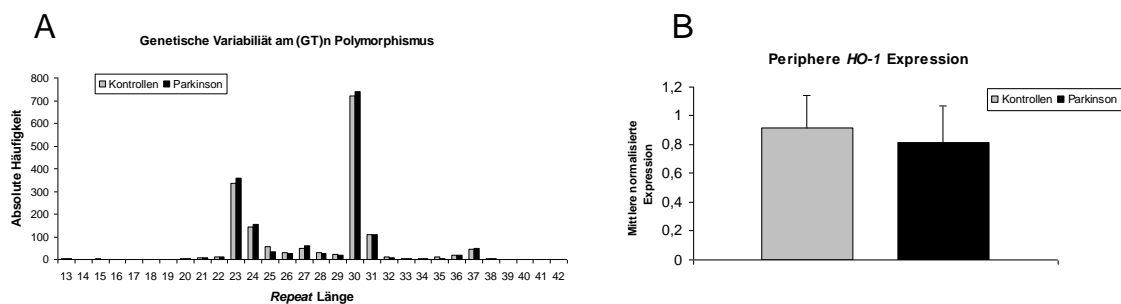


Abbildung 4.2.2: A Darstellung der genetischen Variabilität für den (GT)n - Mikrosatellitenpolymorphismus in der Promotorregion des menschlichen HO-1-Gens. In dieser Abbildung sind die verschiedenartig nachgewiesenen Repeat-Längen (13-42) in ihrer absoluten Häufigkeit bei Parkinson-Patienten (schwarze Balken) und Kontrollen (graue Balken) für den (GT)n-Repeat-Polymorphismus im HO-1-Gen dargestellt. Die am häufigsten vorkommenden Allele in der Promotorregion weisen sowohl bei Parkinson-Patienten als auch bei Kontrollen eine Länge von 23 bzw. 30 GT-Repeats auf. Dabei zeigen sich minimale Unterschiede im Vergleich von Patienten zu Kontrollen, die sich statistisch nicht unterscheiden.

B Vergleichende Darstellung der HO-1-Expression. Vergleichend dargestellt ist die mittlere normalisierte HO-1-Expression gemessen an mRNA, welche aus peripheren Blutlymphozyten isoliert wurde. Gegenüber gestellt sind die Expressionen von Parkinson-Patienten (schwarze Balken) und Kontrollen (graue Balken). Die Expressionen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen diesen beiden untersuchten Gruppen.

4.2.3 Vergleichende mRNA-Expressionanalyse für das HO-1-Gen

In einer Studie von Schipper und Kollegen konnte gezeigt werden, dass bei sporadischen Alzheimer-Patienten die Expression von HO-1 signifikant erniedrigt vorliegt (Schipper, 2000). Zur Beantwortung der Fragestellung, ob Unterschiede in der Hämoxygenase-1-Expression im peripheren Blut zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen nachweisbar sind, wurde von 15 Patienten und entsprechenden alters- und geschlechtsangepassten Kontrollen (Tabelle 4.2.3) mittels quantitativer Real-Time-PCR-Messung die jeweilige Expressionsstärke erstellt (Abbildung 4.2.2B). Die Höhe der HO-1 mRNA-Expression (aus peripheren Lymphozyten)

Ergebnisse

unterscheidet sich dabei kaum im Vergleich der beiden Kohorten (Shapiro-Wilk Test für Normalverteilung: $p > 0.826$; t-Test: $p = 0.290$).

Tabelle 4.2.1: Erhebungsmerkmale der analysierten Kohorten für die Fragmentlängenanalyse

Zur Fragmentlängenanalyse des (GT)_n-Repeat-Polymorphismus in der Promotorregion des *HO-1-Gens* wurden 827 Parkinson-Patienten und 814 altersangepasste Kontrollen herangezogen. Ebenso wurden Patienten und Kontrollen gemäß ihres Geschlechts angeglichen, außer für ein paar wenige Fälle, bei denen das Geschlecht nicht dokumentiert vorlag.

Parkinson-Patienten		Kontrollen		
Gesamtanzahl	827		814	
männlich/weiblich	503	321	470	328
Alter (Jahre)	32 - 97		33 - 86	
durchschnittliches Alter (STABW)	68.7 (11.2)		61.9 (7.3)	

Tabelle 4.2.2: Erhebungsmerkmale der Parkinson-Patienten und Kontrollen für die SNaPshot-Analyse

Insgesamt wurden 300 Parkinson-Patienten und 301 geschlechts- und altersabgestimmte Kontrollen untersucht. Für beide Kohorten ist die jeweilige Männer/Frauen Rate, das Alter sowie das durchschnittliche Alter angegeben. Für die Mehrheit der Patienten war das Erkrankungsalter gut dokumentiert mit einem durchschnittlichen Diagnosezeitpunkt von 56 Jahren.

Parkinson-Patienten		Kontrollen		
Gesamtanzahl	300*		301*	
männlich/weiblich	192	108	198	103
Alter (Jahre)	39 - 90		53 - 84	
durchschnittliches Alter (STABW)	66.4 (10.3)		60.6 (5.2)	
Erkrankungsalter	30 – 86		---	
< 40 Jahre	18		---	
≥40 Jahre to ≤ 70 Jahre	213		---	
> 70 Jahre	14		---	
Erkrankungsalter unbekannt	55		---	
durchschnittliches Erkrankungsalter (STABW)	56.2 (11.0)		---	

*Untergruppe der Studienpopulation aus der Fragmentlängenanalyse

Ergebnisse

Tabelle 4.2.3: Erhebungsmerkmale der untersuchten Kohorten für die mRNA-Expressionsanalyse

Die Kohorte für die mRNA-Expressionsanalysen für das *HO-1-Gen* setzte sich aus 15 Parkinson-Patienten und ihren jeweiligen alters- und geschlechtsangepassten Kontrollen zusammen. Aus der Tabelle kann zusätzlich das jeweilige Alter, sowie das Durchschnittsalter der untersuchten Personen ersehen werden.

	Parkinson-Patienten		Kontrollen	
Gesamtanzahl	15		15	
männlich/weiblich	6	9	6	9
Alter (Jahre)	44 - 74		47 - 76	
durchschnittliches Alter (STABW)	66.4 (7.3)		65.4 (6.9)	

4.3 Ergebnisse der Affymetrix-Chip-Daten

In einer globalen Genexpressionsstudie unter Verwendung des *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays* (Affymetrix) sollte das Gen-Expressionsprofil von 12 Parkinson-Patienten und 17 Kontrollen verglichen werden (durchgeführt in der Microarray-Facility Tübingen unter der Leitung von Dr. Michael Bonin). 266 Gene lagen differentiell reguliert vor (Genliste im Anhang, Tab. 9.1). Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR wurden neun besonders interessant erscheinende Gene, welche unten aufgeführt sind, validiert:

- *Amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein2 (APPBP2)*
- *ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit E1 (ATP6V0E1)*
- *BCL-2 associated transcription factor 1 (BCLAF1)*
- *Iron-responsive element binding protein 2 (IREB2)*
- *NEDD4 family interacting protein 1 (NDFIP1)*
- *SUMO1/sentrin specific peptidase 6 (SENP6)*
- *Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (SYNCRIP)*
- *Ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin1 (UBR1)*
- *Ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog yeast, UBE4B)*

Zwei der neun ausgewählten Gene (*IREB2* und *SENP6*) zeigten in der Validierung den gleichen signifikanten Unterschied wie in den Chip-Daten. Dabei wiesen Parkinson-Patienten eine signifikant geringere Expression von *IREB2* (Abb. 4.3.1A) und *SENP6* (Daten nicht gezeigt) auf als bei ihren Kontrollen. Bei den anderen sieben Genen lag kein nennenswerter Unterschied in der Genexpression zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen vor, die Regulationsunterschiede aus den Chip-Daten konnten somit für die anderen Gene nicht bestätigt werden.

Da der Eisenstoffwechsel bei Parkinson-Patienten im Fokus dieser Dissertation liegt, erschien das *IREB2*-Gen (Iron-responsive element-binding protein 2) besonders interessant. In

Ergebnisse

Kooperation mit Prof. Jing Zhang aus Seattle wurde im Folgenden untersucht, ob diese signifikante Runterregulation des *IREB2*-Gens bei Parkinson-Patienten im mRNA-Blutprofil ebenfalls auf Proteinniveau in der Substantia nigra nachzuweisen war. Hierfür wurde ein Western Blot angefertigt mit Proteinproben aus *post mortem* SN-Gewebe von vier Parkinson-Patienten und vier Kontrollen. Anhand dieser Daten konnte auch hier gezeigt werden, dass *IREB2* in einer geringeren Proteinkonzentration in der Substantia nigra bei Parkinson-Patienten vorliegt im Vergleich zu Kontrollpersonen (Abb. 4.3.1B).

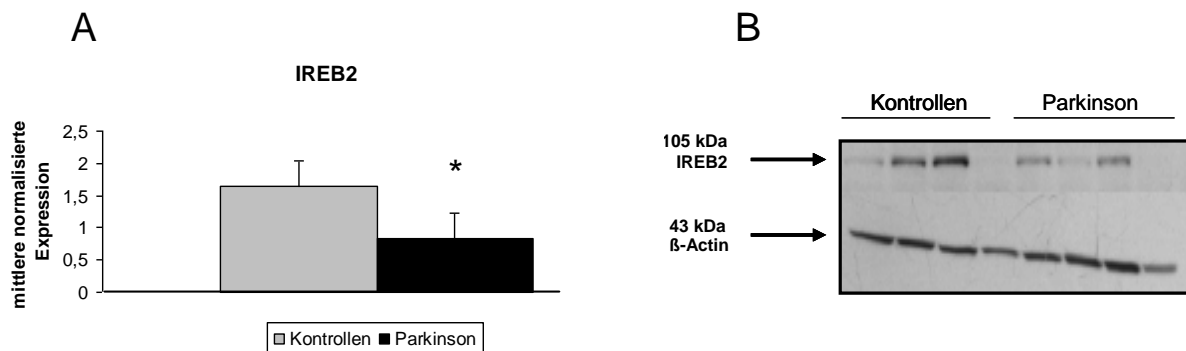


Abbildung 4.3.1: A Mittlere normalisierte Expression von *IREB2* im peripheren Blut Die Genexpression von *IREB2* im peripheren Blut unterscheidet sich signifikant zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen, wobei Parkinson-Patienten deutlich weniger *IREB2* aufweisen im Vergleich zu alters- und geschlechtsangepassten Kontrollen. **B** Western Blot-Ergebnis aus der Substantia nigra von Parkinson-Patienten im Vergleich zu Kontrollen für *IREB2* Die Expression von *IREB2* auf Proteinebene innerhalb einer Gruppe unterliegt diversen Schwankungen. Jedoch ist zu erkennen, dass die Parkinson-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen eine schwächere Protein-Expression von *IREB2* in der Substantia nigra aufweisen.

Ebenso wurde ein Western Blot angefertigt zur Validierung der geringeren *SENP6*-Genexpression auf Proteinniveau bei Parkinson-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Hier konnte kein Unterschied zwischen den Patienten und Kontrollen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus sollten im *IREB2*-Gen zwei SNPs untersucht werden (*rs13180* und *rs2656070*), welche aufgrund einer nachgewiesenen allelischen Assoziation mit der Alzheimer-Erkrankung interessant erschienen (Coon, et al. 2006).

Die Allel- und Genotypenverteilung in den beiden untersuchten SNPs im *IREB2*-Gen (*rs13180* und *rs2656070*) lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen Parkinson-Patienten mit einer hyperechogenen Substantia nigra und entsprechenden Kontrollpersonen erkennen (Abb. 4.3.2). Der häufigste Genotyp am SNP 13180 ist heterozygot für C/T sowohl bei Parkinson-Patienten als auch bei den Kontrollpersonen (A). Ebenfalls ohne Unterschied in beiden untersuchten Kohorten ist für den SNP 2656070 im *IREB2*-Gen der häufigste Genotyp homozygot G/G (B).

Ergebnisse

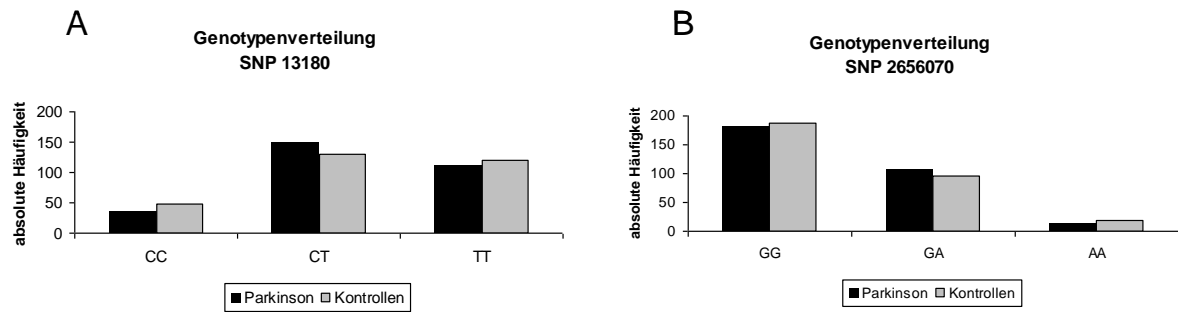


Abbildung 4.3.2: A Verteilung der Genotypen für SNP 13180 und B für SNP 2656070 im *IREB2*-Gen bei Parkinson-Patienten (schwarze Balken) und Kontrollen (graue Balken) A Der am häufigsten gefundene Genotyp C/T am polymorphen SNP 13180 des *IREB2*-Gens zeigt eine annähernd gleiche Verteilung bei Parkinson-Patienten und Kontrollen, sodass keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen wurden. B Ebenso konnten nur marginale Abweichungen zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen am SNP 2656070 im *IREB2*-Gen nachgewiesen werden. Am häufigsten wurde der Genotyp G/G detektiert.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob eventuell ein bestimmtes Allel an SNP 13180 oder SNP 2656070 mit einem diversen Erkrankungsalter für Parkinson assoziiert ist, wurden die erhobenen Allelfrequenzen mit den entsprechenden Erkrankungsaltern verglichen. Es konnte keine Assoziation eines bestimmten Allels mit einem besonders frühen oder besonders späten Erkrankungsbeginn nachgewiesen werden (Abb. 4.3.3).

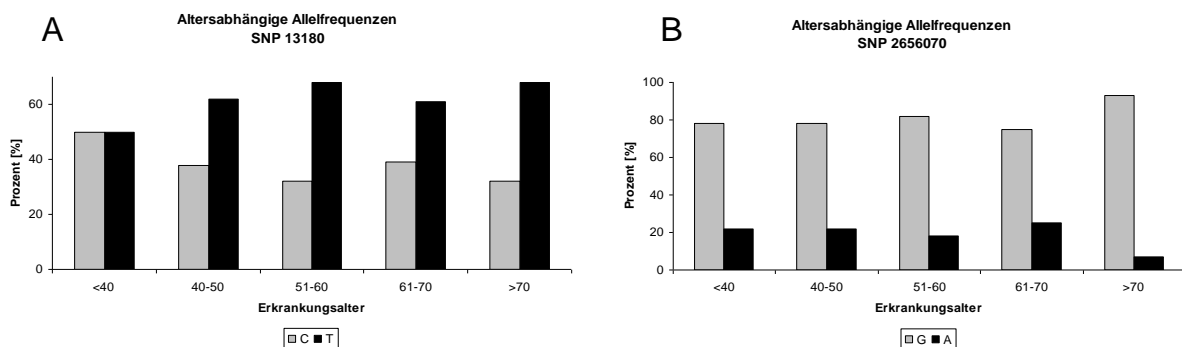


Abbildung 4.3.3: Altersabhängige Allelfrequenzen im *IREB2*-Gen für SNP 13180 und 2656070 bei Parkinson-Patienten. A Unabhängig vom Erkrankungsalter zeigen sich beide Allele C und T in jeder Altersgruppe für SNP 13180. B Für SNP 2656070 konnten ebenso beide Allele G und A in jeder Altersgruppe nachgewiesen werden.

4.4 IREB2

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die nachgewiesene verringerte Expression von *IREB2* aus den Vorexperimenten auch in Gehirngewebe von Parkinson-Patienten darstellbar ist, wurden immunhistochemische Färbungen von Gewebe der Substantia nigra von Parkinson-Patienten und Kontrollen bezüglich des IREB2 angefertigt (immunhistochemische Färbung von Prof. Dr. Jens Schittenhelm durchgeführt). Da IREB2 ein zytoplasmatisches Protein ist, zeigen die Färbungen der Hirnschnitte sowohl eine durchgehende Anfärbung des Zytoplasmas der

Ergebnisse

Neurone mit IREB2 als auch des umliegenden Neuropils (Abb. 4.4.1 B). Für die Auswertung der Farbintensität des IREB2 wurde die Färbung des Zytoplasmas eines Neurons verglichen mit der Färbung des umliegenden Neuropils und anschließend als stark, mittel oder schwach bewertet. Die Signalintensitäten für IREB2 veranschaulichen, dass Parkinson-Patienten in der Substantia nigra weniger Neurone aufweisen, welche eine starke IREB2-Färbung zeigen und im Gegensatz dazu mehr Neurone, welche eine schwache Färbung an IREB2 aufweisen (Abb. 4.4.1 A). Somit wird deutlich, dass die verringerte Expression von *IREB2* im Blut und post mortem-Gewebe auch mit immunhistochemischen Methoden in Gewebe der Substantia nigra nachweisbar ist.

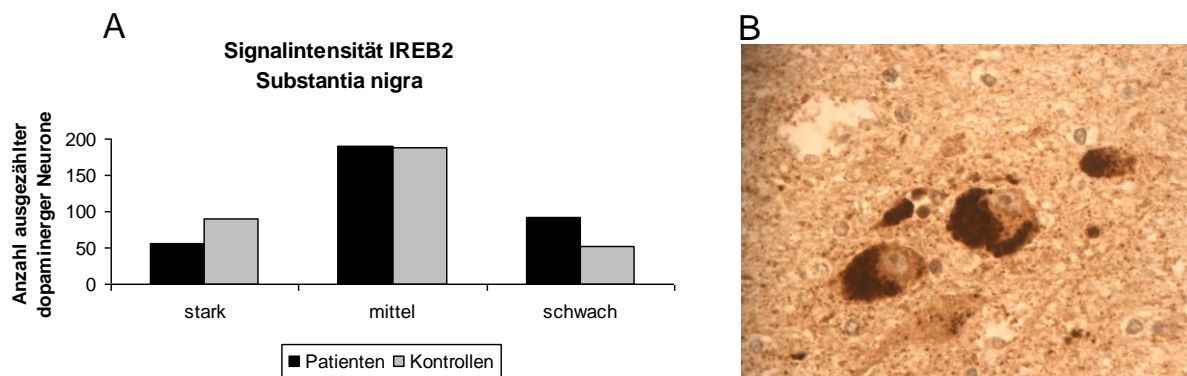


Abbildung 4.4.1: **A** Auszählung der immunhistochemischen Färbung der Substantia nigra mit IREB2 Dargestellt sind die absoluten Werte IREB2 gefärbter, ausgezählter Neurone in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten im Vergleich zu Kontrollen. War das Zytoplasma eines Neurons weniger angefärbt als das Zytoplasma des umliegenden Neuropils wurde die Färbung als „schwach“ interpretiert. Bei gleicher Farbintensität erhielt die Färbung die Beurteilung „mittel“ und bei intensiverer Färbung des Zytoplasmas im Neuron wurde die Bewertung „stark“ vergeben. Deutlich zu erkennen ist, dass Parkinson-Patienten in der Substantia nigra weniger Neurone aufzuweisen scheinen, welche eine starke IREB2-Färbung zeigen und im Gegensatz dazu mehr Neurone, welche eine schwache Färbung an IREB2 aufweisen. **B** Immunhistochemische Färbung eines Gehirnschnittes mit IREB2 durch die Substantia nigra Dieses Bild zeigt mehrere Neurone der Substantia nigra mit umliegendem Neuropil in einer 40-fachen Vergrößerung, welche mit IREB2 gefärbt sind. Deutlich erkennbar ist das dunkle Neuromelanin innerhalb der Neurone.

Aufgrund dieser Befunde stellte sich die Frage, ob die verringerte IREB2-Expression auch in Fibroblasten von Parkinson-Patienten (ohne bekannte pathogene Gen-Mutation) zu finden sein wird. Somit wären die Fibroblasten ein ideales Zellkultur-Modell, um daran funktionelle Tests durchzuführen und Rückschlüsse auf bestimmte untersuchte Mechanismen ziehen zu können. Hierfür wurde die Expression von vier Kontroll-Fibroblasten-Kulturen mit vier Fibroblasten-Kulturen von idiopathischen Parkinson-Patienten sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene verglichen (Abb. 4.4.2). Weder mit Hilfe der Real-Time-PCR (Daten nicht gezeigt) noch unter Verwendung des Western Blot-Verfahrens (Abb. 4.4.2) konnten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen verzeichnet werden. Die Expression von IREB2 scheint in den Fibroblasten bei beiden untersuchten Kohorten nahezu gleich zu sein.

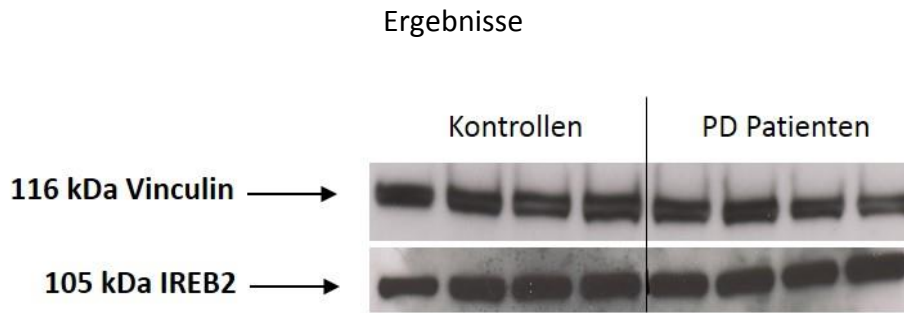


Abbildung 4.4.2: Western Blot von IREB2 an jeweils vier Fibroblasten von Parkinson-Patienten und Kontrollen Diese Abbildung zeigt die detektierte Menge an Protein von IREB2 bei jeweils vier verschiedenen Fibroblasten, welche zum einen von Parkinson-Patienten und zum anderen von gesunden Kontrollpersonen stammen. Aufgrund der Ladekontrolle Vinculin ist ersichtlich, dass überall die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde. Vergleicht man die Signalstärken von IREB2 zwischen den Parkinson-Patienten und Kontrollen kann man keine Unterschiede feststellen.

Um die Fibroblasten als geeignetes Zellkultur-Modell für anstehende Experimente im Eisenstoffwechsel vollends auszuschließen, wurden auch sämtliche Targetgene von IREB2 in ihrer Expression gemessen und zwischen Patienten und Kontrollen verglichen. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt) in der Expressionsstärke. Daher wurde von den Fibroblasten (welche von idiopathischen Parkinson-Patienten stammten) für weitere Analysen bezüglich des Eisenstoffwechsels abgesehen.

Die verringerte Genexpression von *IREB2* sollte an einer zweiten unabhängigen Kohorte von Parkinson-Patienten und Kontrollen mittels quantitativer Real-Time-PCR im Blut bestätigt werden. Bei der Auswahl der Kohorten war die Hyperechogenität der Substantia nigra eine wichtige Voraussetzung bei den Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom. In der Auswertung der Daten zeigte sich zwar eine Tendenz der verringerten Expression von *IREB2* bei den Parkinson-Patienten der zweiten Kohorte, allerdings war die Genexpression von *IREB2* statistisch nicht signifikant niedriger als bei den Kontrollen der zweiten Kohorte (Daten nicht gezeigt).

Da eine Vielzahl von Faktoren die Genexpression beeinflussen können (z.B. Zeitpunkt der Blutabnahme, nüchtern oder nicht oder gar Medikamenteneinnahme) und zusätzlich der genetische Hintergrund bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom sehr unterschiedlich ist, sollte in einem Folgeexperiment die Genexpression von *IREB2* bei Parkinson-Patienten gemessen werden, die eine bestimmte genetische Veränderung aufwiesen, welche für die Parkinsonerkrankung als ursächlich beschrieben oder als Suszeptibilitätsfaktor bekannt sind.

Dabei fiel die Auswahl auf die Gene: alpha-Synuklein (*SNCA*), *GBA*, *LRRK2* und *PINK1*. Bei Patienten, welche eine Mutation in den Genen *GBA*, *LRRK2* und *PINK1* aufwiesen, konnte keine verringerte Genexpression von *IREB2* im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Anders verhielt es sich im Vergleich bei einer Familie, welche eine A30P-Mutation im alpha-Synuklein aufwies (Bereitstellung der Lymphoblasten von Prof. Dr. Rejko Krüger). Aus dieser Familie wurden 10 Testpersonen bezüglich der *IREB2*-Expression untersucht. Darunter

Ergebnisse

befanden sich sowohl gesunde Nicht-Mutationsträger für die A30P-Mutation, Mutationsträger, welche bisher asymptomatisch waren als auch Mutationsträger, welche bereits an einer Parkinson-Erkrankung litten. Deutlich zu erkennen (Abb. 4.4.3) ist eine signifikant reduzierte Genexpression von *IREB2* bei Personen, welche eine A30P-Mutation tragen, egal ob diese Personen asymptomatisch oder bereits erkrankt sind. Dies weist darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der vorhandenen A30P-Mutation im alpha-Synuklein-Gen (*SNCA*) und der Genexpression von *IREB2* gibt, was wiederum bedeutet, dass *IREB2* eine Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielt.

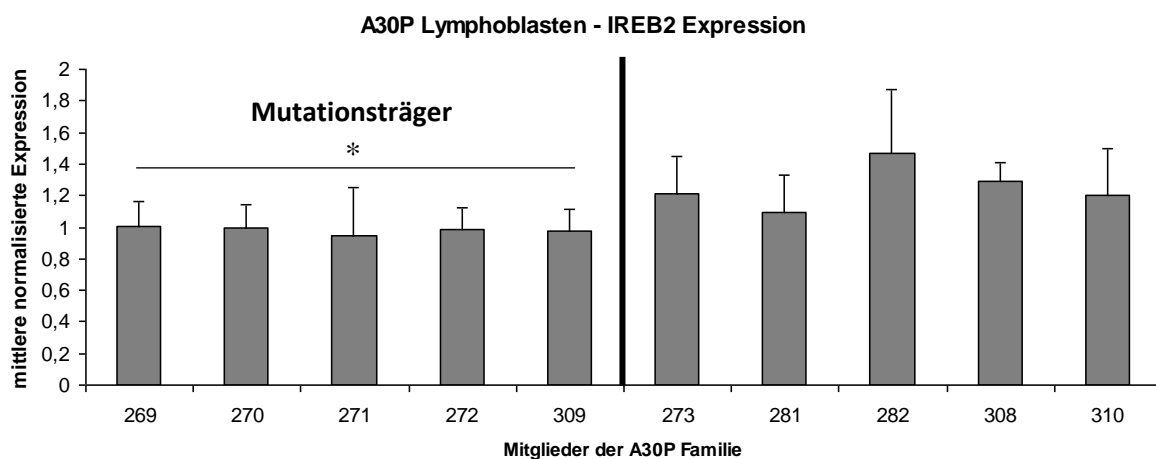


Abbildung 4.4.3: Mittlere normalisierte Expression von *IREB2* in Lymphoblasten In dieser Abbildung ist die mittlere normalisierte Genexpression des *IREB2*-Gens aus RNA von Lymphoblasten dargestellt. Die Lymphoblasten stammen von einer Familie mit bekannter A30P-Mutation. Die einzelnen Familienmitglieder wurden mit Zahlen anonymisiert. Die Mitglieder 269, 270, 271, 272 und 309 sind sowohl symptomatische als auch bisher asymptomatische Mutationsträger der A30P-Mutation im alpha-Synuklein (*SNCA*-Gen). Die Mitglieder 273, 281, 282, 308 und 310 tragen keine A30P-Mutation. Deutlich zu erkennen ist die signifikant reduzierte Expression von *IREB2* in Mutationsträgern im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern innerhalb derselben Familie.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nun im Folgenden der funktionelle Zusammenhang von *IREB2* mit alpha-Synuklein näher untersucht werden, um herauszufinden, ob die verringerte *IREB2*-Genexpression mit ursächlich für die Parkinson-Erkrankung sein könnte oder als Ergebnis der A30P-Mutation im alpha-Synuklein anzusehen ist.

4.5 *IREB2* und alpha-Synuklein

Als erstes Experiment sollte eine Immunfluoreszenzfärbung zeigen, dass beide Proteine (alpha-Synuklein und *IREB2*) potentiell miteinander interagieren könnten, da sie innerhalb der Zelle in den gleichen Kompartimenten vorliegen. Wie in Abbildung 4.5.1 ersichtlich, zeigt die Immunfluoreszenzfärbung in SHSY5Y-Zellen eine sehr ähnliche Verteilung von *IREB2* (Abb. 4.5.1B) und alpha-Synuklein (Abb. 4.5.1C) bezüglich der Zellkompartimente. Beide Proteine liegen im Zytoplasma vor, jedoch nicht im Zellkern (Abb. 4.5.1A). Bei einer überlagernden

Ergebnisse

Ansicht von IREB2 und alpha-Synuklein (Abb. 4.5.1D) wird deutlich, dass die zytoplasmatische Lage beider Proteine große Übereinstimmung zeigt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass IREB2 und alpha-Synuklein miteinander interagieren könnten. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Färbung von Substantia nigra-Gewebe eines Parkinson-Patienten mit IREB2 angefertigt (Abb. 4.5.1E), in der verdeutlicht wird, dass IREB2 sich auch innerhalb eines Lewy-Körperchens befindet, da sich hier eine deutlich positive Färbung abzeichnet (Pfeil). Wie bereits bekannt ist, befindet sich auch alpha-Synuklein in den Lewy-Körperchen von Parkinson-Patienten (Braak, et al. 1995; Licker, et al. 2009).

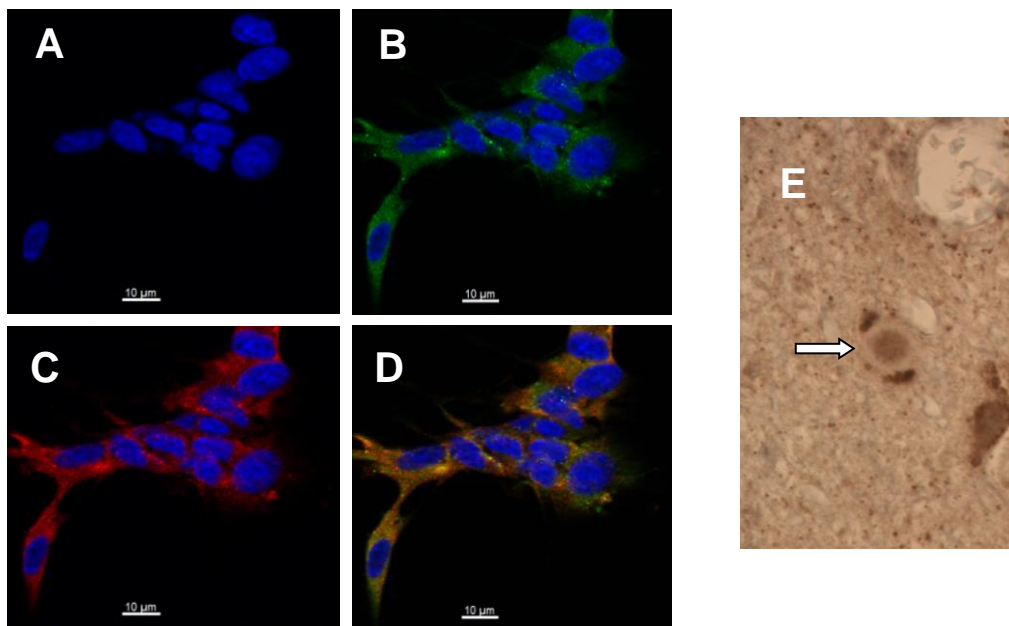


Abbildung 4.5.1: A B C D Immunfluoreszenzfärbung von SHSY5Y-Zellen In Bild A wurden die SHSY5Y-Zellen mit DAPI angefärbt zur Darstellung der Zellkerne, welche in blau deutlich zu erkennen sind. Bild B zeigt in grüner Farbe die zytoplasmatische Anfärbung des IREB2-Proteins. Rot leuchtend in Bild C ist die Anfärbung der SHSY5Y-Zellen mit alpha-Synuklein (15G7) zu sehen. Überlagert man beide Färbungen von B und C erhält man Bild D. Treten beide Proteine an derselben Position in der Zelle auf, wird das grüne und das rote Signal überlagert und gelb dargestellt. **E Immunhistochemische Färbung eines Lewy-Körperchens mit IREB2 in der Substantia nigra eines Parkinson-Patienten in 40-facher Vergrößerung** Das mit IREB2 angefärbte Lewy-Körperchen ist umgeben von einem farblosen Halo. Innerhalb des Lewy-Körperchens zeigt sich eine deutlich positive Färbung für IREB2.

Ein nächster Schritt war herauszufinden, wie eine solche Interaktion von IREB2 mit alpha-Synuklein möglicherweise aussehen kann. Dafür ist wichtig zu wissen, dass IREB2 an sogenannte *iron regulatory elements* (IRE`s) im 3`- bzw. 5`- UTR-Bereich der mRNA bestimmter Targetgene in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration der Zelle bindet oder auch nicht bindet und so die Transkription dieser Gene reguliert, indem sie abgelesen werden können oder eben nicht (siehe Einleitung unter 1.2.5).

Im 5` - UTR-Bereich der mRNA von alpha-Synuklein befindet sich eine Basensequenz, die sich laut *in-silico* Analyse (Friedlich, et al. 2007) zu einer Loop-Struktur zusammenlagert und Sequenzhomologien zu anderen IRE`s aufweist. Diese Loop-Struktur ähnelt sehr stark der

Ergebnisse

Loop-Struktur im 5` - UTR-Bereich der mRNA von Ferritin, welches ein wichtiges Targetgen für IREB2 darstellt. Fünf Basen an der wichtigsten Erkennungssequenz im 5` - UTR-Bereich der mRNA beider Gene sind sogar vollkommen identisch (Abb. 4.5.2).

Diese fünf Basen sind laut Literaturangabe (Friedlich, et al. 2007) essentiell für die Bindung an die sog. *iron regulatory proteins* (IRP`s), wozu auch IREB2 gehört. Das würde bedeuten, dass über diese Basensequenz und die spezielle Sekundärstruktur der mRNA von alpha-Synuclein eine Bindung mit IREB2 erfolgen könnte.

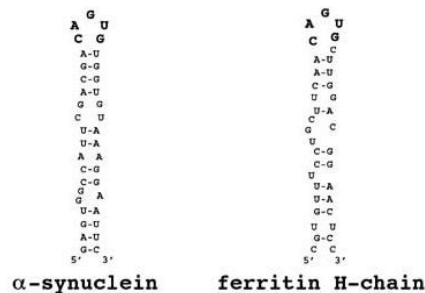


Abbildung 4.5.2: Sekundärstruktur der mRNA im 5` - UTR-Bereich von alpha-Synuclein und Ferritin (schwere Kette) Die mRNA von alpha-Synuclein bildet laut *in silico*-Analyse eine Sekundärstruktur aus, welche starke Homologien zur mRNA von Ferritin aufweist. Für Ferritin ist bekannt, dass es im 5`-UTR-Bereich ein IRE ausbildet als regulatorisches Element zur Eisenregulation innerhalb einer Zelle. Daher wird angenommen, dass diese Loop-Struktur von alpha-Synuclein als ein IRE fungieren könnte, da sogar fünf Basen, welche für die IRE/IRP Bindung essentiell zu sein scheinen, komplett identisch zur Sequenz von Ferritin an dieser Stelle sind (Abbildung aus Friedlich, et al. 2007).

In einem ersten Schritt galt es daher den funktionellen Beweis der *in-silico* Daten zu erbringen, dass es eine tatsächliche Bindung von IREB2 mit der Sekundärstruktur der mRNA im 5` - UTR Bereich von alpha-Synuclein gibt. Hierzu wurde ein Pull Down Experiment durchgeführt, bei dem der 5` - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuclein über eine *in vitro* Transkription künstlich hergestellt wurde. In einer anschließenden Inkubation mit einem Proteinlysate aus SHSY5Y-Zellen sollte im Falle einer Interaktion des potentiellen IRE`s von alpha-Synuclein mit IREB2 ein Signal am Ende des Experimentes sichtbar werden. Um sicher zu gehen, dass der Versuchsaufbau richtig durchdacht ist, wurde als Positivkontrolle die mRNA von Ferritin ebenfalls in gleicher Weise *in vitro* transkribiert und mit IREB2 (im Proteinlysate) inkubiert. Im Fall der Positivkontrolle wird auf jeden Fall ein Signal erwartet, da die Interaktion zwischen Ferritin und IREB2 als bekannt gilt. Als Negativkontrolle wurde eine beliebige mRNA dazu genommen, bei der keine Bindung mit IREB2 nachweisbar sein dürfte. Der Versuch wurde sowohl mit SHSY5Y-Zellen als auch mit HEK-Zellen durchgeführt, welche beide IREB2 exprimieren.

Ergebnisse

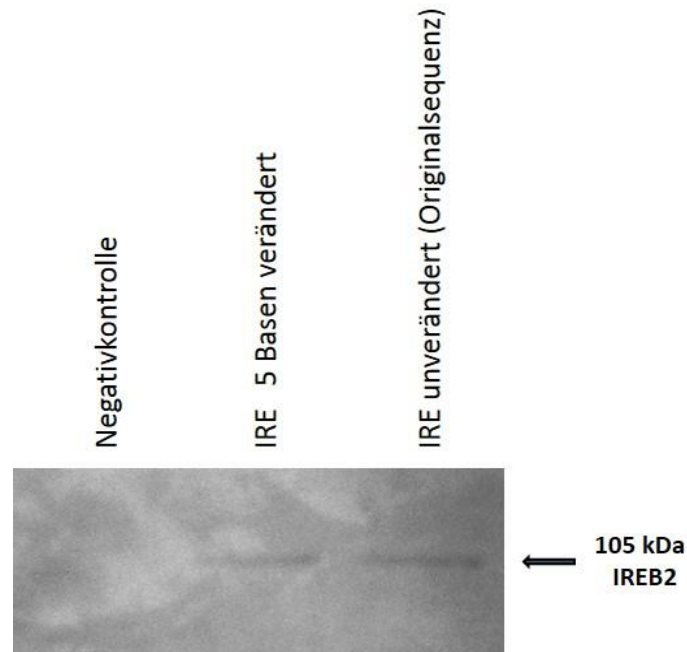


Abbildung 4.5.3: Pull Down Experiment zum Nachweis einer Bindung der mRNA von alpha-Synuklein mit IREB2. In dieser Abbildung erkennt man zwei positive Signale im Western Blot. Dies ist das Resultat einer Bindung von IREB2 mit zwei mRNAs von alpha-Synuklein. Das rechte positive Signal resultiert aus einer Bindung der Originalsequenz des 5' - UTR Bereiches in der mRNA von alpha-Synuklein mit IREB2. Das zweite Signal in der Mitte ist das Resultat einer Bindung von IREB2 mit einer künstlich mutierten mRNA von alpha-Synuklein. In der Negativkontrolle ist kein Signal sichtbar.

In einem ersten Experiment konnte die Bindung des 5' - UTR Bereichs der mRNA von alpha-Synuklein mit IREB2 im Vergleich zur Negativkontrolle bewiesen werden, da sich ein positives Signal im Western Blot zeigte (Abb. 4.5.3 rechte Spur). Um nun herauszufinden, ob die fünf Basen im Loop der mRNA-Struktur von alpha-Synuklein essentiell für eine Bindung mit IREB2 sind, wurden sie künstlich mit Hilfe der *in vitro* Transkription verändert, in dem andere Basen an diese Positionen eingebracht wurden. Dies hat eine Veränderung der Sekundärstruktur der mRNA zur Folge (Abb. 4.5.6). Zu erwarten war, dass hierdurch keine Bindung zwischen der veränderten mRNA von alpha-Synuklein und IREB2 mehr nachweisbar sein dürfte. Wie jedoch aus Abbildung 4.5.3 ersichtlich (mittlere Spur), gibt es trotz der fünf veränderten Basen im Loop eine ähnliche Bindung wie bei der unveränderten Originalsequenz.

Diese Ergebnisse waren unerwartet und warfen die Frage auf, welche Basen im 5' - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein benötigt werden, um eine Bindung mit IREB2 eingehen zu können. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollten zusätzlich zu den 5 veränderten Basen in der Loop-Struktur weitere benachbarte Basen verändert werden, um zu sehen, ab wann keine Bindung mit IREB2 mehr stattfindet.

Wie in Abbildung 4.5.4 zu erkennen ist, scheint jegliche Art der Basensequenzveränderung der mRNA von alpha-Synuklein die Bindung zu IREB2 nicht zu beeinflussen. Auffallend ist der Unterschied in der Intensität der Bindung im Vergleich zur Positivkontrolle Ferritin, die ein deutlich stärkeres Signal aufweist. Allerdings kann die Bindung von IREB2 mit alpha-Synuklein nicht vollkommen unspezifisch sein, da sonst auch ein Signal in der Negativkontrolle zu verzeichnen sein müsste.

Ergebnisse



Abbildung 4.5.4: IREB2 Pull Down Experiment mit diversen sequenzveränderten mRNAs von alpha-Synuklein ausgehend vom zentralen Loop In dieser Abbildung erkennt man positive Signale im Western Blot nach einem Pull Down von IREB2 mit mRNA von alpha-Synuklein. Links zeigt die Bindung der unveränderten Basenabfolge der mRNA von alpha-Synuklein mit IREB2. Nach rechts gelesen sind die Signale für Bindungen von IREB2 mit mRNA von alpha-Synuklein zu erkennen, bei welcher zunächst 5 Basen, dann 8 Basen, später 11 Basen, 14 Basen und letztlich 17 Basen künstlich mutiert wurden ausgehend von zentralen Loop der Sekundärstruktur. Die Positivkontrolle Ferritin zeigt ein deutlich stärkeres Signal. In der Negativkontrolle ist keine Bindung zu verzeichnen.

Zur Kontrolle, ob die 5 Basen im IRE vom Ferritin essentiell für eine Bindung mit IREB2 sind, wie es in mehreren Publikationen beschrieben ist (Friedlich, et al. 2007), wurde in einem weiteren Versuch die Basensequenz im Loop der mRNA von Ferritin künstlich durch *in vitro* Transkription verändert. Wie in Abbildung 4.5.5 eindrücklich zu erkennen ist, scheinen die 5 Basen im IRE Loop der mRNA von Ferritin tatsächlich essentiell für die Bindung mit IREB2 zu sein. Während die Originalbasensequenz der mRNA von Ferritin ein sehr starkes, positives Signal im Pull Down Experiment aufweist, scheint mit Veränderung dieser 5 Basen die Bindung nahezu aufgehoben zu sein (Abb.4.5.5 rechter Blot).

Wenn man also eine solche Veränderung im Bindungsverhalten bei Ferritin beobachten kann, stellt sich die Frage, ob bei alpha-Synuklein eventuell andere Basen für die spezifische Bindung mit IREB2 verantwortlich sein könnten und wenn ja, um welche es sich handelt. Denn durch die Veränderung der 5 Basen im Loop bei alpha-Synuklein konnte kein Effekt im Bindungsverhalten hinsichtlich zur Originalsequenz verzeichnet werden. Daher sollte im Folgenden eine Sequenzveränderung der mRNA von alpha-Synuklein erfolgen, welche weiter entfernt vom Loop im 5' und 3' Bereich lag. Diese Veränderungen sollten sowohl für sich isoliert als auch in Kombination mit einer Veränderung der 5 Basen im Loop untersucht werden. Abbildung 4.5.5 gibt einen Überblick über die verschiedenen durchgeführten Mutationsansätze.

Ergebnisse

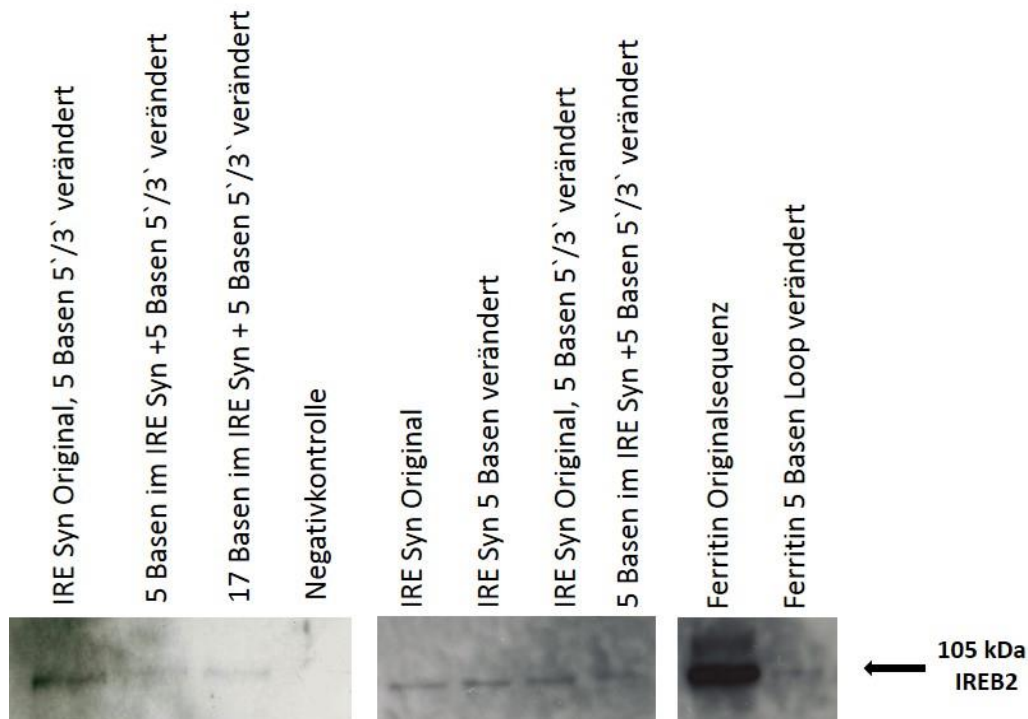


Abbildung 4.5.5: IREB2 Pull Down Experiment mit diversen sequenzveränderten mRNAs von alpha-Synuklein ausgehend vom 5` und 3` Bereich In dieser Abbildung erkennt man positive Signale im Western Blot nach einem Pull Down von IREB2 mit mRNA von alpha-Synuklein und Ferritin. Der **linke** Blot zeigt die Bindung von IREB2 mit verschiedenen Kombinationen an Sequenzveränderungen der mRNA von alpha-Synuklein. Von links nach rechts: zunächst wurden im 5` und 3` Bereich jeweils 5 Basen mutiert, danach zusätzlich noch die 5 Basen im Loop und als letztes ganz extrem 17 zentrale Basen einschließlich des Loops sowie jeweils 5 Basen im 5` und 3` Bereich verändert. Die Negativkontrolle zeigt kein Signal. Der Blot in der **Mitte** zeigt von links nach rechts erst das Signal der Bindung von IREB2 mit der Originalsequenz der mRNA von alpha-Synuklein, dann die Bindung, wenn die 5 Basen im Loop mutiert vorliegen, folgend Loop Originalsequenz aber je 5 Basen im 5` und 3` Bereich mutiert und das letzte Signal resultiert aus veränderter Sequenz im Loop und je 5 Basen im 5` und 3` Bereich. Der **rechte** Blot veranschaulicht die Bindung von IREB2 mit der Originalsequenz von Ferritin als Positivkontrolle, sowie das Bindungsverhalten von IREB2 mit Ferritin, wenn die 5 Basen im Loop verändert vorliegen. In diesem Fall ist kein, allenfalls ein sehr schwaches, Signal erkennbar.

Die diversen Veränderungen in der Basensequenz der mRNA von alpha-Synuklein scheinen überhaupt keinen Effekt auf die Bindung mit IREB2 zu haben. Im linken Blot (Abb. 4.5.5) könnte man noch annehmen, dass bei der Originalsequenz im Loop und jeweils 5 veränderten Basen am 3` und 5` Ende der mRNA von alpha-Synuklein ein stärkeres Signal im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen zu verzeichnen ist. Bei einer Wiederholung dieses Versuches (Abb. 4.5.5 Blot Mitte) ist dieser Effekt jedoch nicht mehr zu sehen, weshalb nicht davon auszugehen ist, dass es sich um eine reale stärkere Bindung handelt.

Um zu verdeutlichen, dass die Veränderung der Basensequenz in der mRNA von alpha-Synuklein zu einer extremen Veränderung in der Ausbildung ihrer Sekundärstrukturen führt, wurden mit Hilfe des *Vienna RNA Web Services* des Institutes für theoretische Chemie der Universität Wien (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) die RNA-Sekundärstrukturen aller im Experiment verwendeten RNA`s aufgrund ihrer thermodynamischen Eigenschaften berechnet

Ergebnisse

und visualisiert (Abb. 4.5.6; 4.5.7 und 4.5.8). Festzuhalten sei zudem, dass die Veränderung der 5 zentralen Basen in der mRNA von Ferritin keine drastische Veränderung der RNA Sekundärstruktur nach sich zieht (Abb.4.5.8 C und D), jedoch das Bindungsverhalten deutlich beeinflusst ist (Abb. 4.5.5 rechts).

Zusammenfassend kann man also feststellen, dass eine Bindung zwischen der mRNA von alpha-Synuklein mit IREB2 nachweisbar ist. Zudem wurde auch die Bindung von IREB2 mit dem IRE von Ferritin bewiesen. Die Intensität im Bindungsverhalten von IREB2 mit Ferritin war um ein vielfaches höher als die Bindung von IREB2 mit alpha-Synuklein. Während die fünf Basen im Loop der RNA-Struktur von Ferritin essentiell für eine Bindung mit IREB2 zu sein scheinen, konnte dieser Effekt für die fünf identischen Basen in der RNA von alpha-Synuklein nicht gezeigt werden. Überdies scheint die Bindung unbeeinträchtigt von diversen Veränderungen in der Abfolge der Basensequenz in der RNA von alpha-Synuklein zu sein. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bindung eventuell unspezifisch sein könnte oder andere Strukturelemente der RNA von alpha-Synuklein für die Bindung mit IREB2 verantwortlich sein könnten.

Überdies stellte sich die Frage, ob nicht eventuell Sequenzveränderungen im IRE der RNA von alpha-Synuklein bei Parkinson-Patienten vorzufinden wären, die eine Erklärung für die verringerte *IREB2*-Expression bei den A30P-Mutationsträgern sein könnten. Zu diesem Zweck wurde der 5` - UTR Bereich von alpha-Synuklein, in dem das IRE die Loop-Struktur ausbildet, bei Personen aus der A30P-Familie sequenziert. Hierfür wurden jeweils drei Personen herangezogen, welche eine sehr niedrige (270, 272 und 309) bzw. eine sehr hohe (273, 281 und 282) Expression von *IREB2* in den Vorexperimenten aufwiesen. In beiden Fällen war die Basensequenzabfolge vollkommen identisch (Daten nicht gezeigt).

Die Proben, welche für die Analysen der immunhistochemischen Färbungen der Substantia nigra mit IREB2 herangezogen wurden, sollten ebenfalls auf ihre korrekte Basenabfolge im 5` - UTR Bereich von alpha-Synuklein hin überprüft werden. Auch hier konnten keine Sequenzveränderungen zum Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), die eine mögliche Erklärung für die verringerte IREB2-Expression gewesen wären.

Ergebnisse

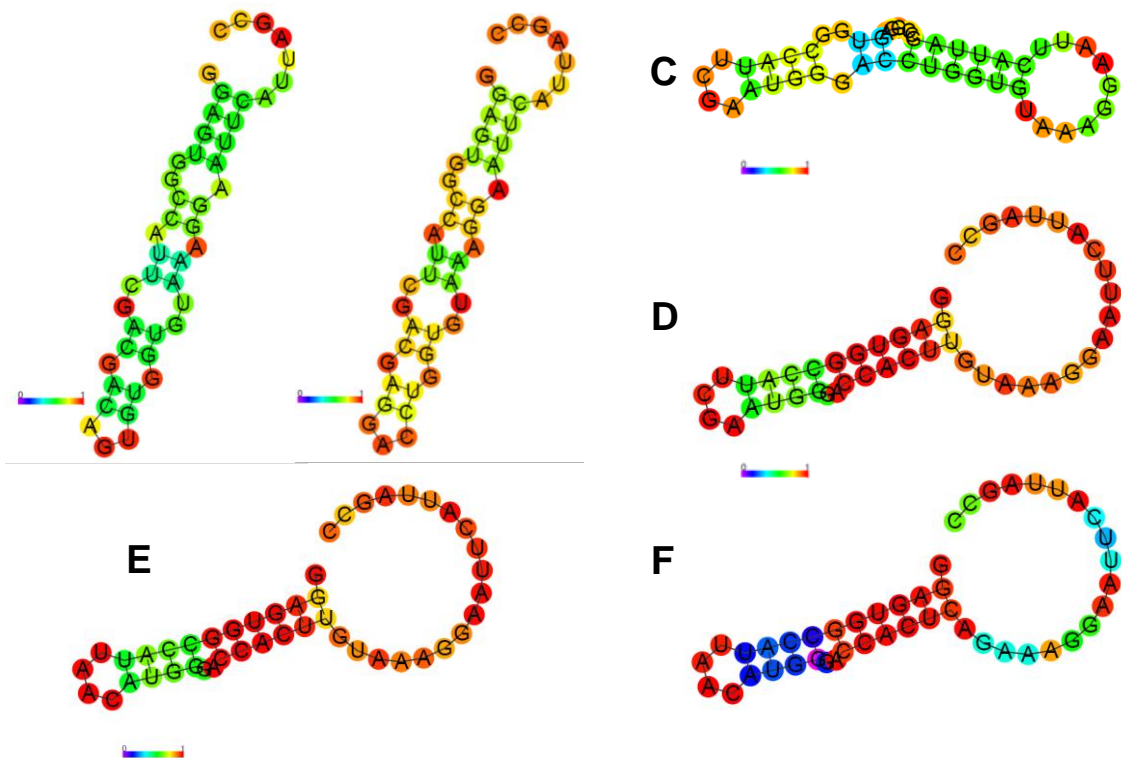


Abbildung 4.5.6: RNA-Sekundärstruktur-Vorhersagen für den 5` - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein (I) In dieser Abbildung sind die verschiedenen Sekundärstrukturen der mRNA von alpha-Synuklein abgebildet, welche in den Pull Down Experimenten verwendet wurden. Sie wurden berechnet aufgrund ihrer thermodynamischen Eigenschaften mit Hilfe des *Vienna RNA Web Services* des Institutes für theoretische Chemie der Universität Wien (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). Die verschiedenen Farben repräsentieren die Basenpaar-Wahrscheinlichkeiten von 0-1, wobei rote Farben eine sehr wahrscheinliche Basenpaarung anzeigen und blaue Farben eher unwahrscheinliche Paarungen. **A** alpha-Synuklein Originalsequenz; **B** fünf Basen im Loop der mRNA künstlich verändert; **C** 8 Basen der mRNA Abfolge geändert ausgehend vom Loop; **D** 11 Basen der mRNA Abfolge geändert ausgehend vom Loop; **E** 14 Basen der mRNA Abfolge geändert ausgehend vom Loop; **F** 17 Basen der mRNA Abfolge geändert ausgehend vom Loop

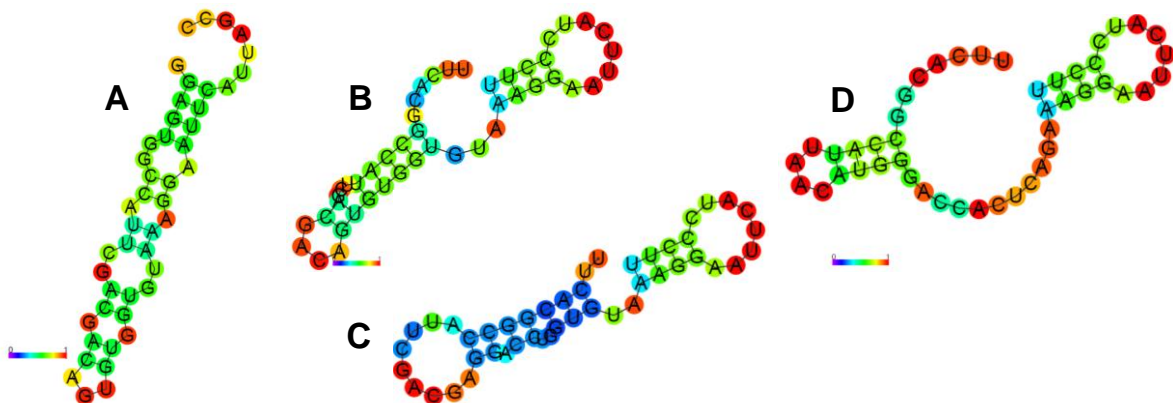


Abbildung 4.5.7: RNA-Sekundärstruktur-Vorhersagen für den 5` - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein (II) In dieser Abbildung sind die verschiedenen Sekundärstrukturen der mRNA von alpha-Synuklein abgebildet, welche in den Pull Down Experimenten verwendet wurden. Sie wurden berechnet aufgrund ihrer thermodynamischen Eigenschaften mit Hilfe des *Vienna RNA Web Services* des Institutes für theoretische Chemie der Universität Wien (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). Die verschiedenen Farben repräsentieren die Basenpaar-

Ergebnisse

Wahrscheinlichkeiten von 0-1, wobei rote Farben eine sehr wahrscheinliche Basenpaarung anzeigen und blaue Farben eher unwahrscheinliche Paarungen. **A** alpha-Synuklein Originalsequenz; **B** fünf Basen im 5' und 3' Bereich künstlich verändert, Basenabfolge im Loop nicht verändert; **C** fünf Basen im 5' und 3' Bereich künstlich verändert, 5 Basen im Loop ebenfalls verändert; **D** fünf Basen im 5' und 3' Bereich künstlich verändert, zusätzlich weitere 17 Basen mutiert ausgehend vom zentralen Loop

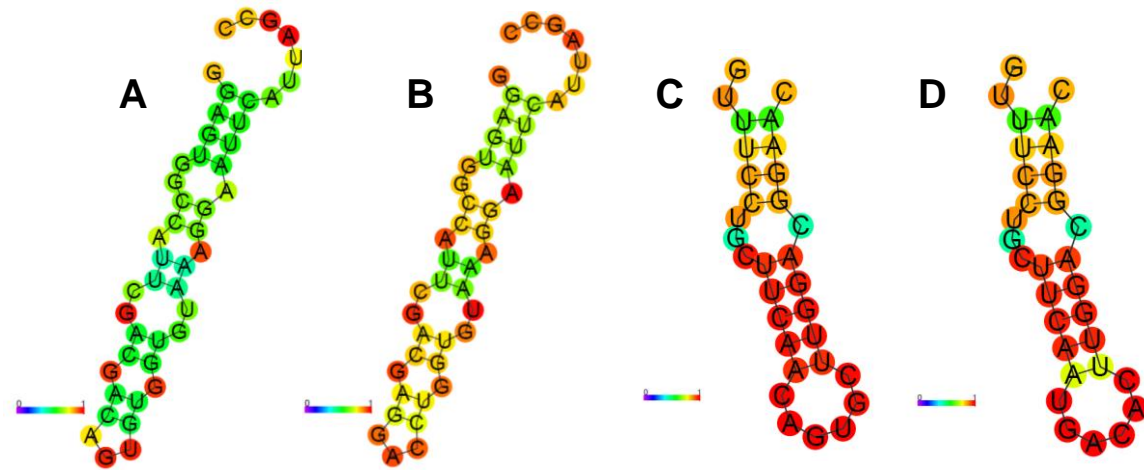


Abbildung 4.5.8: RNA-Sekundärstruktur-Vorhersagen für den 5' - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein und Ferritin In dieser Abbildung sind die verschiedenen Sekundärstrukturen der mRNA von alpha-Synuklein (A und B) und Ferritin (C und D) abgebildet, welche in den Pull Down Experimenten verwendet wurden. Sie wurden berechnet aufgrund ihrer thermodynamischen Eigenschaften mit Hilfe des *Vienna RNA Web Services* des Institutes für theoretische Chemie der Universität Wien (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). Die verschiedenen Farben repräsentieren die Basenpaar-Wahrscheinlichkeiten von 0-1, wobei rote Farben eine sehr wahrscheinliche Basenpaarung anzeigen und blaue Farben eher unwahrscheinliche Paarungen. **A** alpha-Synuklein mRNA Originalsequenz; **B** alpha-Synuklein 5 Basen im Loop verändert; **C** Ferritin mRNA Originalsequenz; **D** Ferritin 5 Basen im Loop verändert

Um zu überprüfen, ob es einen funktionellen oder auch strukturellen Zusammenhang zwischen IREB2 und alpha-Synuklein gibt oder ob die nicht eindeutigen Daten aus dem Pull Down Experiment als unspezifisch einzuschätzen sind, sollte die Expression von alpha-Synuklein gemessen werden, wenn IREB2 überexprimiert vorliegt. Sollte kein Zusammenhang bestehen, dürfte die Expression von alpha-Synuklein nicht beeinträchtigt sein. Hierzu wurden SHSY5Y-Zellen mit einem Vektor über Lipofektion transfiziert, in dem IREB2 über einen CMV-Promotor überexprimiert wird (pCMV6-XL6, AMS Biotechnology, UK). Zur Kontrolle gab es zwei Ansätze. In einem wurde den Zellen ausschließlich das Lipofektionsgemisch ins Medium eingebracht, in dem anderen ein leerer GFP-Vektor mit transfiziert. Somit sollte ausgeschlossen sein, dass die Transfektion an sich einen störenden Einfluss auf die Expression von alpha-Synuklein ausübt.

Wie in Abbildung 4.5.9 gut zu erkennen ist, bleibt die Expression von alpha-Synuklein bei einer Überexpression von IREB2 nicht unbeeinträchtigt. Im Vergleich zur Negativkontrolle ($p = 0,01$) und ebenso im Vergleich zu den Zellen, welche mit GFP transfiziert wurden ($p = 0,04$), ist die Expression von alpha-Synuklein signifikant erhöht. Um sicher zu gehen, dass es sich hierbei um tatsächliche Befunde handelt, wurde der Versuch dreimal wiederholt und bestätigt.

Ergebnisse

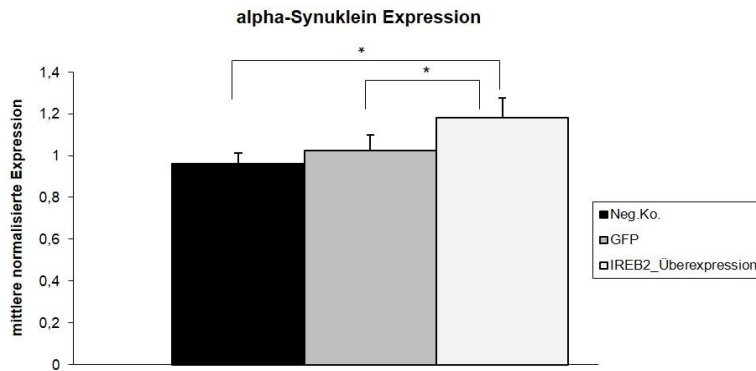


Abbildung 4.5.9: Alpha-Synuklein-Expression nach IREB2-Überexpression In dieser Abbildung ist die mittlere normalisierte Expression von alpha-Synuklein nach verschiedenen Versuchsansätzen dargestellt. SHSY5Y-Zellen wurden mit einem Vektor transfiziert, welcher IREB2 überexprimiert (pCMV6-XL6, AMS Biotechnology, UK). Zusätzlich zur Negativkontrolle wurden SHSY5Y-Zellen mit einem leeren GFP-Vektor transfiziert. Nach einer 48h Inkubation mit dem überexprimierenden IREB2-Vektor wurde die alpha-Synuklein Expression gemessen. Im Vergleich zur Negativkontrolle und ebenso im Vergleich zu den GFP-transfizierten Zellen ist die alpha-Synuklein Expression signifikant erhöht.

Es ist also nicht von der Hand zu weisen, dass es einen Zusammenhang zwischen IREB2 und alpha-Synuklein gibt. In welcher Form dieser Zusammenhang jedoch besteht und ob dieser einen Einfluss auf die Pathogenese der Parkinson-Erkrankung ausübt, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht abschließend geklärt werden.

4.6 Generierung verschiedener LRRK2-Varianten in SHSY5Y-Zellen

Auf Basis einer leicht zu handhabenden Zell-Linie (wie z.B. SHSY5Y-Zellen) sollte ein Parkinson-Zellkulturmodell generiert werden, in welchem verschiedene LRRK2-Varianten, über ein homologes Konstrukt mit Hilfe einer spezifischen Zinkfingerendonuklease, ins Genom integriert werden sollten. Geeignet schien u.a. die G2019S-Mutation im *LRRK2*-Gen, da diese monogenetische Form sich klinisch nicht von der sporadischen Form der Parkinson-Erkrankung unterscheidet.

Folgende Modelle sollten generiert werden:

- SHSY5Y-Zellen mit zwei Stopp-Mutation im *LRRK2*-Gen (Stopp-Kodon in Exon 41 im *LRRK2*-Gen führt zu einem kompletten *LRRK2 knock-out*, persönliche Kommunikation mit Dr. Benjamin Schmid, zweites Stopp-Kodon diente nur zur Sicherheit),
- SHSY5Y-Zellen mit einer I2020T-Mutation im *LRRK2*-Gen,
- SHSY5Y-Zellen mit einer G2019S-Mutation in *LRRK2* (Abb. 4.6.1 von Dr. Benjamin Schmid) und eine
- SHSY5Y-Zelllinie, in dem *LRRK2* nicht mehr funktionsfähig ist, da in die Kinasedomäne eine D1994A-Mutation eingebaut werden sollte.

Ergebnisse

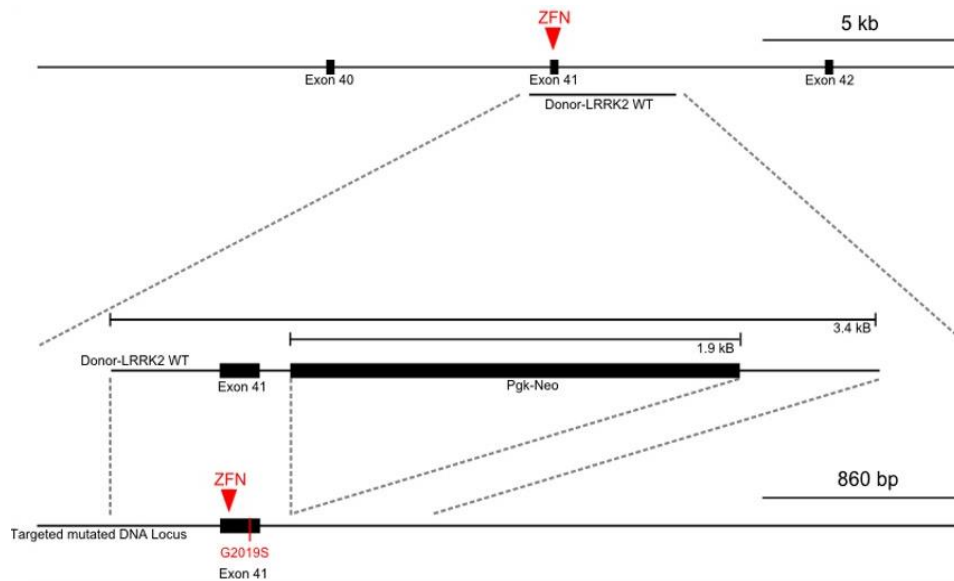


Abbildung 4.6.1: Zinkfinger basiertes *Gene-Editing* für das Exon 41 des *LRRK2*-Gens In dieser Abbildung (von Dr. Benjamin Schmid) erkennt man das homologe Konstrukt, welches eine Neomycinresistenz nach Exon 41 aufweist. Diese ist wichtig für eine spätere Selektion stattgefundenener homologer Rekombinationen mit dem homologen Konstrukt. Der rote Pfeil markiert die Stelle, an der der Zinkfinger ansetzt und die DNA aufschneidet. Hier ist dargestellt, wie eine G2019S-Mutation im *LRRK2*-Gen künstlich über das homologe Konstrukt in seine Wildtypform zurückversetzt werden kann. Denkbar ist jedoch jede weitere, gewünschte Veränderung des Exons 41 des *LRRK2*-Gens.

Die Strategie zur Erstellung dieser verschiedenen SHSY5Y-Zellen sollte für alle genannten Mutationen gleich sein. Hierfür sollten diverse homologe Konstrukte zur genomischen DNA erstellt werden, welche die gewünschten Veränderungen in der Basensequenz des Exons 41 des *LRRK2*-Gens enthielten (D1994A und I2020T selbst kloniert, die anderen zwei Konstrukte von Dr. Benjamin Schmid und David Schöndorf kloniert, HIH Tübingen). Als erstes wurde dafür über zwei Mutagenese-PCR Schritte die gewünschte Mutation ins *LRRK2*-Gen, sowie Erkennungssequenzen bestimmter Restriktionsenzyme, welche für die Einklonierung in den Empfängervektor von Bedeutung waren, in das PCR-Produkt künstlich eingebracht. Nach Kontrolle der Sequenzveränderung im erstellten PCR-Produkt wurde dieses in den Vermehrungsvektor (pGem[®]-T) über eine T4-Ligase einkloniert. Nach einer durchgeführten Transformation in *E.coli*-Zellen und einer anschließenden Selektion mit Ampicillin wurden positive Klone auf ihre Sequenz hin überprüft. Bakterienklone mit der gewünschten DNA-Veränderung im *LRRK2*-Gen wurden für weitere Schritte herangezogen. Das gewünschte Insert im pGem[®]-T Vektor wurde mit Enzymen herausgeschnitten, der Empfängervektor, pEasy FloxII, wurde ebenfalls mit denselben Enzymen aufgeschnitten und Insert mit Empfängervektor wurden inkubiert, damit das Insert dort über die Enzymschnittstellen hineinligiert werden konnte (Abb. 4.6.2). Positive, selektionierte Klone wurden für die anschließende Transfektion in die Empfängerzellen (SHSY5Y) aufgearbeitet. Bei der anschließenden Lipofektion der SHSY5Y-Zellen sollte über eine spezifische Zinkfingernuklease das gewünschte, veränderte DNA-Fragment über homologe Rekombination an die richtige Stelle im Genom der Zellen integriert werden. Über eine Selektion mit Neomycin im

Ergebnisse

Zellmedium konnten Zellklone herangezuchtet werden, welche den Vektor ins Genom integriert hatten.

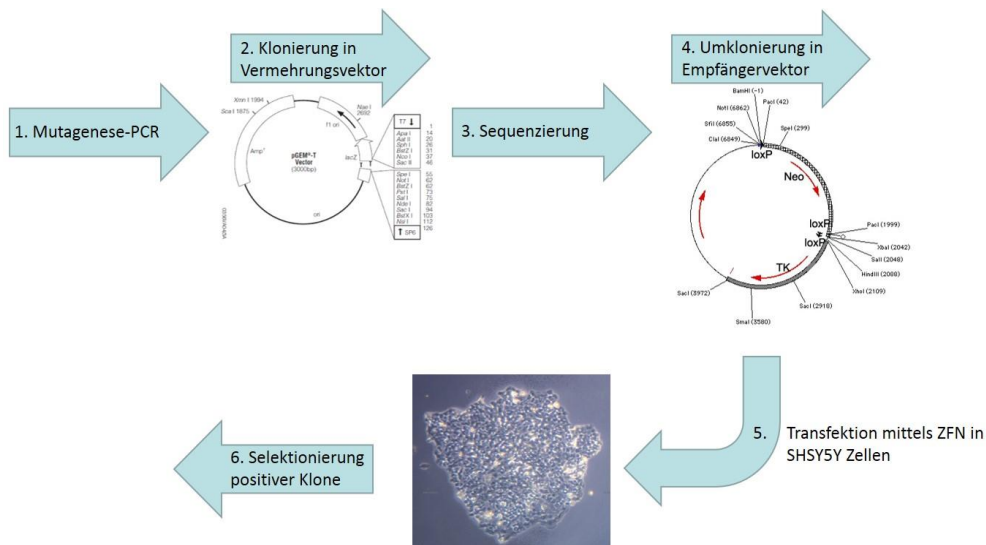
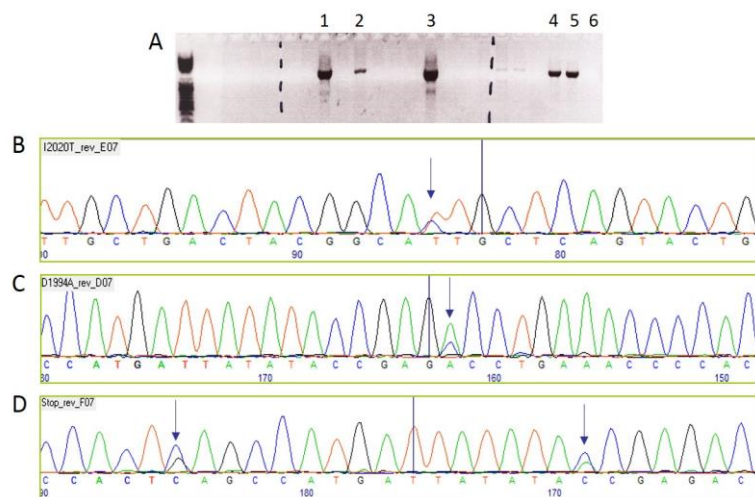


Abbildung 4.6.2: Strategie zur Klonierung des homologen Konstruktes und Generierung von genetisch veränderten SHSY5Y-Zellen Dieses Flusschema veranschaulicht in vereinfachter Weise die einzelnen Klonierungsschritte, die Transfektion der SHSY5Y-Zellen mit dem Zinkfinger bis hin zur Selektion positiver Zellklone. Im ersten Schritt wurde über eine Mutagenese-PCR die gewünschte genetische Veränderung im *LRRK2*-Gen generiert. Zur Vermehrung dieser Mutation wurde dieses PCR-Produkt in einen Vermehrungsvektor (pGEM®) einkloniert. In einem nächsten Schritt erfolgte die Umklonierung dieser Mutation in den Empfängervektor (pEasyFloXII). Dieser wurde nach Überprüfung der korrekten Basenabfolge im *LRRK2*-Gen über eine Lipofektion in die Empfängerzellen (SHSY5Y) mit Hilfe eines Zinkfingers über homologe Rekombination eingebaut und über eine Neomycinresistenz im Zellmedium selektioniert.

Die Integrations-PCR (Abb. 4.6.3A) zeigt positive Banden für einige getestete SHSY5Y-Zellklone, welche die Antibiotikabehandlung im Medium gut überlebt haben (Abb. 4.6.3 A 1, 2, 3 und 4). Ebenso deutlich zu erkennen ist, dass bei weitem nicht alle überlebenden Zellen auch ein positives Integrationssignal in der PCR zeigen. Von erstmals 22 getesteten Zellklonen waren ausschließlich 4 positiv. In der anschließenden Sequenzierung konnten die jeweiligen eingebauten Mutationen im *LRRK2*-Gen nachgewiesen werden (Abb. 4.6.3 B, C und D).



Ergebnisse

Abbildung 4.6.3: Nachweis der gewünschten Mutationen in den positiv selektionierten SHSY5Y-Zellen über Integrations-PCR und Sequenzierung **A** Agarose-Gelbild einer Integrations-PCR visualisiert mit Ethidiumbromid. Positive schwarze Signale sind mit den Ziffern 1, 2, 3 und 4 gekennzeichnet, 5 ist die Positivkontrolle und 6 die leere Negativkontrolle. **B** Elektroferrogramm eines positiven SHSY5Y-Zellklon mit integrierter heterozygoter I2020T-Mutation. **C** Elektroferrogramm eines positiven SHSY5Y-Zellklons mit heterozygot integrierter D1994A-Mutation und **D** Elektroferrogramm eines positiven SHSY5Y-Zellklon mit zwei heterozygot integrierten Stopp-Mutationen (TAA und TAG). Pfeile zeigen jeweils die veränderten Basen an.

Ein nächster Schritt war die Kontrolle der cDNA der positiven SHSY5Y-Zellklone. Erstaunlicherweise konnten hierfür keine sauberen Sequenzen für das Exon 41 von *LRRK2* generiert werden. An einer bestimmten Stelle im Exon 41 des *LRRK2*-Gens ist eine Basensequenzabfolge zu finden, in welcher ein häufiger Wechsel von Adenin und Thymin vorliegt (Abb. 4.6.4 A). Genau an dieser Stelle begann bei der Sequenzierung der cDNA ein „Hintergrundrauschen“ in der Sequenz (Daten nicht gezeigt). Durch die Wahl anderer Primer konnte aufgedeckt werden, dass bei den positiv selektionierten SHSY5Y-Zellklonen die Basenabfolge an dieser AT-reichen Region nicht mehr dem Wildtyp entsprach (Abb. 4.6.4 B, C und D). Entweder fehlte ein Adenin oder auch ein Thymin oder es fehlten mehrere A's allein und/oder T's (Abb. 4.6.4 B). Ebenso gab es Sequenzierungen von cDNA's, in welchen zusätzlich ein A oder T eingebaut wurde. Es gab zusammenfassend gesagt die unterschiedlichsten Variationen in der Sequenz von Exon 41 von *LRRK2* an dieser AT-reichen Region bei der Sequenzierung der cDNA der positiven SHSY5Y-Zellklone. Nach dem Screening von jeweils 50 positiven Klonen für jedes transfizierte Konstrukt (G2019S, I2020T, D1994A und Stopp-Mutation in *LRRK2*) ergab sich nicht ein einziger Zellklon, der an dieser AT-reichen Region im Exon 41 des *LRRK2*-Gens die gewünschte korrekte DNA-Basenabfolge aufwies. Jeder einzeln getestete Klon hatte in irgendeiner Form an dieser Position eine Mutation vorliegen und war somit für weiterführende Experimente unbrauchbar.

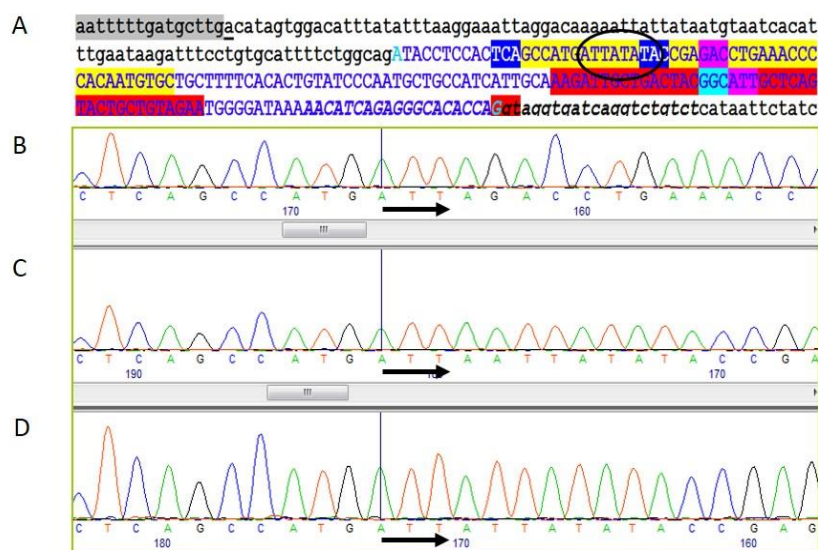


Abbildung 4.6.4: Basensequenzabfolge im *LRRK2*-Gen **A** Ausschnitt der Basensequenz vom Ende des Introns 40 in kleinen Buchstaben, dem Exon 41 in blauen großen Buchstaben und der Anfang des Introns 41 in kleinen Buchstaben vom *LRRK2*-Gen. Mit der Ellipse wird eine Region gekennzeichnet, welche besonders AT-reich ist. In

Ergebnisse

grau, gelb und rot unterlegt sind bestimmte Primersequenzen gekennzeichnet, die dem Anhang entnommen werden können. **B**, **C** und **D** Elektroferrogramme des Exon 41 von *LRRK2* aus cDNA verschiedener positiver SHSY5Y-Zellklone. Die Pfeile markieren den Beginn der AT-reichen Region in Exon 41. Vergleicht man die drei Sequenzierungen mit der Originalsequenz in **A** erkennt man, dass dort jeweils die Basenabfolge verändert vorliegt. Entweder fehlen mehrere Basen oder es sind Zusätzliche eingebaut.

Dieses Ergebnis führte zu der Fragestellung, ob die SHSY5Y-Zellen für die homologe Rekombination mittels Zinkfinger ungeeignet sein könnten und ob man den Versuch mit einer anderen Zelllinie wiederholen sollte. Dabei sei zu erwähnen, dass in einem parallelem Projekt einer anderen Dissertation (David Schöndorf, Hertie Institut für klinische Hirnforschung) mit denselben Konstrukten gearbeitet wurde, welche über die gleiche Technik in iPS-Zellen transfiziert wurden. Im Gegensatz zu den SHSY5Y-Zellen integrierten die iPS-Zellen das gewünschte DNA-Fragment an der richtigen Position im Exon 41 des *LRRK2*-Gens ohne dabei die Basenabfolge in der AT reichen Region zu verändern. Es schien also nicht am Konstrukt zu liegen, sondern an der gewählten Zelllinie.

Daher wurde das ganze Prozedere der Transfektion mit dem Zinkfinger und der Selektion über ein Antibiotikum im Medium nochmals mit HEK-Zellen durchgeführt. Ebenfalls wurden pro Konstrukt ca. 50 positive Zellklone auf die Richtigkeit der Integration überprüft. Jedoch musste auch hier festgestellt werden, dass die HEK-Zellen genau an derselben AT-reichen Region im Exon 41 des *LRRK2*-Gens Mutationen einbauten, die zu einer Veränderung der korrekten Basenabfolge führten und somit für weiterführende Versuche unbrauchbar waren.

Lediglich ein SHSY5Y-Zellklon, der das Konstrukt mit einer heterozygoten Stopp-Mutation aufgenommen hatte, zeigte auf dem anderen Allel eine Veränderung der Basenabfolge in der AT reichen Region, welche zu einem *frameshift* führte und in dessen Folge später zu einem Stopp-Kodon. Für einen vollständigen *knock-out* von *LRRK2* mussten ohnehin beide Allele ein Stopp-Kodon aufweisen, damit kein *LRRK2* mehr translatiert werden konnte. Um zu überprüfen, ob dieser SHSY5Y-Zellklon tatsächlich kein *LRRK2* mehr exprimiert, wurde ein Western-Blot angefertigt (Abb. 4.6.5).

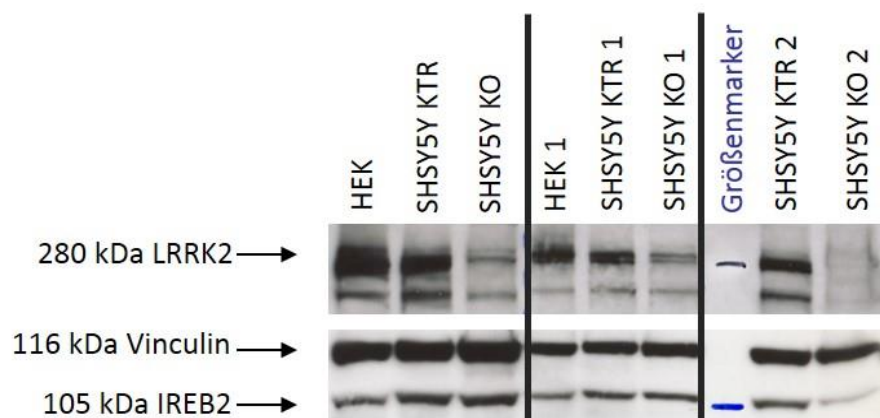


Abbildung 4.6.5: Western-Blot zur Detektion von LRRK2 und IREB2 verschiedener Zelllysate Dieser Western-Blot wurde angefertigt, um die Expression von LRRK2 in den verschiedenen Zelllysaten zu vergleichen. Hierfür wurden im linken Blot zunächst 60µg Protein von HEK-Zellen (Wildtyp), SHSY5Y-Zellen (Wildtyp) und dem

Ergebnisse

generierten SHSY5Y-Zellklon, welcher zwei Stopp-Mutationen aufwies (KO) aufgetragen. Dasselbe wurde mit 30µg Protein (Blot Mitte) wiederholt. Im rechten Blot sind nochmals 60µg Protein von SHSY5Y-Zellen (Wildtyp) und dem vermeintlichen *knock-out* SHSY5Y-Zellen aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist eine wesentlich geringere Expression von LRRK2 in den SHSY5Y-Zellen, welche die zwei Stopp-Mutationen integriert haben. Jedoch scheint es kein völliger *knock-out* von LRRK2 zu sein, da noch ein Restsignal erkennbar ist (wenngleich man es aus dem rechten Blot annehmen könnte). Die Ladekontrolle Vinculin zeigt gleichmäßig aufgetragene Proteinproben. Die Expression von IREB2 scheint in HEK-Zellen geringer als in SHSY5Y-Zellen zu sein, jedoch zeigt sie keinen Unterschied zwischen den SHSY5Y-Wildtyp-Zellen und den SHSY5Y-Zellen mit dem LRRK2 *knock-down*.

In Reihe 1-3 wurden jeweils 60 µg Protein aufgetragen, in Reihe 4-6 jeweils 30 µg Protein und in den zwei rechten Bahnen jeweils 60 µg. Die Ladekontrolle Vinculin zeugt von einer gleichmäßigen Beladung des SDS-Gels. Detektiert wurde zum einen LRRK2 und zum anderen IREB2. Feststellend kann gezeigt werden, dass die SHSY5Y-Zellen, welche das Konstrukt mit der Stopp-Mutation auf einem Allel und dem *frameshift* auf dem anderen Allel enthalten, eine deutliche Reduktion des LRRK2 aufweisen im Vergleich zu unbehandelten SHSY5Y- und HEK-Zellen. Jedoch zeigen sie keinen völligen *knock-out* von LRRK2. Die Expression von IREB2 scheint auch bei stark reduzierter Expression von LRRK2 unbeeinträchtigt zu bleiben. Lediglich eine geringere IREB2-Expression in HEK-Zellen im Vergleich zu SHSY5Y-Zellen ist zu beobachten. In der letzten Reihe (Reihe 9) des Blots scheint es so auszusehen als sei keine LRRK2-Expression mehr vorhanden und die IREB2-Expression deutlich reduziert. Da es sich allerdings um eine Replikation des Versuches handelt und hier kein anderer Zellklon abgebildet ist, scheint dies ein Artefakt im Experiment zu sein.

4.7 LRRK2 – Fibroblasten / Neuronen und SHSY5Y-Zellprojekt

Aufgrund der Tatsache, dass es ziemlich unmöglich scheint mit einer normalen Zelllinie eine Integration des gewünschten Konstruktes über homologe Rekombination ins Genom dieser Zellen zu realisieren, ohne dass dabei unerwünschte Zusatzmutationen auftreten (insgesamt ca. 400 Zellklone analysiert), wurde für das geplante Projekt eine Alternative gesucht.

Erstens sollten nun Fibroblasten von G2019S *LRRK2*-Trägern mit gesunden, alters- und geschlechtsgematchten Kontroll-Fibroblasten für weitere Analysen herangezogen werden. Zweitens durfte auf bereits bestehende iPS-Zellen von Herrn Dr. Benjamin Schmid zurückgegriffen werden. Dabei handelte es sich um iPS-Zellen, welche von einem G2019S-*LRRK2*-Patienten stammten. Als Kontrolle hierfür gab es künstlich genkorrigierte iPS-Zellen von diesem Patienten (Abb. 4.6.1). Diese wurden über das Zinkfingerverfahren wie oben beschrieben generiert. Überdies wurde mit gesunden Kontroll-iPS-Zellen gearbeitet, welche als Pendant dazu künstlich über eine Zinkfingernuklease mit G2019S mutiert wurden. Nachdem diese iPS-Zellen zu Neuronen ausdifferenziert waren, wurden sie für weitere Versuche verwendet. Drittens sollten die geplanten Versuche ebenfalls mit den SHSY5Y-Zellen durchgeführt werden, welche einen *knock-down* von LRRK2 aufwiesen.

Der Versuchsplan sah wie folgt aus:

Ergebnisse

Jeweils vier verschiedene ausdifferenzierte Neuronen (G2019S und Kontrollen), Fibroblasten von vier G2019S-Mutationsträgern und vier Kontrollen sowie die SHSY5Y-Zellen mit dem *knock-down* für LRRK2 und SHSY5Y-Kontrollzellen wurden zu gleicher Zellzahl in 6-Well-Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden begann die Behandlung mit den verschiedenen Substanzen so wie in Abbildung 4.7.1 dargestellt.

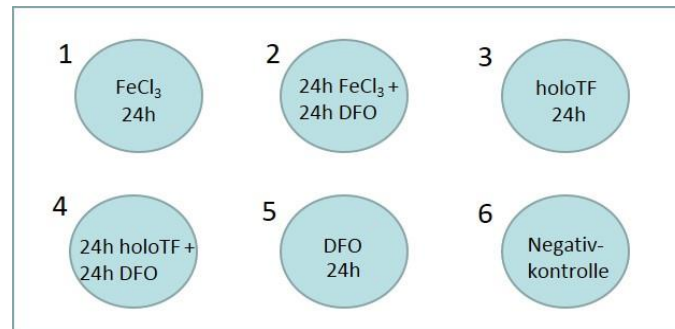


Abbildung 4.7.1: 6-Well-Platte mit Angabe diverser Behandlungen der Zellen. Dieser Abbildung kann entnommen werden, mit welchen verschiedenen Substanzen die Zellen inkubiert wurden. In Well Nummer **1** wurden alle Zellen 24 h mit FeCl₃ (1mM) behandelt. **2** Nach 24 h FeCl₃ bekamen die Zellen 24 h DFO (100µM) ins Medium. **3** Hier wurden die Zellen 24 h mit holo-Transferrin (60µg/ml) inkubiert. **4** Nach 24 h Inkubation mit holo-Transferrin erneute Inkubation der Zellen für 24 h mit DFO (100µM). **5** Hier wurden die Zellen 24 h ausschließlich mit DFO (100µM) inkubiert und **6** zeigt die unbehandelten Negativkontrollen.

Eine Verabreichung von FeCl₃ zum Nährmedium führt zu einem Überangebot von Eisen für die Zellen. Allerdings muss das dreiwertige Eisen noch an die Transferrinrezeptoren der Zellen binden, um das Eisen aufnehmen zu können. Durch die anschließende Zugabe von DFO wird überschüssiges Eisen gebunden und somit eine weitere vermehrte Eisenaufnahme verhindert. Zusätzlich wurden die Zellen mit holo-Transferrin behandelt. Holo-Transferrin ist ein bereits mit Eisen gesättigtes Glykoprotein, welches direkt an die Transferrinrezeptoren der Zellen binden kann und somit das Eisen sofort für die Zellen zugänglich macht. Ebenfalls nach 24 h wurde dieser Prozess durch die Zugabe von DFO unterbunden. Ein weiterer Ansatz sollte untersuchen, welche Konsequenzen bei einer reinen Behandlung mit DFO zu beobachten sind. Alle Zellen wurden nach der Behandlung mit den verschiedenen Substanzen engmaschig lichtmikroskopisch beobachtet. Eine auffallende „krisselige“ Strukturveränderung zeigte sich dabei bei Zellen, welche ausschließlich mit FeCl₃ behandelt wurden, unabhängig vom Zelltyp. Nach lösen und pelletieren dieser Zellen konnte eine rotbraune Färbung des Zellpellets festgestellt werden. Eine anschließende Behandlung der Zellen mit DFO führte zu einer Verbesserung dieser Strukturveränderung und die Zellpellets zeigten eine durchweg weiße Färbung, wie sie makroskopisch auch unbehandelt aussehen. Bei allen anderen verabreichten Substanzen war lichtmikroskopisch keine Veränderung zur unbehandelten Negativkontrolle feststellbar.

Nach der Behandlung wurde von allen Zellen die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und anschließend damit vergleichende Expressionsdaten für ausgewählte, am Eisenstoffwechsel beteiligte Gene (*DMT1*, *IREB2*, *HO-1*, *TFR1*, *Ferritin HC* und *LC*, *FP-1*, *HEPH*

und *HIF1A*) mit Hilfe der Real-Time-PCR erhoben. Die Daten wurden dabei für alle Eisenstoffwechselgene auf die die Housekeeping-Gene *SDHA* und *TBP* normalisiert.

4.7.1 Fibroblasten

In Abbildung 4.7.2 A-I sind die mittleren normalisierten Expressionsdaten der ausgewählten Gene für die G2019S-Fibroblasten und den jeweiligen Kontroll-Fibroblasten dargestellt. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die Behandlung mit den jeweiligen Komponenten bei fast allen Genen eine ähnliche Reaktion bei den G2019S-Fibroblasten und den Kontroll-Fibroblasten hervorruft. So scheint die Prozedur die Expression der Gene *DMT1* (B), *Ferroportin-1* (E), *Hephaestin* (F), *HIF1A* (G) und *IREB2* (H) bei den G2019S-Fibroblasten und den Kontroll-Fibroblasten gleichermaßen zu beeinflussen, sodass dort keine signifikanten Unterschiede zwischen den genetisch verschiedenen Fibroblasten zu verzeichnen sind. Nichts desto trotz ist erkennbar, dass die Behandlung mit den diversen Komponenten an sich im Vergleich zur Negativkontrolle durchaus signifikante Reaktionen in der Expression bestimmter Gene widerspiegeln. So ist beispielsweise deutlich zu erkennen, dass die Genexpression von *Ferroportin-1* nach einer 24h Inkubation mit DFO (Abb. 4.7.2 E) bei beiden Fibroblasten Typen signifikant erniedrigt ist im Vergleich zur Negativkontrolle. Allerdings soll das Hauptaugenmerk auf dem Vergleich der genetisch verschiedenen Zellen liegen, daher wird dies hier nur kurz erwähnt (signifikante Unterschiede innerhalb derselben Zelllinie wurden deshalb nicht mit Sternchen gekennzeichnet). Im Gegensatz dazu scheint es ebenso Gene zu geben (*IREB2*), welche von der ganzen Behandlungsprozedur scheinbar unberührt bleiben und kaum Schwankungen in ihrer Expression zeigen (Abb. 4.7.2 H). Im Weiteren werden nun die Unterschiede in der Genexpression zwischen den verschiedenen Fibroblasten für die vier Gene näher beschrieben, in denen signifikante Veränderungen nachweisbar waren.

Die Genexpression vom Transferrinrezeptor-1 (Abb. 4.7.2 A) ist nach einer Inkubation von 24h mit FeCl_3 und auch nach einer anschließenden 24h Inkubation mit DFO bei den G2019S-Fibroblasten signifikant hochreguliert im Vergleich zu den Kontrollen. Im Gegensatz dazu resultiert die Behandlung mit 24h holo-Transferrin und anschließender 24h DFO Inkubation zu einer signifikanten Runterregulation des *TFR1*-Gens bei den G2019S-Fibroblasten.

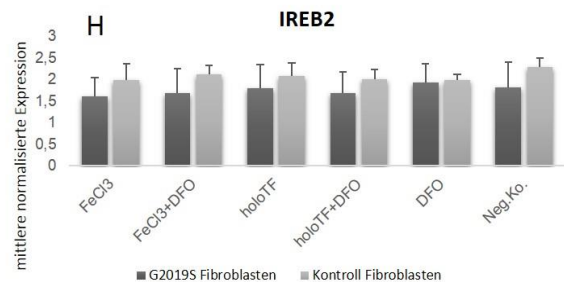
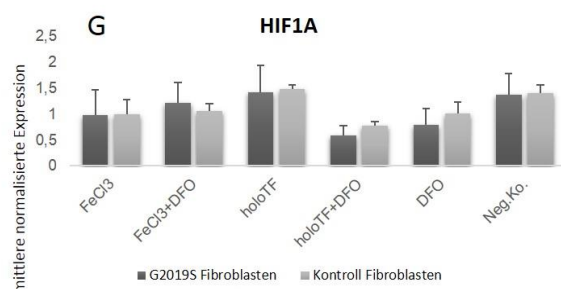
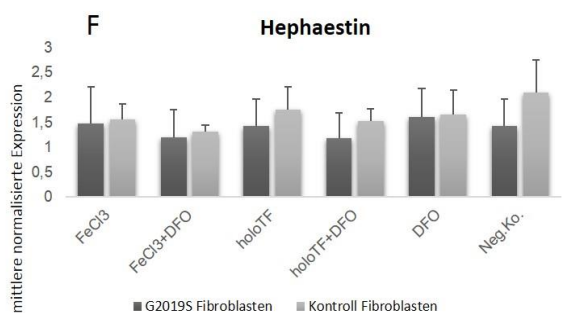
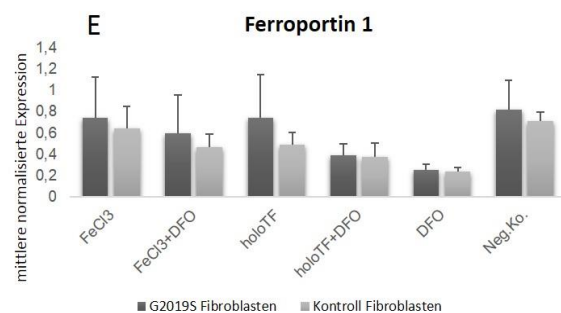
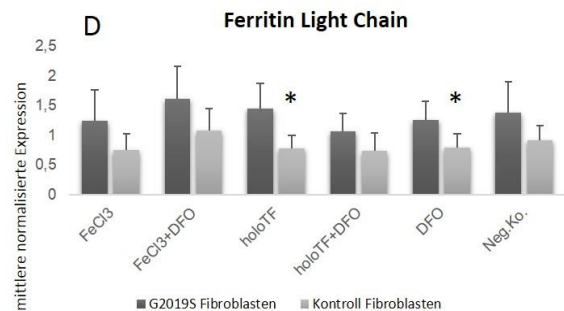
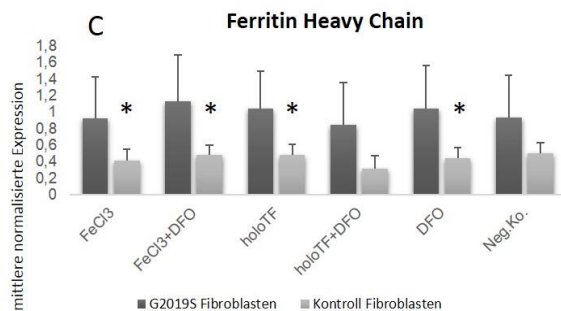
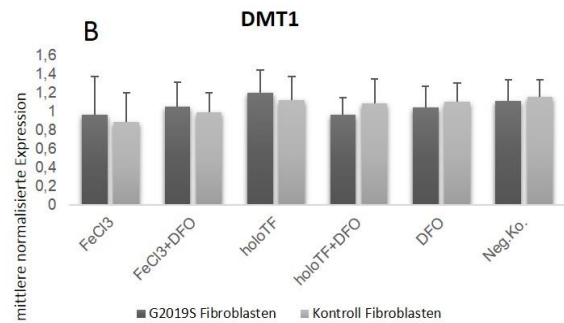
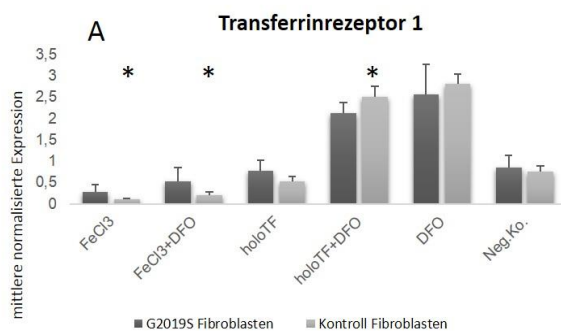
Die Genexpression der schweren Kette vom Ferritin (Abb. 4.7.2 C) ist bei den G2019S-Fibroblasten in allen ausgewählten Behandlungen signifikant hochreguliert (außer nach Behandlung mit holoTf+DFO aufgrund der STABW) im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten. Auch bei der Genexpression der leichten Kette vom Ferritin (Abb. 4.7.2 D) sieht man die Tendenz der Hochregulation bei den G2019S-Fibroblasten in allen Bedingungen, wobei ausschließlich die Behandlung mit 24 h holoTF und die 24h Inkubation mit DFO signifikante Ergebnisse zeigen.

Für das Gen *HO-1* ist deutlich erkennbar, dass die Genexpression durch die diversen Inkubationen im Vergleich zur Negativkontrolle bei beiden Fibroblasten Typen stark beeinflusst ist (Abb. 4.7.2 I). Die Behandlung mit 24h FeCl_3 führt zu einer sehr starken

Ergebnisse

Hochregulation des *HO-1-Gens* bei den G2019S-Fibroblasten, welche sich signifikant von der Expression der Kontrollen unterscheidet. Ebenso nach einer Behandlung mit 24h FeCl₃ + 24h DFO.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass unabhängig vom Fibroblasten Typ, bestimmte Gene ähnliche Veränderungen aufgrund der verschiedenen Behandlungen zeigen. Darüber hinaus gibt es aber auch Gene, welche signifikant unterschiedliche Expressionen in Reaktion auf die verschiedenen Behandlungen bei G2019S-Fibroblasten und den Kontroll-Fibroblasten aufweisen.



Ergebnisse

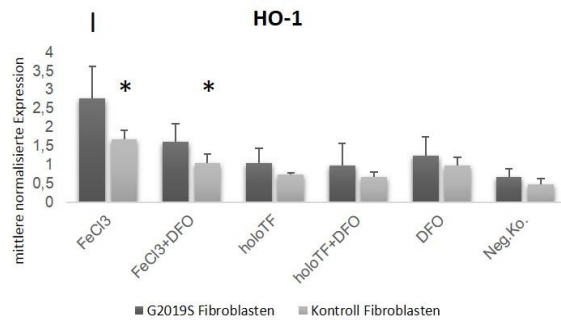


Abbildung 4.7.2: Expressionsdaten ausgewählter Gene nach Eisenbehandlung der Fibroblasten In dieser Abbildung sind die mittleren normalisierten Expressionen dargestellt vergleichend von Fibroblasten, welche von G2019S-Patienten (dunkelgraue Balken) und welche von gesunden Kontrollpersonen (hellgraue Balken) stammen. Beide Zelltypen wurden gleichermaßen mit diversen Substanzen in eine Art Eisenstresssituation versetzt. Anschließend wurden die Expressionen der Gene **A Transferrinrezeptor-1**, **B DMT1**, **C Ferritin (HC)**, **D Ferritin (LC)**, **E Ferroportin-1**, **F Hephaestin**, **G HIF1A**, **H IREB2** und **I HO-1** gemessen. Signifikant unterschiedliche Expressionen zwischen den Fibroblastentypen sind mit einem * markiert.

4.7.2 SHSY5Y-Zellen

In Abbildung 4.7.3 A-G sind die mittleren normalisierten Expressionsdaten der ausgewählten Gene für die SHSY5Y-Zellen (LRRK2 *knock-down* und Kontrollen) grafisch dargestellt. Wie auf den ersten Blick auffällt, verhalten sich die genetisch verschiedenen SHSY5Y-Zellen anders als die vorher verwendeten Fibroblasten. Die Expressionen aller gemessener Gene zeigen in irgendeiner Form signifikante Unterschiede zwischen den LRRK2 *knock-down* SHSY5Y-Zellen und den Wildtypzellen bei verschiedenen Behandlungsbedingungen (Abb. 4.7.3 A-G).

Der *knock-down* von LRRK2 in den SHSY5Y-Zellen scheint somit einen Einfluss auf die genetischen Stressantworten einer Eisenbehandlung zu haben.

Ergebnisse

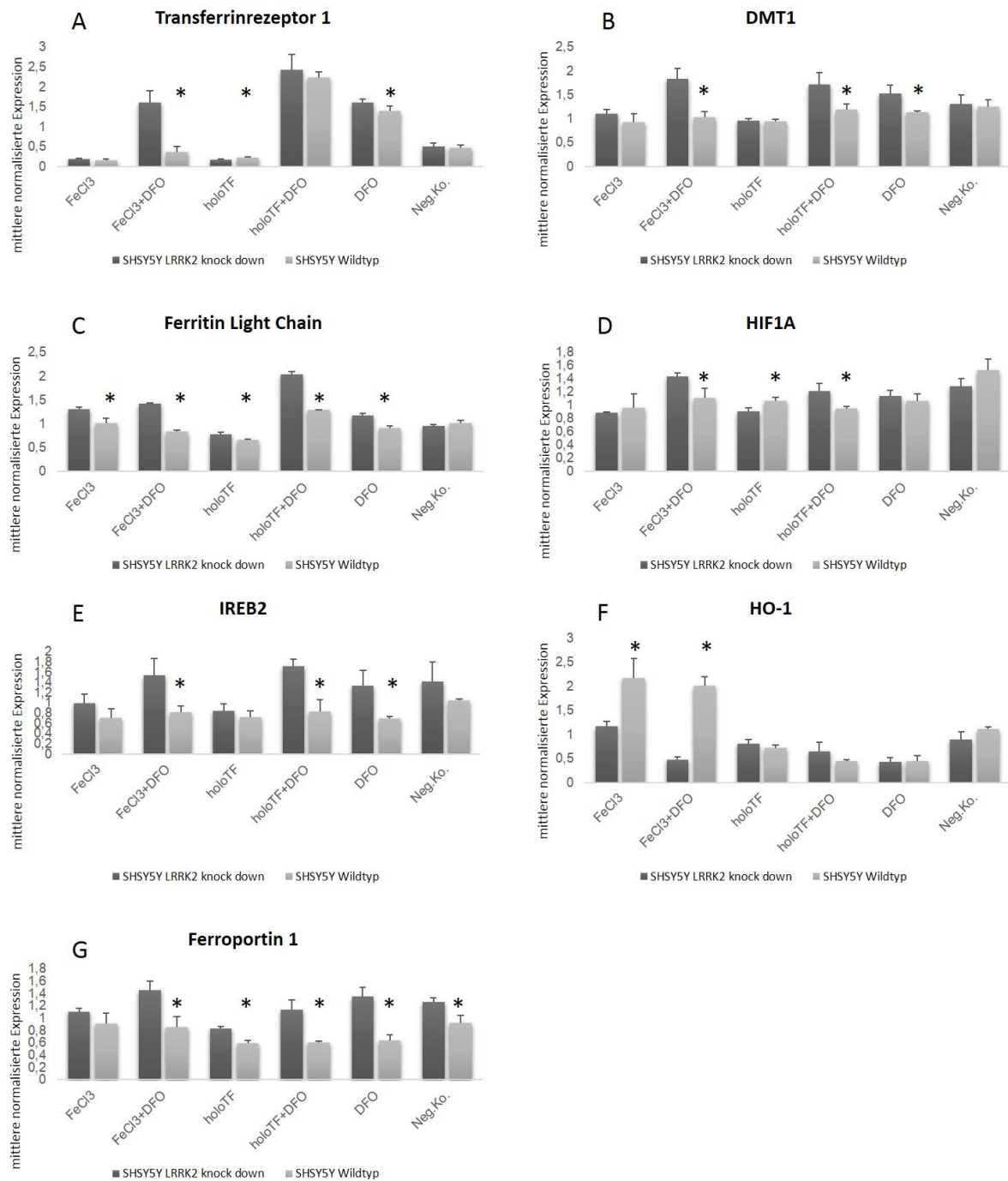


Abbildung 4.7.3: Expressionsdaten ausgewählter Gene nach Eisenbehandlung der SHSY5Y-Zellen In dieser Abbildung sind die mittleren normalisierten Expressionen dargestellt vergleichend von SHSY5Y-Zellen, welche einen *knock-down* für LRRK2 aufweisen (dunkelgraue Balken) und Wildtyp-SHSY5Y-Zellen (hellgraue Balken). Beide Zelltypen wurden gleichermaßen mit diversen Substanzen in eine Art Eisenstresssituation versetzt. Anschließend wurden die Expressionen der Gene **A** *Transferrinrezeptor-1*, **B** *DMT1*, **C** *Ferritin (LC)*, **D** *HIF1A*, **E** *IREB2*, **F** *HO-1* und **G** *Ferroportin-1* gemessen. Signifikant unterschiedliche Expressionen zwischen den SHSY5Y-Zelltypen sind mit einem * markiert.

Auffallend ist die Veränderung der Expression der leichten Kette von Ferritin (Abb. 4.7.3 C). In jeder Behandlungssituation erwies sich die Genexpression von Ferritin (leichte Kette) als signifikant erhöht bei den LRRK2 *knock-down* SHSY5Y-Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-

Ergebnisse

Zellen. Ebenso sieht es bei der Genexpression von *Ferroportin-1* aus, auch hier ist die Genexpression bei den LRRK2 *knock-down* Zellen in allen Behandlungssituationen signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (außer FeCl₃ Behandlung allein). Allerdings besteht diese erhöhte Expression bereits auch schon bei den unbehandelten Negativkontrollen (Abb. 4.7.3 G).

Besonders herausragend sind die Expressionen für *HO-1* (Abb. 4.7.3 F). Ganz deutlich erkennt man eine signifikante Runterregulation der LRRK2 *knock-down* SHSY5Y-Zellen für die zwei Inkubationsbehandlungen mit FeCl₃. Alle anderen Behandlungen scheinen keinen Einfluss auf die *HO-1* Expression zu haben. Diese Daten stehen im Kontrast zu den Expressionen von *HO-1* der G2019S-Fibroblasten. Ebenso hier reagierten sie ausschließlich in diesen beiden FeCl₃-Behandlungssituationen, allerdings in genau umgekehrter Form.

Verglichen mit den Wildtyp-SHSY5Y-Zellen zeigt sich für die LRRK2 *knock-out* SHSY5Y-Zellen, dass jede Zugabe von DFO zu einer signifikanten Hochregulation von *DMT1* (Abb. 4.7.3 B) und *IREB2* (Abb. 4.7.3 E) führt. Als letztes soll erwähnt werden, dass das Muster der Genexpression in Antwort auf eine Eisenbehandlung bzw. Entzug für die Gene *TFR1* (Abb. 4.7.3 A) und *HIF1A* (Abb. 4.7.3 D) für die behandelten SHSY5Y-Zellen ähnlich ausfällt. Sowohl eine 24h Behandlung mit FeCl₃ mit zusätzlicher 24h-Behandlung mit DFO als auch eine Behandlung mit DFO allein führt zu einer signifikanten Hochregulation dieser beiden Gene bei den LRRK2 *knock-down* Zellen. Eine alleinige 24 h-Inkubation mit holo-Transferrin führt im Gegensatz dazu bei beiden Genen zu einer signifikanten Runterregulation bei den LRRK2 *knock-down* SHSY5Y-Zellen im Vergleich zu dem Wildtyp.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die LRRK2 *knock-down* SHSY5Y-Zellen viele Unterschiede bezüglich der Regulation der gemessenen Eisengene im Vergleich zu den Wildtyp-SHSY5Y-Zellen aufweisen.

4.7.3 Neurone

In Abbildung 4.7.4 A-H sind die mittleren normalisierten Expressionsdaten der ausgewählten Gene für die G2019S-Neurone und ihre Kontroll-Neurone dargestellt.

Ergebnisse

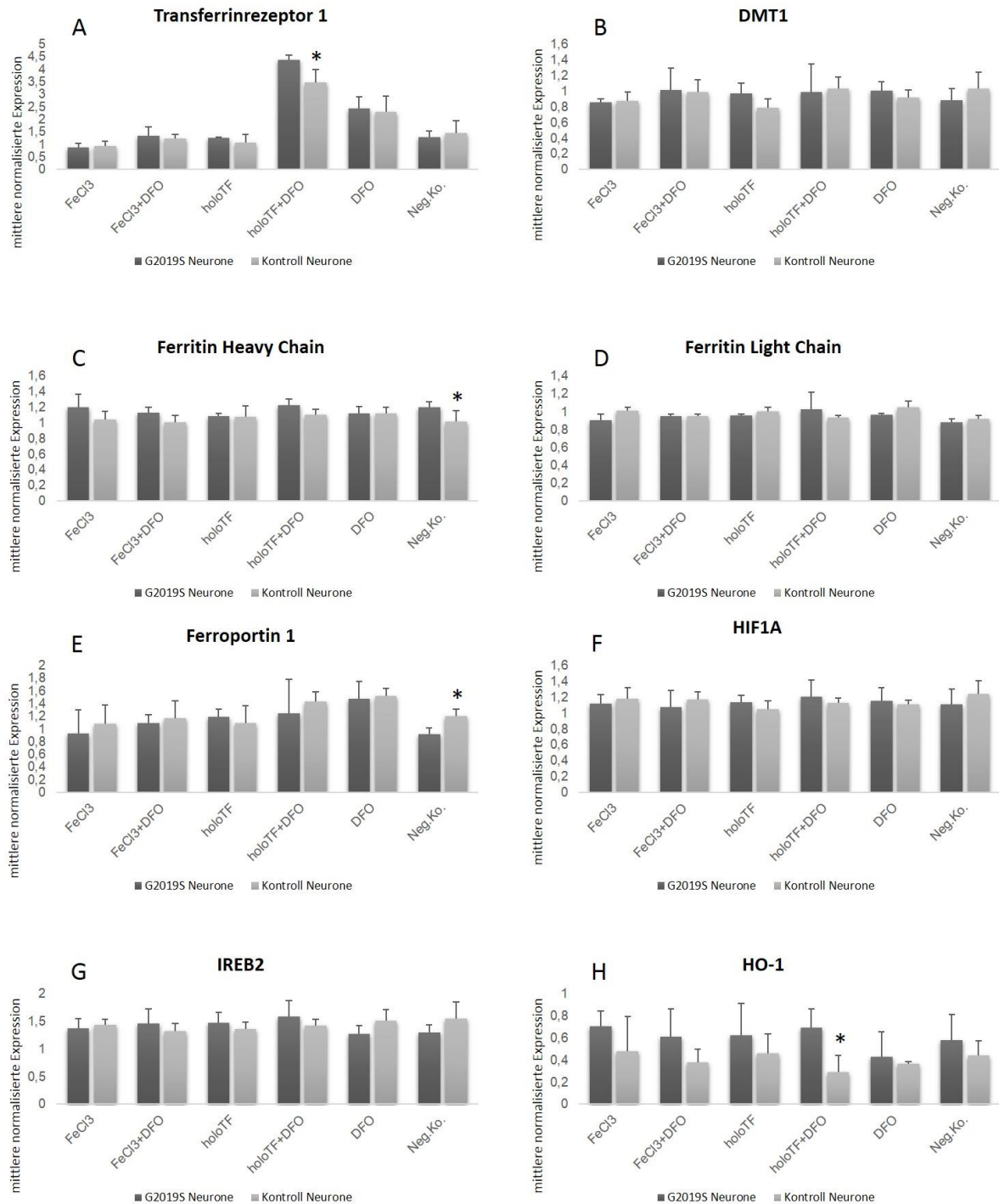


Abbildung 4.7.4: Expressionsdaten ausgewählter Gene nach Eisenbehandlung der Neurone In dieser Abbildung sind die mittleren normalisierten Expressionen dargestellt vergleichend von Neuronen, welche eine G2019S-Mutation tragen (dunkelgraue Balken) und welche eine Wildtypsequenz im *LRK2* aufweisen (hellgraue Balken). Beide Zelltypen wurden gleichermaßen mit diversen Substanzen in eine Art Eisenstresssituation versetzt. Anschließend wurden die Expressionen der Gene **A** *Transferrinrezeptor-1*, **B** *DMT1*, **C** *Ferritin (HC)*, **D** *Ferritin (LC)*, **E** *Ferroportin-1*, **F** *HIF1A*, **G** *IREB2* und **H** *HO-1* gemessen. Signifikant unterschiedliche Expressionen zwischen den Neuronentypen sind mit einem * markiert.

Die G2019S-Neurone und ihre Kontrollen zeigen nach jeder Behandlung sehr ähnliche Veränderungen in der Expression der gemessenen Eisengene. Sie unterscheiden sich nur

selten signifikant bei einzelnen untersuchten Bedingungen (*TFR1* und *HO-1* bei Behandlung mit holoTF und DFO; Abb. 4.7.4 A und H), oder gar ausschließlich in den Negativkontrollen (Abb. 4.7.4 C und E). Allerdings zeigen die Behandlungen mit den diversen Komponenten an sich im Vergleich zur Negativkontrolle durchaus signifikante Reaktionen in der Expression bestimmter Gene, jedoch bei beiden Neuronen-Typen gleich ausgeprägt (wird nicht näher darauf eingegangen).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass eine Behandlung mit FeCl_3 , DFO und holo-Transferrin zur Induktion von Eisenstress in irgendeiner Form (Überschuss oder Entzug) zu kaum signifikanten Unterschieden in der Antwort der Genexpression ausgewählter Eisengene bei G2019S-Fibroblasten mit jeweiligen Kontrollen sowie den G2019-Neuronen mit jeweiligen Kontrollen führte. Anders verhielt es sich bei den SHSY5Y-Zellen. Hier gab es sichtlich signifikante Unterschiede in ihrer Regulation der gemessenen Eisengene in Antwort auf die Stresssituationen zwischen den Zelltypen (*LRRK2 knock-down* und Kontrollen).

4.8 Depression – RBD – Hyposmie - Kohortenvergleich

Insgesamt 47 Gene, davon 20 Gene aus dem Eisenstoffwechsel und 27 Blut-Hirnschranken-Gene (Genliste im Anhang, Tab. 9.2) wurden auf potentielle genetische Punktmutationen in drei verschiedenen Kohorten untersucht. Die erste Kohorte umfasste 27 Parkinson-Patienten, welche vor ihrer Erkrankung ausschließlich an einer Hyposmie litten. In die zweite Kohorte wurden 15 Parkinson-Patienten rekrutiert, welche vor ihrer Erkrankung an einer Depression litten und in der dritten Kohorte 15 Patienten, welche eine REM-Schlafstörung vor ihrer Parkinson-Erkrankung hatten (Kohortenübersicht gerne auf Nachfrage). Durch die Einteilung der Patienten in diese drei klinischen Gruppen sollte untersucht werden, ob es genetische Gemeinsamkeiten in den erwähnten Genen einer klinischen Gruppe gibt, welche sich als genetische Marker herauskristallisieren und somit in die Diagnostik mit einbezogen werden könnten.

Bei der Auswertung wurde das erste Augenmerk auf gemeinsame Punktmutationen innerhalb einer klinischen Gruppe gelegt. Im zweiten Schritt wurde überprüft, wie häufig diese Punktmutationen in der Gesamtbevölkerung auftreten. Handelte es sich um Veränderungen in autosomal rezessiven Genen, wurden Allelfrequenzen bis zu 1 % in der Gesamtbevölkerung akzeptiert. Bei Veränderungen in autosomal dominanten Genen sollten Allelfrequenzen von 0,1 % nicht überschritten werden. Genetische Veränderungen, die über diesen festgelegten Allelfrequenzen lagen, wurden nicht berücksichtigt, da sie über diesen Grenzwerten zu häufig in der normalen gesunden Bevölkerung auftreten, als dass diese Veränderungen als potentiell krankheitsweisend einzuschätzen wären. Ebenso wurde auch keine besonders seltene genetische Veränderung in Betracht gezogen, welche ausschließlich bei einem Patienten auftrat, da mit dieser Untersuchung gruppenspezifische genetische Marker identifiziert werden sollten.

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Analyse blieben keine gemeinsamen genetischen Veränderungen in einer klinischen Gruppe übrig, welche bei mehreren Patienten zu finden waren. Allerdings soll erwähnt werden, dass in der Hyposmie-Kohorte der SNP rs1800562 im *HFE*-Gen, welcher auf Proteinebene zu einer Veränderung von C zu Y an Position 282 führt, bei drei Patienten nachweisbar war. Diese Veränderung wird trotz einer Allelfrequenz von 6,4 % (Exome Variant Server) kurz aufgeführt, weil dieser SNP schon häufiger mit Parkinson in Verbindung gebracht wurde (Berg, et al. 2006; Borie, et al. 2002; Dekker, et al. 2003; Nandar and Connor 2011; Xia, et al. 2015), wenn gleich drei Patienten von 27 aus der Hyposmie-Gruppe nicht ausreichen, um diesen SNP als einen genetischen Marker bezeichnen zu können. In den anderen beiden Kohorten gab es jeweils nur einzelne seltene genetische Veränderungen, sodass auch dort kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einem genetischen Marker und dem Symptom Depression bzw. RBD besteht.

5

Diskussion

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung in der heutigen Gesellschaft (Thomas and Beal 2007). Die Grundlagen seiner Pathogenese sind jedoch nur bruchteilhaft verstanden. Eine mögliche Ursache, welche zum Untergang der dopaminergen Neuronen der Substantia nigra diskutiert wird, ist eine vermehrte Eisenablagerung in diesen neuromelaninhaltigen Zellen, wenngleich nicht eruiert werden kann, ob dies eine primäre Ursache darstellt oder als Nebenphänomen im Krankheitsgeschehen entsteht. Die erhöhten Eisenkonzentrationen können durch die Begünstigung der freien Radikalbildung den Prozess der Neurodegeneration über oxidativen Stress beschleunigen (Berg, et al. 2006; Rouault and Cooperman 2006; Zecca, et al. 2004b).

Die Fragestellung, welchen Beitrag Eisen in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielt, sollte im Rahmen dieser Arbeit an ausgewählten Themen bearbeitet werden. Dafür wurden sowohl genetische Analysen durchgeführt als auch funktionelle Assays angewendet.

5.1 Ergebnisse der *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)-Analysen

5.1.1 *MDR1*

Das *MDR1*-Gen kodiert für einen aktiven, sehr effizienten Efflux-Transporter (P-Glycoprotein, P-gp) in der Blut-Hirn-Schranke (BBB) (Dallas, et al. 2006). Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass bei Parkinson-Erkrankten eine Dysfunktion des P-gp, im Sinne einer reduzierten Aktivität, vorliegt (Kortekaas, et al. 2005; Bartels, et al. 2008b). Daher wurde der Fragestellung nachgegangen, ob sich diese verminderte Aktivität des P-gp auf eine genetische Veränderung im *MDR1*-Gen zurückführen lässt. Überdies scheinen drei SNPs im *MDR1*-Gen in der chinesischen Bevölkerung mit der Parkinson-Erkrankung assoziiert (Lee, et al. 2004a) vorzuliegen und ein bestimmter Haplotyp im *MDR1*-Gen soll sogar protektiv im Falle eines Parkinsons sein (Tan, et al. 2005).

Zu diesem Zweck wurden 8 nicht synonyme, kodierende SNPs, sowie zwei synonyme SNPs im *MDR1*-Gen bei 300 Parkinson-Patienten und 302 Kontrollen mit Hilfe der *SNaPshot*[®]-Methode untersucht. Um eine möglichst homogene Gruppe von Parkinson-Patienten zu untersuchen, wurde darauf geachtet, dass alle eine Hyperechogenität der SN aufwiesen.

Für keinen der untersuchten Loci konnte eine Assoziation mit einem gewissen Genotyp und der Parkinson-Erkrankung nachgewiesen werden. Ebenso brachte eine Stratifizierung nach Alter kein einschlägiges Ergebnis (Funke, et al. 2009a). Somit konnte die beschriebene Assoziation der drei SNPs im *MDR1*-Gen mit der Parkinson-Erkrankung in der chinesischen Bevölkerung in unserer deutschen Kohorte von Parkinson-Patienten nicht repliziert werden, was darauf hindeutet, dass diese Assoziation wahrscheinlich nur in bestimmten ethnischen Bevölkerungsgruppen zu finden ist und nicht generell bei Parkinson-Patienten weltweit. Die Kollegen um Bartels (Bartels, et al. 2008a) konnten in frühen Stadien der Parkinson-

Erkrankung keine Beeinträchtigung der Funktion des P-gp feststellen. Dies deutet darauf hin, dass die verminderte Aktivität von P-gp im Verlauf der Parkinson-Erkrankung nicht primär durch eine genetische Veränderung entsteht, sondern einen Teil des neurodegenerativen Prozesses darstellt.

Eine weitere mögliche Assoziation eines gewissen Genotyps im *MDR1*-Gen und der Parkinson-Erkrankung wurde durch die Exposition von Pestiziden erklärt (Drozdik, et al. 2003; Liu, et al. 2013; Zschiedrich, et al. 2009). Demnach gab es eine signifikante Assoziation zwischen Parkinson-Patienten, welche früher Pestiziden ausgesetzt waren mit einem gewissen Genotyp an diesem SNP (C3435T). Möglicherweise scheint hier eine Verbindung zwischen genetischen Prädispositionen und Umweltfaktoren zusammen zu kommen. In einer neueren Studie konnte diese Assoziation jedoch nicht bestätigt werden, wenngleich die ethnischen Hintergründe mit den Vorgängerstudien nicht vergleichbar sind (Kiyohara, et al. 2013).

Schlussfolgernd kann zusammengefasst werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten genetischen Variationen im *MDR1*-Gen keinen Hinweis auf eine Assoziation mit der Parkinson-Erkrankung ergaben. Allenfalls scheint ein Genotyp an einem gewissen SNP (C3435T) mit der Parkinson-Erkrankung assoziiert vorzuliegen, wenn eine vorangegangene Pestizidexposition stattgefunden hat (Drozdik, et al. 2003; Liu, et al. 2013; Zschiedrich, et al. 2009). Für eine Beurteilung, ob dies auch bei der hier untersuchten Kohorte nachzuweisen war, fehlen detaillierte Patienten-Angaben.

5.1.2 HO-1

Das Schlüsselenzym im Häm-Katabolismus ist die Hämoxygenase-1 (HO-1) (Shibahara 1994). Studien von Schipper und Kollegen konnten HO-1 in den Lewy-Körperchen bei Parkinson-Patienten nachweisen, sowie eine starke Überexpression von HO-1 in den Astrozyten der Substantia nigra (Schipper, et al. 1998). Daher scheint das Gen *HO-1* eventuell bei der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung eine Rolle zu spielen.

In der Promotorregion dieses Gens befindet sich ein polymorpher (GT)_n-Repeat-Polymorphismus, welcher in seiner Relevanz für die Parkinson-Erkrankung bisher nur in einer sehr kleinen Kohorte von Parkinson-Patienten untersucht wurde (Kimpara, et al. 1997), ohne dabei eine Assoziation eines bestimmten Allels mit der Erkrankung nachzuweisen. Daher sollte dieser polymorphe (GT)_n-Repeat in einer wesentlich größeren Studienpopulation auf eine mögliche Assoziation mit der Parkinson-Erkrankung untersucht werden. Dafür wurden 827 Parkinson-Patienten und 814 Kontrollen mit Hilfe einer Fragmentlängenanalyse in dieser Region untersucht. Wie auch bei Kimpara und Kollegen (Kimpara, et al. 1997) erwies sich diese Region als äußerst polymorph mit Allelen unterschiedlichster Repeatanzahl. Jedoch konnte keine Assoziation zwischen einem bestimmten Allel und der Parkinson-Erkrankung nachgewiesen werden (Funke, et al. 2009b).

Zusätzlich wurden drei kodierende, nicht synonyme SNPs mittels SNaPshot®-Analyse überprüft. Auch hier ließ sich keine Assoziation zwischen einem bestimmten Genotyp und der Parkinson-Erkrankung nachweisen (Funke, et al. 2009b).

Überdies ist bekannt, dass in sporadischen Alzheimer-Patienten die Expression von *HO-1* im peripheren Blut signifikant niedriger ist als bei Kontrollpersonen (Schipper 2000). Daher sollten auch die Expressionslevel von *HO-1* bei Parkinson-Patienten und Kontrollen im peripheren Blut untersucht werden. Diese erwiesen sich bei Parkinson-Patienten als nicht signifikant niedriger im Vergleich zu Kontrollpersonen (Funke, et al. 2009b). Dem gegenüber steht die erhöhte Expression von *HO-1* in den Astrozyten der SN bei Parkinson-Patienten (Schipper, et al. 1998). Die Unterschiede in der *HO-1* Expression sind demnach gewebspezifisch.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen keinen Hinweis auf eine genetische Beteiligung von *HO-1* am Krankheitsgeschehen der Parkinson-Erkrankung ergaben. Dies schließt jedoch keinesfalls aus, dass auf funktioneller Ebene oder in spezifischen Geweben eine Beteiligung von *HO-1* am zellulären Untergang der dopaminergen Neuronen nachzuweisen wäre. So behauptet beispielsweise Schipper und Kollegen, dass die Prozesse einer übermäßigen Eisenablagerung, oxidativer Stress, eine mitochondriale Insuffizienz und Makroautophagie als eine einheitliche neurohistopathologische „Läsion“ in vielen neurodegenerativen Erkrankungen angesehen werden sollte. Diese Prozesse könnten durch eine Überexpression von *HO-1* in den Astrogliazellen begründet werden (Schipper and Song 2015; Schipper 2004b). Hinweise dafür gewann er aus den Ergebnissen diverser Tiermodelle und Zellkulturexperimenten. Andere Studien mit Mausmodellen sprechen eher dafür, dass, durch die Verhinderung der von MPTP ausgelösten Neurotoxizität (Youn, et al. 2014), *HO-1* einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines Morbus Parkinson ausübt.

5.1.3 *IREB2*

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Eisenhomöostase ist *IREB2* (*IRP2*) unabdingbar (Rouault 2006). Genetische Veränderungen in *IREB2* könnten somit einen Einfluss auf die Eisenregulation ausüben und möglicherweise zur Pathogenese der Eisenakkumulation in der SN beim Morbus Parkinson beitragen. Für Alzheimer-Patienten konnte in einer vorläufigen Studie eine Assoziation zwischen bestimmten Allelen im *IREB2*-Gen mit der Erkrankung nachgewiesen werden (Coon, et al. 2006). Daher wurden dieselben SNPs aus der Studie von Coon und Kollegen, welche eine Assoziation mit Alzheimer zu haben schienen, in 300 Parkinson-Patienten und 301 Kontrollpersonen mit Hilfe von *High Resolution Melting* analysiert. Es ließ sich keine Assoziation zwischen einem bestimmten Allel und der Parkinson-Erkrankung nachweisen. Da es keine Folgestudie von Coon und Kollegen gibt, welche die ursprüngliche Assoziation eines gewissen Allels in *IREB2* mit der Alzheimer-Erkrankung

bestätigt, ist sie möglicherweise nicht replizierbar und durch die geringe Studienpopulationsgröße von Coon und Kollegen erklärbar.

Jedoch bleibt IREB2 ein sehr interessanter Kandidat in der Beteiligung an der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung, da beispielsweise im 5' - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein ein IRE identifiziert wurde (Friedlich, et al. 2007), welches potentiell mit IREB2 zu interagieren scheint und somit die Translation von alpha-Synuklein in Abhängigkeit der Eisenkonzentration regulieren könnte (Daten selbst erhoben). Interessanterweise scheint ein solches IRE auch im 5' - UTR Bereich der mRNA von APP lokalisiert zu sein (Rogers, et al. 2002), was darauf hindeutet, dass IREB2 eine regulierende Rolle in mehreren neurodegenerativen Erkrankungen haben könnte, welche wiederum einer Eisenabhängigkeit unterliegen.

Heute würde man der Fragestellung, ob genetische Veränderungen im kodierenden Bereich bestimmter Gene mit einer Krankheit assoziiert vorliegen, mit ganz anderen Techniken nachgehen, als es in dieser Arbeit getan wurde. Analysen wie *SNaPshot*[®] oder *High Resolution Melting* bzw. auch Verdaue, wie sie 2007 zu Beginn dieser Arbeit durchaus üblich waren, werden immer mehr durch Hochdurchsatzverfahren wie *Next Generation Sequencing* (NGS) abgelöst. Zum einen bekommt man damit wesentlich mehr Dateninformationen und zum anderen spart man viel Zeit. Jedoch muss weiterhin sorgfältig zwischen Kosten und Nutzen abgewägt werden, da NGS bis heute eine kostenintensive Methode darstellt und nicht jedes Labor über die dafür benötigten Geräte verfügt.

5.2 Ergebnisse der Expressionsdaten

Unterschiedliche Genexpressionen können eine Ursache für die Entwicklung verschiedenster Krankheiten sein. So ist denkbar, dass auch im Falle der Parkinson-Erkrankung differentiell exprimierte Gene einen Beitrag zur Pathogenese leisten könnten. Dafür wurde mit dem *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix) das Expressionsprofil aus peripherem Blut von 12 Parkinson-Patienten mit bekannter Hyperechogenität der SN mit 17 Kontrollen verglichen. Dabei stellten sich 266 Gene als differentiell reguliert dar. Zunächst wurden diese Rohdaten mit Hilfe der *Ingenuity*[®]-Software in verschiedene *Pathways* eingeordnet, um so potentiell interessant erscheinende Gene für eine anschließende Validierung auszuwählen. Insgesamt wurden neun Gene validiert, da sie beispielsweise im Eisenstoffwechsel wichtige Funktionen ausübten oder bei der Ubiquitinierung von Proteinen eine Rolle spielten. Von diesen neun Genen, ließen sich zwei mittels quantitativer Real-Time-PCR bestätigen, *SENP6* (*SUMO1/sentrin specific peptidase 6*) und *IREB2* (*Iron-responsive element-binding protein 2*), welche beide bei Parkinson-Patienten signifikant niedriger exprimiert vorlagen als in Kontrollen. Mit Hilfe einer zweiten, unabhängigen Kohorte von Parkinson-Patienten (n=20) und Kontrollen (n=20) ließen sich diese Ergebnisse nicht bestätigen.

Die Expression eines Gens kann von sehr vielen Störgrößen beeinflusst werden. So spielt beispielsweise der circadiane Rhythmus eine Rolle, weshalb darauf geachtet werden sollte, um welche Uhrzeit das Blut für die Analyse abgenommen wird. Aber auch Medikamenteneinnahme, die Tatsache ob jemand nüchtern ist oder bereits gefrühstückt hat, sportlich mit dem Fahrrad oder mit dem Auto angereist ist, können die Expressionen beeinflussen, um nur einige Punkte zu nennen. Da viele dieser Punkte nicht beeinflussbar sind, ist es umso wichtiger, dass man die Auswahl der Patienten für solche Analysen sehr sorgfältig trifft, um Störfaktoren so gering wie möglich zu halten. Darüber hinaus ist die Größe der ausgewählten Kohorten ebenso wichtig. Je mehr Patienten und Kontrollen für eine solche Studie zur Analyse herangezogen werden können, umso besser ist es für die Aussagen, die man am Ende einer solchen Studie treffen möchte.

Daher sollten die gewonnenen Daten dieser Expressionsstudie mit Vorsicht interpretiert und nicht überbewertet werden, da zum einen die Kohortengröße sehr gering ist und zum anderen die Parkinson-Patienten alle unterschiedliche Medikamente zur Therapie eingenommen haben als die Blutentnahme erfolgte. Zudem wurde das Blut in unterschiedlichen neurologischen Zentren Deutschlands abgenommen, was den Störfaktor erheblich in die Höhe treibt.

Für die Zukunft sollte eine solche Analyse mit wesentlich mehr Patienten und Kontrollen durchgeführt werden und wenn möglich darauf geachtet werden, dass einheitliche Prozesse in der Auswahl der Probanden und der Blutabnahme, sowie in der anschließenden Aufbereitung der RNA aus dem Blutproben eingehalten werden.

5.3 Einfluss von IREB2 auf die Pathogenese der Parkinson-Erkrankung

Wie bereits beschrieben, ist IREB2 (IRP2) für die Aufrechterhaltung der zellulären Eisenhomöostase unabdingbar, da es in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration die Translation von Ferritin und vom Transferrinrezeptor-1 posttranskriptional regulieren kann, indem es an sogenannte IRE's im untranslatierten Bereich der mRNA dieser Gene bindet und somit deren Translation inhibieren bzw. initiieren kann (Rouault 2006; Rouault 2013; Rouault and Cooperman 2006; Zecca, et al. 2004b). Wenngleich sich aus den genetischen Analysen kein konkreter Hinweis für eine Assoziation eines bestimmten Allels von *IREB2* mit der Parkinson-Erkrankung ergab und auch die Expressionsdaten, welche eine signifikant niedrigere Expression für *IREB2* bei Parkinson-Patienten zeigten, mit Vorsicht interpretiert werden sollten, ergaben sich weitere Hinweise dafür, dass IREB2 doch ein interessant bleibender Kandidat ist, welcher am Geschehen der Parkinson-Erkrankung beteiligt sein könnte.

5.3.1 Immundetektion und Immunhistochemie für IREB2

Da die Ergebnisse zur verringerten Expression von *IREB2* in peripheren Blut von Parkinson-Patienten nicht eindeutig validiert werden konnten, sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob sich geringere Proteinlevel von *IREB2* in Gehirngewebe von Parkinson-Patienten nachweisen ließen. Dafür wurde zum einen ein Western-Blot von *post mortem* Substantia nigra-Gewebe von Parkinson-Patienten und Kontrollen für *IREB2* angefertigt (durchgeführt von Jake Hoekstra im Labor von Prof. Jing Zhang, Seattle, da dort die Gewebeproben vorlagen). Zum anderen wurden Schnittpräparate von SN-Gewebe von Parkinson-Patienten und Kontrollen mit *IREB2* angefärbt (mit Unterstützung von Prof. Dr. Jens Schittenhelm, Tübingen) und quantitativ ausgewertet.

In den Western-Blot Proben zeigt sich eindeutig, dass die Signalstärke von *IREB2* bei den Parkinson-Patienten deutlich schwächer ausfiel als bei den Kontrollen, was auf eine geringere Proteinexpression von *IREB2* in der SN von Parkinson-Patienten hinweist.

Überdies ergab die Analyse der immunhistochemischen Färbung, dass in der SN von Parkinson-Patienten wesentlich mehr dopaminerge Neurone nachweisbar waren, welche eine schwache *IREB2*-Färbung aufwiesen im Vergleich zu Kontrollen, bei denen mehr Neurone eine starke *IREB2*-Färbung aufwiesen. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *IREB2* in den dopaminergen Neuronen der SN bei Parkinson-Patienten auf Proteinniveau geringer exprimiert vorliegt als bei Kontrollen.

Anhand dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, wie der funktionelle Zusammenhang zwischen der erhöhten Eisenkonzentration in der SN bei Parkinson-Patienten mit der erniedrigten *IREB2*-Expression in der SN von Parkinson-Patienten aussehen könnte. Ist die eindeutig niedrigere Expression von *IREB2* in der SN bei Parkinson-Patienten als mit-ursächlich an der Parkinson-Erkrankung zu beurteilen oder eventuell eine Konsequenz des Krankheitsgeschehens?

Betrachtet man den physiologischen Prozess der zellulären Eisenhomöostase, bei dem *IREB2* im Fall einer zu hohen Eisenkonzentration in der Zelle nicht mehr an die IREs der Targetgene Transferrinrezeptor-1 und Ferritin bindet und somit Eisen vorwiegend gespeichert und nicht mehr in die Zellen eingeschleust wird (Zecca, et al. 2004c), deutet dies wohl eher auf eine Konsequenz im Krankheitsgeschehen hin. Möglicherweise versucht die Zelle durch die Runterregulation von *IREB2*, welches nachfolgend über Ubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Salahudeen, et al. 2009; Vashisht, et al. 2009), das ohnehin schon zu viel vorkommende Eisen in SN in Form von Ferritin zu speichern, um so die Bildung von toxischen ROS so gering wie möglich zu halten.

Das in Ferritin gespeicherte Eisen liegt in Form von Fe^{3+} vor. Wie kann man sich jedoch erklären, dass bei Parkinson-Patienten eine Verschiebung der Ratio von Fe^{3+} zu Fe^{2+} beobachtet wurde (Sian-Hülsmann, et al. 2011; Sofic, et al. 1988)? Möglicherweise steht dies nicht im Zusammenhang mit der erniedrigten *IREB2*-Expression in der SN, sondern ist eventuell Zeichen von freigesetztem Eisen aus den Zellen in Folge des Untergangs der

dopaminergen Neurone. Möglicherweise ist der Zustand der verringerten IREB2-Expression in der SN bei Parkinson-Patienten ein kontinuierlicher Versuch im gesamten Prozess der Erkrankung, die toxischen Effekte der erhöhten Eisenkonzentration in der SN so gering wie möglich zu halten.

5.3.2 IREB2-Expression bei Mitgliedern der A30P-Familie (alpha-Synuklein)

Aufgrund der starken interindividuellen Variabilität innerhalb des Patienten-Kollektivs mit einem idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS) sollte die Expression von *IREB2* nochmals im peripheren Blut angeschaut werden. Diesmal jedoch wurde auf einen gemeinsamen genetischen Hintergrund geachtet, um die Variabilität geringer zu halten. Hierfür wurden zehn Mitglieder aus einer Familie mit bekannter A30P-Mutation im alpha-Synuklein auf ihre *IREB2*-Expression hin untersucht (mit Einwilligung von Prof. Dr. Rejko Krüger). Fünf Personen trugen die A30P-Mutation (symptomatisch und auch asymptomatisch) und fünf Personen hatten die Wildtypsequenz. Es zeigte sich eine eindeutig signifikante Erniedrigung der *IREB2*-Expression bei den Personen, welche eine A30P-Mutation aufwiesen.

Die A30P-Mutation im alpha-Synuklein ist eine bekannte Ursache für eine autosomal dominante Form der familiären Parkinson-Erkrankung (Krüger, et al. 1998). Die Tatsache, dass die *IREB2*-Expression sowohl bei symptomatischen als auch bei asymptomatischen Mutationsträgern signifikant niedriger ist als bei Kontrollen, wirft die Frage auf, ob es sich bei diesem Prozess um eine primäre Ursache im Krankheitsgeschehen handelt oder als ein Versuch der Zellen angesehen werden sollte, gegen den Krankheitsprozess anzusteuern. Wie schon lange bekannt ist, treten die ersten Symptome der Parkinson-Erkrankung erst auf, wenn bereits 50-70 % der dopaminergen Neurone degeneriert sind (Bernheimer, et al. 1973; Riederer and Wuketich 1976). Das bedeutet, dass bereits Jahre vorher viele molekulare Prozesse im Gehirn stattfinden, bevor sie augenscheinlich in Form des Tremors oder Rigors als Symptome auffällig werden. Dies lässt sich hier beispielsweise in der verringerten Expression von *IREB2* bei bisher noch asymptomatischen A30P-Mutationsträgern ebenfalls nachweisen. Jedoch beantwortet das nicht die Frage nach der Kausalität. Hierzu lassen sich nur Vermutungen anstellen. Wenn es einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der verringerten *IREB2*-Expression und der Parkinson-Erkrankung geben sollte, wäre dies über eine direkte Interaktion von *IREB2* und alpha-Synuklein denkbar. Daher sollten weitere Versuche klären, ob es eine solche Interaktion gibt und wie diese eventuell aussehen kann.

5.3.3 Immunfluoreszenzfärbung von IREB2 und alpha-Synuklein

Für eine direkte Interaktion zweier Proteine ist die Lokalisation im gleichen Zellkompartiment unabdingbar. Daher galt es herauszufinden, ob *IREB2* und alpha-Synuklein in denselben Organellen der Zelle lokalisiert sind, um eine potentielle Interaktion zu ermöglichen. Hierfür wurde von SHSY5Y-Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung für die Proteine *IREB2* und alpha-Synuklein durchgeführt. Beide Proteine zeigen eine zytoplasmatische Lokalisation, was

prinzipiell dafür spricht, dass IREB2 mit alpha-Synuklein interagieren könnte. Daher wurde nun der Frage nachgegangen, wie diese Interaktion aussehen könnte.

5.3.4 Interaktion von IREB2 und alpha-Synuklein

Im 5' - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein befindet sich laut *in-silico* Analysen eine Sequenz, die einem IRE entspricht (Friedlich, et al. 2007). IREB2 bindet bekanntlich an IREs seiner Targetgene und reguliert somit deren Translation in Abhängigkeit von der zellulären Eisenkonzentration (Rouault 2006). Sollte sich durch *in vitro* Studien eine Bindung von IREB2 an die IRE-Struktur der mRNA von alpha-Synuklein nachweisen lassen, würde das bedeuten, dass IREB2 die Translation von alpha-Synuklein regulieren könnte. Es galt daher den Beweis dieser Bindung zu erbringen. Ein weiterer Hinweis, der diese Theorie unterstützt, kommt aus einer Studie, in der beobachtet wurde, dass sich die Expression von alpha-Synuklein in Abhängigkeit der Eisenkonzentration der Zelle verändert (Febbraro, et al. 2012).

Zum Nachweis der potentiellen Bindung von IREB2 mit alpha-Synuklein wurde mit Hilfe der *in vitro* Transkription der 5' - UTR Bereich inklusive der IRE-Sequenz von alpha-Synuklein künstlich synthetisiert. Diese künstlich hergestellte biotinylierte RNA wurde mit Proteinlysate von SHSY5Y-Zellen (auch mit HEK-Zellen) inkubiert, um eine Interaktion von zytoplasmatisch vorliegendem IREB2 mit dem IRE von alpha-Synuklein zu erlauben. Durch die anschließende Bestrahlung mit UV-Licht sollte eine mögliche Interaktion gefestigt werden. Im Anschluss wurde über Streptavidin-Beads die biotinylierte RNA mit den daran hängenden Proteinen aus der Lösung isoliert, gewaschen und für einen anschließenden Western-Blot aufgearbeitet. Bei der Immundetektion von IREB2 ließ sich ein Signal erkennen, was für eine Interaktion von IREB2 mit dem IRE von alpha-Synuklein spricht.

In einem nächsten Schritt galt es herauszufinden, welche Basen in der Sequenz der mRNA von alpha-Synuklein essentiell für eine Bindung mit IREB2 sind. Friedlich und Kollegen behaupten, dass für diese Bindung fünf Basen essentiell wären. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, dass diese fünf Basen identisch sind mit dem IRE von Ferritin, welches ein bekanntes Targetgen von IREB2 ist (Friedlich, et al. 2007). Somit wurden mit Hilfe der *in vitro* Transkription verschiedene künstliche mRNAs von alpha-Synuklein hergestellt, welche sich in ihrer Sequenz alle ein wenig unterschieden. Zusätzlich als Positivkontrolle wurde die mRNA von Ferritin *in vitro* transkribiert. Beim anschließenden Pull-Down zeigte sich ein sehr deutliches Signal für die Detektion von IREB2 nach Bindung mit Ferritin, aber auch schwache Signale für IREB2 nach Bindung mit allen künstlich veränderten RNAs von alpha-Synuklein. Ob die Basensequenz von alpha-Synuklein am 5' oder am 3' Ende mutiert wurde, hatte den gleichen Effekt, wie Veränderungen in der Basensequenz im Loop der IRE-Struktur mit den fünf angeblich essentiellen Basen für eine Bindung. Im Gegensatz dazu war keine Bindung mehr nachweisbar, wenn die fünf Basen des IRE-Loops in der mRNA von Ferritin verändert wurden, was eindeutig zeigt, dass diese fünf Basen in der mRNA von Ferritin essentiell für die Bindung mit IREB2 sind.

Diskussion

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass eine Interaktion von IREB2 mit dem IRE von alpha-Synuklein durch *in vitro* Studien nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zur Interaktion von IREB2 mit dem IRE von Ferritin sind die Signale jedoch wesentlich schwächer. Überdies konnten keine spezifischen Basen in der mRNA von alpha-Synuklein identifiziert werden, die für diese Bindung von essentieller Bedeutung wären. Somit scheinen die fünf Basen im Loop des IREs von alpha-Synuklein bei weitem nicht die gleiche Bedeutung für eine Bindung mit IREB2 aufzuweisen als dies bei Ferritin der Fall ist. Daher bleibt weiterhin die Frage offen, ob tatsächlich eine regulatorische Wirkung von IREB2 auf die Expression von alpha-Synuklein ausgeübt wird.

Somit sollte in einem nächsten Schritt gezeigt werden, ob eine Veränderung der Genexpression von IREB2 eine Veränderung der Genexpression von alpha-Synuklein nach sich ziehen würde. Dafür wurden SHSY5Y-Zellen mit einem Vektor transfiziert, welcher über einen pCMV-Promotor IREB2 überexprimierte. Nach Inkubation mit überexprimiertem IREB2 wurde anschließend die Genexpression von alpha-Synuklein überprüft. In der Tat erhöhte sich die Expression von alpha-Synuklein signifikant nach Inkubation mit überexprimierten IREB2 im Vergleich zu nicht transfizierten bzw. mit GFP-transfizierten Zellen.

Infolgedessen scheint es einen regulatorischen Zusammenhang zwischen IREB2 und alpha-Synuklein zu geben. Wie dieser Zusammenhang im Detail aussieht, muss durch weiterführende Studien aufgeklärt werden. Es deutet alles darauf hin, dass IREB2 in irgendeiner Form an die mRNA von alpha-Synuklein bindet. Zudem sollte in anschließenden Studien eruiert werden, welche Effekte diese Bindung auf die posttranskriptionale Regulation von alpha-Synuklein ausübt. Generell scheint diese Bindung schwach zu sein und auch nicht sonderlich spezifisch.

Es ist zum einen denkbar, dass die nachgewiesene signifikante Hochregulation von alpha-Synuklein nach *IREB2*-Überexpression nicht das Resultat einer Interaktion von IREB2 mit dem IRE von alpha-Synuklein zu sein scheint. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus der Tatsache, dass im Fall einer ständigen Bindung von IREB2 mit dem IRE von alpha-Synuklein, wie man es nach Überexpression von IREB2 erwarten würde, eigentlich mit einer Runterregulation von alpha-Synuklein zu rechnen wäre. Denn im Fall einer Bindung von IREB2 im 5' - UTR Bereich einer mRNA führt dies zur Inhibition der Translation des entsprechenden Proteins (Muckenthaler, et al. 2008). Jedoch betrachten wir hier nur die Resultate auf mRNA Niveau. Andererseits, falls die Hochregulation des Transkriptes von alpha-Synuklein doch das Resultat der Bindung von IREB2 mit dem IRE von alpha-Synuklein darstellen würde, ist dies möglicherweise eine Antwort auf die verringerte Translationsrate des Proteins, um zu versuchen dies durch eine höhere Genexpression zu kompensieren. Auch diese Vermutung muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Um wieder auf die ursprüngliche Frage Bezug zu nehmen, ob es einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der verringerten IREB2-Expression und der Parkinson-Erkrankung

gibt, lassen sich folgende Punkte festhalten. Alpha-Synuklein ist eine zelluläre Ferrireduktase (Davies, et al. 2011), welche Fe^{3+} in Fe^{2+} reduzieren kann. Fe^{2+} wird im Übermaß in der SN von Parkinson-Patienten gefunden (Sian-Hülsmann, et al. 2011; Sofic, et al. 1988). Hohe Konzentrationen an intrazellulärem Fe^{2+} können mit H_2O_2 reagieren und somit die hochreaktiven, zytotoxischen Hydroxyradikale (OH^*) über die Fenton-Reaktion entstehen lassen, was zu oxidativem Stress der Zellen mit nachfolgendem Zelltod führt (Berg and Youdim 2006; Gerlach, et al. 1994; Youdim, et al. 1991). Alle diese Punkte lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Runterregulation von IREB2 bei Parkinson-Patienten ein Resultat des Krankheitsgeschehens ist, um der vermehrten Eisenakkumulation in der SN mit seinen schädlichen Folgen entgegen zu treten. Dazu gehören zum einen die Speicherung von Eisen in der unschädlichen dreiwertigen Form, wie auch die Restriktion einer weiteren Eisenaufnahme in die Zelle.

Sollte die Runterregulation tatsächlich ein primäres Ereignis im Krankheitsgeschehen der Parkinson-Erkrankung sein und würde die Translation von alpha-Synuklein real über das IRE/IRP-System reguliert werden, wäre denkbar, dass durch die geringeren IREB2-Konzentrationen im Fall einer Parkinson-Erkrankung die Translation von alpha-Synuklein erhöht wird und somit aufgrund einer sehr hohen Proteinlast von alpha-Synuklein mit all seinen Folgen die Krankheit ausgelöst wird, wie es beispielsweise von Duplikationen oder Triplikationen des SNCA-Lokus bekannt ist (Farrer, et al. 1999; Singleton, et al. 2003).

5.4 Generierung eines Zellkulturmodells für LRRK2-Mutationen

Zellkulturmodelle, welche für die Analyse von physiologischen Reaktionen der Zelle nach diversen Stresssituationen verwendet werden möchten, sollten nach Möglichkeit einen einheitlichen genetischen Hintergrund aufweisen, um Schwankungen der Zellreaktionen zumindest aufgrund genetischer Gleichheit gering zu halten. Möchte man von solchen Analysen Rückschlüsse auf ein bestimmtes Krankheitsgeschehen ziehen, spielt der genetische Hintergrund eine fundamentale Rolle. Ebenso sollte der Zelltyp der Zelllinie so gewählt werden, dass sie dem Gewebe entspricht, in dem sich das jeweilige Krankheitsgeschehen abspielt.

Aus diesem Grund sollten SHSY5Y-Zellen (neuronale Zellen) generiert werden, welche diverse LRRK2-Mutationen (G2019S, I2020T, D1994A und einen *knock-out*) im Genom tragen. Mit diesen Zelllinien sollten weiterführende Experimente bezüglich des Eisenstoffwechsels durchgeführt werden, um zu eruieren, ob es gewisse Parkinson-spezifische Reaktionen gibt, die man mit der erhöhten Eisenakkumulation in der SN beim Morbus Parkinson in Verbindung bringen könnte. Die Entscheidung dafür diverse LRRK2-Varianten zu generieren, liegt in der Tatsache begründet, dass die Klinik von LRRK2-Patienten und idiopathischen Parkinson-Patienten nicht zu unterscheiden ist (Hasegawa and Kowa 1997; Hernandez, et al. 2005;

Zimprich, et al. 2004a), die Patienten ebenso eine Hyperechogenität der SN aufweisen (Schweitzer, et al. 2007) und somit gewonnene Daten eventuell auch auf idiopathische Parkinson-Patienten übertragen werden können.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Konstrukte kloniert, welche homologe Bereiche zur genomischen DNA im *LRRK2*-Gen aufwiesen und zusätzlich die gewünschte Mutation trugen. Diese Konstrukte wurden mit Hilfe einer Zinkfingernuclease (ZFN) über homologe Rekombination (Urnov, et al. 2010) in die SHSY5Y-Zellen integriert und lagen somit stabil im Genom vor. Diese Art von Gen-Editierung war zum durchgeführten Zeitpunkt eine relativ neue Methode, die es erlaubt, zielgerichtet und effizient die Funktion und den Einfluss von Genen auf endogenem Niveau zu untersuchen. Mittlerweile sind jedoch auch andere Techniken etabliert worden, die dem gleichen Zwecke dienen wie beispielsweise die Verwendung von TALENs (transcription activator-like effector nucleases) und CRISPR/CAS9-Nukleasen (Cho, et al. 2013; Jinek, et al. 2013; Kim, et al. 2013).

Die Integration des homologen Konstruktes in die SHSY5Y-Zellen mit Hilfe des ZFN schien zu Beginn des Projektes ohne Probleme zu funktionieren. Jedoch stellte sich heraus, dass die homologe Rekombination mit Problemen behaftet war. Im Exon 41 des *LRRK2*-Gens befindet sich ein Sequenzbereich, in welchem die Basen Adenin (A) und Thymin (T) relativ oft in verschiedener Kombination aufeinander folgen. Genau in diesem AT-reichen Sequenzbereich bauten die SHSY5Y-Zellen Mutationen im Verlauf der homologen Rekombination ein. Dabei gab es kein erkennbares Muster der vorgefundenen Mutationen. Das Spektrum reichte von einer zusätzlich eingebauten Base (Insertion), meistens A oder T, über zwei oder drei zusätzlichen Basen bis hin zu Deletionen des gesamten AT-reichen Sequenzbereiches. Die veränderten Basen lagen genau an der Schnittstelle der Zinkfingernukleasen. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch das ständige Schneiden der DNA durch den Zinkfinger möglicherweise einzelne Prozesse im Bereich der DNA-Reparatur der SHSY5Y-Zellen nicht mehr effizient genug sind, um falsch eingebaute Basen bei der homologen Rekombination zu erkennen und wieder zu entfernen. Diese Schlussfolgerung wurde gezogen, nachdem die gleichen Konstrukte mit der gleichen Methode in iPS-Zellen (Dissertationsprojekt von David Schöndorf, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung) transfiziert wurden und dort zwar auch im AT-reichen Sequenzbereich Mutationen auftraten, jedoch auch Zellen selektiert werden konnten, welche frei von Mutationen waren. Offenbar verfügen die iPS-Zellen über ein effizienteres System beim Erkennen von falsch eingebauten Basen als die SHSY5Y-Zellen. Dies erscheint auch sinnvoll, da sie sich möglichst fehlerfrei in verschiedene Zelltypen differenzieren müssen.

Nachdem bei über 50 selektierten Zellklonen ausschließlich SHSY5Y-Zellen zu finden waren, welche solche Mutationen eingebaut hatten, wurde sich für eine andere Zelllinie für dieses Projekt entschlossen. Lediglich ein SHSY5Y-Zellklon, der das Konstrukt mit einer heterozygoten Stopp-Mutation aufgenommen hatte, zeigte auf dem anderen Allel eine Veränderung der Basenabfolge in der AT-reichen Region, welche zu einem *frameshift* führte und in dessen Folge später zu einer Stopp-Mutation. Für einen vollständigen *knock-out* von

LRRK2 mussten ohnehin beide Allele ein Stopp-Kodon aufweisen, damit kein LRRK2 mehr abgelesen werden konnte. Durch einen anschließenden Western-Blot zeigte sich für diesen Zellklon, dass LRRK2 nicht vollständig ausgeknockt war, jedoch in seiner Expression stark reduziert vorlag.

In der Hoffnung, dass eine andere Zelllinie für diese Art von Versuchen besser geeignet sein könnte, wurde das gesamte Prozedere mit HEK-Zellen wiederholt. Jedoch konnte auch mit HEK-Zellen kein Zellklon isoliert werden (über 50 analysiert), welcher in dem AT-reichen Bereich des Exons 41 im *LRRK2*-Gen mutationsfrei war.

Dies legt die Vermutung nahe, dass Zelllinien, welche bereits über Jahrzehnte existieren, eventuell generell kein so effizientes DNA-Reparatursystem aufweisen, um falsch eingebaute Basen zu entfernen als dies bei iPS-Zellen der Fall zu sein scheint.

Generell verfügen eukaryotische Zellen über zwei Möglichkeiten, einen DNA Doppelstrangbruch zu reparieren. Dies ist zum einen die homologe Rekombination (HR) und zum anderen das nicht homologe *End Joining* (NHEJ) (Takata, et al. 1998) (Abb.5.1). Während bei der HR die Bruchendstücke der DNA sorgfältig prozessiert werden, ist dies beim NHEJ nicht der Fall. Deshalb kommt es häufig zu eingebauten Fehlern in der Basensequenz, wie kleinere Deletionen oder Insertionen (Lisby and Rothstein 2005; Takata, et al. 1998). Möglicherweise findet dieser Mechanismus bei Zelllinien häufiger statt als eine homologe Rekombination.

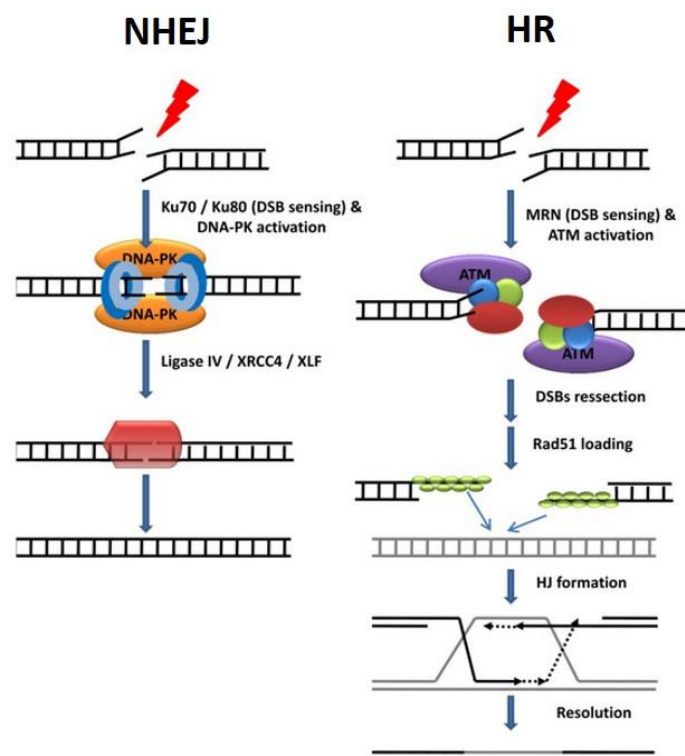


Abbildung 5.1: Vorgang des Nicht homologen End Joinings (NHEJ) und der Homologen Rekombination (HR) nach einem Doppelstrangbruch (DSB) der DNA Links: Beim NHEJ wird der DSB durch zwei ringähnliche Proteine, Ku70 und Ku80, erkannt (blaue Ringe). Diese binden und stabilisieren die Bruchenden der DNA. Darüber hinaus ziehen sie die DNA abhängige Proteinkinase (DNA-PK) an, welche nach Anlagerung am DSB aktiviert wird und Substrate phosphoryliert, welche für die Prozessierung und die Ligation des DSB benötigt werden (Effektor-

Diskussion

Komplex, bestehend aus Ligase IV/XRC44/XLF). **Rechts:** Zunächst werden zu den Bruchstückenden die MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) Komplexe rekrutiert, welche über eine direkte Interaktion die ATM-Kinase anziehen und aktivieren. Diese wiederum phosphoryliert zahlreiche Substrate. Gefolgt von multiplen Endo- und Exonuklease-Reaktionen liegen bald einzelsträngige DNA-Regionen vor. Davon werden Rad51 und andere damit assoziierte Proteine angezogen, welche ein Nucleoproteinfilament ausbilden. Rad51 überzieht die einzelsträngigen DNA Bereiche und das Nucleoproteinfilament begibt sich nun auf die Suche nach homologen Bereichen im Schwesterchromatid. Beim Eindringen in das Schwesterchromatid kommt es zur Ausbildung der charakteristischen Holliday-Struktur (HJ). Abschließend kommt es zur Neusynthese bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt. (Abbildung und Erklärung aus dem Buch „Protein Phosphorylation in Human Health“, Kapitel 8 „Signalling DNA Damage“ von Andres Joaquin Lopez-Contreras und Oscar Fernandez-Capetillo)

Real-Time *in vivo* Monitoring-Studien deuten darauf hin, dass das NHEJ wesentlich schneller abläuft (mit bis zu 30 Minuten) als die HR, welche ca. sieben Stunden und länger andauerte (Mao, et al. 2008). Bei einer schnell teilenden Zelllinie, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (SHSY5Y- und HEK-Zellen), könnte dies tatsächlich ein Grund dafür sein, weshalb NHEJ häufig stattfindet, um den Doppelstrangbruch, ausgelöst durch den ZFN, effizient und schnell zu reparieren. Da NHEJ jedoch sehr häufig mit kleinen Mutationen assoziiert ist, ist dies eine naheliegende Erklärung, weshalb die SHSY5Y-Zellen und auch die HEK-Zellen im AT-reichen Sequenzbereich des Exons 41 des *LRRK2*-Gens diese Mutationen aufwiesen.

Über den quantitativen Beitrag von HR und NHEJ in den Phasen des Zellzyklus ist wenig bekannt. Aus Experimenten wird vermutet, dass HR einen sehr wichtigen Beitrag in den Phasen der frühen Synthese (S) und G2 spielt, während das NHEJ hauptsächlich in den Phasen der späten Synthese (S) und G1 stattfindet, jedoch auch in den anderen Phasen auftreten kann (Fukushima, et al. 2001; Jackson 2002; Mao, et al. 2008; Rothkamm, et al. 2003).

5.5 Zellkulturexperimente zum Eisenmetabolismus

Die bisherigen Ergebnisse aus den genetischen Vorexperimenten zum Eisenmetabolismus beim Morbus Parkinson lassen auf eine Gegenregulation der Zellen in Antwort auf die hohen Eisenkonzentrationen der SN bei Parkinson-Patienten schließen.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Parkinson-Erkrankung auf die Reaktion der Zellen in Antwort auf diverse Eisenstresssituationen ausüben könnte, wurden die folgenden Experimente durchgeführt. Fibroblasten und Neurone mit einer G2019S-Mutation, sowie die SHSY5Y-Zellen mit dem *knock-down* für *LRRK2* wurden mit ihren jeweiligen Wildtypen mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Nach einer gewissen Inkubationszeit wurden die Expressionen wichtiger Eisenstoffwechselfgene analysiert und vergleichend gegenübergestellt. Es wurde sich für Zellen mit einer G2019S-Mutation im *LRRK2*-Gen entschieden, weil Patienten mit einer G2019S-Mutation klinisch die gleiche Symptomatik

Diskussion

aufweisen wie Patienten mit einem idiopathischen Parkinson-Syndrom, sodass gewonnene Erkenntnisse eventuell auch auf die weitaus meisten Patienten reflektiert werden könnten.

Die Zellen wurden in verschiedene Situationen bezüglich des Eisenstoffwechsels gebracht. Zum einen gab es ein Überangebot von Eisen in Form von FeCl₃ oder holo-Transferrin (holoTF). Dieser Zustand wurde allein betrachtet als auch die Expressionen nach einer anschließenden Gabe des Eisenchelators Deferoxamine (DFO). Zudem wurde überprüft, wie die Zellen auf die alleinige Gabe von DFO reagierten.

Generell war die Hypothese, dass ein Eisenüberschuss im Zellkulturmedium bis zu einem gewissen Grad toleriert werden würde, aber die Expressionen von Eisenimportmolekülen runterreguliert sowie die Eisenexporter und Speicherproteine hochreguliert werden, um schädliche Folgen für die Zellen zu verhindern. Im umgekehrten Fall einer Gabe von DFO war zu erwarten, dass die Zellen die Eisenimportmoleküle hochregulieren, Eisenexporter und Speicherproteine runterregulieren, um das restliche Eisen für den Stoffwechsel bereit halten zu können. Ob sich dabei signifikante Unterschiede zwischen den Wildtyp-Zellen und den G2019S-Zellen nachweisen lassen würden, sollte sich mit diesem Versuchsaufbau zeigen. Eine zusammenfassende Übersicht dazu kann Tabelle 5.1 entnommen werden.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Expressionsanalysen für diverse Eisenstoffwechselgene bei verschiedenen Zelltypen nach Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen In dieser Tabelle sind die Expressionsdaten der gemessenen Eisenstoffwechselgene vergleichend zwischen verschiedenen Genotypen dargestellt. Mit einem + gekennzeichnet, sind signifikante Unterschiede in der Genexpression nach Behandlung mit Eisenstressoren. Mit einem – sind nicht signifikante Unterschiede in der Expression des entsprechenden Gens gekennzeichnet. (NK Negativkontrolle; ↓knock-down; WT Wildtyp; --- keine vorhandenen Daten; Tfr1 *Transferrinrezeptor-1*; DMT1 *Divalenter Metalltransporter-1*; HC heavy chain; LC leichte Kette; FP1 *Ferroportin-1*; IREB2 *iron-responsive element-binding protein 2*; HIF1A *hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*; HEPH *Hepheastin*; HO-1 *Hämoxygenase 1*)

Gene	Fibroblasten			SHSY5Y-Zellen			Neurone		
	G2019S NK	WT NK	G2019S WT	LRRK2↓ NK	WT NK	LRRK2↓ WT	G2019S NK	WT NK	G2019S WT
<i>Tfr1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>DMT1</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>Ferritin (HC)</i>	-	-	+	---	---	---	+	-	+
<i>Ferritin (LC)</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>FP1</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>IREB2</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>HIF1A</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>HEPH</i>	-	+	-	---	---	---	---	---	---
<i>HO-1</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+

5.5.1 Fibroblasten

Zur Durchführung der nachfolgenden Experimente wurden Fibroblasten verwendet, welche über eine Hautstanze direkt von Parkinson-Patienten mit einer G2019S-Mutation stammten, sowie von alters- und geschlechtsangepassten Kontrollpersonen, welche bis zum Entnahmezeitpunkt keine neurologischen Erkrankungen hatten.

5.5.1.1 Transferrinrezeptor-1 (*TfR1*), *DMT1* und *Ferroportin-1 (FP1)*

Wie zu erwarten war, zeigen sowohl die Fibroblasten mit der G2019S-Mutation als auch die Wildtypzellen eine signifikante Runterregulation des *TfR1* nach einer Behandlung mit FeCl_3 . Dabei unterscheiden sich beide Zelltypen jedoch signifikant voneinander. Die Kontroll-Fibroblasten zeigen eine stärkere Reduktion in der Expression des *TfR1* im Vergleich zu den G2019S-Fibroblasten. Diese signifikanten Unterschiede sind auch noch nachweisbar nachdem die FeCl_3 -Behandlung durch eine DFO-Inkubation ins Gegenteil gekehrt wurde. Möglicherweise ist die bereits angelaufene Reaktion der Zelle auf die hohen Eisenkonzentrationen nicht innerhalb von 24h zu stoppen, weshalb die DFO-Behandlung keinen Effekt zeigte.

Erstaunlicherweise bleibt die Behandlung mit holoTf bei beiden Genotypen ohne Folgen bezüglich der *TfR1*-Expression. Aufgrund des Mechanismus der Eisenaufnahme über den TfR1/Tf-Komplex (Ghosh, et al. 2015) war im Rahmen dieser Arbeit mit einer Gegenregulation in der Genexpression des TfR1 gerechnet worden. Denkbar ist hier, dass die Konzentration des holoTf höher hätte sein müssen, um eine Reaktion auszulösen. Allerdings zeigen sich sehr deutliche signifikant erhöhte Expressionswerte für *TfR1* nach einer ausschließlichen Behandlung mit DFO, aber auch nach einer Erstbehandlung mit holoTf und einer anschließenden DFO Inkubation, welche bei beiden Genotypen nachzuweisen war. Dies erhärtet den Verdacht, dass die Konzentration an holoTf zu gering dosiert gewesen war, um einen sichtlichen Effekt in der *TfR1*-Expression auszulösen.

Prinzipiell scheinen sowohl die G2019S-Fibroblasten als auch die Kontrollen sehr ähnlich auf die Behandlungen mit den verschiedenen Substanzen in der Expression des TfR1 zu reagieren im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle. Trotz allem sind die Regulationseffekte bei den Kontroll-Fibroblasten in manchen Situationen signifikant stärker im Vergleich zu den G2019S-Fibroblasten. Möglicherweise ein Hinweis dafür, dass die G2019S-Mutation zu einer abgeschwächten oder eventuell langsameren Reaktion im Fall von Eisenstress führt.

Unerwarteter Weise scheint die Expression von *DMT1* in jeder Behandlungssituation komplett unbeeinflusst zu sein. Sowohl die Situation des Eisenüberschusses als auch die des Eisenentzuges verursacht keine Veränderungen in der *DMT1*-Expression. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass *DMT1* in Fibroblasten möglicherweise nicht am Prozess der Eisenaufnahme beteiligt zu sein scheint oder einem anderen Regulationsmechanismus unterliegt. Diese Beobachtung, dass die Expression von *DMT1*, trotz der Änderung der

Eisenkonzentration, unverändert bleibt, wurde auch in tierexperimentellen Studien mit Rattengehirngewebe gemacht (Ke, et al. 2005). Es bleibt somit die Frage zu klären, weshalb in der SN von Parkinson-Patienten erhöhte Expressionen von einer bestimmten Isoform von DMT1 gefunden wurden (Salazar, et al. 2008)?

Unabhängig von der jeweiligen Behandlungssituation mit unterschiedlichen Substanzen sind für die Expressionen von *FP1* keine signifikanten Unterschiede zwischen G2019S-Fibroblasten und Kontrollen nachweisbar gewesen. Interessanter Weise scheint die Zugabe von FeCl_3 und holoTf keinen Effekt auf die Expression von *FP1* auszuüben, wohingegen eine Zugabe von DFO zu einer signifikanten Runterregulation des Eisenexporters im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle führte. Scheinbar reagiert also die Expression von *FP1* nicht im Falle eines Eisenüberschusses, aber sofort im Falle einer Eisendefizienz. In einem speziellen Modell für die Parkinson-Erkrankung zeigte sich, dass eine Runterregulation der *FP1*-Expression zur nigralen Eisenakkumulation beiträgt (Zhang, et al. 2014). Ebenso konnten verminderte *FP1*-Expressionen bei anderen Tier- und Zellkulturmodellen der Parkinson-Erkrankung nachgewiesen werden (Song, et al. 2010b; Wang, et al. 2007). Umgekehrt zeigten andere Zellkulturexperimente, dass eine Überexpression von *FP1* zu einem erhöhten Eisenefflux aus der Zelle beitrug mit folgend geringeren zellulären Eisenkonzentrationen sowie einer Reduktion von ROS (Song, et al. 2010a). Demgegenüber stehen erhöhte Proteinlevel von *FP1* in *post mortem* Proben der SN von Parkinson-Patienten (Visanji, et al. 2013). All diese Studien beweisen die Wichtigkeit der Funktion von *FP1*. In dem hier verwendeten Fibroblasten-Zellkulturmodell scheint die *FP1*-Expression jedoch unabhängig von der G2019S-Mutation zu reagieren.

5.5.1.2 Ferritin

Im Falle der Genexpression der leichten und schweren Kette von Ferritin sind signifikante Expressionsunterschiede zwischen den G2019S-Fibroblasten und den Kontrollen nachweisbar. In jeder Behandlungssituation liegt eine weitaus höhere Expression (meist das Doppelte) von *Ferritin-HC* bei G2019S-Fibroblasten vor im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten. Allerdings sieht man diese höhere Expression von *Ferritin-HC* auch bei der unbehandelten Negativkontrolle der G2019S-Fibroblasten, jedoch unterscheiden sie sich aufgrund der starken Standardabweichung nicht signifikant von den Kontroll-Fibroblasten. Trotz allem scheinen diese hohen Expressionslevel von *Ferritin-HC* nicht die Folge der Behandlung mit den Eisenstressoren zu sein, sondern sind als eine grundsätzlich höher vorliegende Expression in den G2019S-Fibroblasten anzusehen. Die gleiche Tendenz ist auch für die Expression von *Ferritin-LC* zu erkennen, wenngleich die Ausprägung nicht so stark ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, unabhängig von der Eisenkonzentration im Zellkulturmedium, die Expressionslevel von vor allem *Ferritin-HC*, aber auch der *LC* bei G2019S-Fibroblasten deutlich höher sind als bei den Kontroll-Fibroblasten. Dies könnte möglicherweise an der G2019S-Mutation liegen. Die Expression von *Ferritin* wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Faucheux, et al. 2002). Während es Studien gibt, in denen

keine erhöhten Werte von Ferritin in *post mortem* Gewebe von Parkinson-Patienten nachgewiesen wurden (Visanji, et al. 2013), zeigen andere Experimente eine erhöhte Ferritinexpression in der SN von Parkinson-Patienten (Licker, et al. 2014). Letzteres passt auch zu den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit bei den Fibroblasten.

5.5.1.3 IREB2, HEPH, HIF1A und HO-1

Die Genexpression von *IREB2* unterscheidet sich nicht zwischen beiden Genotypen und bleibt unerwarteter Weise ohne Regulationseffekte in Antwort auf einen Eisenüberschuss bzw. einen Eisenentzug. Normalerweise wurde von der Hypothese ausgegangen, dass im Falle eines Eisenüberschusses die Expression von *IREB2* runterreguliert und umgekehrt im Fall der Eisendefizienz die Expression hochreguliert wird. Möglicherweise hätte die Inkubationszeit für einen signifikanten Effekt erhöht werden müssen. Es ist aber auch denkbar, dass Fibroblasten nicht so sensibel bezüglich ihrer *IREB2*-Expression reagieren.

Die Expression der zellulären Ferroxidase *HEPH* scheint von den Behandlungszuständen mit Eisen bei beiden Genotypen weitgehend unbeeinflusst zu sein. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *HEPH* einen positiven Effekt im Sinne einer Reduktion der ROS Produktion für die Zellen hatte (Song, et al. 2010a). Daher wäre die denkbare Konsequenz, dass je weniger *HEPH* vorliegen würde, desto höher die Belastung mit ROS sein müsste. Dieser Regulationsmechanismus scheint allerdings in den Fibroblasten keine Rolle zu spielen.

Keine Unterschiede zwischen den Genotypen der Fibroblasten ließen sich in der Expression von *HIF1A* nachweisen. Wenngleich die Behandlungen innerhalb eines Genotyps im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle schon deutliche Expressionsunterschiede aufwiesen. *Hypoxia inducible factors* sind wichtige Faktoren im Kreislauf der zellulären und systemischen Sauerstoffhomöostase, welche in einem direkten Bezug zum Eisenmetabolismus stehen (Lee, et al. 2004b; Peyssonnaud, et al. 2008). Vor allem eine Inkubation von holoTF/DFO bzw. DFO allein führte zu einer signifikanten Runterregulation von *HIF1A* im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle. Dies steht im Kontrast zur Annahme, dass eine Behandlung mit Eisenchelatoren zu einem Anstieg der *HIF1A*-Expression führt aufgrund einer Inhibition der *HIF1A*-Degradation (Cheng, et al. 2010; Triantafyllou, et al. 2006).

Die *HO-1*-Expression wird sehr stark in die Höhe getrieben nach einer Behandlung mit FeCl_3 bei beiden Genotypen. Dabei ist die Expression in G2019S-Fibroblasten um den Faktor vier erhöht im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle. In Kontroll-Fibroblasten ist der Unterschied nicht so drastisch. Nach anschließender Zugabe von DFO geht die *HO-1*-Expression zwar wieder zurück, unterscheidet sich jedoch immer noch signifikant von den Negativkontrollen. Prinzipiell scheint die *HO-1*-Expression sehr schnell und sensibel auf Änderungszustände in der Eisenkonzentration zu reagieren, was eventuell dadurch erklärt werden kann, dass in der Promotorregion von *HO-1* ein beachtlicher Sequenzbereich vorliegt,

der von sehr vielen unterschiedlichen Substanzen, u.a. auch von Eisen oder H_2O_2 induzierbar ist (Schipper and Song 2015). Es wird angenommen, dass *HO-1* prinzipiell eine schützende Funktion für die Zelle ausübt, in dem es in Stresssituationen hochreguliert wird und dafür sorgt, dass Häm in Biliverdin, CO und Fe^{2+} gespalten wird (Llesuy and Tomaro 1994; Stocker, et al. 1987). Dies konnte in dem durchgeführten Experiment mit den Fibroblasten ebenfalls gezeigt werden, wenngleich die G2019S-Fibroblasten eine wesentlich deutlichere Hochregulation aufwiesen. Gleichzeitig fallen aber auch CO und Fe^{2+} an, welche in der Lage sind die Bildung von ROS in den Mitochondrien zu begünstigen (Piantadosi, et al. 2006; Schipper, et al. 2009). Daher gibt es häufig einen gleichzeitigen Anstieg von apo-Ferritin, um das entstandene Fe^{2+} zu speichern und somit unschädlich zu machen (Dennerly 2000; Ryter and Tyrrell 2000). Möglicherweise ist dies eine denkbare Erklärung dafür, weshalb die Ferritinwerte bei den G2019S-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen so hoch waren, und können daher als eine Reaktion des starken Anstieges der *HO-1*-Expression bei den G2019S-Fibroblasten interpretiert werden.

5.5.2 SHSY5Y-LRRK2 knock-down

Zusätzlich zu den Fibroblasten sollten die gleichen Versuchsansätze mit SHSY5Y-Zellen durchgeführt werden. Dafür wurden genetisch unveränderte Zellen verwendet, sowie die SHSY5Y-Zellen aus Projekt 5.4, welche einen *knock-down* für LRRK2 aufwiesen. Prinzipiell kann festgehalten werden, dass sich die Expressionen aller gemessener Gene signifikant zwischen den Wildtyp-SHSY5Y-Zellen und den LRRK2 *knock-down* Zellen nach diversen Behandlungen unterscheiden. Der *knock-down* von LRRK2 scheint somit einen starken Effekt auf die Veränderungen in der Genexpression der gemessenen Eisenstoffwechselfene auszuüben, wenn die Zellen in Stress geraten. Prinzipiell scheinen die SHSY5Y-Zellen sensibler auf das holoTF zu reagieren als die Fibroblasten.

5.5.2.1 Transferrinrezeptor-1 (*TfR1*), *DMT1* und *Ferroportin 1 (FP1)*

Wie erwartet, bewirkt eine Behandlung mit FeCl_3 und holoTF die Runterregulation des *TfR1* und des *DMT1*, sowie eine Behandlung mit DFO die Hochregulation beider Gene. Dabei scheinen die SHSY5Y-Zellen mit dem *knock-down* für LRRK2 deutlich stärker zu reagieren als die Wildtyp-Zellen. Ein großer Unterschied zeigte sich nach einer FeCl_3 -Inkubation mit anschließender DFO-Behandlung. Die LRRK2 *knock-down* Zellen reagieren auf diese Behandlung mit einer sehr starken Hochregulation des *TfR1*-Gens und des *DMT1*-Gens, während die Wildtyp-Zellen unverändert zur unbehandelten Negativkontrolle bleiben. Man könnte mutmaßen, dass diese Hochregulation eine schnelle Reaktion auf die DFO Behandlung ist, was den Schluss zulassen würde, dass LRRK2 *knock-down* Zellen schneller bzw. stärker auf einen Zustand von Eisenentzug reagieren, wie auch aus einer reinen Behandlung mit DFO anhand der Expressionsstärken für *TfR1* und *DMT1* geschlussfolgert werden kann.

Im Fall der *FP1*-Expression können keine Aussagen zu unterschiedlichen Reaktionen zwischen den Genotypen getroffen werden, da sich bereits die unbehandelten Negativkontrollen signifikant voneinander in ihrem Expressionslevel unterscheiden. Generell jedoch ist die *FP1*-Expression bei den LRRK2 *knock-down* SHSY5Y-Zellen signifikant höher als bei den Wildtyp-SHSY5Y-Zellen. Dies würde die Studie von Visanji und Kollegen unterstützen, in welcher erhöhte Proteinlevel von FP1 in *post mortem* Proben der SN von Parkinson-Patienten nachgewiesen wurden (Visanji, et al. 2013).

5.5.2.2 Ferritin (LC)

Während die unbehandelten Negativkontrollen beider Genotypen keinen Unterschied in der Ferritinexpression aufweisen, bewirken die Behandlungen mit FeCl₃, holoTF und DFO starke Veränderungen. Erwarten würde man im Fall eines Eisenüberschusses eine Hochregulation von *Ferritin* und im Fall eines Eisenentzuges eine Verringerung der Ferritinexpression. Für die Behandlung mit FeCl₃ konnte dies so bei den LRRK2 *knock-down* Zellen nachgewiesen werden. Jedoch führt eine Behandlung mit holoTF zur Runterregulation von *Ferritin*. Ebenso unerwartet steigt die Expression drastisch an nach Inkubation mit holoTF und anschließender DFO Behandlung. Dieser Anstieg ist durchaus bei beiden Genotypen zu beobachten, jedoch wesentlich deutlicher bei den LRRK2 *knock-down* Zellen.

5.5.2.3 IREB2, HIF1A und HO-1

Die *IREB2*-Expression liegt reduziert im Zustand des Eisenüberschusses sowohl durch FeCl₃ als auch durch holoTF bei beiden Genotypen vor. Eine Behandlung mit DFO zeigt, dass die Expression von *IREB2* ausschließlich bei den LRRK2 *knock-down* Zellen hochreguliert wurde, welche sich signifikant von den Wildtyp-Zellen unterscheidet. Genau diesen Effekt der Hochregulation würde man auch aufgrund der Literatur erwarten. Komisch ist allerdings, dass die LRRK2 *knock-down* Zellen der Erwartung entsprechen, während die Wildtyp-Zellen sich etwas anders verhalten. Möglicherweise führt der LRRK2 *knock-down* zu einem sensibleren Verhalten gegenüber von Eisenstress.

Beide Genotypen zeigen in der *HIF1A*-Expression ähnliche Regulationsunterschiede in Antwort auf die diversen Stressbedingungen. Jedoch ist zu verzeichnen, dass im Falle einer Behandlung mit FeCl₃/DFO die Expression von *HIF1A* bei den LRRK2 *knock-down* Zellen hochreguliert wird, während sie im Falle der Wildtyp-Zellen runterreguliert wird. Auch hier entsprechen die Ergebnisse nicht den allgemeinen Angaben, dass eine Behandlung mit DFO zu einer Hochregulation von *HIF1A* führt (Cheng, et al. 2010; Triantafyllou, et al. 2006).

Eine Behandlung mit FeCl₃ und FeCl₃/DFO führt zu einer deutlich unterschiedlichen Reaktion der beiden Genotypen in der *HO-1*-Expression. Während die Wildtyp-Zellen in beiden Behandlungssituationen mit einer signifikanten Hochregulation von *HO-1* reagierten, zeigte

sich lediglich eine leichte Hochregulation bei den LRRK2 *knock-down* Zellen für die ausschließliche FeCl₃ Behandlung und sogar eine Runterregulation von *HO-1* im Falle der Behandlung mit FeCl₃/DFO. Ansonsten sind die Expressionsantworten von *HO-1* auf andere Stressbedingungen bei beiden Genotypen ähnlich. Bei der Gabe von DFO zeigen beide eine starke Runterregulation von *HO-1*.

5.5.3 Neurone

Da die hauptsächliche Pathologie bei der Parkinson-Erkrankung in den dopaminergen Neuronen der SN stattfindet, sollten zusätzlich zu den Fibroblasten und den SHSY5Y-Zellen ebenso Versuche mit Neuronen durchgeführt werden. Diese Neurone stammen aus iPS-Zellen, welche sich in mehreren Schritten zu Neuronen differenziert haben. Hierfür wurden ebenso Neurone ohne genetische Veränderung verwendet, als auch Neurone mit einer G2019S-Mutation.

5.5.3.1 Transferrinrezeptor-1 (*TfR1*), *DMT1* und *Ferroportin 1 (FP1)*

Wie bei den Fibroblasten und auch bei den SHSY5Y-Zellen zu beobachten war, zeigen auch die Neurone eine Runterregulation in der Expression des *TfR1* in Antwort auf einen Eisenüberschuss durch FeCl₃. HoloTF konnte diesen Effekt nicht auslösen. Daher wird angenommen, dass die eingesetzten Konzentrationen von holoTF bei Fibroblasten und Neuronen nicht ausreichend waren, um eine Reaktion auszulösen. Die Behandlung mit holoTF/DFO führte bei beiden Genotypen zu einer drastischen Hochregulation der *TfR1*-Expression, wesentlich höher als es bei einer ausschließlichen DFO-Gabe zu beobachten war. Dabei ist die Hochregulation bei den G2019S-Neuronen signifikant höher ausgefallen als bei den Wildtyp-Neuronen. Weshalb ausgerechnet bei dieser Behandlung eine solche Hochregulation in der *TfR1*-Expression zu beobachten ist, kann nicht geklärt werden. Physiologischer Weise hätte man eine solche Reaktion eher nach einer alleinigen Behandlung mit DFO erwartet.

Die Expression von *DMT1* unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Genotypen der Neurone und ist kaum verändert durch eine Behandlung mit FeCl₃, holoTF oder DFO. Dies sind ähnliche Ergebnisse wie bei den behandelten Fibroblasten. Obwohl eine Isoform von *DMT1* in der SN von Parkinson-Patienten mit einer erhöhten Expression vorliegt und auch bei MPTP behandelten Mäusen eine Hochregulation von *DMT1* nachzuweisen war (Salazar, et al. 2008), zeigten die Neurone keinerlei Reaktion bezüglich ihrer *DMT1*-Expression. Von *DMT1* gibt es vier verschiedene Isoformen, zwei davon unterscheiden sich in der n-terminalen Promotorregion, die anderen beiden am C-Terminus, der entweder ein IRE enthält oder nicht (Hubert and Hentze 2002; Lee, et al. 1998; Mackenzie, et al. 2007). Überdies scheint die Hochregulation der *DMT1*-Isoform mit dem IRE (*DMT1 IRE+*) bei MPTP behandelten

Mäusen über das IRE/IRP System reguliert zu werden (Jiang, et al. 2010). Möglicherweise sind die hier erhobenen Daten der mRNA-Expression von *DMT1* nicht einschlägig verändert, da eine Basensequenz in der *DMT1*-RNA ausgewählt wurde, welche nicht zwischen den verschiedenen Transkripten differenziert. Dies ist ein guter Ansatz für Folgeexperimente.

Die unbehandelten Negativkontrollen beider Genotypen zeigen bereits einen signifikanten Expressionsunterschied für *FP1*. Nichts desto trotz reagieren sie in Antwort auf Eisenstress sehr ähnlich. So zeigen die Neurone beispielsweise eine Hochregulation von *FP1* nach einer Behandlung mit DFO. Dies ist sehr erstaunlich, da in den Fibroblasten eine DFO Behandlung zu einer Runterregulation von *FP1* führte und dies normalerweise, wenn man sich den Prozess der Eisenregulation ansieht, logisch erscheint. Im Fall eines Eisenentzuges versucht die Zelle den Eisenefflux gering zu halten, damit das restlich vorhandene Eisen für Stoffwechselprozesse in der Zelle zur Verfügung bleibt. Die Neurone reagieren genau gegenteilig zur aufgestellten Hypothese. Die Frage nach dem „Warum“ müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

5.5.3.2 Ferritin

Die Expressionen von *Ferritin-HC* und *LC* unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Genotypen der Neurone und scheinen auch unverändert in Bezug auf die verschiedenen Behandlungssituationen. Diese Beobachtung konnte in Fibroblasten nicht gemacht werden.

5.5.3.3 IREB2, HIF1A und HO-1

Die Expressionen von *IREB2* und *HIF1A* sind ebenfalls unverändert nach Auslösen von Eisenstress und unterscheiden sich nicht zwischen den einzelnen Genotypen der Neurone.

Im Gegensatz dazu ist die Expression von *HO-1* prinzipiell auf einem höheren Level bei den G2019S-Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Neuronen. Jedoch wurde ausschließlich im Fall der Behandlung von holoTF/DFO ein signifikanter Unterschied in der Regulation bei beiden Genotypen nachgewiesen. Während die G2019S-Neurone mit einer Hochregulation auf diese Situation reagierten, scheinen die Wildtyp-Neurone genau gegenteilig zu reagieren und sorgten für eine Runterregulation von *HO-1*. Bei Parkinson-Patienten ist die *HO-1* Expression in den Astrozyten der SN deutlich erhöht im Vergleich zu Kontrollen (Schipper, et al. 1998). Möglicherweise ist dies auch eine Erklärung für die generell höhere *HO-1*-Expression bei den G2019S-Neuronen und Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen.

Zusammenfassung: Die Erwartung, dass der Genotyp einen generellen Einfluss auf die Reaktion der Zellen in diversen Eisenstresssituationen ausübt, wurde nicht erfüllt. Generell sind die Beobachtungen in den drei verschiedenen Zelltypen alle sehr unterschiedlich, wengleich natürlich auch spezifische Effekte zu beobachten waren (beispielsweise die

generell höhere Ferritinexpression in Fibroblasten mit einer G2019S-Mutation). Fibroblasten verhalten sich ähnlich wie die Neurone, was ein eventueller Hinweis auf den gemeinsamen genetischen Hintergrund ist. Einheitlich fielen die Expressionen des Transferrinrezeptor-1 aus. Die Expression scheint bei allen Zelltypen gut induzierbar zu sein und hat konstant die Erwartungen erfüllt. Die Gabe von holoTF hat entgegen den Erwartungen kaum Effekte erzeugt. Ferroportin-1 zeigt nach DFO-Gabe bei Fibroblasten eine Runterregulation, bei Neuronen eine Hochregulation. Weshalb die Neurone eine solche Regulation zeigen, konnte nicht eruiert werden. Überdies sollte man in Folgeexperimenten im Fall des DMT1 an andere Transkripte denken, um eventuell Effekte, die auf Proteinebene gezeigt wurden auch auf RNA-Ebene zu finden.

Fibroblasten teilen sich langsamer als SHSY5Y-Zellen. Neurone haben eine noch längere Generationszeit. Das könnte eventuell die verschiedenen Effekte erklären, weshalb SHSY5Y-Zellen komplett unterschiedlich reagieren und Neurone eher unauffällig sind. Vielleicht hätte man die Inkubationszeiten an die jeweiligen Generationszeiten anpassen sollen. Zusätzlich hätte man über eine Anpassung der Dosen von holoTF an die jeweiligen Zelltypen nachdenken müssen. Allerdings hat man dann wieder das Problem der Vergleichbarkeit...wie könnte man differentielle Expressionen erklären, wenn die Rahmenbedingungen unterschiedlich waren? Überdies ist ein *knock-down* von LRRK2 nicht vergleichbar mit einer G2019S-Mutation, von der angenommen wird, dass es zum gain-of-function kommt (Cookson 2010; West, et al. 2007; West, et al. 2005). Der LRRK2 *knock-down* scheint einen wesentlich größeren Effekt auf die Expressionen der Eisenstoffwechselgene auszuüben, als die G2019S-Mutation, wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Sensibilität Zelltyp-bedingt ist.

5.6 Genetische Marker in Hochrisikogruppen der Parkinson-Erkrankung

Über eine retrograde Befragung von Parkinson-Patienten, wurden diese Personen in drei klinisch-prämotorische Risikogruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe wurden Personen eingeschlossen, welche vor ihrer Parkinson-Erkrankung bereits eine Depression erlitten (Ishihara and Brayne 2006), in Gruppe zwei Personen mit einer Hyposmie (Siderowf, et al. 2012) und in Gruppe drei Personen mit einer REM (*rapid eye movement*)-Schlafstörung vor Beginn ihrer Parkinson-Diagnose (Postuma, et al. 2009). All diese Symptome sind stark assoziiert mit einem hohen Risiko einer späteren Entwicklung einer Parkinson-Erkrankung (Postuma, et al. 2010). Diese Einteilung, angelehnt an der Tübinger *TREND*-Studie (Gaenslen, et al. 2014), sollte herangezogen werden, um eventuell genetische Marker innerhalb dieser definierten Patientengruppen identifizieren zu können, welche als Hilfsmittel bei der Diagnosestellung der Parkinson-Erkrankung bereits im prämotorischen Zustand richtungsweisend wären. Dies würde eine frühere Therapie ermöglichen (Postuma and Berg 2016) und somit eine Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten mit sich bringen.

Diskussion

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden insgesamt 47 Gene (20 Gene aus dem Eisenstoffwechsel und 27 Gene, welche für die Blut-Hirn-Schranke wichtig sind; Genliste im Anhang) in allen drei Kohorten mittels *Next Generation Sequencing* (NGS, in der CeGaT GmbH, Tübingen) auf Punktmutationen im kodierenden Bereich hin analysiert.

Aufgrund einer stringenten Analyse blieben keine gemeinsamen genetischen Veränderungen in einer klinischen Gruppe übrig, welche bei mehreren Patienten zu finden waren. Ein SNP, welcher aufgrund seiner Allelfrequenz von 6,4 % (*Exome Variant Server*) deutlich zu häufig in der Bevölkerung auftritt, soll trotz allem kurz erwähnt werden, da dieser bereits häufiger im Zusammenhang mit Parkinson diskutiert wurde. In der Hyposmie-Kohorte konnte der SNP rs1800562 im *HFE*-Gen, welcher auf Proteinebene zu einer Veränderung von C zu Y an Position 282 führt, bei drei Patienten nachgewiesen werden, wenn gleich drei Patienten von 27 aus der Hyposmie-Gruppe nicht ausreichen, um diesen SNP als einen genetischen Marker bezeichnen zu können. In einer aktuellen Metaanalyse wird dieser SNP im *HFE*-Gen als protektiv im Falle einer Parkinson-Erkrankung angesehen (Xia, et al. 2015), wenngleich unsere Ergebnisse und auch andere Daten nicht dafür sprechen (Dekker, et al. 2003; Nandar and Connor 2011).

Möglicherweise muss für eine solche Analyse die Kohortengröße weitaus mehr Personen integriert haben, um einschlägige Ergebnisse erzielen zu können. Jedoch kann es genauso gut sein, dass es keinen genetischen Marker innerhalb dieser prämotorischen Gruppen gibt.

6

Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung in der westlichen Gesellschaft. Dabei kommt es zum Absterben der dopaminergen neuromelaninhaltigen Neurone in der Substantia nigra (SN), was zu den typischen Symptomen der Parkinson-Erkrankung führt. Die molekularen Mechanismen, die zu diesem spezifischen Zelltod führen, sind bis heute nicht vollständig verstanden und es gibt verschiedene Ansätze, die diverse zelluläre Misregulationen beschreiben, welche zum Zelltod beitragen könnten. So wird beispielsweise eine erhöhte Eisenkonzentration in der SN bei Parkinson-Patienten beobachtet, welche als eine mögliche Ursache im Prozess der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung diskutiert wird.

Zur Untersuchung des Einflusses von Eisen in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob eventuell genetische Veränderungen in Eisenstoffwechselgenen oder in einem spezifischen Gen der Blut-Hirn-Schranke vorliegen, die diese erhöhte Eisenakkumulation erklären könnten. Dies würde ein Hinweis für eine primäre Ursache im Krankheitsprozess sein. Dafür wurden diverse SNPs in den Genen *MDR1*, *IREB2* und *HO-1*, sowie ein Fragmentslängenpolymorphismus im *HO-1* Gen untersucht. Es ergab sich jedoch kein Hinweis für ein primäres Geschehen im Prozess der Erkrankung, da alle untersuchten Loci bei Patienten und Kontrollen ähnliche Allelfrequenzen zeigten.

Des Weiteren sind Unterschiede im Expressionsprofil diverser Gene zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollen denkbar, die zur Pathogenese beitragen könnten. Daher wurde das Expressionsprofil aus peripheren Blut dieser beiden Gruppen miteinander verglichen. Ein Eisenstoffwechselgen, das *iron-responsive element-binding protein 2* (*IREB2*), erwies sich dabei als vielversprechender Kandidat.

Im Verlauf der Parkinson-Erkrankung kommt es zur Ausbildung von sogenannten Lewy-Körperchen, welche eine Vielzahl von Proteinen beinhalten. Darunter auch das alpha-Synuklein-Protein, sowie drei- und auch zweiwertiges Eisen. Es wurde in dieser Arbeit erstmals der Beweis erbracht, dass alpha-Synuklein *in vitro* mit einem Eisen-regulierenden Protein, dem *IREB2*, interagiert. Ebenso konnte *IREB2* auch über immunhistochemische Färbungen an *post mortem* SN-Gewebe in den Lewy-Körperchen von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten signifikant niedrigere Expressionen von *IREB2* bei A30P-Mutationsträgern (alpha-Synuklein) verzeichnet werden im Vergleich zu gesunden Nicht-Mutationsträgern in dieser Familie. Dies verdeutlicht, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen *IREB2* und alpha-Synuklein geben muss, welcher möglicherweise am Prozess der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung eine Rolle spielen könnte und so die erhöhten Eisenkonzentrationen in der SN erklären würde.

Zusammenfassung und Ausblick

Ebenso wurde diese verringerte Expression von IREB2 auch in *post mortem* Gewebe der SN von Parkinson-Patienten über immunhistochemische Färbungen und Western Blot-Verfahren nachgewiesen.

Somit wurde versucht, die Bindung von alpha-Synuklein mit IREB2 durch diverse Mutationsansätze zu beeinflussen, um herauszufinden, wie spezifisch diese Bindung ist und welche Basen im 5'-UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein dafür benötigt werden. Zum anderen wurde versucht herauszufinden, wie der funktionelle Zusammenhang zwischen alpha-Synuklein und IREB2 aussehen könnte. Eine Überexpression von IREB2 führte zu einem signifikanten Anstieg der alpha-Synuklein Expression *in vitro*. Diese Daten belegen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem wichtigen alpha-Synuklein-Protein und IREB2 gibt, was dafür spricht, dass der Eisenstoffwechsel eine fundamentale Rolle im Prozess der Parkinson-Erkrankung spielt. Um den genauen molekularen Mechanismus dieses Zusammenspiels aufzudecken, sind weitere Anschluss-Studien notwendig.

Weiterführend wurde untersucht, ob verschiedene Eisenstresssituationen (Eisenüberschuss durch FeCl₃ oder holo-Transferrin, sowie Eisenentzug durch DFO) zu signifikant unterschiedlichen Reaktionen im Expressionsverhalten diverser Eisenstoffwechselfgene führen, wenn der genetische Hintergrund der verwendeten Zellen (SHSY5Y-Zellen, Fibroblasten und Neuronen) sich parkinsonspezifisch unterscheidet. Dafür wurden Zellen mit einer G2019S-Mutation, sowie einem LRRK2 *knock-down* und Wildtypzellen miteinander verglichen. Die Daten belegen, dass eine G2019S-Mutation kaum einen Einfluss auf die Reaktion im Expressionsverhalten der Eisenstoffwechselfgene ausübt, wohingegen ein LRRK2 *knock-down* sehr häufig signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Wildtypzellen reagiert. Jedoch betrifft dies meist nur die Stärke der Expression und zeigt keine gegenteiligen Reaktionen im Expressionsmuster. Man könnte es als sensiblere Reaktion gegenüber der Eisenstresssituation beurteilen. Dies verdeutlicht, dass Zellen mit einem LRRK2 *knock-down* im Falle einer Eisenstresssituation „überreagieren“ und somit nicht mehr adäquat auf Störungen der Eisenhomöostase reagieren können.

Bei 90 % aller Parkinson-Patienten findet man in der SN eine Hyperechogenität, welche mit der erhöhten Eisenakkumulation in der SN in Verbindung gebracht wird. Falls diese Hyperechogenität zusammen mit bisher unbekanntem genetischen Faktoren und klinischen prämotorischen Symptomen richtungsweisend für die Parkinson-Diagnose wäre noch bevor die typischen Symptome wie Tremor, Rigor oder Bradykinese in Erscheinung treten, wäre dies für eine früh beginnende Therapie von größter Bedeutung. Daher wurde nach solchen gemeinsamen genetischen Veränderungen in Eisenstoffwechselfgenen und Blut-Hirn-Schranken Genen bei drei verschiedenen Kohorten gesucht. Die Kohorten wurden klinisch anhand von Hochrisikosymptomen für eine spätere Parkinson-Erkrankung erstellt. Jedoch konnte keine genetische Veränderung in Zusammenhang mit einem dieser Symptome (Depression, Hyposmie, REM-Schlafstörung) nachgewiesen werden.

Dass der Eisenstoffwechsel eine wichtige Rolle im Prozess des Krankheitsgeschehens beim Morbus Parkinson spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit bewiesen. Erheblich von Bedeutung scheint dabei die Expression von IREB2 zu sein, welches mit alpha-Synuklein interagiert und seine Expression beeinflusst. Ob dies allerdings erst im Verlauf der Parkinson-Erkrankung geschieht oder eine primäre Rolle im Prozess des Krankheitsverlaufes spielt, muss durch weiterführende Studien analysiert werden. Die Daten lassen allerdings darauf schließen, dass es ein Regulationsversuch einer erkrankten Zelle ist und somit einen sekundären Prozess darstellt.

6.2 Ausblick

Um in Zukunft eine mögliche kausale Therapie für die Parkinson-Erkrankung entwickeln zu können, ist es äußerst wichtig, die Mechanismen der Pathogenese dieser Erkrankung bis ins Detail hin aufzudecken und zu verstehen. Dazu gehört auch das Verständnis, welchen Beitrag der Eisenstoffwechsel in der Pathogenese der Erkrankung spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass IREB2 eine wichtige Rolle im Prozess des Krankheitsgeschehens beim Morbus Parkinson ausübt. Daher sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden, wie und durch welche Faktoren die IREB2-Expression beim Morbus Parkinson beeinflusst wird. In den durchgeführten Experimenten im Rahmen dieser Arbeit blieb die IREB2-Expression bei Fibroblasten und Neuronen unverändert von Zuständen eines Eisenüberschusses oder eines Eisenentzuges. Dies ist ein kontroverses Ergebnis, da in der Literatur angegeben wird, dass gerade die zelluläre Eisenkonzentration für die Regulation von IREB2 verantwortlich sein soll. Möglicherweise waren die verabreichten Konzentrationen oder Inkubationszeiten nicht ausreichend, um einen solchen Regulationseffekt nachzuweisen. Man könnte daher die Experimente mit abweichenden Substanz-Konzentrationen und anderen Inkubationszeiten wiederholen.

Ebenso interessant erscheint der Zusammenhang der bedingten Expressionsunterschiede von alpha-Synuklein bei IREB2-Überexpression. Normalerweise wird davon ausgegangen, dass bei einer Bindung von IREB2 im 5' - UTR von alpha-Synuklein die Expression durch Hemmung der Translation runterreguliert sein müsste. Warum ist es aber genau umgekehrt zu beobachten gewesen? Um dieser Regulation nachzugehen, müssten detaillierte Experimente folgen, in denen nicht nur die bisher untersuchten Expressionen analysiert werden, sondern auch sämtliche potentielle Regulatoren von alpha-Synuklein. So könnte ein Muster über die bedingten Abhängigkeiten erstellt werden. Eventuell würden Zeitreihenexperimente Aufschluss über den Zeitpunkt der Hochregulation von alpha-Synuklein geben. Möglicherweise ist sogar eine Runterregulation nach kurzer Inkubation mit überexprimierten IREB2 zu beobachten und die Hochregulation resultiert erst später durch Aktivierung anderer, von IREB2 unabhängigen, Regulationsmechanismen. Darüber hinaus wäre eine Untersuchung

Zusammenfassung und Ausblick

des umgekehrten Falles spannend, indem man über eine si-RNA die Expression von IREB2 herunter fährt und daraufhin die alpha-Synuklein Expression beobachtet.

Zudem sollten zusätzliche Experimente geplant werden, um einen Nachweis zu erbringen, welche Basen im 5` - UTR Bereich der mRNA von alpha-Synuklein tatsächlich ausschlaggebend für eine Bindung mit IREB2 sind.

Wenn man den Zusammenhang der Interaktion von IREB2 mit alpha-Synuklein genau im Detail verstehen würde, kommt man der Aufklärung in Bezug auf die Eisenbeteiligung beim Morbus Parkinson einen enormen Schritt näher. Denn es handelt sich bei IREB2 nicht um ein Regulationsendprodukt, sondern genau im Gegenteil, IREB2 selbst reguliert viele Eisenimportmoleküle, eventuell auch Eisenexportmoleküle sowie die Eisenspeicherung.

7

Summary

Summary

Despite extensive research, the cause of Parkinson's disease (PD), the second most common neurodegenerative disorder, is still unclear. PD is characterized by the loss of dopaminergic neurons mainly in the substantia nigra (SN), and the presence of intracytoplasmic inclusions (Lewy bodies, LB). Elevated iron levels have been found in the SN of PD patients using transcranial sonography (TCS), visualized as a hyperechogenic region in the midbrain. Because iron has the capacity to enhance the amplification of reactive oxygen species, it appears to have a crucial role in the neurodegenerative process in PD. Therefore, it is tempting to speculate that genes active in brain iron metabolism may be involved in the pathogenesis of PD. However, it is not known whether increased SN iron levels in PD patients constitute a primary or secondary phenomenon in the disease process.

There are many proteins involved in iron transport, import into, and export out of the cell, and many regulatory elements control the expression of these proteins throughout the body. To evaluate the impact of genetic variants in iron-related genes in the pathogenesis of PD, and to answer the question regarding the possible role of genetic variants in iron-related genes and their role as a primary cause of the elevated iron levels in the SN of PD patients, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IREB2* gene and the *HO-1* gene, as well as fragment length polymorphism in the *HO-1* gene were analyzed and compared between PD patients and control subjects. In addition to the iron-related genes, SNPs in the *MDR1* gene encoding the P-gp protein, a crucial component of the blood brain barrier (BBB) responsible for an active efflux of molecules from the brain endothelium to the blood side, facilitating the clearance of harmful substances, were analyzed. Normally, the BBB precludes the free exchange of solute molecules between blood and brain and thus protects the brain from neurotoxic substances. An impairment of the BBB due to dysfunction of P-gp may contribute to the pathogenesis of PD in association with the development of hyperechogenicity in PD patients. There were no significantly different of any SNP in any of the analyzed genes between PD patients and controls.

Another question of this study concerned the possibility of different regulatory effects of genes when comparing PD patients and controls, and how they may potentially contribute to the pathogenesis of the disease. Therefore the expression profiles of both groups were compared using the GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array of Affymetrix. By validating the chip data using quantitative real time PCR, as well as via protein assays, the significant effect of differential gene regulation could be confirmed for the gene *IREB2*, which was shown to be downregulated in PD patients. The iron-responsive element-binding protein 2 (IREB2) post-transcriptionally regulates iron metabolism genes and has therefore an important role in iron homeostasis.

The characteristic hallmark of PD is the presence of LBs. These LBs consists of many different components, e.g. alpha-synuclein as well as ferric and ferrous iron. Immunohistochemical staining of post mortem SN tissue of PD patients also indicated the presence of IREB2 in LBs. Additionally, significantly lower levels of IREB2 were detected in carriers of the A30P mutation, in contrast to non-mutation carriers of the same family. Therefore it is tempting to speculate

Summary

that there may be a functional relationship between both components, alpha-synuclein and IREB2, which may contribute to the pathogenesis of PD and possibly to the hyperechogenicity of the SN in PD patients. This study demonstrates for the first time an in vitro interaction of alpha-synuclein with IREB2, previously found to be downregulated in PD patients.

For this reason different pull down experiments were performed in order to evaluate the specificity of the binding capacity of alpha-synuclein with IREB2. Artificial overexpression of IREB2 in cell culture experiments results in a significant increase in expression of alpha-synuclein. Moreover, further functional analysis should give an indication regarding the molecular mechanisms of this interaction. Nevertheless, due to the importance of alpha-synuclein in the pathogenesis of PD and the demonstrated interaction with IREB2, the impact of iron metabolism in the disease process is indisputable.

Furthermore, this study also investigated different cell lines and their response to varying situations of iron dependent stress (e.g. overload or depletion). In detail, the expression patterns of different iron metabolism genes were measured from PD-associated cell lines (fibroblasts with a G2019S mutation vs. wildtype, SHSY5Y cells containing a *LRK2* knock down vs wildtype as well as neurons with a *LRK2* G2019S mutation vs. wildtype) and compared. The obtained data provided evidence that the G2019S mutation only rarely impacts the expression patterns of the measured iron metabolism genes in response to iron dependent stress, whereas the *LRK2* knock down cells showed significant expression changes compared to the wildtype cells. *LRK2* knock down cells appear to “overreact” in situations of iron stress.

Using TCS, hyperechogenicity of the SN as a specific echofeature is visualized in more than 90% of patients with idiopathic PD in comparison to only 9% of healthy adults. A combination of this echofeature together with a specific genetic marker only found in patients with typical non-motor features, would be a perfect marker in early diagnosing PD and therefore would allow an early intervention. Three typical non-motor features, known to be present long before the first motor symptoms of PD are recognised, are hyposmia, depression and rapid eye movement behaviour disorder (RBD). To investigate the hypothesis that common genetic variants may be present in cohorts, who are at risk of developing PD, with one of the early non-motor features, next generation sequencing was performed. The focus of interest was to look at common variants in iron metabolism genes and BBB genes within the three cohort groups (hyposmia, depression and RBD). No genetic variants were found to be shared in any of the three groups which may have been associated with any of the early non-motor feature of PD.

This study demonstrates that iron metabolism plays a crucial role in the pathogenesis of PD. In particular, the expression of IREB2 appears to be of particular importance. IREB2 interacts with alpha-synuclein and alters its expression. It remains unclear whether this is a primary cause of disease or a secondary phenomenon related to the disease process. In order to answer this question, further studies are required. Nevertheless, the data seem to provide hints towards a secondary phenomenon in the disease process.

8. Literaturverzeichnis

- Aarsland, D., et al.
2003 Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol* 60(3):387-92.
- Abbott, N. J.
2005 Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25(1):5-23.
- Abbott, N. J., et al.
2010 Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37(1):13-25.
- Abbott, N. J., L. Ronnback, and E. Hansson
2006 Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1):41-53.
- Abbott, S. M., and A. Videnovic
2016 Chronic sleep disturbance and neural injury: links to neurodegenerative disease. *Nat Sci Sleep* 8:55-61.
- Abboud, S., and D. J. Haile
2000 A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275(26):19906-12.
- Abeliovich, A., and A. D. Gitler
2016 Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature* 539(7628):207-216.
- Altamura, S., and M. U. Muckenthaler
2009 Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis* 16(4):879-95.
- Anderson, C. P., et al.
2012 Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1823(9):1468-83.
- Anderson, G. J., and C. D. Vulpe
2009 Mammalian iron transport. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66(20):3241-61.
- Andrews, N. C.
2000 Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nature reviews. Genetics* 1(3):208-17.
- Arreguin, S., et al.
2009 Dopamine complexes of iron in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *J Inorg Biochem* 103(1):87-93.
- Auluck, Pavan K., et al.
2002 Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* 295(5556):865-868.
- Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard
2004 The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16(1):1-13.
- Barañano, D. E., and S. H. Snyder
2001 Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20):10996-11002.
- Barisani, D., and D. Conte
2002 Transferrin receptor 1 (TfR1) and putative stimulator of Fe transport (SFT) expression in iron deficiency and overload: an overview. *Blood Cells Mol Dis* 29(3):498-505.
- Barnham, K. J., and A. I. Bush
2008 Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol* 12(2):222-8.
- Bartels, A. L., et al.
2008a Blood-brain barrier P-glycoprotein function is not impaired in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14(6):505-8.
- Bartels, A. L., et al.
2008b Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 115(7):1001-1009.
- Bartzokis, G., et al.

Literaturverzeichnis

- 2000 In vivo evaluation of brain iron in Alzheimer disease using magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 57(1):47-53.
- Becker, G., et al.
1995 Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* 45(1):182-184.
- Begley, D. J.
2004 ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 10(12):1295-312.
- Ben-Shachar, D., P. Riederer, and M. B. Youdim
1991 Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 57(5):1609-1614.
- Berg, D., et al.
2002a Iron in neurodegenerative disorders. *Neurotox Res* 4(7-8):637-653.
- Berg, D., et al.
1999 Vulnerability of the nigrostriatal system as detected by transcranial ultrasound. *Neurology* 53(5):1026-1031.
- Berg, D., et al.
2001a Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 79(2):225-236.
- Berg, D., et al.
2001b Echogenicity of substantia nigra determined by transcranial ultrasound correlates with severity of parkinsonian symptoms induced by neuroleptic therapy. *Biological Psychiatry* 50(6):463-467.
- Berg, D., et al.
2005 Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. *Brain* 128(Pt 12):3000-11.
- Berg, Daniela, et al.
2006 Disturbance of iron metabolism in Parkinson's disease -- ultrasonography as a biomarker. *Neurotox Res* 9(1):1-13.
- Berg, Daniela, et al.
2002b Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Archives of Neurology* 59(6):999-1005.
- Berg, Daniela, and Moussa B. H. Youdim
2006 Role of iron in neurodegenerative disorders. *Topics in Magnetic Resonance Imaging: TMRI* 17(1):5-17.
- Bernheimer, H., et al.
1973 Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the neurological sciences* 20(4):415-55.
- Bernstein, S. E.
1987 Hereditary hypotransferrinemia with hemosiderosis, a murine disorder resembling human attransferrinemia. *J Lab Clin Med* 110(6):690-705.
- Birkmayer, W., and O. Hornykiewicz
1961 [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787-8.
- Boelmans, K., et al.
2012 Brain iron deposition fingerprints in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27(3):421-7.
- Bolognin, S., L. Messori, and P. Zatta
2009 Metal ion physiopathology in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 11(4):223-38.
- Bonifati, Vincenzo, et al.
2003 Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science (New York, N.Y.)* 299(5604):256-259.
- Borie, Claire, et al.
2002 Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease. *J Neurol* 249(7):801-804.
- Bosgraaf, L., and P. J. Van Haastert
2003 Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1643(1-3):5-10.
- Braak, H., et al.

Literaturverzeichnis

- 1995 Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum* 46:15-31.
- Bradbury, M. W.
1997 Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem* 69(2):443-54.
- Bradford, M. M.
1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Brightman, M. W., et al.
1970 The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J Neurol Sci* 10(3):215-39.
- Burke, R. E.
2007 Programmed cell death in Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol* 83:591-605.
- Campbell, N.A.
1997 *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Canet-Avilés, Rosa M., et al.
2004 The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(24):9103-9108.
- Chaudhuri, K. Ray, and Anthony H. V. Schapira
2009 Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 8(5):464-474.
- Cheng, K., et al.
2010 Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates beta cell function in mouse and human islets. *J Clin Invest* 120(6):2171-83.
- Chew, K. C., et al.
2011 Enhanced autophagy from chronic toxicity of iron and mutant A53T alpha-synuclein: implications for neuronal cell death in Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry* 286(38):33380-9.
- Cho, S. W., et al.
2013 Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31(3):230-2.
- Choi, J., et al.
2012 Duodenal reductase activity and spleen iron stores are reduced and erythropoiesis is abnormal in Dcytb knockout mice exposed to hypoxic conditions. *J Nutr* 142(11):1929-34.
- Connor, J. R., et al.
1990 Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* 27(4):595-611.
- Cookson, M. R.
2010 The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nature reviews. Neuroscience* 11(12):791-7.
- Coon, Keith D., et al.
2006 Preliminary demonstration of an allelic association of the IREB2 gene with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9(3):225-233.
- Cooperman, S. S., et al.
2005 Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *Blood* 106(3):1084-91.
- Crichton, R. R., D. T. Dexter, and R. J. Ward
2011 Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases. *J Neural Transm* 118:301-314.
- Dallas, S., D. S. Miller, and R. Bendayan
2006 Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 58(2):140-61.
- Davies, Paul, Dima Moualla, and David R. Brown
2011 Alpha-synuclein is a cellular ferrireductase. *PLoS One* 6(1):e15814-e15814.
- de Rijk, M. C., et al.
2000 Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54(11 Suppl 5):S21-3.
- Dekker, M. C., et al.

Literaturverzeichnis

- 2003 Mutations in the hemochromatosis gene (HFE), Parkinson's disease and parkinsonism. *Neurosci Lett* 348(2):117-9.
- Dennery, P. A.
2000 Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul* 36:181-99.
- Devi, Latha, et al.
2008 Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283(14):9089-9100.
- Dexter, D. T., et al.
1989 Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52(6):1830-1836.
- Donovan, A., et al.
2000 Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403(6771):776-81.
- Doré, S., et al.
1999 Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5):2445-2450.
- Double, K. L., et al.
2008 The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65(11):1669-1682.
- Drechsel, D. A., and M. Patel
2008 Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 44(11):1873-86.
- Drozdik, M., et al.
2003 Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 13(5):259-63.
- Dzamko, N., C. L. Geczy, and G. M. Halliday
2015 Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience* 302:89-102.
- Engelhardt, B., and H. Wolburg
2004 Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34(11):2955-63.
- Enk, C. et al
2004 Grundlagenwissen. Was man über die Parkinson-Krankheit wissen sollte. Patientenbroschüre, Teil 1, Orion Pharma GmbH, Hamburg
- Fabre, E., et al.
1999 Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J Physiol Biochem* 55(4):325-31.
- Factor, S. A.
2008 Current status of symptomatic medical therapy in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 5(2):164-80.
- Farrer, M., et al.
1999 A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet* 8(1):81-5.
- Faucheux, B. A., et al.
1999 Blood vessels change in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease. *Lancet* 353(9157):981-2.
- Faucheux, B. A., et al.
2002 Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* 83(2):320-30.
- Febbraro, F., et al.
2012 alpha-Synuclein expression is modulated at the translational level by iron. *Neuroreport* 23(9):576-80.
- Fleming, M. D., et al.
1998 Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3):1148-53.
- Frankel, D., K. Mehndate, and H. M. Schipper
2000 Role of heme oxygenase-1 in the regulation of manganese superoxide dismutase gene expression in oxidatively-challenged astroglia. *J Cell Physiol* 185(1):80-6.

Literaturverzeichnis

- Friedlich, A. L., R. E. Tanzi, and J. T. Rogers
2007 The 5'-untranslated region of Parkinson's disease alpha-synuclein messengerRNA contains a predicted iron responsive element. *Molecular Psychiatry* 12(3):222-223.
- Fukushima, T., et al.
2001 Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* 276(48):44413-8.
- Funke, C., et al.
2013 Genetics and iron in the systems biology of Parkinson's disease and some related disorders. *Neurochem Int* 62(5):637-52.
- Funke, Claudia, et al.
2009a Genetic analysis of coding SNPs in blood-brain barrier transporter MDR1 in European Parkinson's disease patients. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 116(4):443-450.
- Funke, Claudia, et al.
2009b Genetic analysis of heme oxygenase-1 (HO-1) in German Parkinson's disease patients. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 116(7):853-859.
- Gaenslen, A., et al.
2014 Prodromal features for Parkinson's disease--baseline data from the TREND study. *Eur J Neurol* 21(5):766-72.
- Galvin, J. E., et al.
1997 Monoclonal antibodies to purified cortical Lewy bodies recognize the mid-size neurofilament subunit. *Ann Neurol* 42(4):595-603.
- Galy, B., et al.
2005 Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood* 106(7):2580-9.
- Ganz, T.
2013 Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 93(4):1721-41.
- Ganz, T., and E. Nemeth
2012 Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823(9):1434-43.
- Garrick, M. D., et al.
2012 Isoform specific regulation of divalent metal (ion) transporter (DMT1) by proteasomal degradation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*.
- Gasser, T.
2009 Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert reviews in molecular medicine* 11:e22.
- 2015 Usefulness of Genetic Testing in PD and PD Trials: A Balanced Review. *J Parkinsons Dis* 5(2):209-15.
- Gasser, T., J. Hardy, and Y. Mizuno
2011 Milestones in PD genetics. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26(6):1042-8.
- Gerlach, M., et al.
1994 Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 63(3):793-807.
- Gerlach, M., et al.
2006 Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. *J Neural Transm Suppl* (70):133-42.
- Gerlach, M., et al.
2007 Die Parkinson-Krankheit. *Grundlagen, Klinik, Therapie*. Springer, Wien, New York.
- Ghosh, M. C., L. Zhang, and T. A. Rouault
2015 Iron misregulation and neurodegenerative disease in mouse models that lack iron regulatory proteins. *Neurobiol Dis*.
- Gibb, W. R.
1986 Idiopathic Parkinson's disease and the Lewy body disorders. *Neuropathology and applied neurobiology* 12(3):223-34.
-

Literaturverzeichnis

- 1992 Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 581(2):283-291.
- Gilks, William P., et al.
2005 A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365(9457):415-416.
- Gomez-Suaga, P., et al.
2012 A Link between Autophagy and the Pathophysiology of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2012:324521.
- Gorell, J. M., et al.
1995 Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology* 45(6):1138-43.
- Götz, Mario E., et al.
2004 The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012:193-208.
- Greggio, E., et al.
2006a Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiology of disease* 23(2):329-41.
- Greggio, E., et al.
2008 The Parkinson disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intramolecular autophosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 283(24):16906-14.
- Greggio, Elisa, et al.
2006b Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis* 23(2):329-341.
- Gunshin, H., et al.
2005 Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest* 115(5):1258-66.
- Hallgren, B., and P. Sourander
1958 The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* 3(1):41-51.
- Hantraye, P., et al.
1996 Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med* 2(9):1017-21.
- Hardy, J.
2010 Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron* 68(2):201-6.
- Hardy, J., et al.
2009 The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Current opinion in genetics & development* 19(3):254-65.
- Hare, D. J., M. Gerlach, and P. Riederer
2012 Considerations for measuring iron in post-mortem tissue of Parkinson's disease patients. *J Neural Transm (Vienna)* 119(12):1515-21.
- Hasegawa, K., and H. Kowa
1997 Autosomal dominant familial Parkinson disease: older onset of age, and good response to levodopa therapy. *Eur Neurol* 38 Suppl 1:39-43.
- Hayashi, A., et al.
1993 Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am J Hum Genet* 53(1):201-13.
- He, Q., et al.
2011 Alpha-synuclein aggregation is involved in the toxicity induced by ferric iron to SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Neural Transm (Vienna)* 118(3):397-406.
- Hentze, M. W., et al.
2010 Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142(1):24-38.
- Hernandez, D. G., et al.
2005 Clinical and positron emission tomography of Parkinson's disease caused by LRRK2. *Ann Neurol* 57(3):453-6.
- Hill, J. M., and R. C. Switzer, 3rd
1984 The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* 11(3):595-603.
- Hirsch, E. C.

Literaturverzeichnis

- 2006 Altered regulation of iron transport and storage in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* (71):201-4.
- Hubert, N., and M. W. Hentze
2002 Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19):12345-50.
- li, K., et al.
1997 Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56(2):125-131.
- Ishihara, L., and C. Brayne
2006 A systematic review of depression and mental illness preceding Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 113(4):211-20.
- Jackson, S. P.
2002 Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23(5):687-96.
- Jaleel, Mahaboobi, et al.
2007 LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochem J* 405(2):307-317.
- Jellinger, K. A.
1999 The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 14(2):115-40.
- 2012 Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27(1):8-30.
- Jenner, P.
1998 Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13 Suppl 1:24-34.
- Jenner, P., and C. W. Olanow
1998 Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44(3 Suppl 1):S72-84.
- Jeong, S. Y., and S. David
2003 Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem* 278(29):27144-8.
- Jiang, H., et al.
2010 Up-regulation of divalent metal transporter 1 in 6-hydroxydopamine intoxication is IRE/IRP dependent. *Cell Res* 20(3):345-56.
- Jinek, M., et al.
2013 RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2:e00471.
- Jomova, K., et al.
2010 Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*.
- Jomova, Klaudia, and Marian Valko
2011 Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283(2-3):65-87.
- Kalia, L. V., and A. E. Lang
2015 Parkinson's disease. *Lancet* 386(9996):896-912.
- Kastner, A., et al.
1992 Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J Neurochem* 59(3):1080-1089.
- Kaur, D., et al.
2003 Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: A novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 37(6):899-909.
- Ke, Y., et al.
2005 Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain. *Neurobiol Aging* 26(5):739-48.
- Kim, Y., et al.
2013 A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol* 31(3):251-8.
- Kimpara, T., et al.
1997 Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Human Genetics* 100(1):145-147.
- Kiyohara, C., et al.

Literaturverzeichnis

- 2013 MDR1 C3435T polymorphism and interaction with environmental factors in risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet* 28(2):138-43.
- Klockgether, T.
2004 Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell Tissue Res* 318(1):115-20.
- Koeppen, A. H.
2003 A brief history of brain iron research. *J Neurol Sci* 207(1-2):95-7.
- Kono, S.
2012 Aceruloplasminemia. *Curr Drug Targets* 13(9):1190-9.
- Kortekaas, Rudie, et al.
2005 Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol* 57(2):176-179.
- Krüger, R., et al.
1998 Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics* 18(2):106-108.
- Kubo, Shin-ichiro, Nobutaka Hattori, and Yoshikuni Mizuno
2006 Recessive Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 21(7):885-893.
- Kumari, Udhaya, and E. K. Tan
2009 LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients. *FEBS J* 276(22):6455-6463.
- Kuzuhara, S., et al.
1988 Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathologica* 75(4):345-353.
- Law, B. M., et al.
2014 A direct interaction between leucine-rich repeat kinase 2 and specific beta-tubulin isoforms regulates tubulin acetylation. *J Biol Chem* 289(2):895-908.
- Lee, C. G. L., et al.
2004a MDR1, the blood-brain barrier transporter, is associated with Parkinson's disease in ethnic Chinese. *Journal of Medical Genetics* 41(5):e60-e60.
- Lee, Donna W., Julie K. Andersen, and Deepinder Kaur
2006 Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. *Molecular Interventions* 6(2):89-97.
- Lee, J. W., et al.
2004b Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36(1):1-12.
- Lee, P. L., et al.
1998 The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis* 24(2):199-215.
- Lev, Nirit, et al.
2008 Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: implications for neuroprotection. *Neurotoxicology* 29(3):397-405.
- Lewis, P. A., et al.
2007 The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochemical and biophysical research communications* 357(3):668-71.
- Li, Hong Mei, et al.
2005 Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radical Research* 39(10):1091-1099.
- Li, Wen-Jing, et al.
2010a Dose- and time-dependent alpha-synuclein aggregation induced by ferric iron in SK-N-SH cells. *Neuroscience Bulletin* 26(3):205-210.
- Li, Wenjing, et al.
2010b Oxidative Stress Partially Contributes to Iron-Induced Alpha-Synuclein Aggregation in SK-N-SH Cells. *Neurotox Res*.
- Li, X., et al.
2007 Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants. *Journal of neurochemistry* 103(1):238-47.
- Licker, V., et al.

Literaturverzeichnis

- 2014 Proteomic analysis of human substantia nigra identifies novel candidates involved in Parkinson's disease pathogenesis. *Proteomics* 14(6):784-94.
- Licker, Virginie, et al.
2009 Proteomics in human Parkinson's disease research. *Journal of Proteomics* 73(1):10-29.
- Lill, R., et al.
1999 The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* 380(10):1157-66.
- Lisby, M., and R. Rothstein
2005 Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes. *Biochimie* 87(7):579-89.
- Litvan, Irene, et al.
2007 The etiopathogenesis of Parkinson disease and suggestions for future research. Part I. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 66(4):251-257.
- Liu, X., et al.
2013 Pesticide-induced gene mutations and Parkinson disease risk: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 17(11):826-32.
- Liu, X., et al.
2004 Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos* 32(1):132-9.
- Liuzzi, J. P., et al.
2006 Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(37):13612-7.
- Llesuy, S. F., and M. L. Tomaro
1994 Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 1223(1):9-14.
- Lotharius, Julie, and Patrik Brundin
2002 Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nature Reviews. Neuroscience* 3(12):932-942.
- Mackenzie, B., et al.
2007 Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem J* 403(1):59-69.
- MacLeod, D., et al.
2006 The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron* 52(4):587-93.
- Maetzler, Walter, Inga Liepelt, and Daniela Berg
2009 Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol* 8(12):1158-1171.
- Maio, N., and T. A. Rouault
2016 Mammalian Fe-S proteins: definition of a consensus motif recognized by the co-chaperone HSC20. *Metallomics* 8(10):1032-1046.
- Mann, V. M., et al.
1994 Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol* 36(6):876-81.
- Mao, Z., et al.
2008 Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)* 7(10):1765-71.
- Marin, I.
2006 The Parkinson disease gene LRRK2: evolutionary and structural insights. *Mol Biol Evol* 23(12):2423-33.
- Mata, I. F., et al.
2006 LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends in neurosciences* 29(5):286-93.
- McCarthy, R. C., and D. J. Kosman
2013 Ferroportin and exocytosomal ferroxidase activity are required for brain microvascular endothelial cell iron efflux. *J Biol Chem* 288(24):17932-40.
- McKie, A. T.
2008 The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochemical Society transactions* 36(Pt 6):1239-41.
- McKie, A. T., et al.

Literaturverzeichnis

- 2000 A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5(2):299-309.
- McNaught, K. S., and P. Jenner
2001 Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 297(3):191-4.
- Meyron-Holtz, E. G., et al.
2004 Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J* 23(2):386-95.
- Miller, R. L., et al.
2009 Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 34(1):55-65.
- Mims, M. P., and J. T. Prchal
2005 Divalent metal transporter 1. *Hematology* 10(4):339-45.
- Moos, T.
2002 Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull* 49(4):279-301.
- Moos, T., et al.
2007 Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* 103(5):1730-40.
- Muckenthaler, M. U., B. Galy, and M. W. Hentze
2008 Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual review of nutrition* 28:197-213.
- Nakagami, T., et al.
1993 A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta* 1158(2):189-193.
- Nandar, W., and J. R. Connor
2011 HFE gene variants affect iron in the brain. *J Nutr* 141(4):729S-739S.
- Nemeth, E., et al.
2004 Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306(5704):2090-3.
- Nutt, J. G., and J. H. Fellman
1984 Pharmacokinetics of levodopa. *Clin Neuropharmacol* 7(1):35-49.
- Ohgami, R. S., et al.
2005 Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 37(11):1264-9.
- Ohgami, R. S., et al.
2006 The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 108(4):1388-94.
- Paisán-Ruíz, Coro, et al.
2004 Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44(4):595-600.
- Paris, I., et al.
2005 Dopamine-dependent iron toxicity in cells derived from rat hypothalamus. *Chem Res Toxicol* 18(3):415-9.
- Parisiadou, L., and H. Cai
2010 LRRK2 function on actin and microtubule dynamics in Parkinson disease. *Commun Integr Biol* 3(5):396-400.
- Peng, Y., et al.
2010a Binding of alpha-synuclein with Fe(III) and with Fe(II) and biological implications of the resultant complexes. *J Inorg Biochem* 104(4):365-70.
- Peng, Yong, et al.
2010b Binding of alpha-synuclein with Fe(III) and with Fe(II) and biological implications of the resultant complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104(4):365-370.
- Pennathur, S., et al.
1999 Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, ortho-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 274(49):34621-8.
- Perez, Carlos A., Yong Tong, and Maolin Guo
2008 Iron Chelators as Potential Therapeutic Agents for Parkinson's Disease. *Current Bioactive Compounds* 4(3):150-158.
- Peyssonaux, C., V. Nizet, and R. S. Johnson

Literaturverzeichnis

- 2008 Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle* 7(1):28-32.
- Piantadosi, C. A., M. S. Carraway, and H. B. Suliman
2006 Carbon monoxide, oxidative stress, and mitochondrial permeability pore transition. *Free Radic Biol Med* 40(8):1332-9.
- Pisli, A., and K. F. Winklhofer
2012 Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* 123(2):173-88.
- Plowey, E. D., et al.
2008 Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 105(3):1048-56.
- Plun-Favreau, Hélène, et al.
2007 The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nature Cell Biology* 9(11):1243-1252.
- Polymeropoulos, M. H., et al.
1997 Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* 276(5321):2045-2047.
- Postuma, R. B., and D. Berg
2016 Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 12(11):622-634.
- Postuma, R. B., J. F. Gagnon, and J. Montplaisir
2010 Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81(9):1008-13.
- Postuma, R. B., et al.
2009 Quantifying the risk of neurodegenerative disease in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 72(15):1296-300.
- Przedborski, S., et al.
1996 Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10):4565-71.
- Recalcati, S., G. Minotti, and G. Cairo
2010 Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxid Redox Signal* 13(10):1593-616.
- Revell, M. A.
2015 Deep Brain Stimulation for Movement Disorders. *Nurs Clin North Am* 50(4):691-701.
- Riederer, P., et al.
1989 Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* 52(2):515-520.
- Riederer, P., and S. Wuketich
1976 Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *Journal of neural transmission* 38(3-4):277-301.
- Rogers, J. T., et al.
2002 An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J Biol Chem* 277(47):45518-28.
- Roth, Jerome A., et al.
2010 Parkin regulates metal transport via proteasomal degradation of the 1B isoforms of divalent metal transporter 1. *J Neurochem* 113(2):454-464.
- Rothkamm, K., et al.
2003 Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23(16):5706-15.
- Rouault, T. A.
2006 The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nature chemical biology* 2(8):406-14.
- 2013 Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14(8):551-64.
- Rouault, T. A., and S. Cooperman
2006 Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol* 13(3):142-8.
- Ryter, S. W., and R. M. Tyrrell

Literaturverzeichnis

- 2000 The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28(2):289-309.
- Salahudeen, A. A., et al.
2009 An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science* 326(5953):722-6.
- Salazar, J., et al.
2008 Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47):18578-83.
- Sanna, G., et al.
2012 LRRK2 and vesicle trafficking. *Biochem Soc Trans* 40(5):1117-22.
- Schapira, A. H., et al.
1990 Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54(3):823-7.
- Schapira, A. H., et al.
1989 Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1(8649):1269.
- Schipper, H. M.
2000 Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Experimental Gerontology* 35(6-7):821-830.
- 2004a Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 1012:84-93.
- Schipper, H. M., A. Liberman, and E. G. Stopa
1998 Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 150(1):60-68.
- Schipper, H. M., and W. Song
2015 A heme oxygenase-1 transducer model of degenerative and developmental brain disorders. *Int J Mol Sci* 16(3):5400-19.
- Schipper, H. M., et al.
2009 Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem* 110(2):469-85.
- Schipper, Hyman M.
2004b Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing. *Ageing Research Reviews* 3(3):265-301.
- Schulz, K., et al.
2011 Iron efflux from oligodendrocytes is differentially regulated in gray and white matter. *J Neurosci* 31(37):13301-11.
- Schweitzer, Katherine J., et al.
2007 Transcranial ultrasound in different monogenetic subtypes of Parkinson's disease. *J Neurol* 254(5):613-616.
- Shen, Jie
2004 Protein kinases linked to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuron* 44(4):575-577.
- Shendelman, Shoshana, et al.
2004 DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biology* 2(11):e362-e362.
- Shibahara, S.
1994 Heme oxygenase – regulation of and physiological implication in heme catabolism. *In* Fujita H (Ed.) *Regulation of heme protein synthesis*. AlphaMed Press, Dayton.
- Sian-Hülsmann, J., et al.
2011 The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*.
- Siderowf, A., et al.
2012 Impaired olfaction and other prodromal features in the Parkinson At-Risk Syndrome Study. *Mov Disord* 27(3):406-12.
- Singh, Neha, Viness Pillay, and Yahya E. Choonara
2007 Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 81(1):29-44.
- Singleton, A. B., et al.
2003 alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302(5646):841.
- Smith, S. R., et al.

Literaturverzeichnis

- 2004 Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies. *Ann N Y Acad Sci* 1012:65-83.
- Smith, S. R., et al.
2006a Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. *Blood Cells Mol Dis* 36(2):283-7.
- Smith, W. W., et al.
2006b Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature neuroscience* 9(10):1231-3.
- Smith, Wanli W., et al.
2006c Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature Neuroscience* 9(10):1231-1233.
- Smith, Wanli W., et al.
2005 Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51):18676-18681.
- Snyder, A. M., and J. R. Connor
2009a Iron, the substantia nigra and related neurological disorders. *Biochim Biophys Acta* 1790(7):606-14.
- Snyder, Amanda M., and James R. Connor
2009b Iron, the substantia nigra and related neurological disorders. *Biochim Biophys Acta* 1790(7):606-614.
- Sofic, E., et al.
1991 Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem* 56(3):978-982.
- Sofic, E., et al.
1988 Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl* 74(3):199-205.
- Song, N., et al.
2010a Ferroportin1 and hephaestin overexpression attenuate iron-induced oxidative stress in MES23.5 dopaminergic cells. *J Cell Biochem* 110(5):1063-72.
- 2010b Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 48(2):332-41.
- Spatz, H.
1922 Über den Eisennachweis im Gehirn, besonders in Zentren des extrapyramidal-motorischen Systems. T. 1. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 77, 261–390
- Spillantini, M. G., et al.
1997 Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645):839-840.
- Stocker, R., et al.
1987 Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science (New York, N.Y.)* 235(4792):1043-1046.
- Sullivan, E. V., et al.
2009 Relevance of Iron Deposition in Deep Gray Matter Brain Structures to Cognitive and Motor Performance in Healthy Elderly Men and Women: Exploratory Findings. *Brain Imaging Behav* 3(2):167-175.
- Takata, M., et al.
1998 Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 17(18):5497-508.
- Tan, E. K., et al.
2005 Effect of MDR1 haplotype on risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 62(3):460-4.
- Tan, Eng-King, and Lisa M. Skipper
2007 Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Human Mutation* 28(7):641-653.
- Thomas, B., and M. F. Beal
2007 Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 16 Spec No. 2:R183-94.
- Todorich, B., X. Zhang, and J. R. Connor
2011 H-ferritin is the major source of iron for oligodendrocytes. *Glia* 59(6):927-35.
- Trepel, M.

Literaturverzeichnis

- 2008 Neuroanatomie. Struktur und Funktion. Elsevier Urban und Fischer. München, Jena.
- Triantafyllou, A., et al.
2006 Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism. *Free Radic Res* 40(8):847-56.
- Tsika, E., and D. J. Moore
2012 Mechanisms of LRRK2-mediated neurodegeneration. *Current neurology and neuroscience reports* 12(3):251-60.
- Urnov, F. D., et al.
2010 Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11(9):636-46.
- Valente, Enza Maria, et al.
2004 Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)* 304(5674):1158-1160.
- Van der Schyf, Cornelis J., et al.
2006 Multifunctional neuroprotective drugs targeting monoamine oxidase inhibition, iron chelation, adenosine receptors, and cholinergic and glutamatergic action for neurodegenerative diseases. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 15(8):873-886.
- Vashisht, A. A., et al.
2009 Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science* 326(5953):718-21.
- Vekrellis, Kostas, Hardy J. Rideout, and Leonidas Stefanis
2004 Neurobiology of alpha-synuclein. *Molecular Neurobiology* 30(1):1-21.
- Vicente, A. M., and R. M. Costa
2012 Looking at the trees in the central forest: a new pallidal-striatal cell type. *Neuron* 74(6):967-9.
- Visanji, N. P., et al.
2013 Iron deficiency in parkinsonism: region-specific iron dysregulation in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Parkinsons Dis* 3(4):523-37.
- Vulpe, C. D., et al.
1999 Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21(2):195-9.
- Waak, Jens, et al.
2009 Oxidizable residues mediating protein stability and cytoprotective interaction of DJ-1 with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* 284(21):14245-14257.
- Walden, W. E., et al.
2006 Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* 314(5807):1903-8.
- Walter, U., et al.
2002 Substantia nigra echogenicity is normal in non-extrapyramidal cerebral disorders but increased in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 109(2):191-196.
- Wang, J., H. Jiang, and J. X. Xie
2007 Ferroportin1 and hephaestin are involved in the nigral iron accumulation of 6-OHDA-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 25(9):2766-72.
- Weinreb, O., et al.
2013 Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med* 62:52-64.
- Wessling-Resnick, M.
2006 Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 290(1):G1-6.
- West, A. B., et al.
2007 Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human molecular genetics* 16(2):223-32.
- West, Andrew B., et al.
2005 Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(46):16842-16847.
- Whitnall, Megan, and Des R. Richardson
2006 Iron: a new target for pharmacological intervention in neurodegenerative diseases. *Seminars in Pediatric Neurology* 13(3):186-197.
- Wilkinson, N., and K. Pantopoulos
2014 The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front Pharmacol* 5:176.

Literaturverzeichnis

- Winklhofer, K. F., and C. Haass
2010 Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802(1):29-44.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, and B. Engelhardt
2005 Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol* 109(2):181-90.
- Wolf, T. L., J. Kotun, and J. H. Meador-Woodruff
2006 Plasma copper, iron, ceruloplasmin and ferroxidase activity in schizophrenia. *Schizophr Res* 86(1-3):167-71.
- Wu, L. J., et al.
2004 Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res* 1001(1-2):108-17.
- Xia, J., et al.
2015 The association between the C282Y and H63D polymorphisms of HFE gene and the risk of Parkinson's disease: A meta-analysis. *Neurosci Lett* 595:99-103.
- Youdim, M. B., D. Ben-Shachar, and P. Riederer
1989 Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurol Scand Suppl* 126:47-54.
- 1991 Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson's disease. *European Neurology* 31 Suppl 1:34-40.
- Youdim, M. B., and P. Riederer
1993 The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum* 40:57-67.
- Youn, J. K., et al.
2014 PEP-1-HO-1 prevents MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in a Parkinson's disease mouse model. *BMB Rep* 47(10):569-74.
- Zakin, M. M., B. Baron, and F. Guillou
2002 Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene. *Dev Neurosci* 24(2-3):222-6.
- Zecca, L., et al.
2004a The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9843-8.
- Zecca, L., et al.
2004b Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5(11):863-873.
- Zecca, L., et al.
2003 Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26(11):578-80.
- Zecca, Luigi, et al.
2004c Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience* 5(11):863-873.
- Zhang, J., and C. A. Piantadosi
1992 Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J Clin Invest* 90(4):1193-9.
- Zhang, Y., and W. M. Pardridge
2001 Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 76(5):1597-600.
- Zhang, Z., et al.
2014 Pro-inflammatory cytokine-mediated ferroportin down-regulation contributes to the nigral iron accumulation in lipopolysaccharide-induced Parkinsonian models. *Neuroscience* 257:20-30.
- Zimprich, A., et al.
2004a The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet* 74(1):11-9.
- Zimprich, Alexander, et al.
2004b Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44(4):601-607.
- Zschiegner, K., et al.
2009 MDR1 variants and risk of Parkinson disease. Association with pesticide exposure? *J Neurol* 256(1):115-20.

Anhang

9. Anhang

Tabelle 9.1: Genliste der 266 differentiell exprimierten Gene bei Parkinson-Patienten und Kontrollen (Daten gewonnen aus Chip-Experiment, beschrieben in Abschnitt 4.3), rot markiert sind die Gene, welche für eine Validierung herangezogen wurden, FC fold change

Gene Title	Gene Symbol	FC Absolute ([patients] Vs [Controls])	pvalue ([patients] Vs [Controls])	regulation ([patients] Vs [Controls])
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain	<i>ACADM</i>	2.021.184	0.019048816	down
adducin 3 (gamma)	<i>ADD3</i>	23.836.193	0.015720047	down
adducin 3 (gamma)	<i>ADD3</i>	28.327.065	0.015294533	down
alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	<i>ADH5</i>	21.403.518	0.017890198	down
acireductone dioxygenase 1	<i>ADI1</i>	20.848.362	0.0040106685	down
adenosine kinase	<i>ADK</i>	2.011.637	1,01E+03	down
angiogenic factor with G patch and FHA domains 1	<i>AGGF1</i>	2.151.562	0.006814238	down
asparagine-linked glycosylation 6 homolog (S. cerevisiae, alpha-1,3-glucosyltransferase)	<i>ALG6</i>	22.492.182	0.007885844	down
adhesion molecule with Ig-like domain 2	<i>AMIGO2</i>	23.824.172	0.009800886	down
angel homolog 2 (Drosophila)	<i>ANGEL2</i>	25.311.503	0.010679696	down
ankyrin repeat domain 12	<i>ANKRD12</i>	20.815.032	0.023438048	down
amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	<i>APPBP2</i>	20.899.217	0.0036749258	down
Rho GTPase activating protein 26	<i>ARHGAP26</i>	22.385.185	0.013497959	up
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	<i>ARHGDI1</i>	24.004.061	0.0033718476	down
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	<i>ARHGEF3</i>	21.020.727	0.013853246	down
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	<i>ARHGEF7</i>	21.650.436	0.009026389	up
AT rich interactive domain 4B (RBP1-like) /// AT rich interactive domain 4B (RBP1-like)	<i>ARID4B</i>	21.183.257	0.019394984	down
ATPase family, AAA domain containing 1	<i>ATAD1</i>	2.355.849	0.014907725	down

Anhang

ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1	<i>ATP2C1</i>	20.256.019	0.0027352397	down
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1	<i>ATP6V0E1</i>	21.026.127	0.0048243348	down
ataxia telangiectasia and Rad3 related	<i>ATR</i>	21.360.056	0.008552469	down
BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2 /// BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	<i>BACH2</i>	2.016.276	0.008669185	down
BAT2 domain containing 1	<i>BAT2D1</i>	20.369.136	0.011414873	up
Bobby sox homolog (Drosophila)	<i>BBX</i>	22.121.785	9,79E+02	down
B-cell CLL/lymphoma 2	<i>BCL2</i>	2.128.429	0.0031811455	down
BCL2-associated transcription factor 1	<i>BCLAF1</i>	23.510.947	0.008140345	down
bromodomain PHD finger transcription factor	<i>BPTF</i>	21.281.383	0.006596655	down
chromosome 1 open reading frame 9	<i>C1orf9</i>	25.164.108	0.008797942	down
Chromosome 21 open reading frame 66	<i>C21orf66</i>	22.918.031	0.0125555275	down
chromosome 3 open reading frame 9	<i>C3orf9</i>	21.848.805	0.00943519	down
chromosome 6 open reading frame 192	<i>C6orf192</i>	2.256.584	0.002484248	down
chromosome 6 open reading frame 55 /// chromosome 6 open reading frame 55	<i>C6orf55</i>	20.811.813	0.0062721497	down
chromosome 9 open reading frame 97 /// chromosome 9 open reading frame 97	<i>C9orf97</i>	20.266.156	0.011317462	down
Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	<i>CAPZA1</i>	23.969.193	0.005199404	up
CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	<i>CD55</i>	31.211.634	0.004338629	up
chromodomain helicase DNA binding protein 2	<i>CHD2</i>	22.091.448	0.018352622	down
CDC-like kinase 1	<i>CLK1</i>	20.842.803	0.014257435	down

Anhang

cytidylate kinase	<i>CMPK</i>	28.047.388	0.013964684	down
cereblon	<i>CRBN</i>	2.602.162	0.0067090695	down
cAMP responsive element binding protein-like 2	<i>CREBL2</i>	22.376.974	0.0073144897	down
cisplatin resistance-associated overexpressed protein	<i>CROP</i>	24.545.026	0.008092998	down
catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	<i>CTNNB1</i>	20.091.777	0.0018277789	down
catenin (cadherin-associated protein), delta 1	<i>CTNND1</i>	2.039.957	0.004660528	down
chromosome X open reading frame 45	<i>CXorf45</i>	22.748.282	0.011800208	down
cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	<i>CYP3A5</i>	25.097.327	9,85E+02	up
chondroitin beta1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase	<i>ChGn</i>	24.692.678	0.0058138273	down
DDHD domain containing 2	<i>DDHD2</i>	22.676.616	0.008655805	down
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10	<i>DDX10</i>	2.099.206	0.010846798	down
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	<i>DECR1</i>	23.294.053	0.0049870866	up
dedicator of cytokinesis 10	<i>DOCK10</i>	23.764.813	0.0038773858	down
dedicator of cytokinesis 4	<i>DOCK4</i>	21.326.568	0.0056167785	up
dedicator of cytokinesis 8	<i>DOCK8</i>	21.429.765	0.0028905324	down
DPH4, JJJ3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>DPH4</i>	20.663.638	0.01641393	down
estrogen receptor binding site associated, antigen, 9	<i>EBAG9</i>	20.692.084	0.012772238	down
epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	<i>EGFR</i>	2.207.604	0.0011716874	up
eukaryotic translation initiation factor 5A	<i>EIF5A</i>	24.917.243	0.002000846	down
ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	<i>ELK3</i>	23.004.427	0.020138286	down

Anhang

erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	<i>EPB41L3</i>	23.811.712	0.004294608	down
Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1	<i>EPS15L1</i>	22.717.822	0.0062688505	up
erbB2 interacting protein	<i>ERBB2IP</i>	23.980.136	0.004071144	down
coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	<i>F5</i>	21.070.867	0.022402402	up
family with sequence similarity 122B	<i>FAM122B</i>	26.556.382	0.021958845	down
family with sequence similarity 13, member A1	<i>FAM13A1</i>	20.154.016	0.012874349	down
family with sequence similarity 35, member A	<i>FAM35A</i>	21.322.684	0.019954234	down
family with sequence similarity 3, member C	<i>FAM3C</i>	22.660.768	0.018576112	down
family with sequence similarity 62 (C2 domain containing) member B	<i>FAM62B</i>	2.083.602	0.0021595329	down
Family with sequence similarity 98, member B	<i>FAM98B</i>	24.755.716	0.008510694	down
fem-1 homolog b (C. elegans)	<i>FEM1B</i>	21.060.827	0.0044712084	down
FGFR1 oncogene partner 2	<i>FGFR1OP2</i>	24.873.788	0.014839941	down
hypothetical protein FLJ20152	<i>FLJ20152</i>	20.084.434	0.021407302	down
FLJ20160 protein	<i>FLJ20160</i>	23.320.398	0.010091209	down
hypothetical protein FLJ90013	<i>FLJ90013</i>	21.588.547	0.013856472	down
fragile X mental retardation 1	<i>FMR1</i>	23.695.486	0.02087946	down
Far upstream element (FUSE) binding protein 1	<i>FUBP1</i>	23.406.005	0.013181283	down
far upstream element (FUSE) binding protein 1	<i>FUBP1</i>	20.037.656	0.018012956	down
FUS interacting protein (serine/arginine-rich) 1 /// similar to FUS-interacting serine-arginine-rich protein 1 (TLS-associated protein with Ser-Arg repeats) (TLS-associated protein	<i>FUSIP1</i> /// <i>LOC727922</i>	2.227.046	0.01737749	down

Anhang

with SR repeats) (TASR) (TLS-associated serine-arginine protein) (TLS-associated SR protein) (Neural-specific SR protein...				
GA binding protein transcription factor, beta subunit 2	<i>GABPB2</i>	2.639.824	0.010982075	down
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	<i>GALNT7</i>	2.258.423	0.023420267	down
GRIP and coiled-coil domain containing 2	<i>GCC2</i>	2.132.656	0.013445693	down
glucocorticoid induced transcript 1	<i>GLCCI1</i>	27.384.202	0.011915494	down
GC-rich promoter binding protein 1	<i>GPBP1</i>	2.167.776	0.010148579	down
G protein-coupled receptor 44	<i>GPR44</i>	21.881.456	0.0012911947	down
G protein-coupled receptor associated sorting protein 1	<i>GPRASP1</i>	214.105	0.011911155	down
G1 to S phase transition 2 /// G1 to S phase transition 2	<i>GSPT2</i>	20.455.933	0.01406724	down
histone deacetylase 9	<i>HDAC9</i>	21.363.106	0.012554896	down
haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A	<i>HDHD1A</i>	21.831.913	0.003855846	down
haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	<i>HDHD2</i>	21.175.683	0.010974383	down
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	<i>HNRPA3</i>	2.307.443	0.008114621	down
Interleukin 10 receptor, beta	<i>IL10RB</i>	20.491.345	0.0039089406	up
Iron-responsive element binding protein 2	<i>IREB2</i>	25.500.464	0.0016959741	down
isochorismatase domain containing 1	<i>ISOC1</i>	2.199.612	0.0040277108	down
integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	<i>ITGA4</i>	2.528.371	0.01060694	down
IL2-inducible T-cell kinase	<i>ITK</i>	21.697.989	0.00816595	down

Anhang

jumonji domain containing 1C	<i>JMJD1C</i>	23.980.756	0.006214792	down
Junction-mediating and regulatory protein	<i>JMY</i>	23.894.105	0.021627877	down
potassium channel tetramerisation domain containing 18	<i>KCTD18</i>	2.006.864	0.011916377	down
KIAA0372	<i>KIAA0372</i>	2.333.322	0.006870718	down
KIAA0528	<i>KIAA0528</i>	20.029.788	0.011771456	down
KIAA0947 protein	<i>KIAA0947</i>	26.423.624	0.0033673183	down
KIAA1008	<i>KIAA1008</i>	21.102.035	0.0045423284	down
KIAA1370	<i>KIAA1370</i>	20.666.876	0.02039434	down
KIAA1598	<i>KIAA1598</i>	20.333.002	0.008917036	down
kinase D-interacting substance of 220 kDa	<i>KIDINS220</i>	21.528.623	0.008651508	down
lysine-rich coiled-coil 1	<i>KRCC1</i>	22.965.271	0.016788425	down
kinectin 1 (kinesin receptor)	<i>KTN1</i>	233.433	0.013115029	down
kinectin 1 (kinesin receptor)	<i>KTN1</i>	2.172.665	0.017311541	down
LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (bacterial)	<i>LANCL1</i>	22.987.978	0.020975599	down
leptin receptor overlapping transcript-like 1	<i>LEPROTL1</i>	2.109.872	0.023123069	down
hypothetical protein LOC145758	<i>LOC145758</i>	2.039.516	0.018005414	down
similar to serine/threonine/tyrosine interacting protein	<i>LOC730432</i>	20.067.081	0.016960133	down
lipin 1	<i>LPIN1</i>	20.311.966	0.011885092	down
leucine-rich PPR-motif containing	<i>LRPPRC</i>	22.844.748	0.0018896289	down
lymphocyte antigen 75	<i>LY75</i>	21.483.898	0.006861768	down
Lym7 homolog (mouse)	<i>LYRM7</i>	20.415.063	0.022385417	down
Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	<i>MALAT1</i>	42.279.544	0.0074500483	up
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2	<i>MAP3K7IP2</i>	20.312.972	0.01738227	down
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 3	<i>MAP3K7IP3</i>	2.277.889	0.019716514	down
mitogen-activated protein kinase 9	<i>MAPK9</i>	20.553.572	0.006927794	down

Anhang

membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	<i>MARCH1</i>	2.036.709	0.012655531	down
matrin 3	<i>MATR3</i>	20.001.316	0.01994479	down
multiple coagulation factor deficiency 2	<i>MCFD2</i>	2.063.249	0.003694423	down
metaxin 3	<i>MTX3</i>	21.662.974	0.01852871	down
myosin VA (heavy chain 12, myoxin)	<i>MYO5A</i>	2.282.975	0.0121806115	down
nucleosome assembly protein 1-like 1	<i>NAP1L1</i>	21.524.062	0.005711365	down
NMDA receptor regulated 1-like	<i>NARG1L</i>	21.393.278	0.0072931573	down
Nedd4 family interacting protein 1	<i>NDFIP1</i>	23.955.643	0.0039889337	down
Nance-Horan syndrome (congenital cataracts and dental anomalies)	<i>NHS</i>	20.179.698	0.0030773156	up
nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus	<i>NPAT</i>	21.640.713	0.014787061	down
nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	<i>NR1D2</i>	2.033.908	0.0025113595	down
nucleoporin 54kDa	<i>NUP54</i>	2.364.579	0.01642916	down
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	<i>P2RY14</i>	25.100.546	0.0073083807	down
Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	<i>PACS1</i>	20.257.604	0.010953186	up
PAP associated domain containing 1	<i>PAPD1</i>	20.346.246	0.006242936	down
pecanex homolog (Drosophila)	<i>PCNX</i>	20.571.303	0.018807255	up
phosphonoformate immuno-associated protein 5	<i>PFAAP5</i>	2.006.777	0.019129725	down
polyhomeotic homolog 3 (Drosophila)	<i>PHC3</i>	2.160.618	0.015009851	down
phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class C	<i>PIGC</i>	22.747.838	0.0144887	down
phosphatidylinositol-3-phosphate/phosphatidylinositol 5-kinase, type III	<i>PIP5K3</i>	2.106.682	0.018815445	down
pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 3	<i>PLEKHG3</i>	20.509.083	0.014171433	up

Anhang

polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa	<i>POLR1B</i>	20.050.607	0.0062870192	down
POM (POM121 homolog, rat) and ZP3 fusion	<i>POMZP3</i>	21.795.619	8,48E+03	down
POT1 protection of telomeres 1 homolog (<i>S. pombe</i>)	<i>POT1</i>	20.337.856	0.0042292764	down
protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit	<i>PPM2C</i>	27.409.103	0.02329227	down
prion protein (p27-30) (Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia)	<i>PRNP</i>	25.359.242	0.015489785	down
PRO1073 protein	<i>PRO1073</i>	23.118.646	0.005253011	up
PRO1073 protein	<i>PRO1073</i>	20.992.692	6,37E+01	up
PRO1073 protein	<i>PRO1073</i>	44.795.504	0.0054714694	up
phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	<i>PRPS2</i>	21.220.467	0.008749791	down
proline-rich coiled-coil 1	<i>PRRC1</i>	23.207.414	0.009895751	down
protease, serine, 33	<i>PRSS33</i>	34.831.662	0.0019234801	down
protease, serine, 33	<i>PRSS33</i>	31.726.775	0.0024427786	down
PC4 and SFRS1 interacting protein 1	<i>PSIP1</i>	2.673.586	0.0072729047	down
phosphotriesterase related	<i>PTER</i>	20.837.328	0.006419334	down
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	<i>PTGER4</i>	2.471.831	0.013659108	down
RAB11A, member RAS oncogene family	<i>RAB11A</i>	2.076.642	0.011104076	down
RAB2, member RAS oncogene family	<i>RAB2</i>	20.233.102	0.019475242	down
RAB21, member RAS oncogene family	<i>RAB21</i>	2.486.865	0.010092232	down
rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	<i>RABEP1</i>	2.022.425	0.020005003	down
RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>)	<i>RAD21</i>	20.869.937	0.00863063	down
RAN binding protein 5	<i>RANBP5</i>	23.716.593	0.005407257	down
RAN binding protein 6	<i>RANBP6</i>	22.305.887	0.009481527	down
RAP2C, member of RAS oncogene family	<i>RAP2C</i>	224.142	0.021861399	down

Anhang

RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	<i>RASA1</i>	25.624.704	0.010064321	down
RAS p21 protein activator 2	<i>RASA2</i>	22.240.353	0.016247367	down
RAS and EF-hand domain containing	<i>RASEF</i>	2.507.171	0.019737078	up
retinoblastoma binding protein 6	<i>RBBP6</i>	20.541.124	0.001056216	down
RNA binding motif protein 25	<i>RBM25</i>	21.608.644	0.017717786	down
RNA binding motif protein, X-linked	<i>RBMX</i>	23.748.386	0.015635202	down
RANBP2-like and GRIP domain containing 5 /// RANBP2-like and GRIP domain containing 4 /// RANBP2-like and GRIP domain containing 8 /// RANBP2-like and GRIP domain containing 6	<i>RGPD5</i> /// <i>RGPD4</i> /// <i>RGPD8</i> /// <i>RGPD6</i>	200.672	0.011419043	down
ring finger protein 138	<i>RNF138</i>	25.765.965	0.01570159	down
ring finger protein (C3H2C3 type) 6	<i>RNF6</i>	23.563.068	0.014981816	down
Ribosomal protein L37a	<i>RPL37A</i>	2.033.635	9,11E+02	down
Ribosomal protein L5	<i>RPL5</i>	2.300.902	0.023837104	down
RING1 and YY1 binding protein	<i>RYBP</i>	20.154.643	0.018305788	down
SAC1 suppressor of actin mutations 1-like (yeast)	<i>SACM1L</i>	20.911.489	0.02044997	down
SCY1-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>SCYL2</i>	20.474.818	0.00476877	down
SEC23 interacting protein	<i>SEC23IP</i>	20.987.592	0.012842152	down
SEC31 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>SEC31A</i>	20.335.832	0.021920733	down
SEC63 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>SEC63</i>	24.770.358	0.0041356073	down
SUMO1/sentrin specific peptidase 6	<i>SENPE6</i>	25.439.665	0.0019815508	down
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	<i>SERPINB6</i>	2.098.271	0.0012002782	up
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	<i>SERPINB9</i>	23.851.867	0.008639033	down

Anhang

splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	<i>SF3B1</i>	20.541.666	0.0030206665	down
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like	<i>SH3BGRL</i>	20.828.989	0.005682401	down
sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	<i>SIRT1</i>	20.069.623	0.018827178	down
solute carrier family 30 (zinc transporter), member 5	<i>SLC30A5</i>	21.402.245	0.008759542	down
solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1	<i>SLC35A1</i>	2.264.869	0.009667584	down
solute carrier family 38, member 1	<i>SLC38A1</i>	2.289.068	0.021880781	down
solute carrier family 38, member 2	<i>SLC38A2</i>	2.021.033	0.01961822	down
Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	<i>SLC39A10</i>	22.249.343	0.023551073	down
solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6	<i>SLC39A6</i>	29.725.528	0.0044186157	down
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	<i>SMARCA2</i>	21.080.925	0.0028640986	down
structural maintenance of chromosomes 4	<i>SMC4</i>	237.778	0.018236337	down
suppressor of cytokine signaling 4	<i>SOCS4</i>	21.734.653	0.017720979	down
SPFH domain family, member 2	<i>SPFH2</i>	21.582.077	0.0027334297	down
spindlin	<i>SPIN</i>	2.227.738	0.011674298	down
signal recognition particle 9kDa	<i>SRP9</i>	2.081.005	0.020637993	down
synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1	<i>SS18L1</i>	22.849.045	0.0072684535	down
serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1 homolog, yeast)	<i>STK39</i>	23.524.947	0.008780715	down
STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog B (S. cerevisiae)	<i>STT3B</i>	2.111.862	0.015605042	down

Anhang

synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	<i>SYNCRIP</i>	20.430.696	0.007643669	down
TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 100kDa	<i>TAF5</i>	2.024.976	0.010959572	down
TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)	<i>TBC1D9</i>	2.238.148	0.009105763	down
transcription elongation regulator 1	<i>TCERG1</i>	21.298.645	0.007242398	down
transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)	<i>TCF12</i>	20.881.424	0.012306963	down
transmembrane protein 1	<i>TMEM1</i>	22.000.816	0.009666716	down
transmembrane protein 49	<i>TMEM49</i>	2.281.309	0.0029623052	up
transmembrane protein 57 /// family with sequence similarity 122B	<i>TMEM57 /// FAM122B</i>	29.952.025	0.008528002	down
thiamin pyrophosphokinase 1	<i>TPK1</i>	20.820.255	0.016201977	down
tripeptidyl peptidase II	<i>TPP2</i>	23.213.713	0.00322291	down
Tyrosylprotein sulfotransferase 1	<i>TPST1</i>	23.105.927	0.014058411	up
T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	<i>TRAT1</i>	2.127.251	0.016193137	down
Transcriptional regulating factor 1	<i>TRERF1</i>	23.594.763	0.0047792513	down
Ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	<i>UBE4B</i>	29.087.658	8,33E+02	up
ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	<i>UBR1</i>	23.148.847	0.021778867	down
unc-84 homolog A (C. elegans)	<i>UNC84A</i>	2.153.638	0.0065540164	down
ubiquitin specific peptidase 32	<i>USP32</i>	21.515.634	0.011658478	down
ubiquitin specific peptidase 38	<i>USP38</i>	20.068.343	0.007104257	down
vezatin, adherens junctions transmembrane protein	<i>VEZT</i>	26.287.835	0.003185665	down

Anhang

vacuolar protein sorting 13 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)	VPS13C	24.012.108	0.008343835	down
WD repeat domain 67	WDR67	21.217.198	0.0022915078	down
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2	XRCC2	20.410.535	0.010039802	up
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	YWHAE	23.341.413	0.001512224	down
zinc finger and BTB domain containing 1	ZBTB1	24.727.848	0.012380329	down
zinc finger homeobox 1b	ZFHX1B	20.550.203	0.012183725	down
Zinc finger protein 117	ZNF117	21.097.956	0.019839432	down
zinc finger protein 146 /// zinc finger protein 146	ZNF146	23.495.932	0.0066061853	down
zinc finger protein 227	ZNF227	20.990.784	0.0031863928	down
zinc finger protein 529	ZNF529	22.000.859	0.01876863	down
zinc finger protein 600	ZNF600	22.784.884	0.0059615057	down
zinc finger protein 650	ZNF650	2.409.479	0.008551979	down
zinc finger protein 650	ZNF650	23.011.072	0.0023513478	down
zinc finger protein 655	ZNF655	20.507.076	0.021358725	down
zinc finger protein 700	ZNF700	2.234.292	0.0028751935	down
zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor) /// POM (POM121 homolog, rat) and ZP3 fusion /// Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 3 (mouse)	ZP3 /// POMZP3 /// MEIS3	20.685.341	0.0013830282	down

Anhang

Tabelle 9.2: Gene, die auf potentielle Punktmutationen in Hochrisikogruppen der Parkinson-Erkrankung untersucht wurden

Gen-Symbol	Genname	Chr	Position	Start	End
<i>SLC40A1</i>	Ferroportin 1, solute carrier family 40 (iron-regulated transporter)	2	2q32	190425316	190445537
<i>SLC11A1</i>	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	2	2q35	219246752	219261617
<i>TF</i>	transferrin precursor	3	3q22.1	133465235	133497635
<i>CP</i>	ceruloplasmin precursor	3	3q23-q25	148890286	148939832
<i>MF12</i>	Melanotransferrin	3	3q28-q29	196730156	196756686
<i>TFRC</i>	transferrin receptor	3	3q29	195776155	195809032
<i>HFE</i>	hemochromatosis protein isoform 1 precursor	6	6p21.3	26087448	26097059
<i>TFR2</i>	transferrin receptor 2	7	7q22	100218039	100239173
<i>ACO1</i>	Aconitase 1, also known as iron regulatory element binding protein 1 (IREB1)	9	9p21.1	32384601	32450834
<i>FXN</i>	frataxin	9	9q21.11	71650344	71688952
<i>UBE2D1(SFT)</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1	10	10q21.1	60094739	60130509
<i>FTH1</i>	ferritin, heavy polypeptide 1	11	11q13	61731757	61735132
<i>SLC11A2</i>	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters); DMT1	12	12q13	51379775	51420199
<i>IREB2</i>	iron-responsive element binding protein 2 (IREB2)	15	15q25.1	78730518	78793798
<i>HAMP</i>	hepcidin antimicrobial peptide	19	19q13.1	35773410	35776046
<i>FTL</i>	ferritin, light polypeptide	19	19q13.33	49468566	49470136
<i>HMOX1</i>	heme oxygenase (decyclizing) 1	22	22q13.1	35777060	35790207
<i>HEPH</i>	hephaestin isoform c	X	Xq11-q12	65382663	65487231
<i>SUMO1</i>	small ubiquitin like protein SMT3C	2	2q33	203070903	203103322
<i>HIF1A</i>	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	14	14q23.2	62162119	62214977
<i>SLC2A1</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	1	1p34.2	43391046	43424847
<i>CLDN19</i>	claudin 19	1	1p34.2	43198764	43205925
<i>CLDN18</i>	claudin 18	3	3q22.3	137717658	137752494
<i>CLDN11</i>	claudin 11	3	3q26.2-q26.3	170136653	170152479
<i>CLDN16</i>	claudin 16	3	3q28	190105841	190128333
<i>CLDN1</i>	claudin 1	3	3q28-q29	190023493	190040215
<i>CLDN22</i>	claudin 22	4	4q35.1	184239220	184241927
<i>OCLN</i>	occludin	5	5q13.1	68788119	68850133
<i>CLDN20</i>	claudin 20	6	6q25	155585147	155597679
<i>CLDN15</i>	claudin 15	7	7q11.22	100875374	100881116
<i>CLDN3</i>	claudin 3	7	7q11.23	73183327	73184600
<i>CLDN4</i>	claudin 4	7	7q11.23	73245193	73247015
<i>CLDN12</i>	claudin 12	7	7q21	90032796	90045268
<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP),	7	7q21.12	87132948	87342564
<i>CLDN23</i>	claudin 23	8	8p23.1	8559666	8561617
<i>TJP2</i>	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	9	9q13-q21	71789089	71870120

Anhang

CLDN10	claudin 10	13	13q31-q34	96085858	96231906
TJP1	tight junction protein 1 (zona occludens 1)	15	15q13	29992356	30114706
CLDN6	claudin 6	16	16p13.3	3064713	3068188
CLDN9	claudin 9	16	16p13.3	3062206	3064506
CLDN7	claudin 7	17	17p13	7163222	7165795
TJP3	tight junction protein 3	19	19p13.3	3728374	3750682
CLDN8	claudin 8	21	21q22.11	31586330	31588318
CLDN17	claudin 17	21	21q22.11	31538261	31538935
CLDN14	claudin 14	21	21q22.3	37832919	37852388
CLDN5	claudin 5	22	22q11.21	19510547	19512860
CLDN2	claudin 2	X	Xq22.3-q23	106163634	106174091

9.1 Ausschnitt aus der Vektor-Sequenz des pEasyFloxxII

Mit dem repräsentativen Ausschnitt der unten angegebenen Vektor-Sequenz (pEasyFloxxII) sowie der farblich dazugehörigen Legende sind alle klonierten Konstrukte dieser Arbeit in ihrer Sequenz nachvollziehbar. Die detaillierte Klonierungsstrategie kann dem Methodenteil dieser Arbeit entnommen werden.

TTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
CCAAGCTCGAAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGTCGAGATCTAGATATCGATGGCCATAGCGGCCttaaaagctga
gctaaacctctatgtggttttaggaaaatcaaaactataaataaatggcaagtacaacaaaatcccatcaattcttatttaacatacttacattttaaagtagtta
aaatattcatatgatcattgagagaattcagaattgcctttaagtaattgttcacatatacaaaagaaaagctccaaaaattgggtctttgcctgagatagattg
tcttaaaattgaaatcattcactatcagatttgacccttttaagcataacttgcctgtgtaataattagacttatatgttttgatttccttcaataatctcttaact
ttaaggacaaaagttagcacagaattttgatgcttgacatagtgacatttatatttaaggaaattaggacaaaaattataatgtaacacattgtaataag
atctctgtgcatcttctggcagATACCTCCACTCAGCCATGATTATAACCGAGACTGAAACCCCAATGTGCTGCTTTTACACT
GTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTACGGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAACATC
AGAGGGCACACCAgtagtgatcaggtctgtctcataattctatcttcaggatggataaaccctgacctcagatgtgagttcagaagagcaaaaggaa
aacagagtctatcacattgtgaacagaggtttatttttgaaaaaatgcaagcatcacattgtGGCGCGCCGCGATCGCTTAATTAAGCTAGAA
AGCTTGAATTCGATATCGATCCATAACTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGAATTGGCCGCTCGACGAAGTTCCTA
TTCCGAAAGTTTCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACTTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCAT
GCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGC
GCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCTTCGCGCCACCTTACTCCTCCCTAGTCAGGAAGTTCACCCCGGCCCGCA
GCTCGCGTCTGTCAGGACGCTATTTCGGCTATGACTGGGCAAGACAAATGGAAGTAGCACGTCTACTAGTCTCGTGCAGA
TGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGG
GCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCCGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAGGT
CCTCCGAGGCCCGGCAATTCTGCACGCTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGTGTCTCCTCTCTCTCATCTCCGGGCTTTT
GACCTGCAGCCAATATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGTTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT
ATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGTGTTCGGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCC
GTTCTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCA
CGACGGGCTTCTTGCAGCTGTGCTGACGTTGCTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGC
CGGGGCAAGATCTCTGTCATCTCACCTTGTCTCTGCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGGCTGCAT
ACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCG
GTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGC
GCATGCCGACGGCGATGATCTCGTCTGACCATGGCGATGCTGCTTGCCTGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTT
TCTGGATTCATCGACTGTGGCCGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCGTGATATTGCTGA
AGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTACGGTATCGCCGCTCCGATTGCGAGCGCATCGCTTCTA
TCGCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGGGGATCAATTCTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAG
CCATCTGTTGTTTCCCTCCCGTGCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTAATAAAAATGAGG

Anhang

Legende:

Primer für Kolonie-PCR und Sequenzierung des pEasyFloxxII

Triplett für I2020T

Triplett für D1994A

Primerüberhänge zur Blasticidinresistenzklonierung aus pLenti 6.3

pGK Promotor

Neomycinresistenz

SFI Schnittstelle

AscI Schnittstelle

Triplets für StoppCodon

CTATTCGGCTATGACTGGGCA IntegrationsPrimer reverse für Neo Insertion

Falls zusätzliche, noch detailliertere Angaben zur Klonierung erwünscht sind, können sie jederzeit auf Anfrage weitere Informationen diesbezüglich erhalten.

