

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. Mathias Bähr)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Stabilität der Synuklein Proteine

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Diana Voll

aus

Rheine

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. Ralf Dressler

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. Mathias Bähr

Ko-Betreuer: Prof. Dr. Markus Zweckstetter

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Mathias

Ko-Referent: Prof. Dr. Markus Zweckstetter

Drittreferent: Prof. Dr. Ralf Dressler

Datum der mündlichen Prüfung: 4. Februar 2025

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Stabilität der Synuklein Proteine" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 26.06.2023

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Raina A, Leite K, Guerin S, Mahajani SU, Chakrabarti KS, Voll D, Becker S, Griesinger C, Bähr M, Kügler S (2020): Dopamine promotes the neurodegenerative potential of β -synuclein. *J Neurochem* 156, 674–69

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Synukleinopathien	1
1.1.1 Parkinson Erkrankung – eine Herausforderung für die Gesellschaft und das Gesundheitssystem.....	1
1.1.2 Therapieprinzipien und Grenzen der Therapie.....	2
1.2 Synuklein-Proteine als Treiber der Neurodegeneration?	3
1.2.1 Struktur der Synuklein-Proteine.....	5
1.2.2 Synuklein-Mutanten	7
1.2.3 Funktion der Synuklein-Proteine	9
1.2.4 Neurotoxische Mechanismen im Zusammenhang mit den Synukleinen	11
1.3 Adeno-assoziierte Viren als Gentransfervehikel	14
1.4 Stabilität der Synukleine als möglicher Faktor für Neurotoxizität	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Kits und Assays	19
2.1.4 Chemikalien	19
2.1.5 Puffer und Lösungen	21
2.1.6 Antikörper	24
2.1.7 Adeno-assoziierte virale Vektoren zur Expression der Synukleine.....	25
2.1.8 Tiere und Zellreihen.....	26
2.1.9 Software	26
2.2 Primärzellkultur	27
2.2.1 Transduktion	28
2.2.2 Probenasservation (Lyse)	28
2.3 Western Blot.....	29
2.3.1 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	29
2.3.2 Immunoblotting.....	30
2.3.3 Auswertung.....	31
2.3.4 Fixierung der Membranen.....	32
2.4 Klonieren viraler Vektoren	32
2.4.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese.....	33
2.4.2 Fällung und Konzentrationsbestimmung der DNA.....	33
2.4.3 Ligation und Transformation	34
2.4.4 Plasmid-DNA-Aufreinigung und AAV-Vektor-Produktion.....	35

3	Ergebnisse	36
3.1	Herausforderungen beim Western Blot.....	36
3.1.1	Evaluation der Western Blot Konditionen	40
3.2	Degradation der Synuklein-Proteine	44
4	Diskussion	48
4.1	Variabilität der Messdaten aus dem Western Blot	48
4.2	Abbau der Synuklein-Proteine.....	50
4.3	Stärken und Schwächen der Arbeit	53
5	Zusammenfassung	54
6	Anhang	55
7	Literaturverzeichnis	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aminosäuresequenz der drei Synuklein-Proteine im Vergleich.....	6
Abbildung 2: Struktur der verwendeten AAV-Vektoren.....	26
Abbildung 3: Versuchsablauf.....	28
Abbildung 4: Auswertung der Western Blots.....	31
Abbildung 5: Klonierte AAV-Vektoren für zukünftige Projekte.....	33
Abbildung 6: Variablen im Western Blot, verschiedene Inkubationsschritte und Antikörper.....	38
Abbildung 7: Streuungsplot für Proteinkonzentrationen der Synukleine und EGFP (<u>unfixierte</u> Membranen).....	39
Abbildung 8: Western Blot Variablen, Fixierung der Membranen.....	40
Abbildung 9: Exemplarischer Western Blot mit finalen Konditionen.....	41
Abbildung 10: Streuungsplots für die verschiedenen Proteine in Abhängigkeit von Zeitpunkt (div) und zusätzlichem Fixierungsschritt.....	43
Abbildung 11: Gegenüberstellung der Proteinwerte aus fixierten Membranen mit vs. ohne Normierung auf β -Tubulin.....	44
Abbildung 12: Degradationskinetik der Synuklein-Proteine und von EGFP.....	46
Abbildung 13: Boxplots zum Vergleich der Synukleine und EGFP an den einzelnen Messzeitpunkten.....	47
Abbildung 14: Degradationsmechanismen der Synukleine (modifiziert nach Xiluori et al.).....	50
Abbildung 15: Mittelwertepplot für die Synukleine und EGFP im direkten Vergleich.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 3: Kits und Assays.....	19
Tabelle 4: Chemikalien.....	19
Tabelle 5: Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 6: Primärantikörper.....	24
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	25
Tabelle 8: Tiere und Zellreihen.....	26
Tabelle 9: Software.....	26
Tabelle A1: Übersicht über verschiedene Variablen beim Western Blot.....	55

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ADH	Antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
ALAD	Aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CMA	<i>chaperone-mediated autophagy</i> , Chaperon-vermittelten Autophagie
CMF	Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -freies Medium
DAT	Dopamin-Transporter
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
div	<i>days in vitro</i> , Tage <i>in vitro</i>
DLB	<i>dementia with Lewy-bodies</i> , Demenz mit Lewy-Körperchen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , nach Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
DOPAL	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verbesserte Chemilumineszenz
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verbessertes grün fluoreszierendes Protein
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> , Hanks balancierte Salzlösung
HCN	Hippocampus- und Cortex-Neuronen Medium
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
hSyn	Humaner Synapsin-Promotor
ITR	<i>inverted terminal repeats</i> , invertierte terminale Sequenzwiederholungen
LAMP-2a	<i>lysosomal membrane-associated protein 2a</i> , Lysosomen-Membran assoziiertes Protein 2a
LB	<i>Lewy-bodies</i> , Lewy-Körperchen
L-Dopa	Levodopa
MSA	Multisystematrophie
NAC	<i>non-amyloid-β component</i> , Nicht-amyloid-β-Komponente
NBM	Neurobasal-Medium
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PD	<i>Parkinson Disease</i> , Parkinson Erkrankung
PK	Proteinase K
PLO	Poly-L-Ornithin
PSN	Penicillin, Streptomycin, Neomycin Antibiotika-Mix
PVDF	Polyvinylidenfluorid

rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SDS-Page	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> , kleine eingreifende Ribonukleinsäure
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i> , löslicher N-Ethylmaleimid sensitiver-Faktor Bindungs-Rezeptor
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline with tween</i> , dreifach gepufferte Salzlösung mit Tween
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRE	Tetracyclin-responsives Element
TRIS-Hcl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Hydrochlorid
tTA	Tetracyclin-Transaktivator
tu	<i>transfecting units</i> , Transfektionseinheiten
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i> , Woodchuck Hepatitis Virus posttranskriptionales Regulationselement
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Synukleinopathien

Der Begriff „Synukleinopathien“ umfasst verschiedene neurodegenerative Krankheitsbilder, die dadurch gekennzeichnet sind, dass bei ihrer Pathogenese die Ablagerung von Synuklein-Proteinen in Neuronen oder Glia-Zellen eine Rolle spielt. Die drei wichtigsten Synukleinopathien sind der Morbus Parkinson mit dem familiären Parkinson-Syndrom und der idiopathischen Parkinson-Erkrankung, die Demenz mit Lewy-Körperchen (*dementia with Lewy-bodies*, DLB) und die Multisystematrophie (MSA), die – obgleich es viele Überschneidungen in Bezug auf die Symptome gibt – sich jeweils als klinisch eigenständige Erkrankungen präsentieren (Galvin et al. 2001).

Neuropathologisch lässt sich die Parkinson-Erkrankung (*Parkinson's Disease*, PD) durch den Verlust dopaminerger Neurone u. a. in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) erklären, in denen es zur Ablagerung von α -Synuklein in Lewy-Körperchen kommt. Charakteristisch für Patienten mit PD sind die motorischen Kardinalsymptome Rigor, Ruhetremor, Bradykinese und posturale Instabilität. Daneben treten häufig noch sensorische, vegetative, kognitive und psychiatrische Symptome hinzu wie z. B. Hyposmie, gestörte Blasen- und Darmfunktion, Schlafstörungen und im fortgeschrittenen Stadium auch Demenz (Jankovic 2008).

Demgegenüber präsentieren sich Patienten mit DLB schon in frühen Stadien mit demenziellen Symptomen. Häufig wird von neuropsychologischen Veränderungen und visuellen Halluzinationen berichtet, während die motorischen Störungen variabel sind (McCann et al. 2014; McKeith et al. 2017). Auch der DLB liegen Ablagerungen von α -Synuklein in Lewy-Körperchen zugrunde; diese werden aber vor allem in kortikalen Arealen gefunden. Zudem wurden bei der familiären Form der DLB Mutationen des Proteins β -Synuklein identifiziert (Ohtake et al. 2004).

Die MSA, bei der α -Synuklein Ablagerungen in Glia-Zellen beschrieben werden (Spillantini et al. 1998), ist in frühen Stadien durch vegetative Beschwerden wie Urin-Inkontinenz und orthostatische Dysfunktion in Kombination mit Parkinson-ähnlichen motorischen Störungen oder zerebellären Symptomen geprägt (Gilman et al. 2008).

1.1.1 Parkinson Erkrankung – eine Herausforderung für die Gesellschaft und das Gesundheitssystem

Von den oben genannten Erkrankungen ist die PD aufgrund ihrer hohen Fallzahlen von besonderer gesellschaftlicher Relevanz. Die Prävalenz in der allgemeinen Bevölkerung wird mit 0,1 % angegeben (Tysnes und Storstein 2017), wobei die Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt. In der Rotterdam-Studie aus dem Jahr 2004 wird für die Altersgruppe von 55 bis

65 Jahren eine Inzidenzrate von 0,3 dokumentiert, für die Altersgruppe von 65 bis 75 Jahren bereits eine von 1,4 und für die Altersgruppe der über 85-Jährigen eine von 4,3 (de Lau et al. 2004). Im Zuge des demografischen Wandels und der zunehmend höheren Lebenserwartung ist weltweit mit einem deutlichen Anstieg der Prävalenz der PD in den kommenden Jahren zu rechnen (Dorsey et al. 2007).

Typischerweise verläuft die Erkrankung progressiv über viele Jahre. Initial kann häufig eine Hyposmie beobachtet werden, außerdem werden Schlafstörungen, depressive Episoden sowie Angststörungen und Obstipation regelmäßig bei Patienten beschrieben, die Jahre später die Diagnose PD erhalten (Mahlknecht et al. 2015). Schon in diesen frühen Prodromalstadien verzeichnen die Patienten eine höhere Anzahl an krankheitsbedingten Arbeitsausfällen als die Allgemeinbevölkerung (Timpka et al. 2018). Die Diagnose wird meist erst bei Auftreten motorischer Symptome gestellt. In fortgeschrittenen Stadien fallen die Patienten unter anderem mit Hypomimie, Dysarthrie und Dysphagie auf (Jankovic 2008). Diese Symptome machen die Teilnahme am alltäglichen Leben und das Pflegen sozialer Kontakte zu einer großen Herausforderung. Die einzelnen motorischen und nicht-motorischen Symptome können in unterschiedlicher Ausprägung auftreten und auch die Progression der Symptome über die Zeit ist variabel (Lawton et al. 2018).

Neben der sporadischen Parkinson-Erkrankung sind familiär vererbte Formen bekannt. Die Symptomatik kann klinisch sehr heterogen sein, erlaubt aber keine sichere Abgrenzung zum sporadischen Parkinson-Syndrom (Baba et al. 2006). Charakteristisch ist oft ein früherer Beginn der Symptome, sowie ein längerer Krankheitsverlauf (Papapetropoulos et al. 2001; Baba et al. 2006).

Die Lebenserwartung von Patienten mit Parkinson-Erkrankung ist gegenüber der Allgemeinbevölkerung deutlich verringert (Savica et al. 2017).

1.1.2 Therapieprinzipien und Grenzen der Therapie

Aufgrund der Degeneration dopaminergener Neurone der *Substantia nigra pars compacta* bei der PD, ist die verringerte Verfügbarkeit des Neurotransmitters Dopamin ein zentraler Ansatzpunkt aktueller Therapieregime (Connolly und Lang 2014).

Als über Jahre etablierte Standardtherapie kommt Levodopa (L-Dopa) zum Einsatz, der natürliche Vorläufer von Dopamin, der über die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (ALAD) in das aktive Dopamin umgewandelt wird (Koller 2000). Initial wird häufig ein schnelles und gutes Ansprechen auf die L-Dopa-Therapie beobachtet, in der Langzeittherapie zeigen sich allerdings zunehmende Wirkstoff-Fluktuationen, die mit motorischen Nebenwirkungen einhergehen. Solche Fluktuationen können durch eine kontinuierliche enterale Therapie zum Beispiel über duodenale Pumpensysteme abgefangen werden, allerdings birgt die Installation dieser Systeme ein Risiko für Komplikationen wie Infektionen (Lees et al. 2009). Des Weiteren kommen Dopaminagonisten wie Pramipexol, die ihre Wirkung durch

Bindung an Dopaminrezeptoren entfalten, und Monoamin-Oxidase-Inhibitoren, die den Abbau von Dopamin hemmen, leitliniengerecht zum Einsatz (DGN 2016).

Nicht-motorische Symptome wie Schlafstörungen, Depressionen und kognitive Einschränkungen lassen sich oft nur wenig durch die auf Dopamin fokussierte Therapie beeinflussen. Hier steht eine entsprechende symptomatische Therapie je nach Beschwerden im Vordergrund (Connolly und Lang 2014).

Wenn die medikamentöse Therapie zu keiner ausreichenden Beschwerdebesserung führt, kommt das invasive Verfahren der Tiefen Hirnstimulation in Frage. Damit kann die beschwerdefreie Zeit erhöht werden, wobei die Komplikationen durch den chirurgischen Eingriff und weitere u. a. motorische Nebenwirkungen berücksichtigt werden müssen (Weaver et al. 2009).

Insgesamt vermag die auf Dopamin fokussierte Therapie eine - oft temporäre - Linderung der v. a. motorischen Symptome zu bewirken. Die Progression der Erkrankung kann jedoch nicht verhindert werden. Von einer Behandlung, die den Krankheitsverlauf beeinflusst und die Progression verhindert oder gar die Erkrankung heilt, ist die aktuelle leitliniengerechte Parkinsontherapie weit entfernt. Verschiedene experimentelle Substanzen mit unterschiedlichen Ansatzpunkten sind und waren in präklinischen und klinischen Studien im Einsatz (Savitt und Jankovic 2019). Auch das Protein α -Synuklein, dem eine Schlüsselrolle in der Krankheitsentstehung zugesprochen wird, stellt einen Ansatzpunkt für krankheitsmodifizierende Therapien dar. Es wurden verschiedene Antikörper gegen unterschiedliche Isoformen des Proteins entwickelt, die *in vitro* sowie bei systemischer Gabe in tierexperimentellen Untersuchungen an Mäusen und Affen vor allem das extrazelluläre α -Synuklein-Level im ZNS verringern und krankheitstypische motorische Einschränkungen reduzierten konnten (Schofield et al. 2019; Weihofen et al. 2019). Bisher konnte die Sicherheit von Antikörper-basierten Therapien gegen das Protein beim Menschen bestätigt werden (Meissner et al. 2020; Volc et al. 2020), weitere klinische Studien zur Wirksamkeit stehen aber noch aus. Zum aktuellen Zeitpunkt konnte kein Medikament mit krankheitsveränderndem Potenzial in die Standardtherapie aufgenommen werden. Hier ist tiefere Grundlagenforschung erforderlich, um den genauen Pathomechanismus der Synukleinopathien weiter zu ergründen.

1.2 Synuklein-Proteine als Treiber der Neurodegeneration?

Bereits vor vielen Jahren wurden *Lewy-bodies*, zytoplasmatische Einschlusskörperchen in Neuronen, und *Lewy-neurites* in Axonen, die neben einer Vielzahl anderer Proteine α -Synuklein in hoher Konzentration beinhalten, u. a. in der *Substantia nigra* von an Parkinson erkrankten Patienten identifiziert und als histopathologisches Korrelat der Erkrankung postuliert (Tretiakoff 1919; Spillantini et al. 1997). Zusätzlich bestehen familiäre Mutationen im SNCA-Gen, das für α -Synuklein kodiert, die zu einem familiären Auftreten der Erkrankung mit

besonders früher Manifestation von krankheitstypischen Symptomen führen (Polymeropoulos et al. 1997). Die Beschreibung von Duplikationen und Triplikationen des SNCA-Genlocus, bei denen es zu einer höheren Proteinlast an α -Synuklein kommt und die zu einer autosomal-dominanten Vererbung der Erkrankung in einigen Familien führte, erhärtete weiter den Verdacht auf eine wichtige, konzentrationsabhängige Rolle von α -Synuklein in der Entstehung der PD (Singleton et al. 2003; Chartier-Harlin et al. 2004). Des Weiteren konnten in einer Genom-weiten Assoziationsstudie *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP, einzelne Nucleotid Polymorphismen) des SNCA-Gens identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko an PD zu erkranken vergesellschaftet sind (Edwards et al. 2010).

Die klinischen Symptome motorischer Art bei PD resultieren aus einem Verlust dopaminerger Neurone im Bereich der SNpc (Fearnley und Lees 1991; Damier et al. 1999), die als Teil der Basalganglienschleife an der Extrapyramidal-Motorik mitwirkt. Diese Neurone scheinen besonders anfällig für die Ablagerung von α -Synuklein in Form von *Levy-bodies* in Zellkörpern sowie in Form von *Levy-neurites* in Axonen zu sein. Aber auch in anderen Regionen des Zentralen Nervensystems, unter anderem in Arealen des limbischen Systems wie Hippocampus und Amygdala (Braak und Braak 2000), dem Hypothalamus (Langston und Forno 1978), der Medulla oblongata und dem Cortex konnten *Levy-bodies* und *Levy-neurites* nachgewiesen werden (Braak et al. 2003b). Darüber hinaus wird über α -Synuklein Ablagerungen in Neuronen der Riechbahn (Sengoku et al. 2008), im enterischen Nervensystem des Darmtraktes (Wakabayashi et al. 1988; Stokholm et al. 2016) sowie in anderen extrazerebralen Regionen im Zusammenhang mit PD berichtet, die als Ursache der oft früher auftretenden, nicht-motorischen Symptome gewertet werden könnten (Lim et al. 2009).

Auf Basis einer Post-Mortem-Analyse von Gehirnen von Parkinson-Patienten, Patienten mit inzidentellem Nachweis von *Levy-bodies* (ohne dass zu Lebzeiten typische Symptome aufgetreten sind) und einer Kontrollgruppe ohne Nachweis von *Levy-bodies*, stellten Braak et al. ein Klassifikationssystem auf, nach dem die Erkrankung in sechs konsekutiv aufeinander folgende Stadien eingeteilt werden kann: In den Stadien 1 und 2 sind *Levy-bodies* oder *Neurites* im Hirnstamm im *Nucleus dorsalis nervi vagi*, im Bereich der *Formatio reticularis* im *Locus coeruleus* oder in Neuronen der Riechbahn nachweisbar. In den Stadien 3 und 4 wird das Auftreten im Mittelhirn, insbesondere in der *Substantia nigra pars compacta*, im basalen Vorderhirn, im transentorhinalen Kortex sowie im Hippocampus beschrieben, erst hier wird von der Manifestation der typischen klinischen Motorsymptome ausgegangen. In den letzten beiden Stadien bestehe die Pathologie in den höheren kortikalen Assoziationsarealen und schließlich im gesamten Neokortex (Braak et al. 2003a). In diesem Zusammenhang entstand die Hypothese, dass die Erkrankung in der Peripherie, entweder in den Neuronen des *Nervus olfactorius* oder dem enterischen Nervensystem des Darms ihren Ausgangspunkt haben und dann über axonalen Transport über den *Nervus vagus* in das Zentrale Nervensystem (ZNS) fortschreiten könnte (Hawkes et al. 2007). Als Auslöser wird ein unbekanntes Agens im Darm oder der Riechschleimhaut diskutiert (Hawkes et al. 2007).

Diese Hypothese wird seit der Veröffentlichung kontrovers diskutiert: Einige Untersuchungen *in vitro*, am Tiermodell aber auch klinische Studien zeigten Ergebnisse, die eine solche Propagation der Synuklein-Pathologie untermauern (Pan-Montojo et al. 2010; George et al. 2013; Ziegler et al. 2013). Gleichzeitig sprechen sich eine Reihe an Autoren gegen die Hypothese aus, vor allem mit den Argumenten, dass die Stadien nicht von allen Patienten in dieser Form durchlaufen werden und dass die *Lenny-body*-Pathologie nur wenig mit dem neurodegenerativen Prozess korreliert (Parkkinen et al. 2005; Burke et al. 2008; Markesbery et al. 2009). In den letzten Jahren besteht aber zunehmend Einigkeit darin, dass die Entwicklung der Erkrankung über das periphere Nervensystem ins ZNS bei einigen Patienten beobachtet werden kann, aber vor dem Hintergrund der Komplexität der Synukleinopathien nicht das vollständige Patientenkollektiv widerspiegelt (Halliday et al. 2008; Braak und Tredici 2017).

1.2.1 Struktur der Synuklein-Proteine

Neben α -Synuklein, für das eine wichtige Rolle in der Entstehung der PD akzeptiert ist, sind auch β - und γ -Synuklein Teil der Synuklein-Familie. β - und γ -Synuklein wurden bisher nicht in *Lenny-bodies* nachgewiesen, ihr Vorliegen in hippocampalen Axonen von Patienten mit DLB und PD ist aber belegt (Galvin et al. 1999).

α -Synuklein ist ein Protein mit einer Masse von 14 kDa, das primär und in hoher Konzentration im ZNS exprimiert wird (Iwai et al. 1995). Es wird vor allem in den Präsynapsen nachgewiesen und kommt in löslicher Form vor (George et al. 1995), eine Assoziation mit Membranen wird aber beschrieben (McLean et al. 2000). Physiologisch existiert α -Synuklein als ungefaltetes Monomer (Fauvet et al. 2012) und wird zur Gruppe der intrinsisch ungeordneten Proteine (*intrinsically disordered proteins*, IDP) gezählt, die bei Bindung an andere Proteine oder Strukturen ihre Konformation verändern können, dadurch eine Vielzahl an Interaktionspartnern haben und verschiedene Funktionen in der Zelle ausüben können (Deleersnijder et al. 2013; Uversky 2015).

	N-terminale Domäne					
α Syn	MDVFMKGLSK	AKEGVVAAAE	KTKQGVAAEA	GKTKEGVLYV	GSKTKEGVVH	
β Syn	MDVFMKGLSM	AKEGVVAAAE	KTKQGVTEAA	EKTKEGVLYV	GSKTREGVVQ	
γ Syn	MDVFKKGFSI	AKEGVVGAVE	KTKQGVTEAA	EKTKEGVMYV	GAKTKENVVQ	
	non-amyloid- β component (NAC) Region					
α Syn	GVATVAEKT	EQVTNVGGAV	VTGVTAVAQK	TVEGAGSIAA	ATGFVKKDQL	
β Syn	GVASVAEKT	EQASHLGGAV	FSG-----	----AGNIAA	ATGLVKREEF	
γ Syn	SVTSVAEKT	EQANAVSEAV	VSSVNTVATK	TVEEAENIAV	TSGVVRKEDL	
	C-terminale Domäne					
α Syn	GKNEEG----	-AP-QEGILE	DMPVDPDNEA	YEMPSEEGYQ	DYEPEA	140
β Syn	PTDLKPEEVA	QEA-AEEPLI	EPLMEPEGES	YEDPPQEEYQ	EYEPEA	134
γ Syn	RPSAPQQEGE	ASKEKEEVAE	EAQSG--GD-	-----	-----	127

Abbildung 1: Aminosäuresequenz der drei Synuklein-Proteine im Vergleich. In der N-terminalen Domäne zeigen die Proteine die größte Homologie, während in der NAC-Region und der C-terminalen Domäne relevante Unterschiede vorliegen.

α -Synuklein besteht aus 140 Aminosäuren, von denen die ersten 60 die N-terminale Domäne bilden, in der vier unvollständige Wiederholungen des hexameren Motivs KTKEGV auftreten, die das Potenzial besitzen, bei Bindung an Membranen amphiphile α -Helices zu bilden (Davidson et al. 1998). In diesem Bereich besteht auch die größte Homologie zu den anderen Mitgliedern der Synuklein-Familie. Die *non-amyloid- β -component* (NAC)-Region, Aminosäuren 61 bis 95, stellt einen hydrophoben Anteil dar, der für die Aggregation und Bildung Proteinase-resistenter Fibrillen unerlässlich ist (Giasson et al. 2001). Die C-terminale Domäne, Aminosäuren 96 bis 140, ist negativ geladen und übt einen wichtigen Einfluss auf die Gesamtladung des Proteins aus. Untersuchungen an C-terminal gekürzten α -Synuklein Varianten ergaben ein erhöhtes Aggregationspotenzial, sodass von einem negativen regulatorischen Einfluss dieses Teils auf die Aggregation des Proteins ausgegangen werden kann (Hoyer et al. 2004). Es bestehen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen C-terminaler Domäne und NAC-Region (Dedmon et al. 2005) sowie elektrostatische Wechselwirkungen zwischen C-terminaler und N-terminaler Domäne (Wu und Baum 2010), deren Beeinflussung sich auf das Aggregationspotenzial des Proteins auswirkt (Dedmon et al. 2005; Stephens et al. 2020). Darüber hinaus ist die C-terminale Domäne in Protein-Protein-Interaktionen involviert und enthält die Ansatzpunkte für die häufigsten posttranslationalen Modifikationen (Oueslati et al. 2010). In *Lewy-bodies* liegt α -Synuklein typischerweise an Position Ser129 phosphoryliert vor (Fujiwara et al. 2002), an einem Drosophilamodell für PD konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung essentiell für die Neurotoxizität des Proteins ist (Chen und Feany 2005). In einem Rattenmodell für PD hingegen, wurde gegenteilig beobachtet, dass die Inhibition der Phosphorylierung neurotoxisch sein kann (Azeredo da Silveira et al. 2009). Zu einem kleineren Anteil liegt α -Synuklein in *Lewy-bodies* auch als C-terminal gekürzte Variante vor (Baba et al. 1998), was mit einem erhöhten Aggregationspotenzial assoziiert ist (Hoyer et al. 2004). Darüber hinaus wird die Ubiquitinierung von α -Synuklein beschrieben, diese findet aber eher in der N-terminalen Domäne statt (Nonaka et al. 2005). Die Studienlage

zum Einfluss dieser Modifikation auf die Neurotoxizität ist uneinheitlich (Oueslati et al. 2010).

β -Synuklein verfügt über eine 134 Aminosäuren umfassende Sequenz und zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie α -Synuklein (Lavedan et al. 1998). γ -Synuklein hingegen wird vor allem im peripheren Nervensystem in sensorischen Neuronen und Motoneuronen sowie in den Spinalganglien nachgewiesen, mit Verteilung in den Zellkörpern und Axonen ohne Fokus auf die Präsynapse (Buchman et al. 1998). Strukturell besteht zwischen den drei Proteinen eine hohe Homologie (Abbildung 2), insbesondere in der N-terminalen Domäne. β - und γ -Synuklein liegen ebenfalls als nativ ungefaltete Proteine vor, können aber z. B. bei Bindung an Mizellen α -Helices ausbilden (Sung und Eliezer 2006), was die hohe Homologie zu α -Synuklein im Bereich der N-terminalen Domäne widerspiegelt (Bertoncini et al. 2007). β -Synuklein birgt einen relevanten Unterschied zu α -Synuklein im Bereich der NAC-Region, in der dem Protein 11 Aminosäuren fehlen. Dies konnte bei *in vitro*-Untersuchungen zum Vergleich von α - und β -Synuklein mit einem verringerten Aggregationspotenzial in Zusammenhang gebracht werden (Giasson et al. 2001; Uversky et al. 2002). Mit einer höheren Anzahl an Prolinen in der C-terminalen Domäne wurde für β -Synuklein im Vergleich zu α -Synuklein die Ausbildung von Polyprolin2-Helices beobachtet, die Protein-Protein-Interaktionen begünstigen (Cubellis et al. 2005; Bertoncini et al. 2007). Die Interaktionen zwischen C-terminaler Domäne und NAC-Region fehlen bei β -Synuklein (Bertoncini et al. 2007). γ -Synuklein zeigt die größten Unterschiede zu den anderen beiden Synukleinen im Bereich der C-terminalen Domäne, hier fehlen dem Protein 19 Aminosäuren. Die NAC-Region von γ -Synuklein ähnelt hingegen α -Synuklein und auch für γ -Synuklein wurde bei *in vitro*-Untersuchungen ein Aggregationspotenzial mit Ausbildung von β -Faltblattstrukturen beobachtet (Uversky et al. 2002).

1.2.2 Synuklein-Mutanten

Familiär vererbte α -Synuklein Mutationen liegen zwar nur einem kleinen Anteil der PD zugrunde, haben aber essenziell zum Verständnis der Erkrankung beigetragen. Es wurde für Duplikationen des α -Synuklein Genlocus ein Phänotyp mit späterem Manifestationsalter und langsam progressivem Verlauf beschrieben, der dem der idiopathischen PD ähnelt (Chartier-Harlin et al. 2004). Bei Triplikationen des α -Synuklein Genlocus hingegen treten die Symptome deutlich früher auf, das mittlere Erkrankungsalter wird mit 34 Jahren angegeben, der Krankheitsverlauf ist schneller progressiv und es wird über stärker ausgeprägte nicht-motorische Symptome wie Demenz oder Depression berichtet (Singleton et al. 2003; Olgiati et al. 2015). Dass die pathologischen Mechanismen bei Entstehung der PD abhängig von der Menge des vorliegenden α -Synukleins sind, gilt vor dem Hintergrund dieser Mutationen als gesichert.

Darüber hinaus besteht eine Reihe von Punktmutation in der N-terminalen Domäne, die mit dem familiären Auftreten von PD in Zusammenhang stehen:

Bei der A53T-Mutation wird die Base Alanin an Position 53 mit Threonin ausgetauscht. Diese Mutation wird autosomal-dominant vererbt und führt bei den Betroffenen zu einer im Schnitt ca. zehn Jahre früheren Manifestation der Symptome gegenüber der idiopathischen PD (Polymeropoulos et al. 1997; Papapetropoulos et al. 2001). Darüber hinaus scheint es aber eine hohe Heterogenität in Hinblick auf klinische Manifestation und das histopathologische Ausmaß der α -Synuklein-Pathologie zwischen verschiedenen Patienten mit nachgewiesener A53T-Mutation zu geben (Markopoulou et al. 2008).

Auch die A30P-Mutation wird autosomal-dominant vererbt (Krüger et al. 1998). Sie scheint vom Erkrankungsalter und vom klinischen Verlauf der idiopathischen PD zu entsprechen (Krüger et al. 2001). Die *Post-mortem*-Untersuchung eines Patienten zeigte aber eine ausge dehntere α -Synuklein-Pathologie als typischerweise für die idiopathische PD beschrieben wird (Seidel et al. 2010).

Sowohl die A53T- als auch die A30P-Mutation zeigen im Vergleich zum WT- α -Synuklein (Wildtyp- α -Synuklein) eine schnellere Oligomerisation mit Entstehung von protofibrillären Strukturen (Conway et al. 2000), was durch Bildung ringartiger Strukturen und Permeabilisierung von Membranen mit einer erhöhten Neurotoxizität in Zusammenhang gebracht wird (Lashuel et al. 2002; Volles und Lansbury 2002).

In den letzten Jahren wurden einige weitere Mutationen im SNCA-Gen nachgewiesen, die mit der Entwicklung von PD einhergehen, darunter E46K, H50Q, A18T, A29S, A53E und G51D (Zarranz et al. 2004; Appel-Cresswell et al. 2013; Lesage et al. 2013; Fujioka et al. 2014; Picillo et al. 2018; Boyer et al. 2020). Auch wenn diverse Unterschiede in Bezug auf klinisches Erscheinungsbild, Aggregationsverhalten und Neurotoxizität zwischen den einzelnen Mutationen bestehen, überschneiden sie sich alle in der Entwicklung eines Parkinson-assoziierten Krankheitsbildes und unterstützen so die Hypothese, dass α -Synuklein eine entscheidende Rolle bei der PD spielt. Nichtsdestotrotz muss berücksichtigt werden, dass Mutationen in verschiedenen anderen Genen, wie vor allem von der LRRK2 (Leucinreichen-Repeat-Serin-/Threoninkinase 2), Parkin, Pink 1 und der Glucozerebrosidase zusammen zu einem größeren Anteil der familiären Parkinson-Erkrankungen beitragen (Poulopoulos et al. 2012).

Darüber hinaus wurden zur Untersuchung spezieller Fragestellungen verschiedene synthetische α -Synuklein-Mutanten kreiert, von denen die A56P- und die Triple-Prolin-Mutante (TP) besonders zu nennen sind. Bei diesen wurde das in der A30P-Mutation ausgetauschte Prolin zu Position 56 (A56P) bzw. zu den Positionen 30, 56 und 76 (A30P/A56P/A76P, Triple-Prolin) transferiert und damit in den β -Faltblatt-reichen Kern der α -Synuklein Fibrillen. Dadurch wird die Bildung von Fibrillen inhibiert und die Mutanten bilden vermehrt lösliche Oligomere. Sie können so zu vergleichenden Untersuchungen von fibrillären und präfibrillären α -Synuklein Varianten dienen (Karpinar et al. 2009).

Für β -Synuklein sind zwei Punktmutationen bekannt (V70M und P123H), die bei Patienten mit DLB nachgewiesen wurden (Ohtake et al. 2004). Die P123H-Mutation liegt in der C-

terminalen Domäne von β -Synuklein. Untersuchungen haben gezeigt, dass es hier zu Konformationsveränderungen kommt, die dazu führen, dass bei Ko-Inkubation von α -Synuklein und der P123H- β -Synuklein-Mutante die Fibrillenbildung von α -Synuklein beschleunigt wird (Janowska und Baum 2016). In-vitro-Untersuchungen zeigten für die beiden Mutanten ein verändertes Membranbindungs-Potenzial gegenüber WT- β -Synuklein und unter bestimmten experimentellen Bedingungen eine schnellere Fibrillenbildung (Sharma et al. 2020).

Für γ -Synuklein wurden bisher zwar keine krankheitsassoziierten Mutationen beschrieben, es besteht aber ein Polymorphismus im nicht kodierenden Bereich des *SNCG*-Gens, der mit der Entwicklung von DLB assoziiert wird (Nishioka et al. 2010).

1.2.3 Funktion der Synuklein-Proteine

Obwohl zur Investigation der natürlichen Funktion der Synuklein-Proteine zahlreiche Untersuchungen durchgeführt und einzelne Aspekte bestätigt werden konnten, ist ihr physiologisches Wirken noch nicht im Detail verstanden.

Aufgrund von Ähnlichkeiten der N-terminalen Domäne der Synukleine zu den 14-3-3-Proteinen, einer Gruppe von ubiquitär exprimierten Chaperonen, wird für die Synukleine eine Chaperon-artige Funktion vermutet (Ostrerova et al. 1999). *In vitro*-Untersuchungen konnten zeigen, dass jedes Mitglied der Synuklein Familie in der Lage ist, die Aggregation von denaturiertem ADH (Antidiuretisches Hormon) und Insulin zu reduzieren. Diese Funktion ist abhängig von der C-terminalen Domäne (Souza et al. 2000). Andere Arbeitsgruppen sehen vor allem in β -Synuklein ein Chaperon: Bei Untersuchungen zur Interaktion zwischen α - und β -Synuklein konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von β -Synuklein die Aggregation von α -Synuklein sowie die Bildung ringförmiger Oligomere reduziert wird (Tsigelny et al. 2007).

Die Beobachtung, dass in Doppel-*knockout*(KO)-Mäusen für zwei der Synukleine, jeweils das noch exprimierte Protein vermehrt exprimiert wird, spricht für eine gewisse Redundanz in ihrer Funktion oder ihre Beteiligung an einem gemeinsamen Regulationsmechanismus (Chandra et al. 2004; Robertson et al. 2004).

Studien an α -Synuklein KO-Mäusen zeigen insgesamt einen milden Phänotyp mit lebensfähigen Tieren ohne pathologische, strukturelle Veränderungen des ZNS (Abeliovich et al. 2000; Cabin et al. 2002). Teilweise konnte eine Reduktion der synaptischen Vesikel im Reserve- oder Ruhepool mit verlangsamer Auffüllung des Vesikelpools nach Stimulation beobachtet werden (Cabin et al. 2002). In einem α -Synuklein-KO-Modell und in einem Doppel-KO für sowohl α - als auch β -Synuklein zeigte sich ein verringerter Dopamin-Spiegel im *Striatum* (Abeliovich et al. 2000; Chandra et al. 2004), sodass eine Beeinflussung der Dopaminsynthese nahe liegt.

Im Gegensatz zu den KO-Modellen wurde an α -Synuklein-*Knockdown*-Modellen in Zellkultur-Experimenten und im Mausmodell, in denen die Expression des Proteins durch Einbringung von spezifischen *small-interfering-RNA* (siRNA, kleine eingreifende Ribonukleinsäure)

gehemmt wurde, ein deutlicher Neuronenuntergang beobachtet (Liu et al. 2008; Gorbatyuk et al. 2010).

α -Synuklein wird eine negative regulatorische Wirkung auf die Dopamin-Synthese zugeschrieben. In Zellkultur-Untersuchungen konnte eine Überexpression von α -Synuklein mit einer verringerten Dopamin-Synthese durch Inhibition der Tyrosinhydroxylase (TH)-Aktivität, einem essentiell an der Dopaminsynthese beteiligten Protein, gezeigt werden (Perez et al. 2002). Konkordant dazu war in einem α -Synuklein-*knockdown*-Mausmodell der Dopaminspiegel erhöht und die TH-Aktivität gesteigert (Liu et al. 2008). Darüber hinaus wurde eine Beeinflussung des Dopamin-Transporters (DAT) durch α -Synuklein beschrieben (Butler et al. 2015).

Aufgrund des überwiegenden Vorliegens von α -Synuklein in der Präsynapse wurden verschiedene Funktionen im Zusammenhang mit synaptischen Vesikeln und Endo- oder Exozytose von Neurotransmittern vorgeschlagen: Burré et al. beschreiben auf Basis von *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen eine supportive Wirkung von α -Synuklein auf den Aufbau des SNARE-Komplexes (Burré et al. 2010). Anhand eines α - β - γ -Dreifach-KO-Modells konnten Vargas et al. eine reduzierte Transmitter-Endozytose nach repetitiver Stimulation von Hippocampus-Neuronen in Hirnschnitten zeigen: Demnach sind die Synukleine an der Clathrin-vermittelten Neurotransmitter-Endozytose im Bereich der präsynaptischen Membran beteiligt (Vargas et al. 2014). Das Endozytose-Defizit im Dreifach-KO-Modell ließ sich aber durch Expression eines jeden der drei Synukleine beheben (Vargas et al. 2014).

Mithilfe von Zellkultur-Untersuchungen an HeLa-Zellen (Zervixkarzinom-Zellen) konnte eine Rolle für α -Synuklein in der Stabilisierung der Interaktion zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien identifiziert werden, womit eine Regulation der Kalzium-Hämostase in Mitochondrien einhergeht (Cali et al. 2012). Auch eine regulatorische Wirkung auf die ATP-Synthase und damit auf den Energiehaushalt der Zelle konnte in einem Dreifach-KO-Modell nachgewiesen werden (Ludtmann et al. 2016).

In umfangreichen Zellkultur-Untersuchungen konnten Pinho et al. eine Lokalisation von α -Synuklein vor allem in phosphorylierter Form (PSer129- α -Synuklein) im Zellkern nachweisen. Durch Interaktion mit der DNA (*desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonucleinsäure) führte α -Synuklein in diesen Untersuchungen zu Transkriptionsveränderungen und zur Herunterregulierung verschiedener Gene (Pinho et al. 2019). Andere Untersuchungen bestätigten das Vorliegen von α -Synuklein im Zellkern und identifizierten eine Funktion des Proteins in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Schaser et al. 2019).

Die Zugabe von β - oder γ -Synuklein zu α -Synuklein konnte in verschiedenen Untersuchungen die Aggregation von α -Synuklein reduzieren (Uversky et al. 2002; Jain et al. 2018). Neben dieser inhibitorischen Wirkung auf die Aggregation von α -Synuklein *in vitro*, aber auch *in vivo* (Hashimoto et al. 2001; Uversky et al. 2002; Jain et al. 2018), wurde für β -Synuklein eine negative regulatorische Funktion auf die Expression von α -Synuklein (Wright et al. 2013)

und die durch α -Synuklein induzierte Hemmung des 26S-Proteasoms beschrieben (Snyder et al. 2005).

1.2.4 Neurotoxische Mechanismen im Zusammenhang mit den Synukleinen

Neben der überwiegenden monomeren Form von α -Synuklein wurde in verschiedenen experimentellen Konstellationen z. B. bei pH-Veränderungen oder Überexpression eine Oligomerisation beobachtet: Über Dimere und verschiedene Zwischenstadien entstehen Oligomere, die eine β -Faltblattstruktur einnehmen und Proteinase-K-resistent sind (Tsigelny et al. 2007; Cremades et al. 2012). Darüber hinaus werden ringförmige Oligomere beschrieben, die durch eine Integration in die Zellmembran die Zellpermeabilität erhöhen könnten (Lashuel et al. 2002). Aus Oligomeren entstehen unverzweigte, langkettige α -Synuklein-Fibrillen, die reich an paralleler β -Faltblattstruktur sind und mittels Thioflavin T angefärbt werden können (Celej et al. 2012). Diese Fibrillen können wieder dissoziieren und unterschiedliche Oligomere bilden (Tsigelny et al. 2007).

Je nach experimentellen Bedingungen können Konformationen mit unterschiedlichen strukturellen Charakteristika entstehen z. B. fibrilläre Stadien mit unterschiedlichen Eigenschaften. Man spricht von α -Synuklein-*strains* (Lau et al. 2020). Verschiedene *strains* können in Hinblick auf ihr Aggregationsverhalten, ihre Proteinase-Resistenz, ihre klinische Manifestation, ihre Neurotoxizität, die Art und Lokalisation der von der Aggregation betroffenen Zellen und der Ausbreitung der Pathologie in andere Zellen (*seeding*-Verhalten) differieren (Peelaerts et al. 2015; Lau et al. 2020). Durch verschiedene α -Synuklein-*strains* wird auch die klinische und histopathologische Heterogenität der verschiedenen Synukleinopathien erklärt (Perren et al. 2020). Außerdem könnte das Vorliegen verschiedener α -Synuklein-*strains* zu den teils stark divergierenden Ergebnissen unterschiedlicher experimenteller Untersuchungen beitragen.

In LB liegt α -Synuklein in fibrillärer Form vor (Wakabayashi et al. 2013). Die Beobachtung in einem Mausmodell für PD, dass LB-beinhaltende Neurone im Verlauf selektiv untergehen, spricht für α -Synuklein-Fibrillen als neurotoxische Form des Proteins (Osterberg et al. 2015). Histopathologische Untersuchungen an Gehirnen von PD-Patienten unterstützen diese Ansicht (Greffard et al. 2010). Auch Untersuchungen an synthetischen α -Synuklein-Mutanten mit deutlich verringertem Potenzial fibrilläre Strukturen zu bilden, zeigen, dass nur diejenigen Varianten des Proteins, die in der Lage sind Fibrillen auszubilden, im Mausmodell einen über die Zeit progredienten Zelluntergang verursachen können (Taschenberger et al. 2012).

Demgegenüber stehen Untersuchungen, die α -Synuklein-Oligomere und -Protofibrillen als toxische Spezies sehen und die Ablagerung in fibrillärer Form in LB eher als protektive Maßnahme. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die beiden familiären α -Synuklein-Mutanten A30P und A53T schneller oligomerisieren, aber nicht schneller Fibrillen bilden als WT- α -

Synuklein (Conway et al. 2000). In einem Drosophilamodell für PD stand die Einschlusskörper-Bildung im Zusammenhang mit vermehrtem Zellüberleben, ohne dass eine vermehrte Neurotoxizität beobachtet wurde (Chen und Feany 2005). Im Rahmen von *in vivo*-Untersuchungen in Drosophila und im Fadenwurm (Karpinar et al. 2009) als auch im Rattenmodell (Winner et al. 2011) wurde das neurodegenerative Potenzial der synthetischen α -Synuklein-Mutanten, mit reduziertem Potenzial Fibrillen zu bilden, mit dem der WT- α -Synuklein und den familiären Mutationen mit hohem Fibrillisationspotenzial verglichen. Dabei zeigte sich für die synthetischen Mutanten ein höherer Anteil oligomerer Formen und damit assoziiert eine stärker ausgeprägte Neurodegeneration im Tiermodell.

Auch wenn unterschiedliche experimentelle Bedingungen einem Teil der divergierenden Ergebnisse zugrunde liegen, könnte die Theorie, dass nicht eine bestimmte Form von α -Synuklein, sondern der Prozess der Entstehung fibrillärer Formen die Grundlage der Neurotoxizität darstellt, die verschiedenen Studien miteinander in Einklang bringen (Roberts und Brown 2015).

γ -Synuklein zeigt *in vitro*, ähnlich wie α -Synuklein, unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wie Überexpression, pH- oder Temperaturveränderungen das Potenzial zu oligomerisieren und Fibrillen zu bilden (Golebiewska et al. 2014; Jain et al. 2018). In oxidiert Form, die *in vitro* durch Zugabe von Dopamin erreicht werden kann, führte γ -Synuklein auch zu einer verstärkten Fibrillenbildung von α -Synuklein (Surgucheva et al. 2012). Dass die Aggregation von γ -Synuklein selbst zu einem Neuronenuntergang und zu klinischen Symptomen führen kann, konnte in transgenen Mäusen mit Überexpression von γ -Synuklein gezeigt werden (Ninkina et al. 2009).

Unter physiologischen Bedingungen neigt β -Synuklein nicht zur Aggregation; lange wurde eine neuroprotektive Wirkung angenommen. Neuere Untersuchungen zeigen für β -Synuklein aber bei leicht saurem pH-Wert ein mit α -Synuklein vergleichbares Potenzial Fibrillen zu bilden (Moriarty et al. 2017; Jain et al. 2018). Im Rattenmodell konnte bei Überexpression von β -Synuklein die Bildung von PK (Proteinase K)-resistenten Aggregaten sowie ein relevanter Neuronenuntergang beobachtet werden (Taschenberger et al. 2013).

Neben der Frage, in welcher Form α -Synuklein toxisch für die Neuronen ist, werden die primären Angriffspunkte der durch α -Synuklein induzierten Neurodegeneration in der Zelle diskutiert.

Die Beobachtung, dass die Projektionsneurone der *Substantia nigra* mit ihren langen, verzweigten und wenig oder nicht-myelinisierten Axonen besonders vulnerabel für die Aggregation von α -Synuklein sind (Braak und Del Tredici 2004), gemeinsam mit dem Nachweis ausgedehnter α -Synuklein-Aggregation in Axonen und in der Präsynapse (Duda et al. 2002), legen eine Beeinträchtigung der synaptischen Funktion bei der PD nahe (Calo et al. 2016). Sowohl im Tiermodell (Decressac et al. 2012) als auch bei PD-Patienten (Cheng et al. 2010) geht dem Untergang von Neuronen der Verlust striataler dopaminerger Projektionsfasern voraus, einhergehend mit Zeichen axonaler Schädigung (Caminiti et al. 2017). Als mögliche

Pathomechanismen für den axonalen Schaden werden eine Beeinträchtigung der Neurotransmitter-Freisetzung und des Neurotransmitter-Transports diskutiert (Calo et al. 2016).

Auch eine Veränderung der Mitochondrien-Morphologie durch α -Synuklein-Überexpression wurde beobachtet (Nakamura et al. 2011; Ordonez et al. 2018). In einzelnen Untersuchungen wurde zudem eine reduzierte Aktivität von Komplex I der Atmungskette mit mitochondrialen Funktionseinschränkungen nachgewiesen (Devi et al. 2008; Chinta et al. 2010).

In verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnte bei stark vermehrter Dopamin-Synthese eine neurotoxische Wirkung beobachtet werden (Fahn 1997; Burke et al. 2003). Dopamin-Metabolite wie DOPAL (3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd) konnten schon in gering erhöhter Konzentration eine Neurodegeneration im Rattenmodell induzieren (Burke et al. 2003). Reaktive Dopamin-Metabolite werden mit der Bildung von SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumlaurylsulfat)-resistenten α -Synuklein-Oligomeren in Zusammenhang gebracht (Pham et al. 2009). Da α -Synuklein eine regulatorische Wirkung auf die DAT-Aktivität zugeschrieben wird (Butler et al. 2015), kann eine synergistische Wirkung von α -Synuklein und Dopamin vermutet werden (Alvarez-Fischer et al. 2008; Mor et al. 2017). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass auch das neurodegenerative Potenzial von β -Synuklein eng mit Dopamin assoziiert ist (Raina et al. 2020).

Des Weiteren konnten in unterschiedlichen Untersuchungen weitere Angriffspunkte für die durch α -Synuklein induzierte Neurotoxizität nachgewiesen werden: Eine Beeinträchtigung der Proteasomen-Aktivität und damit auch des eigenen Abbaus wurde für α -Synuklein beschrieben (Emmanouilidou et al. 2010; McKinnon et al. 2020). Auch eine Resistenz gegenüber dem Abbau durch das Autophagie-Lysosomen-System ist bekannt (Tanik et al. 2013). Darüber hinaus wird eine inhibitorische Wirkung auf den ER (Endoplasmatisches Retikulum)-zu-Golgi-Transport beschrieben (Thayanidhi et al. 2010). Es bestehen Hinweise auf eine Interaktion mit Lipiden als Ausgangspunkt für die Aggregation von α -Synuklein (Suzuki et al. 2018). Außerdem kann α -Synuklein nach Exozytose als Alarmin fungieren und in oligomerer Form Mikroglia aktivieren. Es folgt die Produktion proinflammatorischer Zytokine mit daraus resultierendem oxidativem Stress (Béraud et al. 2013).

Neben dieser Annahme einer neurotoxischen gegenüber der physiologischen Funktion (*gain-of-function*) von α -Synuklein, gibt es auch Argumente für einen *loss-of-function*, also einen Verlust der natürlichen Funktion von α -Synuklein in der Zelle, als Ursache für die Neurodegeneration. Sowohl im Mausmodell, als auch bei einer kleinen Untersuchung an Primaten konnte durch α -Synuklein-*knockdown* ein Neuronenuntergang und ein Verlust dopaminerger Projektionen zum *Striatum* beobachtet werden (Gorbatyuk et al. 2010; Collier et al. 2016). Ursachen dieses Funktionsverlustes könnten unter anderem eine Umverteilung des Proteins in andere Kompartimente der Zelle, Strukturveränderungen und Aggregation des Proteins in funktionsunfähige Konformationen sein (Collier et al. 2016).

Auch wenn bisher keine direkte pathologische Funktion von γ -Synuklein bei neurologischen Erkrankungen belegt ist, scheint das Protein in die Pathologie von malignen Mamma- und

Ovarialtumoren involviert zu sein. In invasiven Brustkrebszellen wurde eine vermehrte Synthese des Proteins nachgewiesen und bei Überexpression in einem Mausmodell für Mammakarzinome wurde eine vermehrte und ausgedehntere Metastasierung beobachtet (Jia et al. 1999). In einem Zellkulturmodell konnte γ -Synuklein über die selektive Interaktion mit bestimmten Kinasen das Überleben von Krebszellen verlängern und eine Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika induzieren (Pan et al. 2002). Auch in anderen Tumorgeweben, u. a. in kolorektalen Karzinomen und Blasen Tumoren, wurde eine verstärkte Synthese von γ -Synuklein nachgewiesen .

1.3 Adeno-assoziierte Viren als Gentransfervehikel

Bei Adeno-assoziierten Viren handelt es sich um Parvoviren mit einer Genomlänge von 4,7 kb. Sie sind einzelsträngige DNA-Viren und werden zu den Dependoviren gezählt, da ihre Replikation von einer Ko-Infektion mit einem anderen Virus abhängig ist (Berns und Linden 1995). Die Infektion mit AAV hat keinen Krankheitswert; es wird über eine hohe Durchseuchung der Bevölkerung mit bis zu 80 % Seropositivität für AAV-Serotyp 2 berichtet (Gonçalves 2005).

Das AAV-Genom besteht aus zwei Genen, dem *CAP*-Gen, das für drei Kapsidproteine kodiert, und dem *REP*-Gen, das für vier replikationsrelevante Proteine kodiert. Diese beiden Gene werden von *Inverted Terminal Repeats (ITR, invertierte terminale Sequenzwiederholungen)* umgeben, die eine T-förmige Sekundärstruktur bilden (Gonçalves 2005). Für die Herstellung rekombinanter AAV werden die Wildtyp-AAV-Gene *REP* und *CAP* entfernt und durch ein Transgen mit Promotor ersetzt (Ortolano et al. 2012). AAV infizieren sich teilende, aber auch ruhende Zellen wie Neurone *in vivo* und *in vitro* (Wu et al. 1998). Unterschiedliche AAV-Serotypen zeigen einen unterschiedlichen Zelltropismus. Darüber hinaus kann durch die Auswahl des Promotors die Expression in bestimmten Zelltypen bestimmt werden (Shevtsova et al. 2005). Nach Infektion liegen AAV im Zellkern meist als stabile Episomen extrachromosomal vor, können aber auch in die Wirtszell-DNA integriert werden (Russell 2003).

Auf Basis von rekombinanten AAV mit Überexpression von α -Synuklein konnten verschiedene, überzeugende Zellkultur- und Tiermodelle für PD entwickelt werden (Decressac et al. 2012; Taschenberger et al. 2012), die gegenüber anderen Modellen für PD neben der Entwicklung einer LB-Pathologie und motorischer Symptome auch den Verlust dopaminerger Neurone in der SN induzieren. Durch rekombinante AAV kann innerhalb von wenigen Tagen eine relevante Überexpression und damit eine Proteinakkumulation erreicht werden, zudem ist die Anwendung unabhängig vom Alter der Versuchstiere möglich und scheint besser als andere PD-Modelle auf den Menschen übertragbar zu sein (Volpicelli-Daley et al. 2016). Auch zur Entwicklung von Gentherapien für neurodegenerative Erkrankungen sind AAV-basierte Vektoren aktuell in präklinischen und klinischen Studien im Einsatz (Haggerty et al. 2020).

1.4 Stabilität der Synukleine als möglicher Faktor für Neurotoxizität

Auch wenn α -Synuklein lange als einziges Synuklein-Protein mit der Ätiopathogenese von PD, DLB und MSA in Zusammenhang gebracht wurde, häufen sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass auch β - und γ -Synuklein ein Aggregationspotenzial besitzen und in experimentellen Untersuchungen zu Neurodegeneration führen können. In einzelnen Untersuchungen wurden die Synukleine in Hinblick auf ihre Funktion als redundant angesehen. Trotzdem sind β - und γ -Synuklein nicht in LB von Patienten mit PD nachweisbar und die Datenlage zu ihrem neurotoxischen Potenzial ist begrenzt. Vor dem Hintergrund der hohen Homologie zwischen den drei Proteinen, ist nicht abschließend geklärt, wieso vor allem α -Synuklein im Menschen bei der PD als Treiber der Neurodegeneration auftritt.

Ein entscheidender Faktor für sowohl Aggregation als auch Neurotoxizität der Synuklein-Proteine ist die Proteinkonzentration. Dafür spricht insbesondere die frühere Manifestation der PD-Symptomatik bei Patienten mit Duplikation und v. a. Triplikation des SNCA-Gens. Auch die Tatsache, dass diverse Tiermodelle der PD auf einer Überexpression des SNCA-Gens basieren und damit nicht nur die Synuklein-Pathologie sondern auch klinische Veränderungen induzieren, untermauert die Relevanz der Proteinkonzentration. Familiäre Mutationen im SNCA-Gen sind mit einem erhöhten Aggregationspotenzial assoziiert, dies bewirkt eine Proteinakkumulation in der Zelle und auch hier sehen wir teilweise eine verstärkte oder früher eintretende PD-Symptomatik. Und auch wenn die Datenlage diesbezüglich nicht einheitlich ist, korreliert in einigen Untersuchungen die Ausprägung der Synuklein-Pathologie mit dem klinischen Erscheinungsbild.

Die für die entsprechende Zelle angemessene Konzentration an Synukleinen wird durch ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Proteine gewährleistet. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass veränderte Abbaumechanismen von α -Synuklein in der Zelle mit zur Akkumulation und Neurotoxizität des Proteins beitragen (Cuervo et al. 2004; Tanik et al. 2013). Eine direkte Interaktion mit den Degradationsmechanismen der Zelle wurde für α - und γ -Synuklein bestätigt, aber auch β -Synuklein hat indirekt durch Bindung an α -Synuklein einen Einfluss auf den proteasomalen Abbau von Zellbestandteilen (Snyder et al. 2005).

Es ist also denkbar, dass Unterschiede in der Stabilität der verschiedenen Synukleine in der Zelle, die über verschiedene Mechanismen erreicht werden könnten, ein entscheidender Faktor für die Aggregation und Neurodegeneration sein könnten. Ziel dieser Arbeit ist es, die Degradationskinetik der drei Proteine in einem Zellkulturmodell direkt miteinander zu vergleichen, um mögliche Stabilitätsunterschiede zu differenzieren. Dazu werden embryonale Kortexneurone der Ratte in Zellkultur mit einem Synuklein-enthaltenden AAV-Vektor transduziert, es kommt dann zur Proteinbiosynthese und Akkumulation des entsprechenden Synukleins in den Zellen. Durch Implementierung eines Tet-Off-Doxy-Systems kann die Proteinbiosynthese dann an einem definierten Zeitpunkt beendet werden und anschließend

die Proteindegradation beobachtet werden. Im Anschluss wird die Rest-Proteinkonzentration an bestimmten Zeitpunkten mittels Western-Blot aus den Zell-Lysaten bestimmt und zwischen den verschiedenen Synuklein-Proteinen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Biophotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Chemilumineszenz-Dokumentationssystem, Chemi Doc XRS+	Bio-Rad (München, Deutschland)
Eismaschine	Zigra (Isernhagen, Deutschland)
Elektroporationssystem, Gene Pulser II	Bio-Rad (München, Deutschland)
Gel-Dokumentationssystem, 2000TM UV Transilluminator	Bio-Rad (München, Deutschland)
Gelkassetten	Bio-Rad (München, Deutschland)
Inkubator, Heracell	Unity Lab Services, Teil von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mini Trans-Blot	Bio-Rad (München, Deutschland)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad (München, Deutschland)
Netzteil, E835 (<i>power supply</i>)	Consort (Turnhout, Belgien)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rollenmixer (<i>roller mixer</i>)	Stuart (Staffordshire, GBR)
Spark Multimode Mikroplatten-Leser	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Sterilwerkbank, HERA safe	Unity Lab Services, Teil von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Thermoheizblock	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tiefkühlschränke, -20°C	Liebherr-International GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Ultraschall Homogenisator, UW 2070	Bandelin electronic (Berlin, Deutschland)
Vortex-Mixer	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Wasserbad	Lauda-GFL (Burgwedel, Deutschland)
Wippe (<i>multi-functional orbital shaker</i>)	Grant Instruments (Cambridge, GBR)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

24- <i>well</i> sterile Zellkulturplatten	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
50 ml Röhrchen	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
96- <i>well</i> Mikrotiterplatten	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Mikrodialyse-Membranen	Millipore (Billerica, MASS, USA)
Parafilm M	Bemis NA (Neeah, WI, USA)
Pasteurpipetten	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland); Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland); Brand (Wertheim, Deutschland)
PVDF-Membranen	Merck Millipore (Cork, Irland)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Whatman Papier	GE Healthcare (Chalfon St. Gilles, GBR)

2.1.3 Kits und Assays

Tabelle 3: Kits und Assays

BCA Protein Assay Kit, Pierce	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

0,9% NaCl (Natriumchlorid)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bacto-Trypton	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
BlueJuice, Gelladepuffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Borsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
CutSmart-Puffer	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , nach Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DNAseI	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Doxycyclin	Takara Bio Europe, zuvor Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol 100%	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

FCS (<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum)	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Femto-ECL-Lösung	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Glukose	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glutaraldehyd	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
H ₂ O ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HBSS (<i>Hank's balanced salt solution</i> , Hanks balancierte Salzlösung) 10×	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Hefeextrakt	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
KCl (Kaliumchlorid)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Laminin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Glutamin	Lonza (Köln, Deutschland)
Luminol	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
NaCl (Natriumchlorid)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
NaOH (Natriumhydroxid)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat 7,5%	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
NBM (Neurobasal-Medium)	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
PageRule Prestained, <i>protein ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

PBS (<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
P-Cumarsäure	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
PLO (Poly-L-Ornithin)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Proteinaseinhibitor, pellets	Roche (Basel, Schweiz)
PSN (Penicillin, Streptomycin, Neomycin Antibiotika-Mix)	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
SDS, pellets (<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
T4-Puffer	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TE-Puffer (TRIS-EDTA-Puffer)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Transferrin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tris Base	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
TRIS-HCL	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

0,25 %ige Trypsin-Lösung	25 mg Trypsin in 10 ml CMF-Medium
4×Tris/SDS pH 6,8	0,5 M Tris base 60,5 g/l 0,4 % SDS 4 g/l

	verdünnen in destilliertem H ₂ O, pH-Wert anpassen
4×Tris/SDS pH 8,8	1,5 M Tris base 182 g/l 0,4 % SDS 4 g/l verdünnen in destilliertem H ₂ O, pH-Wert anpassen
Agarosegel 0,8 %	800 mg Agarose 100 ml TBE-Puffer 2 min bei 800 Watt in der Mikrowelle auflösen, unter laufendem Wasser abkühlen, dann 2 µl Ethidiumbromid hinzugeben und Gele gießen
Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBS-T
Boratpuffer	0,928 g 150 mM Borsäure in 100 ml destilliertem H ₂ O mit NaOH auf pH 8,3 einstellen, sterilfiltrieren
CMF-Medium (Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -freies Medium)	HBSS 1:9 in destilliertem H ₂ O mit Natriumhydrogencarbonat 7,5 % auf pH 7,5 einstellen
ECL (<i>enhanced chemiluminescence</i>) 1-Lösung	100 µl 250 mM Luminol 44 µl 90 mM p-Cumarsäure 1 ml 1 M Tris-HCl pH 8.5 8,85 ml H ₂ O
ECL (<i>enhanced chemiluminescence</i>) 2-Lösung	6 µg 30 % H ₂ O ₂ 1 ml 1 M Tris pH 8.5 9 ml H ₂ O
Elektrophorese-Puffer, 10×	30,24 g 250 mM Tris Base 142,5 g 1,9 M Glycin

	20 % Methanol mit 1 l H ₂ O auffüllen
Fixierlösung	4 % PFA 0,1 % Glutaraldehyd in PBS
HCN-Medium	5 µg/ml Transferrin PSN (Penicillin 50 µg/ml, Streptomycin 50 µg/ml, Neomycin 100 µg/ml) 2 mM L-Glutamin 2 % B-27 ergänzen in Neurobasal Medium (NBM)
Lyse-Puffer	850 µl steriles H ₂ O 50 µl 1 M Tris pH 8,0 50 µl 10 % SDS 10 µl 100 mM DTT 40 µl Proteinaseinhibitor
Poly-L-Ornithin-Lösung 10×	50 mg PLO 50 ml Boratpuffer
Sammelgel, SDS-Page (für ein 1,5 mm Gel)	433 µl Acrylamid 30 % 833 µl 4×Tris/SDS pH 6,8 2,03 ml H ₂ O 16,7 µl 10 % APS 33,3 µl TEMED
SDS-Ladepuffer, 6×	350 mM Tris-HCl pH 6.8 10 % SDS 0.6 M DTT 30 % Glycerin 0,03 % Bromphenolblau
SOC-Nährmedium	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt

	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	10 mM NaCl
	20 mM Glukose
	pH auf 7,0 anpassen
TBS-T (<i>tris-buffered saline with tween</i> , Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween), 10×	24,2 g 20 mM Tris Base
	90 g NaCl
	0,1 % Tween 20
	mit destilliertem H ₂ O auf 1 l auffüllen, pH auf 7,6 anpassen
Transfer-Puffer, 1×	192 mM Glycine
	25 mM Tris-HCl
	20 % Methanol
	mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Trenngel, SDS-Page, 12 % (für ein 1,5 mm Gel)	4 ml Acrylamid 30 %
	2,5 ml 4× Tris/SDS pH 8,8
	3,5 ml H ₂ O
	35 µl APS 10 %
	7 µl TEMED

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Primärantikörper

Antikörper	Klonalität	Spezies	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung
Anti-AU1	Mono-klonal	Maus	MSS-130R-500µl	HiSS Diagnostics	1:1.000
Anti-AU1	Polyklonal	Maus	MSS-130P-500µl	HiSS Diagnostics	1:1.000 – 1:500

Anti-AU1	Polyklonal	Kaninchen	3401	abcam	1:1.000
Anti-GFP	Mono-klonal	Maus	11814460001	Roche	1:100.000 – 1:5.000
Anti- β -Tubulin	Mono-klonal	Maus	T4026	Sigma	1:50.000 – 1:10.000

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung
Anti-ms-HRPO	Esel	715-035-152	Dianova	1:3.000 – 1:2.000
Anti-rb-HRPO	Esel	711-035-152	Dianova	1:3.000 – 1:2.000

2.1.7 Adeno-assoziierte virale Vektoren zur Expression der Synukleine

Die für diese Arbeit verwendeten AAV-Vektoren wurden von Dr. Sebastian Kügler zur Verfügung gestellt und nach bekanntem Schema produziert (Shevtsova et al. 2005).

Die in Abbildung 2 dargestellten viralen Vektoren stellen ein Tet-Off-Doxy-System dar: In Abwesenheit von Doxycyclin bindet der Tetracyclin-Transaktivator (tTA2), der kontrolliert durch den humanen Synapsin Promoter (hSyn) kontinuierlich synthetisiert wird, an die Tetracyclin-responsiven Elemente (TRE) der anderen Konstrukte, sodass es zur Expression der entsprechenden Synukleine und von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*, verbessertes grün fluoreszierendes Protein) kommt. Wenn Doxycyclin hinzugefügt wird, bindet es an den tTA2, was dessen Bindung an die TRE der anderen Konstrukte inhibiert, sodass die Proteinbiosynthese der eingebrachten Gene gestoppt wird. Dieses System ermöglicht es, nach einer gewissen Expressions-Zeit der Gene die Proteinsynthese zu beenden, um im Anschluss die Protein-Degradation beobachten zu können.

In vorausgegangenen Untersuchungen in unserem Labor wurde beobachtet, dass die drei verschiedenen Synukleine im Western Blot bei Darstellung durch spezifische Antikörper für α -, β -, und γ -Synuklein nur schwer vergleichbar waren, da die verschiedenen Antikörper unterschiedlich sensitiv waren. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Synukleine für diese Untersuchungen mit einem AU1-Epitop-*tag* (engl. *tag* für Markierung) ergänzt, sodass durch Nutzung des gleichen AU1-Antikörpers für alle Synukleine nun eine verbesserte Vergleichbarkeit erwartet wird. Das AU1-Epitop-*tag* besteht aus der kurzen Peptidsequenz DTYRYI und wurde aus dem Kapsid des bovinen Papillomavirus Typ 1 isoliert (Lim et al.

1990). *In vivo* und *in vitro* konnte durch Fusion des AU1-tags eine hoch spezifische und sensitive Detektion der markierten Proteine erreicht werden, ohne erkennbaren Einfluss des tags auf die Protein-Eigenschaften (Shevtsova et al. 2006).

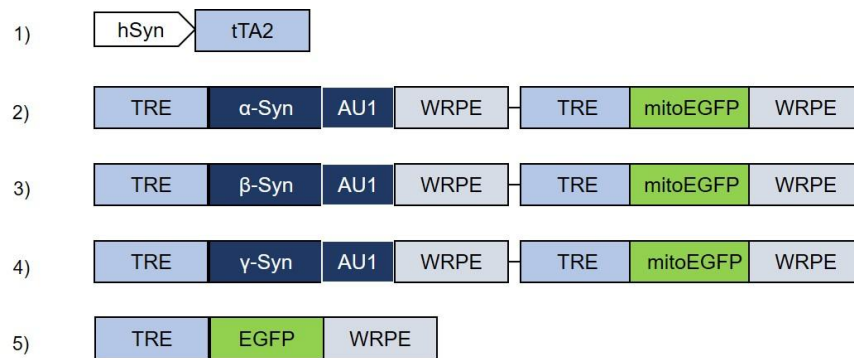


Abbildung 2: Struktur der verwendeten AAV-Vektoren. AAV6-Vektoren, die die cDNA für 1) den konstitutiv aktiven humanen Synapsin Promoter (hSYN) und den Tetracyclin-Transaktivator (tTA2), 2) - 4) das Tetracyclin-responsive Element (TRE) sowie das entsprechende Synuklein mit AU1-tag und mitoEGFP oder 5) das TRE und EGFP allein, als Standard, enthalten. Die Expression wird gesteigert durch das *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (WPPE, Woodchuck Hepatitis Virus posttranskriptionales Regulationselement).

2.1.8 Tiere und Zellreihen

Tabelle 8: Tiere und Zellreihen

NEB5α E.coli-Zellen	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
SURE® E.coli-Zellen	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
Wistar-Ratten, E18	Zentrale Tiereinheit, Universität Göttingen

2.1.9 Software

Tabelle 9: Software

Excel	Microsoft
QuantityOne 4.6.9	Bio-Rad
Spark Control Magellan 1.2	Tecan
Statistica	StatSoft Europe
Word	Microsoft

2.2 Primärzellkultur

Für die Primärzellkultur wurden embryonale Kortexneurone der Wistar-Ratte verwendet. Alle Arbeiten mit den Primärzellkulturen wurden an der Sterilwerkbank durchgeführt.

Die Kortex-Präparation wurde von Sonja Heyroth durchgeführt. Sie fand an Tag 17,5 der Embryonalentwicklung statt. Die Ratten wurden mit Kohlendioxid getötet, der Uterus entfernt und die Embryonen in eiskaltem CMF-Medium frei präpariert. Nach Dekapitation der Embryonen wurden Kortizes und Hippocampi präpariert und in CMF-Medium auf Eis gestellt. Die Hirngewebe-enthaltenden Röhrchen wurden dann für 4 min bei 800 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 1 ml Trypsin-Lösung hinzugegeben, um die Neurone zu vereinzeln. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Dann wurden 50 µl DNaseI ergänzt, die Röhrchen vorsichtig geschüttelt, für eine Minute zentrifugiert und der trypsinhaltige Überstand entsorgt. Die so entstandenen Pellets wurden mit 1 – 2 ml FCS bedeckt. Die Pellets wurden dann durch Pipettieren mit einer speziell vorbereiteten Pasteurpipette aufgelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 4 min bei 4 °C und 800 rpm, wurde der Überstand entfernt und die Pellets in HCN-Medium resuspendiert.

Die Neurone wurden in einer Dichte von 250000 Zellen pro *well* (englisch für Kavität) in 750 µl HCN(Hippocampus- und Cortex-Neuronen)-Medium auf zuvor mit Poly-L-Ornithin und Laminin beschichtete Zellkulturplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Feuchtigkeit. Das Medium wurde für die Dauer der Untersuchungen nicht ausgewechselt.

Der anschließende Versuchsablauf ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

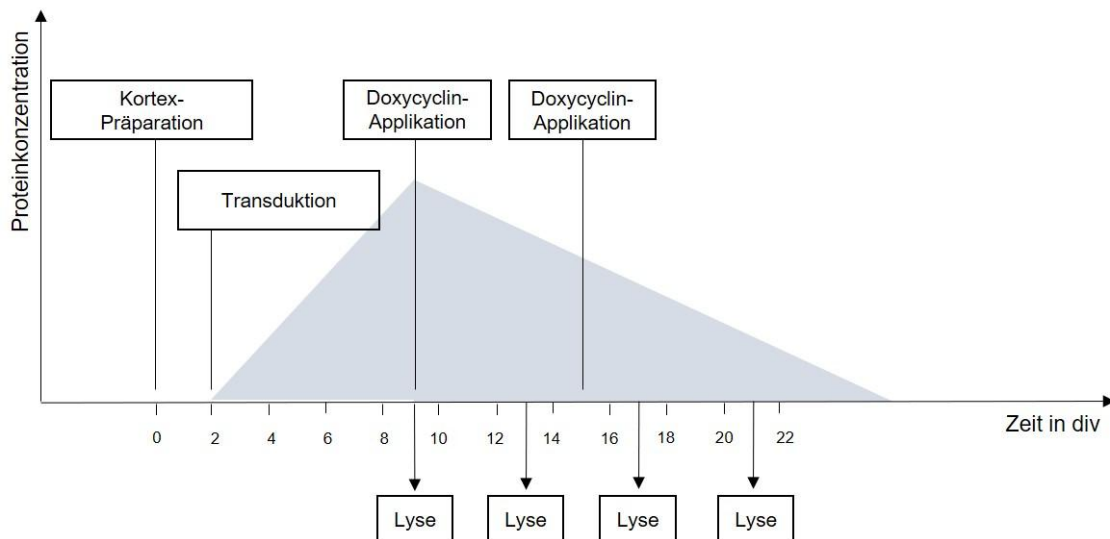


Abbildung 3: Versuchsablauf. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Transduktion der embryonalen Kortexneurone an div 2, darauf erwarteter Anstieg der Proteinkonzentration der Synukleine bis div 9. An div 9 und div 15 Doxycyclin-Zugabe: Proteinbiosynthese wird beendet und die Proteinkonzentration nimmt im Verlauf durch Proteindegradation ab. Erste Lyse an div 9, dann an div 13, div 17 und div 21.

2.2.1 Transduktion

Die Transduktion erfolgte an Tag 2 *in vitro* (*day in vitro* 2, *div* 2) jeweils mit einem der α -, β -, γ -Synuklein oder EGFP enthaltenden AAV-Vektoren in einer Konzentration von 10^8 *tu/well* und dem Transaktivator enthaltenden AAV-Vektor in einer Konzentration von 10^7 *tu/well*. Die AAV wurden in sterilem, eiskaltem PBS (*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) verdünnt, sodass 10 μ l Lösung pro *well* angewandt werden konnten. Nach Zugabe der AAV-enthaltenden Lösung wurden die Zellkulturplatten vorsichtig geschwenkt, um die gleichmäßige Verteilung der Lösung zu gewährleisten.

Um die Proteinbiosynthese zu inhibieren, wurde an *div* 9 Doxycyclin in einer Konzentration von 100 ng/ml hinzugegeben. Doxycyclin wurde lichtgeschützt in sterilem, eiskaltem PBS verdünnt und es wurden 10 μ l der Lösung pro *well* in die Zellkultur gegeben. Da in vorhergegangenen Untersuchungen in unserem Labor gesehen wurde, dass die einmalige Doxycyclin-Applikation nicht ausreicht, um einen stabilen Spiegel zu erreichen, wurde Doxycyclin im Rahmen dieser Arbeit ein zweites Mal an div 15 hinzugegeben.

2.2.2 Probenasservation (Lyse)

Die Lyse erfolgte an den folgenden vier Zeitpunkten: div 9, div 13, div 17 und div 21.

Nach orientierender mikroskopischer Kontrolle der Zellkulturplatten und Ausschluss erkennbarer Kontaminationen erfolgte die Lyse. Das Medium wurde vorsichtig aspiriert und die Platten zweimal mit 500 μ l eiskaltem PBS gespült. Nach Entfernung des PBS wurden 40 μ l Lysepuffer pro *well* hinzugegeben und die Zellen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze ausgekratzt. Die Lysate wurden in 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße transferiert und

auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte eine 30-sekündige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und eine dreimalige Sonifikation für jeweils 10 s bei Cycle 2 mit dem Ultraschall-Homogenisator, beides bei 4 °C. Die Lysate wurden dann 30 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße in Portionen von 40 – 50 µl aliquotiert und bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank bei -20 °C gelagert.

2.3 Western Blot

Um eine vergleichbare Proteinmenge im Western Blot für die verschiedenen Proben zu gewährleisten, wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben mittels BCA (*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure)-Test bestimmt. Zusammengefasst beruht das Verfahren auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , das mit BCA einen Farbkomplex ausbildet, der bei Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm sein Absorptionsmaximum hat. Die Menge des kolorimetrisch nachweisbaren Farbkomplexes ist direkt proportional zur Proteinkonzentration (Smith et al. 1985).

Für den BCA-Test wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific genutzt. Die Protein-Proben wurden auf Eis aufgetaut. Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Untersuchungen in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt und die Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. Mit BSA (Bovines Serumalbumin) als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit 0, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, und 20 µg/well hergestellt, die parallel zu den Proben getestet wurde. Die einzelnen Proben und der Standard wurden 1:10 in PBS verdünnt und davon 10 µl/well in die Mikrotiterplatte pipettiert. Jede Probe und die Standardproben wurden doppelt getestet. Durch Zugabe von 190 µl der Mischung aus Reagenz A und B wurde die Reaktion gestartet. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm verschlossen und für 35 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionmessung bei Wellenlänge 562 nm wurde mit dem Spark Multimode-Mikroplatten-Reader und der Software Spark Control Magellan 1.2 durchgeführt. Mit dem Programm Microsoft Excel wurde ein Funktionsgraph für die Standardproben mit der Absorption in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration generiert, für den das Bestimmtheitsmaß (R^2) über 0,998 liegen musste. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden dann anteilmäßig aus dem Standard-Funktionsgraphen berechnet.

2.3.1 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Mit der SDS-Page können geladene Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. Das anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladung von Proteinen, sodass die untersuchten Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung bekommen. Des Weiteren trägt das Aufkochen der Proben für 5 min bei 95 °C zur Denaturierung und Linearisierung zuvor gefalteter Proteine bei.

Die 1,5 mm dicken, zweiphasigen Polyacrylamidgele mit einem 12 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel wurden am Vortag vorbereitet und über Nacht in feuchte Tücher gewickelt im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die Gele wurden in die Elektrophorese-Kammern eingespannt und es wurde Elektrophorese-Puffer eingefüllt. Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut und in einer Proteinkonzentration von 5 – 40 µg mit PBS und 6×SDS Ladepuffer verdünnt. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütige Erhitzung bei 95 °C, dann wurden die Proben kurz bei 4 °C zentrifugiert und auf Raumtemperatur gekühlt. Die so vorbehandelten Proben wurden in die Gele geladen. Als Größenstandard wurde neben den Proben das Gel mit einem Größenstandard, PageRuler, beladen. Für die ersten 20 min wurde eine Spannung von 70 V angelegt, um das Eintreten der Proteine in das Gel zu ermöglichen. Dann wurde die Spannung auf 100 V erhöht und die Elektrophorese für etwa eine Stunde fortgesetzt, bis das Bromphenolblau des Ladepuffers das Ende des Trenngels erreichte.

2.3.2 Immunoblotting

Als nächstes folgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran. Die Bestandteile des Transfer-„Sandwiches“ wurden wie folgt aufgebaut: Kathode, Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Membran, Whatman-Papier, Schwamm, Anode. Schwämme und Whatman-Papier wurden zuvor etwa 10 min in Transferpuffer eingelegt. Die PVDF-Membranen wurden zur Aktivierung zuvor für 10 min in Methanol eingelegt. Das so aufgebaute „Sandwich“ wurde in die Mini Trans-Blot-Kammer eingehängt; die Kammer wurde mit 4 °C kaltem Transferpuffer aufgefüllt, der Transfer erfolgte bei 100 V über 1 h 15 min im Kühlraum bei 4 °C.

Nach dem Transfer wurden die Membranen für 10 min in TBS-T (*tris-buffered saline with tween*, Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween) gespült. Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren und so unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die Membranen dann für 1 h in eine milchpulverhaltigen Blockierlösung eingelegt und geschwenkt.

Die Primärantikörper gegen AU1, GFP und β -Tubulin wurden entsprechend der Herstellerempfehlung in TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt. Die Membranen wurden in 50 ml Röhrchen mit 6 ml der alle drei Antikörper enthaltenden Lösung über Nacht bei 4 °C auf dem Rollen-Mixer inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 min in TBS-T unter Schwenken gewaschen. Die Inkubation mit den an HRPO (*horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase)-gebundenen Sekundärantikörpern (Tabelle 7), die ebenfalls in TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt wurden, erfolgte 1 h lang bei Raumtemperatur mit Lichtschutz. Die Membranen wurden erneut dreimal jeweils 10 min in TBS-T gespült.

Zur Darstellung der Proteinbanden wird Luminol als Substrat der HRPO verwendet, das mit HRPO reagiert und so zur Chemilumineszenz führt. Die Luminol-enthaltende ECL1-Lösung (*enhanced chemiluminescence*-Lösung, verbesserte Chemilumineszenz-Lösung) wurde 1:1 mit der ECL2-Lösung vermischt und so auf die Membran gegeben, dass sie komplett benetzt

war. Die Chemilumineszenz-Signale wurden mit dem ChemiDocXRS+ Transilluminator (Bio-Rad) dargestellt (*Imaging*) und mit der CCD-Kamera aufgenommen. Die so generierten Bilder konnten dann mit der Software QuantityOne 4.6.9 bearbeitet werden.

2.3.3 Auswertung

Neben den Antikörpern gegen die transgen überexprimierten Proteine α -, β -, γ -Synuklein und EGFP, wurde beim Immunoblot auch ein Antikörper gegen β -Tubulin verwendet, das ein endogenes Protein des Zytoskeletts darstellt und von dem eine konstant hohe Nachweisbarkeit erwartet wird.

Für β -Tubulin wird eine Bande auf Höhe von 55 kDa erwartet, für EGFP auf Höhe von 32 kDa, für α -Synuklein mit AU1-*tag* bei etwa 19 kDa, für β -Synuklein mit AU1-*tag* bei etwa 21 kDa und für γ -Synuklein mit AU1-*tag* bei etwa 17 kDa.

Die Signalintensität der einzelnen Proteinbanden für die verschiedenen Versuchszeitpunkte (div 9, div 13, div 17, div 21) wurde jeweils anteilmäßig von dem initialen Messwert an div 9 angegeben. Ebenso wurden die Messwerte für β -Tubulin, das als Ladekontrolle diente und auf das die Synuklein- bzw. EGFP-Werte normiert wurden, jeweils anteilmäßig vom ersten Versuchszeitpunkt an div 9 angegeben. Daraus ergibt sich die in Abbildung 4 dargestellte Formel. Der erste Messzeitpunkt wird so immer als 100 % angegeben.

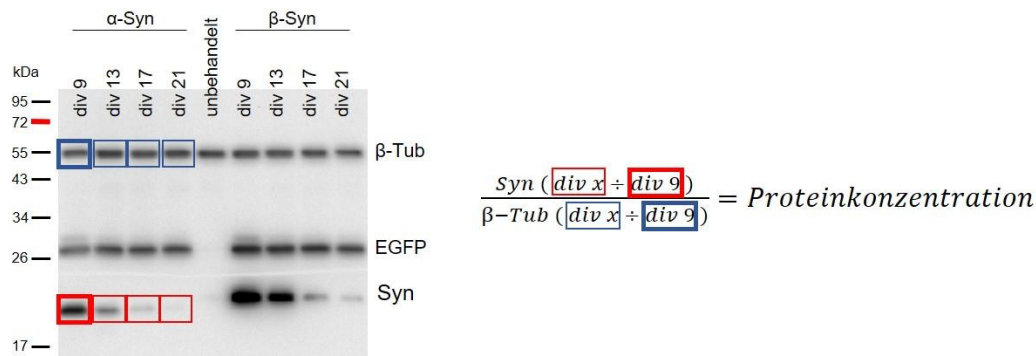


Abbildung 4: Auswertung der Western Blots. Darstellung der Auswertung der Western Blots an einem exemplarischen Blot mit Proteinproben von α - und β -Synuklein (α -Syn und β -Syn) an den vier Messzeitpunkten und dazwischen einer Probe mit unbehandelten Kortexneuronen. Die Signalintensität für α -Synuklein an den einzelnen Messzeitpunkten (div x, dünn rot umrandet) wird durch die Signalintensität am ersten Messzeitpunkt (div 9, dick rot umrandet) dividiert und dieser Wert dann durch den Quotienten aus β -Tubulin (β -Tub) an den einzelnen Messzeitpunkten (div x, dünn blau umrandet) und β -Tubulin am ersten Messzeitpunkt (div 9, dick blau umrandet) geteilt. So ergibt sich die Proteinkonzentration für α -Synuklein an den einzelnen Zeitpunkten normiert durch β -Tubulin. Auf die gleiche Weise wurden die Proteinkonzentrationen für β - und γ -Synuklein sowie EGFP ermittelt.

2.3.4 Fixierung der Membranen

Nach der Durchführung einer statistisch relevanten Menge an Western Blots für die verschiedenen Versuchsreihen, wurde deutlich, dass mit dem oben beschriebenen Standardverfahren keine robuste und replizierbare Nachweisbarkeit der Synukleine im Western Blot gegeben war. Die Arbeitsgruppen um Lee, Kamitani und Sasaki et al. beschreiben eine verbesserte Detektion von endogenem α -Synuklein im Western Blot nach Fixierung der Membranen mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd (Lee und Kamitani 2011; Sasaki et al. 2015). Wir konnten mit einer modifizierten Form dieser Fixierung die transgen überexprimierten Proteine α -, β - und γ -Synuklein schon in deutlich geringerer Konzentration als mit dem Standardverfahren zuverlässig nachweisen.

Zur Fixierung wurden die PVDF-Membranen direkt nach dem Transfer knapp unterhalb der 25 kDa-Markierung des Größenstandards zerschnitten. Der Teil der Membran mit den Proteinen größer als 25 kDa wurde mit dem oben dargestellten Standardverfahren weiterbearbeitet. Der Teil mit den Proteinen kleiner als 25 kDa, der die Synukleine enthielt, wurde ohne weitere Zwischenschritte für 30 min in eine Lösung aus 4 % Paraformaldehyd in PBS und 0,1 % Glutaraldehyd eingelegt und geschwenkt. Im Anschluss wurden die fixierten Membranen dreimal für jeweils 10 min in TBS-T gespült. Das Blockieren der Membranen und die weiteren Schritte entsprachen dem oben dargestellten Standardverfahren.

2.4 Klonieren viraler Vektoren

Als Vorbereitung für ergänzende Arbeiten u. a. zur Degradationskinetik der Synukleine und ihren mutierten, krankheitsassoziierten Varianten wurden im Rahmen dieser Arbeit neue virale Konstrukte kloniert, diese sind in Abbildung 5 dargestellt.

Um mikroskopische Untersuchungen zur Mitochondrien-Morphologie und -Motilität in Zellen mit transgener Synuklein-Überexpression zu ermöglichen, ist in den verwendeten AAV-Konstrukten die Gensequenz für das Protein mitoEGFP integriert, s. Abbildung 2. MitoEGFP wird, anders als EGFP, gezielt in den Mitochondrien gebildet, was zur speziellen Anfärbung dieser führt. Um hier eine Kontrolle ohne Synuklein-Überexpression gegenüberstellen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Konstrukt „pAAV-TRE-mitoEGFP-WRPE“ kloniert. Ausgehend vom Konstrukt „pMA-TRE-null-WRPE-TRE-mitoEGFP-WRPE“ wurde mittels der Restriktionsenzyme Spe1 und Xba1 die gewünschte Sequenz ausgeschnitten und dann an den Restriktionsstellen Sph1 und Mlu1 in ein entsprechendes pAAV-*backbone* (Rückgrat) integriert.

Zur Evaluation der Degradationskinetik der α -Synuklein-Mutanten wurden entsprechende pAAV-Vektoren kloniert. Dazu wurde bei vorbereitenden Arbeiten in unserem Labor die cDNA der α -Synuklein-Mutante A53T und der α -Synuklein-Mutante A56P mit AU1-*tag* mittels PCR amplifiziert. Nach Verdau mit Asc1/Sbf1 (für A53T) bzw. Mlu1/Sph1 (für A56P)

erfolgte die Insertion in ein pAAV-*backbone*. Die jeweiligen Ausgangsprodukte wurden durch Dr. Sebastian Kügler zur Verfügung gestellt.

Die hier durchgeführten Klonierungen wurden gemäß der Richtlinien in der gängigen Literatur durchgeführt (Green et al. 2012).

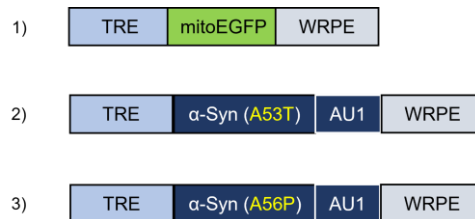


Abbildung 5: Klonierte AAV-Vektoren für zukünftige Projekte. Dargestellt sind die im Rahmen dieser Arbeit klonierten pAAV6-Vektoren mit cDNA für 1) mitoEGFP sowie 2) und 3) α -Synuklein-Mutanten mit AU1-*tag*, alle eingebettet in ein Tet-Off-Doxy-System.

2.4.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Die Enzyme für den Restriktionsverdau wurden so gewählt, dass dabei komplementäre Enden entstehen sollten. Angesetzt wurden 10 μ g Plasmid-DNA bzw. 2 μ g cDNA aus den vorangegangenen PCR-Amplifikationen der α -Synuklein-Mutanten mit AU1-*tag*, dazu 10 μ l CutSmart-Puffer, die entsprechenden Restriktionsenzyme und soviel H₂O, dass der Gesamtansatz 100 μ l betrug. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz vor der weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Als Größenkontrolle der entstandenen DNA-Produkte erfolgte eine Gelelektrophorese mit 0,8%igen Agarosegelen. Für das analytische Gel wurden ca. 100 ng DNA pro *lane* (Spur im Agarosegel) aufgetragen. Es wurden jeweils 1 μ l der verdauten und der unverdauten Probe mit 9 μ l H₂O und 2,5 μ l Gelladepuffer versetzt und parallel auf das Gel geladen, zusätzlich wurde als Größenstandard der 2-Log DNA Ladder, nach Herstellerangaben vorbereitet, auf das Gel geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 70 V über ca. 1 h, bis eine adäquate Separation der einzelnen DNA-Banden erreicht wurde. Zur Darstellung der DNA-Banden mittels UV-Licht wurde der Gel Documentation 2000™ UV Transilluminator verwendet. Bei erfolgreichem Verdau und Nachweis der erwarteten Fragmente im analytischen Gel, wurde dann der restliche Teil der verdauten DNA nach gleichem Prinzip in einem präparativen Gel nach Fragmentgröße aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde der die Zielfragmente enthaltende Gelanteil ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte nach Herstellerangaben mittels des QIAquick Gel Extraction Kit.

2.4.2 Fällung und Konzentrationsbestimmung der DNA

Bei der Fällung wurde die zuletzt mittels Gel Extraction Kit eluierte DNA aufgereinigt und konzentriert. Dazu wurde die eluierte DNA mit 10 %-Volumen Natriumacetat und dem zweieinhalb-fachen Volumen eiskalten, 100 %igen Ethanol versetzt. Diese Mischung wurde

für 5 min auf Trockeneis gestellt und dann für 30 min bei 4 °C bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgekippt und nach Zugabe von 200 µg 70%igem Ethanol erneut für 5 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das entstandene *Pellet* (DNA-Klumpchen) in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Die so gewonnene DNA wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert und abschließend im Vortex-Mixer gemixt.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch. Anhand der optischen Dichte einer Probe bei 260 nm wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Der Quotient aus optischer Dichte bei 260 und 280 nm gab Aufschluss über die Reinheit der DNA und sollte über 1,7 liegen.

2.4.3 Ligation und Transformation

Zur Ligation wurde ein DNA-*backbone* mit der zu inserierenden cDNA im Verhältnis 1:3 vermengt. Die DNA-Mischung wurde mit H₂O für 5 min bei 45 °C erhitzt und dann direkt auf Eis gestellt. 1 µl T4-DNA-Ligase wurde hinzugefügt, sowie 2 µl T4-Puffer (10x); das Gesamtvolumen betrug insgesamt 20 µl. Dieser Ansatz wurde dann für 20 min bei 16 °C und anschließend für 20 min bei 25 °C inkubiert. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Um den Salzgehalt der DNA-Proben vor Elektroporation zu reduzieren, wurde eine Mikrodialyse durchgeführt. Dazu wurde ein Becherglas mit Dialysepuffer bestehend aus 10%igem Glycerin gefüllt, eine entsprechende Dialysemembran aufgelegt und die DNA-Probe vorsichtig aufpipettiert. Unter kontinuierlichem Rühren wurde die Probe dann für 20 min dialysiert und anschließend wieder abpipettiert.

Im Rahmen der viralen Vektorproduktion in unserem Labor kommen in der Regel SURE® E.coli-Zellen zur Anwendung, die als elektroporationskompetente Zellen entwickelt wurden und eine hohe Transformations-Effizienz aufweisen. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurden 50 µl SURE®-Zellen mit 50 ng DNA in einer Elektroporationsküvette auf Eis vermengt. Die Küvette wurde in das System eingespannt; bei 1,7 kV erfolgte die Elektroporation. Direkt im Anschluss wurden 1000 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Nährmedium in die Küvette eingespült, mit der Probe wieder aspiriert und in vorgewärmte, belüftete Reaktionsgefäße transferiert, die dann für 1 h bei 37 °C mit hoher Frequenz geschüttelt wurden.

Insbesondere zur Klonierung des Konstruktes „pAAV-TRE-mitoEGFP-WRPE“, bei der mehrere Zwischenschritte notwendig waren und bei Nutzung von SURE®-Zellen keine erfolgreiche Transformation möglich war, wurden NEB5α E.coli-Zellen verwendet. Diese sind ein Derivat der DH5α-Zellen, die eine einfachere und effizientere Transformation versprechen. Hier wurden 25 µl der NEB5α-Zellen auf Eis aufgetaut und 20 ng DNA hinzugefügt. Es wurde vorsichtig gemischt und die Probe für 30 min auf Eis gestellt. Dann erfolgte die Transformation durch Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C. Anschließend wurde die Probe für

5 min auf Eis abgekühlt, mit SOC-Medium versetzt und schließlich für 1 h bei 37 °C mit hoher Frequenz geschüttelt.

Die hier verwendeten Plasmide verfügten alle über das Ampicillinase-Gen, sodass zur Selektion der erfolgreich transformierten Klone ein Ausstreichen auf Ampicillin-Agar erfolgte. Die Agarplatten wurden dann für 16 h bei 37 °C bebrütet, im Anschluss wurden einzelne Klone zur weiteren Verarbeitung aufgelesen.

2.4.4 Plasmid-DNA-Aufreinigung und AAV-Vektor-Produktion

Die im Anschluss kurz zusammengefassten Arbeitsschritte wurden vor Dr. Sebastian Kügler bzw. seinen Labormitarbeitern durchgeführt.

Zur Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den transformierten *E.coli*-Zellen wurden Mini- und Megaprep-Protokolle durchgeführt. Je nach Protokoll wurden die selektierten Bakterienklone in unterschiedlichen Volumina an entsprechendem Nährmedium (LB-Medium, *lysogeny-broth* Medium) für 15 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur. Aus den so entstandenen Pellets wurde dann mit dem QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) bzw. dem NucleoBond® PC 2000 Megaprep kit (Macherey Nagel) die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt. Die sich daraus ergebende eluierte DNA wurde wie zuvor beschrieben gefällt, s. Absatz 2.4.2. Anschließend erfolgte ein Kontroll-Verdau.

Die AAV-Vektor-Produktion erfolgte gemäß dem vorbeschriebenen und publizierten Prozedere (Kügler et al. 2007).

3 Ergebnisse

Der in Abbildung 3 dargestellte Versuchsablauf wurde insgesamt fünfmal mit Kortexneuronen aus fünf unabhängigen Präparationen durchgeführt ($n = 5$, 5 Versuchsreihen); für jede gewonnene Proteinprobe wurden mindestens drei Western Blots durchgeführt.

3.1 Herausforderungen beim Western Blot

Auch wenn der in Absatz 2.3.1 und 2.3.2 dargestellte Ablauf des semiquantitativen Proteinachweises im Western Blot in unserem Labor für die Synukleine etabliert war, ergaben sich bei dem Versuch die Ergebnisse zu replizieren eine Reihe an Herausforderungen.

Für die initialen Versuchsdurchführungen wurden folgende Variablen verwendet: Proteinmenge von 20 μg ; sequenzielle Inkubation der Antikörper mit separater Inkubation des anti-AU1-AK und der beiden anderen Primärantikörper anti- β -Tubulin und anti-EGFP; Verdünnung der Antikörper: anti-AU1 1:1.000, anti-GFP 1:10.000, anti- β -Tubulin 1:20.000 in 5 % Milchpulver in TBS-T; *Imaging* mit selbst hergestellter ECL-Lösung. Durch die zwei Inkubationsschritte führten schon minimale Unterschiede beim *Imaging*, z. B. durch unterschiedliche Verteilung der ECL-Lösung auf der Membran, zu einer veränderten Bandenintensität, sodass die Normierung der Synukleine auf β -Tubulin, das in einem späteren *Imaging* dargestellt wurde, teilweise fehlerhaft war. Dieses Problem konnte durch gemeinsame, monophasische Inkubation aller drei Primärantikörper reduziert werden. Die Banden für GFP und β -Tubulin waren mit den oben genannten Konditionen um ein Vielfaches intensiver als die Synuklein-Banden, sodass zum gemeinsamen *Imaging* die Verdünnung der anti-GFP und anti- β -Tubulin-AK angepasst werden musste. Zusätzlich konnte die Bildqualität durch Erhöhung des Verdünnungsvolumens der Antikörper von 4 auf 6 ml verbessert werden.

Trotzdem zeigten sich bei wiederholter Testung der Proben sowohl innerhalb einer Versuchsreihe als auch zwischen den verschiedenen biologischen Replikaten immer wieder große Unterschiede in der Bandenintensität vor allem für die Synuklein-Proteine. Nach wiederholtem Auftauen wurden beim Pipettieren der Proben teilweise gelartige Bestandteile detektiert, was die Homogenität der Proben in Frage stellte. Auch eine Wiederholung des BCA-Testes zeigte divergierende Werte für die Doppelbestimmung einzelner Proben. Es wurde beschlossen, die Proben aller Versuchsreihen nachzubearbeiten. Dazu wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und die Aliquots gepoolt. Der Lyse-Puffer wurde wie bereits für die Probenasservation (s. Kapitel 2.2.2) angesetzt und es wurde zu einem Probenvolumen von 80 – 120 μl eine Menge von 40 – 50 μl Lyse-Puffer hinzugegeben. Proben und Lyse-Puffer wurden gemischt und erneut zweimal für 10 s sonifiziert. Es erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C. Die Proben wurden untersucht und zeigten keine erkennbaren festen oder gelartigen Bestandteile mehr. Die Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels BCA-Tests wurde wiederholt. Die nachbearbeiteten Proben mit zweiter Lyse wurden in 20 μl Aliquots bei -20 °C gelagert. Es schien also durch das (wiederholte) Einfrieren und Auftauen

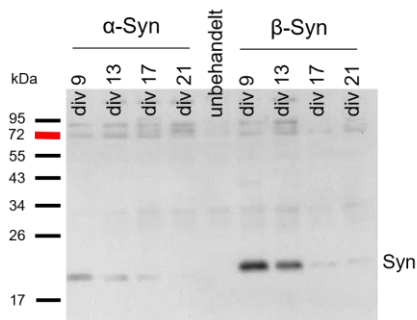
zu einer Aggregation von Proteinen in den Proben zu kommen, sodass für die nachfolgenden Versuche die Aliquots nur einmal verwendet wurden. Die Proben wurden in entsprechend geringen Mengen gelagert.

Im Laufe der Untersuchungen war der initial verwendete anti-AU1-Antikörper (HiSS, monoklonaler Maus-AK) nicht mehr verfügbar, sodass wir auf ein Ersatzprodukt des gleichen Unternehmens (HiSS, polyklonaler Maus-AK) zurückgriffen. Damit zeigte sich ein schwaches Signal für die Synuklein-Proteine bei zunehmendem Hintergrundsignal mit unspezifischen Banden bei etwa 22 kDa bei den EGFP-Proben. Die Erhöhung der Proteinkonzentration von 20 µg auf 40 µg brachte keine Verbesserung, ebenso wenig die Verdünnung des anti-AU1-AK 1:500 statt 1:1.000. Bei Verwendung von Femto-ECL-Lösung beim *Imaging* waren die Synuklein-Banden zwar intensiver erkenn- und auswertbar, die EGFP- und β -Tubulin-Banden aber in wenigen Sekunden überbelichtet. Die Verdünnung des neuen Antikörpers in 4%ige BSA-Lösung statt in 5%ige Milch-Lösung führte zu einer weiteren Verstärkung des unspezifischen Hintergrundsignals und machte die Auswertung unmöglich.

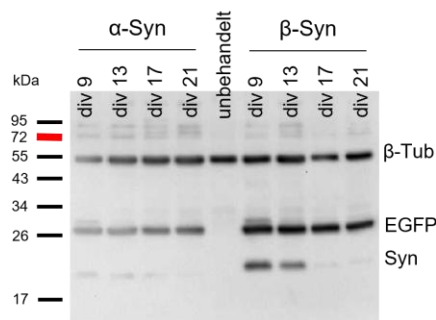
Es wurde beschlossen einen anderen anti-AU1-Antikörper auszutesten und für die folgenden Western Blots den anti-AU1-AK vom abcam (Kaninchen, polyklonal) zu verwenden. Bei einer Verdünnung von 1:1.000 und stärkerer Verdünnung der anti-GFP und anti- β -Tubulin-Antikörper konnten so weitgehend zuverlässig auswertbare Synuklein-Banden generiert werden.

In Abbildung 6 sind Western Blot Membranen mit unterschiedlichen Konditionen gegenübergestellt, die die oben beschriebenen Aspekte nachvollziehbar machen.

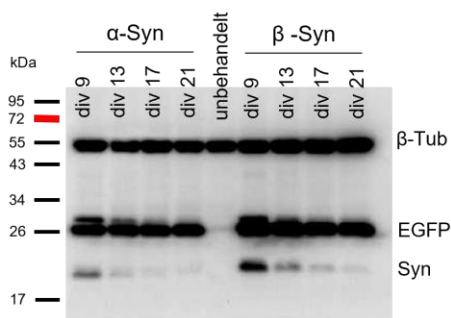
- 1.1) **Western Blot vom 22.12.17 #1**
anti-AU1-AK (HiSS, Maus mono) 1:1.000
Sekundär-AK: anti-Maus-HRPO 1:3.000



- 1.2) **Western Blot vom 22.12.17 #1**
anti-GFP-AK 1:10.000
anti- β -Tubulin-AK 1:20.000
Sekundär-AK: anti-Maus-HRPO 1:3.000



- 2) **Western Blot vom 17.01.18 #1, nach Nachbearbeitung der Proben**
anti-AU1-AK (HiSS, Maus poly) 1:1.000
anti-GFP-AK 1:10.000
anti- β -Tubulin-AK 1:20.000
Sekundär-AK: anti-Maus-HRPO 1:2.000



- 3) **Western Blot vom 20.01.18 #1, nach Nachbearbeitung der Proben**
anti-AU1-AK (HiSS, Maus poly) 1:500
anti-GFP-AK 1:10.000
anti- β -Tubulin-AK 1:20.000
Sekundär-AK: anti-Maus-HRPO 1:2.000

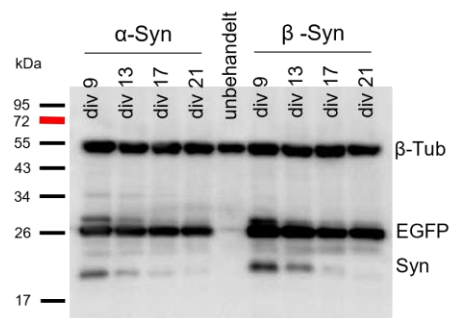


Abbildung 6: Variablen im Western Blot, verschiedene Inkubationsschritte und Antikörper. Exemplarische Gegenüberstellung verschiedener Western Blots mit Proben der Versuchsreihe 1 (#1) für α - und β -Synuklein (α -Syn und β -Syn) sowie einer unbehandelten Probe. Bei 1.1) und 1.2) sequenzielle Inkubation mit Primär-AK anti-AU1 (monoklonal) und anti- β -Tubulin sowie anti-GFR. Bei 2) und 3) monophasische Inkubation mit allen drei Antikörpern gemeinsam und anti-AU1 (polyklonal) in zwei verschiedenen Verdünnungen, dabei verstärktes Hintergrundsignal und schwaches Synuklein-Signal.

Nach statistischer Auswertung der Ergebnisse der Western Blots aus allen Versuchsreihen mit mindestens drei Western Blots pro Probe, ergab sich sowohl innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen als auch zwischen den verschiedenen weiterhin eine große Variabilität der einzelnen Messwerte. Diese hohe Variabilität ist im Scatterplot in Abbildung 7 dargestellt, beispielsweise ergaben sich für die Proteinkonzentration von α -Synuklein an div 13 Messwerte zwischen 10 % und 70 % vom Ausgangswert.

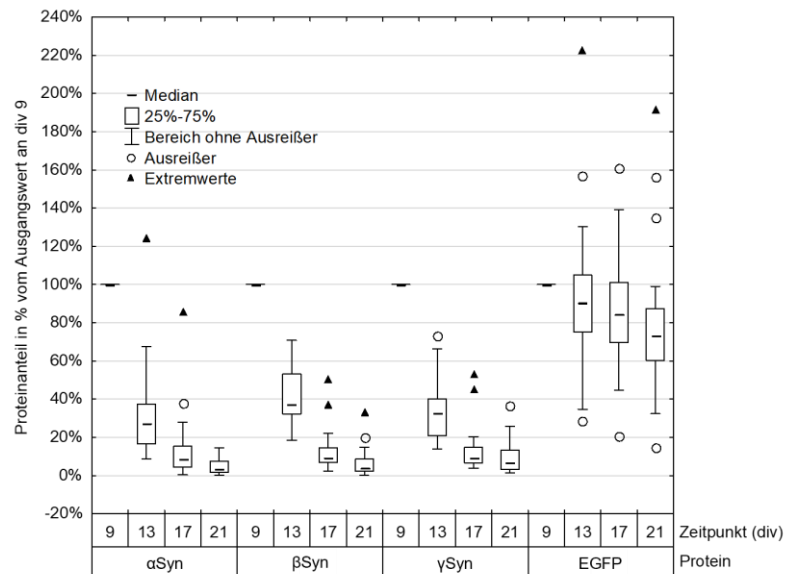


Abbildung 7: Streuungsplot für Proteinkonzentrationen der Synukleine und EGFP (unfixierte

Membranen). Erkennbar ist, dass für alle drei Synukleine vor allem am ersten Messzeitpunkt (div 13) eine sehr breite Streuung der Messergebnisse vorliegt, zu den späteren Messzeitpunkten (div 17 und div 21) wird die Streuung geringer. Für EGFP liegt an allen Messzeitpunkten eine gegenüber den Synukleinen noch höhere Streuung der Messergebnisse vor.

Über ähnliche Probleme beim Nachweis von Synukleinen im Western Blot wurden von anderen Arbeitsgruppen für endogenes α -Synuklein berichtet. Die Detektion konnte durch Fixierung der α -Synuklein enthaltenden Membrananteile in Glutaraldehyd und/oder Paraformaldehyd verbessert werden (Lee und Kamitani 2011; Sasaki et al. 2015). Die Western Blots wurden für alle Versuchsreihen mit dem Zusatzschritt der Fixierung der die Synuklein enthaltenden Membrananteile wiederholt. Das genaue Prozedere ist in Absatz 2.3.4 beschrieben. Durch diese Anpassung des Verfahrens wurde die Bandenintensität für die Synukleine massiv erhöht, sodass die Proteinkonzentration reduziert werden musste, um die Auswertung zu ermöglichen. Zusätzlich wurden zur gleichzeitigen robusten Darstellung der Proteine GFP und β -Tubulin, die gegen sie gerichteten Antikörper weniger stark verdünnt (1:5.000 für anti-GFP-AK, 1:10.000 für anti- β -Tubulin-AK). In Abbildung 8 ist die Bandenintensität der Synukleine mit und ohne Fixierungsschritt gegenübergestellt.

Einen Überblick über die verschiedenen Variablen im Western Blot mit den zugehörigen Störfaktoren und Anpassungen gibt die Tabelle im Anhang.

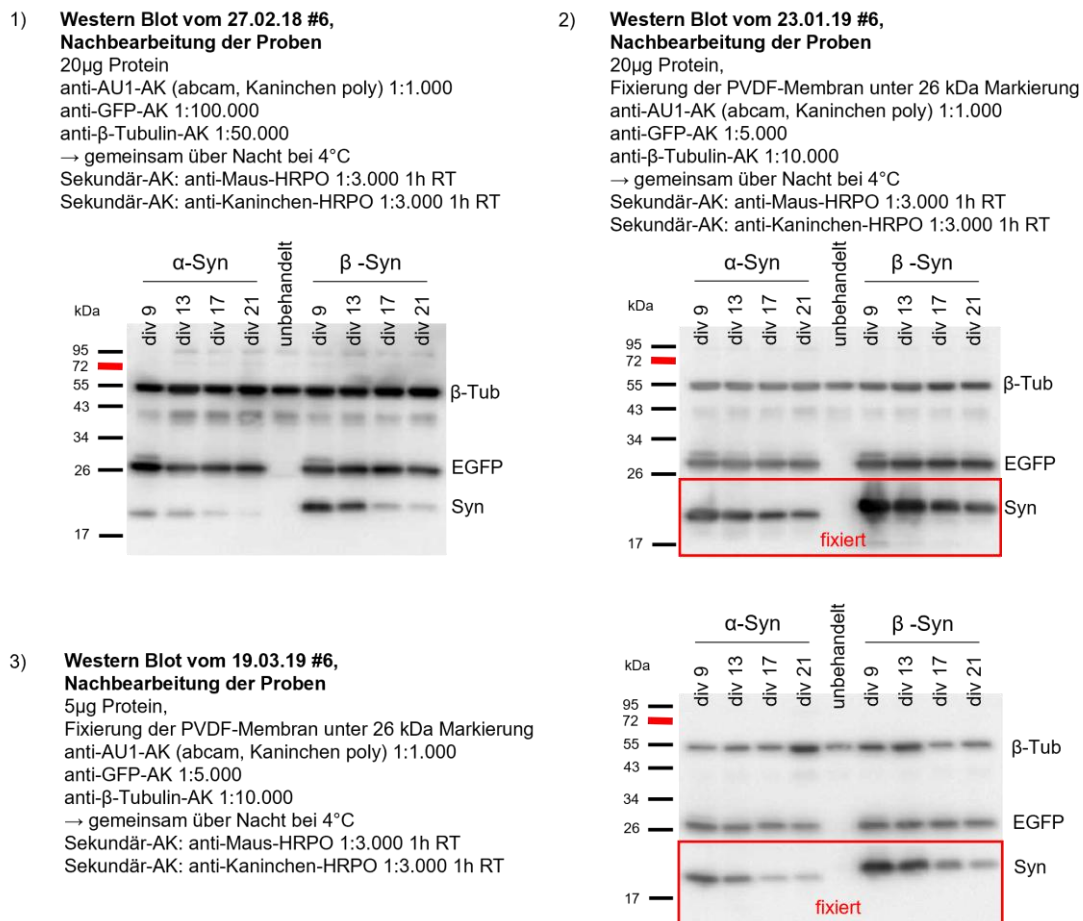


Abbildung 8: Western Blot Variablen, Fixierung der Membranen. Exemplarische Gegenüberstellung von Western Blots der Versuchsreihe 6 (#6) ohne Fixierung s. 1) und mit Fixierung s. 2) und 3). Dabei ist im direkten Vergleich zwischen 1) und 2) bei gleicher Proteinladungsmenge das Synukleinsignal in den fixierten Membranen deutlich intensiver. Nach Anpassung der Proteinladungsmenge in 3) kann nach Fixierung der Membranen eine adäquate Auswertbarkeit der Synukleinbanden ohne relevantes Hintergrundsignal erreicht werden.

3.1.1 Evaluation der Western Blot Konditionen

Ein Aspekt, der unabhängig von den verschiedenen Variablen im Western Blot konstant war, war die unterschiedliche Bandenintensität am ersten Messzeitpunkt (div 9) zwischen α - und β -Synuklein bei gleicher Proteinladungsmenge. Während die Banden für α - und γ -Synuklein am ersten Messzeitpunkt in den Blots vergleichbar waren, zeigte sich die Bande für β -Synuklein stets deutlich intensiver. Dies kann in allen hier dargestellten Western Blots (Abbildung 6, Abbildung 8, Abbildung 9) nachvollzogen werden. Es muss also von einer höheren Ausgangskonzentration an Protein für β -Synuklein ausgegangen werden, was insofern Fragen aufwirft, als dass die gleiche Menge an Transfektionseinheiten für die Transduktion bei allen drei Synukleinen verwendet wurde und in vorausgegangenen Untersuchungen in unserem Labor keine Unterschiede in der Synthesekinetik der Proteine beobachtet wurden. Ursächlich könnten Fehler in der Titrierung des Vektors sein, die zu einer ungenauen Bestimmung der Transfektionseinheiten führen.

Da für die Berechnung der Proteinkonzentrationen aber die Messdaten der einzelnen Zeitpunkte anteilmäßig vom initialen Zeitpunkt angegeben wurden und entsprechend für die Untersuchung der Degradationskinetik nur relative Werte verwendet wurden, sollte dieser Aspekt die Ergebnisse nicht verzerren.

Durch die entscheidende Abwandlung des Western Blots mit Ergänzung des Fixierungsschritts für den die Synukleine enthaltenden Membrananteil, konnte eine robuste und gut auswertbare Bandenintensität für die Synukleine, β -Tubulin und EGFP bei geringem Hintergrundsignal erreicht werden. Exemplarische Membranen mit den finalen Konditionen sind in Abbildung 9 gezeigt.

Western Blot vom 25.01.19 #10, nach Nachbearbeitung der Proben

5 μ g Protein, Fixierung der Membranen
 anti-AU1(abcam, Kaninchen poly) 1:1000
 anti-GFP (Maus, mono) 1:5000 in Milch
 anti- β -Tubulin (Maus, mono) 1:10.000 in Milch } gemeinsam über Nacht
 Sekundär-AK: anti-Maus-HRPO 1:3000 und anti-Kaninchen-HRPO 1:3000 1h RT

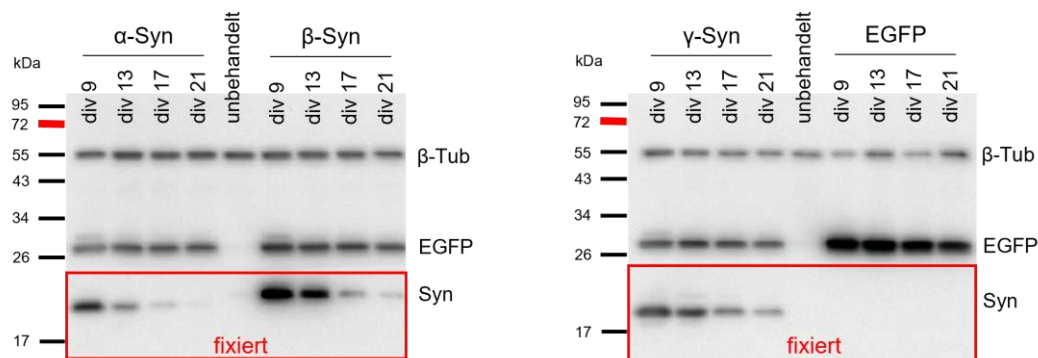


Abbildung 9: Exemplarischer Western Blot mit finalen Konditionen. Nach Ergänzung des Fixierungsschrittes und Anpassung der übrigen Parameter sind die Synuklein-Banden stets ausreichend intensiv dargestellt, sodass eine stabile Auswertung möglich ist.

Um die Daten, die nach Fixierung der Membranen entstanden sind, mit den vorherigen Daten aus dem Standardverfahren zu vergleichen, wurden Streuungsplots für die einzelnen Proteine in Abhängigkeit von den Versuchszeitpunkten und dem Fixierungsstatus erstellt. Diese Grafiken wurden um Berechnungen zu Mittelwert und Standardabweichung ergänzt, um die Variabilität der Daten objektivieren zu können, und sind in Abbildung 10 dargestellt. Insgesamt zeigt sich eine große Streuung der Messwerte für alle Proteine an allen Messzeitpunkten. So liegen beispielsweise die Proteinkonzentrationen für α -Synuklein an div 13 zwischen 70 % und 10 % vom Ausgangswert bei den unfixierten Membranen (SD bei 0,27) und zwischen 90 % und 10 % für die fixierten Membranen (SD bei 0,28). Die geringste Streuung besteht bei den Messwerten für α - und β -Synuklein an div 21 (Messwerte zwischen 0 % und 15 % vom Ausgangswert, SD 0,04 für α - und 0,08 für β -Synuklein) bei den Daten aus den unfixierten Membranen. Für die aus dem Standardverfahren ohne Fixierung generierten Daten für die Synukleine zeigt sich eine abnehmende Variabilität der Messwerte an den späteren Messzeitpunkten, d. h. an div 13 ist für alle Synukleine die Variabilität hoch, nimmt zu div 17

und 21 aber ab. Bei geringerer Proteinkonzentration scheint also eine zuverlässigere Detektion gegeben zu sein. Bei den Daten aus den fixierten Membranen zeigt sich zwar ein ähnliches Schema für α - und β -Synuklein, trotzdem ist die Streuung sowie die Standardabweichung der Messwerte hier für jedes Protein zu jedem Zeitpunkt größer als bei den Daten ohne Fixierungsschritt. Von den vier Proteinen ergibt sich für EGFP an allen Zeitpunkten sowohl bei den Daten, die mit dem Standardverfahren ermittelt wurden, als auch aus den Membranen, die im Bereich der Synukleine fixiert wurden, die größte Heterogenität. Es wurden z. B. für div 13 Proteinkonzentrationen zwischen 35 % und 260 % vom Ausgangswert berechnet, was einer SD von 0,39 für die unfixierten Membranen und 0,65 für die Daten aus den fixierten Membranen entspricht.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus fixierten und unfixierten Blots ergaben sich nur für einzelne Versuchszeitpunkte für β - und γ -Synuklein.

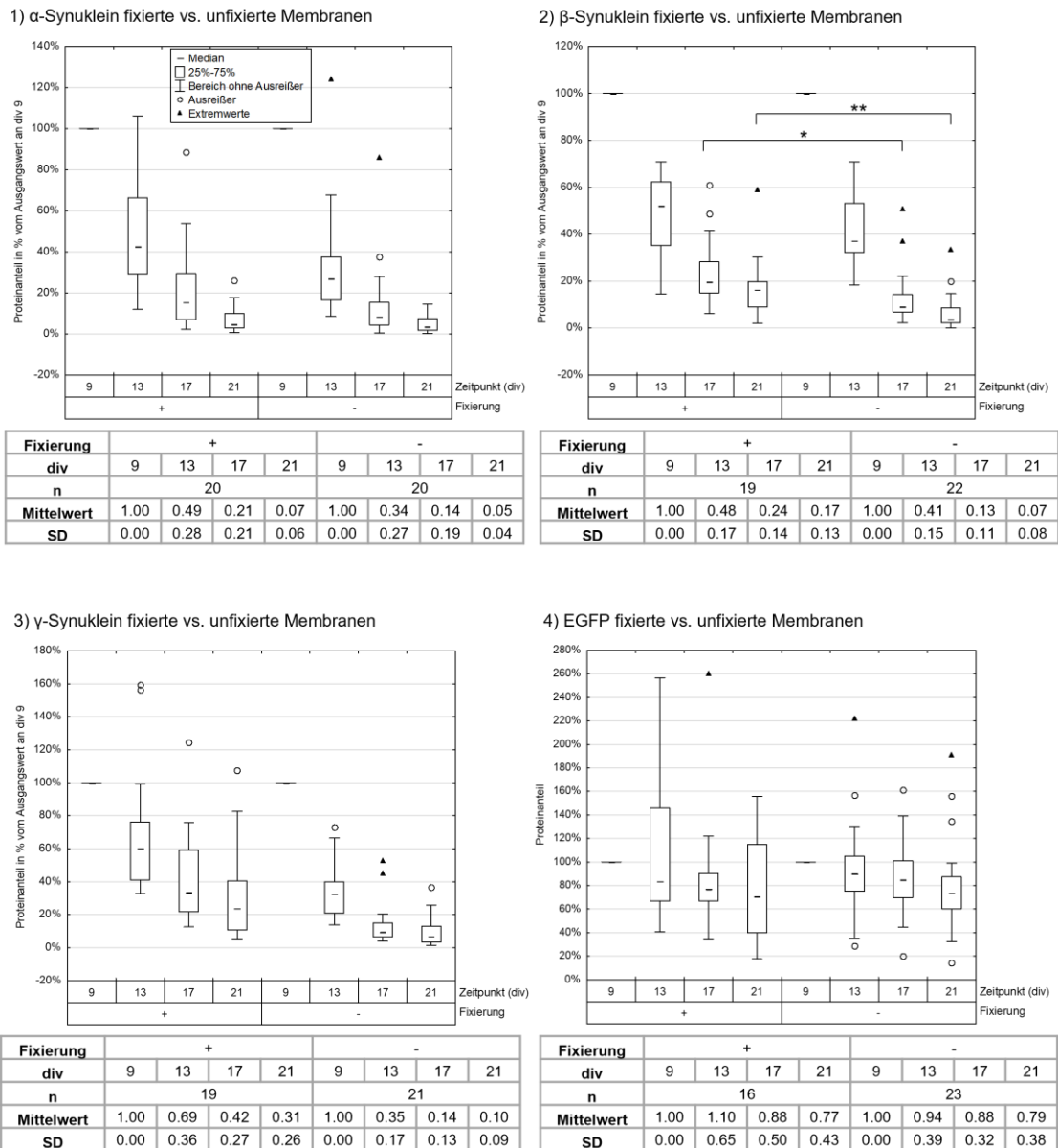


Abbildung 10: Streuungsplots für die verschiedenen Proteine in Abhängigkeit von Zeitpunkt (div) und zusätzlichem Fixierungsschritt. Die in 1) abgebildete Legende gilt auch für die Streuungsplots 2)–4). Dargestellt sind die Proteinanteile für die vier Proteine α -, β - und γ -Synuklein sowie EGFP an den verschiedenen Zeitpunkten (div 9 – 21) in Abhängigkeit vom zusätzlichen Fixierungsschritt (+ entspricht zusätzlichem Fixierungsschritt, - entspricht Standardverfahren). Mittels unabhängigem t-Test für Variablen wurden für die einzelnen Proteine und Zeitpunkte die Messwerte mit (+) und ohne (-) Fixierung verglichen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * markiert, dabei repräsentiert * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$. Bestand für die einzelnen Proteine und Zeitpunkte kein statistisch signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Fixierung wurde dies nicht gesondert markiert. Die EGFP-Werte in 4) wurden zwar gesondert für die zerschnittenen und fixierten und die Membranen im Standardverfahren berechnet, die EGFP-Banden an sich wurden aber für beide Verfahren nicht fixiert.

Bei der Analyse der Daten aus den fixierten Membranen ist auffällig, dass die Messwerte vor Normalisierung durch β -Tubulin konsistenter waren als nach Normalisierung der Werte. Ein vergleichender Streuungsplot ist in Abbildung 11 dargestellt. Vor allem für EGFP zeigten die berechneten Proteinkonzentrationen ohne Normierung auf β -Tubulin eine deutlich geringere Variabilität, mit weniger Ausreißern und Extremwerten. Dieser Effekt war auch bei

den Synukleinen vorhanden, wenn auch weniger ausgeprägt. Da für die Western Blots mit Fixierung eine geringere Proteinkonzentration verwendet wurde als für die Blots ohne Fixierung (5 μg vs. 20 μg Protein), ist denkbar, dass durch die geringe Proteinladungsmenge minimale Pipettierfehler stärker ins Gewicht fallen. Dadurch sind auch die β -Tubulin-Banden bei den fixierten Membranen weniger konstant als zuvor, was z. B. in Abbildung 9 angedeutet erkennbar ist. Da die Proteinwerte ohne Normierung erkennbar konsistenter waren, ist es möglich, dass die Normierung durch β -Tubulin die Daten verzerrt. Eine andere Normierungsmethode sollte für nachfolgende Versuche evaluiert werden. Da hier keine andere Variante der Ladekontrolle durchgeführt wurde, wurden die Messdaten trotzdem wie gehabt durch β -Tubulin normiert.

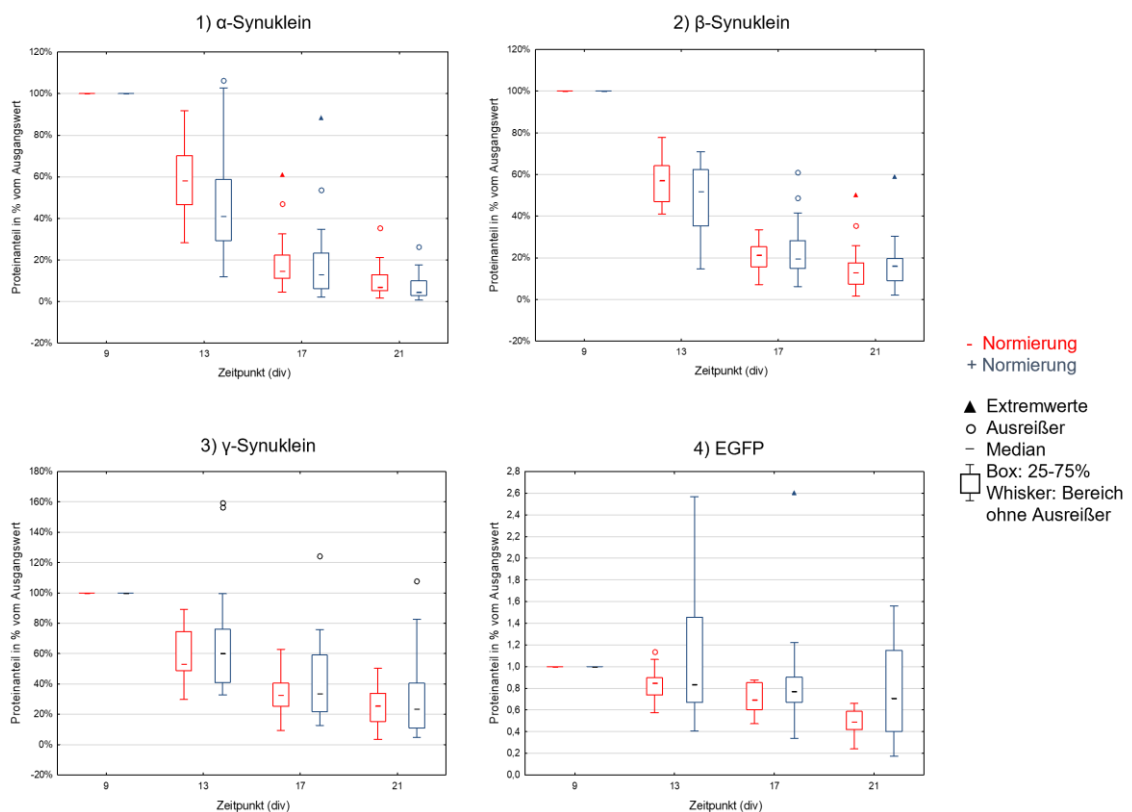


Abbildung 11: Gegenüberstellung der Proteinwerte aus fixierten Membranen mit vs. ohne Normierung auf β -Tubulin. Sowohl für die Synukleine in 1)-3) als auch für EGFP in 4) bestand (bei den fixierten Membranen) eine geringere Streuung der Messergebnisse vor Normierung der Messdaten auf β -Tubulin. Nach Normierung war der Bereich ohne Ausreißer zentrierter, Extremwerte seltener. Besonders deutlich war dieser Effekt für EGFP.

3.2 Degradation der Synuklein-Proteine

Zur Analyse des Proteinabbaus der Synukleine wurden alle auswertbaren Western Blots unabhängig von den einzelnen Variablen einbezogen, da auch die subjektiven Verbesserungen des Verfahrens nicht zu einer Verringerung der Variabilität beitrugen und sich kein konstanter, statistisch signifikanter Unterschied zwischen fixierten und nicht-fixierten Membranen ergab.

Zur Darstellung der Degradationskinetik der Synuklein-Proteine wurden die Proteinkonzentrationen in Abhängigkeit von den verschiedenen Versuchszeitpunkten grafisch aufgetragen. Für die Daten ließen sich durch nicht-lineare Regression exponentielle Funktionen anpassen, die den Abbau der Proteine über die Zeit repräsentieren. Die Funktionsgraphen mit den einzelnen Messwerten als Punkte sind in Abbildung 12 dargestellt. Es zeigt sich ein ähnlicher Funktionsgraph für α -, β - und γ -Synuklein mit einem initial schnellen Abfall auf etwa 30 % der initialen Proteinkonzentration bis div 15 und einem im Anschluss langsameren Proteinabbau. Die Kurven nähern sich zum letzten Messzeitpunkt der x-Achse an, dabei ist die γ -Synuklein Konzentration an div 21 etwas höher als die Konzentration der anderen Synukleine.

Die Messdaten für EGFP ließen sich eher als lineare Zerfallsfunktion darstellen (s. Abbildung 12). Das Protein scheint deutlich stabiler zu sein als die Synukleine. Der für EGFP berechnete Funktionsgraph zeigt bei div 15 eine Proteinkonzentration von etwa 90 % vom Ausgangswert an und fällt zum letzten Messzeitpunkt nur auf 80 % ab.

Zur statistischen Gegenüberstellung der Degradationskinetik der drei Synuklein-Proteine, wurde eine multiple lineare Regression mit den logarithmierten Messwerten der Proteine in Abhängigkeit vom Einfluss der einzelnen Proteine berechnet. Diese Analyse zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen α - und β -Synuklein, α - und γ -Synuklein sowie β - und γ -Synuklein auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,016$. Diese, auf Basis der logarithmierten, kumulativen Messwerte bestehende Analyse zum Einfluss der unterschiedlichen Proteine auf den Verlauf des berechneten Graphen, erlaubt aber keine Aussage über Unterschiede an den einzelnen Messzeitpunkten und ist somit nicht zielführend.

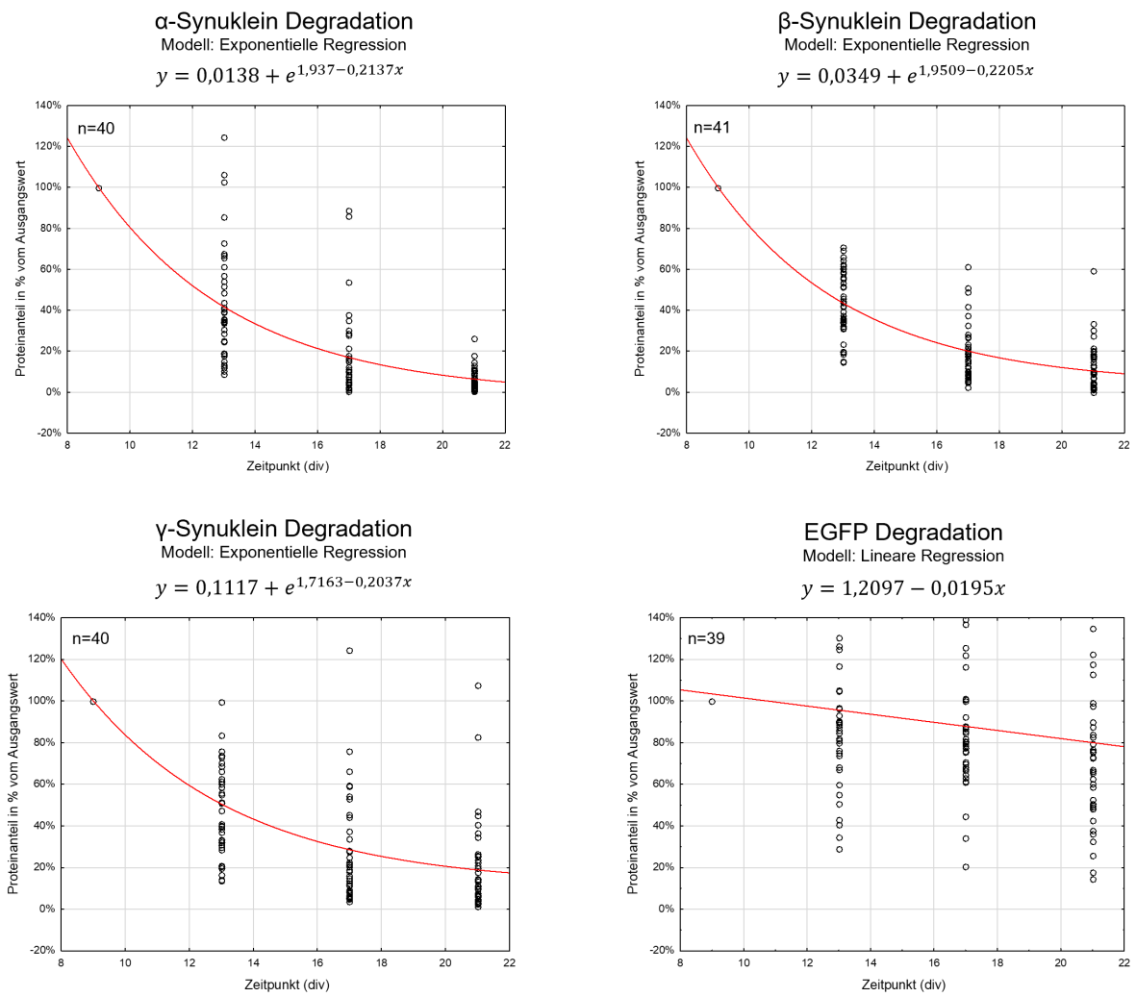


Abbildung 12: Degradationskinetik der Synuklein-Proteine und von EGFP. Abgebildet sind die einzelnen Messergebnisse an den verschiedenen Zeitpunkten als Punkte und die daraus errechneten Funktionsgraphen zur Darstellung der Degradationskinetik der Synukleine und von EGFP. Während die Synukleine einem exponentiellen Zerfall entsprechend abgebaut wurden und am letzten Messzeitpunkt nur noch geringe Proteinmengen nachweisbar waren, entsprach der Abbau von EGFP einem linearen Abfall.

Die so ermittelten Ergebnisse scheinen vor dem Hintergrund der sehr ähnlichen Degradationsgraphen für die Synukleine zusätzlich kontraintuitiv, sodass als nächstes die Messwerte für die verschiedenen Proteine an den einzelnen Messzeitpunkten gegenübergestellt wurden, (s. Abbildung 13). Dazu wurden für jeden Zeitpunkt die vier Proteine mittels Varianzanalyse (ANOVA) und anschließender Bonferroni-Korrektur miteinander verglichen. Dabei zeigten sich an den einzelnen Messzeitpunkten div 13, 17 und 21 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Synuklein-Proteinen. Zu jedem Zeitpunkt waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Synukleinen und EGFP statistisch signifikant.

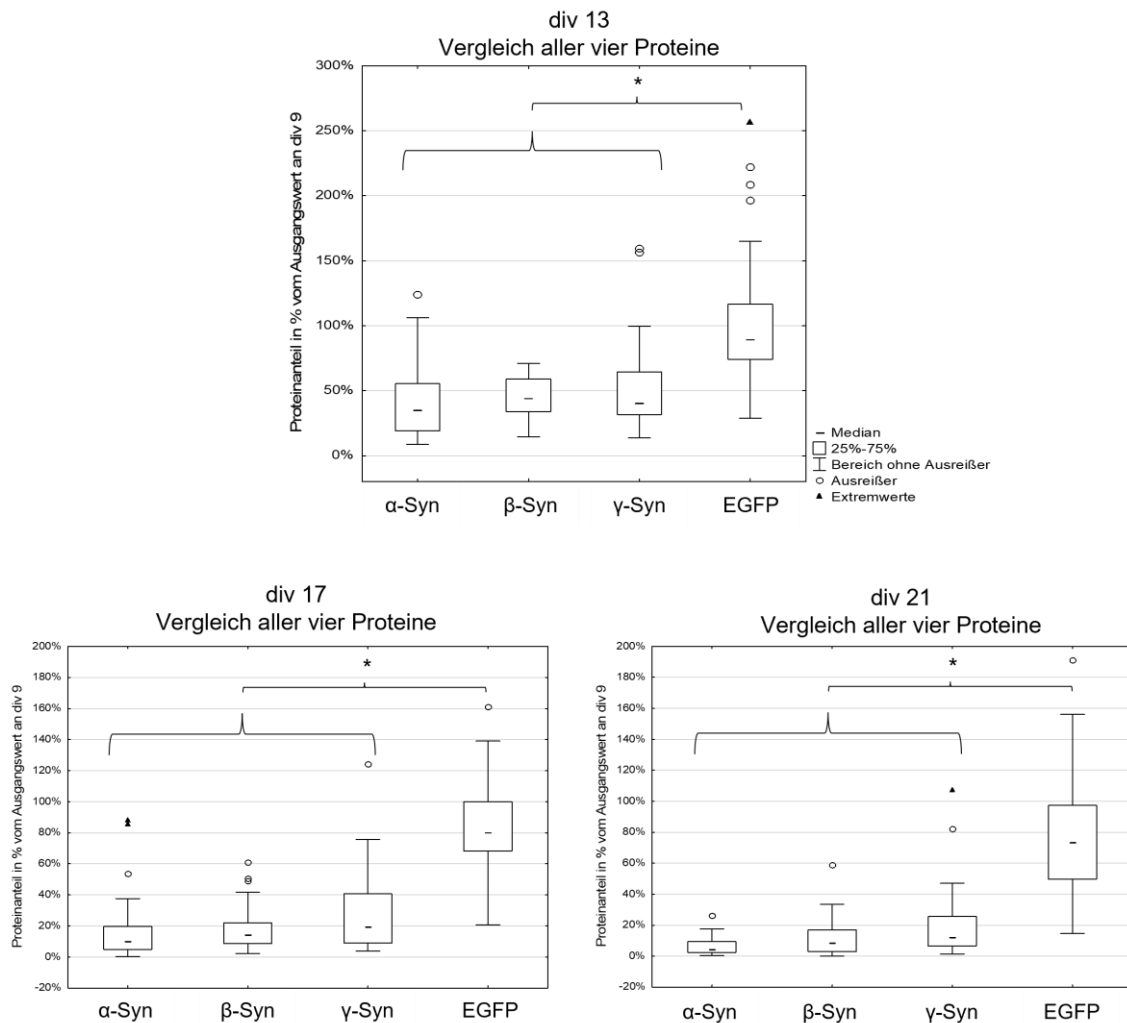


Abbildung 13: Boxplots zum Vergleich der Synukleine und EGFP an den einzelnen Messzeitpunkten. Es sind die Proteinkonzentrationen für α -, β - und γ -Synuklein sowie EGFP an den einzelnen Messzeitpunkten als Boxplots dargestellt. Statistisch lassen sich mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Korrektur an den einzelnen Messzeitpunkten keine relevanten Unterschiede zwischen den Proteinnengen der Synukleine feststellen. Für jeden Messzeitpunkt bestand aber ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den einzelnen Synukleinen und EGFP.

Zusammenfassend folgen die drei Synukleine einer ähnlichen gemeinsamen Degradationskinetik, die sich als exponentieller Zerfall darstellt. Auch wenn sich durch multiple lineare Regression der logarithmierten Messwerte statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Proteinen berechnen ließen, sind die Proteinkonzentrationen an den einzelnen Messzeitpunkten bei direkter Gegenüberstellung mittels ANOVA nicht signifikant verschieden. Auf Basis unserer Ergebnisse bestehen somit keine Unterschiede in Hinblick auf die Stabilität zwischen den verschiedenen Synuklein-Proteinen.

4 Diskussion

4.1 Variabilität der Messdaten aus dem Western Blot

Auch wenn der Western Blot als Proteinnachweis-Verfahren seit Jahren im Einsatz und Routine in vielen Laboren ist, setzt die Generierung quantitativer Daten aus dem Western Blot eine besonders exakte Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung voraus. Bei der Planung ist neben der Probenbearbeitung, die Auswahl und Validierung der Primärantikörper, die Auswahl der Ladekontrolle, die Bestimmung des gemeinsamen linearen Bereichs von Ladekontrolle und Zielprotein im *Imaging*, die Auswahl des *Imaging*-Verfahrens und die Bestimmung der geeigneten Protein-Ladekonzentration entscheidend (Pillai-Kastoori et al. 2020). Zusätzlich zu möglichen Fehlern in diesen Planungsschritten, sind die verschiedenen manuellen Schritte beim Western Blot von Proteinkonzentrationsbestimmung über Gelelektrophorese, Transfer, Blockieren der Membranen und Darstellung der Banden fehleranfällig (Bass et al. 2017). Darüber hinaus stellen die primären Neurone ein sehr variables Ausgangsmaterial dar, deren Überlebensrate, Gehalt an Gliazellen und Stoffwechselforgänge von einer Reihe an Faktoren wie unter anderem der Qualität der Präparation, dem *Coating* der Platten, dem Alter der verwendeten Embryonen und den Bedingungen im Inkubator abhängt.

Vor dem Hintergrund der vielen möglichen Fehlerquellen, ist es schwierig die hohe Variabilität der Daten auf einen einzelnen Aspekt zurückzuführen. Da neben den Synuklein-Messwerten auch die Werte für EGFP eine sehr hohe Streuung zeigten (s. Abbildung 10), ist von generellen Problemen auszugehen, die nicht ausschließlich durch die besonderen Eigenschaften der Synukleine hervorgerufen wurden. Die Inhomogenität der Proteinproben wurde durch Nachbearbeitung der Proben mit zweiter Lyse ausgeglichen. Um die Anzahl der Versuchsschritte und damit das Fehlerpotenzial zu reduzieren, wurden alle verwendeten Primärantikörper gemeinsam inkubiert. Weil durch die höhere Konzentration von β -Tubulin und EGFP im Vergleich zu den Synukleinen, die Banden für β -Tubulin und EGFP bereits übersättigt waren (kein linearer Zusammenhang mehr zwischen Bandenintensität und Proteinkonzentration), bevor ein auswertbares Signal für die Synukleine entstanden war, mussten die Antikörper für β -Tubulin und EGFP stärker verdünnt werden, damit ein gemeinsames *Imaging* im linearen Bereich für alle Proteine möglich war.

Auch eine Anpassung der Proteinladekonzentration an die verschiedenen Konditionen ist erfolgt. Es zeigte sich bei den Proben aus den unfixierten Membranen insgesamt eine reduzierte Streuung der Messwerte an den späteren Messzeitpunkten, an denen eine geringe Restproteinkonzentration erwartet wurde. Da durch die Implementierung des zusätzlichen Fixierungsschrittes die Bandenintensität für die Synukleine deutlich verstärkt wurde, konnten wir gleichzeitig die Proteinladekonzentration reduzieren, was eine präzisere Messung erwarten ließ. Trotzdem war nach Fixierung die Streuung der Synuklein- und EGFP-Messwerte eher

erhöht. Möglicherweise fallen durch die sehr geringe Proteinladungsmenge von 5 µg Pipettierfehler verstärkt ins Gewicht und eine Anpassung auf 10 µg könnte sinnvoll sein.

Ein anderer Aspekt, der zur hohen Variabilität beiträgt, ist die Normierung der Proteinkonzentrationen durch das Haushaltsprotein β -Tubulin. Insbesondere bei den fixierten Membranen zeigt sich nach Verrechnung der Bandenintensitäten mit β -Tubulin eine größere Streuung der Messwerte (s. Abbildung 11). Die Verwendung von einem einzelnen Haushaltsprotein der Zelle wie β -Tubulin zur Ladekontrolle ist etabliert, da eine konstante Expression angenommen wird. Eine veränderte Expression unter experimentellen Bedingungen ist aber möglich und die Ladekontrolle mittels Darstellung der totalen Proteinkonzentration durch z. B. Ponceau S-Färbung, Coomassie Blau-Färbung oder Verfahren ohne Färbung auf speziell gefertigten Gelen mit UV-Messung wird von manchen Autoren vorgezogen (Gürtler et al. 2013; Li und Shen 2013). Insbesondere die Verwendung vorgefertigter Gele mit färbungsfreier Ladekontrolle (Bio-Rad, TGS Stain-Free gels) könnte für die hier durchgeführten Versuche eine Verbesserung darstellen, weil über einen höheren linearen Bereich zwischen Proteinkonzentration und Bandenintensität sowie eine höhere Konsistenz der so normierten Daten berichtet wird (Gürtler et al. 2013; Rivero-Gutiérrez et al. 2014). Nachteilig dabei sind die deutlich höheren Kosten.

Zur Darstellung der Proteinbanden ist in unserem Labor die Chemilumineszenz etabliert. Dabei ist die Bandenintensität zeitabhängig und abhängig von der Verfügbarkeit des Substrats in der ECL-Lösung. Bei einer sehr intensiven Bande ist das Substrat in kurzer Zeit verbraucht und es entstehen übersättigte Signale, während für schwächere Banden noch kein Signal erkennbar ist. Ein alternatives Verfahren ist die Darstellung der Banden mittels Fluoreszenz, die unabhängig von Zeit und Substratverfügbarkeit ist (Pillai-Kastoori et al. 2020). Ein kürzlich vorgestelltes Verfahren verzichtet komplett auf das typische *Imaging* und nutzt stattdessen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) (Ntoukas et al. 2021). TMB ist ein chromogenes Substrat, das durch die HRPO oxidiert werden kann und Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 370 und 650 nm aufweist. Bei Zugabe von Schwefelsäure wird die Oxidation gestoppt und das Absorptionsmaximum wechselt zu 450 nm. Die Proteinkonzentration des Zielproteins kann dann spektrophotometrisch im Mikroplatten-Reader gemessen werden. Es können sowohl sehr kleine (mindestens 0,5 ng) als auch größere Proteinmengen (bis 256 ng) quantifiziert werden. Vorteilhaft ist, dass das *Imaging* mittels Chemilumineszenz oder Fluoreszenz als Fehlerquelle wegfällt und die Auswertung der einzelnen Blots objektiver ist. Auch wenn das Verfahren noch neu und nicht im Detail evaluiert ist, könnte es eine verbesserte Option für quantitatives Western Blotting, wie es im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde, darstellen.

Unabhängig von der hohen Variabilität muss hinterfragt werden, inwiefern EGFP als Kontrollprotein zu den Synukleinen legitim ist. EGFP, das initial aus Quallen extrahiert und hier in der embryonalen Kortexneuronen-Kultur transgen überexprimiert wurde, kann möglicherweise nicht, unvollständig oder nur verzögert von den Kortexneuronen abgebaut werden,

was sich in der langsameren Degradation und der höheren Restproteinmenge am letzten Messzeitpunkt in den Versuchen widerspiegelt (s. Abbildung 12). Zudem ist die Degradationskinetik des Proteins unter unseren Versuchsbedingungen bisher nicht beschrieben worden, was die Interpretation der Validität der Daten erschwert. Besser als Vergleichsprotein zu den Synukleinen wäre für zukünftige Versuche ein endogenes Protein der Kortexneuronen, das von der Zelle vollständig abgebaut werden kann und für das die genauen Abbaumechanismen bekannt sind, sodass eine Gegenüberstellung aufschlussreicher ist.

4.2 Abbau der Synuklein-Proteine

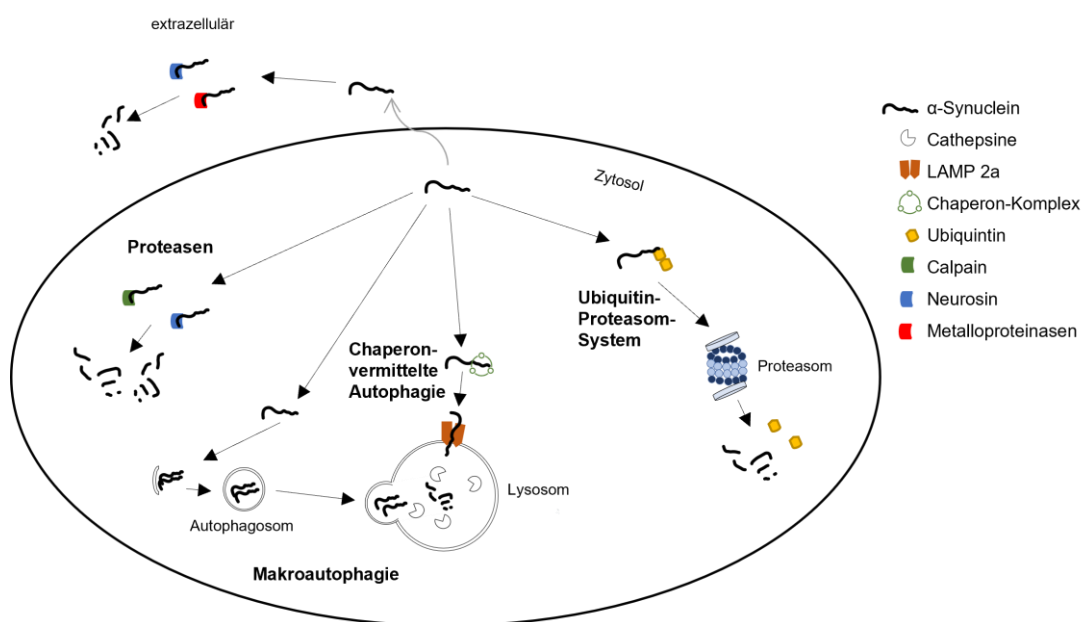


Abbildung 14: Degradationsmechanismen der Synukleine (modifiziert nach Xiluori et al.). Schematische Darstellung der verschiedenen Abbauege der Synuklein-Proteine: Neben der Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System ist intrazellulär auch ein Abbau durch freie Proteasen beschrieben. Zusätzlich spielt die Autophagozytose mit der Chaperon-vermittelten Autophagie sowie der Makroautophagie eine wichtige Rolle.

Während die Abbaumechanismen von α -Synuklein umfangreich untersucht wurden und zum Teil verstanden sind, liegen sehr begrenzte Informationen zu den Degradationsmechanismen von β - und γ -Synuklein vor. Die für α -Synuklein relevanten Abbaumechanismen sind in Abbildung 14 dargestellt. Dabei sind in Abhängigkeit von Lokalisation, Aggregationsgrad und posttranslationalen Modifikationen des Proteins unterschiedliche Abbaumechanismen vorrangig aktiv (Stefanis et al. 2019).

Im Rahmen des Ubiquitin-Proteasom-Systems wird das Protein durch spezielle Ligasen mit einer Ubiquitin-Kette versehen, die vom Proteasom erkannt wird. Das Proteasom baut das Substrat in definierte Oligopeptide ab und Ubiquitin wird wieder frei. Das Ubiquitin-Proteasom-System wurde durch verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen als Abbaueg für α -Synuklein identifiziert (Webb et al. 2003; Ebrahimi-Fakhari et al. 2011; Alvarez-Castelao et

al. 2014). Es scheint dabei sowohl endogenes als auch transgen überexprimiertes α -Synuklein in monomerer Form und als lösliche Oligomere abzubauen, α -Synuklein-Fibrillen aber sind gegenüber dem proteasomalen Abbau resistent (Emmanouilidou et al. 2010; Ebrahimi-Fakhari et al. 2011; Alvarez-Castelao et al. 2014).

Die Autophagozytose umfasst drei Gruppen, von denen die Makroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie für α -Synuklein relevant sind (Cuervo et al. 2004; Mak et al. 2010). Bei der Makroautophagie werden Zellorganelle oder Proteine, auch in aggregierter Form, in Autophagosomen aufgenommen, die dann wiederum mit dem Lysosom fusionieren und das Autophagolysosom bilden. Im sauren Lumen wird das Substrat dann durch Proteasen, Lipasen und Nukleasen abgebaut. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA, *chaperone-mediated autophagy*) wird das Substrat anhand einer spezifischen Pentapeptid-Sequenz von einem Chaperon-Komplex im Zytosol erkannt und zur Lysosomenmembran transportiert. Das *lysosomal membrane-associated protein 2a* (LAMP-2a, Lysosomen-Membran assoziiertes Protein 2a) vermittelt die Aufnahme des Proteins in das Lysosom, wo es abgebaut wird. Für die Autophagozytose wird eine verstärkte Aktivität bei erhöhter α -Synuklein Konzentration sowie bei transgener Überexpression beschrieben (Batelli et al. 2011; Ebrahimi-Fakhari et al. 2011). Einzelne oligomere α -Synuklein-Spezies scheinen aber auch gegenüber dem Abbau durch Autophagozytose resistent zu sein und eine Inhibition des eigenen Abbaus (sowohl über Autophagozytose als auch durch das Proteasom) wurde in verschiedenen experimentellen Konditionen beobachtet (Cuervo et al. 2004; Emmanouilidou et al. 2010; Tanik et al. 2013). Für γ -Synuklein wurde wie für α -Synuklein eine Inhibition des 20S-Proteasoms beschrieben, während β -Synuklein die Proteasomen-Inhibition durch die beiden anderen Proteine antagonisieren konnte (Snyder et al. 2005).

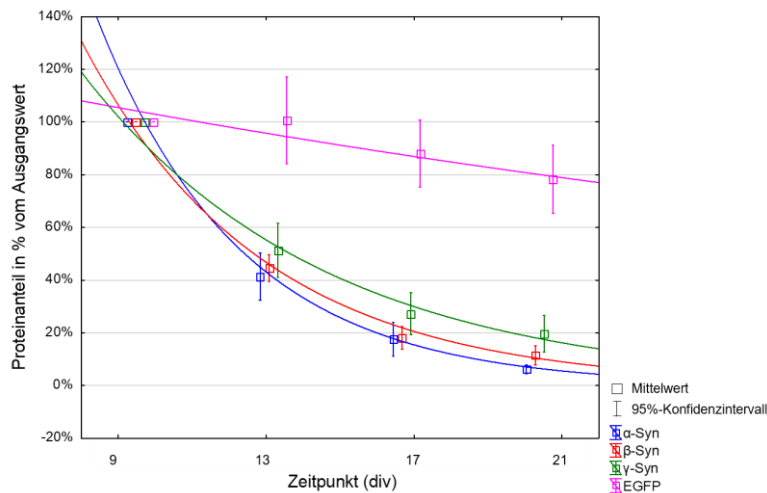


Abbildung 15: Mittelwertepplot für die Synukleine und EGFP im direkten Vergleich. Im direkten Vergleich der vier untersuchten Proteine im orientierenden Mittelwertepplot zeigt sich die sehr ähnliche, exponentielle Degradationskinetik der drei Synukleine gegenüber der linearen Degradation von EGFP.

In unserem Modell stellt sich die Degradation der drei Synuklein-Proteine als exponentielle Degradation dar, dabei sind die Unterschiede zwischen α -, β - und γ -Synuklein minimal (Abbildung 15). Es kann also von ähnlichen Degradationsmechanismen für die Proteine ausgegangen werden. Am initialen Messzeitpunkt (div 9) liegt eine hohe Konzentration der transgen überexprimierten Synuklein-Proteine vor, darauf folgt ein schneller Abfall der Proteinkonzentration bis etwa div 15. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen, die für α -Synuklein durchgeführt wurden, könnte bei diesen hohen Proteinkonzentration der Abbau über Autophagozytose im Vordergrund stehen, wodurch größere Proteinmenge in kurzer Zeit degradiert werden können. Nach div 15 verläuft die Degradation langsamer. Die Proteinkonzentration ist bereits deutlich reduziert und ein Abbau über das Proteasom-Ubiquitin-System in diesen Konditionen denkbar. Die hier beobachtete Degradationskinetik ist durch die bisher bekannten Degradationsmechanismen für α -Synuklein, unter Annahme von ähnlichen Mechanismen für die anderen Synukleine, insgesamt nachvollziehbar zu erklären. Da aber die einzelnen Abbauege nicht untersucht wurden, ist diese Übertragung der Ergebnisse aus Untersuchungen zu α -Synuklein hypothetisch.

Inwieweit die hier beschriebene Degradationskinetik in unserem Zellkulturmodell mit transgener Überexpression der drei Synukleine mit *AU1-tag* auf die Situation *in vivo* übertragbar ist, bleibt zu hinterfragen. Für α -Synuklein wurde nachgewiesen, dass in Abhängigkeit verschiedener Konditionen unterschiedliche Abbaumechanismen rekrutiert werden. Folglich ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Degradation von endogenem α -, β - und γ -Synuklein *in vivo* im Menschen, einer anderen Kinetik folgt, als hier ermittelt wurde. Auch wenn bisher kein Einfluss von der Ergänzung eines *AU1-tags* auf die Degradation von Proteinen beschrieben wurde, könnte die Anheftung dieser Peptidsequenz den Abbau durchaus verändern und die Proteine z. B. stabiler machen.

Nichtsdestotrotz ist das Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen der Degradationskinetik von α -, β - und γ -Synuklein ein Ergebnis, das zwar in weiteren Untersuchungen reevaluiert werden muss, aber von dem eine Übertragung auf andere Systeme und auf den Menschen potenziell sinnvoll erscheint. Auf Basis dieser Untersuchungen ist die initiale Hypothese, dass Unterschiede in der Stabilität der drei Proteine zu ihrer differenziellen Akkumulation und Neurotoxizität beitragen könnten, zu verwerfen. Trotzdem könnten Stabilitätsunterschiede unter anderem durch eine unterschiedliche Beeinflussung der Degradationsmechanismen für die verschiedenen α - und β -Synuklein-Mutanten von Relevanz sein und ihre erhöhte Neurotoxizität mit bedingen. Eine Untersuchung der Degradationskinetik der Mutanten im Vergleich zu den WT-Synukleinen nach weiterer Optimierung des Nachweisverfahrens wäre eine interessante Ergänzung der hier präsentierten Ergebnisse.

4.3 Stärken und Schwächen der Arbeit

Die beträchtliche Variabilität der einzelnen Messdaten im Western Blot, die unabhängig von den verschiedenen biologischen Replikaten und den durchgeführten Anpassungen des Verfahrens bestand, stellt einen entscheidenden kritischen Faktor dieser Arbeit dar. Die Präzision und Notwendigkeit der Optimierung aller Variablen, die für die zuverlässige Generierung quantitativer Daten aus dem Western Blot unerlässlich ist, wurde unterschätzt. Auch nachträgliche Adjustierungen und Ergänzung zusätzlicher Schritte konnten die Variabilität der Daten im Ganzen nicht wegweisend verbessern. Des Weiteren ist die Wahl von EGFP als Kontrollprotein zu den Synukleinen zu überdenken. Für EGFP ist der Abbau in den embryonalen Kortexneuronen bisher nicht ausreichend evaluiert, auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit scheint das Protein sehr stabil zu sein. Es wird von der Zelle nicht endogen produziert und entsprechend nur mit Schwierigkeiten oder in geringem Anteil abgebaut und stellt deswegen nur ein unzulängliches Kontrollprotein zu den Synukleinen dar. Bei Wiederholung der Versuche ist die Implementierung eines anderen Kontrollproteins zu bedenken.

Auch wenn einzelne Ergebnisse vor dem Hintergrund der hohen Variabilität im Western Blot relativiert werden müssen, liegt die Stärke dieser Arbeit in der stetigen Anpassung und Verbesserung des Verfahrens für die hier untersuchten Proteine. Zudem wird das Kernergebnis, dass die verschiedenen Synukleine einer gemeinsamen Degradationskinetik unterliegen, gestützt dadurch, dass die unterschiedlichen Anpassungen und Ergänzungen des experimentellen Verfahrens sie nicht beeinflussten. Unabhängig von den verschiedenen Variablen, die im Western Blot verändert wurde, zeigte sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen der Degradationskinetik für α -, β - und γ -Synuklein. Dabei beruhen die Daten auf Proben aus fünf separaten biologischen Replikaten und insgesamt ca. 40 technischen Replikaten pro Protein und Zeitpunkt, damit mindestens drei separate Western Blots pro Probe und Fixierungsstatus. Die hohe Menge der ausgewerteten Daten trägt entscheidend zur Validität der präsentierten Ergebnisse bei.

5 Zusammenfassung

Das Protein α -Synuklein, das neben β - und γ -Synuklein Mitglied der Synuklein-Familie ist, trägt entscheidend zur Pathogenese der Parkinson Erkrankung bei. Auch β -Synuklein steht durch zwei Mutationen in ätiopathologischer Verbindung mit der Entstehung einer Synukleinopathie, der DLB. Demgegenüber steht γ -Synuklein nicht mit neurodegenerativen Erkrankungen im Zusammenhang und zeigt nur unter speziellen experimentellen Konditionen die Fähigkeit in unlösliche Aggregate überzugehen. Das Aggregationspotenzial der drei Proteine mit Bildung toxischer Spezies wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, dabei spielt die Proteinkonzentration, beeinflusst durch z. B. Überexpression im experimentellen Kontext oder Duplikationen und Triplikationen des SNCA-Gens bei früh einsetzender PD, eine entscheidende Rolle. Neben der Regulation der Synthese wird das Proteingleichgewicht durch die Degradationsmodalitäten aufrechterhalten. Unterschiede im Abbau und damit in der Stabilität der Proteine wurden als Ursache für das unterschiedliche Aggregationspotenzial und damit die unterschiedliche Neurotoxizität der drei Synuklein-Proteine angenommen. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde die Degradationskinetik für die drei Proteine auf Basis eines Zellkulturmodells in embryonalen Kortexneuronen der Ratte mit transgener Überexpression der drei Synukleine durch Adeno-assoziierte virale Vektoren ermittelt. Die drei Synuklein-Proteine zeigten eine sehr ähnliche Degradationskinetik, die sich als exponentieller Zerfall darstellte. Initial ließ sich eine rasche Degradation mit Reduktion der Proteinkonzentration um 70 % über die ersten sieben Tage nach Expressionsstopp zeigen, mit im Anschluss verlangsamter Degradation, bei der die Proteinkonzentration über die nächsten 7 Tage gegen null ging. Auf Basis dieser Untersuchungen ist von einer ähnlichen Degradationskinetik für die drei Synuklein-Proteine auszugehen. Unterschiede in der Stabilität scheinen kein entscheidender Faktor für die unterschiedlichen Neurotoxizität von α -, β - und γ -Synuklein zu sein.

6 Anhang

Tabelle A1: Übersicht über verschiedene Variablen beim Western Blot

Variablen	Mögliche Störfaktoren	Getestete Varianten	Einfluss
Proteinproben			
Proteinkonzentration		5 µg – 40 µg	In Abhängigkeit von den anderen Variablen können unterschiedliche Proteinkonzentrationen sinnvoll sein
Probenqualität	Probeninhomogenität nach (wiederholtem) Einfrieren	Einfache Lyse	Keine ausreichende Homogenisierung der Proben
		Nachbearbeitung der Proben mit zweiter Lyse	Verbesserte Replizierbarkeit, homogene Proben
Adhäsion der Proteine an Membran	Ablösung der Synuklein-Proteine von Membran	Standardverfahren	
		Fixierung mittels PFA und Glutaraldehyd	Robustere Nachweisbarkeit der Synuklein-Proteine
Antikörper			
Verschiedene anti-AU1-Antikörper	Unterschiedliche Affinität fürs Epitop und unterschiedliches Hintergrundsignal	Maus, monoklonal, HiSS	
		Maus, polyklonal, HiSS	verstärktes Hintergrundsignal bei reduziertem Signal für AU1 im Vergleich zu anderen AK
		Kaninchen, polyklonal, abcam	
Konzentration	zu geringe oder zu hohe Konzentration der	Anti-AU1: 1:1000 – 1:500	Bei gemeinsamer Inkubation aller drei Primär-AK: Verhältnis der Konzentrationen zueinander entscheidend, damit

	einzelnen Antikörper (im Verhältnis zueinander)	Anti-GFP: 1:100.000 – 1:5.000	bei <i>Imaging</i> auf einer Membran alle Proteine gleichzeitig eine scharf erkennbare Bande zeigen und nicht einzelne noch zu schwach, während andere schon überbelichtet sind.
		Anti- β -Tubulin: 1:50.000 – 1:10.000	
Inkubations- schema		Sequenziell	teilweise erschwerte Normierbarkeit durch unterschiedliche <i>Imaging</i> -Einstellungen für Synukleine und die anderen Proteine
		monophasisch	verbesserte Vergleichbarkeit
Verdünnungslösung		5 % Milchpulver in TBS-T	verbesserte Detektion der hier gesuchten Proteine
		4 % BSA in TBS-T	deutlich stärkeres Hintergrundsignal
Verdünnungsvolumen	Zu geringes Volumen und damit unvollständiger Kontakt der Membran zu Antikörpern	4 ml vs. 6 ml	Mindestens 6 ml Verdünnungsvolumen für AK notwendig bei Inkubation in 50 ml Falkonröhrchen
<i>Imaging</i>			
ECL-Lösung		Selbst angesetzte ECL-Lösung	bei Optimierung der anderen Variablen bessere Ergebnisse mit selbst hergestellter ECL-Lösung.
		Femto-ECL-Lösung	deutlich sensitiver für minimale Proteinkonzentrationen, aber mehr Hintergrundsignal

7 Literaturverzeichnis

- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JMG, Armanini M, Ryan A, et al. (2000): Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron* **25**, 239–252
- Alvarez-Castelao B, Goethals M, Vandekerckhove J, Castano JG (2014): Mechanism of cleavage of alpha-synuclein by the 20S proteasome and modulation of its degradation by the RedOx state of the N-terminal methionines. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1843**, 352–365
- Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU, Oertel WH, Hartmann A (2008): Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. *Exp Neurol* **210**, 182–193
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, et al. (2013): Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* **28**, 811–813
- Azeredo da Silveira S, Schneider B, Cifuentes-Diaz C, Sage D, Abbas-Terki T, Iwatsubo T, Unser M, Aebischer P (2009): Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **18**, 872–887
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998): Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* **152**, 879
- Baba Y, Markopoulou K, Putzke JD, Whaley NR, Farrer MJ, Wszolek ZK, Uitti RJ (2006): Phenotypic Commonalities in Familial and Sporadic Parkinson Disease. *Arch Neurol* **63**, 579–583
- Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ (2017): An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* **27**, 4–25
- Batelli S, Peverelli E, Forloni G, Albani D (2011): Macroautophagy and the proteasome are differently involved in the degradation of alpha-synuclein wild type and mutated A30P in an in vitro inducible model (PC12/TetOn). *Neuroscience* **195**, 128–137
- Béraud D, Hathaway HA, Trecki J, Chasovskikh S, Johnson DA, Johnson JA, Federoff HJ, Shimoji M, Mhyre TR, Maguire-Zeiss KA (2013): Microglial Activation and Antioxidant Responses Induced by the Parkinson's Disease Protein α -Synuclein. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**, 94
- Berns KI, Linden RM (1995): The cryptic life style of adenoassociated virus. *BioEssays* **17**, 237–245
- Bertoncini C, Rasia R, Lamberto G, Binolfi A, Zweckstetter M, Griesinger C, Fernandez C (2007): Structural Characterization of the Intrinsically Unfolded Protein β -Synuclein, a Natural Negative Regulator of α -Synuclein Aggregation. *J Mol Biol* **372**, 708–722
- Boyer DR, Li B, Sun C, Fan W, Zhou K, Hughes MP, Sawaya MR, Jiang L, Eisenberg DS (2020): The α -synuclein hereditary mutation E46K unlocks a more stable, pathogenic fibril structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 3592

- Braak H, Braak E (2000): Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 247, II3–II10
- Braak H, Del Tredici K (2004): Poor and protracted myelination as a contributory factor to neurodegenerative disorders. *Neurobiol Aging* 25, 19–23
- Braak H, Tredici KD (2017): Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *J Park Dis* 7, S71
- Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E (2003a): Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197–211
- Buchman VL, Hunter HJA, Pinõn LGP, Thompson J, Privalova EM, Ninkina NN, Davies AM (1998): Persyn, a Member of the Synuclein Family, Has a Distinct Pattern of Expression in the Developing Nervous System. *J Neurosci* 18, 9335
- Burke RE, Dauer WT, Vonsattel JPG (2008): A Critical Evaluation of The Braak Staging Scheme for Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 64, 485
- Burke WJ, Li SW, Williams EA, Nonneman R, Zahm DS (2003): 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Res* 989, 205–213
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton M, Südhof TC (2010): α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663
- Butler B, Saha K, Rana T, Becker JP, Sambo D, Davari P, Goodwin JS, Khoshbouei H (2015): Dopamine Transporter Activity Is Modulated by α -Synuclein. *J Biol Chem* 290, 29542
- 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 α -Synuclein. *J Neurosci* 22, 8797
- Calì T, Ottolini D, Negro A, Brini M (2012): α -Synuclein Controls Mitochondrial Calcium Homeostasis by Enhancing Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Interactions. *J Biol Chem* 287, 17914
- Calo L, Wegrzynowicz M, Santivañez-Perez J, Grazia Spillantini M (2016): Synaptic failure and α -synuclein. *Mov Disord* 31, 169–177
- Caminiti SP, Presotto L, Baroncini D, Garibotto V, Moresco RM, Gianolli L, Volonté MA, Antonini A, Perani D (2017): Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early Parkinson's disease. *NeuroImage Clin* 14, 734
- Celej MS, Sarroukh R, Goormaghtigh E, Fidelio GD, Ruyschaert JM, Raussens V (2012): Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem J* 443, 719–726
- Chandra S, Fornai F, Kwon H-B, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, Hammer RE, Battaglia G, German DC, Castillo PE, Südhof TC (2004): Double-knockout mice for α - and β -synucleins: Effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14966

- Chartier-Harlin M-C, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, et al. (2004): α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet* 364, 1167–1169
- Chen L, Feany MB (2005): α -Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat Neurosci* 8, 657–663
- Cheng H-C, Ulane CM, Burke RE (2010): Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol* 67, 715–725
- Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rane A, Andersen JK (2010): Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neurosci Lett* 486, 235
- Collier TJ, Redmond DE, Jr, Steece-Collier K, Lipton JW, Manfredsson FP (2016): Is Alpha-Synuclein Loss-of-Function a Contributor to Parkinsonian Pathology? Evidence from Non-human Primates. *Front Neurosci* 10, 12
- Connolly BS, Lang AE (2014): Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* 311, 1670–1683
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr (2000): Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 571
- Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, Sandal M, Clarke RW, Dunne P, Aprile FA, et al. (2012): Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of α -Synuclein. *Cell* 149, 1048
- Cubellis MV, Cailleux F, Blundell TL, Lovell SC (2005): Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 58, 880–892
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004): Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* 305, 1292–1295
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999): The substantia nigra of the human brainII. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122, 1437–1448
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM (1998): Stabilization of α -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes. *J Biol Chem* 273, 9443–9449
- de Lau LML, Giesbergen PCLM, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB (2004): Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology* 63, 1240–1244
- Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Björklund A (2012): Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of α -synuclein in mid-brain dopamine neurons. *Neurobiol Dis* 45, 939–953

- Dedmon MM, Lindorff-Larsen K, Christodoulou J, Vendruscolo M, Dobson CM (2005): Mapping Long-Range Interactions in α -Synuclein using Spin-Label NMR and Ensemble Molecular Dynamics Simulations. *J Am Chem Soc* 127, 476–477
- Deleersnijder A, Gerard M, Debyser Z, Baekelandt V (2013): The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends Mol Med* 19, 368–377
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2008): Mitochondrial Import and Accumulation of α -Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic Neuronal Cultures and Parkinson Disease Brain. *J Biol Chem* 283, 9089
- DGN (2016): Idiopathisches Parkinson-Syndrom (Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie); S3 Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. <https://dgn.org/leitlinien/030-010-idiopathisches-parkinson-syndrom/>; abgerufen am 24.01.2021
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007): Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68, 384–386
- Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, Lee VMY, Trojanowski JQ (2002): Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. *Ann Neurol* 52, 205–210
- Ebrahimi-Fakhari D, Cantuti-Castelvetri I, Fan Z, Rockenstein E, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ, Unni VK (2011): Distinct Roles In Vivo for the Ubiquitin–Proteasome System and the Autophagy–Lysosomal Pathway in the Degradation of α -Synuclein. *J Neurosci* 31, 14508
- Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, Wang L, Züchner S, Konidari I, Wang G, et al. (2010): Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 74, 97
- Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K (2010): Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol Aging* 31, 953–968
- Fahn S (1997): Levodopa-Induced Neurotoxicity. *CNS Drugs* 8, 376–393
- Fauvet B, Mbefo MK, Fares MB, Desobry C, Michael S, Ardah MT, Tsika E, Coune P, Prudent M, Lion N, et al. (2012): α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer. *J Biol Chem* 287, 15345
- Fearnley JM, Lees AJ (1991): Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114, 2283–2301
- Fujioka S, Ogaki K, Tacik P, Uitti RJ, Ross OA, Wszolek ZK (2014): Update on novel familial forms of Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* 20, S29
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002): α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160–164

- Galvin JE, Uryu K, Lee VMY, Trojanowski JQ (1999): Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains α -, β -, and γ -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13450
- Galvin JE, Lee VMY, Trojanowski JQ (2001): Synucleinopathies: Clinical and Pathological Implications. *Arch Neurol* 58, 186–190
- George, Jin, Woods, Clayton (1995): Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361–372
- George S, Rey NL, Reichenbach N, Steiner JA, Brundin P (2013): α -Synuclein: The Long Distance Runner: α -Synuclein: The Long Distance Runner. *Brain Pathol* 23, 350–357
- Giasson BI, Murray IVJ, Trojanowski JQ, Lee VMY (2001): A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly. *J Biol Chem* 276, 2380–2386
- Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, et al. (2008): Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71, 670
- Golebiewska U, Zurawsky C, Scarlata S (2014): Defining the Oligomerization State of γ -Synuclein in Solution and in Cells. *Biochemistry* 53, 293
- Gonçalves MA (2005): Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2, 1–17
- Gorbatyuk OS, Li S, Nash K, Gorbatyuk M, Lewin AS, Sullivan LF, Mandel RJ, Chen W, Meyers C, Manfredsson FP, Muzyczka N (2010): In Vivo RNAi-Mediated α -Synuclein Silencing Induces Nigrostriatal Degeneration. *Mol Ther* 18, 1450
- Green MR, Sambrook J, Sambrook J: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4th ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y 2012
- Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Seilhean D, Hauw JJ, Duyckaerts C (2010): A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol Aging* 31, 99–103
- Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE, Posch A (2013): Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 433, 105–111
- Haggerty DL, Grecco GG, Reeves KC, Atwood B (2020): Adeno-Associated Viral Vectors in Neuroscience Research. *Mol Ther Methods Clin Dev* 17, 69
- Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J (2008): The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 115, 409–415
- Hashimoto M, Rockenstein E, Mante M, Mallory M, Masliah E (2001): β -Synuclein Inhibits α -Synuclein Aggregation: A Possible Role as an Anti-Parkinsonian Factor. *Neuron* 32, 213–223
- Hawkes CH, Tredici KD, Braak H (2007): Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 599

- Hoyer W, Cherny D, Subramaniam V, Jovin TM (2004): Impact of the Acidic C-Terminal Region Comprising Amino Acids 109–140 on α -Synuclein Aggregation in Vitro †. *Biochemistry* 43, 16233–16242
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Fianagan L, Kitte A, Saitoh T (1995): The Precursor Protein of Non-A β Component of Alzheimer's Disease Amyloid Is a Presynaptic Protein of the Central Nervous System. *Neuron* 14, 467–475
- Jain MK, Singh P, Roy S, Bhat R (2018): Comparative Analysis of the Conformation, Aggregation, Interaction, and Fibril Morphologies of Human α -, β -, and γ -Synuclein Proteins. *Biochemistry* 57, 3830–3848
- Jankovic J (2008): Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 368–376
- Janowska MK, Baum J (2016): The loss of inhibitory C-terminal conformations in disease associated P123H β -synuclein. *Protein Sci Publ Protein Soc* 25, 286
- Jia T, Liu YE, Liu J, Shi YE (1999): Stimulation of Breast Cancer Invasion and Metastasis by Synuclein γ . *Cancer Res* 59, 742–747
- Karpinar DP, Balija MBG, Kügler S, Opazo F, Rezaei-Ghaleh N, Wender N, Kim HY, Taschenberger G, Falkenburger BH, Heise H, et al. (2009): Pre-fibrillar α -synuclein variants with impaired β -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J* 28, 3256
- Koller WC (2000): Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 55
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O (1998): AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18, 106–108
- Kruger R, Kuhn W, Leenders KL, Sprengelmeyer R, Muller T, Woitalla D, Portman AT, Maguire RP, Veenma L, Schroder U, et al. (2001): Familial parkinsonism with synuclein pathology: Clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology* 56, 1355–1362
- Kügler S, Hahnewald R, Garrido M, Reiss J (2007): Long-Term Rescue of a Lethal Inherited Disease by Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer in a Mouse Model of Molybdenum-Cofactor Deficiency. *Am J Hum Genet* 80, 291
- Langston JW, Forno LS (1978): The hypothalamus in parkinson disease. *Ann Neurol* 3, 129–133
- Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT (2002): Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418, 291–291
- Lau A, So RWL, Lau HHC, Sang JC, Ruiz-Riquelme A, Fleck SC, Stuart E, Menon S, Visanji NP, Meisl G, et al. (2020): α -Synuclein Strains Target Distinct Brain Regions and Cell Types. *Nat Neurosci* 23, 21
- Lavedan C, Leroy E, Torres R, Dehejia A, Dutra A, Buchholtz S, Nussbaum R, Polymeropoulos MH (1998): Genomic Organization and Expression of the Human β -Synuclein Gene (SNCB). *Genomics* 54, 173–175

- Lawton M, Ben-Shlomo Y, May MT, Baig F, Barber TR, Klein JC, Swallow DMA, Malek N, Grosset KA, Bajaj N, et al. (2018): Developing and validating Parkinson's disease subtypes and their motor and cognitive progression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89, 1279–1287
- Lee BR, Kamitani T (2011): Improved Immunodetection of Endogenous α -Synuclein. *PLoS ONE* 6, e23939
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009): Parkinson's disease. *The Lancet* 373, 2055–2066
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Picri L, Madona K, Dürr A, Melki R, et al. (2013): G51D α -synuclein mutation causes a novel Parkinsonian–pyramidal syndrome. *Ann Neurol* 73, 459–471
- Li R, Shen Y (2013): An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sci* 92, 747
- Lim PS, Jenson AB, Cowser L, Nakai Y, Lim LY, Jin XW, Sundberg JP (1990): Distribution and specific identification of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides. *J Infect Dis* 162, 1263–1269
- Lim SY, Fox SH, Lang AE (2009): Overview of the Extranigral Aspects of Parkinson Disease. *Arch Neurol* 66, 167–172
- Liu D, Jin L, Wang H, Zhao H, Zhao C, Duan C, Lu L, Wu B, Yu S, Chan P, et al. (2008): Silencing α -Synuclein Gene Expression Enhances Tyrosine Hydroxylase Activity in MN9D Cells. *Neurochem Res* 33, 1401
- Ludtmann MHR, Angelova PR, Ninkina NN, Gandhi S, Buchman VL, Abramov AY (2016): Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase. *J Neurosci* 36, 10510
- Mahlknecht P, Seppi K, Poewe W (2015): The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. *J Park Dis* 5, 681
- Mak SK, McCormack AL, Manning-Boğ AB, Cuervo AM, Monte DAD (2010): Lysosomal Degradation of α -Synuclein in Vivo. *J Biol Chem* 285, 13621
- Markesbery WR, Jicha GA, Liu H, Schmitt FA (2009): Lewy Body Pathology in Normal Elderly Subjects. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 816
- Markopoulou K, Dickson DW, McComb RD, Wszolek ZK, Katechalidou L, Avery L, Stansbury MS, Chase BA (2008): Clinical, Neuropathological and Genotypic Variability in SNCA A53T Familial Parkinson's Disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 116, 25
- McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM (2014): α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat Disord* 20, S62–S67
- McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor JP, Weintraub D, Aarsland D, Galvin J, Attems J, Ballard CG, et al. (2017): Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* 89, 88–100

- McKinnon C, Snoo MLD, Gondard E, Neudorfer C, Chau H, Ngana SG, O'Hara DM, Brotchie JM, Koprich JB, Lozano AM, et al. (2020): Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by α -synuclein. *Acta Neuropathol Commun* **8**, 17
- McLean PJ, Kawamata H, Ribich S, Hyman BT (2000): Membrane Association and Protein Conformation of α -Synuclein in Intact Neurons: effect of Parkinson's disease-linked mutations. *J Biol Chem* **275**, 8812–8816
- Meissner WG, Traon APL, Foubert-Samier A, Galabova G, Galitzky M, Kutzelnigg A, Laurens B, Lühns P, Medori R, Péran P, et al. (2020): A Phase 1 Randomized Trial of Specific Active α -Synuclein Immunotherapies PD01A and PD03A in Multiple System Atrophy. *Mov Disord* **35**, 1957
- Mor DE, Tsika E, Mazzulli JR, Gould NS, Kim H, Daniels MJ, Doshi S, Gupta P, Grossman JL, Tan VX, et al. (2017): Dopamine induces soluble α -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. *Nat Neurosci* **20**, 1560
- Moriarty GM, Olson MP, Atieh TB, Janowska MK, Khare SD, Baum J (2017): A pH-dependent switch promotes β -synuclein fibril formation via glutamate residues. *J Biol Chem* **292**, 16368–16379
- Nakamura K, Nemani VM, Azarbal F, Skibinski G, Levy JM, Egami K, Munishkina L, Zhang J, Gardner B, Wakabayashi J, et al. (2011): Direct Membrane Association Drives Mitochondrial Fission by the Parkinson Disease-associated Protein α -Synuclein. *J Biol Chem* **286**, 20710–20726
- Ninkina N, Peters O, Millership S, Salem H, Putten H van der, Buchman VL (2009): γ -Synucleinopathy: neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein. *Hum Mol Genet* **18**, 1779
- Nishioka K, Wider C, Vilariño-Güell C, Soto-Ortolaza AI, Lincoln SJ, Kachergus JM, Jasinska-Myga B, Ross OA, Rajput A, Robinson CA, et al. (2010): Association of α -, β -, and γ -Synuclein With Diffuse Lewy Body Disease. *Arch Neurol* **67**, 970
- Nonaka T, Iwatsubo T, Hasegawa M (2005): Ubiquitination of alpha-synuclein. *Biochemistry* **44**, 361–368
- Ntoukas A, Niarchos A, Tsika AC, Mantzoukas S, Spyroulias GA, Poulas K (2021): A quantitative western blot technique using TMB: Comparison with the conventional technique. *Electrophoresis* **42**, 786–792
- Ohtake H, Limprasert P, Fan Y, Onodera O, Kakita A, Takahashi H, Bonner LT, Tsuang DW, Murray IVJ, Lee VM-Y, et al. (2004): β -Synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies. *Neurology* **63**, 805
- Olgati S, Thomas A, Quadri M, Breedveld GJ, Graafland J, Eussen H, Douben H, de Klein A, Onofri M, Bonifati V (2015): Early-onset parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication: Clinical and genetic findings in a novel family. *Parkinsonism Relat Disord* **21**, 981–986

- Ordonez DG, Lee MK, Feany MB (2018): α -synuclein induces mitochondrial dysfunction through spectrin and the actin cytoskeleton. *Neuron* 97, 108
- Ortolano S, Spuch C, Navarro C (2012): Present and Future of Adeno Associated Virus Based Gene Therapy Approaches. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 6, 47–66
- Osterberg VR, Spinelli KJ, Weston LJ, Luk KC, Woltjer RL, Unni VK (2015): Progressive Aggregation of Alpha-Synuclein and Selective Degeneration of Lewy Inclusion-Bearing Neurons in a Mouse Model of Parkinsonism. *Cell Rep* 10, 1252–1260
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B (1999): α -Synuclein Shares Physical and Functional Homology with 14-3-3 Proteins. *J Neurosci* 19, 5782
- Oueslati A, Fournier M, Lashuel HA: Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of α -synuclein. In: *Progress in Brain Research*. Band 183; Elsevier 2010, 115–145
- Pan ZZ, Bruening W, Giasson BI, Lee VMY, Godwin AK (2002): γ -Synuclein Promotes Cancer Cell Survival and Inhibits Stress- and Chemotherapy Drug-induced Apoptosis by Modulating MAPK Pathways *. *J Biol Chem* 277, 35050–35060
- Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H, Funk RHW (2010): Progression of Parkinson's Disease Pathology Is Reproduced by Intragastric Administration of Rotenone in Mice. *PLoS ONE* 5
- Papapetropoulos S, Paschalis C, Athanassiadou A, Papadimitriou A, Ellul J, Polymeropoulos MH, Papapetropoulos T (2001): Clinical phenotype in patients with α -synuclein Parkinson's disease living in Greece in comparison with patients with sporadic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70, 662–665
- Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttilä T, Autere JM, Alafuzoff I (2005): α -Synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol* 57, 82–91
- Peelaerts W, Bousset L, Perren AV der, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Haute CV den, Melki R, Baekelandt V (2015): α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ (2002): A Role for α -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. *J Neurosci* 22, 3090
- Perren AV der, Gelders G, Fenyi A, Bousset L, Brito F, Peelaerts W, Haute CV den, Gentleman S, Melki R, Baekelandt V (2020): The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 132, 977
- Pham CLL, Leong SL, Ali FE, Kenche VB, Hill AF, Gras SL, Barnham KJ, Cappai R (2009): Dopamine and the Dopamine Oxidation Product 5,6-Dihydroxylindole Promote Distinct On-Pathway and Off-Pathway Aggregation of α -Synuclein in a pH-Dependent Manner. *J Mol Biol* 387, 771–785

- Picillo M, Lizarraga KJ, Friesen EL, Chau H, Zhang M, Sato C, Rooke G, Munhoz RP, Rogaeva E, Fraser PE, et al. (2018): Parkinsonism due to A53E α -synuclein gene mutation: Clinical, genetic, epigenetic, and biochemical features. *Mov Disord* 33, 1950–1955
- Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA (2020): A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem* 593, 113608
- Pinho R, Paiva I, Jerčić KG, Fonseca-Ornelas L, Gerhardt E, Fahlbusch C, Garcia-Esparcia P, Kerimoglu C, Pavlou MAS, Villar-Piqué A, et al. (2019): Nuclear localization and phosphorylation modulate pathological effects of alpha-synuclein. *Hum Mol Genet* 28, 31–50
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubinbenstein J, Boyer R, et al. (1997): Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276, 2045–2047
- Poulopoulos M, Levy OA, Alcalay RN (2012): The neuropathology of genetic Parkinson's disease. *Mov Disord* 27, 831–842
- Raina A, Leite K, Guerin S, Mahajani SU, Chakrabarti KS, Voll D, Becker S, Griesinger C, Bähr M, Kügler S (2020): Dopamine promotes the neurodegenerative potential of β -synuclein. *J Neurochem* 156, 674–691
- Rivero-Gutiérrez, Anzola, Martínez-Augustin, Sánchez de Medina (2014): Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem* 467, 1–3
- Roberts H, Brown D (2015): Seeking a Mechanism for the Toxicity of Oligomeric α -Synuclein. *Biomolecules* 5, 282–305
- Robertson D, Schmidt O, Ninkina N, Jones P, Sharkey J, Buchman V (2004): Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *J Neurochem* 89
- Russell DW (2003): AAV loves an active genome. *Nat Genet* 34, 241–242
- Sasaki A, Arawaka S, Sato H, Kato T (2015): Sensitive western blotting for detection of endogenous Ser129-phosphorylated α -synuclein in intracellular and extracellular spaces. *Sci Rep* 5, 14211
- Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Boeve BF, Graff-Radford J, Rocca WA, Mielke MM (2017): Survival and Causes of Death Among People With Clinically Diagnosed Synucleinopathies With Parkinsonism: A Population-Based Study. *JAMA Neurol* 74, 839–846
- Savitt D, Jankovic J (2019): Targeting α -Synuclein in Parkinson's Disease: Progress Towards the Development of Disease-Modifying Therapeutics. *Drugs* 79, 797–810
- Schaser AJ, Osterberg VR, Dent SE, Stackhouse TL, Wakeham CM, Boutros SW, Weston LJ, Owen N, Weissman TA, Luna E, et al. (2019): Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. *Sci Rep* 9, 10919
- Schofield DJ, Irving L, Calo L, Bogstedt A, Rees G, Nuccitelli A, Narwal R, Petrone M, Roberts J, Brown L, et al. (2019): Preclinical development of a high affinity α -synuclein antibody,

- MEDI1341, that can enter the brain, sequester extracellular α -synuclein and attenuate α -synuclein spreading in vivo. *Neurobiol Dis* 132, 104582
- Seidel K, Schöls L, Nuber S, Petrasch-Parwez E, Gierga K, Wszolek Z, Dickson D, Gai W, Bornemann A, Riess O, et al. (2010): First appraisal of brain pathology owing to A30P mutant alpha-synuclein. *Ann Neurol* 67, 684–689
- Sengoku R, Saito Y, Ikemura M, Hatsuta H, Sakiyama Y, Kanemaru K, Arai T, Sawabe M, Tanaka N, Mochizuki H, et al. (2008): Incidence and Extent of Lewy Body-Related α -Synucleinopathy in Aging Human Olfactory Bulb. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 1072–1083
- Sharma K, Mehra S, Sawner AS, Markam PS, Panigrahi R, Navalkar A, Chatterjee D, Kumar R, Kadu P, Patel K, et al. (2020): Effect of Disease-Associated P123H and V70M Mutations on β -Synuclein Fibrillation. *ACS Chem Neurosci* 11, 2836–2848
- Shevtsova Z, Malik JMI, Michel U, Bähr M, Kügler S (2005): Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system in vitro and in vivo. *Exp Physiol* 90, 53–59
- Shevtsova Z, Malik JMI, Michel U, Schöll U, Bähr M, Kügler S (2006): Evaluation of epitope tags for protein detection after *in vivo* CNS gene transfer. *Eur J Neurosci* 23, 1961–1969
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, et al. (2003): α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 302, 841–841
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76–85
- Snyder H, Mensah K, Hsu C, Hashimoto M, Surgucheva IG, Festoff B, Surguchov A, Masliah E, Matouschek A, Wolozin B (2005): β -Synuclein Reduces Proteasomal Inhibition by α -Synuclein but Not γ -Synuclein. *J Biol Chem* 280, 7562–7569
- Souza JM, Giasson BI, Lee VM-Y, Ischiropoulos H (2000): Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Lett* 474, 116–119
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997): α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840
- Spillantini MG, Crowther AR, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M (1998): Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 251, 205–208
- Stefanis L, Emmanouilidou E, Pantazopoulou M, Kirik D, Vekrellis K, Tofaris GK (2019): How is alpha-synuclein cleared from the cell? *J Neurochem* 150, 577–590
- Stephens AD, Zacharopoulou M, Moons R, Fusco G, Seetaloo N, Chiki A, Woodhams PJ, Mela I, Lashuel HA, Phillips JJ, et al. (2020): Extent of N-terminus exposure of monomeric alpha-synuclein determines its aggregation propensity. *Nat Commun* 11, 2820

- Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, Borghammer P (2016): Pathological α -synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients: α -Synuclein in Prodromal PD. *Ann Neurol* 79, 940–949
- Sung Y, Eliezer D (2006): Secondary structure and dynamics of micelle bound β - and γ -synuclein. *Protein Sci* 15, 1162–1174
- Surgucheva I, Sharov VS, Surguchov A (2012): γ -Synuclein: Seeding of α -Synuclein Aggregation and Transmission between Cells. *Biochemistry* 51, 4743–4754
- Suzuki M, Sango K, Wada K, Nagai Y (2018): Pathological role of lipid interaction with α -synuclein in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 119, 97–106
- Tanik SA, Schultheiss CE, Volpicelli-Daley LA, Brunden KR, Lee VMY (2013): Lewy Body-like α -Synuclein Aggregates Resist Degradation and Impair Macroautophagy. *J Biol Chem* 288, 15194
- Taschenberger G, Garrido M, Tereshchenko Y, Bähr M, Zweckstetter M, Kügler S (2012): Aggregation of α Synuclein promotes progressive in vivo neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol (Berl)* 123, 671
- Taschenberger G, Toloe J, Tereshchenko J, Akerboom J, Wales P, Benz R, Becker S, Outeiro TF, Looger LL, Bähr M, et al. (2013): β -synuclein aggregates and induces neurodegeneration in dopaminergic neurons: Neurotoxicity of β -Synuclein. *Ann Neurol* 74, 109–118
- Thayanidhi N, Helm JR, Nycz DC, Bentley M, Liang Y, Hay JC (2010): α -Synuclein Delays Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi Transport in Mammalian Cells by Antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell* 21, 1850
- Timpka J, Dahlström Ö, Spreco A, Nilsson MH, Iwarsson S, Timpka T, Odin P (2018): Reduced workforce participation 5 years prior to first Parkinson's disease sick-leave. *Npj Park Dis* 4, 36
- Tretiakoff C (1919): Contribution a l'etude de l'Anatomie pathologique du Locus Niger de Soemmering avec quelques deduction relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Theses Paris
- Tsigelny IF, Bar-On P, Sharikov Y, Crews L, Hashimoto M, Miller MA, Keller SH, Platoshyn O, Yuan JXJ, Masliah E (2007): Dynamics of α -synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by β -synuclein. *FEBS J* 274, 1862–1877
- Tysnes O-B, Storstein A (2017): Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 124, 901–905
- Uversky VN (2015): Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci* 7, 18
- Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, Goedert M, Fink AL (2002): Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate: Inhibition of α -Synuclein assembly by β - and γ -Synucleins. *J Biol Chem* 277, 11970–11978
- Vargas KJ, Makani S, Davis T, Westphal CH, Castillo PE, Chandra SS (2014): Synucleins Regulate the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis. *J Neurosci* 34, 9364–9376

- Volc D, Poewe W, Kutzelnigg A, Lührs P, Thun-Hohenstein C, Schneeberger A, Galabova G, Majbour N, Vaikath N, El-Agnaf O, et al. (2020): Safety and immunogenicity of the α -synuclein active immunotherapeutic PD01A in patients with Parkinson's disease: a randomised, single-blinded, phase 1 trial. *Lancet Neurol* 19, 591–600
- Volles MJ, Lansbury PT (2002): Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism. *Biochemistry* 41, 4595–4602
- Volpicelli-Daley LA, Kirik D, Stoyka LE, Standaert DG, Harms AS (2016): How can rAAV- α -synuclein and the fibril α -synuclein models advance our understanding of Parkinson's disease? *J Neurochem* 139, 131–155
- Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F (1988): Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol (Berl)* 76, 217–221
- Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H (2013): The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Mol Neurobiol* 47, 495–508
- Weaver FM, Follett K, Stern M, Hur K, Harris C, Marks WJ, Jr, Rothlind J, Sagher O, Reda D, et al. (2009): Bilateral Deep Brain Stimulation vs Best Medical Therapy for Patients With Advanced Parkinson Disease: A Randomized Controlled Trial. *JAMA J Am Med Assoc* 301, 63
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003): α -Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome *. *J Biol Chem* 278, 25009–25013
- Weihofen A, Liu Y, Arndt JW, Huy C, Quan C, Smith BA, Baeriswyl JL, Cavegn N, Senn L, Su L, et al. (2019): Development of an aggregate-selective, human-derived α -synuclein antibody BIIB054 that ameliorates disease phenotypes in Parkinson's disease models. *Neurobiol Dis* 124, 276–288
- 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 α -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4194
- Wright JA, McHugh PC, Pan S, Cunningham A, Brown DR (2013): Counter-regulation of alpha- and beta-synuclein expression at the transcriptional level. *Mol Cell Neurosci* 57, 33–41
- Wu KP, Baum J (2010): Detection of transient inter-chain interactions in the intrinsically disordered protein α -synuclein by NMR paramagnetic relaxation enhancement. *J Am Chem Soc* 132, 5546
- Wu P, Phillips MI, Bui J, Terwilliger EF (1998): Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Transgene Integration into Neurons and Other Nondividing Cell Targets. *J Virol* 72, 5919
- Ye Q, Zheng MH, Cai Q, Feng B, Chen XH, Yu BQ, Gao YB, Ji J, Lu AG, Li JW, et al. (2008): Aberrant expression and demethylation of γ -synuclein in colorectal cancer, correlated with progression of the disease. *Cancer Sci* 99, 1924–1932
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, et al. (2004): The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55, 164–173

- Zhao J, Xing N (2014): Identification of γ -Synuclein as a Stage-Specific Marker in Bladder Cancer by Immunohistochemistry. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 20, 2550
- Ziegler DA, Wonderlick JS, Ashourian P, Hansen LA, Young JC, Murphy AJ, Koppuzha CK, Growdon JH, Corkin S (2013): Substantia nigra volume loss before basal forebrain degeneration in early Parkinson disease. *JAMA Neurol* 70, 241–247

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinen Doktorvätern Prof. Dr. Bähr und Prof. Dr. Zweckstetter, die mir dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Sebastian Kügler, dessen hervorragende Betreuung ein entscheidender Faktor für das Gelingen der hier dargestellten Untersuchungen war. Die gesamte AG Kügler mit Sonja Heyroth, Monika Zebski, Kristian Leite und Dr. Raina standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite, dafür bin ich sehr dankbar.