

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Entwicklung und Evaluation eines neuen Modells für Synucleinopathien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Marlena Schnieder
aus
Lüdinghausen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Kermer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Thumm

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Das Idiopathische Parkinson-Syndrom	9
1.1.1	Symptome und Epidemiologie	9
1.1.2	Pathologie und Genetik	9
1.2	α -Synuclein	10
1.2.1	Struktur und Vorkommen	10
1.2.2	Funktion	12
1.2.3	Mutationen	13
1.2.4	Zelltoxizität von α - Synuclein	14
1.3	Fragestellung dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien, Reagenzien und Kits	20
2.2	Puffer und Lösungen	23
2.3	Antikörper	25
2.4	Geräte und Software	26
2.5	Kulturmedien	28
2.6	Verbrauchsmaterialien	29
2.7	Plasmide	29
2.7.1	pEGFP-N1	29
2.7.2	pcDNA3.1.	29
2.7.3	α -Synuclein-Wildtyp	30
2.7.4	α -Synuclein-Multiplikationen	30
2.8	Klonierung der Plasmide	30
2.8.1	PCR	30
2.8.2	Analytische Agarosegelelektrophorese	30
2.8.3	Aufreinigung des PCR-Produkts	31
2.8.4	Restriktionsverdau	31
2.8.5	Präparatives Agarosegel und Aufreinigung der DNA	32

2.8.6	Ligation	32
2.9	Amplifikation der Plasmide	33
2.9.1	Transformation kompetenter Bakterien	33
2.9.2	Mini-Präparation	33
2.9.3	Sequenzierung	34
2.9.4	Klonierung der α -Synuclein-Multiplikationen	34
2.9.5	Maxi-Präparation	35
2.10	Zelllinien	36
2.10.1	SH-SY5Y-Zellen	36
2.10.2	CSM14.1-Zellen	36
2.10.3	Primäre hippokampale Neurone	36
2.11	Zellkultur	36
2.11.1	Kultivierung	36
2.11.2	Passagierung	37
2.11.3	Quantifizierung	37
2.11.4	Beschichten von Zellkulturplatten für primäre hippokampale Neurone	37
2.11.5	Beschichten von Deckgläsern	37
2.11.6	Fixieren der Zellen	38
2.11.7	Einfrieren der Zellen	38
2.11.8	Auftauen der Zellen	38
2.11.9	Transfektion	38
2.12	Zelltodassay	40
2.13	Proteinanalysen	40
2.13.1	Zellyse	40
2.13.2	BCA-Assay	42
2.13.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	42
2.13.4	Western Blot	42
2.13.5	Immunodetektion von Proteinen	43
2.13.6	Densitometrische Messung der Immunblots	43
2.13.7	Autophagie	43
2.13.8	Proteasomenaktivitätsmessungen	43
2.13.9	Statistik	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Konstruktion der α -Synuclein-Multiplikationen	45
3.1.1	Restriktionsenzymverdau der α -Synuclein-Multiplikationen	45

3.1.2	Sequenzierung der α -Synuclein-Multiplikationen	46
3.2	Transiente Transfektion der α -Synuclein-Multiplikationsplasmide	47
3.3	Die Auswirkungen der α -Synuclein-Multiplikationen auf den Zelltod	48
3.3.1	Die α -Synuclein-Multiplikationen sind toxisch in primären hippo- kampalen Neuronen	48
3.3.2	Die α -Synuclein-Multiplikationen sind toxisch in SH-SY5Y-Zellen	49
3.4	Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf die Zellfunktion	51
3.4.1	Aggregatbildung durch die α -Synuclein-Multiplikationen	51
3.4.2	Inhibition des Proteasoms durch die α -Synuclein-Multiplikationen	52
3.4.3	Der Einfluss der α -Synuclein-Multiplikationen auf die Autophagie	53
4	Diskussion	59
4.1	α -Syn-Multiplikationen	59
4.2	α -Syn-Multiplikationen und Toxizität	61
4.3	Aggregation und Oligomerisierung	62
4.4	Proteasominhibition durch die α -Syn-Multiplikationen	63
4.5	Der Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf die Autophagie	64
4.6	Ausblick	66
5	Zusammenfassung	67

Tabelle 0.1: Abkürzungen und Anglizismen

A	Alanin
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7- amino-4-methylcoumarin
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäuren
α -Syn	α -Synuclein
Autophagie	Makroautophagie
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BiFC-Assay	Bimolecular Fluorescence Complementation Assay
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie (Chaperone mediated autophagy)
CMV	Zytomegalievirus
CSP- α	cysteine-string-proteine α
DAPI	4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy Nucleotidtriphosphate
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced Green fluorescent proteine
eIF-2 α	eukaryontischer Initiationsfaktor-2 α
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E46K	Glutaminsäure46Lysin
F	Phenylalanin
FCS	fetales Rinderserum (fetal calv serum)
G	Glycin

Tabelle 0.1: Abkürzungen und Anglizismen

xg	Erdschwerebeschleunigung
Glu	Glutaminsäure
GRP78	Glukose-reguliertes Protein 78
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IGEPAL	Octylphenoxypolyethoxyethanol
in-frame deletion	im Rahmen Deletion, Aminosäurendeletion bei erhaltenem Leseraster
iPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
kDA	kiloDalton
Knock-down	Niederschlag, teilweises Abschalten eines Gens
Knockout	außer Gefecht setzen, hier Ausschalten eines Gens
K	Lysin
LB	Luria-Bertani
lc3	Leichte Kette 3 (light chain 3)
Leu	Leucin
LK	Lewy-Körperchen
MATra	Magnet Assistant Transfection
NAC	Nicht-Abeta-Komponente
P	Prolin
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PC12 Zellen	Phäochromozytom-12-Zellen
PLK	Polo-like Kinase
p62	Protein62

Tabelle 0.1: Abkürzungen und Anglizismen

Q	Glutamin
R	Arginin
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffmetabolite (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Ser	Serin
SNARE	Proteinkomplexe in Vesikeln (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor)
SNCA	α -Synuclein-Gen
Snpc	Substantia nigra pars compacta
SOB	Super Optimal Broth
SV40	simian vacuolating virus 40
T	Threonin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
V	Valin
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Idiopathische Parkinson-Syndrom

1.1.1 Symptome und Epidemiologie

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (iPS) wurde erstmals 1817 von dem britischen Arzt James Parkinson in seinem Essay "An Essay on the shaking palsy" beschrieben (Parkinson, 2002). Die Klinik des iPS ist gekennzeichnet durch die Symptome Rigor, Tremor, Bradykinesie bzw. Akinesie und posturale Instabilität (Gasser, 2007). Zudem finden sich zahlreiche Symptome wie olfaktorische Störungen, Depressionen, Blasenentleerungsstörungen, erektile Dysfunktion und Schlafstörungen (Chaudhuri and Schapira, 2009).

Das iPS ist heute die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer (Dauer and Przedborski, 2003). Die Inzidenz liegt bei 121/100 000 Fälle pro Jahr und steigt mit dem Alter an. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 73.1 Jahren (Driver et al., 2009). Die Prävalenz bei der Bevölkerung von über 65 Jahren liegt bei 1.8% mit einem Anstieg von 0,6% bei den 65- bis 69-Jährigen, bis hin zu einer Prävalenz von 2.6% bei den 85- bis 89-Jährigen. Es gibt keine Unterschiede in der Prävalenz zwischen Männern und Frauen (de Rijk et al., 2000).

1.1.2 Pathologie und Genetik

Das pathologische Korrelat der Symptome ist der Untergang der dopaminergen Zellen in der Substantia nigra pars compacta (Snpc). Außerdem finden sich Läsionen in anderen Teilen des Gehirns, wie zum Beispiel im dorsalem Vaguskern, dem vorderen olfaktorischen System, dem Locus coeruleus, der Amygdala und den Raphekernen (Braak et al., 2006). Das erklärt auch die zahlreichen Symptome, welche nicht durch den Untergang dopaminergener Zellen zu erklären sind. Neuropathologisch findet man in den überlebenden Neuronen Lewy-Körperchen (LK), welche eosinophile intrazelluläre Aggregate aus Proteinen sind. Hauptbestandteile dieser Aggregate sind α -Synuclein (α -Syn) (Spillantini et al., 1997), Ubiquitin und Neurofilamente (Braak et al., 2006).

Meist tritt die Erkrankung sporadisch auf, in 5-10% der Fälle finden sich jedoch familiäre

Formen mit monogenetischem Erbgang (Lesage and Brice, 2009). Seit der Entdeckung von Mutationen im α -Syn-Gen 1997 wurden bis heute in 15 weiteren Genloci Mutationen identifiziert, welche das PS mit monogenetischem Erbgang verursachen (siehe Tabelle 1).

1.2 α -Synuclein

1.2.1 Struktur und Vorkommen

α -Syn ist ein nativ ungefaltetes Protein (Weinreb et al., 1996) und besteht aus 140 Aminosäuren (Ueda et al., 1993). Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen dem gefalteten Protein und der nativ ungefalteten Form (Wang et al., 2011; Bartels et al., 2011). α -Syn gehört zu der Familie der Synucleine, diese Proteine kommen nur bei Vertebraten vor, sie konnten weder in einzelligen noch in Insekten oder Nematoden gefunden werden (Hamilton, 2004).

Im menschlichen Körper ist α -Syn in den meisten Organen des Körpers vorhanden (Lavedan, 1998), es kommt aber hauptsächlich im Gehirn und dort vor allem im zerebralen Kortex, der olfaktorischen Region, dem Putamen, dem Nucleus accumbens, dem Hippocampus und zerebellärem Kortex vor. In diesen Regionen wird es überwiegend in den präsynaptischen Endungen der Neuronen gefunden (Iwai et al., 1995).

Das α -Syn-Gen (SNCA) ist auf dem Chromosom 4q21.3-q22 lokalisiert (Chen et al., 1995). Insgesamt besteht es aus sieben Exonen, wovon fünf proteinkodierend sind. Es gibt drei α -Syn-Isoformen, wovon zwei durch alternatives Spleißen entstehen, zum einen durch eine in-frame-Deletion des dritten Exons (Position 41-54) mit einem daraus resultierendem Protein aus 126 Aminosäuren (AS) und zum anderen eine Isoform mit 112 AS, entstanden durch eine in-frame-Deletion des Exons 5 (Position 103-130) (Campion et al., 1995). Die Aminosäuresequenz von α -Syn kann in drei verschiedene Regionen eingeteilt werden, jede mit ihren besonderen strukturellen Kennzeichen. Am N-terminus des Proteins gibt es sieben imperfekte AS-Wiederholungen, bestehend aus je elf AS mit dem Kernmotiv KTKEGV (George et al., 1995; Ueda et al., 1993), wobei die beiden kleineren Isoformen von α -Syn nur sechs Wiederholungen aufweisen (Campion et al., 1995). Die N-terminale Region ist in der Lage, α -Helices zu bilden (Davidson et al., 1998). Die zentrale Region von α -Syn ist hydrophob (Ueda et al., 1993) und essentiell um amyloidartige β -Faltblatt-Fibrillen zu bilden (Giasson et al., 2001). Das C-terminale Ende ist glutamatereich und somit ist dieser Abschnitt des Proteins sauer und negativ geladen (Jo et al., 2000).

Tabelle 1.1: Genetische Parkinsonsyndrome

Locus	Gen	Chromosom	Vererbung	Funktion	Referenz
PARK1 PARK4	SNCA	4q21	AD	präsynaptisches Protein	(Polymeropoulos et al., 1997)
PARK2	Parkin	6q25-q27	AR	E3 Ligase	(Kitada et al., 1998)
PARK3	unbekannt	2p13	AD	unbekannt	(Gasser et al., 1998)
PARK5	UCHL1	4p14	AD	Ubiquitin Hydrolase	(Leroy et al., 1998)
PARK6	PINK1	1p35-p36	AR	mitochondriale Kinase	(Valente et al., 2004)
PARK7	DJ-1	1p36	AR	unklar	(Bonifati et al., 2003)
PARK8	LRRK2	12q12	AD	Kinase	(Zimprich et al., 2004)
PARK9	ATP13A2	1p36	AR	ATPase	(Ramirez et al., 2006)
PARK10	unbekannt	1p32	AD	unklar	(Hicks et al., 2002)
PARK11	GIGYF2	2q36-37	AD	Regulation von Tyrosinkinase- rezeptor- Signal- wegen	(Lautier et al., 2008)
PARK12	unbekannt	Xq21-q25	X- chromosomal	unbekannt	(Pankratz et al., 2003)
PARK13	HTRA2	2p12	unbekannt	Serinprotease	(Strauss et al., 2005)
PARK14	PLA2G6	22q13.1	AR	A2 Phospho lipase	(Paisan-Ruiz et al., 2009)
PARK15	FBXO7	22q12-q13	AR	F-Box Protein	(Fonzo et al., 2009)
PARK16	unbekannt	1q32	unbekannt	unbekannt	(Simon- Sanchez et al., 2009)

1.2.2 Funktion

Die Funktion von α -Syn ist bis heute nicht vollständig geklärt. Eine modulierende Funktion der synaptischen Übertragung und der Dichte der synaptischen Vesikel konnte gezeigt werden (Cabin et al., 2002). Auch spielt es eine Rolle bei der Funktion von SNARE (eng.: *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) Proteinen. Meist liegt α -Syn im Zytosol gelöst vor (Iwai et al., 1995), jedoch ist es in der Lage, sich an präsynaptische Vesikel zu binden (Irizarry et al., 1996), wobei es die kleinen Vesikel bevorzugt (Davidson et al., 1998). Auch kann es sich an Zellmembranen (McLean et al., 2000) und an Phospholipide anlagern (Davidson et al., 1998). An Membranen geht es von einer ungefalteten Form in eine α -Helix-Konformation über. Diese hat polare Aminosäurenreste, welche mit den Phospholipidkopfgruppen der Membranen interagieren können. Die Interaktion von α -Syn mit Membranen ist transient und nicht stabil. Bei neuronaler Aktivität kommt es zur Dissoziation von α -Syn an den Synapsen zum Zeitpunkt der Vesikelexozytose, wofür Ca^{2+} -Einstrom essentiell ist (Fortin et al., 2005). Eine andere Funktion von α -Syn ist die Unterstützung von CSP- α (cysteine-string-proteine α) in seiner Funktion. CSP- α erleichtert die Aneinanderlagerung und Dissoziation von SNARE Proteinen. Um die unterstützende Wirkung ausüben zu können, muss α -Syn an Phospholipide anbinden (Chandra et al., 2005).

α -Syn-Knockout-Mäuse sind fortpflanzungs- und lebensfähig, auch zeigen sie keine größeren strukturellen Defizite im Zentralnervensystem. Jedoch weisen sie eine niedrigere striatale Dopaminkonzentration als der Wildtyp (Wt) auf und haben eine verringerte lokomotorische Reaktion auf Amphetamine. Auch zeigen striatale Neurone von Knockout-Mäusen eine schnellere Dopaminwiederanreicherung nach deren Stimulation, als die Neurone von Wt-Mäusen (Abeliovich et al., 2000). Außerdem haben die Mäuse eine reduzierte Vesikelkonzentration im Reservepool, bei normaler basaler synaptischer Funktion (Cabin et al., 2002). Unter Stresssituationen findet sich ein deutlicher Unterschied zwischen α -Syn-Knockout- und α -Syn-Wt-Mäusen. So konnte die durch 4-Aminopyridin verstärkte synaptische Aktivität im Wt deutlicher stimuliert werden, als in der Knockout-Maus (Martin et al., 2004).

Durch die Inhibition der Tyrosinhydroxylase, das limitierende Enzym in der Dopaminsynthese, wirkt α -Syn hemmend auf den Dopaminstoffwechsel (Peng et al., 2005). Zudem hat α -Syn auch eine hemmende Wirkung auf die Katecholaminausschüttung und zwar nach dem Andocken des Vesikels an der Membran und vor der Ca^{2+} -abhängigen Vesikelfusion (Larsen et al., 2006). So ist es möglich, dass α -Syn eine modulierende Funktion auf die Vesikelfunktion und die Transmitterausschüttung hat. Eine weitere mögliche Funktion von α -Syn ist die Neuroprotektion. So kann α -Syn bei CSP- α -Knockout-Mäusen die

dadurch entstehende Neurodegeneration verlangsamen (Chandra et al., 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei erhöhtem oxidativem Stress α -Syn verstärkt exprimiert wird und dieses die Apoptoserate der Zellen verringert (Quilty et al., 2006).

1.2.3 Mutationen

Mit der Entdeckung der A53T-Synucleinmutation wurde erstmals eine autosomal dominante Form des PS nachgewiesen (Polymeropoulos et al., 1997). Interessanterweise kommt die A53T-Mutation bei vielen Vertebraten physiologisch vor (Hamilton, 2004). Seit der Entdeckung dieser Mutation wurden noch zwei weitere α -Syn-Punktmutationen gefunden, A30P (Krueger et al., 1998) und E46K (Zarranz et al., 2004), welche ebenfalls ein autosomal-dominantes PS verursachen. Die Klinik und Pathologie variiert zwischen den verschiedenen Mutationen, auch gibt es Unterschiede zum iPS. Die A53T-Mutation wurde in einer großen italienischen und mehreren griechischen Familien gefunden. Es ist eine Punktmutation an der Stelle 209 von G zu A mit einer daraus resultierenden Aminosäuresubstitution an Position 53 von Alanin zu Threonin. Die Träger der Mutation zeigen ein frühes Auftreten der Symptome im Alter von 46+/-13 Jahren. In den Gehirnen der Träger findet man LK (Polymeropoulos et al., 1997).

Durch eine Punktmutation an der Stelle 188 von G zu A entsteht ein Aminosäureaustausch an der Position 46 von Glutamin zu Lysin (E46K). Die Klinik dieser E46K-Mutation zeigt schwere Parkinsonsymptome mit Demenz. Als pathologisches Korrelat findet man eine hohe Dichte an LK, sowohl in der Substantia nigra, als auch im Parahippokampus, der Amygdala und im Kortex (Zarranz et al., 2004). Die A30P-Mutation wurde in einer deutschen Familie gefunden, die Träger dieser Mutation zeigen frühes Auftreten der Krankheit. Die Patienten reagieren sensibel auf L-Dopa (Krueger et al., 1998). Alle Punktmutationen liegen im N-terminalen Bereich des SCNA-Gens (Zarranz et al., 2004), so dass dieser Teil eine besondere Rolle für die Pathologie von α -Syn zu haben scheint.

Auch gibt es Duplikationen (Chartier-Harlin et al., 2004) und Triplikationen (Singleton et al., 2003) des normalen Wt-Allels von SCNA. Bei den Duplikationen findet sich ein ähnlicher Phänotyp wie beim iPS, es wird keine Demenz beobachtet, jedoch findet sich ein früher Beginn der Symptome, im Durchschnitt mit 48.4 Jahren (Chartier-Harlin et al., 2004). Bei den Triplikationen findet man schwerere Formen des PS mit frühem Beginn der Krankheit in der dritten oder vierten Lebensdekade, neuropsychologischen Symptomen und Demenz. Die Neuropathologie der SCNA-Triplikation-Patienten zeigt diffus verteilte LK mit viel α -Syn und zahlreichen Lewy-Neuriten (Muentzer et al., 1998). Es kommt bei den Triplikationen zu einer Verdoppelung der RNA und des Proteinlevels von α -Syn

(Singleton et al., 2003). So scheint ein Gen-Dosis-Effekt bei den SCNA-Multiplikationen eine Rolle zu spielen, da alleine α -Syn-Überexpression zum PS führen kann und bei den Triplikationen die Klinik wesentlich schwerwiegender ist, als bei den Duplikationen. Die Penetranz ist altersabhängig und komplett für die A53T, E46K und die Triplikationen, wohingegen sie bei den Duplikationen und der A30P-Mutation geringer ausgeprägt ist (Cookson, 2010). Bei zwei genomweiten Assoziationsstudien bei einer kaukasischen (Simon-Sanchez et al., 2009) und in einer asiatischen Population (Satake et al., 2009) konnten mit dem iPS assoziierte Einzelnukleotid-Polymorphismen des SCNA-Lokus gefunden werden.

1.2.4 Zelltoxizität von α - Synuclein

Sowohl in primären dopaminergen Neuronen (Xu et al., 2002) als auch in immortalisierten dopaminergen mesenzephalischen Zellen konnte gezeigt werden, dass α -Syn toxisch ist. Die Toxizität ist dosisabhängig (Zhou et al., 2000). Da α -Syn auch in Organismen toxisch ist, welche physiologischerweise kein α -Syn exprimieren, wird angenommen, dass die Toxizität nichts mit der normalen Funktion zu tun hat, sondern dass das Protein per se toxisch ist (Cookson, 2009). Bislang wurde kein gemeinsamer Pathomechanismus identifiziert, vermutlich ist es vielmehr ein Zusammenspiel aus den verschiedenen unten dargestellten Mechanismen, welche zur Zelltoxizität von α -Syn führen.

Aggregation

α -Syn hat eine starke Tendenz, sich fehl zu falten und zu aggregieren (Uversky, 2007). Die Aggregationsneigung wird über die hydrophobe NAC-Region von α -Syn vermittelt. Eine toxische Funktionszunahme wie bei den Mutationen oder Überexpression wie bei den Duplikationen oder Triplikationen kann ein möglicher Initiator sein (Cookson and van der Brug, 2008). So fangen in hoher Konzentration sowohl der Wt als auch die Mutanten an, amyloidartige Fibrillen zu formen (Conway et al., 1998). Dieser Prozess beginnt, indem fehlgefaltete α -Syn-Monomere kleine Oligomere in größtenteils antiparalleler Anlagerung bilden. Diese Oligomere liegen vor allem in β -Faltblatt Konformation vor (Goldberg and Lansbury, 2000). Die Oligomere können sich wiederum zusammenlagern und unlösliche fibrilläre Strukturen formen, welche sich letztendlich als LK in den Zellen ablagern (Cookson and Bandmann, 2010). Vieles spricht dafür, dass diese Oligomere das toxische Agens und LK eher ein Rettungsmechanismus der Zellen sind (Outeiro et al., 2008). So schienen bei Autopsien menschlicher Gehirne von Parkinsonpatienten die dopaminergen Neurone mit LK, sowohl nach morphologischen als auch nach bioche-

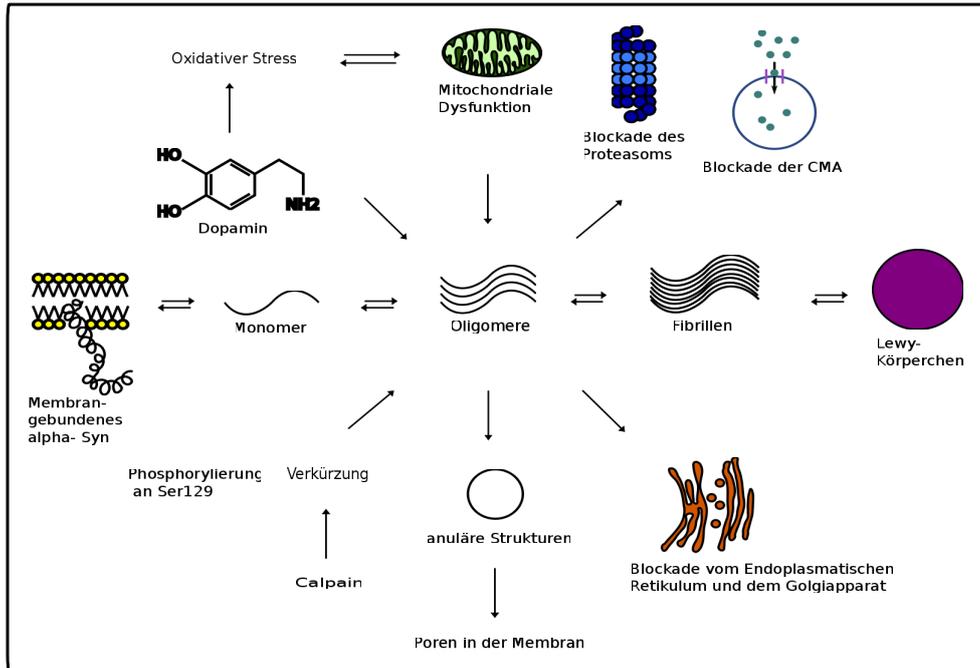


Abbildung 1.1: Synucleintoxizität

mischen Kriterien gesünder, als die der benachbarten Neurone. Außerdem werden in den Gehirnen von alten Menschen häufig auch LK gefunden, ohne dass diese Personen Symptome eines PS aufwiesen (Goldberg and Lansbury, 2000).

Die Fibrillierung von A53T ist gegenüber dem Wt beschleunigt, jedoch ist die von A30P verlangsamt. Bei der A30P-Mutation kommt es zu einer erhöhten Konzentration an Oligomeren. Die künstlichen α -Syn-Mutationen E57K und E35K sind in der Lage, Oligomere zu bilden. Diese Mutationen sind toxischer als der Wt und als die Fibrillen bildenden Mutationen (Winner et al., 2011). Diese Erkenntnis, zusammen damit, dass LK möglicherweise neuroprotektiv sind, lässt darauf schließen, dass die Oligomere das toxische Agens sind (Conway et al., 2000). Das Chaperon Hsp70 ist in der Lage, die Oligomerisierung und zugleich die Zytotoxizität zu hemmen (Outeiro et al., 2008). Die Oligomere und Fibrillen von α -Syn sind in der Lage, porenartige Strukturen in den Zellmembranen zu bilden, so dass es zu Ionenverschiebungen und somit zu Zelltod kommen kann (Zhu et al., 2003). Die Synucleinoligomere können anuläre Strukturen bilden, welche möglicherweise die Ursache der porenbildenden Funktion sind (Pountney et al., 2004).

Posttranslationale Modifikation

Durch Proteinkinasen kann α -Syn an Ser129 phosphoryliert werden. Dieses Phänomen tritt vor allem bei Synucleinopathien und weniger unter physiologischen Bedingungen auf, so dass es als pathologisch angesehen werden kann. Auch in LK ist die Mehrheit des α -Syn an Stelle Ser129 phosphoryliert. Ein Grund hierfür könnte sein, dass es durch die vermehrte Phosphorylierung von α -Syn an Stelle Ser129 zu einer erhöhten Rate an Oligomerisierung und Fibrillierung kommt (Fujiwara et al., 2002). Die Phosphorylierung findet durch eine Vielzahl von Kinasen statt, wie Casein-Kinase-1 und -2, G-Protein gekoppelten Kinasen, aber auch durch Mitglieder der polo-like-Kinase-Familie (PLK), insbesondere der PLK2. Diese ist verantwortlich für die Mehrzahl der α -Syn Phosphorylierungen, was sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gezeigt werden konnte (Inglis et al., 2009). PLK2 hat eine modulierende Funktion auf die neuronale Aktivität (Seeburg et al., 2008), so dass dieses als potentieller Link zwischen neuronaler Aktivität und α -Syn-Toxizität angesehen werden kann. α -Syn ist außerdem Substrat der zytoplasmatischen Protease Calpain, welche in der Lage ist, α -Syn zu verkürzen, wodurch es eine stärkere Tendenz hat zu aggregieren (Dufty et al., 2007). Auch gibt es Verkürzungen am C-terminalen Ende von α -Syn. Diese verkürzte Variante von α -Syn kann leichter Fibrillen und Oligomere bilden (Li W et al., 2005)

Oxidativer Stress und Dopamin

Als ein anderer möglicher Mechanismus der Zelltoxizität wird oxidativer Stress diskutiert. Insbesondere das Gehirn ist ein Organ, welches durch seine geringe Regenerationsfähigkeit sehr sensibel auf oxidativen Stress reagiert. In der SnpC von Parkinsonpatienten können post mortem erhöhte Konzentrationen an Markern für oxidativen Stress gefunden werden (Dexter et al., 1989). Des Weiteren findet man bei Parkinsonpatienten in der SnpC eine verringerte Konzentration an Glutathion, einem Antioxidans, so dass die dopaminergen Zellen weniger gegen oxidativen Stress geschützt sind (Pearce et al., 1997). Dagegen ist die Konzentration an Eisen, einem Katalysator für oxidative Reaktionen in der SnpC, bei Parkinsonpatienten erhöht (Riederer et al., 1989).

Durch seine Tendenz zu oxidieren spielt Dopamin bei der Zelltoxizität eine große Rolle. Dieser Effekt wird durch die im Dopaminmetabolismus gebildeten toxischen Substanzen wie Superoxide und Hydrogenperoxid verstärkt. Diese reaktiven Sauerstoffmetabolite (ROS) führen zu erhöhtem oxidativen Stress und zu mitochondrialer Dysfunktion (Cookson and van der Brug, 2008). Zudem kommt es unter Dopamineinfluss zu einer verstärkten α -Syn-Aggregation und auch zu erhöhter α -Syn-induzierter Zelltoxizität (Xu

et al., 2002). α -Syn bildet unter dem Einfluss von Dopamin vermehrt lösliche Oligomere (Cappai et al., 2005).

Mitochondriale Dysfunktion

Unter oxidativem oder metabolischem Stress transloziert α -Syn von einer diffusen Verteilung aus dem Zytoplasma auf die mitochondriale Oberfläche, insbesondere auf die innere Mitochondrienmembran (Cole et al., 2008). So kann α -Syn einen Einfluss haben auf die mitochondriale Funktion, welche wiederum in engem Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose steht. Die erhöhte Akkumulation von α -Syn in den Mitochondrien führt zu einer Funktionseinschränkung des Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette. Der Defekt in der Funktion des Komplex 1 resultiert in der vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten (ROS). Es gibt eine Korrelation zwischen der α -Syn-Konzentration und der verminderten Komplex-1-Aktivität. Je höher die α -Syn-Konzentration, desto niedriger ist die Komplex-1-Aktivität (Devi et al., 2008). Die Sensitivität der Mitochondrien auf Rotenon, einen Komplex-1-Inhibitor, kann durch α -Syn erhöht werden (Orth et al., 2003). Erhöhte Konzentrationen von α -Syn können außerdem Apoptose auslösen (Kim et al., 2004), welche durch Caspaseinhibitoren oder durch Knockdown von Caspase-12 wieder vermindert werden kann (Smith WW et. al., 2005).

Einfluss auf das Endoplasmatische Retikulum und den Golgiapparat

Die α -Syn-Mutation A53T ist in der Lage, Stress auf das Endoplasmatische Retikulum (ER) auszuüben. So konnte gezeigt werden, dass durch vermehrte Expression von α -Syn in PC12-Zellen GRP78 hochreguliert und eIF-2 α vermehrt phosphoryliert werden. Beides sind Marker für erhöhten Stress des ER (Smith WW et. al., 2005). Auch kann α -Syn den ER-Golgi-Transport blockieren und so vermehrte Zelltoxizität auslösen. Dies kann zumindest teilweise durch Rab1, eine GTPase wieder rückgängig gemacht werden (Cooper et al., 2006).

Proteindegradation

In einer Zelle gibt es verschiedene Mechanismen, um alte oder nicht mehr funktionierende Proteine abzubauen. Zum einen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und zum anderen die Lysosomen, welche entweder durch Chaperon-vermittelter Autophagie (CMA) oder durch Vesikelfusion als Makroautophagie die Proteine abbauen. Normales

α -Syn wird entweder durch das UPS oder durch Lysosomen mit Hilfe der CMA degradiert. Das Vorhandensein von Ubiquitin und ubiquitiniertem α -Syn in den LK legt die Vermutung nahe, dass das UPS eine Rolle in α -Syn- Aggregation und -Toxizität spielt (Li et al., 1997). Sowohl die 20S- als auch die S6-Untereinheit des UPS wird durch α -Syn, und besonders durch dessen Oligomere gehemmt, was in humanen Fibroblastenkulturen als auch in isolierten humanen 20S Proteasomeuntereinheiten gezeigt werden konnte. Die Mutanten, insbesondere A30P, zeigen eine schnellere Inhibition des Proteasomes als der Wt (Lindersson et al., 2004; Snyder et al., 2003). α -Syn hat in seiner Aminosäurestruktur das Motiv KFERQ. Dieses Motiv ist für Proteine essentiell, um durch CMA abgebaut werden zu können. Es ist eine Erkennungssequenz von Hsp70, einem Chaperon, welches an der CMA beteiligt ist (Dice, 2007). α -Syn wird durch den CMA- Weg in die Lysosomen transloziert und dort degradiert. Die Mutanten A30P und A53T blockieren jedoch einen Rezeptor für die CMA an der Wand der Lysosomen und inhibieren so ihren eigenen Abbau, als auch den von anderen Substraten der Lysosomen. Dies könnte ein möglicher Mechanismus des toxischen Funktionsverlustes der α -Syn-Mutanten sein. Durch die Blockade kommt es vermehrt zum Abbau von Proteinen durch das Makroautophagosom, welches jedoch an der vermehrten Proteindegradation dekomponiert. Dieses führt dazu, dass Proteine nicht mehr degradiert werden können und es zu Ansammlungen von toxischen Metaboliten in der Zelle kommt (Cuervo et al., 2004). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass bei erhöhter α -Syn-Konzentration die Proteindegradation durch lysosomale Wege erhöht ist (Mak et al., 2010).

Prionartige Mechanismen

LK können in transplantierten embryonalen mesenzephalischen Neuronen zehn Jahre nach Implantation gefunden werden. Diese LK haben die gleichen Eigenschaften, wie LK, die in der SN bei PS Patienten gefunden werden (Li JY et. al., 2008) Die Pathologie scheint von Zelle zu Zelle fortzuschreiten. So wurden einem Patienten vor 16 Jahren dopaminerge Zellen auf einer Seite der SN implantiert und zehn Jahre später Zellen in die andere Seite implantiert. Bei der Autopsie zeigte sich, dass sowohl die Zellen, die vor 16 Jahren implantiert, als auch die Zellen, die zehn Jahre später implantiert wurden, LK aufwiesen. Jedoch waren von den älteren Zellen mehr LK positiv (Brundin et al., 2008). Verschiedene Mechanismen werden für dieses Phänomen diskutiert. α -Syn und dessen Aggregate wird auch extrazellulär im Medium von kultivierten Zellen gefunden. Dieses ist insbesondere der Fall, wenn die proteasomale oder mitochondriale Funktion eingeschränkt ist (Lee et al., 2005). Auch können diese Aggregate und Oligomere per Endozytose wieder in Zellen aufgenommen werden (Lee et al., 2008). Das in die Zellen

aufgenommene α -Syn interagiert mit dem zytoplasmatischem α -Syn und stimuliert dieses zur Aggregation (Hansen et al., 2011).

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Der exakte Zusammenhang zwischen α -Syn-Aggregaten und Zytotoxizität, welche zu einem Fortschreiten des PS führt, ist noch nicht endgültig geklärt. Vieles deutet darauf hin, dass nichtfibrilläre Dimere und Oligomere verantwortlich für die Neurodegeneration sind (Lansbury Jr and Brice, 2002). Als mögliche Mechanismen der Toxizität wird unter anderem proteasomale Dysfunktion und die Beeinflussung der Autophagie diskutiert. Es gibt α -Syn-Modelle, welche die Formation von Oligomeren sichtbar machen können (Outeiro et al., 2008), jedoch ist es mit diesen nicht möglich, die genauen Effekte der Oligomere auf die Zellen zu studieren. Zudem sind die Oligomere nicht stabil in der Zelle, sondern die Formation unterliegt einem dynamischen Prozess (Siehe Abbildung 1). Dieses macht es schwierig, die genauen Auswirkungen der Oligomere auf die Zellen zu studieren. Aus diesen Gründen werden in dieser Arbeit stabile α -Syn-Fusionsproteine entwickelt. Es wird sowohl ein α -Syn-Dimer, als auch ein -Trimer entwickelt. Mit diesem α -Syn-Multiplikationsmodell werden anschließend die Einflüsse der α -Syn-Oligomere auf Zelltoxizität und Zellfunktion getestet. So wird der Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf die Proteindegradation, insbesondere der proteasomalen Funktion, als auch der Makroautophagie getestet. Ein zentraler Punkt in der α -Syn-Pathologie ist zudem dessen Aggregationsneigung (Uversky, 2007), so wird auch in dieser Arbeit die Aggregationsneigung der α -Syn-Multiplikationen analysiert. Außerdem soll die Frage untersucht werden, ob die Aggregate eher ein Rettungsmechanismus sind und die Vorstufen der Aggregate, die Oligomere, das toxische Agens sind. So stellt sich die Frage, ob es durch vermehrte Aggregation zur erhöhten oder erniedrigten Toxizität kommt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 2.1: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Substanz	Herkunft
Agarose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
B27 Supplement	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bafilomycin A1	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
BCA-Assay	Pierce, Bonn, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Comassieblau G250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cyclohexamide Ready-Made Solution	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DAPI	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dinatrium-EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Gibeco, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DNA Marker GIBECO®1kb plus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Set	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
DSS	Pierce, Bonn, Deutschland

Tabelle 2.1: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Substanz	Herkunft
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dual [®] Color Marker	BioRad, München, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	Riedel de Haën, Seelze, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
FCS	PAA, Coelbe, Deutschland
G418	PAA, Coelbe, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hefe-Extrakt	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
HEPES	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
IGEPAL	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Invitrogen PCR Purification Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laminin	Sigma, TaufkirchenQiagen, Deutschland
L-Glutamin	Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland
LB Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB Pulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine2000 [®]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
MATra [®] Reagent	IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland
Moviol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Neurobasal	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nucleospin [®] Plasmid Mini Kit	Machery-Nagel, Düren, Deutschland

Tabelle 2.1: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Substanz	Herkunft
PageRuler™	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rat-Neuron Nucleofector® Solution	Lonza, Rockland, ME, USA
Rat-Neuron Nucleofector® Supplement	Lonza, Rockland, ME, USA
PBS-Pulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
p-Coumarsäure	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin	PAA, Coelbe, Deutschland
Poly-Ornithin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Polymerase Pfx	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Polymerase Pfx Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase Inhibitor	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Puromycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rapamycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese Gel (30 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	PAA, Coelbe, Deutschland
Sucrose(D+)Saccharose)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
T4-Ligase Puffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ToxiLight® BioAssay Kit	Lonza, Rockland, ME, USA
Toxilight™100 %Lysis Reagent Set	Lonza, Rockland, ME, USA
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tween	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
Agarosegel	1 % Agarose, 0,006 % Ethidiumbromid in TBE-Puffer
BCA-Farblösung	2 % Reagenz B in Reagenz A
Boratpuffer	0,928 g Borsäure auf 100 ml auffüllen und mit NaOH auf pH von 8,4 einstellen
BSA-Standardprotein Stocklösung	10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA in Lysepuffer
CMF-Medium	450 ml Ampuwa, 50 ml 10x HBSS, mit NaHCO_3 auf pH 7,3 einstellen
DAPI-Lösung	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI in PBS
DNA-Puffer 6x	0,15 % Bromphenolblau, 0,15 % Xylenxyanol, 40 % Saccharose in H_2O dest.
ECL	Lösung 1:2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarsäure, 0,1 M Tris-Chlorid in H_2O dest.; pH 8.5, Lösung 2:18 % H_2O_2 , 0,1 M Tris-Chlorid in H_2O dest.; pH 8.5. Beide Lösungen werden kurz vor dem Verwenden im Verhältnis 1:1 gemischt
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris-Chlorid, 192 mM Glycin und 0,1 % H_2O dest.; pH 8.3
Glycin/SDS	0,2 M Glycin, 0,5 % SDS in PBS
HKME-Puffer	10 mM HEPES, pH 7,2, 142 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA in H_2O dest.
Hypotoner Lysepuffer	5 ml HKME- Puffer, 200 μl Complete [®] Proteinase Inhibitor, 50 μl IGEPAL
Lysepuffer	100 μl Proteinase-Inhibitor-Lösung in 2,5 ml RIPA-Puffer
Blocking solution	5 % Milchpulver in TBS-T
NEBuffer2	10 mM Tris-Chlorid, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, 1 mM DTT; pH 7,9

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
4 % Paraformaldehydlösung	40 g Paraformaldehyd in 1000 ml PBS; filtriert
PBS	8,0 g, 0,2 g NaCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24g KH ₂ PO ₄ PBS in 1000 ml H ₂ O dest.; pH 7.4; steril filtriert für alle in vitro Experimente
Poly-Ornithin Stock	50 mg Poly- Ornithin in 50 ml sterilem Boratpuffer lösen
Proteinase-Inhibitor Stocks	2 Tabletten in 840 µl H ₂ O dest.
Purifiziertes H ₂ O	mit dem Wasserreiniger PureLab Plus gereinigtes H ₂ O
RIPA-Puffer	20 mM Tris-Chlorid (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS in H ₂ Odest.
Sammelgel für Western Blots (5 %)	0,68 ml purifiziertes H ₂ O, 0,17 ml Rotiphorese Gel, 0,13 ml 1 M TrisCl/SDS (4x, pH 6,8), 0,01 ml 10 % SDS, 0,01 ml 10 % Ammoniumperoxidsulfat, 0,001 ml TEMED (die Angaben wurden für ein Gel gemacht)
Substratpuffer für Proteasomaktivitätsmessung	25 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM DTT, 0,1 % CHAPS, 0,5 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 20 µM des jeweiligen Fluoreszenzsubstrat
TBE	84 mM Tris-Chlorid, 89 mM Borsäure, 2 mM Na ₂ -EDTA in H ₂ O dest.
TBS	150 mM NaCl, 10 mM Tris-Chlorid in H ₂ O dest.; pH 9.0
TBS-T	0,1 %Tween in TBS; pH7.6
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Chlorid, 192 mM Glycin und 20 % Methanol in H ₂ O dest. ; pH 8.3

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
Trenngel für Western Blots (12 %)	1,6 ml purifiziertes H ₂ O dest., 2 ml 30 % Rotiphorese Gel, 1,3 ml 1,5 M TrisCl/SDS (4x,pH 8,8), 0,05 ml 10% SDS , 0,05 ml 10% Ammoniumperoxidsulfat, 0,002 ml TEMED (die Angaben wurden für ein Gel gemacht)
TrisCl/SDS 4x; pH 6.8	0,5 M Tris-Chlorid, 0,4 % SDS in H ₂ O dest.; pH6,8
TrisCl/SDS 4x; pH 8.8	1,5M Tris-Chlorid, 0,4 % SDS in H ₂ O dest.; pH 8.8
0,25 % Trypsin	25 mg Trypsin in 10 ml CMF
Western Blot Ladepuffer (6x)	7 ml 4x TrisCl/SDS (4x;pH6,8), 3 ml Glycerol, 1g SDS, 0,93 g DTT, 1,2 mg Bromphenolblau (für 10 ml)
Zähllösung	50 % Trypanblau in PBS

2.3 Antikörper

Tabelle 2.3: Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Maus-IgG-Ziegen Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Ziegen-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-LC3-Maus-Antikörper	Abcam, Cambridge, UK
Anti-p62-Kaninchen-Antikörper	Abcam, Cambrige, UK
Anti- β -Tubulin-Maus-Antikörper	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Anti- α -Synuclein-Maus-Antikörper	Zymed Labaratories, CA, USA

2.4 Geräte und Software

Tabelle 2.4: Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
Autoklave	Greiz, Deutschland
AxioVision 3 Software Package	Zeiss, Göttingen, Deutschland
DNA-Elektrophoresekammer, Mini-Sub [®]	BioRad, München, Deutschland
Cell GT-System, 15 x 7 cm und 15 x 25 cm	
easy WIN basic 6.1.	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Eismaschine, Scotman [®]	Frimont, Mailand, Italien
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme, Crurix 60	AGFA, Düsseldorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Axiovision	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Fluor-ST [™] -Multimanager	BioRad, München, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gentle	Universität Köln, Köln
Heizblock, ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubator für Bakterienkultur	Heraeus, Hanau, Deutschland
Inkubator für Zellkultur	Sanyo, Bad Nenndorf, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Biberach, Deutschland
Luminometer Wallac 1450 Microbeta	PerkinElmer, CT, USA
Trilux	
Magnetplatte 24-well	IBA BioTAGnology, Göttingen, Deutschland
Mikroskop ID 02	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer improved	Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland
Nucleofactor [®]	Lonza, Rockland, ME, USA
PCR-Maschine Cyclon 25	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Photometer, Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.4: Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
Photometer, ELISA-Photometer Tecan Rainbow	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Pipetten	Gilson, Villers le Bel, Frankreich
Quantity One 4.2.1	BioRad, München, Deutschland
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sonicator	Bandelin, Berlin, Deutschland
Transferkammer Mini-PROTEAN [®]	BioRad, München, Deutschland
Elektrophorese-System	
Vortex, Mixer	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wallac 1450 MicroBeta Workstation 2.7.	PerkinElmer, CT, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Western Blot Elektrophoresekammer, Mini-PROTEAN [®] 3 Cell System	BioRad, München, Deutschland
Zellkulturbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.5 Kulturmedien

Tabelle 2.5: Kulturmedien

Kulturmedium	Herstellung
DMEM-Full	10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in DMEM
Hippokampus-Medium	100 ml Neurobasal, 0,5 ml Transferrin, PSN 1 ml, L-Glutamin 0,5 mM, B27 Supplement
Medium zum Einfrieren der Zellen	10 %DMSO in FCS
LB-Agar	11,2 g LB-Agar in 350 ml H ₂ O dest.; autoklaviert, auf 60°C abgekühlt, 18 ml Agar pro 10 cm Kulturschale, über Nacht trocknen und anschließend bei 4 °C lagern. Gegebenenfalls mit Antibiotikum versetzen.
LB-Medium	25 g LB-Pulver in 1000 ml H ₂ Odest.; pH7.0.; autoklaviert. Eventuell mit Antibiotikum, z.B.100 µg/ml Ampicillin
Medium für SH-SY5Y-Zellen	15 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin in DMEM
SOB-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ in H ₂ O dest.
SOC-Medium	20 mM Glucose in SOB-Medium

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.6: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Blotting-Papiere	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chemilumineszenzfilme, Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Nitrocellulose PROTEAN [®]	Schleicher & Schüll Bioscience GmbH, Dassel, Deutschland
Multipipettenspitze 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objekträger	Waldemar Knittel, Braunschweig, Deutschland
Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland
Zellkulturplatten (96 well, weiß)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (10 cm, 6-well, 24-well, 96-well)	Greiner Bio One, Solingen, Deutschland

2.7 Plasmide

2.7.1 pEGFP-N1

Das Plasmid pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA, USA) exprimiert das *enhanced green fluorescent proteine*. Es wird von blauem oder UV-Licht angeregt mit einem Exzitationsmaximum von 488 nm und es fluoresziert grün bei einem Emissionsmaximum von 507 nm. Das Plasmid beinhaltet einen CMV-Promotor und eine Neomycin/Kanamycinresistenz (Zhang et al., 1996).

2.7.2 pcDNA3.1.

Das Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) besteht aus 5428 bp. Es weist unter anderem einen CMV-Promotor, eine multiple Klonierungsstelle an Position 895-1010, eine T7- und BGH-*reverse-priming site*, sowie eine Neomycin- und Ampicillinresistenz auf.

2.7.3 α -Synuclein-Wildtyp

Das α -Syn-Wt enthaltende Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Anja Baumann (Neuropädiatrie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.7.4 α -Synuclein-Multiplikationen

Die α -Synuclein-Duplikation und -Triplikationplasmide sind Plasmide, in denen zwei bzw. drei α -Synucleine ohne Stoppcodon durch eine Linkersequenz (3'-GGTGGAGGCCCTTC TAGCGGTGGTGGACCA-5') gekoppelt sind. Sie sind in einen pcDNA3.1-Vektor geklont und besitzen eine T7-Primingsite, einen CMV-Promotor, eine SV40-Origin of Replication, und außerdem eine Ampicillin- als auch eine Neomycinresistenz.

2.8 Klonierung der Plasmide

Die Klonierung besteht aus dem Einschleusen eines DNA-Fragments (Insert) in ein Plasmid (doppelsträngiger DNA-Vektor) und deren darauf folgende Vervielfältigung. Das Plasmid wird mit Restriktionsenzymen an für das Enzym spezifischen DNA-Stellen geschnitten. Anschließend wird das Insert mit Hilfe des Enzyms Ligase in das Plasmid eingefügt. Dieser Vorgang wird Ligation genannt.

2.8.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von DNA. Zunächst wird dafür die DNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen. Nun können sich Primer anlagern. Primer sind kurze zum 5'- und zum 3'-Ende komplementäre DNA-Stränge, die die Basis für eine hitzestabile Polymerase bilden, welche die Genabschnitte amplifiziert. Die Polymerase bindet an die Primer und fügt die komplementären Nukleotide ein, so dass neue DNA-Stränge entstehen. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Prozesses liegt das gewünschte Genprodukt am Ende in großer Menge vor.

2.8.2 Analytische Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kann DNA anhand der Größe aufgetrennt werden. DNA wandert in einem elektrischem Feld zum positiven Pol, da sie selber negativ geladen ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Größe der Fragmente

bestimmt, je kleiner die Fragmente, desto schneller wandern sie. Die analytische Agarosegelelektrophorese dient zur Kontrolle der erfolgten PCR. Dafür wurde eine DNA-Elektrophoresekammer mit 1 % Agarosegel verwendet. In die Taschen des Agarosegels wurden nun 5 μ l PCR-Produkt, versetzt mit 6x DNA-Puffer, ohne Bromphenolblau geladen. Zusätzlich wurde in eine Tasche 4 μ l 100 bp DNA-Leiter geladen, um später die Größe des DNA-Fragmentes bestimmen zu können. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in TBE bei Raumtemperatur bei 80 Volt für ca.1 Stunde aufgetrennt. Mit Hilfe des fluoreszierenden und interkalierenden Ethidiumbromids konnte durch Anregung mit UV-Licht und des FluorTMMultiImagers die DNA mit der Software Software Quantity One 4.2.1 sichtbar gemacht werden.

2.8.3 Aufreinigung des PCR-Produkts

Die Aufreinigung des PCR-Produkts wurde mit Hilfe des Invitrogen PureLinkTM PCR Purification Kits durchgeführt. Zur Vorbereitung der Aufreinigung wurden zunächst 10 ml Isopropanol in 15 ml Bindepuffer gegeben, außerdem wurde im Verhältnis 1:10 Isopropanol mit dem Bindepuffer HC gemischt. Zu den 8 ml Waschpuffer wurden 32 ml Ethanol gegeben. Die mitgelieferte Säule wurde in ein 2-ml-Reagenzgefäß platziert. Zur Aufreinigung des PCR-Produkts wurde dieses zunächst im Verhältnis 1:4 mit dem Bindepuffer vermischt. Das Gemisch wurde anschließend in die Säule gegeben und für 1 min bei 10 000 xg zentrifugiert und die abzentrifugierte Lösung verworfen. Nun wurde 650 μ l Waschpuffer auf die Säule gegeben und nochmals bei 10 000 xg für 1 min zentrifugiert und die abzentrifugierte Lösung ebenfalls verworfen. Anschließend wurde die Säule bei maximaler Geschwindigkeit für 2-3 min zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Zum Eluieren der DNA wurde die Säule auf ein 1,5-ml-Reagenzgefäß gesetzt und 50 μ l des Eluierpuffers auf die Säule gegeben, 1 min inkubiert und anschließend für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die abzentrifugierte Lösung enthält die aufgereinigte DNA.

2.8.4 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen das Plasmid geschnitten. Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, welche DNA an bestimmten, für die jeweiligen Enzyme spezifischen Stellen schneiden können. Dies dient zum einem dem Öffnen des Vektors, in welchen bei der Ligation ein Insert eingefügt werden soll. Zum anderen aber auch zur Kontrolle, ob das richtige Insert eingefügt wurde. Das geschieht, indem die geschnittene DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und somit sichtbar gemacht

werden kann.

Tabelle 2.7: Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme	Schnittstellen
ApaI	GGGCCC
BamHI	GGATCC
HindIII	AAGCTT
NheI	GCTACG
SmaI	CCCGGG
XbaI	TCTAGA

2.8.5 Präparatives Agarosegel und Aufreinigung der DNA

Die geschnittenen DNA-Stücke werden nun noch einmal auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Unter UV-Licht werden die sichtbaren Banden ausgeschnitten und in je ein 2-ml-Reagenzgefäß gegeben. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte entsprechend dem Protokoll mit dem Qiaquick Gel Extraction[®] Kit. Hierzu wurde zunächst das Gewicht der Gelfragmente bestimmt und anschließend der Puffer QG im Verhältnis 3:1 hinzugegeben und 10 min bei 50 °C inkubiert. Das Gelfragment wurde, nachdem es sich komplett gelöst hatte, mit Isopropanol versetzt. Anschließend wurde die DNA-Lösung in eine, auf ein 1,5-ml-Reagenzgefäß platzierte Qiaquick-Spin[®]-Säule gegeben und bei 10000 xg 1 min zentrifugiert. Die abzentrifugierte Lösung wurde verworfen. Das Waschen der Säule erfolgte mit 750 µl Puffer PE (1 min bei 10.000 xg), die abzentrifugierte Waschlösung wurde ebenfalls verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde diese noch einmal bei 10000 xg für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule auf ein neues 1,5-ml-Reagenzgefäß gesetzt und der Puffer EB zum Eluieren der DNA auf die Säule gegeben und wiederum 1 min bei 10000 xg zentrifugiert. Das 1,5-ml-Reagenzgefäß enthält nun die gereinigte DNA.

2.8.6 Ligation

Ligation beschreibt die Verknüpfung des Vektormoleküls mit dem Insert. Dieser Vorgang wird durch das Enzym Ligase katalysiert. Für die Ligation wurde zunächst die Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente bestimmt und daraufhin im gewünschten Verhältnis gemischt. Die DNA wurde anschließend mit der T4-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur, bzw. 16 °C inkubiert.

2.9 Amplifikation der Plasmide

2.9.1 Transformation kompetenter Bakterien

Viele Bakterien sind in der Lage, Plasmide aufzunehmen und sie unabhängig von ihrem eigenen Genom zu vervielfältigen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Amplifikation der Plasmide zunutze. Für die Transformation wurden *E. coli*-DH5 α -Bakterien verwendet. 100 μ l der Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, anschließend wurden sie mit 20 μ l des Ligationsansatzes versetzt und daraufhin 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde nun für 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt und umgehend zwei Minuten auf Eis gekühlt. Die kurze Erhöhung der Temperatur auf 42 °C ermöglicht den Bakterien, die Plasmide aufzunehmen. Nach der Inkubation auf Eis wurde 400 μ l warmes LB-Medium zu den Zellen gegeben und anschließend wurde der Ansatz für 1 Stunde im Wärmeschüttler bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien wurden 200 μ l des Transformationsansatzes auf eine mit Ampicillin versetzte Agarplatte ausplattiert. So können nur solche Bakterien Kolonien bilden, die eine Ampicillinresistenz aufweisen und diese wurde im Plasmid in die Bakterien geschleust. So kann davon ausgegangen werden, dass nur die über Nacht bei 37 °C gewachsenen Kolonien das gewünschte Plasmid enthalten.

2.9.2 Mini-Präparation

Eine Mini-Präparation dient der Gewinnung analytischer Mengen (ca. 20 μ l) von Plasmid-DNA aus den Bakterien. Mehrere, der über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurden von der Agarplatte in je 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt. Das Antibiotikum wird entsprechend der über das transformierte Plasmid vermittelten Resistenz gewählt, hier wurde Ampicillin verwendet. Der Ansatz inkubierte bei 37 °C über Nacht. Die Mini-Präparation wurde mit Hilfe des Nucleospin[®] Plasmid Mini Kits entsprechend dem Protokoll durchgeführt. Zunächst wurde der Ansatz bei 11000 xg für 30 sek zentrifugiert. Anschließend wurde zur Lysierung der Bakterien, das die Bakterien enthaltende Pellet mit 250 μ l Puffer A1, 250 μ l Puffer A2 für 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 300 μ l Puffer A3 zugefügt und 10 min bei 11000 xg zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Plasmiden wurde nun auf die NucleoSpin[®]-Säulen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 11000 xg für 1 min. Auf die Säule wurden 600 μ l Puffer A4 pipetiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei 11000 xg für 1 min wurde die DNA gewaschen und Nukleasen inaktiviert. Zum Trocknen der Säule wurde diese 2 min bei 11000 xg zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurden 50 μ l Puffer AE auf die Säule gegeben und diese anschließend bei 11000 xg für 1 min zentrifugiert. Die gewonnenen

Plasmide wurden mittels Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese auf die Anwesenheit des korrekten Inserts im Plasmids geprüft. Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen Plasmid-DNA wurde mit einem Bio-Photometer bestimmt.

2.9.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der genauen Bestimmung der Nukleotidsequenz im Plasmid. Die Sequenzierung beruht auf der von Sanger und Coulsen entwickelten Kettenabbruchmethode. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Seqlab Laboratories (Göttingen). Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Gentle mit den in der Literatur beschriebenen Sequenzen verglichen.

2.9.4 Klonierung der α -Synuclein-Multiplikationen

Die α -Syn-Duplikation und -Triplikation sollten in einen pcDNA3.1 Vektor kloniert werden. Dieser enthält jedoch nicht die für die Klonierung der α -Syn-Multiplikationen nötigen Schnittstellen der Restriktionsenzyme NheI und XbaI. So wurden 2 μ g des pcDNA3.1-Vektors zunächst mit 10 U ApaI für 6 Stunden bei 25 °C verdaut und anschließend mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit purifiziert. Das Plasmid wurde mit dem Enzym BamHI zum zweiten Mal für zwei Stunden bei 37 °C verdaut. Nun wurde der doppelt-verdaute Vektor eine Stunde mit Garnelen-alkalischer-Phosphatase behandelt, um Selbstligationen zu vermeiden. Zwei, an den Enden phosphorylierte Oligonukleotide mit den Sequenzen 5'-GAT-CCA-TGT-CTA-GAG-TTT-CAG-CTA-GCT-AGC-TAA-GGG-CC-3' und 5'-CTT-AGC-TAG-CTG-AAA-CTC-TAG-ACA-TG-3' wurden aneinander gelagert, um einen Polylinker mit Start-, Stop-Codon und Schnittstellen für NheI und XbaI zu generieren. Dazu wurden die beiden Fragmente bei 95 °C für 2 min, 80 °C 1 min, 70 °C 1 min, 60 °C eine Stunde, 50 °C eine Stunde und bei 40 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 5 pmol des DNA-Fragments mit mit 5 pmol des doppelt verdauten pcDNA3.1-Vektors mittels der T4-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur ligiert. Am nächsten Tag wurde die DNA in chemisch-kompetente E.coli transformiert. Die Klone wurden gepickt und in 5 ml LB-Medium kultiviert. Anschließend wurde zum Eluieren der DNA eine Minipräparation durchgeführt. Zur Kontrolle der Klonierung erfolgte die Sequenzierung mit nachfolgendem Vergleich der Sequenz mit Hilfe des Computerprogramms Gentle. Um α -Syn zu amplifizieren und die Linkersequenz und Schnittstellen für NheI und XbaI an α -Syn zu koppeln, wurde eine PCR durchgeführt. Als vorwärts Primer diente 5'-CAT-AGC-GGT-GGT-GGA-CCA-GAT-GTA-TTC-ATG-AAA-GGA-CTT-TCA-3', der rückwärts Primer hatte die Sequenz 5'-CAT-TCT-AGA-AGG-GCC-

TCC-ACC-GGC-TTC-AGG-TTC-GTA-GTC-TTG-3'. Für die PCR wurde die deep-vent[®]-Polymerase genommen, das PCR-Programm des Zyklers war 1x 94 °C für 5 min, 24x (94 °C für 30 sek., 52 °C für 30 sek., 72 °C für 1 min), 1x 72 °C. Anschließend wurde die DNA bei 4 °C gelagert. Zur weiteren Klonierung wurde die DNA mit dem Invitrogen-PCR-Purification-Kit gereinigt und mit den Enzymen NheI sowie XbaI für 3 Stunden bei 37 °C verdaut. Es wurde nun eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1 % Gel durchgeführt und die DNA anschließend ausgeschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraction[®] Kit gereinigt. Da die beiden Enzyme kompatibel, jedoch nicht identische Schnittstellen haben, ist es möglich, dass diese sich aneinanderlagern können. Zur Ligation wurden 780 ng des amplifizierten Synucleins mit der T4-Ligase über Nacht bei 25°C inkubiert. Die daraus resultierenden DNA-Fragmente wurden auf ein Gel aufgetragen und die α -Syn-Duplikation, bzw. -Triplikation aus dem Gel extrahiert. Der pcDNA3.1-Vektor mit dem neuem Polylinker wurde doppelt verdaut mit NheI sowie XbaI für drei Stunden bei 37 °C und anschließend mit einem präparativen 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit dem Qiaquick Gel Extraction[®] Kit gereinigt. Die DNA wurde außerdem noch für eine Stunde bei 37 °C mit der Garnelen-alkalischen-Phosphatase behandelt. 1 pmol des Vektors wurde nun mit 1 pmol der jeweiligen ausgeschnittenen α -Synucleinfragmente durch die T4-Ligase bei Raumtemperatur über Nacht ligiert. Das daraus resultierende Ligationsprodukt wurde erneut mit NheI und XbaI für zwei Stunden bei 37 °C doppelt verdaut. Dieser Verdau diente zum Ausschließen aller Vektoren, welche das Insert falsch integriert hatten. Anschließend wurden die Plasmide in chemisch-kompetente E.coli transformiert. 76 gewachsene Klone wurden in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum amplifiziert und die DNA mittels Minipräparation eluiert. 700 ng der jeweiligen gewonnenen Produkte wurden anschließend mit HindIII und SmaI doppelt für zweieinhalb Stunden bei 37 °C verdaut und anschließend auf ein analytisches 1 % Agarosegel aufgetragen. Diese Schritte sollen gewährleisten, dass das korrekte Insert eingebaut wurde. Die positiven Plasmide wurden anschließend durch SeqLab sequenziert und mit dem Computerprogramm Gentle mit den geplanten Sequenzen verglichen.

2.9.5 Maxi-Präparation

So wie die Mini-Präparation dient auch die Maxi-Präparation der Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien, jedoch in größeren Mengen von ca. 500 μ l. Ausgangspunkt für eine Maxi-Präparation war ein über Sequenzierung ausgewählter Mini-Präparationsansatz. Mit diesem wurden wiederum Bakterien transformiert und auf einer Agarplatte zu Kolonien herangezüchtet. Eine Bakterienkultur wurde in 200 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und unter Schütteln 12 Stunden bei 37 °C selektiv amplifiziert. Die

Maxi-Präparation wurde mit Hilfe des Qiagen-Plasmid-Maxi-Kits entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Durchführung der Maxi-Präparation ist der Durchführung der Mini-Präparation bis auf einige zusätzliche Reinigungsschritte nahezu identisch, so dass auf eine ausführliche Darstellung verzichtet wird. Nach erneuter Kontrolle durch einen Restriktionsverdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese wurden die Plasmide für die folgenden Experimente verwendet.

2.10 Zelllinien

2.10.1 SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen sind Neuroblastom Zellen, die aus der Neuroblastomlinie SH-N-SY hervorgegangen sind. Die original Zelllinie wurde aus dem Knochenmarksbiopsat eines vierjährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom gewonnen (Biedler et al., 1973). Die Zellen wachsen einschichtig und bei hoher Konfluenz auch in Anhäufungen. Weiterhin sind die Zellen charakterisiert durch die Expression von Neurofilamenten und Vimentin.

2.10.2 CSM14.1-Zellen

CSM14.1-Zellen sind nigrostriatale Rattenzellen, welche durch das temperatursensitive SV-40-large-T-Antigen immortalisiert wurden und können über dieses auch bei 39 °C wieder differenziert werden (Haas and Wree, 2002).

2.10.3 Primäre hippokampale Neurone

Die primären hippokampalen Neurone wurden aus 18 Tage alten Embryos von Ratten isoliert. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Kathrin Eckermann zu Verfügung gestellt.

2.11 Zellkultur

2.11.1 Kultivierung

Die SH-SY5Y-Zellen wachsen in 10 cm Rundschalen bei wasserdampfgesättigter Luftfeuchtigkeit mit einem CO₂ Gehalt von 5 % bei 37 °C mit SH-SY5Y-Kulturmedium. CSM14.1-Zellen wurden ebenfalls in 10-cm-Rundschalen in DMEM full bei 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre, jedoch bei 32 °C kultiviert. Die primären hippokampalen Neurone wachsen bei wasserdampfgesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bei 37 °C in Hippokampus-Medium.

2.11.2 Passagierung

Die Passagierung der Zellen fand unter sterilen Bedingungen statt. Die Zellen wurden nach dem Absaugen des Medium mit 5 ml PBS gewaschen. Zum Lösen des Zellrasens von den Rundschalen wurden die Zellen für 10 min in 2,5 ml 1 % Trypsin bei 37 °C bzw. 32 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 ml Kulturmedium in ein 15-ml-Reagenzgefäß gegeben und für 5 min bei 390 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Kulturmedium gelöst. 300 μ l der SH-SY5Y-Zelllösung wurden in eine mit 10 ml des entsprechenden Kulturmedium gefüllte 10-cm-Rundschale gegeben, bei den CSM14.1-Zellen wurde genauso verfahren, jedoch wurde je 200 μ l der Zelllösung in das entsprechende Kulturmedium gegeben.

2.11.3 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Zellen wurden 25 μ l der, in 1 ml Kulturmedium gelösten Zellen, 1:10 mit der Zählösung verdünnt. Anschließend wurden 0,4 μ l der Zählösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die Zellzahl mit einem invertiertem Mikroskop ermittelt und auf 1 ml hochgerechnet. Das Volumen mit der gewünschten Anzahl von Zellen wurde auf entsprechende Zellkulturplatten ausgesät.

2.11.4 Beschichten von Zellkulturplatten für primäre hippokampale Neurone

Vor der Kultivierung der primären hippokampalen Neurone mussten zuvor die Kulturplatten beschichtet werden. Dazu wurde 50 μ g Poly-L-Ornithin in 50 ml sterilem Boratpuffer gelöst und steril filtriert. Anschließend wurde die Lösung 1:10 mit Ampuwa verdünnt. Jedes Well der 12-Well-Kulturplatte wurde mit 500 μ l der Ornithinlösung bedeckt. Die Platte wurde nun 24 Stunden im Kühlschrank inkubiert, anschließend wurden die Wells 2x mit Ampuwa gewaschen. Nach der Beschichtung mit Ornithin wurden die Kulturplatten mit Laminin beschichtet. Dazu wurde Laminin in einem Verhältnis von 1:1000 mit Neurobasalmedium verdünnt. 500 μ l dieser Lösung wurden nun auf jedes Well gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.11.5 Beschichten von Deckgläsern

SH-SY5Y-Zellen haften nicht ohne vorherige Beschichtung auf Deckgläsern. Deswegen wurden diese vor Verwendung mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurden die Zellen mit Poly-L-Lysin und PBS in einem Verhältnis von 1:100 gemischt und auf die Deck-

gläser gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der weiteren Verwendung wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen.

2.11.6 Fixieren der Zellen

Für die Fixierung der Zellen auf Deckgläser wurden die Zellen in PBS gewaschen und für 30 min mit 4 % Paraformaldehyd inkubiert. Mit drei 10 minütigen Waschschrritten wurde das Fixans mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Deckgläser, mit dem Zellrasen nach unten, mit 1-2 Tropfen Moviol auf einem Objektträger befestigt. Zum Trocknen wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung werden die Objektträger bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.11.7 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellen, wie beschrieben, von den 10-cm-Rundschalen gelöst und abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert, langsam auf -80 °C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.11.8 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und zusammen mit dem Einfriermedium in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach dem Abzentrifugieren mit 174 xg für 5 min wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und im jeweiligen Kulturmedium auf 10-cm-Kulturschalen ausgesät.

2.11.9 Transfektion

Bei einer Transfektion wird fremde DNA in eine eukaryote Zelle eingeschleust. Dies kann sowohl mit einer stabilen Transfektion auf Dauer oder zeitlich beschränkt mit einer transienten Transfektion geschehen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich transiente Transfektionen durchgeführt. Bei einer transienten Transfektion wird die DNA nicht fest in das Genom eingebaut, sondern die DNA mittels eines Promotors mit hohem Niveau vom freiliegenden Plasmid abgelesen.

Lipofectamine™2000

Die Lipofectamine™2000-Transfektion wurde genutzt, um DNA in den CSM14.1-Zellen überzuexpressieren. Hierzu wurden zunächst 48 h vor der Transfektion die Zellen auf gewünschte Zellkulturplatten in dem entsprechenden Kulturmedium ausplattiert; hier

wurden 6-well-Platten verwendet. Die Transfektion wurde mit dem Transfektans Lipofectamine™2000 anhand des zugehörigen Protokolls durchgeführt. Hierzu wurde zunächst 4 µg des entsprechenden Plasmids mit 250 µl Opti-MEM® vermischt. Pro Plasmid wurde 10 µl Lipofectamine™2000 in 250 µl Opti-MEM® für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit dem Transfektans gemischt und für 20 min inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium der Zellen gewechselt. Dazu wurde von den Zellen zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 2 ml DMEM zu jedem Well gegeben. Nach den 20 min Inkubationszeit wurde 500 µl des DNA-Lipofectamine™2000-Gemisch auf jedes Well gebracht. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde erneut das Kulturmedium zu einem zellspezifischem Kulturmedium gewechselt.

MATra®

Zur Transfektion der SH-SY5Y-Zellen wurde MATra® genutzt, da Lipofectamine™2000 eine gewisse Zelltoxizität aufweist und SH-SY5Y-Zellen sehr empfindlich sind. 72 h vor der Transfektion wurden die Zellen auf 24-well-Platten ausplattiert. Hierzu wurde pro Well 0,6 µg DNA mit 50 µl DMEM vermischt. Nach fünf Minuten Inkubation wurde 0,6 µl MATra® Suspension hinzugegeben und 20 min inkubiert. Währenddessen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS vorsichtig gewaschen und anschließend 250 µl DMEM zu jedem Well gegeben. Nach der Inkubationszeit von 20 min wurde der Transfektionsansatz so mit DMEM verdünnt, dass ein Gesamtvolumen von 100 µl auf jedes Well gegeben werden konnte. Nach vorsichtigem Schütteln der 24-well-Platte wurde diese auf eine 24-well-Magnetplatte gelegt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Transfektion der primären hippocampalen Neurone

Die primären hippocampalen Neurone wurden mit dem Amaxa® Nucleofector® transfiziert. Zu jedem Well, der vorher beschichteten Kulturplatten, wurde 300 µl Kulturmedium 2 gegeben und die Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Auch wurde je 500 µl Kulturmedium 1 unter den gleichen Konditionen vorinkubiert. Die Zellen wurden nun für 5 min bei 80 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl 20 °C warmer Nucleofector®-Lösung resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden anschließend mit 3 µg der entsprechenden DNA versetzt. Die Suspension wurde in eine Küvette zur Transfektion gegeben. Am Nucleofector® wurde das Programm 0-005 ausgewählt. Zur Küvette wurden die 500 µl der vorgewärmten Kulturmedium 1 gegeben

und die Zellsuspension wurde anschließend auf die vorher präparierten Zellkulturplatten transferiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ bei gesättigter Luftfeuchtigkeit gelagert. Nach 4 Stunden wurde das Medium gewechselt und 750 µl Kulturmedium 2 hinzugegeben. Nach 24 Stunden erfolgte ein weiterer Mediumwechsel.

2.12 Zelltoxdassay

Die Bestimmung der Toxizität der α -Syn-Duplikationen und Triplikationen wurde an SH-SY5Y-Zellen und primären hippocampalen Neuronen getestet. Dieses geschah mit Hilfe des ToxiLight™BioAssay Kit. Hierbei wird die Freisetzung der Adynerlatkinase von sterbenden Zellen gemessen. Die Adynerlatkinase wandelt ADP in ATP um, welches in einer zweiten Reaktion, katalysiert durch das Enzym Luciferase, zur Emission von Licht führt. Dieses kann mit dem Luminometer gemessen werden. Die SH-SY5Y-Zellen wurden auf 24-well-Platten ausplattiert und nach 72 Stunden mit MATra® transfiziert. Nach weiteren 72 Stunden erfolgte die Auswertung mit Hilfe des ToxiLight™BioAssay Kit. Das Toxilight Reagenz wurde anhand der Herstellerangaben angesetzt und lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Durchführung der Messung wurden je 50 µl Medium pro Well der auszuwertenden Platte in eine lichtundurchlässige 96-well-Platte pipettiert. Anschließend wurde 50 µl des Toxilight-Reagenz in jedes Well gegeben. Die Messung wurde nach exakt fünf Minuten Inkubation mit dem Luminometer durchgeführt. Mit Hilfe der Software Wallac 1450 MicroBeta Workstation 2.7. erfolgte die Auswertung. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem eGFP-Plasmid transfiziert und vor der Toxizitätsmessung unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Zu Toxizitätsmessungen an den primären hippocampalen Neuronen wurde die Zellen 48 Stunden vor Analyse mit dem Nucleofector® transfiziert. Die Auswertung erfolgte mit dem ToxiLight™BioAssay Kit nach dem gleichen Schema wie bei den SH-SY5Y-Zellen.

2.13 Proteinanalysen

2.13.1 Zellyse

Die Zellyse dient der Freisetzung von Proteinen aus Zellen, so dass diese für nachfolgende Untersuchungen genutzt werden können.

Standardzelllyse

Zur Lyse der Zellen wurde 48 Stunden nach Transfektion das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Mit 80 μ l RIPA-Lysepuffer wurden die Zellen mit einem Zellkratzer von der Platte geschabt und in ein 1,5-ml-Reagenzgefäß überführt. Nach 15 min Inkubation auf Eis erfolgte die Ultraschallbehandlung mit dem Sonicator. Anschließend wurden die Zellen bei 13000 xg für 10 min zentrifugiert und der Proteinüberstand in ein neues Reagenzgefäß gegeben und dieses bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

DSS-Zelllyse

Die Zelllyse mit dem Protein-Crosslinker DSS diente zur Stabilisierung und Darstellung der α -Syn-Aggregate. Hierzu wurden CSM14.1-Zellen auf 6-well-Platten ausplattiert und 48 Stunden nach Transfektion mit 500 μ l Trypsin pro Well von der Platte gelöst und mit 500 μ l DMEM in ein 1,5-ml-Reagenzgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 390 xg wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml DMEM resuspendiert. Anschließend erfolgte, wie oben beschrieben, die Quantifizierung der Zellen, so dass in jedem Reagenzgefäß die gleiche Anzahl Zellen vorhanden war. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 390 xg, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μ l PBS resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden 2 mg DSS in 1080 μ l DMSO gelöst. Zum Start der Crosslinking-Reaktion wurde nun 3.5 μ l dieser Lösung in jedes Reagenzgefäß pipettiert. Nach exakt 30 min wurde zum Stoppen der Reaktion 3,6 μ l 1 M Tris-Chlorid, pH 7,4 in jedes Reagenzgefäß gegeben und für 15 min inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 390 xg und anschließendem Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 50 μ l RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten nach dem Protokoll für die Standardzelllyse.

Zelllyse für die Proteasomaktivitätsbestimmung

48 Stunden nach Transfektion wurden das Medium der Zellen verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun mit hypotonen Lysepuffer lysiert und in ein 1,5-ml-Reagenzgefäß überführt. Nun wurde das Zelllysats mit dem Sonicator homogenisiert und anschließend mit 21,000 xg für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Verwendung des Lysats in ein neues 1,5-ml-Reagenzgefäß überführt.

2.13.2 BCA-Assay

Bicinchoninsäure (BCA)-Assay ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Der Assay macht sich zu nutze, dass Proteine im alkalischen Milieu einen Komplex mit Cu^{2+} eingehen. Bei der Komplexbildung wird Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert. Cu^{1+} bildet mit BCA einen stabilen violett-leuchtenden Komplex, welcher bei 562 nm photometrisch bestimmt werden kann (Smith PK et. al., 1985). Die Proteinkonzentration der Lysate wurde durch einen Vergleich mit einer Standardkonzentrationen an Protein bestimmt. Dazu wurde auf einer 96-well-Platte BSA als Standard in verschiedenen Konzentrationen (40 μg , 20 μg , 10 μg , 5 μg , 2,5 μg , 1,25 μg , 0,635 μg), sowie 4 μl Lysat (Doppelbestimmung) mit je 200 μl BCA-Färbelösung versetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm mit einem Photometer unter Verwendung der Software easy WIN basic 6.1 bestimmt. Die Proteinkonzentration wurden anhand einer Eichreihe ermittelt, die sich durch die BSA-Konzentrationsstandartreihe ergab.

2.13.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) dient der Auftrennung von Proteinen. Die Auftrennung erfolgt anhand des Molekulargewichtes der Proteine in einem elektrischem Feld. Dabei wandern die Proteine vom negativen zum positiven Pol. Für die Proteinauftrennung der Lysate wurde zunächst ein 12 % Trenngel und ein 5 % Sammelgel in eine Gel-Elektrophoresekammer gegossen. Des Weiteren wurden 20 μg der Proteinlysate mit H_2O auf 15 μl verdünnt und mit 2 μl 6x SDS versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben in die Wells des Gels aufgetragen. Als Standart wurden 5 μ des Page Rulers verwendet. Die SDS-Page wurde zunächst bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V und anschließend für 2 h bei 100 V durchgeführt.

2.13.4 Western Blot

Beim Blotten werden die durch die SDS-Page aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, um diese später Mittels Antikörper dedektieren zu können. Der Western Blot erfolgte in einer Transferkammer zwischen zwei 6x9 cm großen Blottingpapieren in Transferpuffer für eineinhalb Stunden bei 4 °C mit 100 V. Die Transferkammer wurde zusätzlich mit Eis gekühlt. Transferiert wurde auf eine 6x9 cm große Nitrocellulosemembran.

2.13.5 Immunodetektion von Proteinen

Nach dem Blotten der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran 1 Stunde lang in 5 % Milch in TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Anschließend erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers über Nacht bei 4 °C. Für den Nachweis von α -Syn wurde der Anti- α -Synuclein-Maus-Antikörper, zum Nachweis von β -Tubulin der Anti- β -Tubulin-Maus-Antikörper, beide in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Zum Nachweis von p21 wurde der Anti-p21-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Verdünnt wurde jeweils mit 5 % Milch in TBS-T. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3x20 min in TBS-T gewaschen und anschließend im zweiten Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Zur Detektion von α -Syn und β -Tubulin diente der Anti-Maus-IgG-HRP-Ziegen-Antikörper. Der Nachweis von p21 erfolgte mit dem Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Ziegen-Antikörper als Zweitantikörper. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 20 min erfolgte die Detektion der Proteine mit Hilfe des ECL-Reagenz. ECL reagiert unter Bildung von Chemolumineszenzsignalen, als Substrat dient die an die Zweitantikörper gekoppelten HRP. Hierzu wurden die ECL-Lösungen 1 und 2 miteinander versetzt und anschließend wurde die Lösung auf die Membrane gegeben, für 1 min inkubiert und die Chemolumineszenz mittels einer Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme auf Chemolumineszenzfilmen nachgewiesen. Erfolgten mehrere Antikörperfärbungen auf einer Membran, wurde die Membran zwischen den verschiedenen Färbungen für eine Stunde mit Glycin/SDS gewaschen.

2.13.6 Densitometrische Messung der Immunblots

Die densitometrische Messung der Immunoblots erfolgte mit dem Programm ImageJ.

2.13.7 Autophagie

Zur Analyse der Aktivität der Autophagie in den Zellen wurden CSM14.1-Zellen mit LipofectamineTM2000 transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Zugabe von 0,3 M Rapamycin auf die Zellen, nach 72 h erfolgte die Zugabe von 15 nM Bafilomycin-A1. Nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden wurden die Zellen nach dem Standardprotokoll lysiert.

2.13.8 Proteasomenaktivitätsmessungen

Das proteasomspezifische Substrat Z-LLE-AMC besteht aus drei Aminosäuren und einem C-terminal-angehängten inaktiven Fluorochrom (AMC, 7- amino-4-methylcoumarin). Das

Substrat besitzt eine Schnittstelle der post-glutamyl-Peptid-Hydrolase der 20S-Untereinheit des Proteasoms. Durch Hydrolase des Substrates wird das Fluorochrom AMC aktiviert. In einem 1,5-ml-Tube wurde je 30 μg Protein mit dem Substratpuffer auf 247,5 μl aufgefüllt. Danach wurde in jedes Tube 2,5 μl der Substratlösung gegeben. Viermal 50 μl der Probe wurde eine schwarze 96-well-Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde alle 20 min in einer Stunde die Fluoreszenz mit dem Spectra Fluor Plus unter Verwendung der Software easy WIN basic 6.1 bei einer Extinktion von 360 und Emission von 465 gemessen.

2.13.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student t-Test im Computerprogramm Excel. Eine Signifikanz bestand ab $p < 0,05$, eine hohe Signifikanz ab $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion der α -Synuclein-Multiplikationen

Bei der Konstruktion der α -Syn-Multiplikationen wurden für die α -Syn-Duplikation zwei, für die α -Syn-Triplikation drei α -Synucleinsequenzen ohne Stopcodon durch eine Linkersequenz miteinander verbunden. Die Aminosäuresequenz der Linkers ist GGGPSSGGGP. Das Prolin in der Linkersequenz verhindert die Bildung einer Sekundärstruktur, zusammen mit dem Glycin ist der Linker sehr flexibel. Durch die hydrophilen Serine in der Struktur wird der Linker gut löslich. Nach erfolgreicher Ligation der α -Synucleinsequenzen wurden diese anschließend am Polylinker, über die Restriktionsstellen HindIII und SmaI in den pcDNA3.1-Plasmidvektor kloniert. In beiden Konstrukten werden die entstandenen α -Syn-Multiplikationen unter Kontrolle eines viralen CMV-Promotors und einer SV40-Sequenz abgelesen. Beide Konstrukte enthalten eine Ampicillin-Resistenz. Das Restriktionsenzym HindIII ist Teil des Polylinkers des pcDNA3.1-Vektors, die SmaI Schnittstelle liegt in der Sv40-origin-of-replication (Abbildung 3.1).

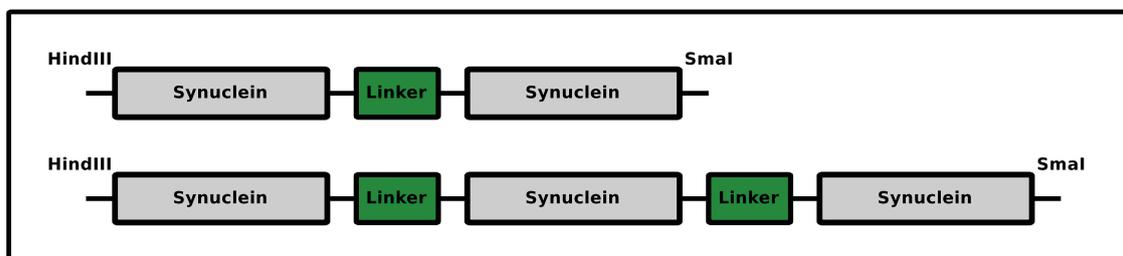


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der α -Syn-Multiplikationen. Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII und SmaI, α -Synucleinsequenz, die Linkersequenz GGGPSSGGGP.

3.1.1 Restriktionsenzymverdau der α -Synuclein-Multiplikationen

Zur Kontrolle der Klonierung der α -Syn-Multiplikationsplasmide wurden diese nach Amplifikation durch eine Mini-Präparation mit den Restriktionsenzymen HindIII und SmaI

verdaut. Im Anschluss folgte eine Agarosegelelektrophorese. Die folgende Abbildung zeigt das Agarosegel mit den α -Syn-Multiplikationsplasmiden (Abbildung 3.2). Die α -Syn-Triplikation ist bei 2500 bp und die α -Syn-Duplikation bei 2030 bp zu sehen. Dieses sind die korrekten, vorher berechneten, DNA-Banden. So kann die Klonierung der α -Syn-Multiplikationsplasmide als erfolgreich angesehen werden. Links in der Abbildung ist die Kontroll-DNA-Leiter dargestellt.

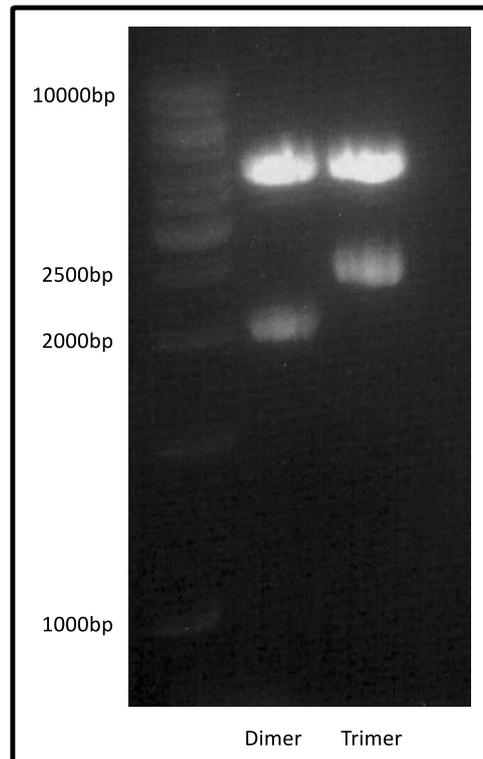


Abbildung 3.2: Restriktionsenzymverdau der α -Syn-Multiplikationsplasmide mit den Enzymen HindIII und SmaI, Dimer = α -Syn-Duplikation, Trimer = α -Syn-Triplikation

3.1.2 Sequenzierung der α -Synuclein-Multiplikationen

Nach dem erfolgreichem Verdau wurden die α -Syn-Multiplikationsplasmide durch SeqLab (Göttingen, Deutschland) sequenziert und daraufhin mit Hilfe des Computerprogramms Gentle mit der bekannten α -Synucleinsequenz und der Linkersequenz verglichen. Die korrekte Aminosäuresequenz konnte ermittelt werden, es fanden sich keine Mutationen, auch die Linkersequenz stimmte überein.

3.2 Transiente Transfektion der α -Synuclein-Multiplikationsplasmide

Die α -Syn-Multiplikationen wurden in einem Western Blot dargestellt, um die Größe der jeweiligen Proteine zu analysieren (Abbildungen 3.3 und 3.4). Als Negativkontrolle diente ein Proteinlysats aus CSM14.1-Zellen bzw. SH-SY5Y-Zellen welche zuvor mit einem pcDNA3.1-Leervektorplasmid transfiziert wurden. Um zu gewährleisten, dass überall die gleiche Proteinkonzentration vorhanden ist, wurden die Immunoblots zusätzlich gegen β -Tubulin gefärbt. Die Immunoblots zeigen die erfolgreiche transiente Transfektion der jeweiligen Plasmide, sowohl in CSM14.1-Zellen als auch in SH-SY5Y-Zellen (Abbildungen 3.3 und 3.4). Das α -Syn-Monomer hat auf dem Western Blot eine Größe von 17 kDA. Die α -Syn-Duplikation zeigt eine Bande bei 38 kDA, der doppelten Höhe des Monomers, zudem ist eine Bande bei 50 kDA zu sehen. Die α -Syn-Triplikation zeigt dementsprechend eine Bande in den dreifachen Höhe des Monomers bei 57 kDA. Auch im Western Blot der α -Syn-Triplikationen sind, wie bei der α -Syn-Duplikation, weitere höhermolekulare Banden zu sehen bei 70 und 75 kDA.

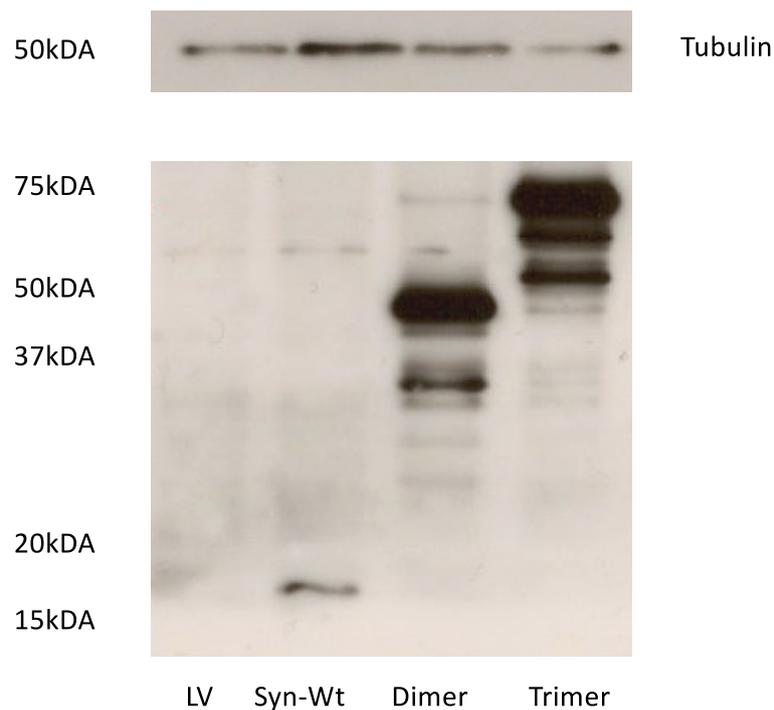


Abbildung 3.3: Die Abbildung zeigt einen Western Blot mit den α -Syn-Multiplikationen in SH-SY5Y-Zellen. LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation, Trimer = α -Syn-Triplikation

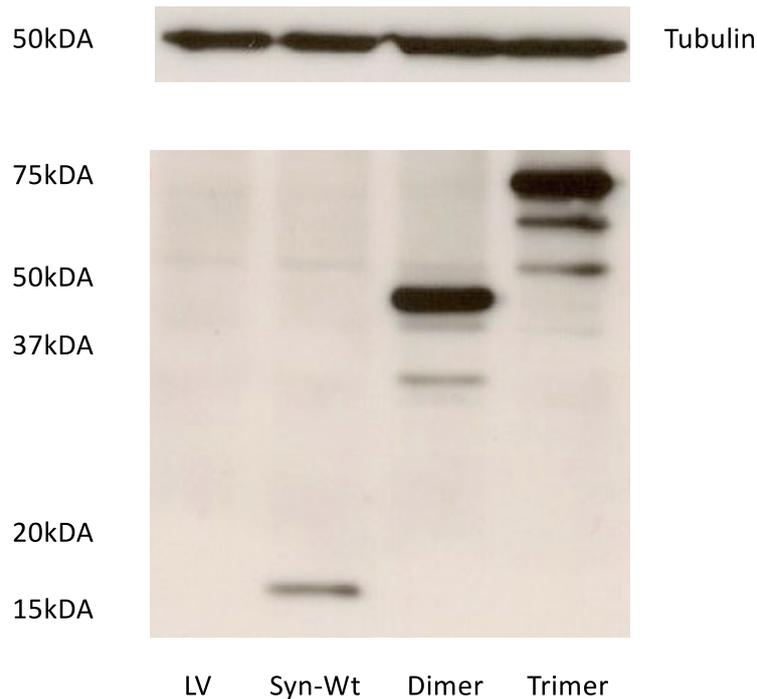


Abbildung 3.4: Die Abbildung zeigt einen Western Blot der α -Syn-Multiplikationen in CSM14.1-Zellen. LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation, Trimer = α -Syn-Triplikation

3.3 Die Auswirkungen der α -Synuclein-Multiplikationen auf den Zelltod

Um die Auswirkungen der α -Syn-Multiplikationen auf den Zelltod zu studieren wurden sowohl in primären hippokampalen Neuronen als auch in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y Zelltoxizitätsassays mit dem Toxilight[®] Assay durchgeführt. Alle Versuche wurden mindestens fünfmal wiederholt.

3.3.1 Die α -Synuclein-Multiplikationen sind toxisch in primären hippokampalen Neuronen

Die folgende Abbildung zeigt einen exemplarischen Assay der Toxizitätsmessung mit dem Toxilight[®] Assay 48 h nach Transfektion der α -Syn-Multiplikationsplasmide mit dem Nucleofector. Im Toxizitätsassay fand sich gegenüber der Negativkontrolle eine signifikant erhöhte Toxizität der α -Syn-Duplikation ($p < 0,05$ im Student t-Test) als auch der α -

Syn-Triplikation ($p < 0,001$ im Student t-Test) (Abbildung 3.5). Der α -Syn-Wt zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Toxizität gegenüber der Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten mit einem pcDNA.3.1-Leervektorplasmid transfizierte Zellen.

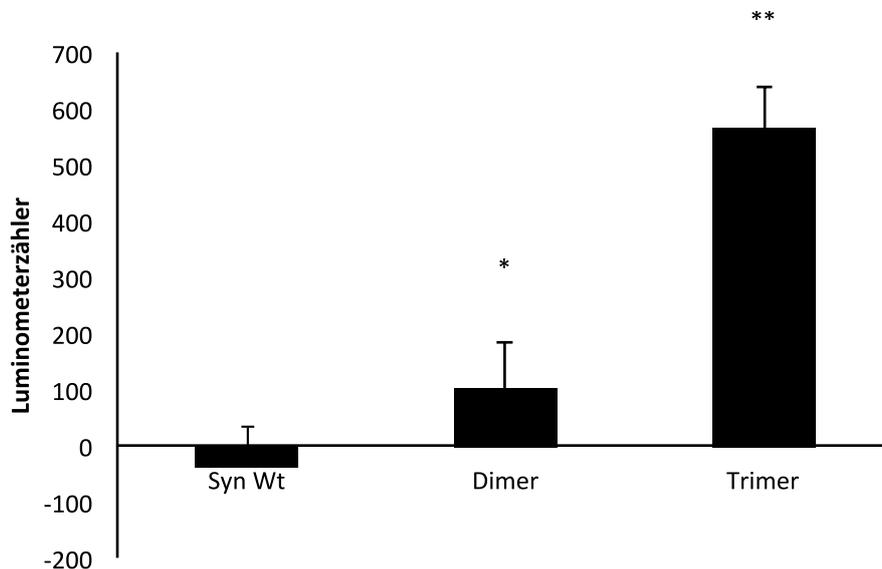


Abbildung 3.5: Toxilight von primären Neuronen 48 Stunden nach Transfektion. Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation, Trimer = α -Syn-Triplikation, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$

3.3.2 Die α -Synuclein-Multiplikationen sind toxisch in SH-SY5Y-Zellen

Die folgende Graphik zeigt die toxische Wirkung der α -Syn-Multiplikationen auf SH-SY5Y-Zellen. Auch hier wiesen die α -Syn-Multiplikationen eine signifikant erhöhte Toxizität auf (Abbildung 3.7). Im Gegensatz zu den primären hippokampalen Neuronen ist in den SH-SY5Y-Zellen die α -Syn-Duplikation ($p < 0,001$) toxischer als die α -Syn-Triplikation ($p < 0,05$). 72 h nach transients Transfektion mit den Plasmiden α -Syn-Wt, α -Syn-Duplikation und α -Syn-Triplikation wurde der Toxilight[®] Assay durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden mit einem pcDNA3.1-Leervektorplasmid transfizierte Zellen verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde durch Transfektion mit einem eGFP exprimierenden Plasmid visualisiert (Abbildung 3.6).

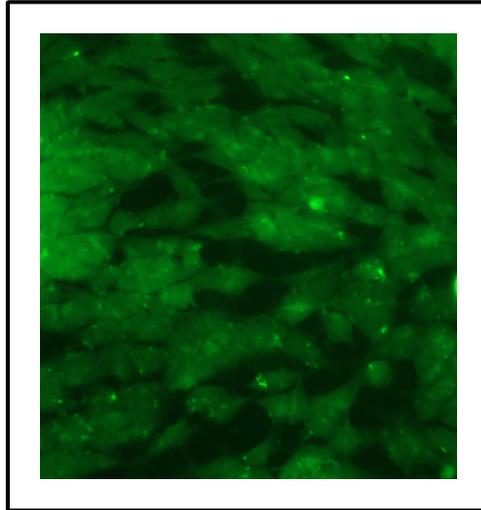


Abbildung 3.6: Darstellung der Transfektionseffizienz mit dem eGFP-Plasmid vor Messung der α -Syn-Toxizität

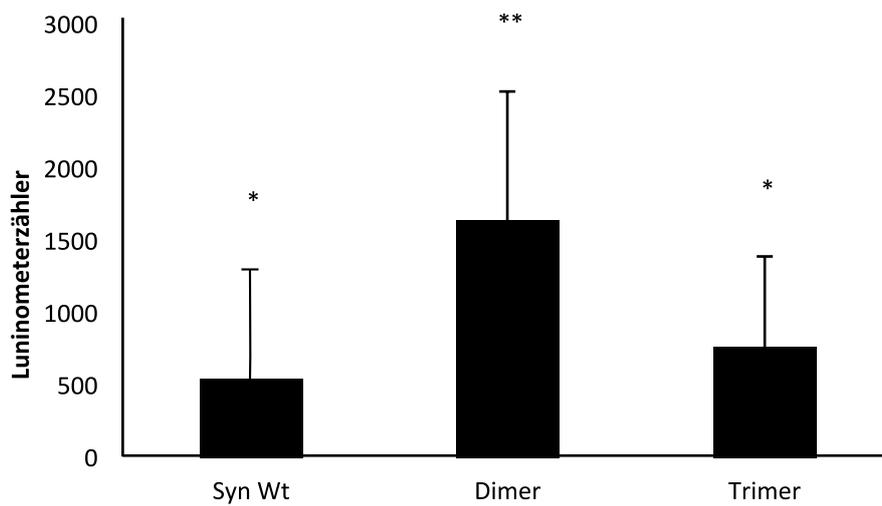


Abbildung 3.7: Toxilight von SH-SY5Y-Zellen 72 Stunden nach Transfektion. Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation, Trimer = α -Syn-Triplikation, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$

3.4 Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf die Zellfunktion

Um die Ursache der Zelltod fördernden Eigenschaften der α -Syn-Multiplikationen zu erkennen wurden die Funktionen verschiedener Zellkompartimente in CSM14.1-Zellen untersucht. Zum einen die Bildung von Proteinaggregaten, welche in der Parkinsonpathologie eine entscheidende Rolle spielen, zum anderen die Funktion des Proteasoms und der Makroautophagie (Autophagie) als Proteindegradationsmechanismen.

3.4.1 Aggregatbildung durch die α -Synuclein-Multiplikationen

Die folgende Abbildung zeigt einen Western Blot auf dem, mittels DSS-Crosslinker, Proteininteraktionen visualisiert werden. Diese Abbildung dient zur Darstellung von α -Syn-Aggregaten. Nach transienter Transfektion von CSM14.1-Zellen mit α -Syn-Wt-Plasmid und den α -Syn-Multiplikationsplasmiden wurden die Zellen vor der Lyse mit DSS behandelt. Nach anschließender SDS-Page und Western Blot konnten die Aggregate auf einem, gegen α -Syn gefärbten, Immunoblot dargestellt werden (Abbildung 3.8). Als Negativkontrolle diente ein pcDNA3.1-Leervektorplasmid. Beim α -Syn-Wt können sowohl das Monomer bei 17 kDA, als auch höhermolekulare Aggregate im Bereich von 250 bis 75 kDA gezeigt werden. Auch die α -Syn-Multiplikationen konnten sowohl in ihrer nicht aggregierten Form als auch als höhermolekulare Aggregate im Bereich von 250 bis 55 kDA dargestellt werden. Die Aggregate sind bei den α -Syn-Multiplikationen wesentlich stärker ausgeprägt als beim α -Syn-Wt.

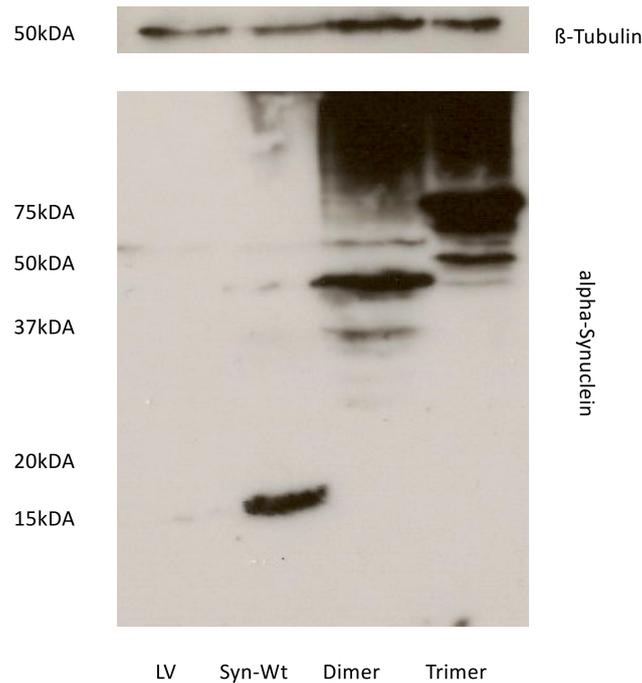


Abbildung 3.8: Western-Blot Analyse von mit DSS-Crosslinker behandelten CSM14.1-Zellysaten zur Aggregatdarstellung. In den Zellen wurde jeweils pcDNA 3.1, α -Syn-Wt, α -Syn-Duplikation, bzw. die α -Syn-Triplikation überexprimiert. Die Proteinstandartgrößen werden auf der linken Seite dargestellt.

3.4.2 Inhibition des Proteasoms durch die α -Synuclein-Multiplikationen

Als mögliche Ursache der Toxizität der α -Syn-Multiplikationen wurde der Einfluss auf die Funktion des Proteasoms untersucht. Die Aktivität des Proteasoms wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzassays ermittelt. Als Marker diente die Fluoreszenz des 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC), welches durch die proteasomale Spaltung des Substrates Z-Leu-Leu-Glu-AMC entstanden ist. Für den Assay wurden in CSM14.1-Zellen transient α -Syn-Wt und die α -Syn-Multiplikationen überexprimiert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Zugabe des Fluoreszenzsubstrats. Die Abbildung zeigt eine Messung 60min nach Substratzugabe. Sowohl die α -Syn-Duplikation ($p < 0,05$ im Student t-Test) als auch die α -Triplikation ($p < 0,001$ im Student t-Test) zeigen eine signifikante Inhibition des Proteasoms. Im α -Syn-Wt konnten keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle gemessen werden (Abbildung 3.9). Als Negativkontrolle wurden mit einem pcDNA 3.1-Leervektorplasmid transfizierte CSM14.1-Zellen verwendet.

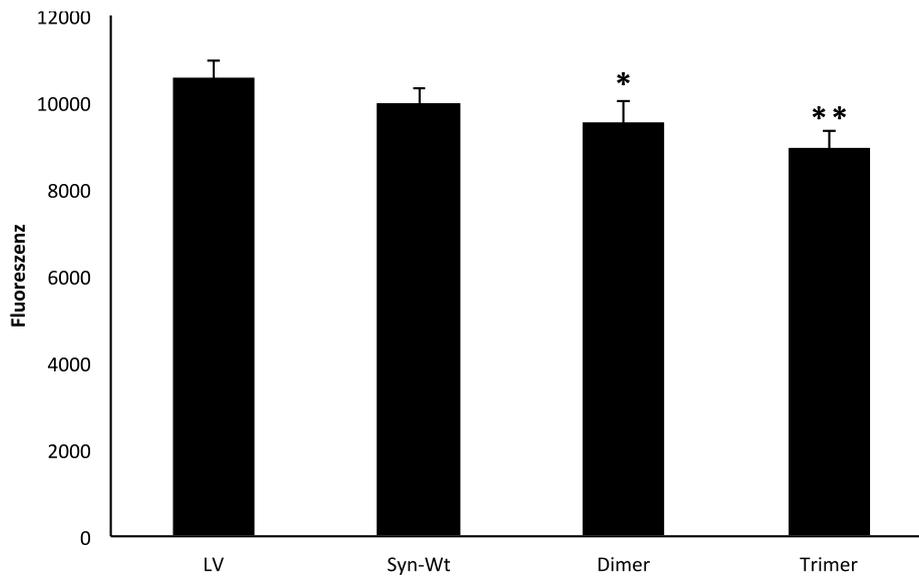


Abbildung 3.9: Proteasomassay von CSM14.1-Zellen. LV = Leervektor, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation, Trimer = α -Syn-Triplikation, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$

3.4.3 Der Einfluss der α -Synuclein-Multiplikationen auf die Autophagie

Zur Untersuchung des Einflusses der α -Syn-Multiplikationen auf die Autophagie wurden CSM14.1-Zellen transient in äquimolaren Mengen mit dem α -Syn-Wt-Plasmid und den α -Syn-Multiplikationsplasmiden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Reagenzien behandelt. Zum einen mit Rapamycin, einem m-TOR-Inhibitor, zum anderen mit Bafilomycin A1, welches den Abbau der Autophagosomen inhibiert. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Im folgenden werden exemplarische Immunoblotanalysen als auch deren densitometrische Auswertung dargestellt. Alle Immunoblots wurden mindestens dreimal wiederholt.

Zum einen wurde die Aktivität der Autophagie durch das Protein LC3-II im Verhältnis zu β -Tubulin quantifiziert. Durch Aktivierung der Autophagie wird LC3-I in LC3-II umgewandelt. LC3-I hat eine Größe von 18 kDa, LC3-II von 16 kDa. Bei intakter Autophagosomdegradation korreliert LC3-II mit der Anzahl der Autophagosomen. Durch den Lysozyminhibitor Bafilomycin A1 wird der Abbau der Autophagosomen gehemmt, so dass diese kumulieren und bei vermehrter Anreicherung davon ausgegangen werden kann, dass ein Flux von LC3-I zu LC3-II stattfindet. Die Western-Blot-Analyse mit anschließender densitometrischer Messung mit ImageJ zeigt einen, nach Inhibitorbehandlung mit Bafilomycin A1 in den Kontrollzellen, signifikanten Anstieg der LC3-II-Proteinmenge im

Vergleich zur DMSO-Kontrollbehandlung. Demgegenüber kam es in den mit der α -Syn-Triplikation-transfizierten Zellen, ausgehend von einer, schon in der DMSO-Kontrolle im Vergleich zur Kontrollkondition tendenziell erniedrigten LC3-II-Menge, lediglich zu einem nicht signifikanten Anstieg bei weiterhin absolut erniedrigter LC3-Menge. Somit zeigt sich in den mit der α -Syn-Triplikation-transfizierten Zellen ein verminderter Autophagie-Flux im Vergleich zur Kontrolltransfektion (Abbildungen 3.11 und 3.13). Bei der α -Syn-Duplikation ist keine Hemmung der Autophagie zu sehen (Abbildungen 3.10 und 3.12). P62 ist ein Protein, welches an defekte Proteine bindet und somit, durch die Interaktion mit LC3, deren Abbau in den Autophagosomen induziert (Wong and Cuervo, 2010). Ist die Autophagie gestört kommt es zu einer Akkumulation vom p62 in den Zellen. In der densitometrischen Messung der Immunofluoreszenz akkumuliert p62 in den Zellen in denen die α -Syn-Triplikation überexprimiert wurde. Eine signifikante Inhibition der Autophagie zeigte sich zudem bei Überexpression mit der α -Syn-Triplikationen in den mit Bafilomycin A1 behandelten Zellen (Abbildungen 3.11 und 3.15). Bei Überexpression der α -Syn-Duplikation als auch des α -Syn-Wt kam es hingegen zu keiner signifikant vermehrten Anreicherung von p62 in den Zellen (Abbildungen 3.10 und 3.14). In der folgenden Abbildungen werden exemplarische Western Blots gefärbt gegen p62, sowie die densitometrischen Analysen gezeigt.

Um zu analysieren, ob auch der Abbau von α -Syn-Wt und den α -Syn-Multiplikationen durch die gestörte Funktion der Autophagie eingeschränkt ist, wurden die Western Blots auch gegen α -Syn gefärbt. Gleichzeitig diente diese Färbung auch als Transfektionskontrolle. Es zeigt sich keine vermehrte Anreicherung vom α -Syn-Wt und den α -Syn-Multiplikationen bei Inhibition der Autophagie (Abbildungen 3.10 und 3.11). Als Negativkontrollen dienten jeweils die entsprechenden Konditionen in den mit Leervektor transfizierten CSM14.1-Zellen.

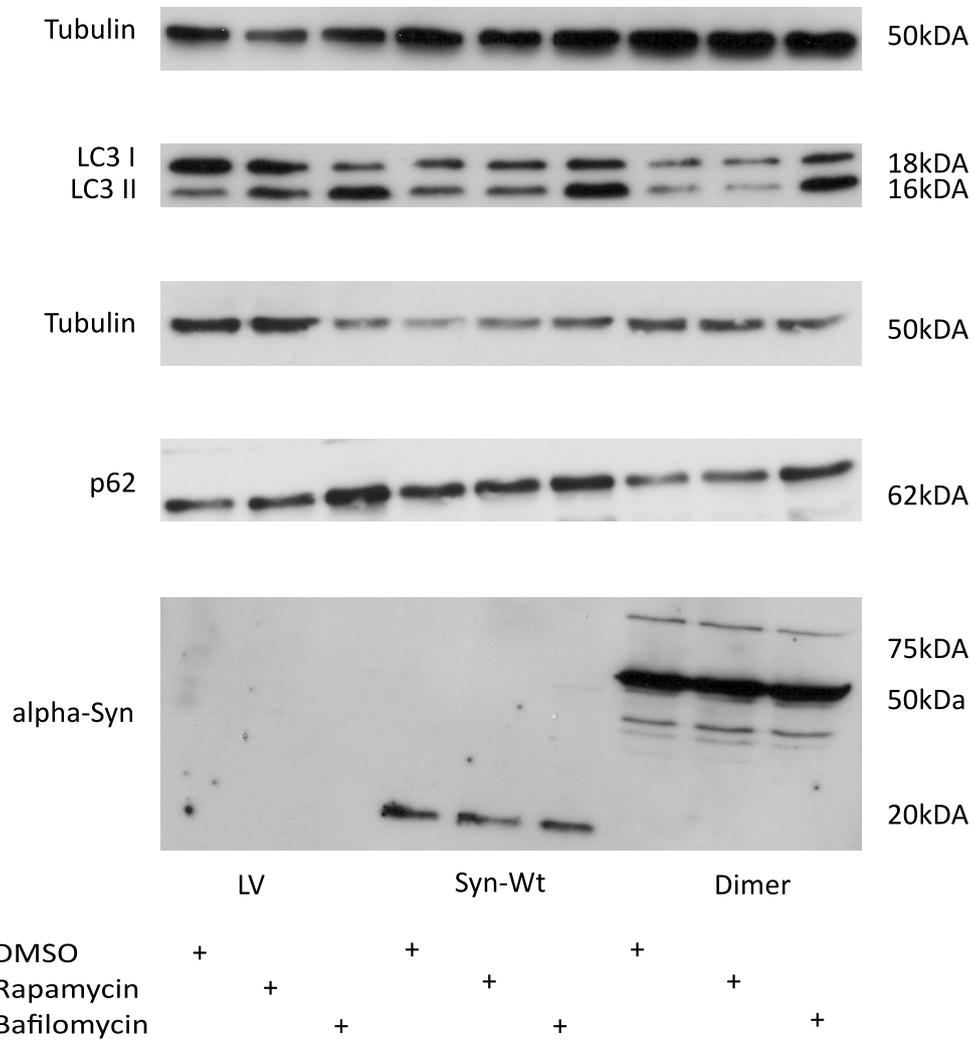


Abbildung 3.10: Western Blots gefärbt gegen LC3, p62 und α -Syn zur Messung der Autophagie und dessen Einfluss auf α -Syn in CSM14.1-Zellen. LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation

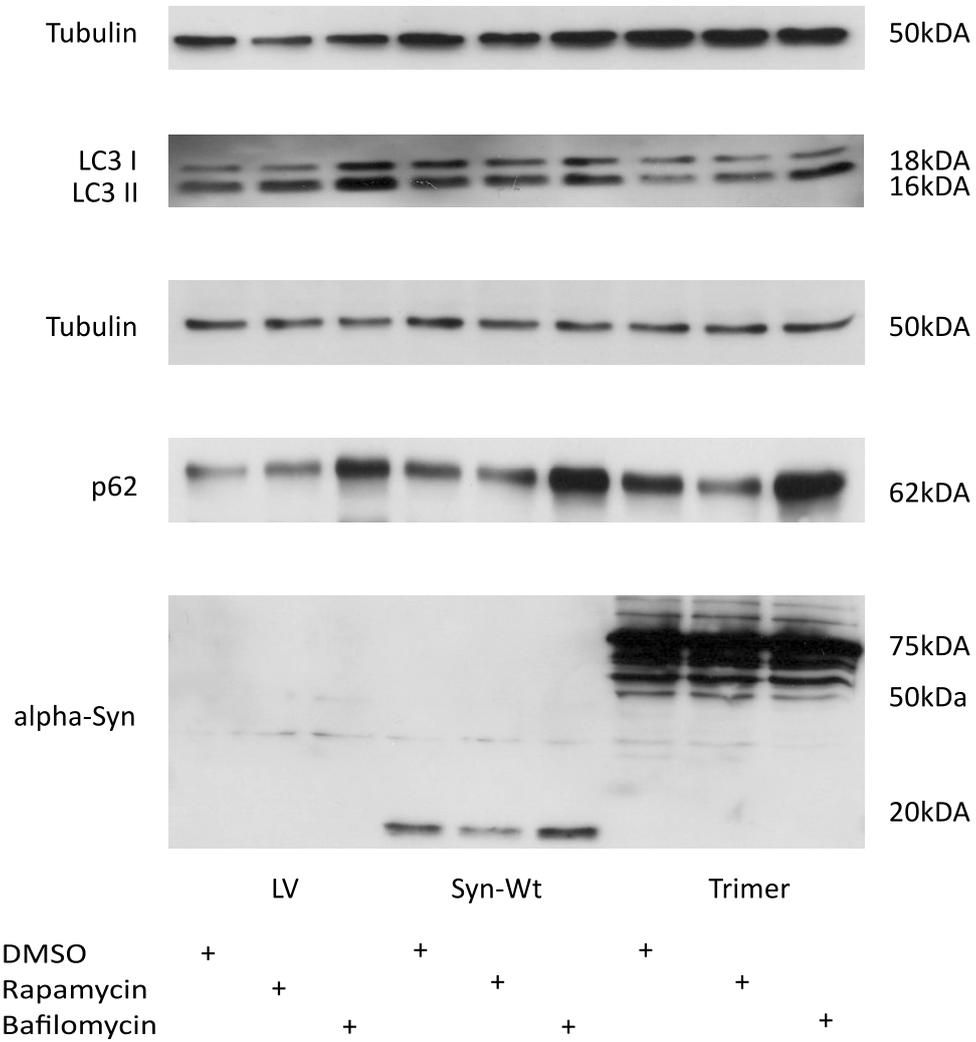


Abbildung 3.11: Western Blots gefärbt gegen LC3, p62 und α -Syn zur Messung der Autophagie und dessen Einfluss auf α -Syn in CSM14.1-Zellen. LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn Wt, Trimer = α -Syn-Triplikation

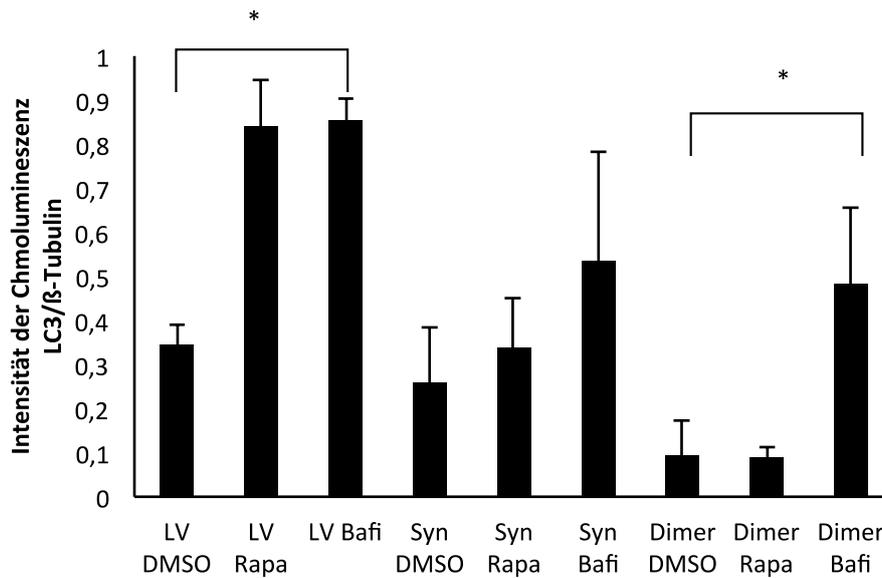


Abbildung 3.12: Densitometrische Messung der Chemolumineszenz von LC3-II im Verhältnis zu β -Tubulin, LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation, * = $p < 0,05$, Rapa = Rapamycin, Bafi = Bafilomycin A1

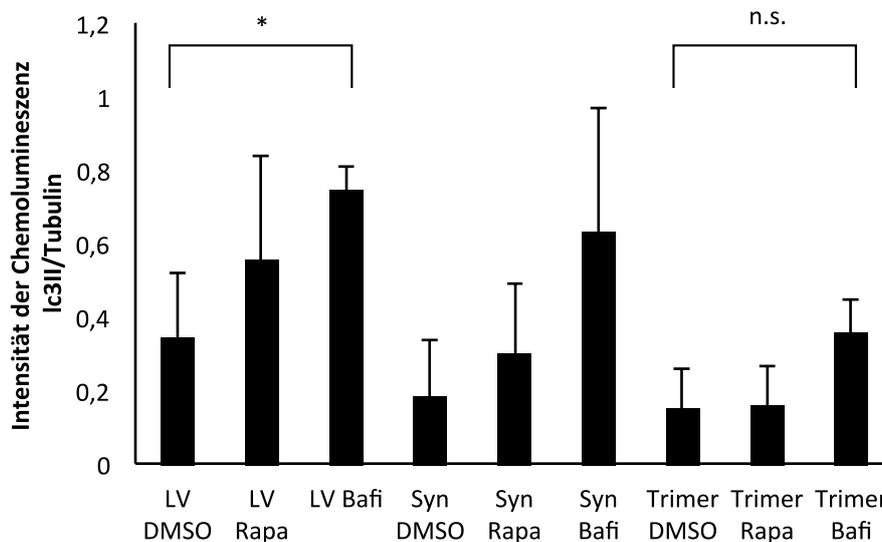


Abbildung 3.13: Densitometrische Messung der Chemolumineszenz von LC3-II im Verhältnis zu β -Tubulin, LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Trimer = α -Syn-Triplikation, * = $p < 0,05$, Rapa = Rapamycin, Bafi = Bafilomycin A1

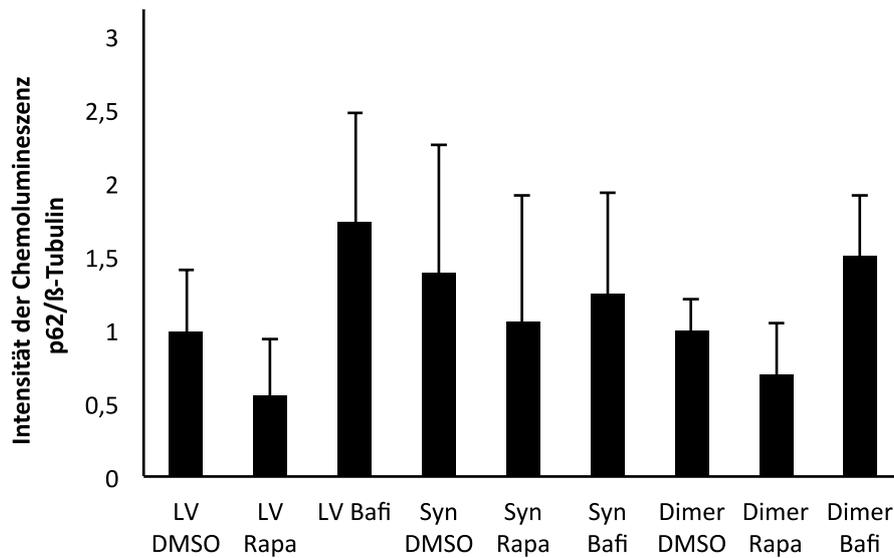


Abbildung 3.14: Densitometrische Messung der Chemolumineszenz von p62 im Verhältnis zu β -Tubulin, LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Dimer = α -Syn-Duplikation, * = $p < 0,05$, Rapa = Rapamycin, Bafi = Bafilomycin A1

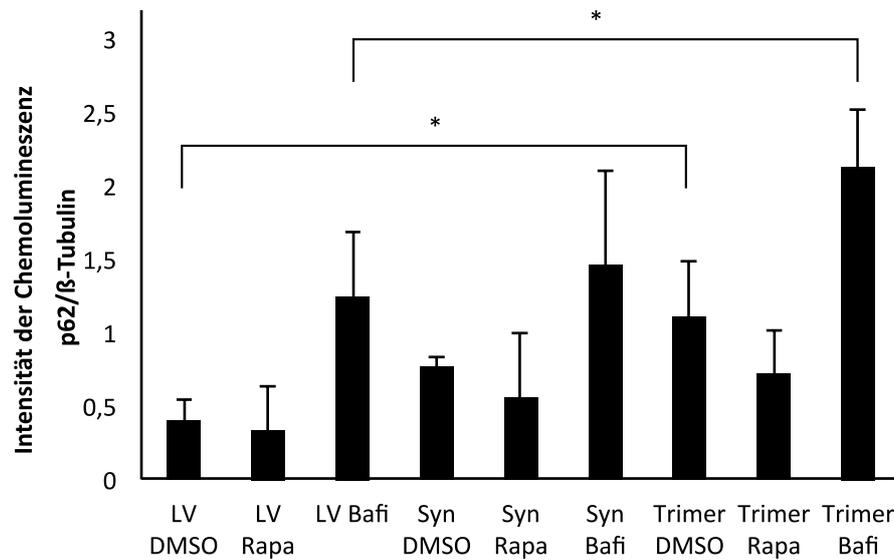


Abbildung 3.15: Densitometrische Messung der Chemolumineszenz von p62 im Verhältnis zu β -Tubulin, LV = Negativkontrolle, Syn-Wt = α -Syn-Wt, Trimer = α -Syn-Triplikation, * = $p < 0,05$, Rapa = Rapamycin, Bafi = Bafilomycin A1

4 Diskussion

Das iPS ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer (Dauer and Przedborski, 2003). α -Syn spielt eine wesentliche Rolle in der Pathologie der Erkrankung, jedoch nicht nur beim PS, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten wie der Lewy-Körperchen-Demenz. Die exakten Vorgänge und Mechanismen, in wie weit und wie es zum α -Syn-induzierten Zelluntergang kommt, sind bislang nicht aufgeklärt. Aggregation wird als einer der Hauptmechanismen diskutiert. Hier sind insbesondere die Oligomere, die Vorstufen der Aggregate zu nennen, welche als die potentiell toxische Spezies in der α -Syn-Pathologie gelten (Winner et al., 2011). Als weitere mögliche Mechanismen gelten Störungen in der Proteinhomöostase wie proteasomale Dysfunktion und verminderte Autophagie (Cuervo et al., 2004). Auch andere durch α -Syn ausgelöste zellschädigende Mechanismen wie die Bildung von Poren in der Zellmembran werden diskutiert (Zhu et al., 2003).

In physiologischer Form liegt α -Syn als Tetramer vor. Dieses steht in einem Gleichgewicht mit der ungefalteten nativen Form. Durch Überexpression, Mutationen oder zellulärer Dysfunktion kann es zu einem Wechsel der Konformation und zur Oligomerisierung und Aggregation kommen (Wang et al., 2011; Bartels et al., 2011).

4.1 α -Syn-Multiplikationen

In Zellkulturmodellen wird durch Überexpression von α -Syn nur eine geringe zelluläre Dysfunktion ausgelöst. Auch im Mausmodell, durch temporäre Überexpression als auch durch knockout von α -Syn sind nur minimale Effekte in der Beeinträchtigung der Zellfunktion zu sehen (Abeliovich et al., 2000). Dies macht es schwer α -Syn-Modelle zu entwickeln, die genauen pathologischen Mechanismen zu erkennen und diese wiederzugeben. Meistens werden als Modelle die familiären α -Syn-Mutationen verwendet. Die familiären Parkinsonformen stellen jedoch nur einen sehr kleinen Anteil der Parkinsonpatienten dar. Auch wurden die bekannten Punktmutationen bislang nur in einzelnen Familien identifiziert. Zudem könnte es für die Mutationen spezifische Toxizitätsmuster geben, welche nicht auf das iPS zutreffen (Esposito et al., 2007). Ein weiteres Problem

ist die Instabilität der Oligomere. Es besteht ein ständiger Wechsel von der monomeren Form zu Oligomeren und Fibrillen. So ist es schwer, die genauen Auswirkungen der potentiell toxischen Oligomere zu studieren. Aus diesen Gründen wurde das Modell der α -Syn-Multiplikationen entwickelt. Zum einen um stabile α -Syn-Oligomere herzustellen und zum anderen um den Prozess der Oligomerisierung zu beschleunigen indem durch die Kopplung eine räumliche Nähe der α -Syn-Monomere geschaffen wird.

Bei der Klonierung der α -Syn-Multiplikationen wurden zwei, bzw. drei α -Syn-Monomere durch eine flexible Linkersequenz miteinander verbunden. Durch diese Kopplung wurden künstlich die α -Syn-Oligomere erzeugt. Hierfür wurde die Linkersequenz GGGPSSGGGP gewählt, um die normale Funktion und Faltung von α -Syn möglichst wenig zu beeinflussen. Das Prolin verhindert die Bildung einer Sekundärstruktur des Linkers, durch die hydrophoben Anteile des Serins wird der Linker gut löslich. Der Rest des Linkers besteht aus ungeladenem Glycin, welches ebenfalls die Faltung von α -Syn wenig beeinflussen sollte. Außerdem ist der Teil GGGP des Linkers ein natürlicher Bestandteil der Tau-Linker-Region.

Es ist anzunehmen, dass die α -Syn-Multiplikationen stabile Oligomere bilden. Im Western Blot von SH-SY5Y-Zellen und CSM14.1-Zellen konnten sowohl bei der α -Syn-Duplikation als auch bei der α -Syn-Triplikation keine Monomere entdeckt werden.

Ein Großteil der α -Syn-Oligomere lagert sich antiparallel aneinander (Roberti et al., 2011). Durch Stabilisierung von antiparallelen α -Syn-Dimeren mit gesplittetem GFP im BiFc-Assay kommt es zu erhöhter α -Syn-Aggregation und -Toxizität (Outeiro et al., 2008). Ein kleiner Teil des α -Syn interagiert parallel miteinander, welches in FRET Analysen gezeigt wurde (Klucken et al., 2006). Ob diese unspezifische Effekte durch Überexpression von α -Syn sind oder ob die parallelen Anlagerungen eine Rolle in der Amyloidentstehung spielen konnte nicht geklärt werden. In einem anderen Modell mit α -Syn-Multiplikationen konnte keine erhöhte Toxizität gemessen werden, es sind jedoch die α -Synucleine ohne eine Linkersequenz direkt miteinander verbunden. So ist die zum Größtenteils natürlich stattfindende antiparallele Interaktion von α -Syn nicht möglich. Durch das Fehlen der Linkersequenz formen diese Konstrukte ein starres Gebilde. Im Gegensatz zu diesem Modell, ist in dem hier vorgestellten Modell der α -Syn-Multiplikationen die antiparallele Aneinanderlagerung durch die flexible Linkersequenz möglich. Bei den α -Syn-Multiplikationen konnte gezeigt werden, dass die antiparallele Anlagerung der α -Syn-Duplikationen und -Triplikationen genügt, um Aggregation und zelluläre Dysfunktion herbeizuführen.

Die Fähigkeit von α -Syn unter physiologischen Bedingungen dynamische Tetramere zu formen (Bartels et al., 2011; Wang et al., 2011) ist im hier beschriebenen Modell aufgrund

der sterischen Inhibition unwahrscheinlich.

Ein Gendosis-Effekt ist in der α -Syn-Pathologie in der Literatur beschrieben worden. So wird bei den Familien mit Genlocustriplikationen die doppelte Proteinkonzentration von α -Syn gemessen, gleichzeitig zeigen die Patienten einen frühen Beginn der Krankheit mit schwerem Verlauf (Singleton et al., 2003). Um diesen durch Überexpression verursachten Effekt zu vermeiden, wurde bei allen Versuchen zum α -Syn-Wt äquimolare Mengen der α -Syn-Multiplikationsplasmide transfiziert. Um die gleiche Anzahl an Plasmiden bei der Transfektion in die Zellen einzubringen, wurde zusammen mit den jeweiligen α -Syn-Multiplikationen die entsprechenden Mengen eines pcDNA3.1-Leervektorplasmid transfiziert. Dieses erfolgte zur Reduktion von Nebeneffekten, da sowohl transfizierte DNA als auch das Transfektionsagens einen Einfluss auf die Zellintegrität haben können.

Wie auch in anderen Modellen, welche Mutationen oder strukturelle Veränderungen von α -Syn verwenden, können keine unspezifischen Effekte der α -Syn-Multiplikationen ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten CSM14.1-Zellen exprimieren physiologischerweise kein α -Syn, so dass es unwahrscheinlich ist, dass es zur einer Interaktion mit der normalen zellulären Funktion kommt.

4.2 α -Syn-Multiplikationen und Toxizität

Da Dimere und Oligomere die vermeintlich toxische Spezies in der α -Syn-Pathologie sind (Outeiro et al., 2008), wurde der Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf den Zelltod untersucht. In dieser Arbeit wurden SH-SY5Y-Zellen und primäre hippokampale Neurone für die Zelltodassays verwendet, da diese Zelllinien empfindlich auf zellschädigende Einflüsse reagieren. Zunächst wurde in der immortalisierten Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y die Toxizität der α -Syn-Multiplikationen im ToxilightTM Assay gemessen. Dabei zeigte sich, dass die α -Syn-Multiplikationen signifikant toxischer als der pcDNA 3.1-Leervektor sind. Hierbei weist die α -Syn-Duplikation eine höhere Toxizität als die α -Syn-Triplikation auf. In CSM14.1-Zellen konnte kein toxischer Effekt nachgewiesen werden. Dieses erklärt sich zu einem damit, dass CSM14.1-Zellen nicht empfindlich auch zellschädigende Mechanismen reagieren und zum anderen, dass der durch α -Syn ausgelöster Zelltod im Verhältnis zur ToxilightTM 100% Lysis Kontrolle bei nur 5% liegt. Mit der geringen α -Synucleintoxizität lässt sich auch die hohe Standardabweichung in der Ergebnissen von den SH-SY5Y-Zellen erklären.

Zur Bestätigung des toxischen Effekts der α -Syn-Multiplikationen auf die Zellen wurde der ToxilightTM Assay auch mit primären hippokampalen Neuronen durchgeführt. Diese sind nicht immortalisiert und stellen somit die Zustände in der Zellen besser dar. Adulte

Nervenzellen sind postmitotisch, sie können sich nicht mehr teilen und auch nicht regenerieren. Die hippokampalen Neurone wurden den Mittelhirn und Kortexneuronen vorgezogen, da hippokampale Kulturen den größten Anteil an Neuronen aufweisen. Mittelhirn- oder Kortexneuronenkulturen sind Mischkulturen, enthalten viele Astrozyten und andere Gliazelltypen. Da jedoch nur der Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf Neurone getestet werden sollte, wurden die Versuche an hippokampalen Neuronen durchgeführt, auch wenn diese beim iPS nicht primär betroffen sind. Auch hier konnte eine signifikant erhöhte Toxizität der α -Syn-Multiplikationen nachgewiesen werden, wobei die α -Syn-Triplikation ein höheres Signifikanzniveau aufweist als die Duplikation. Der α -Syn-Wt zeigt keine Toxizität gegenüber der Negativkontrolle.

Beim ToxilightTM Assay ist es essentiell, dass gleiche Zelldichten in den verschiedenen Konditionen vorhanden sind, da der Assay auf der Freisetzung der Adenylatzyklase aus absterbenden Zellen beruht. Da verschiedene Zelldichten die Ergebnisse verfälschen, wurden die Zellen vor jeder Messung im Mikroskop beurteilt. In dieser Arbeit wird ein exemplarisches Bild der Zelldichte und Transfektionseffektivität mit eGFP gezeigt.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben zur Toxizität des α -Syn-Wt. So konnte gezeigt werden, dass Überexpression des α -Syn-Wt in H4-Zellen toxisch ist (Klucken et al., 2004), dieses konnte in dieser Arbeit in SH-SY5Y-Zellen bestätigt werden. In einer anderen Arbeit konnte kein toxischer Effekt von α -Syn in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden (Baumann, 2011). Wobei in der hier vorgestellten Arbeit eine höhere Versuchszahl generiert wurde, welche die signifikant erhöhte Toxizität erklären kann. Insgesamt ist die α -Synucleintoxizität in Neuronen schwer darstellbar da α -Syn insgesamt eine geringe Toxizität aufweist. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des α -Syn-Wt, als auch der α -Syn-Multiplikationen in den Zelltodassays mögen zudem auf die verschiedenen Zelllinien zurückzuführen sein. So wirken in unterschiedlichen Organismen die Konstrukte unterschiedlich.

4.3 Aggregation und Oligomerisierung

Die Aggregation von α -Syn ist einer der zentralen Mechanismen in der Pathogenese des PS. Die Krankheit als auch die Aggregation von α -Syn schreitet von den vagen Kerne des enterischen Nervensystem, über die Substantia nigra bis in den Kortex fort (Braak et al., 2006). Zudem bilden sich bei Mäusen, welche oral Rotenon, ein parkinsoninduzierendes Gift appliziert bekommen, LK-artige Einschlusskörperchen sowohl im enterischen Nervensystem, im Locus coeruleus, im olfaktorischen Bulbus als auch in den Zellen der

Substantia nigra (Pan-Montojo et al., 2010).

Bei der transienten Überexpression und anschließendem Western Blot der α -Syn-Multiplikationen in SH-SY5Y und CSM14.1-Zellen konnten die zu erwartenden Banden in der doppelten bei 38 kDA bzw. dreifachen Höhe bei 57 kDA von α -Syn gezeigt werden. Zudem fanden sich höhermolekulare Banden, als die eigentlich zu erwartenden. Bei der α -Syn-Duplikation eine Bande von 50 kDA, bei der α -Syn-Triplikation Banden von 70 und 75 kDA. Diese höhermolekularen SDS-unlöslichen Banden werfen die Frage auf, ob die α -Syn-Multiplikationen verstärkt mit anderen Proteinen interagieren, größere Oligomere oder Fibrillen bilden und wohlmöglich aggregieren. Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurden CSM14.1-Zellen vor der Lyse mit DSS, einem chemischen Proteincrosslinker behandelt. Durch diesen Crosslinker werden vor der Zellyse intrazellulär Proteininteraktionen stabilisiert. Dadurch ist es möglich Aggregate im Western Blot unter denaturierenden Bedingungen zu visualisieren. Um Vergleichbarkeit zwischen den Aggregaten sicherzustellen, wurden die Zellen vor der Lyse gezählt und auf eine Zellzahl normiert. So war in jedem Lysat die gleiche Konzentration an Crosslinker vorhanden. Im Western Blot konnten Aggregate nachgewiesen werden. Es zeigten sich größere Aggregate bei den α -Syn-Multiplikationen als beim α -Syn-Wt. Beim α -Syn-Wt fanden sich auch Aggregate, jedoch waren diese kleiner als die der α -Syn-Multiplikationen. Dies bestätigt die Arbeit von Baumann, in der ebenfalls die Aggregationsneigung des α -Syn-Wt mittels DSS Crosslinker in CSM14.1-Zellen untersucht wurde (Baumann, 2011). CSM14.1-Zellen wurden verwendet, da diese resistent gegen α -Syn-induzierten-Zelltod sind und aus dem Lysat der Zellen hohe Proteinkonzentrationen extrahiert werden können, so dass diese für das Modell geeignet sind. Der Direktnachweis der Aggregate mittels nativem Western Blot gelang wegen einer im Modell hohen unspezifischen Bindung des Primärantikörpers nicht. Ein möglicher methodischer Fehler beim chemischen Crosslinking besteht in der Darstellung von unspezifischen Effekten, was nicht mit der Aggregatformation in Verbindung steht. Dieser kann jedoch auch bei den Native-PAGE Western Blots nicht ausgeschlossen werden. Zudem wurde Chemical Crosslinking bereits verwendet, um instabile α -Syn-Konformationen zu visualisieren (Bartels et al., 2011).

4.4 Proteasominhibition durch die α -Syn-Multiplikationen

Proteasomale Dysfunktion spielt eine große Rolle beim PS und der α -Synucleintoxizität. So sind proteasomale Proteine Bestandteile der LK (Ii et al., 1997). α -Syn kann durch das Proteasom abgebaut werden (Mak et al., 2010). Auch sind die Mutationen A30P und A53T in der Lage das Proteasom zu blockieren (Lindersson et al., 2004). Bei Überexpres-

sion von α -Syn *in vivo* kommt es jedoch zu keiner Inhibition des Proteasoms (Dyllick-Brenzinger et al., 2010).

Aus diesen Gründen wurde in der Arbeit der Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf die proteasomale Funktion in einem Fluoreszenzassay in CSM14.1-Zellen getestet. Das genutzte Substrat Z-Leu-Leu-Glu-AMC zur Messung der Proteasomfunktion wird ausschließlich vom Proteasom abgebaut, so dass sicher gestellt wurde, dass die proteasomale Funktion gemessen wird und nicht andere Proteindegradationswege der Zellen. Durch die proteasomale Spaltung wird aus dem Substrat das fluoreszierende AMC freigesetzt. Bei den α -Syn-Multiplikationen konnte eine signifikant niedrige Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden. Dies zeigt die Inhibition des Proteasoms durch die α -Syn-Multiplikationen in CSM14.1-Zellen. Hingegen kommt es durch den α -Syn-Wt zu keiner signifikanten Einschränkung der proteasomalen Funktion. Durch den gestörten Proteindegradationsweg, kann es zur Akkumulation von toxischen Zellsubstanzen und somit zu zellulärer Dysfunktion und Zelltod kommen.

4.5 Der Einfluss der α -Syn-Multiplikationen auf die Autophagie

Ein weiterer möglicher Mechanismus der Synucleintoxizität ist der Einfluss auf die Autophagie (Cuervo et al., 2004). α -Syn Überexpression führt zur Dysfunktion der Autophagie. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Winslow et al., 2010). In der hier vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob die α -Syn-Duplikationen und α -Syn-Triplikationen die Autophagie beeinflussen. Die Funktion der Autophagie wurde durch zwei verschiedene Mechanismen gemessen. Zum einen wurde die Konzentration von LC3-II im Verhältnis zu β -Tubulin quantifiziert. Bei intakter Autophagie kommt es zu einem Flux von LC3-I zu LC3-II. Zum anderen wurde die Autophagieaktivität mittels der Bestimmung des Proteins p62 gemessen. P62 ist ein Protein, welches über Interaktion mit LC3, den Abbau defekter Proteine in den Autophagosomen induziert (Wong and Cuervo, 2010). Akkumulation von p62 zeigt eine Störung der Autophagie an. Der Lysozyminhibitor Bafilomycin A1 hemmt den Abbau der Autophagosomen, so dass diese kumulieren. Kommt es bei Gabe von Bafilomycin A1 zur vermehrten Anreicherung von LC3-II, kann davon ausgegangen werden, dass ein Flux von LC3-I zu LC3-II stattfindet. Rapamycin, ein m-TOR Inhibitor führt zu einer verminderten Hemmung der Autophagie. Somit findet ein erhöhter Flux von LC3-I zu LC3-II als auch ein verstärkter Abbau von p62 statt. Die beiden hier durchgeführten Versuche zeigen eine signifikante Inhibition der Makroautophagie durch die α -Syn-Triplikation. In der densitometrischen

Messung der Western Blots, gefärbt gegen LC3, kam es zu einer signifikant erniedrigten Konzentration von LC3-II, sowohl bei Behandlung der Zellen mit Rapamycin als auch bei Behandlung mit Bafilomycin A1. Dieses zeigt einen verminderten Autophagiefluss an und lässt somit auf eine Hemmung der Makroautophagie durch die α -Syn-Triplikation schließen. Bei der α -Syn-Duplikation zeigt sich keine Hemmung der Makroautophagie. Beim α -Syn-Wt zeigte sich lediglich eine Tendenz, dass auch hier die Funktion der Autophagie vermindert ist. Bei der Quantifizierung von p62 im Verhältnis zu β -Tubulin kommt es bei Überexpression der α -Syn-Triplikation zur Akkumulation. Bei Überexpression der α -Syn-Duplikation und des α -Syn-Wt lässt sich eine Tendenz zur Akkumulation von p62 erkennen. In der Literatur wurde eine Akkumulation von p62 bei Überexpression von α -Syn-Wt beschrieben (Winslow et al., 2010).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression der α -Syn-Triplikation zu einer Einschränkung der Autophagie führt. Die Makroautophagie wurde jedoch nicht vollständig gehemmt, da LC3-II stets in den Zellen vorhanden war. Zudem kommt es bei Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A1 stets zu einer, wenn auch erniedrigten Anreicherung der Autophagosomen. Bei Überexpression der α -Syn-Triplikation ist es nicht möglich durch den m-TOR Inhibitor die Autophagie zu stimulieren. Rapamycin hat keinen Effekt mehr auf die Makroautophagie. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht alleine die Makroautophagie durch die α -Syn-Multiplikationen inhibiert wird, sondern eine Dysfunktion schon vor der Proteindegradation in den Autophagosomen vorliegt. Überexpression von α -Syn inhibiert Rab1a, eine GTPase, welche bei der Autophagosomenentstehung eine Rolle spielt (Gitler et al., 2008). So ist es möglich, dass es bei Überexpression der α -Syn-Triplikation nicht nur zu einer Einschränkung der Autophagie, sondern auch der Autophagosomenbildung kommt. Sowohl die erhöhte Konzentration von p62 als auch der Verlust der Wirkung von Rapamycin auf die Zellen zeigen dieses an. Als möglicher Pathomechanismus kommt eine Einschränkung der Funktion von Atg9 in Frage, ein Protein, welches für die Autophagosomenbiosynthese benötigt wird. Die Aktivität von Atg9 ist bei Überexpression von α -Syn vermindert (Winslow et al., 2010).

Das kein signifikanter Einfluss des α -Syn-Wt auf die Autophagie und die proteasomale Funktion gesehen werden konnte, steht im Widerspruch zu anderen Arbeiten, in denen sowohl eine Beeinflussung der Autophagie als auch der proteasomalen Funktion *in vitro* gezeigt wurde (Emmanouilidou et al., 2010).

Gestörte Autophagie führt zu keiner Mehranreicherung von α -Syn in den Zellen. Dies zeigt an, dass der Hauptdegradationsweg von α -Syn nicht die Makroautophagie ist, sondern andere Proteindegradationswege, wie die CMA oder das Ubiquitin-Proteasom-System.

4.6 Ausblick

Welcher der toxisitätsauslösende Mechanismus der α -Syn-Multiplikationen ist, bleibt zu beantworten. Es ist anzunehmen, dass Oligomere das potentiell toxische Agens sind (Outeiro et al., 2008). Bei Inhibition der Fibrillenbildung müsste es zu einer erhöhten Neurodegeneration (Goldberg and Lansbury, 2000), bei Blockierung der Oligomerbildung zu einem neuroprotektiven Effekt kommen (Hashimoto et al., 2002). CSM14.1-Zellen exprimieren kein α -Syn, dennoch ist ein toxischer Effekt durch die α -Syn-Multiplikationen und somit der α -Syn-Oligomere vorhanden. Dies zeigt die direkte toxische Eigenschaft der α -Syn-Multiplikationen und somit der Oligomere an. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es durch die Oligomere und deren Akkumulation zu einer Schädigung der Proteinhomöostase mit proteasomaler Dysfunktion und verminderter Autophagie kommt. Dieses konnte in der hier vorgelegten Arbeit mit dem α -Syn-Multiplikationen bestätigt werden. Sowohl die proteasomale Funktion als auch die Makroautophagie werden negativ in ihrer Funktion beeinflusst. Durch die Dysfunktion der Proteinhomöostase kommt es zur Akkumulation von α -Syn und somit wird die Bildung von Oligomeren und Aggregation gefördert. Insgesamt entsteht aus diesen vielen, sich gegenseitig beeinflussenden Mechanismen ein Teufelskreis, welcher nur schwer zu durchbrechen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Toxizitätsmessung mit SH-SY5Y-Zellen die α -Syn-Triplikation weniger toxisch ist als die α -Syn-Duplikation. So stellt sich die Frage, ob es bei einer bestimmten Größe der α -Syn-Multiplikationen zu einem protektiven Effekt auf die Zellen kommt. Durch die Aggregationsneigung der α -Syn-Multiplikationen könnte es bei zunehmender Anzahl an Multiplikationen zu einer so schnellen Aggregation kommen, bei der die Oligomere nicht mehr in der Lage sind, ihre zytotoxische Wirkung zu entfalten. Diese Hypothese basiert auf der Annahme, dass die Oligomere die toxische Spezies und die Aggregate eher protektiv sind (Outeiro et al., 2008). Nach den erfolgreichen *in-vitro*-Versuchen können die α -Syn-Multiplikationen *in vivo* getestet werden. Hierzu könnten die α -Syn-Multiplikationen per Virus in die Sncp injiziert werden.

Das Modell der α -Syn-Multiplikationen stellt eine einfache Methode dar, um α -Syn-induzierte-Toxizität und Aggregation *in vitro* zu untersuchen. Dies bietet eine neue Screening-Möglichkeit für therapeutische Ansätze als auch ein Modell, um neuroprotektive Mechanismen zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Fehlfaltung und Oligomerisierung von α -Synuclein wird als einer der zentralen Mechanismen in der Pathogenese des Parkinson-Syndroms diskutiert (Conway et al., 2000). Die Oligomere werden als das zellschädigende Agens angesehen (Outeiro et al., 2008). Überexpression von α -Syn in Zellen führt jedoch nur zu einer leichten Toxizität (Xu et al., 2002), so dass es schwierig ist, die genauen Auswirkungen und potentielle neuroprotektive Strategien *in vitro* zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde in der hier vorgestellten Arbeit ein α -Synuclein-Modell mit artifiziellen α -Syn-Oligomeren entwickelt, um die Mechanismen der α -Syn-Toxizität und deren Einflüsse auf die zelluläre Integrität besser zu untersuchen. Es wurden zwei Konstrukte kloniert, zum einen eine α -Syn-Duplikation, zum anderen eine α -Syn-Triplikation. Hierfür wurden jeweils zwei, bzw. drei α -Synucleine mit einer flexiblen Linkersequenz aneinander gekoppelt. Die Linkersequenz wurde verwendet, um die antiparallele Faltung der generierten α -Syn-Oligomere möglichst wenig zu beeinflussen. Anschließend wurden die Auswirkungen der α -Syn-Multiplikationen auf die Zellfunktion getestet. Zunächst wurde die Toxizität der α -Syn-Multiplikationen untersucht. Hier zeigte sich bei Überexpression der α -Syn-Multiplikationen in äquimolaren Mengen des α -Syn-Wt eine erhöhte Toxizität, sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in primären hippocampalen Neuronen. Die α -Syn-Multiplikationen zeigten zudem eine hohe Aggregationsneigung, dargestellt im Western Blot mit dem Crosslinker DSS. Auch eine Beeinflussung der Proteinhomöostase konnte gezeigt werden. So kam es durch die α -Syn-Multiplikationen sowohl zu einer Inhibition des Proteasoms als auch zu einer Einschränkung der Makroautophagie. Auch beim α -Syn-Wt kann eine Funktionsstörung der Makroautophagie gesehen werden, welche jedoch nicht signifikant ist. Umso wichtiger ist es ein Modell zu haben, welches die potentiell toxischen Funktionen durch die α -Syn-Oligomere besser darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen die α -Syn-Multiplikationen zu einem einfachen Modell welches die pathophysiologischen Vorgänge von α -Syn in den Zellen imitiert. Dies kann zur weiteren Untersuchung des α -Syn-induzierten Zelltods und zur Untersuchung neuroprotektiver Mechanismen dienen. So können potentielle Behandlungsstrategien des idiopathischen Parkinsonsyndroms an diesem Modell einfach *in vitro* getestet werden.

Literaturverzeichnis

- Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A et al. (2000): Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239–252
- Bartels T, Choi JG and Selkoe DJ (2011): alpha-synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107–110
- Baumann A: Neuroprotektion durch bag1 in modellen des idiopathischen parkinson-syndroms. Med. Diss. Göttingen 2011
- Biedler JL, Helson L and Spengler BA (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33, 2643–2652
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M et al. (2003): Mutations in the dj-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256–259
- Braak H, Bohl JR, Mueller CM, Rueb U, de Vos RAI and Tredici KD (2006): Stanley fahn lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 21, 2042–2051
- Brundin P, Li JY, Holton JL, Lindvall O and Revesz T (2008): Research in motion: the enigma of parkinson's disease pathology spread. *Nat Rev Neurosci* 9, 741–745
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R et al. (2002): Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* 22, 8797–8807
- Campion D, Martin C, Heilig R, Charbonnier F, Moreau V, Flaman JM, Petit JL, Hannequin D, Brice A and Frebourg T (1995): The nacp/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in alzheimer disease. *Genomics* 26, 254–257

- Cappai R, Leck SL, Tew DJ, Williamson NA, Smith DP, Galatis D, Sharples RA, Curtain CC, Ali FE, Cherny RA et al. (2005): Dopamine promotes alpha-synuclein aggregation into sds-resistant soluble oligomers via a distinct folding pathway. *FASEB J* 19, 1377–9
- Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schlueter OM and Suedhof TC (2005): Alpha-synuclein cooperates with csp α in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383–396
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M et al. (2004): Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167–1169
- Chaudhuri KR and Schapira AHV (2009): Non-motor symptoms of parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 8, 464–474
- Chen X, de Silva HA, Pettenati MJ, Rao PN, George-Hyslop PS, Roses AD, Xia Y, Horsburgh K, Ueda K and Saitoh T (1995): The human nacp/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and taqi rflp analysis. *Genomics* 26, 425–427
- Cole NB, Dieuliis D, Leo P, Mitchell DC and Nussbaum RL (2008): Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp Cell Res* 314, 2076–89
- Conway KA, Harper JD and Lansbury PT (1998): Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset parkinson disease. *Nat Med* 4, 1318–20
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE and Lansbury PT Jr (2000): Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 571–6
- Cookson MR (2009): alpha-synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener* 4, 9
- Cookson MR (2010): Unravelling the role of defective genes. *Prog Brain Res* 183, 43–57
- Cookson MR and Bandmann O (2010): Parkinson's disease: insights from pathways. *Hum Mol Genet* 19, R21–R27
- Cookson MR and van der Brug M (2008): Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Exp Neurol* 209, 5–11

- Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F et al. (2006): Alpha-synuclein blocks er-golgi traffic and rab1 rescues neuron loss in parkinson's models. *Science* 313, 324–8
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT and Sulzer D (2004): Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292–5
- Dauer W and Przedborski S (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF and George JM (1998): Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 273, 9443–9449
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG and Anandatheerthavarada HK (2008): Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex i in human dopaminergic neuronal cultures and parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283, 9089–100
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P and Marsden CD (1989): Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in parkinson's disease. *J Neurochem* 52, 381–9
- Dice JF (2007): Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295–9
- Driver JA, Logroschino G, Gaziano JM and Kurth T (2009): Incidence and remaining lifetime risk of parkinson disease in advanced age. *Neurology* 72, 432–438
- Dufty BM, Warner LR, Hou ST, Jiang SX, Gomez-Isla T, Leenhouts KM, Oxford JT, Feany MB, Masliah E and Rohn TT (2007): Calpain-cleavage of alpha-synuclein: connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation. *Am J Pathol* 170, 1725–38
- Dyllick-Brenzinger M, D'Souza CA, Dahlmann B, Kloetzel PM and Tandon A (2010): Reciprocal effects of alpha-synuclein overexpression and proteasome inhibition in neuronal cells and tissue. *Neurotox Res* 17, 215–27
- Emmanouilidou E, Stefanis L and Vekrellis K (2010): Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26s proteasome. *Neurobiol Aging* 31, 953–68

- Esposito A, Dohm CP, Kermer P, Bähr M and Wouters FS (2007): alpha-synuclein and its disease-related mutants interact differentially with the microtubule protein tau and associate with the actin cytoskeleton. *Neurobiol Dis* 26, 521–31
- Fonzo AD, Dekker MCJ, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Guedes LC, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LOM, Wouters CH et al. (2009): Fbxo7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 72, 240–245
- Fortin DL, Nemani VM, Voglmaier SM, Anthony MD, Ryan TA and Edwards RH (2005): Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein. *J Neurosci* 25, 10913–10921
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K and Iwatsubo T (2002): alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160–4
- Gasser T (2007): Update on the genetics of parkinson's disease. *Mov Disord* 22 Suppl 17, S343–S350
- Gasser T, Mueller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznaï B, Fabrizio E, Vieregge P and Horstmann RD (1998): A susceptibility locus for parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 18, 262–265
- George JM, Jin H, Woods WS and Clayton DF (1995): Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361–372
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ and Lee VM (2001): A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276, 2380–6
- Gitler AD, Bevis BJ, Shorter J, Strathearn KE, Hamamichi S, Su LJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Rochet JC, McCaffery JM et al. (2008): The parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular rab homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 145–50
- Goldberg MS and Lansbury PT Jr (2000): Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2, E115–9

- Haas SJP and Wree A (2002): Dopaminergic differentiation of the nurr1-expressing immortalized mesencephalic cell line csm14.1 in vitro. *J Anat* 201, 61–69
- Hamilton BA (2004): alpha-synuclein a53t substitution associated with parkinson disease also marks the divergence of old world and new world primates. *Genomics* 83, 739–742
- Hansen C, Angot E, Bergstroem AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, Outeiro TF, Melki R, Kallunki P, Fog K et al. (2011): alpha-synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* 121, 715–25
- Hashimoto M, Hsu LJ, Rockenstein E, Takenouchi T, Mallory M and Masliah E (2002): alpha-synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-jun n-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem* 277, 11465–72
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K et al. (2002): A susceptibility gene for late-onset idiopathic parkinson's disease. *Ann Neurol* 52, 549–555
- Ii K, Ito H, Tanaka K and Hirano A (1997): Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 125–31
- Inglis KJ, Chereau D, Brigham EF, Chiou SS, Schöbel S, Frigon NL, Yu M, Caccavello RJ, Nelson S, Motter R et al. (2009): Polo-like kinase 2 (plk2) phosphorylates alpha-synuclein at serine 129 in central nervous system. *J Biol Chem* 284, 2598–602
- Irizarry MC, Kim TW, McNamara M, Tanzi RE, George JM, Clayton DF and Hyman BT (1996): Characterization of the precursor protein of the non-a beta component of senile plaques (nacp) in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 889–895
- Iwai A, Yoshimoto M, Masliah E and Saitoh T (1995): Non-a beta component of alzheimer's disease amyloid (nac) is amyloidogenic. *Biochemistry* 34, 10139–10145
- Jo E, McLaurin J, Yip CM, George-Hyslop PS and Fraser PE (2000): alpha-synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J Biol Chem* 275, 34328–34334
- Kim S, Jeon BS, Heo C, Im PS, Ahn TB, Seo JH, Kim HS, Park CH, Choi SH, Cho SH et al. (2004): Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in parkinson's disease. *FASEB J* 18, 1615–7

- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y and Shimizu N (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608
- Klucken J, Outeiro TF, Nguyen P, McLean PJ and Hyman BT (2006): Detection of novel intracellular alpha-synuclein oligomeric species by fluorescence lifetime imaging. *FASEB J* 20, 2050–7
- Klucken J, Shin Y, Masliah E, Hyman BT and McLean PJ (2004): Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation and toxicity. *J Biol Chem* 279, 25497–502
- Krueger R, Kuhn W, Mueller T, Voitalla D, Graeber M, Koesel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schoels L and Riess O (1998): Ala30pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in parkinson's disease. *Nat Genet* 18, 106–108
- Lansbury PT Jr and Brice A (2002): Genetics of parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Cell Biol* 14, 653–60
- Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, Quazi AZ, Savalle M, Nemani V, Chaudhry FA, Edwards RH et al. (2006): Alpha-synuclein overexpression in pc12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J Neurosci* 26, 11915–22
- Lautier C, Goldwurm S, Duerr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G, Brice A and Smith RJ (2008): Mutations in the ggyf2 (tnrc15) gene at the park11 locus in familial parkinson disease. *Am J Hum Genet* 82, 822–833
- Lavedan C (1998): The synuclein family. *Genome Res* 8, 871–880
- Lee HJ, Patel S and Lee SJ (2005): Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 25, 6016–24
- Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR and Lee SJ (2008): Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1835–49
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T et al. (1998): The ubiquitin pathway in parkinson's disease. *Nature* 395, 451–452
- Lesage S and Brice A (2009): Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 18, R48–R59

- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehnrcrona S, Bjoerklund A et al. (2008): Lewy bodies in grafted neurons in subjects with parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14, 501–503
- Li W, West N, Colla E, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson TM, Jäkälä P, Hartmann T, Price DL et al. (2005): Aggregation promoting c-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial parkinson's disease-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2162–7
- Lindersson E, Beedholm R, Højrup P, Moos T, Gai W, Hendil KB and Jensen PH (2004): Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem* 279, 12924–34
- Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM and Di Monte DA (2010): Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem* 285, 13621–9
- Martin ED, Gonzalez-Garcia C, Milan M, Farioas I and Ceoa V (2004): Stressor-related impairment of synaptic transmission in hippocampal slices from alpha-synuclein knock-out mice. *Eur J Neurosci* 20, 3085–3091
- McLean PJ, Kawamata H, Ribich S and Hyman BT (2000): Membrane association and protein conformation of alpha-synuclein in intact neurons. effect of parkinson's disease-linked mutations. *J Biol Chem* 275, 8812–8816
- Muenter MD, Forno LS, Hornykiewicz O, Kish SJ, Maraganore DM, Caselli RJ, Okazaki H, Howard FM, Snow BJ and Calne DB (1998): Hereditary form of parkinsonism-dementia. *Ann Neurol* 43, 768–781
- Orth M, Tabrizi SJ, Schapira AHV and Cooper JM (2003): Alpha-synuclein expression in hek293 cells enhances the mitochondrial sensitivity to rotenone. *Neurosci Lett* 351, 29–32
- Outeiro T, Putcha P, Tetzlaff J, Spoelgen R, Koker M, Carvalho F, Hyman B and McLean P (2008): Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS One* 3, e1867
- Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, Hardy J, Houlden H, Singleton A and Schneider SA (2009): Characterization of pla2g6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 65, 19–23

- Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H et al. (2010): Progression of parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 5, e8762
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T and Group PS (2003): Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 12, 2599–2608
- Parkinson J (2002): An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14, 223–36; discussion 222
- Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P and Marsden CD (1997): Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in parkinson's disease. *J Neural Transm* 104, 661–77
- Peng X, Peng XM, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L and Perez RG (2005): Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2a reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci* 118, 3523–30
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R et al. (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047
- Pountney DL, Lowe R, Quilty M, Vickers JC, Voelcker NH and Gai WP (2004): Annular alpha-synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions. *J Neurochem* 90, 502–12
- Quilty MC, King AE, Gai WP, Pountney DL, West AK, Vickers JC and Dickson TC (2006): Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Exp Neurol* 199, 249–56
- Ramirez A, Heimbach A, Gruendemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J et al. (2006): Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in *atp13a2*, encoding a lysosomal type 5 p-type atpase. *Nat Genet* 38, 1184–1191
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K and Youdim MB (1989): Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* 52, 515–20

- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder 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, S21–S23
- Roberti MJ, Jovin TM and Jares-Erijman E (2011): Confocal fluorescence anisotropy and frap imaging of alpha-synuclein amyloid aggregates in living cells. *PLoS One* 6, e23338
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A et al. (2009): Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for parkinson's disease. *Nat Genet* 41, 1303–7
- Seeburg DP, Feliu-Mojer M, Gaiottino J, Pak DTS and Sheng M (2008): Critical role of cdk5 and polo-like kinase 2 in homeostatic synaptic plasticity during elevated activity. *Neuron* 58, 571–83
- Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG et al. (2009): Genome-wide association study reveals genetic risk underlying parkinson's disease. *Nat Genet* 41, 1308–1312
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R et al. (2003): alpha-synuclein locus triplication causes parkinson's disease. *Science* 302, 841
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76–85
- Smith WW, Jiang H, Pei Z, Tanaka Y, Morita H, Sawa A, Dawson VL, Dawson TM and Ross CA (2005): Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate a53t mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet* 14, 3801–11
- Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A and Wolozin B (2003): Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the s6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem* 278, 11753–9
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R and Goedert M (1997): Alpha-synuclein in lewy bodies. *Nature* 388, 839–840

- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Mueller T, Bornemann A et al. (2005): Loss of function mutations in the gene encoding *omi/htra2* in parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14, 2099–2111
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y and Saitoh T (1993): Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11282–11286
- Uversky VN (2007): Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103, 17–37
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Turco DD, Bentivoglio AR, Healy DG et al. (2004): Hereditary early-onset parkinson's disease caused by mutations in *pink1*. *Science* 304, 1158–1160
- Wang W, Perovic I, Chittuluru J, Kaganovich A, Nguyen LTT, Liao J, Auclair JR, Johnson D, Landru A, Simorellis AK et al. (2011): A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17797–802
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA and Lansbury PT Jr (1996): Nacp, a protein implicated in alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709–15
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S et al. (2011): In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4194–9
- Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S et al. (2010): alpha-synuclein impairs macroautophagy: implications for parkinson's disease. *J Cell Biol* 190, 1023–37
- Wong E and Cuervo AM (2010): Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 13, 805–11
- Xu J, Kao SY, Lee FJS, Song W, Jin LW and Yankner BA (2002): Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in parkinson disease. *Nat Med* 8, 600–6
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B et al. (2004): The new mutation, e46k, of alpha-synuclein causes parkinson and lewy body dementia. *Ann Neurol* 55, 164–173

- Zhang G, Gurtu V and Kain SR (1996): An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 707–711
- Zhou W, Hurlbert MS, Schaack J, Prasad KN and Freed CR (2000): Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells. *Brain Res* 866, 33–43
- Zhu M, Li J and Fink AL (2003): The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. *J Biol Chem* 278, 40186–97
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB et al. (2004): Mutations in *lrrk2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44, 601–607

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Poster:

Schnieder M, Dohm CP, Baumann A, Liman J, Bähr M, Kermer P: A novel *in vitro* model of α -synuclein aggregation/toxicity and its modulation by the cochaperone BAG. 12th International Neuroscience Winter Conference, 06. bis 10. April 2010 in Sölden

Schnieder M, Dohm CP, Baumann A, Liman J, Bähr M, Wouters F, Kermer P: A novel *in vitro* model of α -synuclein aggregation and toxicity. 34th Göttingen Neurobiology Conference, 10th Meeting of the Neuroscience Society, 23. bis 27. März 2011 in Göttingen

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. M. Bähr für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Ermöglichung zur Durchführung dieser Arbeit bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. P. Kermer für die Bereitstellung des spannenden Themas sowie seine fachliche Betreuung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Christoph Dohm für die wunderbare Zusammenarbeit. Er stand mir bei allen Problemen und Schwierigkeiten, welche die Laborarbeit mit sich bringt, beiseite. Er hat dafür gesorgt, dass die Laborarbeit, trotz allen Problemen und Schwierigkeiten, mir unglaublich viel Spaß macht und ich nie die Motivation verloren habe. Auch danke ich ihm für seine Freundschaft, die während der Zeit der Doktorarbeit entstanden ist.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. M. Bähr, insbesondere aber bei der AG Kermer, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Großen Dank schulde ich hier insbesondere Sandra Gerke für die Einführung in die praktische Laborarbeit zu Beginn meiner Dissertation und Beate Veith für die große Hilfe bei vielen Techniken der praktischen Laborarbeit.