

**Die Bedeutung von oxidativem Stress bei hereditären und
sporadischen Formen der Parkinson'schen Krankheit.
Eine Studie an *Drosophila melanogaster*.**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Florian Bayersdorfer
aus Regensburg
02/09

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am **9.02.2009**.

Die Arbeit wurde angeleitet von: **Prof. Dr. Stephan Schneuwly**

Prüfungsausschuss: **Prof. Dr. Rosemarie Baumann (Vorsitzende)**
Prof. Dr. Stephan Schneuwly (1. Gutachter)
Prof. Dr. Charlotte Förster (2. Gutachterin)
Prof. Dr. Frank Sprenger (3. Prüfer)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Botella JA, Bayersdorfer F, Schneuwly S (2008) Superoxide dismutase overexpression protects dopaminergic neurons in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 30(1):65-73.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	10
KAPITEL I:	
EINLEITUNG	12
1. DOPAMIN UND DAS DOPAMINERGE SYSTEM	13
2. DIE PARKINSON'SCHE KRANKHEIT	16
3. RISIKOFAKTOREN FÜR DAS AUFTRETEN DER PARKINSON'SCHEN KRANKHEIT	17
3.1 Umweltgifte und oxidativer Stress	17
3.1.1 MPTP	18
3.1.2 Rotenon.....	19
3.1.3 Paraquat.....	21
3.2 genetische Risikofaktoren	21
4. DROSOPHILA ALS MODELLORGANISMUS FÜR DEGENERATIONSVORGÄNGE AM DOPAMINERGEN SYSTEM	26
5. ZIELSETZUNG	29

KAPITEL II:

MATERIAL UND METHODEN.....	30
1. MATERIAL.....	31
1.1 Oligonukleotide.....	31
1.2 Vektoren.....	31
1.3 Antikörper.....	32
1.4 Mikroorganismen.....	32
1.5 Fliegenstämme.....	32
1.6 Puffer und Lösungen.....	35
1.7 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	37
1.8 Software.....	37
2. HISTOLOGISCHE METHODEN.....	39
2.1 Anti- α -Synuclein- und Anti-SynT- Avidin-Biotin-Complex Horseradish-Peroxidase-Färbung (ABC-HRP) auf Paraffinschnitten.....	39
2.2 Semi- und Ultradünnschnitte.....	40
2.2.1 Semidünnschnitte.....	40
2.2.2 Ultradünnschnitte.....	40
2.3 Antikörperfärbung an Gehirn Wholemounts.....	40
2.3.1 Anti-Tyrosin-Hydroxylase-Färbung.....	40
2.3.2 Anti- α -Syn-Färbung.....	41
2.3.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie für die gleichzeitige Detektion des GFP-Reporters und der Antikörperfärbungen.....	41
2.3.4 Quantifizierung dopaminergener Neurone an Gehirn Präparaten.....	42
3. MOLEKULARE METHODEN.....	46
3.1 Methoden für die Arbeit an Nukleinsäuren.....	46
3.1.1 Isolierung genomischer DNA.....	46
3.1.2 Polymerase Chain Reaction.....	46
3.1.4 Plasmid Miniprep.....	47
3.1.5 Plasmid Midiprep.....	47
3.1.6 Restriktionsverdau.....	47
3.1.7 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Proben.....	47
3.1.8 Ligation.....	48
3.1.9 Transformation.....	48
3.1.10 Zyklus-Sequenzreaktion und Fällung der Sequenzierungsansätze.....	48
3.1.11 RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung.....	49
3.1.12 Reverse Transkription und Test der cDNA.....	49
3.1.13 Semiquantitative RT-PCR.....	49
3.2 Methoden für die Arbeit an Proteinen.....	51
3.2.1 Immunoblot- Verfahren.....	51
4. KEIMBAHNTRANSFORMATION UND GENETISCHE METHODEN.....	53
4.1 Keimbahntransformation.....	53
4.1.1 Mikroinjektion.....	53
4.1.2 Etablierung stabiler transgener Linien.....	53
4.2 genetische Methoden.....	54

4.2.1 Gewebsspezifische Überexpression von humanen und Drosophila Genen und gewebsspezifische RNA Interferenz.....	54
4.2.2 Koexpression mehrerer UAS-Konstrukte.....	54
4.2.3 Meiotische Rekombination von UAS- α -SynA30P und UAS-IR-ple.....	55
5. VERSUCHE ZU OXIDATIVEM STRESS, ROTENON UND PARAQUAT.....	56
5.1 Sauerstoffstress	56
5.2 Rotenon.....	56
5.3 Paraquat.....	56
6. VERHALTENSVERSUCHE	57
6.1 Negative Geotaxis	57
7. STATISTISCHE ANALYSEN	58
7.1 Deskriptive Statistik	58
7.2 Student's t-Test	58

KAPITEL III:

ERGEBNISSE	59
1. DIE BEDEUTUNG VON OXIDATIVEM STRESS IM α -SYNUCLEIN- MODELL	60
1.1 Selektive und differentielle Toxizität der α -Synucleine	61
1.2 Auswirkungen von oxidativem Stress auf die α -Syn- Toxizität	66
1.3 Modifikation der α -SynA30P Toxizität	69
1.3.1 Reparatur oxidativer Schäden	69
1.3.2 Entfernung von Superoxidradikalen	70
1.3.3 Dopamin- Depletion.....	74
2. BEDEUTUNG VON OXIDATIVEM STRESS UND DOPAMIN- STOFFWECHSEL IN MODELLSYSTEMEN DER SPORADISCHEN PARKINSON'SCHEN KRANKHEIT	83
2.1 Rotenon und Paraquat als Modelle der sporadischen Parkinson'schen Krankheit	83
2.1.1 Rotenon- und Paraquatexposition setzen die Lebenserwartung herab	83
2.1.2 Rotenon- und Paraquatexposition führen zum Verlust von dopaminergen Neuronen im ZNS von Drosophila	84
2.1.3 Rotenon- und Paraquatexposition reduzieren die Fähigkeit zur negativen Geotaxis	85
2.2 Modifikation der Paraquat- Toxizität	86
2.2.1 hSod1 erhöht die Lebenserwartung unter Paraquatstress	86
2.2.2 Dopamin- Depletion verstärkt die Paraquattoxizität.....	87
2.3 Modifikation der Rotenontoxizität	91
2.3.1 Steigerung der allgemeinen Rotenontoleranz durch hSoD1.....	91
2.3.2 Dopamin- abhängige Rotenonsensitivität dopaminерger Neurone	93
3. AUSWIRKUNGEN VON OXIDATIVEM STRESS AUF DIE α -SYN AGGREGATION IN DOPAMINERGEN NEURONEN VON DROSOPHILA.....	96
3.1 α -Syn- Aggregation in Drosophila	96
3.2 Aggregation durch Modifikation des α -Syn C-Terminus - WTsynEGFP Δ 15599	
3.3 Auswirkungen von Rotenon und Paraquat auf die Aggregation von WTsynEGFP Δ 155	103

KAPITEL IV:

DISKUSSION	106
1. DOPAMIN, OXIDATIVER STRESS UND α -SYN- TOXIZITÄT	107
1.1 α -Syn- Toxizität in <i>Drosophila</i>	107
1.2 Anfälligkeit dopaminerger Neurone gegenüber oxidativem Stress	111
1.3 Synergetische Neurotoxizität von α -Syn und Dopamin	112
1.4 Detoxifizierung von α -SynA30P	115
2. DIE ROLLE VON OXIDATIVEM STRESS UND DA- STOFFWECHSEL BEI DROSOPHILA- MODELLEN DER SPORADISCHEN PARKINSON'SCHEN KRANKHEIT	118
2.1 Rotenon und Paraquat als Modelle der sporadischen Parkinson'schen Krankheit in <i>Drosophila</i>	118
2.2 Die Rolle von $\cdot\text{O}_2^-$ bei Modellen der sporadischen Parkinson'schen Krankheit	120
2.3 Dopamin als Mediator der Neurotoxizität bei Modellen der sporadischen Parkinson'schen Krankheit	121
3. OXIDATIVER STRESS UND α -SYN- AGGREGATION	123
3.1 Aggregation von humanem α -Syn in <i>Drosophila</i>	123
3.2 Bedeutung des α -Syn C-Terminus beim Aggregationsprozess	124
3.3 Auswirkungen von oxidativem Stress auf die SynT- Aggregation	126

KAPITEL V:

ANHANG	127
1. VERKÜRZUNG DER LEBENSERWARTUNG DURCH DOPAMIN- DEPLETION	128
2. NATIVER WESTERNBLOT VON KOPFEXTRAKTEN	128
3. SYNT IN PUAST.....	129
4. PROTPARAM- ANALYSE FÜR WTSYN Δ 155EGFP	130
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	132
TABELLENVERZEICHNIS	134
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	135
LITERATURVERZEICHNIS:	137

Zusammenfassung

Die Entstehung der Parkinson'schen Krankheit wird sowohl auf schädliche Umwelteinflüsse als auch auf genetische Prädisposition zurückgeführt. Einerseits führen diverse rezessive und dominante genetische Mutationen zum Auftreten der hereditären Form der Krankheit. Andererseits tritt sie auch sporadisch ohne erkennbaren genetischen Hintergrund auf oder wird erst durch Kontakt mit Neurotoxinen ausgelöst. In der vorliegenden Arbeit wurden nach Faktoren gesucht, die beiden Formen der Krankheit gemeinsam sind. Dafür wurden genetische und Neurotoxin- basierende Modellsysteme der Degeneration dopaminergener Neurone von *Drosophila melanogaster* etabliert.

Es wurde beobachtet, dass die gezielte Expression humanem α -Synucleins zu altersabhängigem und spezifischem Verlust dopaminergener Neurone führt. Hereditäre Mutationen im α -Synuclein- Gen, beschleunigen die Degenerationsrate. Zumindest im Fall von α -SynA30P könnte die erhöhte Toxizität mit gestörtem axonalen Transport in Zusammenhang stehen.

Außerdem sind dopaminerge Neurone anfällig gegenüber oxidativem Stress. Mittels Hyperoxie, Rotenon, Paraquat und genetisch bedingter Dysfunktion der zellulären Stressantwort war es möglich, Zellverluste am dopaminergen System auszulösen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Toxizität von α -Syn, α -SynA30P und α -SynA53T unter Hyperoxie stark zunimmt. Daher erscheint es möglich, dass der Degeneration dieser Neurone bei den verschiedenen Modellsystemen ähnliche und synergetisch wirkende Mechanismen zugrunde liegen.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde untersucht, ob die Neurodegeneration durch Verringerung der oxidativen Belastung der Zellen aufgehalten werden kann. Die Entfernung von Superoxid- Radikalen durch Expression humaner Zn/Cu- Superoxid-Dismutase war ausreichend, α -SynA30P- induzierte Neurodegeneration signifikant zu reduzieren. Allerdings war es dadurch nicht möglich, den Verlust der Neurone unter Rotenon- und Paraquatstress bedeutend zu verlangsamen. Alternativ zum Abfangen der Superoxid- Radikale wurde versucht, durch eine Reduktion der Dopamin- Produktion die Entstehung toxischer Dopamin- Metabolite zu verhindern. Durch die Unterdrückung des Dopamin- Stoffwechsels durch Silencing des Gens *pale* werden die dopaminergen Neurone vor der Toxizität von α -Synuclein und Rotenon geschützt. Die Paraquat-Neurotoxizität wurde wiederum nicht beeinflusst.

Weiterhin wurde untersucht, ob auch die, bei der Parkinson'schen Krankheit auftretende α -Syn- Aggregation durch oxidativen Stress beeinflusst wird. Dafür wurde eine Fliegenlinie hergestellt, die C-terminal- modifiziertes α -Syn exprimiert. Die Expression dieses Konstrukts führte zu einem robusten Aggregations- Phänotyp in dopaminergen Neuronen. An diesem Modell konnte beobachtet werden, dass Rotenon und Paraquat den Aggregationsprozess des modifizierten α -Synucleins beschleunigen.

Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass oxidativer Stress im Allgemeinen und oxidativer Stress aus dem Dopamin- Stoffwechsel im speziellen ein bedeutender Faktor bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Parkinson'schen Krankheit sein könnte.

Kapitel I: Einleitung

1. Dopamin und das dopaminerge System

Das Phenethylamin Dopamin (DA) ist ein bei Tieren, Pflanzen und Pilzen weit verbreitetes Derivat der Aminosäure Tyrosin und stellt eine chemische Vorstufe für Melanin und Adrenalin dar. Je nach Spezies und Lokalisation erfüllt DA verschiedenste Aufgaben. Bei Bananen beispielsweise, ist DA ein Edukt von Phenoloxidasen die nach Verletzung des Fruchtkörpers als Schutzmechanismus Quinone und Melanin produzieren (Gooding *et al.*, 2001).

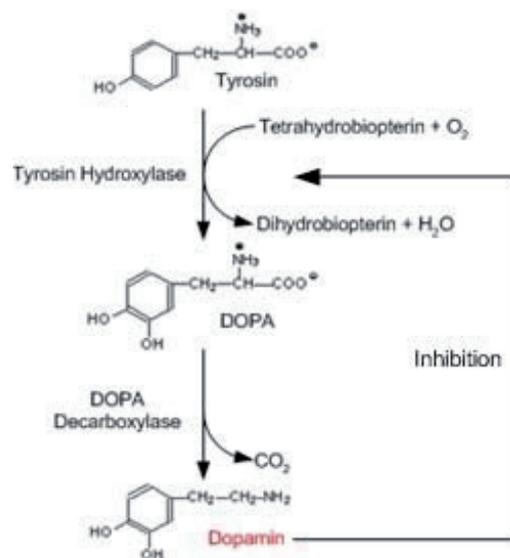


Abbildung 1: Dopaminsynthese: Das Enzym Tyrosin Hydroxylase (TH) hydroxyliert mit Hilfe des Kofaktors Tetrahydrobiopterin unter Entstehung von H₂O ein C-Atom des Phenolrings des Tyrosins. Das entstandene L-DOPA wird durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu DA decarboxyliert.

Im Vergleich zu Pflanzen übernimmt DA im Tierreich wesentlich mehr Funktionen. Zwar dient es Invertebraten wie *Drosophila* während der Entwicklung ebenfalls als Edukt für die Bildung kutikulären Melanins (True *et al.*, 1999); jedoch gelang Carlson und Kollegen 1957 der Nachweis, dass DA mehr als ein Zwischenprodukt für die Synthese von Melanin oder Adrenalin ist: Mäuse und Kaninchen, die mit dem Catecholamin-bindenden Tranquilizer Reserpin ruhig gestellt waren, wachten sofort nach Injektion von L-DOPA wieder auf und zeigten normales, mitunter sogar leicht hyperaktives Verhalten. Damit war bewiesen dass L-DOPA beziehungsweise sein direkter Metabolit DA selbst ein cholinerges Neurotransmitter wie Adrenalin oder Serotonin ist (Carlsson *et al.*, 1957). Die Synthese von DA läuft in zwei Schritten ab. Das Enzym Tyrosin Hydroxylase (TH) hydroxyliert Tyrosin zu L-DOPA (Axelrod, 1971) welches anschließend von der DOPA-Decarboxylase (Ddc) in DA umgewandelt wird (Abbildung 1). Die Regulation der DA-

Synthese erfolgt zum Teil durch DA selbst, da es in hohen Konzentrationen die TH-Aktivität nach dem Prinzip einer Feedback- Endproduktthemmung herabsetzt (Kaushik *et al.*, 2007).

Nach der Synthese wird DA vom vesikulären Monoamin Transporter (VMAT) in präsynaptischen Vesikeln verpackt. Diese können bei Bedarf mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt abgeben. Dort diffundiert er nach dem Konzentrationsgefälle zur postsynaptischen Membran, und bindet dort an einen von mindestens fünf verschiedenen DA- Rezeptortypen. Diese Rezeptoren werden in zwei Familien zusammengefasst. Zur D1-Familie zählen die Rezeptortypen D1 und D5, zur D2- Familie die Rezeptortypen D2, D3 und D4.

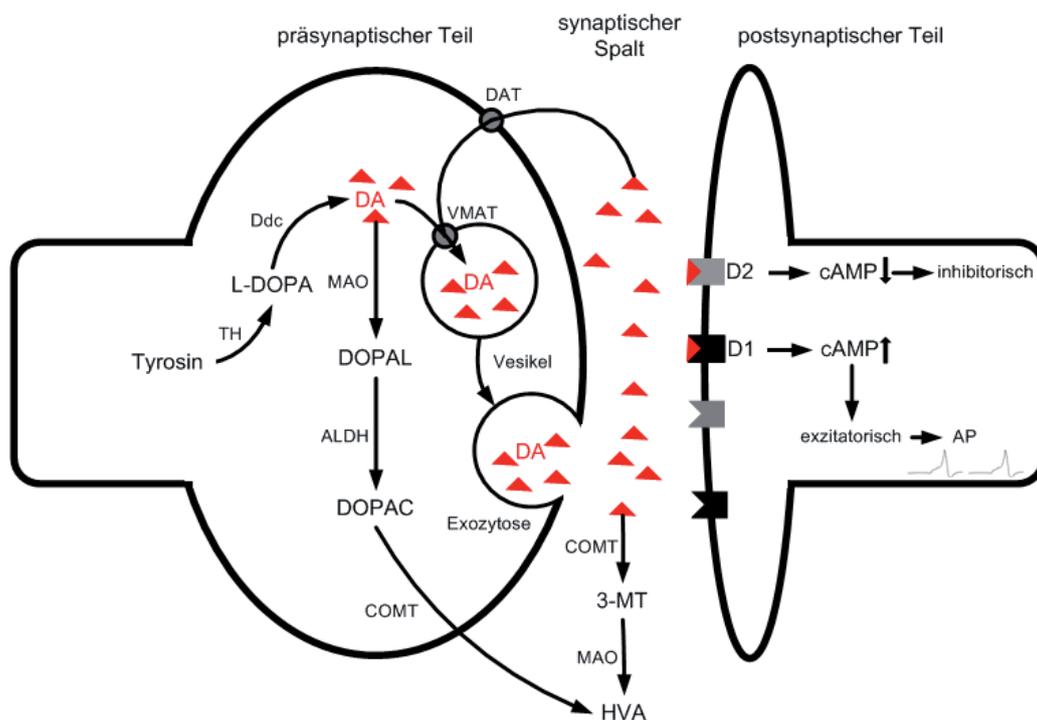


Abbildung 2: schematische Darstellung des DA- Metabolismus und der Reizübertragung an einer dopaminergen Synapse: TH: Tyrosinhydroxylase; Ddc: Dopaminhydroxylase; DA: Dopamin; VMAT: vesikulärer Monoamin Transporter; DAT: Dopamin- Transporter; D1, D2: DA-Rezeptoren; cAMP zyklisches Adenosin Monophosphat; AP: Aktionspotenzial; MAO: Monoamin Oxidase; COMT: Catechol-O-Methyl-Transferase; DOPAC: Dihydroxyphenylethylsäure; COMT: Catechol-O-Methyl-Transferase; 3-MT: 3-Methoxytyramin; HVA: Homovanillinsäure; Erläuterungen im Text.

Der Unterschied zwischen den beiden Rezeptorfamilien liegt neben ihrer räumlichen Verteilung im Gehirn vor allem in der unterschiedlichen Wirkung auf nachgeschaltete *second-messenger*- Systeme. Obwohl es sich bei beiden Familien um metabotrope (G-Protein- gekoppelte) Rezeptoren handelt, resultiert die Stimulation der Rezeptoren der D1-Familie in der Aktivierung der Adenylatcyclase und der Produktion von cAMP, welche im Endeffekt zur Auslösung eines postsynaptischen Aktionspotenzials führt (excitatorische Antwort), während die Aktivierung der Rezeptoren der D2-Familie zur

Inhibition der Adenylatzyklase führt (inhibitorische Antwort) (Lachowicz und Sibley, 1997; Missale *et al.*, 1998).

Extrazelluläres DA wird aus dem synaptischen Spalt entweder katabolisiert oder über den DA-Transporter (DAT) an der präsynaptischen Membran resorbiert und zur Wiederverwendung in Vesikel eingelagert. Durch diese differentielle Dopaminantwort in nachgeschalteten Zellen kann auf systemischer Ebene durch DA-Signale modulierend in unterschiedliche neuronale Prozesse eingegriffen werden.

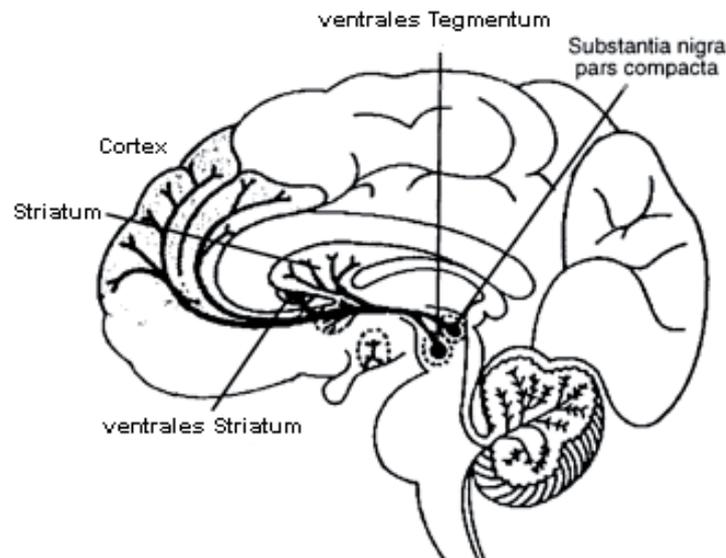


Abbildung 3: Hauptprojektionsbahnen dopaminergener Neurone
(abgeändert aus Schultz, 1999).

Im menschlichen Gehirn befinden sich die Zellkörper des dopaminergen Neurotransmittersystems in der *Substantia Nigra Pars Compacta* (SNPC) (nigrostriatales System) und im *ventralen Tegmentum* (mesokortikales System, mesolimbisches System). Aus diesen Bereichen des Mittelhirns heraus innervieren sie über verschiedene Projektionsbahnen mehrere Bereiche des zentralen Nervensystems (Abbildung 3). Vor allem im Basalganglion und im Neokortex finden sich sehr viele dopaminerge Nervenendigungen. Im Neokortex werden die Integrationszentren höherer Motorik, der Motivation, des Belohnungssystems und des Lernens vermutet. Die primäre Funktion dopaminergener Neurone ist also nicht, wie bei der Mehrzahl der Neurone im Gehirn die sensorische Wahrnehmung, sondern eher die interne Verschaltung und die Steuerung von Vorgängen in der Gehirnrinde (Dunnett und Robbins, 1992). Gerade darum zieht das dopaminerge System schon lange die Aufmerksamkeit von Forschern verschiedener Disziplinen auf sich. Durch pharmakologische Eingriffe in die Signalübertragung an den Synapsen lassen sich verschiedenste Reaktionen provozieren. Beispiele solcher Pharmazeutika sind das Neuroleptikum *Haloperidol*, welches D1-Rezeptoren blockiert

und so die Reizübertragung verhindert, oder Kokain, welches DAT blockiert und ein längeres Verweilen und eine höhere Konzentration von DA im synaptischen Spalt bewirkt.

Da das dopaminerge System multiple Subzentren des Gehirns entweder stimuliert oder hemmt und damit regulierend in neurologische Vorgänge eingreift, führt der Funktionsverlust dieser Neurone zu multiplen neuropsychiatrischen Symptomen.

2. Die Parkinson'sche Krankheit

In seinem Artikel „*An Essay on the Shaking Palsy*“ beschreibt der britische Arzt James Parkinson in Fallstudien erstmals die später nach ihm benannte Parkinson'sche Krankheit (PD) und grenzt sie gleichzeitig gegen ähnliche Symptomatiken wegen der, in der frühen Krankheitsphase meist ausbleibenden Demenz ab (Parkinson, 1817). Bei der PD handelt es sich um eine chronisch-progressive neurologische Erkrankung, deren Symptome sich individuell verschieden äußern. Die frühen motorischen Symptome sind in den meisten Fällen unilaterales Zittern der Extremitäten mit niedriger Frequenz (Tremor), der von Muskelverhärtungen (Rigor), Verlust primärer Bewegungsautomatismen (Akinesie) und dem Ausfallen von Haltungsreflexen begleitet wird (Jankovic, 2008). Zusätzlich kommt es zu Problemen bei der sprachlichen Artikulation und Schluckbeschwerden (Deuschl und Goddemeier, 1998). In der späten Phase der Krankheit treten neuropsychiatrische Auffälligkeiten wie Depressionen und Wesensveränderungen auf. Nur 20- 40% der Patienten entwickeln eine Demenz (Lieberman, 2006).

Den Symptomen liegt eine Degeneration dopaminergener Neurone der SNPc zu Grunde. Die motorischen und psychiatrischen Symptome der PD lassen sich zum Teil aus dem Verlust und dem entstehenden Ungleichgewicht zwischen hemmender und erregender dopaminergener Innervation der den Basalganglien nachgeschalteten kortikalen Subzentren erklären. Obwohl die Zellen schon während der präsymptomatischen Phase der Krankheit abzusterben beginnen, zeigen sich aufgrund der, dem System innewohnenden hohen Redundanz und Kompensationsfähigkeit, erste Symptome der Krankheit erst ab einem kritischen Verlust von mehr als 70% der dopaminergen Neurone (Zigmond *et al.*, 1990). Bis vor wenigen Jahren wurden die meisten PD- Fälle als idiopathisch eingestuft. Erst in neuerer Zeit war man in der Lage, die Krankheit in spezifischen Fällen auf distinkte Auslöser zurückzuführen.

3. Risikofaktoren für das Auftreten der Parkinson'schen Krankheit

Das Leben einer jeden Biospezies ist von ihrem genetischen Bauplan und den Umwelteinflüssen aus der von ihr besiedelten ökologischen Nische bestimmt. Die Evolution ist eine Folge des Wechselspiels von Genen und Umwelt. Auch können Gene und Umweltfaktoren oder ihre wechselseitigen Wirkungen die Entstehung von Krankheiten wie der PD befördern oder aufhalten. Ebenso können chemische Agenzien in beide Richtungen wirken. Es existieren mehrere epidemiologische Studien, die andeuten, dass Koffein oder Nikotin das Risiko, an der PD zu erkranken bis zu 50% senken (Ascherio *et al.*, 2001; Allam, 2002). Auf der anderen Seite wurden viele natürliche oder künstliche Chemikalien aus der Umwelt als Risikofaktoren der sporadischen PD erkannt. Als zentrales Element der Giftwirkung dieser Chemikalien wurden oft Reaktive Oxigene Spezies (ROS) identifiziert.

3.1 Umweltgifte und oxidativer Stress

Denham Harman identifiziert in seiner *'Free-Radical Theory of Ageing'* (Harman, 1956) neben ionisierender Strahlung oxidativen Stress als ein zentrales Element des Alterungsprozesses. Seine Theorie setzt auf der ursprünglichen *'rate-of-living'*-Hypothese (Pearl, 1928) auf, und basiert auf der Beobachtung, dass mit zunehmendem Alter ROS in Zellen akkumulieren und dort Schäden verursachen oder Signalkaskaden auslösen. Zu den ROS zählen freie Radikale wie Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$), Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) und Stickoxide ($\cdot\text{NO}_x$), aber auch Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), aus denen sich leicht freie Radikale bilden können.

ROS beschädigen Nukleinsäuren (Piette, 1991; Agarwal *et al.*, 2005), Proteine und Lipide (Rice-Evans *et al.*, 1993) und greifen direkt in zelluläre Signalwege ein. Unter anderem stören sie in hohen Konzentrationen die Inhibition der JNK- und p38- mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK)- Signalwege und lösen so durch Aktivierung von Caspasen Apoptose aus (Chun *et al.*, 2001; Matsuzawa und Ichijo, 2005). Außerdem können ROS in bestimmten Fällen mit zellulären Metaboliten Addukte wie beispielsweise DHBT-1¹ bilden, welche die mitochondriale Atmungskette am Komplex I hemmen und so durch gesteigerte Produktion von $\cdot\text{O}_2^-$ einen sich selbst verstärkenden toxischen Kreislauf bilden (Li und Dryhurst, 1997).

¹ 7-(2-Aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-Benzothiazin-3-Carboxylsäure

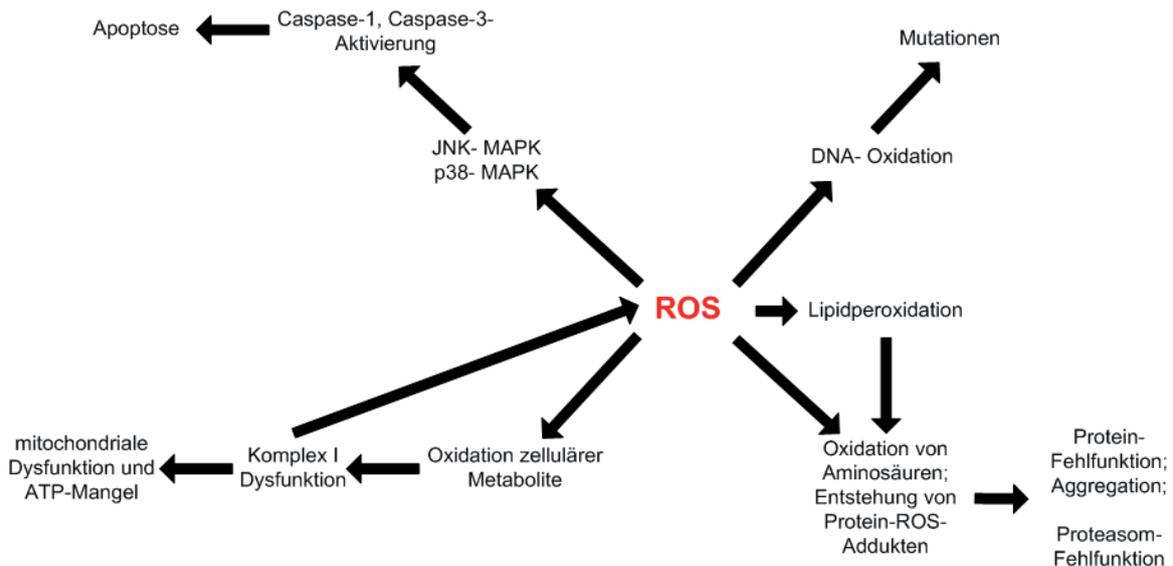


Abbildung 4: Mögliche biochemische Interaktionen von ROS mit Zellkomponenten

ROS können sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein. Endogen entstehen sie beispielsweise durch die Aktivität zytoplasmatischer NADPH- Oxydasen bei Entzündungen (Vincent und Taylor, 2006) oder in geringen Mengen durch normale Mitochondrienaktivität (Boveris und Chance, 1973). Allgemeine exogene ROS- Quellen sind unter anderem molekularer Sauerstoff, ionisierende Strahlung oder bestimmte Umweltgifte, die die Produktion zellulärer ROS stimulieren und teilweise hoch spezifisch dopaminerge Neurone schädigen.

3.1.1 MPTP

Ende der siebziger Jahre häuften sich in den USA Berichte über PD-Fälle bei jungen Suchtkranken. Den Patienten war gemeinsam, dass sie über einen längeren Zeitraum hinweg das künstliche Opiat MPPP² aus illegalen Laboratorien konsumiert hatten. Der Parkinsonismus konnte auf das Nervengift MPTP³, das Nebenprodukt eines fehlerhaften MPPP Syntheseprozesses (Johannessen und Markey, 1984), zurückgeführt werden. Dies war der erste direkte Beweis einer durch einen extrinsischen Auslöser induzierten PD beim Menschen (Davis *et al.*, 1979). Spätere Experimente an Primaten (Kolata 1983; Burns *et al.*, 1983) und Mäusen (Heikkila *et al.*, 1984) zeigten, dass MPTP- induzierte Neurodegeneration hauptsächlich das nigrostriatale System betrifft.

MPTP ist lipophil und kann so die Blut-Hirn-Schranke leicht überwinden. In Gliazellen findet durch MAO-B die Umwandlung zu MPDP⁴ statt, welches zum eigentlichen Toxin

² 1-methyl-4-phenyl-4-Propionoxypiperidin

³ 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin

⁴ 1-methyl-4-phenyl-2,3-Dihydropyridinium

MPP⁺ (Abbildung 7) umgewandelt wird. MPP⁺ ist ein polares Molekül und kann darum nur mit Hilfe eines aktiven Transportmechanismus ins innere von Zellen vordringen. Da die Affinität von MPP⁺ zu DAT relativ hoch ist wird MPP⁺ bevorzugt von dopaminergen Neuronen aufgenommen. Obwohl MPP⁺ durch VMAT aktiv in Vesikel transportiert wird und teilweise im Zytosol verbleibt, liegt der Hauptgrund seiner Toxizität in der Hemmung des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Zum einen führt dies zu einer verringerten Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), zum anderen werden erhöhte Superoxidmengen ($\cdot\text{O}_2^-$) ins Zytosol abgegeben was den dortigen Spiegel freier Radikale stetig ansteigen lässt (Abbildung 6).

Epidemiologisch ist die Bedeutung von MPTP allerdings zu vernachlässigen, da es weder natürlich vorkommt, noch in größerem Umfang ins Ökosystem eingebracht wird.

3.1.2 Rotenon

Das Pestizid Rotenon⁶ (Abbildung 5) dagegen findet häufig in der Landwirtschaft Anwendung. Chemisch handelt es sich um ein Furocumarin- Derivat welches hauptsächlich aus der Wurzel von *Derris elliptica* gewonnen wird (Windholz *et al.*, 1983). Rotenon ist wie MPP⁺ ein Komplex I- Inhibitor und kann wegen seiner lipophilen Natur ohne weitere Modifikation die Blut-Hirn-Schranke und Zellmembranen überwinden (Di Monte, 2003). In Ratten wird durch Injektion von Rotenon selektive Degeneration dopaminergener Neurone und α -Syn- Aggregation ausgelöst (Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2003). Ob Rotenon speziell dopaminerge Neurone schädigt ist nicht vollständig geklärt. Während im Rattenmodell auch allgemeine Neurodegeneration durch Rotenon beschrieben ist (Höglinger *et al.*, 2003), wird berichtet, dass der Effekt in *Drosophila* tatsächlich auf dopaminerge Neurone beschränkt zu sein scheint (Coulom und Birman, 2004). Der *modus operandi* mit dem Rotenon und MPP⁺ ein Ansteigen der Konzentration zellulärer ROS bewirken ist allerdings weitgehend geklärt (Abbildung 6).

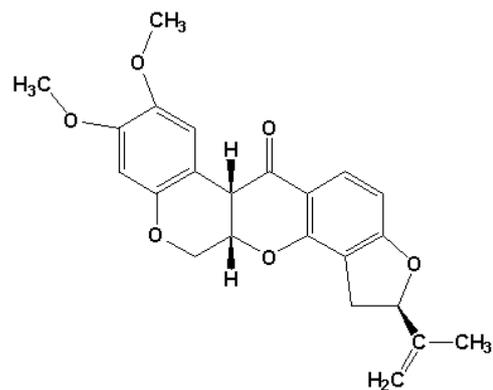


Abbildung 5: Strukturformel von Rotenon

⁵ 1-methyl-4- Phenylpyridinium

⁶ (2*R*,6*aS*,12*aS*)-1,2,6,6*a*,12,12*a*- hexahydro-2-isopropenyl-8,9- dimethoxychromeno[3,4-*b*] furo (2,3-*h*) Chromen-6-on

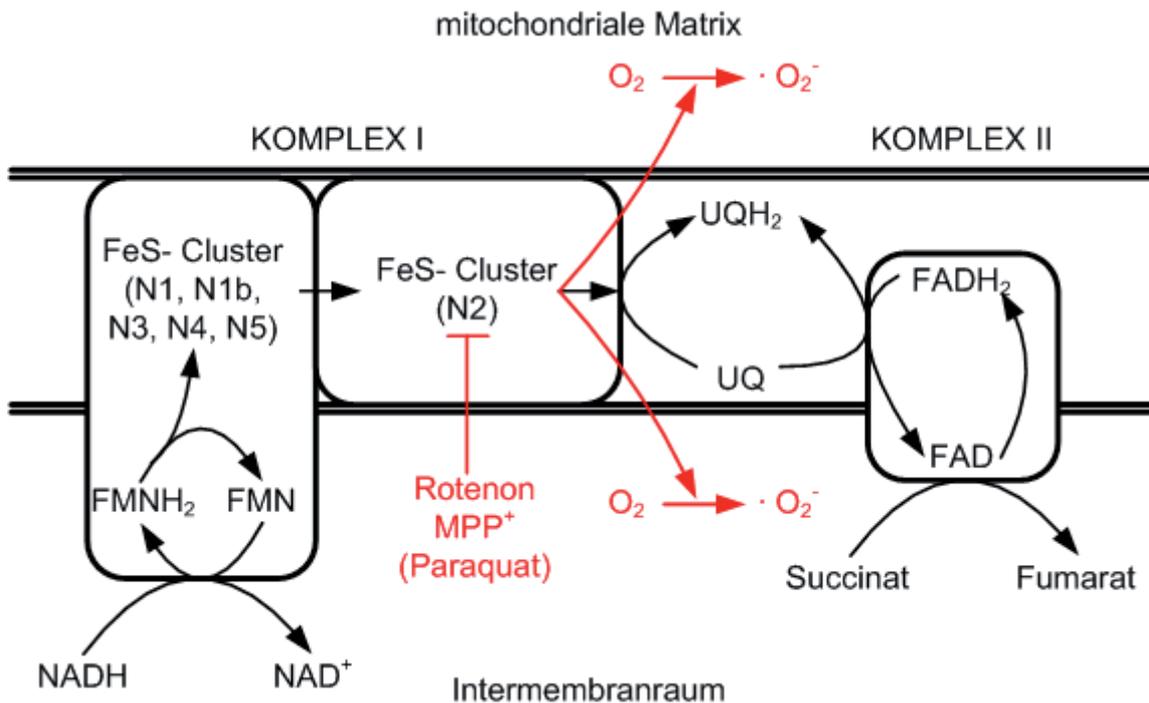


Abbildung 6: Schema der Elektronentransportkette an den Komplexen I und II der mitochondrialen Atmungskette: Das Schema wurde nach Informationen aus Pitkänen und Robinson (1996), Lümmen (1998) und Löffler (2001) zusammengestellt. Auf die Darstellung des Protonentransports wurde verzichtet. Erläuterungen im Text.

Der Komplex I der Atmungskette ist eine NADH : Ubichinon– Oxioreduktase. Am ersten Eisen- Schwefel- Cluster (FeS) werden durch die prosthetischen Gruppen FMN, N1, N1b, N3, N4 und N5 Reduktionsäquivalente (NADH) oxidiert. Dabei werden Protonen in die mitochondriale Matrix transportiert und Elektronen auf den zweiten Eisen-Schwefel-Cluster (N2) übertragen. Dieser reduziert Ubichinon (UQ) zu Ubichinol (UQH₂) (Lümmen, 1998). Die mitochondriale Atmungskette produziert an dieser Stelle *per se* auch bei normaler Funktion Superoxid- Radikale (Boveris und Chance, 1973). Wird aber die Redoxreaktion durch einen Komplex I- Inhibitor unterbrochen, lecken Elektronen verstärkt in den Intermembranraum und die mitochondriale Matrix wo sie anstatt des Ubiquinons molekularen Sauerstoff zu Superoxid- Radikalen reduzieren (Lümmen, 1998). Die Gesamtfunktion der Atmungskette und die ATP- Produktion der Mitochondrien kommt durch die Hemmung des Komplex I nicht vollständig zum Erliegen, da bei intaktem erstem FeS- Cluster der Nettoverlust an transportierten Protonen nur zwei pro NADH beträgt und die Succinat : Ubichinon– Oxidoreduktase des Komplex II weiterhin Energie ins Gesamtsystem einspeist.

Da Rotenon den Komplex I systemisch inhibiert, ist mitochondriale Dysfunktion allein keine befriedigende Erklärung der selektiven Degeneration dopaminerger Neurone. So ist der Blick auf ein weiteres Produkt der Agrarchemie, welches unter dem Verdacht steht, beim Menschen PD auszulösen lohnend.

3.1.3 Paraquat

Paraquat⁷ (Abbildung 7) wird wie Rotenon häufig in der Landwirtschaft angewendet. Ende der neunziger Jahre kam es in ländlichen Gebieten in Taiwan und Italien, in denen Paraquat intensiv ausgebracht wurde, zu gehäuftem Auftreten der PD. Die Krankheitsfälle wurden auf den Einsatz des Paraquats zurückgeführt (Liou *et al.*, 1997; Smargiassi *et al.*, 1998). Im Tierversuch zeigen Mäuse, denen Paraquat injiziert



Abbildung 7: Strukturformeln von MPP⁺ und Paraquat

wird nach kurzer Zeit PD- ähnliche Symptome und selektive Degeneration dopaminergener Neurone (McCormack *et al.*, 2002). Die Europäische Union hat mittlerweile die Zulassung für die landwirtschaftliche Nutzung von Paraquat aufgehoben⁸.

Der Mechanismus, mit dem Paraquat seine toxische Wirkung entfaltet ist nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (Miller, 2007; Cory-Slechta *et al.*, 2007; LoPachin und Gavin, 2008). Zuerst ordnete man Paraquat aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit MPP⁺ denselben Toxizitätsmechanismus zu und erbrachte auch experimentelle Beweise für den Transport via DAT (Shimizu *et al.*, 2003; Ossowska *et al.*, 2005) und die Möglichkeit, damit eine Komplex I- Dysfunktion zu provozieren (Cocheme und Murphy, 2007). Zeitgleiche Studien führen zu entgegen gesetzten Schlüssen, nämlich, dass Paraquat weder über DAT transportiert wird, noch dass es mit dem Komplex I interagieren kann. (Richardson *et al.*, 2005). Weitere Veröffentlichungen zeigen experimentelle Beweise für Paraquat- induzierte Apoptose durch JNK- MAPK induzierte Caspasen (Peng *et al.*, 2004; Ramachandrian *et al.*, 2007).

PD wurde lange als typisches Beispiel einer nicht- genetischen Krankheit angesehen. Nach der Entdeckung eines Risikogens (Polymeropoulos *et al.*, 1997) war allerdings klar, dass die PD neben den sporadischen und Toxin- induzierten Formen auch genetisch bedingt sein kann.

3.2 genetische Risikofaktoren

Bei der Suche nach PD- Risikogenen ist das Mittel der Wahl die Analyse hereditärer Formen der PD. Obwohl nur 20% aller PD- Fälle auf familiäre Vererbung zurückzuführen sind, können an diesen Fällen durch Erbgutvergleiche Abweichungen

⁷ 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium

⁸ Gericht erster Instanz der Europäischen Gemeinschaften: Pressemitteilung Nr. 45/07. 11. Juli 2007

von der Norm erkannt werden. Bis dato sind beim Menschen 13 PD- assoziierte chromosomale Loci identifiziert worden. Sechs davon weisen codierende Gene auf, in denen Mutationen zur PD führen können (Belin und Westerlund, 2008)

Parkinson-Lokus	betroffenes Gen	Form der PD	Art der Mutation
PARK1	<i>SNCA</i>	AD	A30P, A53T, E56K
PARK2	<i>parkin</i>	AR	zahlreiche Punktmutationen, Exon Deletionen, Lokus-Duplikation, -Triplikation
PARK4	<i>SNCA</i>	AD	Lokus- Duplikation, - Triplikation
PARK5	<i>UCHL-1</i>	AD	I93M, S18Y
PARK6	<i>pink</i>	AR	G309D, Exon- Deletionen
PARK7	<i>DJ-1</i>	AR	L166P
PARK8	<i>LRRK2</i>	AD	R1441C/GH, Y1699C, G2019S, I2020T, G2385R

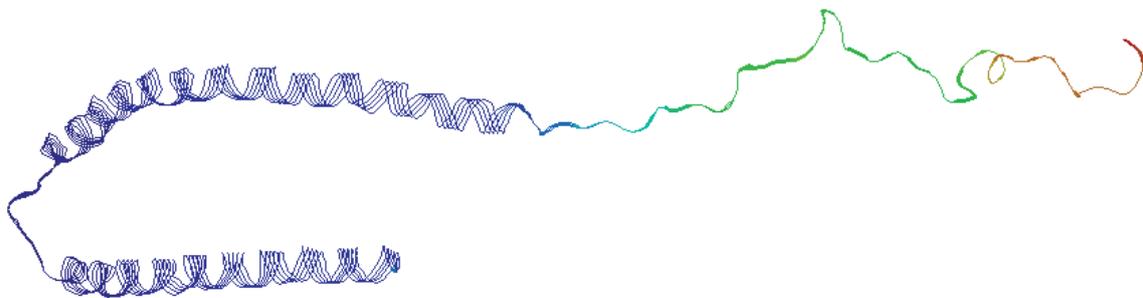
Tabelle 1: PARK- Loci mit codierenden Genen: bisher wurden in sieben PARK- Loci sechs codierende Gene identifiziert. Der PARK4 Locus ist identisch mit dem PARK1-Lokus. Mutationen in diesen Genen führen zu dominant- oder rezessiv vererbbarer PD. AD: autosomal dominant; AR autosomal rezessiv.

An dieser Stelle wird auf die ausführliche und angemessene Erläuterung aller Park- Loci und die Revision der dazu relevanten Literatur verzichtet, da dies den Rahmen dieses Kapitels sprengen würde. Das Hauptaugenmerk wird auf *SNCA* gelegt, welches für diese Arbeit primäre Relevanz hat.

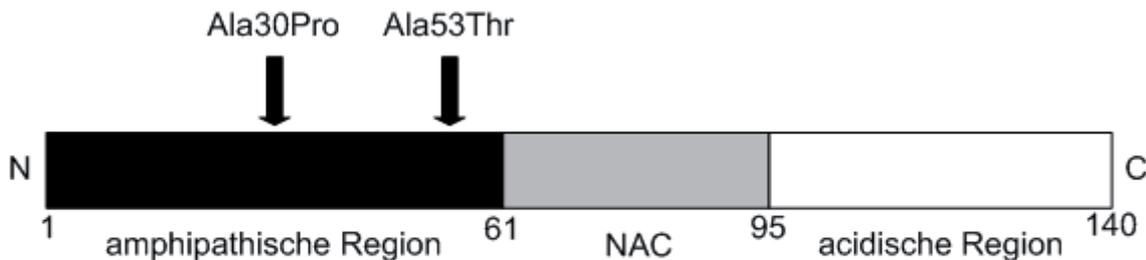
cDNA von *SNCA* wurde erstmals aus *Torpedo californica* isoliert. Expressionsanalysen zeigten, dass *SNCA* für das Protein α -Synuclein (α -Syn, Abbildung 8) codiert welches aus 140 Aminosäuren besteht und an den axonalen Nervenenden im Gehirn lokalisiert ist (Maroteaux *et al.*, 1988). Ueda *et al.* (1993) klonierten eine menschliche cDNA-Sequenz aus der sie NACP140 exprimierten, den nicht- A β - amyloiden Bestandteil der Alzheimer- Plaques. Ein Jahr später wurde das in *Torpedo* beschriebene α -Syn selbst mit der Alzheimer'schen Krankheit (AD) in Verbindung gebracht, da erkannt wurde, dass NACP140 eigentlich kein neu entdecktes Protein, sondern lediglich das humane Homolog des *Torpedo* α -Syn ist. α -Syn ist ein relativ kleines Neuropeptid welches im menschlichen Gehirn hauptsächlich im Mittelhirn, der Gehirnrinde und dem Striatum exprimiert wird (Charles *et al.*, 2000). Seine Funktion ist nicht geklärt (Vekrellis *et al.*, 2004). A-Syn- *Knockout*- Mäuse zeigen außer geringfügig veränderter Neurotransmission dopaminerger Neurone keine Auffälligkeiten (Abeliovich *et al.*, 2000). Die Überexpression von α -Syn rettet Mäuse, die im genetischen Hintergrund homozygot eine

letale Mutation im Gen des Cystein String Proteins- α ($CSP\alpha$) tragen (Chandra *et al.*, 2005), wodurch eine Beteiligung von α -Syn als Cochaperon beim Verpackungsprozess von Neurotransmittern in synaptische Vesikel möglich erscheint (Bonini und Giasson, 2005). Andere Studien deuten auf eine Beteiligung von α -Syn am Lernprozess und der synaptischen Plastizität hin (George *et al.*, 1995; Gureviciene *et al.*, 2008).

A



B



NAC: *Non A β -component of the fibrillar core of AD senile plaques*

Abbildung 8: dreidimensionale Struktur und schematische Darstellung der Domänenorganisation von α -Syn:

A: NMR-Struktur von Micellen- assoziiertem α -Syn: der N-Terminus des Proteins bildet eine antiparallele Helix-Loop-Helix Struktur aus. Der C-Terminus weist hohe Moleküldynamik auf und bildet keine festgelegten Tertiärstrukturen aus (1XQ8.pdb, Ulmer *et al.*, 2004).

B: Schema der Domänen im α -Syn: das Protein setzt sich aus der α -Helix- bildenden amphipathischen Region am N-Terminus (AS 1-60), der NAC-Domäne (non-A β -component of AD- Plaques, AS 61- 94) und einer acidischen Region am C-Terminus (AS 95-140) zusammen. Die beiden krankheitsrelevanten Mutationen A30P und A53T liegen in der Region, die die, vom N- Terminus aus gesehen, zweite α -Helix des Proteins ausbildet (nach Gaeta und Hider, 2005).

Obwohl seine molekulare Funktion noch nicht aufgeklärt ist, wurde α -Syn mit mehreren neurodegenerativen Syndromen als möglicher krankheitsrelevanter Faktor in Verbindung gebracht. A-Syn ist nicht nur Bestandteil von AD- Plaques, sondern wird auch bei der Huntington'schen Krankheit (HD) als Einlagerung in Polyglutaminaggregaten (Charles *et al.*, 2000) beschrieben. Trotz diesen Befunden scheint α -Syn bei AD und HD nur eine periphere Rolle zu spielen. Bei Symptomatikern aus der Gruppe der α -Synucleopathien erscheint es dagegen als zentrales pathologisches Element. Als zwei Mutationen in *SNCA* (PARK1) und die Triplikation seines Locus (PARK4) jeweils mit spezifischen familiär vererbten Fällen der PD in Verbindung gebracht werden konnten (Polymeropoulos *et al.*,

1997; Krüger *et al.*, 1998; Singleton *et al.*, 2003), wurden die ersten Indizien für die Existenz einer genetischen Komponente bei der Entstehung der PD deutlich. Beide Mutationen in *SNCA* führen zu einem Aminosäureaustausch in der amphipatischen Region des Proteins wobei im einen Fall Alanin an Stelle 53 durch Threonin (α -SynA53T), beziehungsweise Alanin an Stelle 30 mit Prolin (α -SynA30P) ersetzt ist.

Außerdem stellt α -Syn den Hauptproteinanteil striitärer *Lewy- Bodies* (LBs) bei der PD, kortikaler LBs bei der Demenz mit *Lewy- Bodies* (DLB), neuronaler und glialer Ablagerungen bei der Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn (*Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*; NBIA) und glialer Ablagerungen bei der Multisystematrophie (MSA) (Martí *et al.*, 2003) dar.

Bei LBs handelt es sich um intrazelluläre α -Syn- und Ubiquitin- immunreaktive Aggregate, die neben α -Syn und Ubiquitin auch Hitzeschock- Proteine und diverse andere Bestandteile enthalten (Beyer und Ariza, 2007). Humanes α -Syn kann *in vitro* ohne Beteiligung weiterer Komponenten mit sich selbst in Wechselwirkung treten und über di- und oligomere Zwischenstufen zu multimeren Fibrillen und Aggregaten kondensieren. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs wird einerseits von der Menge, andererseits von der Art des α -Syn bestimmt: sowohl die Erhöhung der Proteinkonzentration als auch die Mutationen beschleunigen die Aggregation (Conway *et al.*, 1998; Narhi *et al.*, 1999). Für transgene Tiermodelle ist nach Überexpression der humanen wildtypischen und mutanten α -Syn- Formen Degeneration dopaminergischer Neurone und Bildung zyttoplasmatischer Aggregate beschrieben, wobei sich auch hier Berichte häufen, wonach mutantes α -SynA30P oder α -SynA53T in Mäusen (Kahle, 2008) und *C. elegans* (Kuwahara *et al.*, 2005) generell prominentere Phänotypen hinsichtlich Neurodegeneration und α -Syn- Aggregation auslöst als wildtypisches α -Syn. Oxidativer Stress und die Dysfunktion von Proteinabbauebenen scheinen für die Toxizität von großer Bedeutung zu sein. In einem gängigen Modell werden α -Syn- Fibrillen und Aggregate für die Behinderung des proteasomalen Proteinabbaus verantwortlich gemacht. Die Fibrillisation von α -Syn wird dabei durch oxidativen Stress beschleunigt (Dawson und Dawson, 2003). Zudem deuten auch die PD- Mutationen in *parkin* (PARK2), welches für eine E3 Ubiquityl Ligase, oder *UCH-L1* (PARK5), welches für die Ubiquitin-C-Hydrolase-L1 codiert auf Funktionsstörungen des proteasomalen Proteinabbaus hin (Lansbury und Brice, 2002). Alternativ zum proteasomalen Abbau

wird α -Syn auch am Lysosom durch Chaperon- medierte Autophagie degradiert. Dieser Abbauweg wird durch α -SynA30P und α -SynA53T blockiert (Cuervo *et al.*, 2004).

Die Toxizität mutanter α -Syn- Proteine beruht also nicht auf einem durch die Mutationen in *SNCA* ausgelösten Funktionsverlust (*loss of function*'), sondern auf dem Entstehen neuer und toxischer Zusatzeigenschaften (*toxic gain of function*') (Rajagopalan und Andersen, 2001; Eriksen *et al.*, 2003). Daraus ergibt sich die Möglichkeit Organismen wie *Drosophila*, die selbst kein eigenes *SNCA*- Gen haben, als genetisches Modell der Toxizitäts- und Aggregationsmechanismen humanen α -Synucleins einzusetzen.

4. *Drosophila* als Modellorganismus für Degenerationsvorgänge am dopaminergen System

Drosophila ist als Modellorganismus der Neurobiologie von unschätzbarem Wert. Aufgrund der kurzen Generationszeit, der einfachen Zuchtbedingungen und der über Balancer-Chromosomen einfach zu bestimmenden Genotypen ist es möglich, komplexe genetische Konfigurationen einfach und innerhalb kurzer Zeit ohne molekularbiologische Genotypisierung von Zwischengenerationen zu realisieren. Obwohl das Gehirn der Invertebraten bei weitem nicht so hoch entwickelt ist wie das Gehirn der Wirbeltiere, ist es trotzdem in der Lage, erstaunliche integrative Leistungen zu vollbringen und besitzt eine Vielzahl verschiedener, aber untereinander verschalteter neuronaler Subsysteme. Ein bedeutender Vorteil von *Drosophila* als Modellorganismus der Neurobiologie ist, dass die Gehirne quasi transparent sind und so als *Wholemout* mit Licht- und Lasermikroskopischen Methoden untersucht werden können.

Genau wie die Vertebraten besitzen auch Fliegen Neurone, die DA produzieren. Die Morphologie des dopaminergen Systems im ZNS von Schmeißfliegen und Fruchtfliegen wurde mit immunhistochemischen Färbungen gegen das Enzym TH aufgeklärt (Abbildung 9).

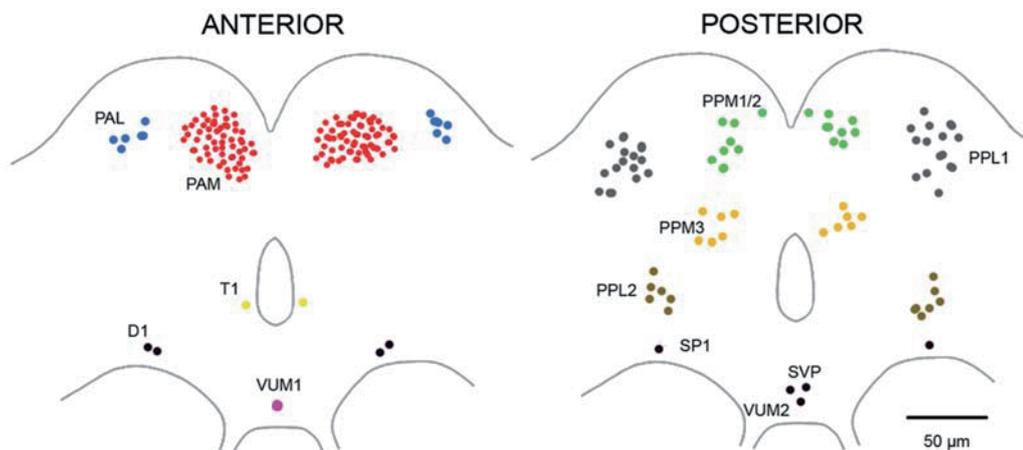


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Verteilung dopaminergener Neurone im Gehirn von *Drosophila*:

anterior: PAL: dorsolaterale anterielle protocerebrale Neurone (ca. 10); PAM: dorsomediale anterielle protocerebrale Neurone (> 100), Posterior PPM1/2/3: dorsomediale posteriore protocerebrale Neurone (PPM1/2: ca. 12; PPM3: ca.: 12), PPL1: dorsolaterale posteriore protocerebrale Neurone; (ca. 28) PPL2: laterale posteriore protocerebrale Neurone (ca. 12); SP1: Subesophagusganglion, T1: Tritocerebrum (2), D1: laterales posteriores Deuterozerebrum, (ca. 4) SVP/VUM1/VUM2: unpaariges ventrales Subesophagusganglion (ca. 4); (aus Botella *et al.*, 2008 nach Nässel und Elkes, 1991)

Dabei zeigte sich, dass die insgesamt ca. 96 dopaminergen Neurone im Gehirn in mehreren Clustern mit jeweils unterschiedlichen Neuronenzahlen angelegt sind. Durch die hoch entwickelten Methoden der ektopischen Genexpression mittels des Hefe-

UAS/Gal4- Systems (Brand und Perrimon, 1993) können Fliegen der *Th-Gal4*-Treiberlinie (Friggi-Grelin *et al.*, 2003) als Werkzeug für die direkte und präzise ektopische Expression von cDNAs in diesen Zellen genutzt werden. Wird eine Responderlinie, die das *Green Fluorescent Protein* (GFP) stromabwärts der *Upstream Activating Sequence* (UAS) trägt, unter die Kontrolle von *Th-Gal4* gestellt, werden in larvalen und adulten Gehirnen die meisten der von Nässel und Elkes beschriebenen dopaminergen Cluster markiert (Abbildung 10B, D).

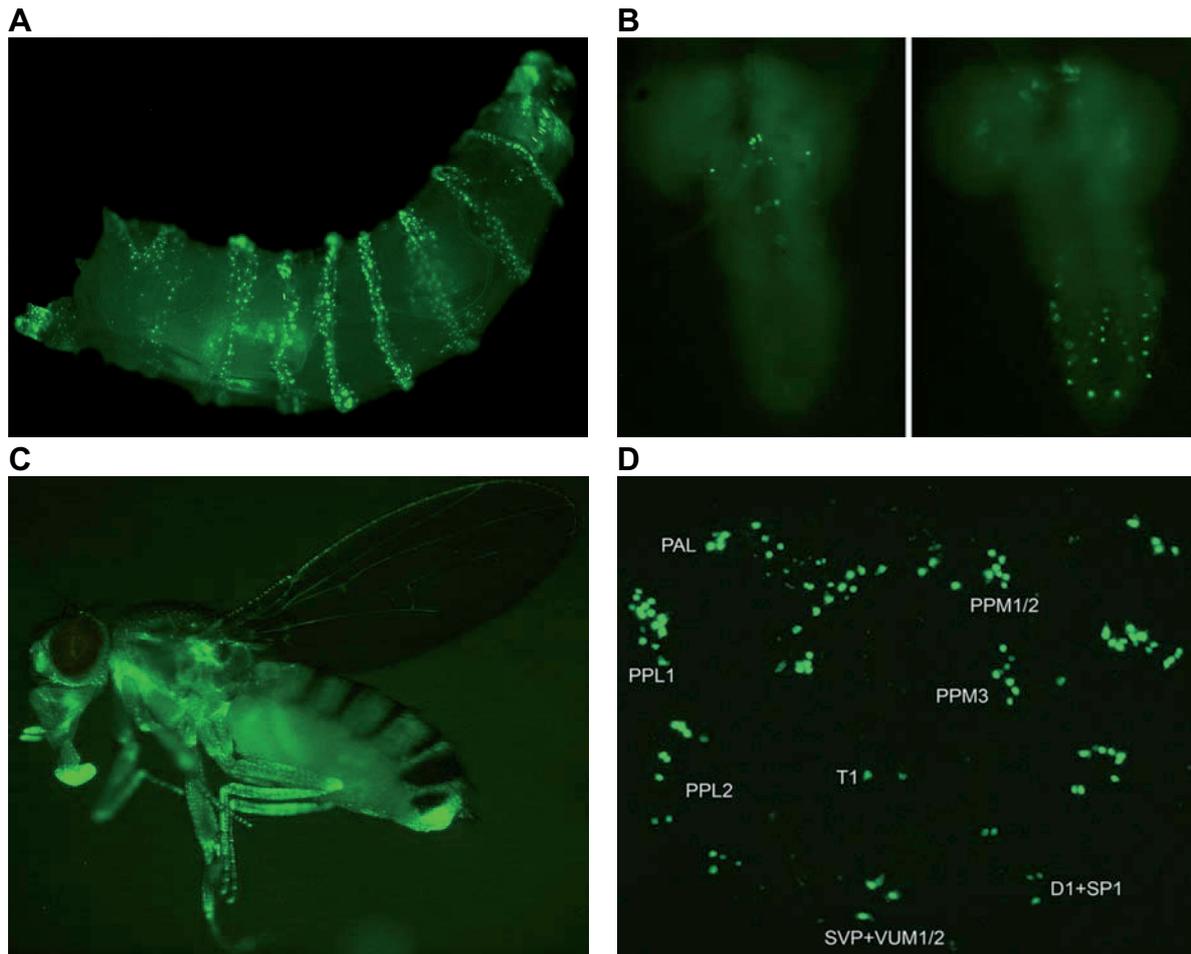


Abbildung 10: Expressionsmuster der *TH-Gal4* Treiberlinie: Expression des GFP- Reporters in larvaler Epidermis und Vorläuferzellen des adulten peripheren Nervensystems (A) und larvalen Gehirn (B). Expression des GFP- Reporters in den olfaktorischen Chemorezeptoren von Antennen und Mundwerkzeugen, den campaniformen Sensillen und den Mikrochaeten der Flügelkanten und Beine in adulten Fliegen (C) und adultem Gehirn (D). Vergl. Abbildung 10A, C mit Hartenstein (1993) und Abbildung 10D mit Abbildung 9.

Neben den dopaminergen Neuronen im ZNS treibt *Th-Gal4* auch im peripheren Nervensystem in Teilen der epidermalen Sensillen von Larven und Adulten (Abbildung 10A, C). In Epidermis und Gehirn werden durch differentielles Splicing der prä-mRNA alternative mRNA- Isoformen aus sieben beziehungsweise fünf Exonen zusammengestellt. Die epidermale TH ist während der Entwicklung segmental exprimiert (Abbildung 10A) und zeichnet sich durch eine endogene Aktivierungssequenz, erhöhter

Enzymaktivität und Insensitivität gegenüber der DA- Feedback-Endproduktschmimmung aus. Die neuronale TH weist dagegen geringere Enzymaktivität auf und kann durch Catecholamine oder Phosphorylierungen gehemmt werden (Friggi-Grelin *et al.*, 2003b). Im zentralen Nervensystem selbst ist das Expressionsmuster des *TH-Gal4*- Treibers mit dem Expressionsmuster von *pale* fast deckungsgleich. Lediglich die Zellen des als TH-immunreaktiv beschriebenen PAM- Clusters werden von der Effektorlinie nicht getroffen. Durch die Expression von fluoreszenten Markern unter der Kontrolle des *TH-Gal4*- Treibers steht eine Methode zur Verfügung, mit der Degenerationsvorgänge am dopaminergen System im Gehirn der Fliege beobachtet werden können.

Auch die Portierung von Modellen der PD aus anderen Modellorganismen ist in vielen Fällen möglich. Wie in Nagern kann in *Drosophila* Degeneration dopaminergcr Neurone durch Rotenon, Paraquat oder die Expression von α -Syn ausgelöst werden (Feany und Bender, 2000; Coulom und Birman, 2004; Chaudhuri *et al.*, 2007).

Die PD ist die zweithäufigste altersbedingte neurodegenerative Krankheit beim Menschen (Ross und Smith, 2007). Obwohl der medizinische Fortschritt zu stetig zunehmender Lebenserwartung führt, existiert gleichzeitig noch kein Weg, neuronalen Verfall bei neurodegenerativen Krankheiten zu stoppen. So ist in der Zukunft eine drastische Steigerung der Anzahl Betroffener zu erwarten, die das Gesundheitssystem mit beträchtlichen Mehrkosten belasten werden. In der Zukunft wird ein kostengünstiger und effektiver Modellorganismus wie *Drosophila* in der Pharmakologie und der Grundlagenforschung an neurodegenerativen Krankheiten unter Umständen unentbehrlich sein.

5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Degeneration dopaminerg Neurone von *Drosophila melanogaster* durch oxidativen Stress und die Expression von humanem α -Syn zu untersuchen. Dafür sollen toxikologische und genetische Neurodegenerations-Modellsysteme etabliert werden, an denen Zellverlust am dopaminergen System, Lebenserwartung und Verhalten untersucht werden können.

Anschließend soll getestet werden, ob die degenerativen Phänotypen die bei den Modellsystemen der sporadischen und genetischen Formen der Parkinson'schen Krankheit auftreten durch molekularbiologische Manipulation bestimmter zellulärer Stoffwechselwege modifiziert werden können. Besonderes Augenmerk soll dabei auf zelluläre Funktionen gelegt sein, die für die Produktion freier Radikale oder die zelluläre Stressantwort verantwortlich sind.

Neben den Experimenten zur Neurodegeneration soll auch untersucht werden, ob oxidativer Stress eine Rolle bei der α -Syn- Aggregation spielt. Zu diesem Zweck soll eine transgene Fliegenlinie erzeugt werden, mit der modifiziertes α -Syn- Protein exprimiert werden kann um die α -Syn- Aggregation in *Drosophila* robust zu modellieren.

Kapitel II:
Material und Methoden

1. Material

1.1 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	T _a	Verwendung
A1	AGATCTATGGATTCATGAAAGGACT	51°C	Klonierung
A2	AGATCTTGGCTTCAGGTTCTAGTCTT GATACC	58°C	Klonierung
hsapSOD antisense	TACACCACAAGCCAAACG	50°C	RT-PCR
hsapSOD sense	TGCAGGGCATCATCAATT	44°C	RT-PCR
ple_Asense	GGAGTAGTCGATGAATGGGAT	47°C	qRT-PCR
ple_sense	AAGGCTCCGTGGTTCCC	47°C	qRT-PCR
pUAS _t -(hsp70)-seq	GCGCTTCGTCTACGGAGCGAC	60°C	Sequenzierung
pUAS _t -(SV40)-seq	CTTAGAGCTTTAAAT	60°C	Sequenzierung
Rp49 fw	GCGGGTGCCTTGTTTCGATCC	55°C	qRT-PCR
Rp49 rev	CCAAGGACTTCATCCGCCACC	55°C	qRT-PCR
snca (antisense)	TGTCTTCTGGGCTACTGC	52°C	qRT-PCR
snca (sense)	AGTTGTGGCTGCTGCTGA	52°C	qRT-PCR
DAT sense	TGGAGATTTCCCTATTTGTGC	52°C	qRT-PCR
DAT asense	GCCAATTCATATAGAACAGAGC	52°C	qRT-PCR
T7	ATTATGCTGAGTGATATCCCGCT	55°C	Sequenzierung

Tabelle 2: Liste der eingesetzten Primer

1.2 Vektoren

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft bzw. Literatur
pBluescript II SK (+)	Sub- Klonierung	Stratagene (Alting-Mees and Short 1989)
pGEM-T® Easy	Klonierungsvektor für PCR- Produkte	Promega
pUAST	ektopische Expression	Brand und Perimon, 1993

Tabelle 3: Liste der eingesetzten Vektoren

1.3 Antikörper

Bezeichnung	Kürzel	Tier	Verwendung	Verdünnung	Herkunft
Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG (H+L)	GαM 546	Ziege, monoklonal	Wholemout	1:150	Molecular Probes
Alexa Fluor® 680 goat anti-mouse IgG (H+L)	GαM 680	Ziege, monoklonal	Immunoblot	1:2500	Molecular Probes
Alexa Fluor® 800 goat anti-rabbit IgG (H+L)	GαR 800	Ziege, monoklonal	Immunoblot	1:2500	Molecular Probes
Anti-Maus-HRP	αM-HRP	Pferd, monoklonal	ABC-HRP	1:2500	Alexa
Mouse Monoclonal to Dopamine ab1001	Ab1001	Maus, monoklonal	ABC-HRP	1:500	Abcam
Rabbit Anti-Actin AA20-33	AA20-33	Kaninchen, monoklonal	Immunoblot	1:2500	Sigma
Tyrosine Hydroxylase Antibody LNC1	LNC1	Maus, monoklonal	Wholemout, Immunoblot	1:500	ImmunoStar
α-Synuclein LB509	LB509	Maus, monoclonal	ABC-HRP, Wholemout	1:500	Zymed Laboratories Inc.
α-Synuclein clone42	clone42	Maus, monoclonal	Immunoblot, ABC-HRP	1:500 – 1:1000	BD Transduction Laboratories

Tabelle 4: Liste der eingesetzten Antikörper

1.4 Mikroorganismen

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue Hitzeschock-kompetente Zellen	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F'proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene

1.5 Fliegenstämme

Die Fliegenzucht erfolgte bei 18 oder 25°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% in kleinen Gläsern mit Nahrungsbrei (0,8% Agar, 2,2% Zuckerrübensirup, 8,0% Malzextrakt, 1,8% Bierhefe, 1,0% Sojamehl, 8,0% Maismehl). Um Pilzbefall zu

verhindern enthielt das Futter 0,3% Nipagin als Fungizid. Die administrierte Beleuchtung simulierte einen 12/12 h LD Tag-Nacht Rhythmus.

Für Kreuzungen wurden zwei bis drei Männchen mit vier bis sechs Jungfrauen zur Eiablage in Gläsern mit Trockenhefe als zusätzlicher Proteinquelle gehalten und vor dem Schlüpfen der F1-Generation aus den Gläsern entfernt. Die Alterungsexperimente fanden in Gläsern ohne Trockenhefe statt.

Genotyp	Chromosom	Kürzel/Bemerkungen	Herkunft/Literatur
$y, w[*]; P\{actin-GAL4/TM6b\}$	III	Actin-Gal4/ homozygot-letal	Stammsammlung
$y, w^{1118}; CyO/noc^{Sco}; TM3/mus302^{D3}$	II, III	CyO/Sco; TM3/D3 Doppelbalancerstamm	Stammsammlung
$w^{1118}; CyO/noc^{Sco}; P\{w[+mC]=UAS-ple.RNAi\}, P\{w[+mC]=UAS-Hsap\SNCA.A30P;40.1/TM3\}$	II, III	CyO/Sco; UAS-IR-ple, UAS-Syn(A30P)/TM3	diese Arbeit
$w^{1118}; CyO/noc^{Sco}; P\{w[+mC]=UAS-ple.RNAi\}$	II, III	CyO/Sco; UAS-IR-ple/TM3	diese Arbeit
$w^{1118}; CyO/Sp; TM6B/mus302^{D3}$	II, III	CyO/Sp; TM6B/D3 Doppelbalancerstamm	Stammsammlung
$w[*]; P\{w[+mW.hs]=GawB elav[C155]\}$	X	elav-Gal4	Stammsammlung
$w[*]; fmn$	II	fmn	Kume <i>et al.</i> , 2005
w^{1118}	X	genetischer Hintergrund	Stammsammlung
$w[*]; P\{w[+mC]=longGMR-GAL4\}2$	III	<i>GMR-GAL4</i>	Ratnakumar und Desplan, 2004
sni^1	X	P-Element	José Botella/ Botella <i>et al.</i> , 2004
$w[*]; P\{w[+mC]=ple-GAL4.F\}3$	III	TH-Gal4	Serge Birman/ Friggigrelin <i>et al.</i> , 2005
$w^1; P\{UAS-Cat.A\}$	II	UAS-Cat	Phillips <i>et al.</i> , 2000
$w^1; P\{UAS-Cat.A\}/CyO; P\{w[+mC]=UAS-Hsap\SNCA.A30P;40.1/TM3\}$	II, III	UAS-Cat; UAS- α -Syn(A30P)	diese Arbeit
$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-dDAT\}$	III	<i>UAS-dDAT</i>	Kume <i>et al.</i> , 2005
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-Dicer2\}$	II	UAS-Dicer2	Vienna Drosophila RNAi Center/ Dickson <i>et al.</i> , 2007

<i>lCyO/ P{w[+mC]=UAS-Dicer2}; TM3/ mus302^{D3}</i>	II, III	UAS-Dicer2/CyO; D3/TM3	Juan Navarro
<i>w¹¹¹⁸; CyO/ P{w[+mC]=UAS-Dicer2}; P{w[+mC]= UAS- ple.RNAi}</i>	II, III	UAS-Dicer2/CyO; UAS- IR-ple	diese Arbeit
<i>w¹¹¹⁸; CyO/ P{w[+mC]=UAS-Dicer2}; P{w[+mC]= UAS- ple.RNAi}, P{w[+mC]= UAS- Hsap\SNCA.A30P}40.1/T M3</i>	II, III	UAS-Dicer2/CyO; UAS- IR-ple, UAS- Syn(A30P)/TM3	diese Arbeit
<i>w¹¹¹⁸; CyO/ P{w[+mC]=UAS-Dicer2}; P{w[+mC]= UAS- Hsap\SNCA.A30P}40.1/T M3</i>	II, III	UAS-Dicer2/CyO; UAS- Syn(A30P)/TM3	diese Arbeit
<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS- GFP.S65T}T2</i>	II	UAS-GFP	Bloomington Stock Center/ Dickson, 1996
<i>w¹¹¹⁸; P{w[+mC]=UAS- GFP.Y}; P{w[+mC]=ple- GAL4.F}3</i>	II, III	UAS-GFP; TH-Gal4	Bayersdorfer, 2005
<i>w[I]; P{w[+mC]=UAS- Sod.A}B36</i>	II	UAS-hSoD1	Bloomington Stock Center/Parkes <i>et al.</i> , 1998
<i>w¹¹¹⁸; P{w[+mC]=UAS- ple.RNAi}</i>	III	UAS-IR-ple	Vienna Drosophila RNAi Center/ Dickson <i>et al.</i> , 2007
<i>w[I]; P{w[+mC]=UAS- Sod2.M}UM83</i>	II	UAS-mSoD	Bloomington Stock Center/Missirlis <i>et al.</i> , 2003
<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS- Sniffer};</i>	II	UAS-Sniffer	José Botella/ Botella <i>et al.</i> , 2005
<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS- Sniffer}/CyO/ P{w[+mC]=UAS- Hsap\SNCA.A30P}40.1/T M3</i>	II, III	UAS-Sniffer; UAS- α - Syn(A30P)	diese Arbeit
<i>w[*]; P{w[+mC]=UAS- Sod.A}B36/CyO; P{w[+mC]=UAS- Hsap\SNCA.A30P}40.1/T M3</i>	II, III	UAS-SoD; UAS- α - Syn(A30P)	diese Arbeit
<i>w¹¹¹⁸; P{w[+mC]=UAS- GFP.nls}I4</i>	II	UAS-Stinger	Bloomington Stock Center/ Robertson, 2001

$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-GFP.nls\}14;$ $P\{w[+mC]=ple-GAL4.F\}3$	II, III	UAS-Stinger; TH-Gal4	Bayersdorfer, 2005
$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$	III	UAS-Syn(A30P)	Nancy Bonini/ Bonini, 2004
$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}15.3$	III	UAS-Syn(A53T)	Nancy Bonini/ Bonini, 2004
$w[*]; P\{w[+mC]=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$	III	UAS-Syn(wt)	Nancy Bonini/ Bonini, 2004
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT/CyO\}1$	II	UAS-SynT1	diese Arbeit
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT/TM3\}12$	III	UAS-SynT12	diese Arbeit
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT/CyO\}13$	II	UAS-SynT13	diese Arbeit
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT/CyO\}2$	II	UAS-SynT2	diese Arbeit
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT/CyO\}3$	II	UAS-SynT3	diese Arbeit
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT/CyO\}4$	II	UAS-SynT4	diese Arbeit
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT/CyO\}8$	II	UAS-SynT8	diese Arbeit
$w^{1118}; P\{w[+mC]=UAS-SynT-IK\}/CyO$	II	<i>UAS-SynT-IK</i>	Tobias Härtinger/ Härtinger, 2008

Tabelle 5: Liste der eingesetzten Fliegenstämme

1.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
GTE	50mM Tris/HCl pH 8,0. 25 Glukose. 10mM EDTA	Plasmid- Miniprep
NaOH/SDS	0,2M NaOH, 1%SDS	Plasmid- Miniprep
KAc	5MKAc	Semidry- Blot
SDBB	25mM Tris, 192mM Glycin pH8,3	Plasmid- Miniprep
PCB	6M Harnstoff, 10% DDT, 0,01% Bromphenolblau, 10mM NaPO4 pH 7.2, 210µl Mercaptoethanol	Protein- Extraktion
Carnoy- Fixans	60% EtOH p.a., 30% Chloroform, 10% Eisessig	Fixierung für ABC-HRP
APS	10% APS	Westernblot
Natriumazid	10% Natriumazid	Fungizid für Antikörperlösungen

LB _{Amp} (Midiprep)	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 3 ml/l 1N NaOH, 100µg/ml Ampicillin	selektive E. coli Flüssigkultur
LB _{Amp} (Miniprep)	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 3 ml/l 1N NaOH, 50µg/ml Ampicillin	selektive E. coli Flüssigkultur
LB-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 3 ml/l 1N NaOH	E. coli Flüssigkultur
SDS-PAGE Buffer	1,5% Tris, 7,2% Glycin, 0,5% SDS	Westernblot
4% PFA	4% PFA in PBS	Wholemout
Apfelsaftagarplatten	1,75% Agar; 25% Apfelsaft; 2,5% Zucker; 1% Nipagin in Ethanol	Keimbahntransformation
Injektionspuffer (10x)	5mM KCL; 0,1mM Na- Phosphatpuffer (pH 6,8)	Keimbahntransformation
Squishing buffer	10mM Tris-Cl (pH 8,2), 1mM EDTA, 25mM NaCl	gDNA Extraktion
TAE	0,04M Tris-Acetat, 0,001M EDTA	Agarose- Gelelektrophorese
TBST	TBS, 0,05% Tween-20	Westernblot
TBS	140mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH 7,5	Westernblot
DGLP (2x sample buffer)	0,09M Tris pH 6,8; 20% Glycerin; 2% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 10% Mercaptoethanol; 0,1M DTT	Westernblot
Tris-HCl-Puffer	1,5M Tris HCl-Puffer; pH 8,8	Westernblot
Tris-HCl-Puffer	1M Tris HCl-Puffer; pH 6,8	Westernblot
absteigende Alkoholreihe	99, 96, 80, 70, 30 EtOH	Rehydrierung von Paraffinschnitten
aufsteigende Alkoholreihe	30, 50, 70, 80, 95, 99,5% EtOH	Entwässerung von Semidünn- Schnitten
Einbettmedium	<i>VectaShield H 1000</i> von Vector Laboratories	Wholemout
Eindeckmedium	<i>DPX mountant for histology</i> von Fluka	Semidünn-Schnitte
Formaldehyd-Fixans	4% Paraformaldehyd in PBS; pH 7,4	Wholemout
Glutaraldehyd-Fixans	1% Glutaraldehyd in PBS	Semidünn-Schnitte
Nagellack	farblos, schnell trocknend	Wholemout
Osmium-Fixans	1% OsO ₄ in PBS	Ultradünn-Schnitte

PBS	130mM NaCl; 7mM Na ₂ PO ₄ ; pH 7,2	Semidünn-Schnitte, Wholemunt
PBST	PBS mit 0,5% Triton-X 100; pH 7,4	Wholemunt
Toluidinblau Färbelösung	1% Toluidinblau; 1% di-Natrium-tetraborat	Semidünn-Schnitte

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen

1.7 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, Enzyme, und Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

BioRad, Biozym, Braun, Corning, Fermentas, Fluka, Intenso, Balur, Hartenstein, Kimberley-Clark, LiCor, Marienfeld, Menzel, Merck, New England Biolabs, Pall, Pierce, Pharmacia, PeqLab, Polysciences, Qiagen, Roche, Roth, Sarstedt, Schleicher & Schuell, SemperMed, Serva, Sigma, TPP, USB und Verbatim.

1.8 Software

Programm	Hersteller/Distributor	Version(en)	Verwendungszweck
Alphamanager	Alpha Innotech	2.0	Steuerungssoftware des Geldokumentationssystems
ImageJ	NCBI	1.34 bis 1.42	Quantifizierung dopaminerger Neurone
KamCon	Linthaler & Co.	2.0.5	Fotografie und Dokumentation von Gewebeschnitten
LSM 510	Zeiss	3.2	Steuerungssoftware für Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop
LSM Image Browser	Zeiss	3.2.0.115	Bildbetrachter für Zeiss *.lsm Dateiformat
Odysse	LiCor	1.2	Steuerungssoftware für LiCor Infrarotscanner
Office	Microsoft	10.3416.3501 bis 11.8125.8122	Erstellen dieses Textes
Photoshop	Adobe	CS 3	Bildbearbeitung
SigmaPlot	Sysstat Software	10.0	Erstellen der Grafiken in dieser Arbeit
Statistica	Statsoft Inc.	6.0	statistische Auswertung
Visio	Microsoft	11.3216.5606	Erstellen von Schemazeichnungen

LightCycler Software	Roche	3.5.3	Steuerungssoftware für das Roche LightCycler System
BioEdit	Ibis Biosciences	7.09	Sequenzanalyse für Sequenzdaten im ab1 Dateiformat
EditSeq	DNASStar	5.03	Sequenz- und Restriktionsanalyse
PrimerPremiere	Premier Biosoft International	5.0	Primerdesign
pDRAW32	AcaClone	1.1.96	Analyse von Vektorkarten im *.pdw Dateiformat
ProtParam	Swiss Institute of Bioinformatics (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)	1.1	<i>In silico</i> Proteinanalyse, Wilkins <i>et al.</i> , 1999

Tabelle 7: Verwendete Software

2. Histologische Methoden

2.1 Anti- α -Synuclein- und Anti-SynT- Avidin-Biotin-Complex Horseradish-Peroxidase-Färbung (ABC-HRP) auf Paraffinschnitten

Herstellung von Gewebeschnitten:

Für die ABC-HRP immunhistochemischen Analysen wurden je fünf Fliegen der zu vergleichenden Genotypen auf gemeinsame Krägen aufgefädelt und mit *Sine Oculis* Fliegen so gruppiert, dass eine eindeutige Unterscheidung der Genotypen nach dem Schneiden möglich war. Die aufgefädelten Fliegen wurden zwei Stunden mit Carnoy fixiert und dreimal mit EtOH (99%, 30min; 99%, 30min; abs., 1h) gewaschen, bevor sie ÜN in Methylbenzoat eingelegt wurden. Das Methylbenzoat wurde bei 60°C durch Einlegen in ein Methylbenzoat/Paraffin 1:1 Gemisch, gefolgt von sechs Paraffinbädern mit steigender Reinheit aus dem Gewebe entfernt. Danach wurden die Krägen in Paraffinblöcken eingebettet.

Nach dem Abtrennen der Krägen mit den Körpern wurden 7 μ m Schnitte der Köpfe angefertigt, getrocknet und bei 60°C durch zwei 30-minütige Xylolbäder entparaffiniert.

Die Antigendetektion erfolgte unter Zuhilfenahme des *VECTASTAIN ABC Elite* Kits der Firma *VectaStain* nach folgendem Protokoll:

Rehydrierende Alkoholreihe:

99% EtOH	5min, RT
96% EtOH	5min, RT
90% EtOH	5min, RT
80% EtOH	5min, RT
70% EtOH	5min, RT
MQ-H ₂ O	5min, RT

Anti- α -Syn ABC-HRP-Färbung:

	PBST 0,5% Triton-X 100	5min, RT
Blocken	PBST 0,5% Triton-X 100 5%NHS	30min
1. Antikörper	Mouse- Anti- α -Synuclein LB509, 1:500 in PBST 0,5% Triton-X	ÜN, 4°C
Aufwärmen		1h, RT

Waschen	PBST 0,5% Triton-X 100	2 x 5min, RT
2. Antikörper	Horse- α -Mouse Biotinyliert, 1:500 in PBST 0,5% Triton-X 100	1h, RT
Waschen	PBST 0,5% Triton-X 100	2 x 5min, RT
HRP-Konjugation	ABC (A:B = 1:1)	1h, RT
Waschen	PBST 0,5% Triton-X 100	2 x 15min
DAB-Reaktion	DAB-Urea-H ₂ O ₂	2-10min, Sichtkontrolle
Neutralisation	MQ-H ₂ O	
Eindeckeln	Glycergel	

2.2 Semi- und Ultradünnschnitte

Fliegenköpfe wurden auf Eis in PPS pH 7,4 entrüsselt und anschließend in 5% Glutaraldehyd ÜN bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Köpfe dreimal in PPS pH 7,4 gewaschen und mit 1% Osmiumtetroxid bei 4°C kontrastiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Köpfe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 min 50%, 70%, 80%, 95%, 3x100% EtOH) dehydriert, in Propylenoxid gewaschen und in Durcupan eingebettet.

2.2.1 Semidünnschnitte

Zur Herstellung von Semidünnschnitten für die Lichtmikroskopie wurden 2 μ m Schnitte aus den Blöcken angefertigt, mit Toluidinblau gefärbt und mit DPX eingedeckelt.

2.2.2 Ultradünnschnitte

Von den eingebetteten Köpfen wurden mit einem Ultra-cut ca. 50nm dicke Schnitte angefertigt, auf Grids gezogen und mit 2% Uranylacetat/Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert.

Die Aufnahmen wurden an einem *Zeiss EM 10 C/V/R* Elektronenmikroskop bei einer Kathodenspannung von 80kV angefertigt.

2.3 Antikörperfärbung an Gehirn Wholemounts

2.3.1 Anti-Tyrosin-Hydroxylase-Färbung

Gehirne fünf bis sieben Tage alter Fliegen wurden in Phosphatpuffer mit 4% PFA, pH 7,2 in der Mitte der Lichtphase präpariert und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gehirne fünfmal mit PBST 0,5% Triton-X100

(=Waschpuffer) gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur in PBST 0,5% Triton-X100 10%NGS (=Blockpuffer) geblockt.

Die 24-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper LNC1 erfolgte bei 4°C im Blockpuffer in dem der Antikörper in einer 1:100 Verdünnung vorlag. Die Bindung des primären Antikörpers wurde durch langsames Aufwärmen bis auf Raumtemperatur stabilisiert, bevor durch fünfmaliges Waschen ungebundener primärer Antikörper entfernt wurde.

Die Inkubation mit dem, 1:150 in Block-Puffer vorliegenden, sekundären Antikörper G α M 546, fand über Nacht oder 48 Stunden bei Raumtemperatur statt.

Im Anschluss wurden die Gehirne weitere fünf Male gewaschen, Pufferreste entfernt und auf vier Deckgläsern (Abbildung 11) in einer Schicht *VectaShield* eingebettet und bis zur Auswertung im Kühlschrank gelagert.

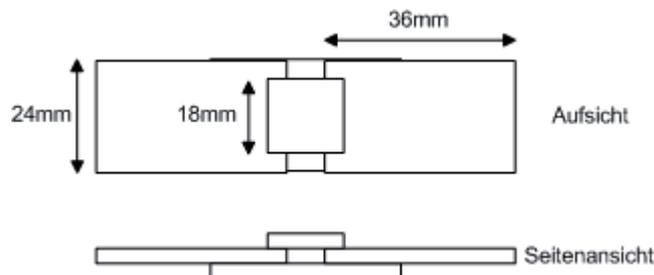


Abbildung 11: Schemazeichnung eines Objektträgers für Gehirn- Wholemounts

2.3.2 Anti- α -Syn-Färbung

Das Vorgehen bei Präparation, Fixierung, Blocken und Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper sowie bei den Waschschrritten als auch beim Einbetten war bei α -Syn- Färbungen und Tyrosin-Hydroxylase-Färbungen identisch. Die Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper fand ebenfalls in Blockpuffer statt.

Die Konzentration des primären Antikörpers LB509 betrug 1:100, die des sekundären Antikörpers 1:80.

2.3.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie für die gleichzeitige Detektion des GFP-Reporters und der Antikörperfärbungen

Für die gleichzeitige Detektion der Antikörperfärbungen und des GFP-Reporters an Gehirn- Wholemounts wurde das LSM-510 im *MultiChannel* Modus so konfiguriert, dass gleichzeitig GFP und der sekundäre Antikörper *AlexaFlour* 546nm detektiert werden konnten. Die Nominalstärke des Argonlasers betrug 35%, von dessen Intensität bei 488nm 40% auf die Band-Pass Filter weitergeleitet wurden. Der HeNe1- Laser wurde bei

maximaler Leistung betrieben. Um ‚crosstalking‘- Artefakte zwischen den grünen und roten Fluoreszenzsignalen zu vermeiden wurde der 488/543 Hauptstrahlteiler in den Strahlengang gelegt und entsprechende Band-Pass Filter (GFP: 505- 535; *AlexaFluor* 546 540- 560nm) für die Detektion der Signale eingelegt.

Die Aufzeichnung erfolgte mit dem 20x PlanAchromat Objektiv. Beide Kanäle wurden gleichzeitig gescannt und in einen 512x512 Pixel Z-Stack eingelesen. Für weitere Vergrößerungen wurden über die *Region of Interest* (ROI)- Funktion Scanbereiche festgelegt und die Auflösung auf den betreffenden maximal möglichen Wert erhöht.

2.3.4 Quantifizierung dopaminergener Neurone an Gehirn Präparaten

Die Quantifizierung der dopaminergen Neurone wurde mit einer Methode durchgeführt, die in einer vorhergehenden Arbeit (Bayersdorfer, 2005) entwickelt wurde. Aufgrund der stetigen Weiterentwicklung der zur Verfügung stehenden Auswertungssoftware *ImageJ* und deutlich gesteigener Rechenleistung konnte die Methode weiterentwickelt werden.

2.3.4.1 Präparation

Gehirne drei bis fünf Tage alter Fliegen, die unter der Kontrolle des pale- Promotors nukleäres Stinger-GFP in den dopaminergen Neuronen exprimieren, wurden in Phosphatpuffer mit 4% PFA, pH 7,2 in der Mitte der Lichtphase präpariert und zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunklen fixiert. Im Anschluss wurden die Gehirne fünfmal mit kaltem PBS pH7,2 gespült und auf dreiteiligen Objektträgern in *VectaShield* eingebettet. und bis zur Auswertung im Kühlschrank gelagert.

2.3.4.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie für die Quantifizierung dopaminergener Neurone:

Mittels eines *LSM 510* wurden dreidimensionale Abbilder des mit TH-Gal4 getriebenen nukleären GFP-Reporters aufgenommen.

Dabei betrug die Nominalstärke des Argonlasers 35%, von dessen Intensität bei 488nm 40% über einen Spiegel und einen *Band Pass* Filter (505-535nm) auf den Detektor weitergeleitet wurden. Dieser wurde mittels *Detektor Gain* und *Amplifier Offset* so justiert, dass die Signale nicht überschwellig wurden und der Hintergrund weitgehend unter der Detektionssensitivität lag.

Der Scanbereich wurde festgelegt, indem mit dem 20x PlanAchromat Objektiv und einem *Fast XY* Scan durch das Gehirn fokussiert wurde. Die Grenzen der *Z-Stacks* wurden kurz vor dem ersten, beziehungsweise kurz nach dem letzten auftretenden Signal

festgelegt. Die Optimierung der Parameter für optische Schnittdicke und *Pinhole*-Durchmesser erfolgte automatisch durch das Steuerungsprogramm. Die Anzahl der optischen Schnitte durch die Gehirne war aufgrund der Automatisierung und der morphologischen Größenunterschiede der einzelnen Gehirne untereinander nicht völlig konstant. Der *Pinhole*- Durchmesser lag im Bereich von 0,96 bis 1,01 Airy Units.

Nach Festlegung der oben beschriebenen Parameter wurden die einzelnen optischen Schnitte in *Z-Stacks* mit einer Auflösung von 512 x 512 Pixel eingelesen. Die *Pixeltime*, die sich aus Anzahl der bidirektionalen Scan- Wiederholungen eines Pixels und der Scangeschwindigkeit zusammensetzt, lag um 3,20µsek.

2.3.4.3 Quantifizierung

Die Z-Stacks wurden mittels der Steuerungssoftware des Mikroskops in Projektionen umgewandelt. Pro Gehirn wurden 30 Einzelprojektionen berechnet, bei denen sich der Aufsichtswinkel jeweils um sechs Winkelgrade erhöhte. Dadurch entstand ein virtuelles, um 180 Winkelgrade rotierbares Modell des Expressionsmusters des GFP-Reporters, welches in *ImageJ* eingelesen werden kann. Bei der Auswertung mit *ImageJ* wurden folgende Schritte durchgeführt:

Hintergrundkorrektur:

Die Hintergrundkorrektur ist ein weiterer Normalisierungsschritt, um Fehler, die bei der Normalisierung unter Sichtkontrolle am Mikroskop zwangsläufig auftraten zu minimieren.

Process → Subtract Background

Farbwertreduzierung:

Die Konvertierung des Bildes von 32 bit auf 8 bit diente der Farbwertreduktion von 65536 auf 256 Farben. Nachfolgende Operationen konnten nur auf 8-bit-Datensätze angewendet werden.

Image → Type → 8-Bit

Schwellwertfestlegung:

Der Schwellwert für die Quantifizierung erfolgte automatisch. Dies war nur bei ausreichender Qualität der Präparate sinnvoll (Abbildung 12A).

Image → Adjust → Threshold → Auto → Apply

Signaldiskriminierung:

Die *Watershed*- Funktion ermöglichte die Diskriminierung von Einzelsignalen, die sich in einer Schnittebene überlagern und ohne Anwendung dieser Funktion als Einzelsignal gewertet würden (Abbildung 12C).

Process → Binary → Watershed

Signaldetektion:

Der Detektor wurde so eingestellt, dass Signale ab der Fläche eines einzelnen Pixels als positives Signal gewertet wurden. Als Ausgabe wurden eine *Outline*- Darstellung und eine Zusammenfassung des Datensatzes angefordert (Abbildung 12B, E)

Analyze → Analyze Particles

Die Methode detektierte in unbehandelten Kontrollen durchschnittlich 96 Zellkerne. Dieser Wert entspricht dem Wert, der durch manuelles Zählen ermittelt wurde (Abbildung 12D).

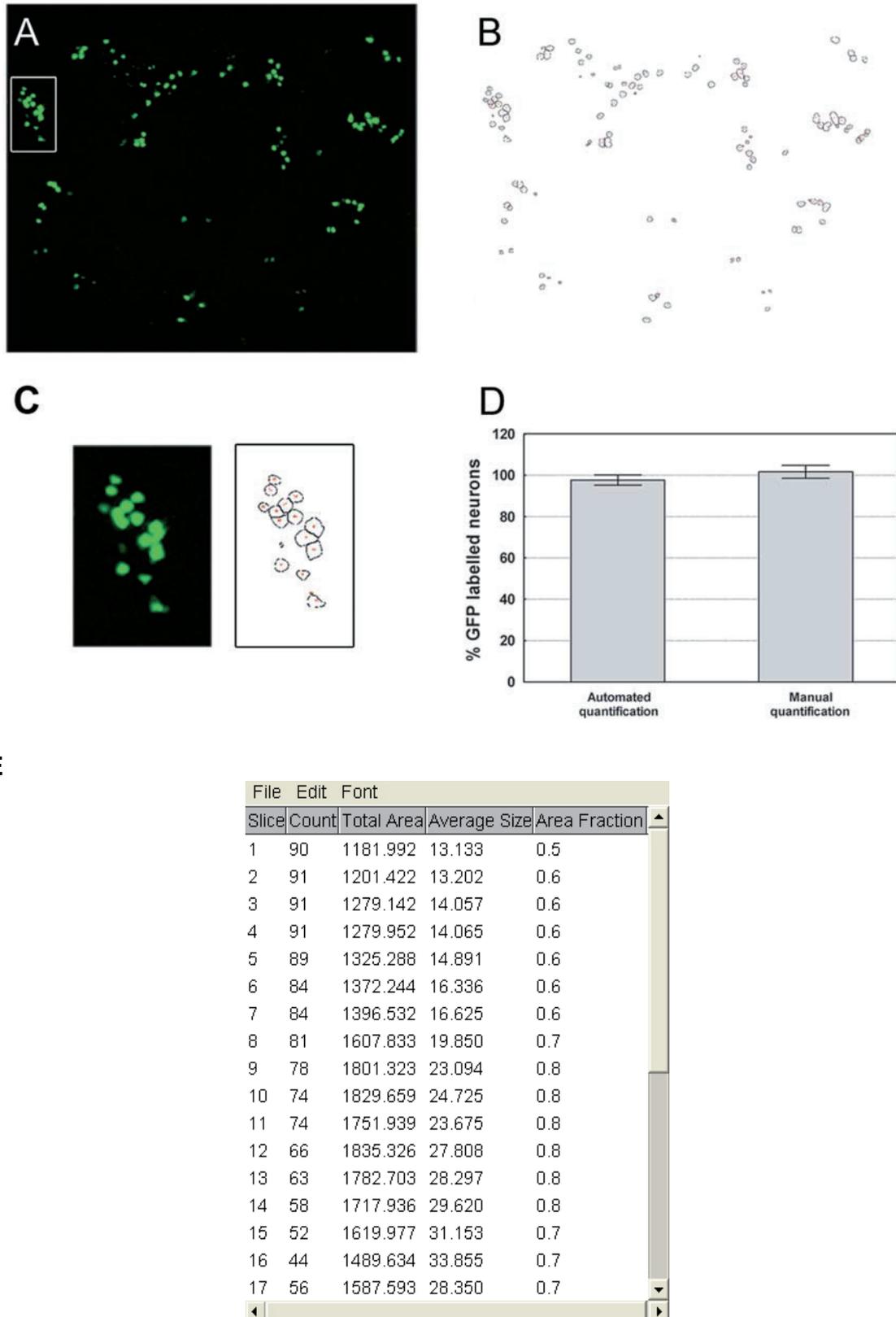


Abbildung 12: Softwaregestützte Quantifizierung dopaminerger Neurone:

A: Markierte Neurone im ZNS einer männlichen Fliege

B: Outline Darstellung der Signalerfassung durch ImageJ

C: Vergrößerung der GFP- Markierung und der Outline Darstellung des PPL1- Clusters

D: Vergleich zwischen manueller und softwaregestützter Quantifizierung

E: Ausgabebeispiel

3. Molekulare Methoden

3.1 Methoden für die Arbeit an Nukleinsäuren

3.1.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach dem ‚Single-Fly‘ Protokoll (Gloor *et al.*, 1993) isoliert. Anstatt einer Fliege wurden jedoch drei Fliegen in einem PCR-Reaktionsgefäß mittels einer mit 50 µl Squishing Buffer befüllten Pipettenspitze zermalmt und mit dem Inhalt der Spitze versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf 37°C wurde die im Squishing Buffer enthaltene Proteinase K bei 95°C inaktiviert.

3.1.2 Polymerase Chain Reaction

Sofern die optimale Annealingtemperatur eines Primerpaars bekannt war wurden PCR-Reaktionen mit einer vorher festgelegten und dann konstanten Annealingtemperatur durchgeführt. Für Primer, die mit dem Programm *PrimerPremiere* berechnet waren lieferten die Reaktionen mit der vorhergesagten Annealingtemperatur zufriedenstellende Amplifikation.

War die optimale Annealingtemperatur eines Primerpaars nicht bekannt wurde zu deren Ermittlung eine Temperaturgradienten-PCR für den Temperaturbereich zwischen 50 und 60°C durchgeführt. Die Elongationszeit wurde der Größe des Amplikons angepasst, wobei davon ausgegangen wurde, dass sich die Replikationsgabel bei der eingesetzten prokaryotischen Polymerase mit einer relativen Geschwindigkeit von approximativ 1000bp/min fortbewegt.

Reaktionsansatz und Reaktion:

Template cDNA	1µl	5 min.	95°C	35 Zyklen
10xLow Salt Buffer	2µl	1 min.	95°C	
40 mM dNTPs (10mM/Base)	1µl	30 sek.	XX°C	
Taq- Polymerase	1µl	XX sek.	72°C	
10mM forward Primer	1µl	10 min.	72°C	
10mM reverse Primer	1µl			
MQ- H ₂ O	ad 20µl	∞	4°C	

3.1.4 Plasmid Miniprep

Die Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) aus 1ml einer E.coli Übernachtskultur isoliert und in 20µl autoklaviertem MQ-H₂O aufgenommen.

3.1.5 Plasmid Midiprep

Die Plasmid-DNA wurde mit dem *QIAfilter Plasmid Midi Kit* der Firma *Qiagen* nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, 2005) aus 25ml einer LB_{AMP} Übernachtskultur isoliert. Die Ampicillinkonzentration im Aufzuchtmedium wurde in Abweichung vom Protokoll des Herstellers auf 100 ng/µl verdoppelt.

3.1.6 Restriktionsverdau

Reaktionsansatz für Testverdau:

DNA	5µl
Enzym(e) (10U/µl)	je 1µl
10x Puffer	2µl
steriles MQ-H ₂ O	ad 20µl
Inkubation:	1h, 37°C

Reaktionsansatz für präparativen Verdau:

DNA	10µl
Enzym(e) (10U/µl)	je 1,5µl
10x Puffer	3µl
steriles MQ-H ₂ O	ad 30µl
Inkubation:	1h, 37°C

Die korrekte Kombination von Puffer und Enzymen wurde aus den Aktivitätstabellen für Restriktionsenzyme (*New England Biolabs*) entnommen.

3.1.7 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Proben

DNA wurde auf 0,8-1,2% TAE-Agarosegelen (0,1µl/ml EtBr) geladen und bei 90V-120V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte am *Intas Multiimage Light Cabinet*.

Falls für das betreffende Experiment von Nöten, wurden DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Protokoll des Herstellers (Qiagen, 2005) extrahiert.

3.1.8 Ligation

Reaktionsansatz :

Vektor	50ng
Insert	150ng
T4 Ligase (3U/ μ l)	1 μ l
10x Ligation Buffer	2 μ l
steriles MQ-H ₂ O	ad20 μ l
Inkubation:	1h, 37°C bzw. ÜN 18°C

3.1.9 Transformation

Die Transformation von XL1-Blue Zellen wurde nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* (1996), Unit 1.8.2 mit 45sek. Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Die Zellen wurden auf selektivem LB_{Amp} Medium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.10 Zyklus-Sequenzreaktion und Fällung der Sequenzierungsansätze

Die Sequenzreaktion wurde mit dem *Big Dye[®] Terminator v.1.1* Sequenzierungskit der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Die Annealingtemperaturen für die jeweiligen Sequenzreaktionsprimer können aus Tabelle 2 entnommen werden:

Reaktionsansatz und Reaktion:

Big Dye v.1.1	2 μ l	10sek.	95°C	29 Zyklen
Primer (10 μ M)	3 μ l	5sek.	XX°C	
5x Seq-Buffer	3 μ l	4min.	60°C	
Plasmid	50-100 μ g	∞	4°C	
MQ-H ₂ O	ad 20 μ l			

Nach der Sequenzreaktion wurden die Proben auf 100 μ l mit MQ-H₂O aufgefüllt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 μ l 3M NaAc pH4,8 und 250 μ l EtOH p.a. und 15 minütiger Zentrifugation bei 13000g gefällt. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und in 20 μ l HiDi-Formamid aufgenommen.

Die Sequenzierung der Sequenzreaktionsprodukte erfolgte bei der der Firma *Geneart, Regensburg*. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm *BioEdit*.

3.1.11 RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Die RNA wurde aus 100 Köpfen mit dem *PeqGOLD TriFast™* Reagenz der Firma *PeqLab* nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und in 50µl H₂O_{DEPC} gelöst. Konzentration und Ratio (A_{260}/A_{280}) der RNA wurden mit einem *Ultraspec 3000* der Firma *Pharmacia Biotech* an einer 1:100 Verdünnung UV- spektrometrisch bestimmt. Die erreichte RNA-Konzentration lag zwischen 0.7 und 1.1µg/µl bei einer Ratio von 1.6 bis 1.9. Proben, die diese Kriterien nicht erfüllten wurden verworfen.

3.1.12 Reverse Transkription und Test der cDNA

Die Reverse Transkription erfolgte mit dem *Quantitect™ Reverse Transcription Kit* der Firma *Qiagen* nach dem Protokoll des Herstellers. Um unerwünschte Kopien genomischer DNA auszuschließen, kamen anstatt des mitgelieferten Primer Mix Oligo-dT Primer zum Einsatz.

Zur Qualitätskontrolle der hergestellten cDNA wurde eine PCR mit Primern für das Housekeeping- Gen rp49 durchgeführt. Zeigten sich nach einer Gelelektrophorese auf einem Agarosegel Schmier oder unspezifische Banden wurde die betreffende Probe verworfen.

3.1.13 Semiquantitative RT-PCR

In den semiquantitativen Real-Time-PCR Experimenten kamen das *Lightcycler™* System der Firma Roche und das *Quantitect SybrGreen Kit* der Firma Qiagen zum Einsatz. SybrGreen I absorbiert als asymmetrischer Cyanin- Farbstoff nach Bindung an DNA blaues Licht der Wellenlänge 498nm und emittiert grünes Licht der Wellenlänge 522nm. Anhand der Emissionsstärke kann die DNA-Konzentration spektroskopisch ermittelt werden. Zur Minimierung des Pipetierfehlers wurde für jede cDNA- Probe ein PCR-Mastermix ohne Primer hergestellt und für je drei Reaktionen für das Housekeepinggen und das Zielgen in sechs Kapillaren vorgelegt. Die nachträgliche Zugabe der Primer zu den Einzelreaktionen führt dann nicht zu einer Veränderung der Reaktionseffizienz.

qRT-PCR Mastermix für eine cDNA- Probe und Real-Time PCR:

cDNA	6µl	15 min.	95°C	40 Zyklen
SybrGreen Mix	60µl	15 sek.	95°C	
MQ-H ₂ O	ad 20µl	30 sek.	55°C	
Primerzugabe:	2 mal 1µl	20 sek.	72°C	

Die 95 → 55°C Schmelzkurve am Ende der Reaktionen zeigte für keinen der benutzten Primer Anzeichen für Primerdimere oder unspezifische Produkte.

Zur Auswertung diene die $\Delta\Delta C_T$ – Methode. Unter dem C_T -Wert versteht man die Zyklenzahl, an dem das von SybrGreen emittierte Signal einen bestimmten Schwellwert (Threshold) übersteigt. Der ΔC_T - Wert einer Probe errechnet sich aus der Differenz der durchschnittlichen C_T -Werte der Reaktionstriplets des Zielgens (ZG) und des Housekeepinggens (HK):

$$\Delta C_T = (CT(ZG)_1 + CT(ZG)_2 + CT(ZG)_3)/3 - (CT(HK)_1 + CT(HK)_2 + CT(HK)_3)/3$$

Der $\Delta\Delta C_T$ – Wert des ist die Differenz aus den ΔC_T – Werten von Kontrolle (K) und der zu untersuchenden Probe (P):

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(P) - \Delta C_T(K)$$

Das Expressionsverhältnis r ergibt sich dann aus der negativen Potenz des $\Delta\Delta C_T$ – Wertes zur Basis 2.

$$r = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.2 Methoden für die Arbeit an Proteinen

3.2.1 Immunoblot- Verfahren

3.2.1.1 Westernblot für α -Synuclein mit Aktin als Ladekontrolle

Proteinextraktion:

20 Fliegen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und durch vortexen in einem Eppendorf Reaktionsgefäß dekaptiert. Die Separation von Köpfen und Körpern fand über ein in flüssigem Stickstoff gekühltes Metallsieb statt.

Die Köpfe wurden in 30 μ l eisgekühltem PCB mit einem eisgekühlten Stößel homogenisiert. Unlösliche Probenbestandteile wurden durch zwei Zentrifugationsschritte bei vier Grad Celsius abgetrennt.

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese:

Nach Zugabe von 5 μ l 6xDGLP und fünfminütiger Proteindenaturierung bei 95°C wurden die Proteine in den Proben bei 50V über Nacht auf einem 16,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

SDS-Polyacrylamidgel:

	Trenngel 16,5%	Sammelgel 5%
40:1 Acrylamid/Bisacrylamid	7,5ml	1,25ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	5ml	
1,0M Tris-HCl, pH 6,8		1,25ml
MQ-H ₂ O	7,3ml	7,4ml
10% (w/v) SDS	100 μ l	50 μ l
10% (w/v) APS	100 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

Blot:

Um die Proteine auf die PVDF Membran zu transferieren wurde die ‚Semidry-Blot‘ Methode (Ausubel *et al.*, 1996) gewählt. Die gewässerte Membran, das Gel und sechs Whatman-Papiere wurden in SDBB equilibriert. Die Proteine wurden eine Stunde mit einer Stromstärke von 400mA aus dem Gel auf die Membran transferiert.

Immunfärbung:

Nach dem Blocken in OBP/TBS fand die Inkubation mit den im Verhältnis 1:1000 (clone49) respektive 1:2500 (AA20-33) in OBP/TBST verdünnten primären Antikörpern über Nacht bei vier Grad Celsius statt. Nachdem die Antikörperbindung durch langsames Aufwärmen bis zur Raumtemperatur stabilisiert und überschüssiger Antikörper durch waschen mit TBST entfernt war, erfolgte die zweistündige Inkubation mit den jeweils 1:2500 in OBP/TBST verdünnten sekundären Antikörpern (G α M 680 und G α R 800). Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorophorgruppen der sekundären Antikörper waren dieser und alle folgenden Schritte abgedunkelt vorzunehmen.

Detektion und Quantifizierung:

Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Membran auf einem Infrarotscanner (*LiCor Qdyssey*) bei 700 und 800nm angeregt und die Infrarot-Fluoreszenz im grünen und roten Wellenlängenbereich aufgezeichnet und digital im tif-Format gespeichert.

Für die Quantifizierung der Proteine wurde die *Integrated Intensity* von Aktin- und α -Syn- Signal einer Spur mit der Steuerungssoftware bestimmt und der Quotient aus beiden Werten gebildet. Der Quotient stellt dann die α -Syn- Menge relativ zur Aktin- Menge innerhalb einer Einzelprobe dar.

3.2.1.2 nativer Westernblot für α -Synuclein-Aggregate

Proteinextraktion:

100 Fliegen wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und durch vortexen in einem Eppendorf Reaktionsgefäß dekaptiert. Die Separation von Köpfen und Körpern fand über ein in flüssigem Stickstoff gekühltes Metallsieb statt.

Die Köpfe wurden in 50 μ l eisgekühltem MQ-H₂O mit einem eisgekühlten Stößel homogenisiert.

Proteinmengenbestimmung nach Bradford:

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde mit dem *Coomassie Plus* Kit der Firma *Pierce* am *Ultraspec 3000* der Firma *Pharmacia Biotech* durchgeführt. Für jede Messung wurde an einer BSA-Verdünnungsreihe eine Eichkurve bei einer Wellenlänge von 595nm aufgenommen. Durch Vergleich mit der Eichkurve kann so die Gesamtproteinmenge der zu messenden Proben anhand deren Absorption bei 595nm bestimmt werden.

Die Abänderungen beim hier benutzten Verfahren im Vergleich zum Protokoll des Herstellers bestanden in einer verdoppelten Inkubationszeit der Proben mit dem Reagenz und einer fünfmal höheren Verdünnung der Probe. Dies war nötig, da die Reaktionszeit bis zu einem konstanten Absorptionswert wesentlich länger als fünf Minuten dauerte und gleichzeitig die Proteinkonzentration in den Proben so hoch war, dass sie bei Zugabe der empfohlenen Menge sofort ausfielen. Jede Probe wurde dreimal gemessen und als Referenz wurde dieselbe Menge MQ-H₂O eingesetzt. Die Proteinkonzentration in den Proben lag zwischen 2 und 4 µg/µl.

Polyacrylamidgel:

Die Probe wurde nach Zugabe von Glycerin auf ein nicht- denaturierendes 10%-iges Polyacrylamidgel geladen und aufgetrennt.

Primärer Antikörper gegen α -Synuclein (clone49) und sekundärer Antikörper (G α M, 680) waren wie in Punkt 3.2.1.1 beschrieben konzentriert. Waschschritte und Blocken wurden analog durchgeführt. Die Anregung der Membran erfolgte bei 700nm.

4. Keimbahntransformation und genetische Methoden

4.1 Keimbahntransformation

4.1.1 Mikroinjektion

Plasmid- DNA aus einer Midipräp wurde mit sterilem MQ-H₂O und Injektionspuffer mit Lebensmittelfarbe auf eine Endkonzentration von 400 ng/µl verdünnt und in die Polzellregion von männlichen und weiblichen Embryos des Genotyps $w^{1118}; \Delta 2-3, ki$ im syncytialen Stadium injiziert.

30 bis 60 Minuten alte Embryonen wurden von Apfelagarplatten abgesammelt und manuell dechorionisiert, getrocknet und mit *Voltalef* Öl überschichtet. Die Injektionslösung wurde bei ~1 bar Druck mit Hilfe schräg abgebrochener Injektionskapillaren der Firma Eppendorf injiziert. Die weitere Entwicklung der Embryos erfolgte bei 18°C auf Standardmedium.

4.1.2 Etablierung stabiler transgener Linien

Nach der Mikroinjektion wurden die überlebenden Larven voneinander getrennt und als Adulte mit w^{1118} rückgekreuzt. Die Tiere der F1-Generation wurden auf die Präsenz des *mini-white* Gens aus dem p-Element untersucht. Fliegen mit mosaikartiger

Augenpigmentierung wurden verworfen. Um das p-Element zu immobilisieren wurden für die folgenden Kreuzungen nur *kinked*⁺ Tiere ohne Transposase verwendet.

Die Fliegen der F1-Generation wurden einzeln mit dem Doppelbalancerstamm *w*; *CyO/Sp D3/TM6B* gekreuzt. Rotäugige Fliegen, die die Merkmale für die Balancerchromosomen *CyO* und *TM6B* aufwiesen wurden nochmal mit *w*; *CyO/Sp; D3/TM6B* gekreuzt. Traten in der nächsten Generation weißäugige Fliegen mit der Balancerkombination *CyO/Sp; D3* oder *TM6B* auf war davon auszugehen, dass die Insertion auf dem zweiten Chromosom stattgefunden hatte. Analog dazu deuteten weißäugige Fliegen mit der Balancerkombination *CyO* oder *ScO*; und *D3/TM6B* auf einen Insertionsort auf dem dritten Chromosom hin.

Nachdem das Chromosom mit der Insertion bekannt war wurden die Linien über *CyO* beziehungsweise *TM6B* stabilisiert.

4.2 genetische Methoden

4.2.1 Gewebsspezifische Überexpression von humanen und *Drosophila* Genen und gewebsspezifische RNA Interferenz

Bei der gewebsspezifischen Überexpression von Genen beziehungsweise deren cDNAs kam das UAS/GAL4- System (Brand und Perrimon, 1993) zum Einsatz. GAL4 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Hefe, dessen Expression in *Drosophila* unter der transkriptionellen Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors, Enhancers (*Enhancer-Trap*) oder beidem steht. GAL4 codiert für einen Transkriptionsfaktor, der an die *Upstream activating sequence* (UAS) bindet und so die Transkription eines von UAS *downstream* gelegenen Zielgens aktiviert. Die Aktivierung der UAS/GAL4 Systems erfolgt durch die Kreuzung eines transgenen Gal4 Stamms (Treiberlinie) mit einem transgenen UAS-Stamm (Responderlinie). In den Nachkommen wird in allen Zellen, in denen GAL4 transkribiert wird das dem UAS nachgeschaltete Gen expremiert.

Für gewebsspezifisches RNAi Gen *silencing* wurden analog UAS-RNAi-Konstrukte (Lee and Carthew, 2003) exprimiert.

4.2.2 Koexpression mehrerer UAS-Konstrukte

Für die gleichzeitige Überexpression zweier UAS-Konstrukte (hier: p^1 , p^2), die auf den Chromosomen zwei und drei liegen, wurden die beiden p-Elemente unabhängig voneinander durch zwei Kreuzungen mit einem Doppelbalancerstamm in zwei separaten Linien balanciert. Die Nachkommen aus einer Kreuzung dieser Linien untereinander trugen auf dem zweiten und dritten Chromosom die beiden p-Elemente (Abbildung 13).

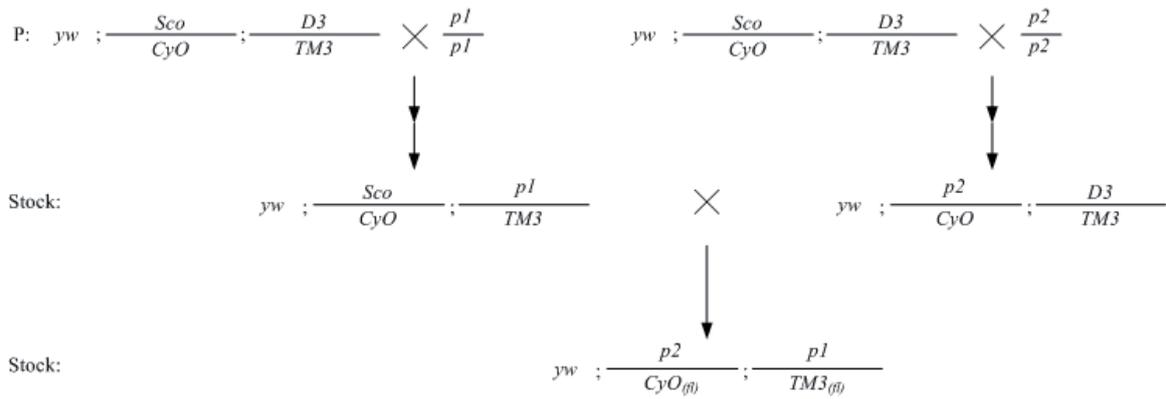


Abbildung 13: exemplarisches Kreuzungsschema für Experimente mit doppelter Überexpression. Nach einer Kreuzung mit einem Treiberstamm überexprimieren die Individuen der nächsten Generation beide, den UAS-Sequenzen nachgestellten Gene.

4.2.3 Meiotische Rekombination von *UAS-α-SynA30P* und *UAS-IR-ple*

Für die meiotische Rekombination von *UAS-α-SynA30P* und *UAS-IR-ple* wurden 100 Jungfrauen des Stammes *UAS-IR-ple* mit 40 Männchen des Stammes *UAS-α-SynA30P* gekreuzt. Die F1-Generation wurde mit dem Doppelbalancerstamm *CyO/Sco*; *D3/TM3* gekreuzt (Abbildung 14).

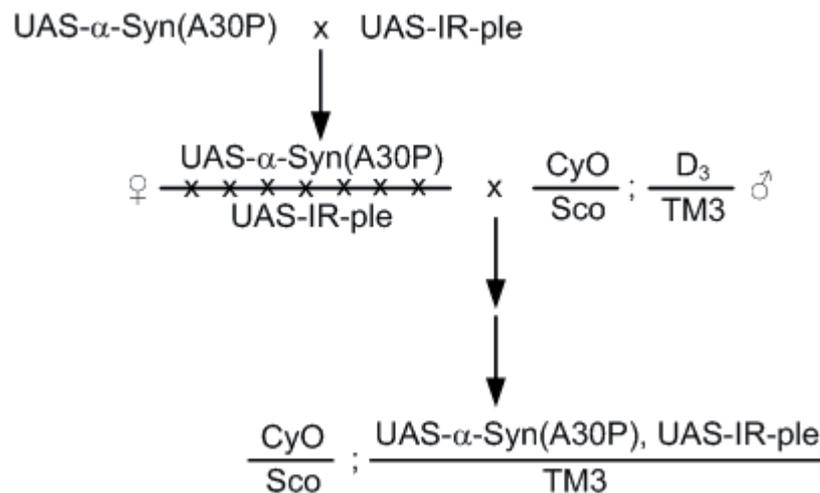


Abbildung 14: Kreuzungsschema für die Rekombination der *UAS-α-SynA30P* und *UAS-IR-ple*-p-Elemente.

Da sowohl *UAS-α-SynA30P* als auch *UAS-IR-ple* heterozygot nur leichte Augenpigmentierung zeigen, konnten in der Folgegeneration die Rekombinanten *UAS-α-SynA30P*, *UAS-IR-ple/TM3* anhand ihrer stärkeren Augenpigmentierung eindeutig identifiziert werden. Die gewonnenen Rekombinanten wurden über *TM3* stabilisiert.

5. Versuche zu oxidativem Stress, Rotenon und Paraquat

5.1 Sauerstoffstress

Drei bis fünf Tage alte Fliegen in einem mit Schliff Fett abgedichteten Exsikkator auf Drosophilamedium ohne Hefe wurden bei 26°C und 12/12 Stunden Licht-Dunkel Rhythmus einer 99,5%igen Sauerstoffatmosphäre ausgesetzt. Der Sauerstoff wurde aus einer Druckflasche über eine Hochdruckkapillare in einen Exsikkator eingeleitet und am Seitenhahn in eine Waschflasche entlassen. Die Kapillare stellte sicher, dass am Exsikkator bei voll geöffneter O₂- Druckflasche immer ein fast normobarischer Sauerstoffdruck (c.a. 1,1 bar) anlagen. Die Fliegengläser waren mit einem lockeren Schaumstoffstopfen verschlossen, um sicherzustellen, dass Innen- und Außenatmosphäre am Fliegenglas identisch waren. Die Gläser wurden jeden zweiten Tag erneuert (nach Orr *et al.*, 1993). Falls nötig wurde die Überlebensrate pro Messpunkt und Genotyp durch nachfolgende Formel berechnet:

$$\frac{(\text{Gesamtzahl}_{\text{Genotyp}} - \text{Anzahl der Toten}_{\text{Genotyp}}) \times 100}{\text{Gesamtzahl}_{\text{Genotyp}}}$$

5.2 Rotenon

Für die Rotenonbehandlung wurde eine 20mg/ml_{DMSO} Rotenon- Stammlösung in einer 10%igen Saccharoselösung 1:100 zu einer Futterlösung verdünnt. Unbehandelte Kontrollgruppen erhielten 10%ige Saccharoselösung ohne Zugabe von Rotenon.

Drei bis fünf Tage alte Fliegen wurden in Gruppen zu je 20 auf je acht Filterpapiere (Durchmesser: 2,7cm; von Schleicher & Schuell) gesetzt, die mit 800µl der Futterlösung getränkt waren. Das Experiment erfolgte unter Standardbedingungen. Um Austrocknung vorzubeugen und aufgrund der Instabilität des Rotenons wurden alle 48 Stunden 300µl einer frisch aus der Stammlösung verdünnten Futterlösung zugegeben. Die Überlebensrate wurde wie unter Punkt 5.1 beschrieben berechnet.

5.3 Paraquat

Als Futterlösung wurde eine 10%ige Saccharoselösung mit 20mM Paraquat versetzt. Unbehandelte Kontrollgruppen erhielten 10%ige Saccharoselösung ohne Zugabe von Paraquat.

Drei bis fünf Tage alte Fliegen wurden in Gruppen zu je 20 auf je acht Filterpapiere (Durchmesser: 2,7cm; von Schleicher & Schuell) gesetzt, die mit 800 μ l der Futterlösung getränkt waren. Das Experiment erfolgte unter Standardbedingungen. Alle 48 Stunden wurden 300 μ l der Futterlösung zugegeben. Die Überlebensrate wurde wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben berechnet.

6. Verhaltensversuche

6.1 Negative Geotaxis

Beim negativen Geotaxistest wurde ermittelt, wie schnell die Versuchstiere gegen die Schwerkraft klettern konnten. Die Fliegen wurden entweder unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 1.5) oder unter Stressbedingungen (siehe Abschnitt 5) gehalten. An den Messzeitpunkten wurden 10 Fliegen eines jeden Genotyps je dreimal getestet. Dabei wurde die innerhalb eines Zeitraums von 12 Sekunden zurückgelegte Strecke ermittelt. Die Geschwindigkeit war dann der Quotient aus der Wegstrecke in cm und der Zeit in Sekunden.

7. Statistische Analysen

7.1 Deskriptive Statistik

Fehlerbalken in Diagrammen stellen den mittleren Standardfehler (σ_n) einer Gruppe von Stichproben dar. Er berechnet sich nach

$$\sigma_n = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

wobei σ die Standardabweichung und n die Anzahl der Proben darstellt. Die Standardabweichung wurde im Programm *Microsoft Excel* mit der Funktion ‚STABW‘ bestimmt.

7.2 Student's t-Test

Als Signifikanztest wurde der ungepaarte Student's t-Test aus den Programmen *Statistica 6.0* und *SigmaPlot 10.0* eingesetzt. Die Signifikanzschwellen wurden wie folgt gesetzt:

$p \leq 0,05$	*	(signifikant)
$p \leq 0,01$	**	(hoch signifikant)
$p \leq 0,001$	***	(höchst signifikant)

Für die Überprüfung der Zulässigkeit des t-Tests wurde die Normalverteilung der Daten überprüft und die errechneten t-Werte mit den experimentellen Freiheitsgraden abgeglichen (Scott, 1985).

Kapitel III: Ergebnisse

1. Die Bedeutung von oxidativem Stress im α -Synuclein- Modell

Beim Menschen gelten Mutationen im *SNCA*- Gen als Risikofaktoren für das Auftreten der erblichen Variante der PD (Polymeropoulos *et al.*, 1997). In *Drosophila* werden nach Expression von α -Syn und seiner mutanten Formen α -SynA30P und α -SynA53T altersabhängiger Verlust der Kletterfähigkeit, selektive Degeneration dopaminergener Neurone und die Bildung von α -Syn- Aggregaten beschrieben (Feany und Bender, 2000). Durch die Überexpression molekularer Chaperone (Auluck *et al.*, 2002), der pharmakologischen Stimulation der Hitzeschock-Antwort (Auluck *et al.*, 2004) oder der Überaktivierung des Phase II-Entgiftungsweges (Trinh *et al.*, 2008) ist es möglich, in die neurodegenerativen Vorgänge einzugreifen und die Toxizität des α -Synucleins in *Drosophila* drastisch zu reduzieren.

Oxidativer Stress ist im vergangenen Jahrzehnt immer mehr von der Peripherie ins Zentrum der Diskussion über die Ursachen neurodegenerativer Erkrankungen gerückt. Schon 1989 postulierten Youdim *et al.*, einen Mechanismus, bei dem die Degeneration dopaminergener Neurone durch Metallionen- katalysierte Bildung von reaktiven oxigenen Spezies (ROS) ausgelöst wird.

In *Drosophila* führen Mutationen in Stressantwort- Genen und die Gabe von Rotenon, Paraquat, oder die Haltung in einer 99,5%-igen Sauerstoffatmosphäre zum Verlust dopaminergener Neurone und schnell eintretendem Tod (Botella *et al.*, 2004; Birman *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005). Diese Erkenntnisse stellen die Basis für eine Theorie dar, nach der die Toxizität von α -Syn zumindest teilweise vom Redoxzustand und der Menge an freien Radikalen in den Zellen abhängig sein könnte. Die im Folgenden beschriebenen Experimente sollen darüber Aufschluss geben, ob die α -Syn- induzierte Degeneration dopaminergener Neurone in *Drosophila* durch Faktoren, die die Menge an freien Radikalen beeinflussen, modifiziert werden kann.

1.1 Selektive und differentielle Toxizität der α -Synucleine

Für die Expression von wildtypischem α -Syn und dessen mutierten Allelen α -SynA30P und α -SynA53T stehen drei transgene *UAS*- Linien zur Verfügung (*UAS- α -Syn*, *UAS- α -SynA30P* und *UAS- α -SynA53T*) (Bonini, 2004). Bei panneuraler Expression können auf denaturierenden Westernblots die drei α -Syn- Formen jeweils als Einzelbande bei ca. 20kDa nachgewiesen werden (Abbildung 15A).

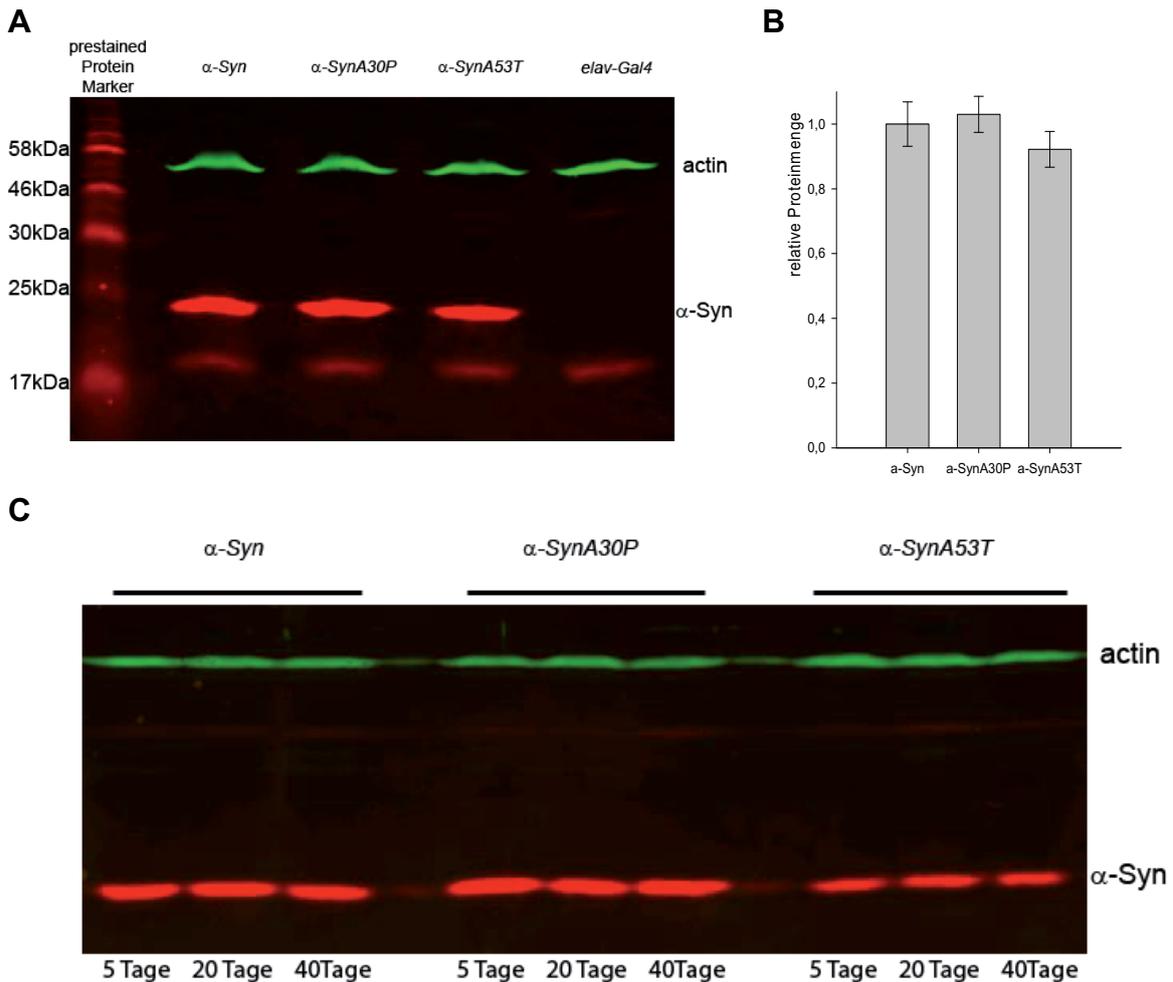


Abbildung 15: Expression von α -Syn im Gehirn von *Drosophila*:

A: Westernblot von Kopfextrakten für α -Syn, α -SynA30P und α -SynA53T und nicht-transgene Kontrolle: α -Syn: *elav-Gal4/y; UAS- α -Syn/+*; α -SynA30P: *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA30P/+*; α -SynA53T: *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA53T/+*; *elav-Gal4*: *elav-Gal4/+; w¹¹¹⁸: elav-Gal4/y*.

B: Relative α -Syn- Mengen: α -Syn: *elav-Gal4/y; UAS- α -Syn/+* (n=5); α -SynA30P: *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA30P/+* (n=5); *UAS- α -SynA53T*: *elav-Gal4/y; α -SynA53T/+* (n=5). Die Werte für α -Syn wurden als Referenz gleich eins gesetzt.

C: Vergleich der Proteinmengen während der Alterung der Tiere; Genotypen wie oben.

Da in *Drosophila* kein intrinsisches α -Syn Homolog vorkommt (Adams *et al.*, 2000), zeigen Kontrolltiere des Genotyps *elav-Gal4/y*, die kein Transgen exprimieren bei dieser Größe erwartungsgemäß keine Bande. Anhand der internen Kontrollfärbung gegen Actin lässt sich aus den Westernblots ebenfalls ablesen, dass die panneurale Expression der

verschiedenen *UAS- α -Syn*- Konstrukte in ähnlichen Proteinmengen resultiert (Abbildung 15B). Auch während des Alterungsprozesses bleibt die Expression stabil. Bei keinem der Genotypen ist in gealterten Tieren ein Rückgang der panneuralen α -Syn- Mengen im Vergleich zu jungen Tieren desselben Genotyps feststellbar (Abbildung 15C).

Die panneurale Expression von α -Syn führt zu altersabhängiger Neurodegeneration. Die Analyse von Gehirnschnitten zeigt jedoch, dass nicht alle Zellen in gleichem Maße betroffen sind. Der Großteil des Gehirns zeigt keine Anzeichen einer Schädigung durch α -Syn. Lediglich bestimmte Bereiche und Zellgruppen scheinen für die Toxizität anfällig zu sein (Abbildung 18A). Nur in diesen Bereichen konnte in gealterten Fliegen, die panneural α -SynA30P oder α -SynA53T exprimieren apoptotischer Zelltod nachgewiesen werden (Abbildung 18B, C). Dies zeigt, dass manche Zelltypen im Gehirn von *Drosophila* sensitiver gegenüber der Expression von α -SynA30P beziehungsweise α -SynA53T sind als andere Zelltypen. Zwar können anhand von Semi- und Ultradünnschnitten nur eingeschränkte Aussagen über die Identität der betroffenen Zellen gemacht werden, jedoch ist es möglich, dass es sich bei den beobachteten apoptotischen Zellen unter Umständen tatsächlich um dopaminerge Neurone handelt und diese auch sensitiver gegenüber der α -Syn- Expression sind als andere Neurone.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die Auswirkungen einer *Th-Gal4*-getriebenen α -Syn-, α -SynA30P- und α -SynA53T- Expression in dopaminergen und eine *pdf-Gal4*- getriebenen Expression von α -SynA30P in den kleinen ventralen Lateralen Neuronen (sLNv) getrennt voneinander untersucht und der jeweils daraus resultierende Zellverlust quantifiziert. In dopaminergen Neuronen führt die Expression aller α -Syn- Formen zu fortschreitender Degeneration dieser Zellen (Abbildung 16). Fliegen, die die wildtypische α -Syn- Form exprimieren zeigen nach 40 Tagen einen Verlust von ca. 20% der dopaminergen Neurone. Die Expression von α -SynA30P oder α -SynA53T führt im selben Zeitrahmen zu Zellverlusten von bis zu 45% (α -SynA30P) beziehungsweise 35% (α -SynA53T). Da die Expression von *UAS- α -SynA30P* und *UAS- α -SynA53T* vergleichbare Proteinmengen produzieren, ist es wahrscheinlich, dass die stärkere Toxizität auf die durch Mutationen induzierten Aminosäureaustausche zurückgeführt werden kann.

Die Expression von α -SynA30P, welches in dopaminergen Neuronen die stärkste toxische Wirkung zeigt ist in den sLNvs nicht toxisch. Selbst nach 40 Tagen Alterung

sind alle sLNv eindeutig zu identifizieren und zeigen keine Anzeichen von Degeneration (Abbildung 17).

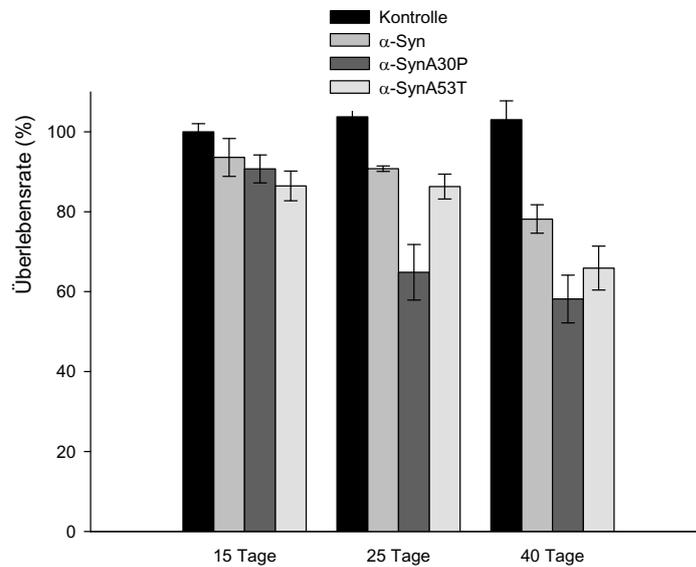


Abbildung 16: Verlust dopaminerger Neurone durch die Expression von α -Syn, α -SynA30P und α -SynA53T mit Th-Gal4: Kontrolle: *UAS-Stinger; Th-Gal4*, (n=6), α -Syn: *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -Syn* (n=6); α -SynA30P: *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=6); α -SynA53T: *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA53T* (n=6). Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

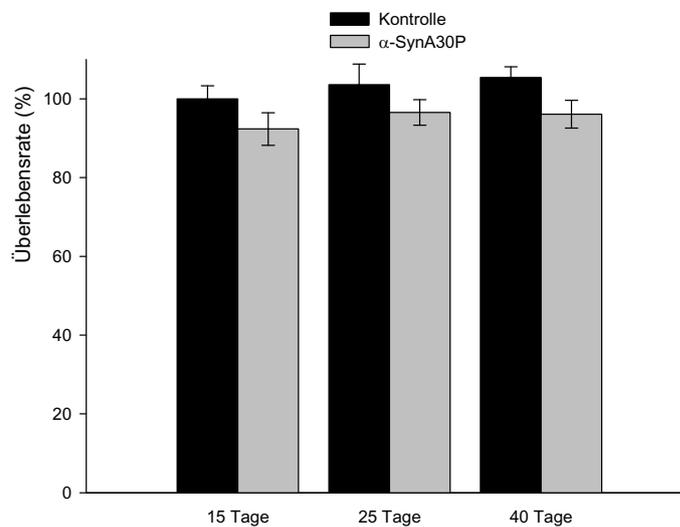


Abbildung 17: Expression von α -SynA30P in den sLNv: Kontrolle: *Pdf-Gal4; UAS-DsRed* (n=5); A30P: *Pdf-Gal4; UAS-DsRed/UAS- α -Syn(A30P)*, (n=7). Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Im Gegensatz zu dopaminergen Neuronen scheint die Expression von α -Syn in anderen neuronalen Zelltypen nicht toxisch zu sein. Auch die zuvor beschriebene, α -Syn-induzierte Degeneration des visuellen Systems (Feany und Bender, 2000) konnte mit keiner der in dieser Arbeit eingesetzten *UAS*- Linien reproduziert werden. Dies

impliziert, dass in dopaminergen Neuronen ein spezifisches Milieu herrscht, durch das α -Syn erst toxisch wird.

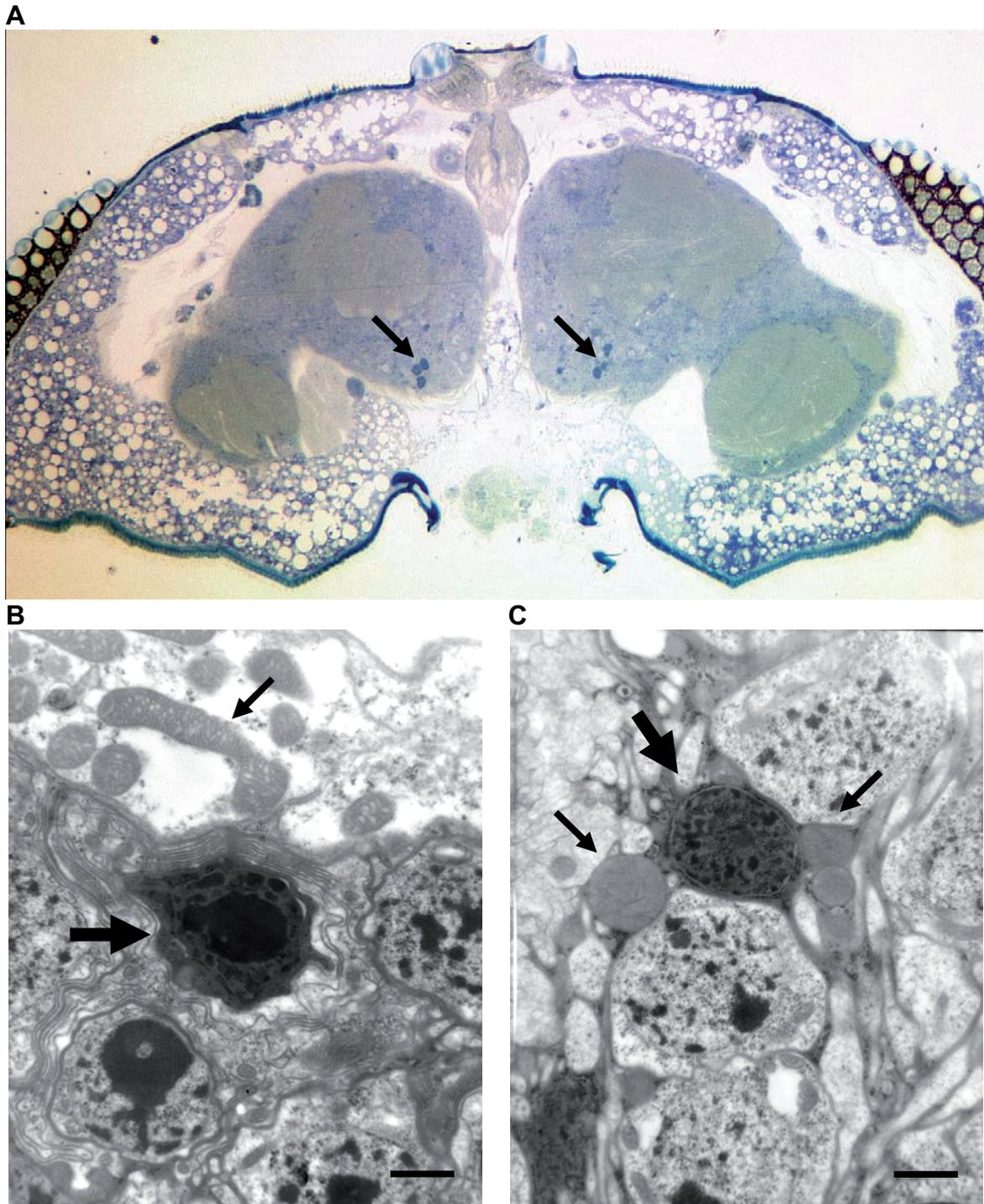


Abbildung 18: Neurodegeneration bei panneuraler Expression von α -SynA30P und α -SynA53T:

A Horizontaler, Toluidinblau gefärbter Semidünnschnitt durch den caudalen Teil des Gehirns einer 25 Tage alten Fliege des Genotyps *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA30P*. Trotz panneuraler Expression von α -SynA30P zeigt in dieser Schnittebene nur ein bilateraler Zellcluster Apoptose (Pfeile).

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme des caudalen Teils des Gehirns einer Fliege desselben Genotyps und Alters: apoptotische Nervenzelle (dicker Pfeil) und deformiertes Mitochondrium (dünner Pfeil).

C: Elektronenmikroskopischer Schnitt durch den caudalen Teil des Gehirns einer 40 Tage alten Fliege des Genotyps *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA53T*: apoptotische Zelle (dicker Pfeil) und deformierte Mitochondrien (dünne Pfeile).

Die Balken entsprechen 1 μ m.

1.2 Auswirkungen von oxidativem Stress auf die α -Syn- Toxizität

Hyperoxie löst in *Drosophila* allgemeine Neurodegeneration aus (Botella *et al.*, 2004). Eine theoretische Erklärung für die spezifische Degeneration dopaminerger Neurone bei der sporadischen PD wäre, dass das dopaminerge System gegenüber oxidativen Schäden anfälliger ist als andere neuronale Systeme (Yu *et al.*, 2005). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde untersucht, ob in *Drosophila* dopaminerge Neurone erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress zeigen. Wiederum wurde die Sensitivität des dopaminergen Systems mit den sLNvs verglichen.

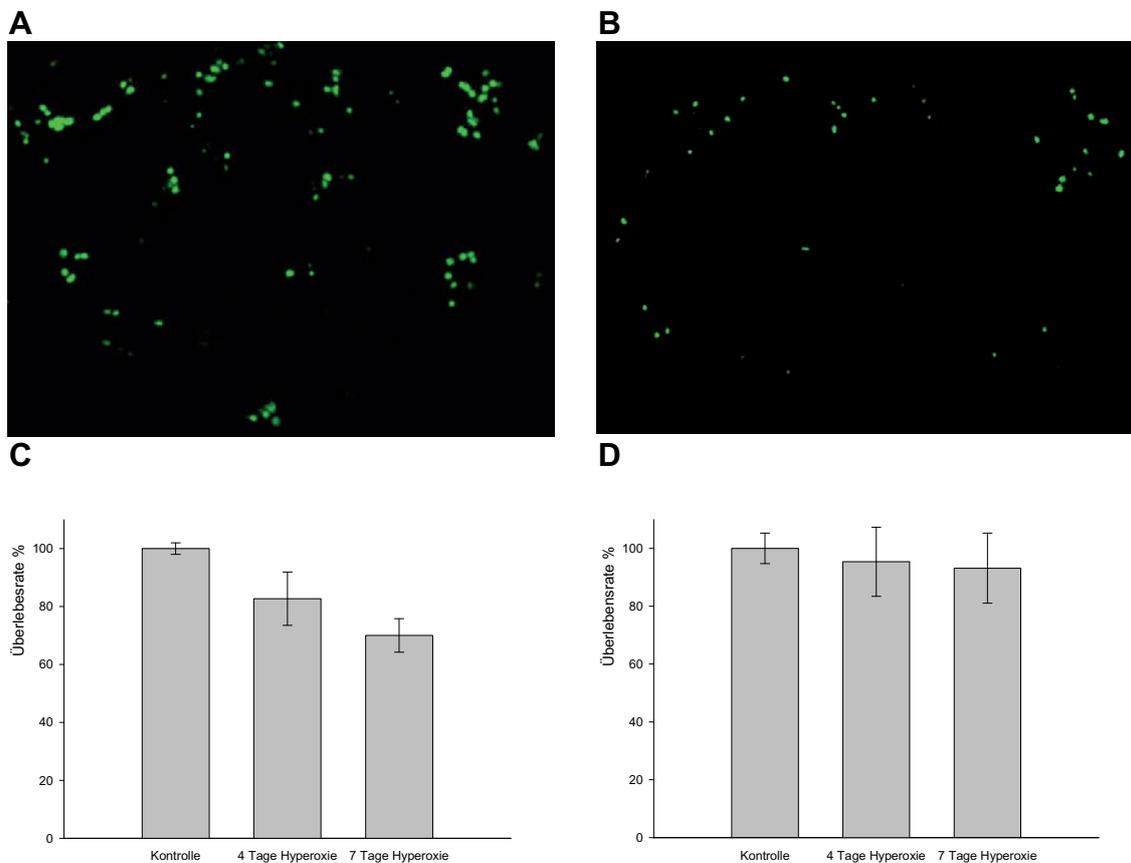


Abbildung 19: Auswirkungen von oxidativem Stress auf dopaminerge Neurone und sLNvs:

A: Stinger GFP- markierte Zellkerne dopaminerger Neurone im Gehirn von *Drosophila*, die unter Standardbedingungen und

B: sieben Tage in einer 99,5%-igen Sauerstoffatmosphäre gehalten wurden.

C: Durchschnittliche Anzahl dopaminerger Neurone in unbehandelten (Kontrolle (n=9)) und O₂- begasten (4 Tage (n=9), 7 Tage Hyperoxie n=9)) Fliegen. Genotyp: *UAS-Stinger; Th-Gal4*.

D: Durchschnittliche Anzahl sLNvs in unbehandelten (Kontrolle (n=8)) und O₂- begasten (4 Tage (n=8), 7 Tage Hyperoxie n=8)) Fliegen. Genotyp: *Pdf-Gal4; UAS-DsRed*.

Schon nach vier Tagen unter Hyperoxie ist Degeneration dopaminerger Neurone feststellbar, bis nach sieben Tagen in der 99,5%-igen Sauerstoffatmosphäre der Tod der Tiere eintritt, degenerieren ca. 35% der Neurone. sLNvs hingegen tolerieren Hyperoxie besser als dopaminerge Neurone. Obwohl die Tiere nach derselben Begasungszeit

sterben, ist kein Verlust von sLNvs feststellbar (Abbildung 19). Genau wie bei den Experimenten zur α -Syn- Toxizität zeigen dopaminerge Neurone unter Hyperoxie höhere Anfälligkeit als sLNvs.

Um zu bestätigen, dass die oxidativen Schäden tatsächlich für die Degeneration der dopaminergen Neurone verantwortlich sind, wurde getestet, ob auch ein Ausfall der Stressantwort durch eine Mutation im Gen *sniffer* (*sni*) (Botella *et al.*, 2004) zur Degeneration führen kann.

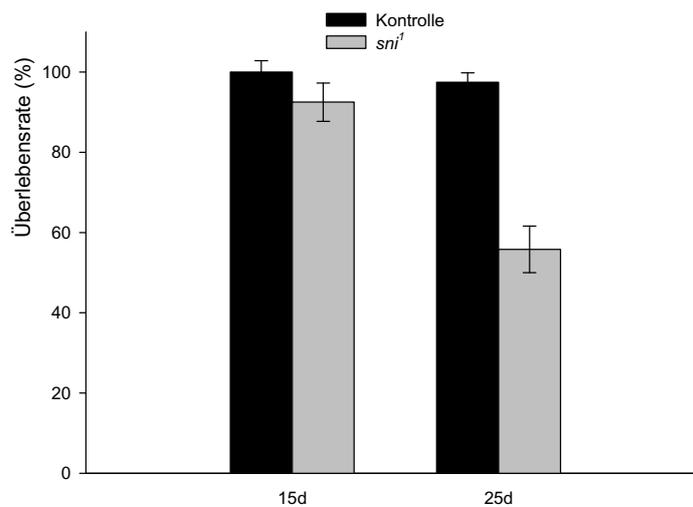


Abbildung 20: Der Verlust von *sniffer* führt zur Degeneration dopaminergener Neurone: Kontrolle: *UAS-Stinger; Th-Gal4*, (n=4), *sni*¹: *UAS-Stinger; Th-Gal4* (n=6); Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Im Alter von 25 Tagen geht die Anzahl der dopaminergen Neurone von Fliegen, die die *sni*¹- Mutation tragen um durchschnittlich 45% zurück (Abbildung 20). Die Ergebnisse dieses Tests zeigen, dass Fliegen, deren Toleranz gegenüber oxidativem Stress stark reduziert ist, ebenfalls dopaminerge Neurone verlieren.

Da also sowohl α -Syn- Expression als auch oxidative Schäden zu Degeneration dopaminergener Neurone führen, stellt sich die Frage, ob sie in beiden Fällen auf demselben grundlegenden Mechanismus beruht. Um zu überprüfen, ob auch die Toxizität von α -Syn auf die verstärkte Akkumulation oxidativer Schäden an dopaminergen Neuronen zurückgeführt werden könnte, wurde untersucht, ob sich die α -Syn- Toxizität unter oxidativen Bedingungen verändert. Dopaminerge Neurone, in denen unter Hyperoxie α -SynA30P oder α -SynA53T exprimiert wird, degenerieren schneller, als Neurone, die kein, oder die wildtypische α -Syn- Form exprimieren. Die letzteren zeigen nach sieben Tagen Begasung einen ca. 30%-igen Rückgang der Neuronenzahlen. In Fliegen, die die beiden hereditären Formen α -SynA30P oder α -SynA53T exprimieren, sterben die

dopaminergen Neurone früher und in größerer Zahl ab. Schon nach vier Tagen unter Hyperoxie sind jeweils ca. 45% der dopaminergen Neurone abgestorben. In den folgenden drei Hyperoxie-Tagen setzt sich der Verlust noch bis auf ca. 55% bei Expression von α -SynA30P beziehungsweise bis auf ca. 50% bei Expression von α -SynA53T fort (Abbildung 21). Daraus kann gefolgert werden, dass durch Mutationen in *SNCA* entweder die Stressbelastung dopaminergener Neurone erhöht, beziehungsweise, dass oxidativer Stress die Toxizität von α -SynA30P und α -Syn53T verstärkt.

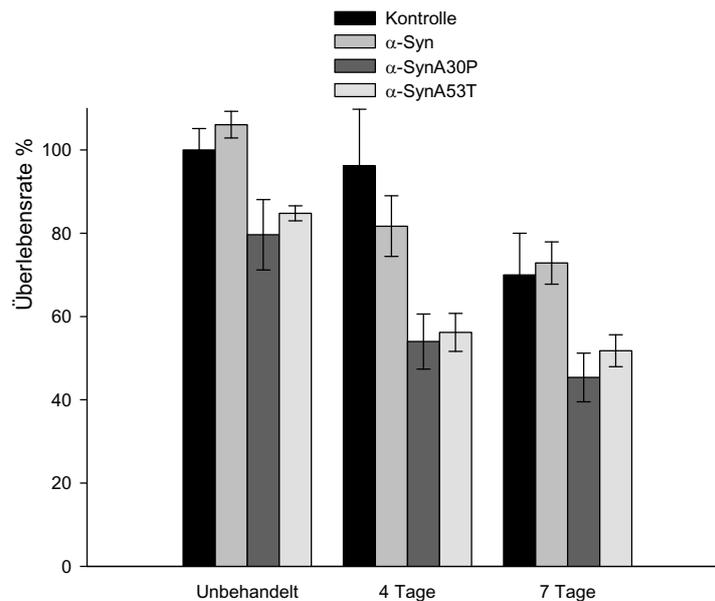


Abbildung 21: Verlust dopaminergener Neurone unter Hyperoxie bei gleichzeitiger Expression von α -Syn, α -SynA30P oder α -SynA53T: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*, (n=6), α -Syn: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -Syn* (n=6); α -SynA30P: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=6); α -SynA53T: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA53T* (n=6). Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass es möglich sein könnte α -Syn zu detoxifizieren, indem man versucht, die Mengen zytosolischer ROS zu reduzieren oder oxidative Schäden an Proteinen und Fetten zu reparieren. Eine geeignete Vorgehensweise dafür ist die Expression zytosolischer Radikalfänger (Parkes *et al.*, 1998) oder die Überexpression von Reparaturenzymen.

1.3 Modifikation der α -SynA30P Toxizität

1.3.1 Reparatur oxidativer Schäden

Das Gen *sni* codiert für ein Enzym mit Carbonylreduktase- Aktivität. Fliegen, die eine Mutation in *sni*^l tragen haben eine verkürzte Lebenserwartung und zeigen nach 25 Tagen Alterung erhebliche Neurodegeneration. Unter oxidativem Stress ist ihre Lebenserwartung im Vergleich zu Kontrolltieren um 2/3 reduziert. Die ubiquitäre oder panneurale Überexpression von *sni* im *sni*^l- Hintergrund rettet sowohl die Lebenserwartung unter Sauerstoffstress als auch die Neurodegeneration im Gehirn gealterter Fliegen. Außerdem führt die Überexpression von *sni* in Tieren ohne Hintergrundmutation zu einer Verdoppelung der Lebenserwartung unter Sauerstoffstress (Botella *et al.*, 2004)

Darum ist es interessant, die Auswirkungen einer *sni*- Überexpression auf die Toxizität von α -SynA30P zu untersuchen. Durch die Koexpression von *sni* (*UAS-Sni*) und *SynA30P* cDNAs kann getestet werden, ob *sni* als Komponente zellulärer Reparaturmechanismen auch die Toxizität von α -Syn herabsetzen kann.

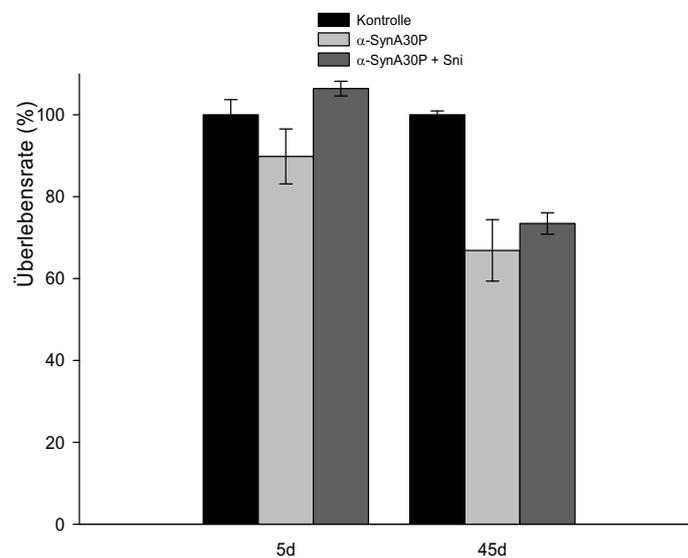


Abbildung 22: Effekt der Sni- Überexpression auf die Degeneration dopaminerger Neurone durch α -SynA30P: Kontrolle: *UAS-Stinger; Th-Gal4*, (n=5), α -SynA30P: *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=6); α -SynA30P + Sni: *UAS-Stinger/UAS-Sni; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=6). Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Fliegen des Genotyps *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* zeigen schon im Alter von fünf Tagen Verlust dopaminerger Neurone. Die Degeneration setzt sich mit zunehmendem Alter fort. Nach 40 Tagen sind in diesem Fall 40% der Zellen nicht mehr detektierbar. Obwohl Fliegen, die zusätzlich *sni* überexprimieren zu Beginn der Alterung

noch keine Schäden am dopaminergen Netzwerk zeigen, nimmt die Neurodegeneration mit zunehmendem Alter dieselben Ausmaße an, wie in Fliegen die *sni* nicht überexprimieren (Abbildung 22).

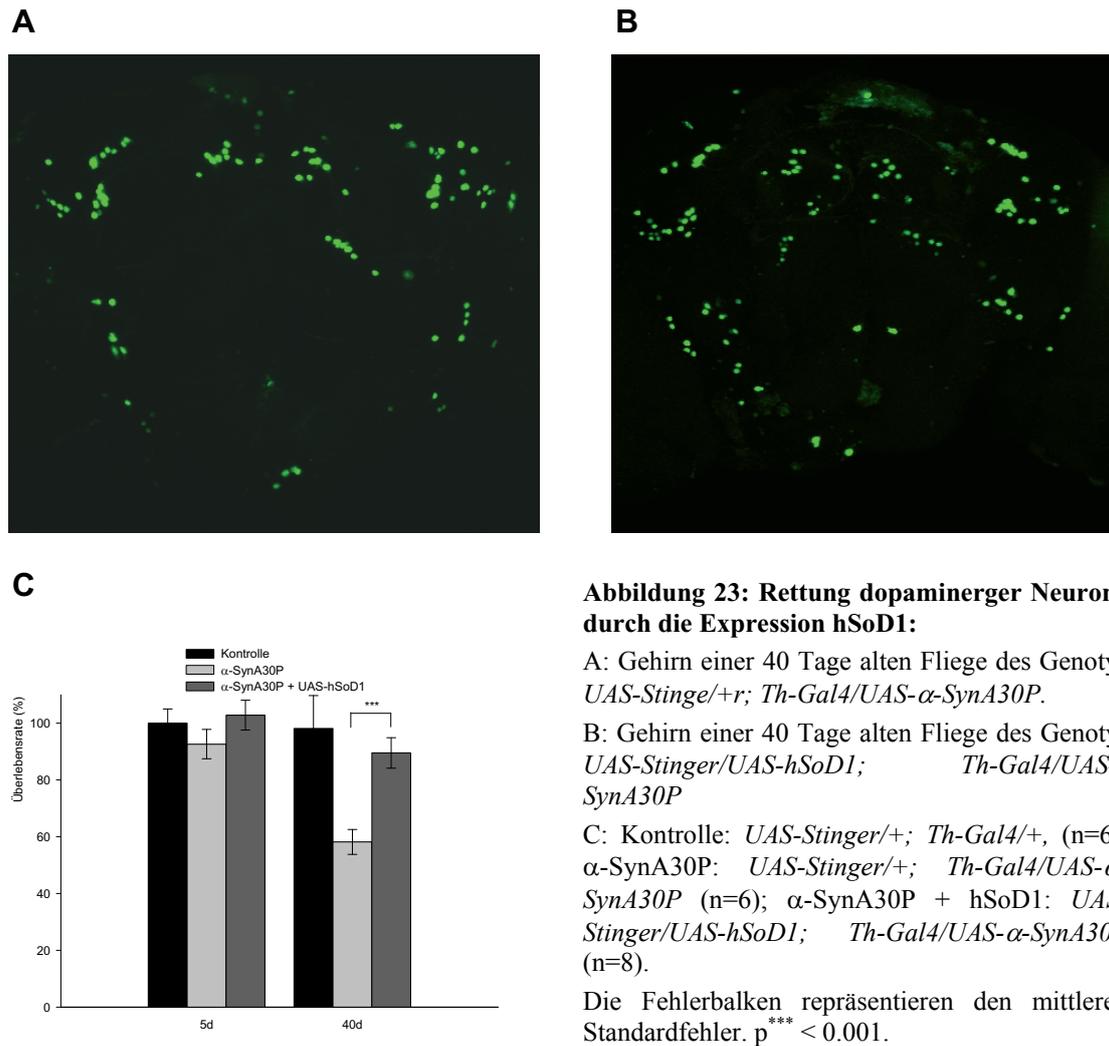
Da *Sni* nicht in der Lage ist, die Neurodegeneration bedeutend zu verlangsamen, ist davon auszugehen, dass die Neurodegeneration durch α -SynA30P auf anderen Mechanismen als die Neurodegeneration durch den Verlust von *sni* beruht. Es scheint nicht ausreichend zu sein, oxidative Schäden erst nach deren Entstehung zu reparieren. Eine alternative Strategie zur Abmilderung der Toxizität wäre demnach, oxidative Schäden *a priori* zu vermeiden.

1.3.2 Entfernung von Superoxidradikalen

Parkes und Kollegen (1998) gelang es in *Drosophila* nachzuweisen, dass die Überexpression humaner Superoxid Dismutase 1 (hSoD1) in Motoneuronen semiletale *dSod1*- Mutanten rettet und im wildtypischen Hintergrund zu einer 20%-igen Verlängerung der Lebenserwartung führt. Außerdem kann so die Stabilität dopaminergener Neurone unter Sauerstoffstress verbessert werden (Grießl, 2005). Die schützende Wirkung der hSoD1 beruht auf der Umwandlung von Superoxiden in Wasserstoffperoxid.

Durch ein weiteres Koexpressionsexperiment, bei dem α -SynA30P und hSoD1 gleichzeitig in dopaminergen Neuronen exprimiert werden, kann überprüft werden, ob die Entfernung von $\cdot\text{O}_2^-$ auch die Neurotoxizität der α -SynA30P- Expression eindämmen kann. Tiere, die zusätzlich zu α -SynA30P hSoD1 in dopaminergen Neuronen exprimieren, zeigen ein wesentlich geringeres Ausmaß an Neurodegeneration als Fliegen, die nur α -SynA30P exprimieren. Hier führt die Expression von α -SynA30P nach 40 Tagen zum Verlust von 42% der dopaminergen Neurone. Bei gleichzeitiger Koexpression von hSoD1 ist nach 40 Tagen lediglich ein Verlust von elf Prozent der Neurone feststellbar (Abbildung 23).

Typisch für *Drosophila* ist das ‚negative Geotaxis‘- Verhalten. Darunter versteht man die Fähigkeit der Fliegen, sich kletternd gegen das Schwerfeld der Erde fortzubewegen. Das Klettern an sich, beziehungsweise die Geschwindigkeit, mit dem dieses Verhalten ausgeführt wird, kann als Indikator der neuronalen und allgemeinen Fitness herangezogen werden (Arkin *et al.*, 1988). Fliegen verlieren mit zunehmendem Alter ihre Kletterfähigkeit. Dieser Verlustprozess wird durch panneurale Expression von α -SynA30P beschleunigt (Feany und Bender, 2000).



Typisch für *Drosophila* ist das ‚negative Geotaxis‘- Verhalten. Darunter versteht man die Fähigkeit der Fliegen, sich kletternd gegen das Schwerfeld der Erde fortzubewegen. Das Klettern an sich, beziehungsweise die Geschwindigkeit, mit dem dieses Verhalten ausgeführt wird, kann als Indikator der neuronalen und allgemeinen Fitness herangezogen werden (Arkin *et al.*, 1988). Fliegen verlieren mit zunehmendem Alter ihre Kletterfähigkeit. Dieser Verlustprozess wird durch panneurale Expression von α -SynA30P beschleunigt (Feany und Bender, 2000).

Der protektive Effekt der hSoD1 wird auch bei der Bestimmung der Klettergeschwindigkeit deutlich. Die Koexpression von hSoD1 führt auch nach 35 Tagen α -SynA30P- Expression zur Aufrechterhaltung der Kletterfähigkeit. 35 Tage alte Fliegen des Genotyps *UAS-Stinger/UAS-hSoD1; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* schneiden sowohl im Vergleich mit Tieren des Genotyps *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* als auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe *UAS-Stinger; Th-Gal4* deutlich besser ab (Abbildung

24). Zu Beginn des Alterungsexperiments klettern die Fliegen aller Genotypen schneller als 1 cm/s. Nach 25 Tagen Alterung sind erste Unterschiede erkennbar.

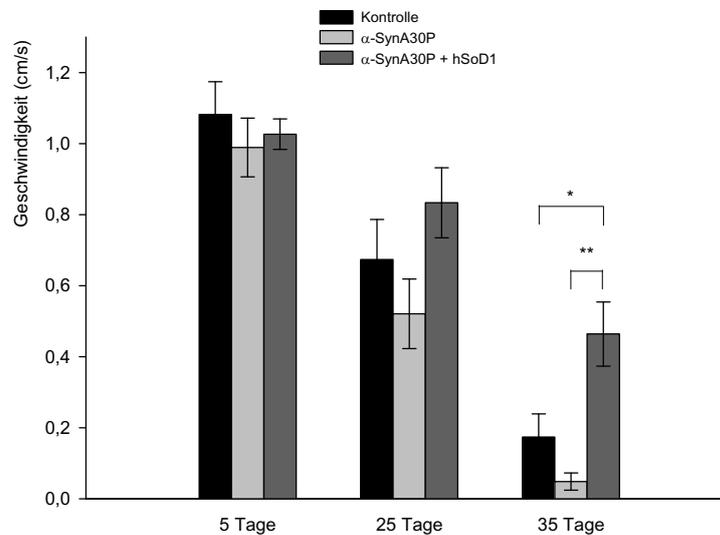


Abbildung 24: Rettung des negativen Geotaxis- Verhaltens durch hSoD1: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*, (n=30), α -SynA30P: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=30); α -SynA30p + hSoD1: *UAS-Stinger/UAS-hSoD1; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=30). Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler. $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$.

Nun erreichen die Kontrolltiere noch eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,67 cm/s. Und Tiere, der α -SynA30P- Gruppe, eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,52 cm/s. Schon zu diesem Zeitpunkt ist bei Tieren, die α -SynA30P und hSoD1 koexprimieren eine höhere Durchschnittsgeschwindigkeit zu beobachten. Nach 35 Tagen ist dieser Unterschied wesentlich deutlicher ausgeprägt. Tiere der Kontrollgruppe und Tiere, die α -SynA30P exprimieren zeigen mit Klettergeschwindigkeiten von 0,17 cm/s beziehungsweise 0,05 cm/s fast kein negatives Geotaxis- Verhalten mehr. Im Gegensatz dazu sind Tiere, die α -SynA30P und hSoD1 koexprimieren selbst im Alter von 35 Tagen noch relativ mobil und erreichen eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,46 cm/s. Es ist zu beachten, dass, durch die Expression von α -SynA30P unter der transkriptionellen Kontrolle von *Th-Gal4* zwar ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zu beobachten ist. Dies stellt eine Diskrepanz zu den histologischen Daten zur Neurodegeneration dar. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Genauigkeit der negativen Geotaxis- Methode aufgrund unkontrollierbarer Sekundäreinflüsse nicht ausreicht. Die starke Ausprägung des Rettungseffekts kann unter Umständen auf die unspezifische Expression des *UAS-hSoD1*- Konstrukts zurückgeführt werden, welche zum Beispiel durch einen Enhancer- reichen Insertionsort zustande kommen könnte.

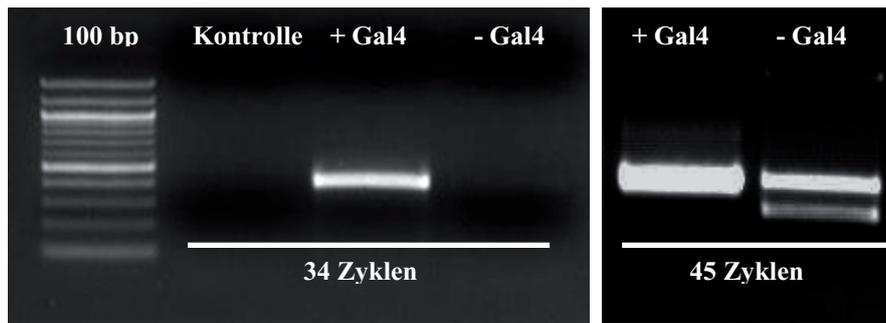


Abbildung 25: RT-PCR der hSoD1 m-RNA in Larven: In Tieren ohne Gal4-Treiber ist die *hSoD1*-mRNA nach 45 PCR-Zyklen nachweisbar. Kontrolle: *w¹¹¹⁸*; + Gal4: *UAS-hSoD1*; *Actin-Gal4*; - Gal4: *UAS-hSoD1*.

Durch RT-PCR-Analysen (Abbildung 25) kann das hSoD1-Transkript auch in heterozygoten *UAS-hSoD1*-Fliegen ohne *Gal4*-Treiber nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass der beobachtete Effekt bei der negativen Geotaxis auf die unspezifische Expression der hSoD1 in verschiedenen Organen, jedoch nicht auf Vorgänge in dopaminergen Neuronen zurückzuführen ist. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob Experimente zur negativen Geotaxis in diesem speziellen Fall tatsächlich für die Analyse des neuronalen Status geeignet sind, oder ob sie nicht eher die Gesamtfitness der Fliege wieder spiegeln.

Wie bei allen Rettungsexperimenten bei denen die negativen Auswirkungen der Expression eines Konstrukts durch die Expression eines zusätzlichen Konstrukts aufgehoben wird, stellt sich allerdings noch die Frage, ob die Abschwächung der Neurotoxizität des α -SynA30P wirklich auf der Aktivität der hSoD1 beruht, oder ob durch die Expression des zusätzlichen *UAS-hSoD1*-Konstrukts nicht etwa die Expression des *UAS- α -SynA30P* durch eine Titration von Gal4 verringert wird. Auf transkriptioneller Ebene sind jedoch keine Expressionsunterschiede erkennbar (Abbildung 26). *UAS- α -SynA30P* wird in Fliegen, die zwei beziehungsweise drei *UAS*-Konstrukte tragen mit derselben Effizienz abgelesen. Im Endeffekt bedeuten diese Ergebnisse sowohl, dass die beobachtete Rettung dopaminergere Neurone auf der Aktivität der hSoD1 beruht, als auch, dass die α -SynA30P-Toxizität tatsächlich vom Spiegel zytosolischer Superoxidradikale abhängig ist. Dies erklärt allerdings nicht, warum ausgerechnet dopaminerge Neurone in *Drosophila* erhöhte Sensitivität gegenüber der Expression von α -SynA30P und α -SynA53T zeigen.

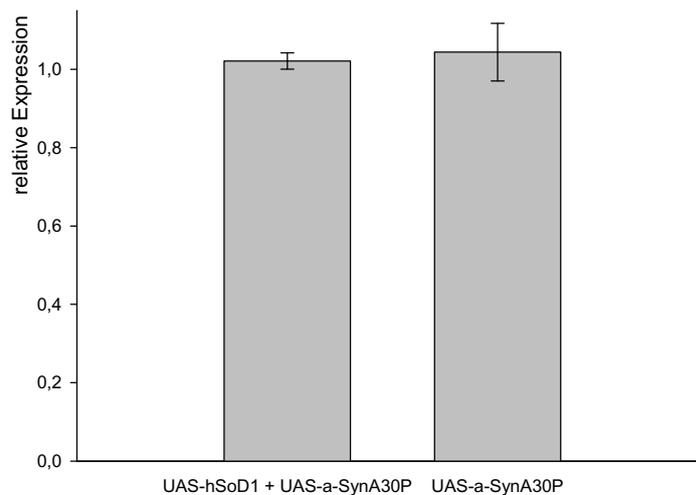


Abbildung 26: qRT-PCR-Analyse der relativen Expression von α -SynA30P: UAS-hSoD1 + UAS- α -SynA30P: *UAS-Stinger/UAS-hSoD1*; *Th-Gal4/UAS- α -SynA30P*; UAS- α -SynA30P: *UAS-Stinger/+*; *Th-Gal4/UAS- α -SynA30P*.

Aus den bisherigen Ergebnissen und in Kenntnis der Tatsache, dass in diesen Neuronen als Nebenprodukte des DA- Stoffwechsels durch autooxidative Vorgänge endogene ROS entstehen (Graham, 1978), lässt sich eine bestechend einfache Hypothese zur Begründung der erhöhten Sensitivität dopaminerger Neurone gegenüber α -SynA30P formulieren: Da α -SynA30P durch die Entfernung freier Radikale weitgehend detoxifiziert wird, besteht die Möglichkeit, dass der DA- Stoffwechsel selbst eine wichtige Rolle für die selektive Toxizität von α -Syn spielen könnte.

1.3.3 Dopamin- Depletion

Das Gen *pale* (*ple*) codiert für das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) (Neckameyer und White, 1993), welches den ersten Schritt der Catecholaminsynthese in cholinergen Neuronen katalysiert. Dabei wird L- Tyrosin in Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) umgewandelt (Nagatsu *et al.*, 1964). L-DOPA, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin können durch Autooxidationsvorgänge zu toxischen Neuromelaninvorläufern, den DOPA- und DA- Quinonen reagieren (Graham, 1978).

Um zu klären, ob L-DOPA und DA, beziehungsweise deren Derivate ein relevanter Faktor der Hypersensitivität dopaminerger Neurone gegenüber oxidativem Stress sind, wurden Fliegen gezüchtet, in denen die Expression von *pale* durch RNA- Interferenz reduziert ist.

1.3.3.1 Fliegen mit reduzierter DA Produktion

Das Gen *pale* wird sowohl während der Entwicklung als auch in Adulten im ZNS und der Kutikula exprimiert. Eine homozygote Mutation von *pale* führt bei *Drosophila* zu larvaler Letalität, Neben dem Einsatz von Nullmutanten steht die Methode der RNA-Interferenz zur Verfügung, die die Expression eines Gens zwar nicht immer terminieren, jedoch drastisch reduzieren kann.

In *Drosophila* ist das Silencing von *pale* letal. Trotzdem können durch die richtige Kombination von *pale*- RNAi- Konstrukt (*UAS-IR-ple*) und Treiberlinie lebendige Nachkommen erzeugt werden (Tabelle 8): Die ubiquitäre Expression unter der transkriptionellen Kontrolle des *actin*- Promotors ist während der Entwicklung letal (*UAS-IR-ple/Actin-Gal4*). Wird das *pale*- RNAi Konstrukt panneural mittels des *elav-Gal4*-Treibers getrieben, entwickeln sich die Fliegen allerdings zu lebensfähigen Adulten. Interessanterweise führt das Silencing von *pale* unter transkriptioneller Kontrolle des *pale*- Promotors (*Th-Gal4/UAS-IR-ple* und *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS-IR-ple*) nicht zu larvaler Letalität. Erst die zusätzliche Überexpression des Enzyms Dicer II (*UAS-Stinger/UAS-DicII; Th-Gal4/UAS-IR-ple*) verhindert bei männlichen Nachkommen die Entwicklung.

Genotyp	Letalität	Zielgewebe der Expression
<i>UAS-IR-ple/Actin-Gal4</i>	larval letal	ubiquitär
<i>elav-gal4; UAS-IR-ple</i>	lebensfähig	panneural
<i>Th-Gal4/UAS-IR-ple</i>	lebensfähig	dopaminerge Neurone, Epidermis
<i>UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS-IR-ple</i>	lebensfähig	dopaminerge Neurone, Epidermis
<i>UAS-Stinger/UAS-DicII; Th-gal4/UAS-IR-ple</i>	Weibchen lebensfähig; Männchen zu ~95% letal	dopaminerge Neurone, Epidermis

Tabelle 8: Überlebensfähigkeit der F1-Generationen von IR-ple- Fliegen nach Kreuzung mit verschiedenen Treiberlinien.

Die *Th-Gal4* getriebene, unverstärkte *pale*- RNA- Interferenz löst jedoch weit reichende morphologische-, zelluläre- und Verhaltens- Veränderungen aus, die im Folgenden näher charakterisiert werden.

1.3.3.2 Auswirkungen des *pale*- Silencings

Die verschiedenen *Drosophila*- Melanine sind Catecholaminderivate die aus DOPA- und DA- Quinonen gebildet werden. Melanine sind im Tier- und Pflanzenreich und auch bei Pilzen weit verbreitet und dienen unter anderem dem Schutz vor ionisierender Strahlung (Ruan *et al.*, 2004). Schlüsselgene für die Umwandlung in die verschiedenen Melaninsorten und deren Verteilung sind die Gene *yellow-f*, *yellow-f2* (Han *et al.*, 2002) und *ebony* (Wittkopp *et al.*, 2002). Die Melaninsynthese ist jedoch primär von der Aktivität der TH abhängig, da diese die Edukte der nachfolgenden Reaktionskaskaden liefert.

Der *Drosophila melanogaster* Wildtyp zeigt ausgeprägte braun-schwarze Körperpigmentierung (*melanogaster*, lat.: „schwarzbäuchig“). Im Gegensatz dazu ist bei Fliegen des Genotyps *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple* eine drastisch reduzierte Körperpigmentierung zu beobachten (Abbildung 27).



Abbildung 27: Verlust der Pigmentierung:

Rechts: Kontrolltier *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*

Links: *pale*- Silencing unter der Kontrolle von *Th-Gal4: UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple*

Konkret ist die Kutikula von Kopf, Thorax, Beinen, Halteren und der Abdominalsegmente A1 bis A4 unpigmentiert, die Segmente A5 bis A8 zeigen eine leichte, graubraune Färbung. Die fehlende Pigmentierung ist ein eindeutiges Indiz für eine drastische Reduktion der Melaninmengen in der Kutikula der Fliegen und deutet darauf hin, dass der Knockdown von *ple* in der Epidermis hoch effektiv ist.

Diese Annahme bestätigt sich durch die Analyse der mRNA-Mengen von *pale*. Diese sind schon während der Entwicklung bis unter die Nachweisgrenze einer Standard- RT-PCR reduziert (Abbildung 28A). Das *pale*- Transkript ist in Larven von Kontrolltieren (*UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*) ab 25 PCR-Zyklen nachweisbar, während aus Larven, die das *pale*-RNAi- Konstrukt exprimieren (*UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple*) auch nach 35 Zyklen kein PCR-Produkt zu gewinnen ist.

Da bei der Analyse ganzer Larven die Gefahr besteht, dass eine eventuell stattfindende Restexpression im Gehirn maskiert sein könnte, müssen die Transkriptionsanalysen auf vollständig entwickelte Tiere ausgeweitet werden. Diese ergeben, dass das Silencing auch im Gehirn adulter Tiere hoch effektiv ist (Abbildung 28 C). Bei Expression des *pale*-RNAi-Konstrukts unter der transkriptionellen Kontrolle des *pale*-Promotors ist die Transkriptmenge um 82% reduziert. Wird die Expression unter Kontrolle des *elav*-Promotors auf neuronales Gewebe eingegrenzt, so liegt die Effizienz bei 84%. Da die Expression des RNAi-Konstrukts mit *Th-Gal4* respektive *elav-Gal4* zu ähnlichen Ergebnissen führt, kann davon ausgegangen werden, dass das Silencing vor allem im ZNS stattfindet.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Reduktion der *pale*-mRNA effektiv bis auf die Proteinebene wirkt. In Köpfen von Fliegen, die das *pale*-RNAi-Konstrukt in dopaminergen Neuronen exprimieren, ist die TH-Menge reduziert, während in Kontrolltieren ohne RNAi-Konstrukt deutlich mehr Protein detektiert werden kann (Abbildung 28B).

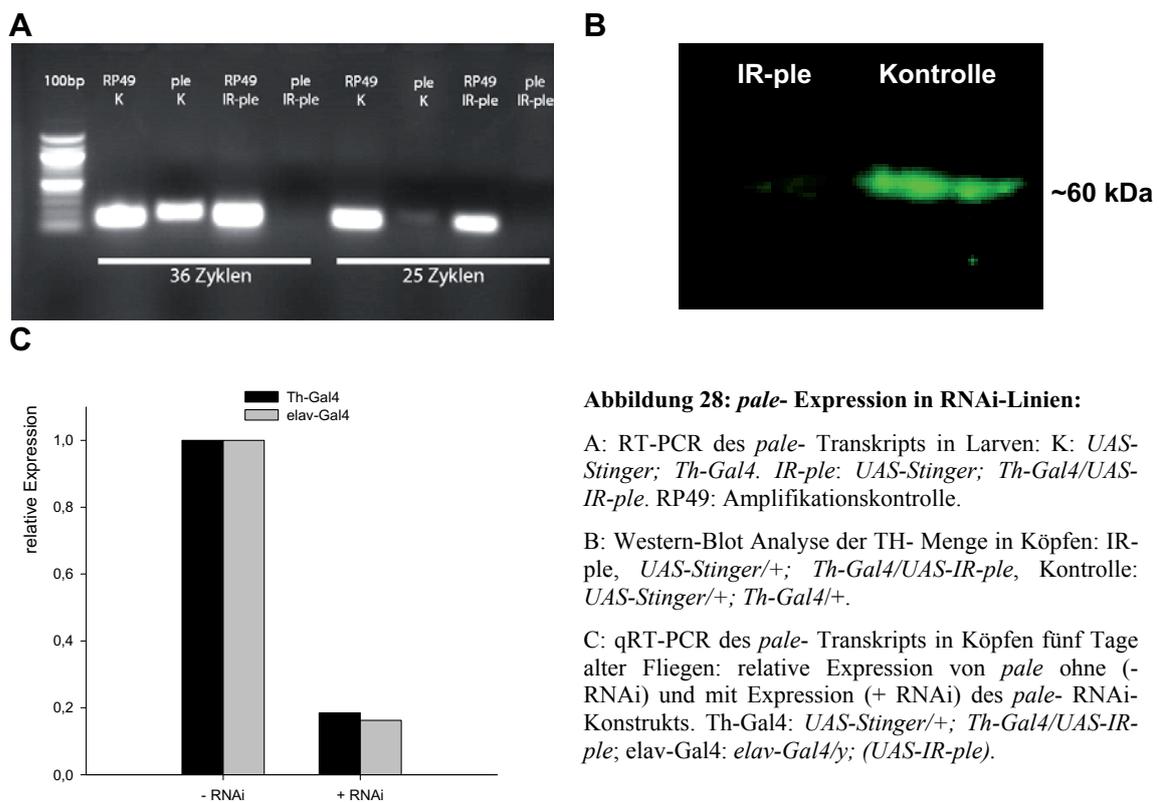


Abbildung 28: *pale*- Expression in RNAi-Linien:

A: RT-PCR des *pale*-Transkripts in Larven: K: *UAS-Stinger*; *Th-Gal4*. IR-ple: *UAS-Stinger*; *Th-Gal4/UAS-IR-ple*. RP49: Amplifikationskontrolle.

B: Western-Blot Analyse der TH-Menge in Köpfen: IR-ple, *UAS-Stinger*/+; *Th-Gal4/UAS-IR-ple*, Kontrolle: *UAS-Stinger*/+; *Th-Gal4*/+.

C: qRT-PCR des *pale*-Transkripts in Köpfen fünf Tage alter Fliegen: relative Expression von *pale* ohne (-RNAi) und mit Expression (+RNAi) des *pale*-RNAi-Konstrukts. Th-Gal4: *UAS-Stinger*/+; *Th-Gal4/UAS-IR-ple*; elav-Gal4: *elav-Gal4/y*; (*UAS-IR-ple*).

Dieser Befund wird zusätzlich durch immunhistochemische Versuche untermauert: Färbungen der Gehirne von Kontrolltieren zeigen TH-Immunreaktivität im Zytoplasma dopaminergener Neurone (Abbildung 29A-C), während in Fliegen des Knockdown-Tieren die Färbung gegen TH negativ ausfällt (Abbildung 29D-F).

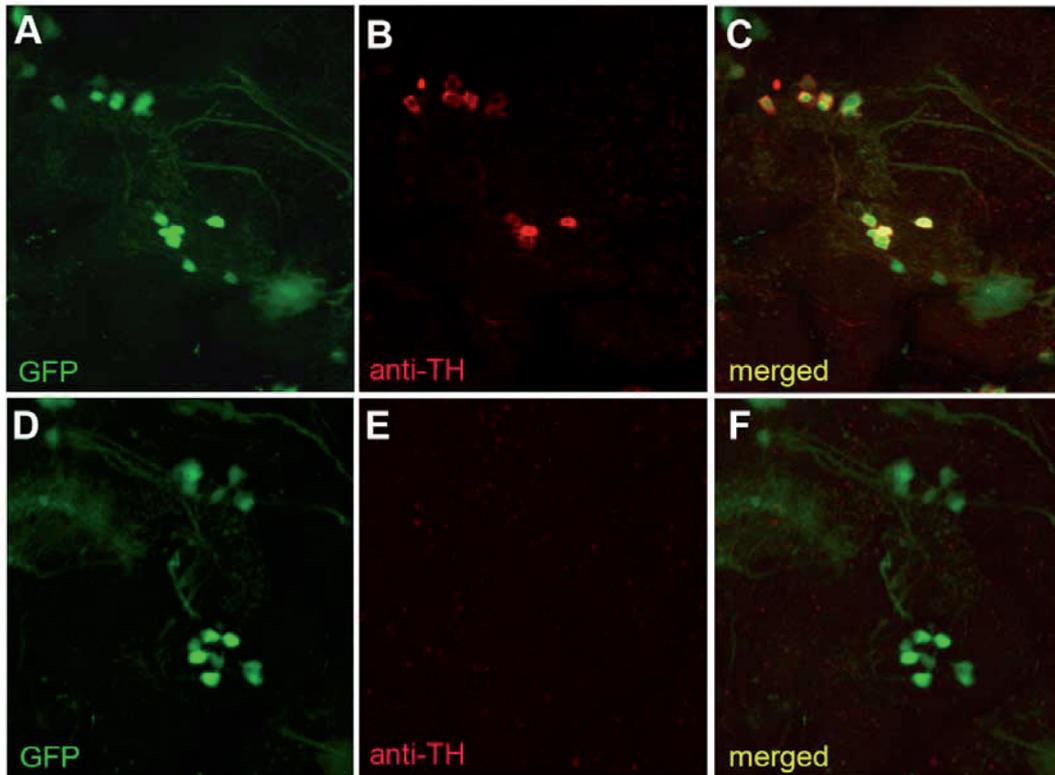


Abbildung 29: Tyrosin- Hydroxylase- Färbungen an Gehirn-Wholemounds: dopaminerge Neurone der PPM1/2- und PPM3- Cluster sind mit zytoplasmatischem GFP markiert (A, D), Antikörperfärbung gegen TH (B, E) und Überlagerung der beiden Kanäle (C, F).

A, B, C: *UAS-GFP/+; Th-Gal4/+*.

D, E, F: *UAS-GFP/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple*

Entscheidend für nachfolgende Experimente ist jedoch nicht die Menge an TH, sondern, wie viel Dopamin im Gehirn konkret vorliegt. Um die oben beschriebenen Ergebnisse zu verifizieren, ist also eine direkte chromatographische Bestimmung des zellulären Dopaminspiegels unerlässlich. Eine *Reverse Phase* HPLC- Analyse von Köpfen zeigt, dass sich die Reduktion von *pale*- mRNA- beziehungsweise TH- Mengen direkt im Dopaminspiegel manifestiert.

In den Köpfen von Fliegen des Genotyps *Th-Gal4; UAS-IR-ple* ist die Dopaminmenge im Vergleich zu Kontrolltieren um 86% verringert. In überlebenden Tieren, die die zusätzliche Koexpression von *DicerII* überleben, liegt der Dopaminspiegel sogar unter der Nachweisgrenze des Detektionssystems (Abbildung 30).

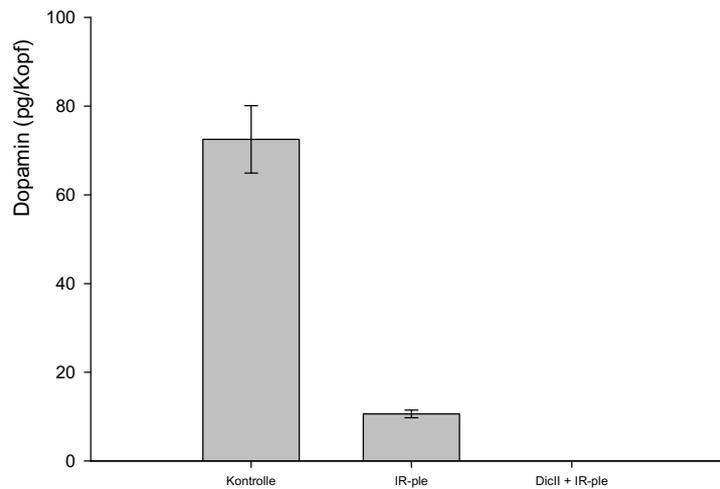


Abbildung 30: DA- Mengen in Köpfen von Fliegen mit normalem und unterdrücktem DA- Stoffwechsel: Kontrolle: *UAS-Stinger/UAS-DicII; Th-Gal4/+*; IR-ple: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple*; DicII + IR-ple: *UAS-Stinger/UAS-DicII; Th-Gal4/UAS-IR-ple* (das Experiment wurde von Herrn Dr. Aaron Voigt am Universitätsklinikum Göttingen durchgeführt)

Eine weitere Frage, die in diesem Zusammenhang geklärt werden muss, ist, ob sich die dopaminergen Neurone auch unter Silencing von *pale* normal entwickeln und ein dopaminerges System ausbilden, das mit demjenigen der Kontrolltiere vergleichbar ist. Wholemout- Präparationen der Gehirne von Fliegen, in denen *pale* unterdrückt ist, zeigen, dass die Tiere ein dopaminerges System mit normaler Zellzahl entwickeln. Obwohl keine Schäden oder Entwicklungsfehler am dopaminergen Neuronennetzwerk festgestellt werden konnten, sollte an dieser Stelle erwähnt sein, dass durch die Suppression von *pale* in Epidermis und dopaminergen Neuronen die Lebenserwartung der Fliegen um ca. 10% abnimmt (siehe Kapitel V.1).

Die Ergebnisse dieses Abschnitts zeigen, dass durch das Silencing von *pale* unter der Kontrolle des *Th-Gal4* Treibers lebensfähige Fliegen mit drastisch reduzierter DA-Produktion gezüchtet werden können. Damit steht nun ein neues Modellsystem zur Verfügung, mit dem Fragen zur Rolle des DA bei der Degeneration dopaminergere Neurone beantwortet werden können.

1.3.3.3 DA- Abhängigkeit der α -SynA30P- Toxizität

Um zu untersuchen, ob DA ein wichtiger Faktor bei der Toxizität von α -SynA30P ist, wurden Fliegen gezüchtet, mit denen zusätzlich zur Expression von α -SynA30P ein Silencing des Gens *pale* vorgenommen werden kann.

Da sowohl *Th-Gal4*, *UAS- α -SynA30P* als auch *UAS-IR-ple* auf dem dritten Chromosom lokalisiert sind⁹, kann die Koexpression erst nach meiotischer Rekombination beider Konstrukte vorgenommen werden. Anhand der Augenfarbe können potentielle chromosomale Rekombinationen von *UAS- α -SynA30P* und *UAS-IR-ple* präselektiert und einzeln mit dem *Th-Gal4*- Treiber gekreuzt werden. Fliegen der F1- Generationen, die den beschriebenen Phänotyp (Abbildung 27) zeigen und α -SynA30P exprimieren (Abbildung 31), wurden als Rekombinanten angesehen.

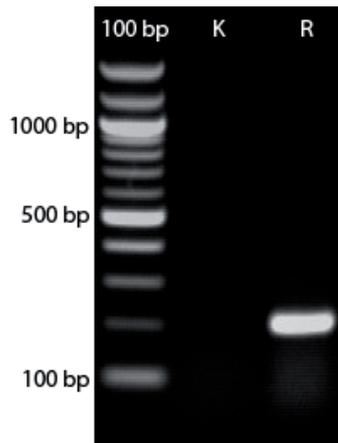


Abbildung 31: RT-PCR für α -Syn zur Identifizierung rekombinater Fliegen:

100 bp: 100bp Größenmarker

K: Negativkontrolle: *Th-Gal4/UAS-IR-ple*

R: Rekombinante: *Th-Gal4/UAS-IR-ple, UAS- α -SynA30P*

Die Bande repräsentiert ein ca. 200bp langes Fragment der α -SynA30P mRNA.

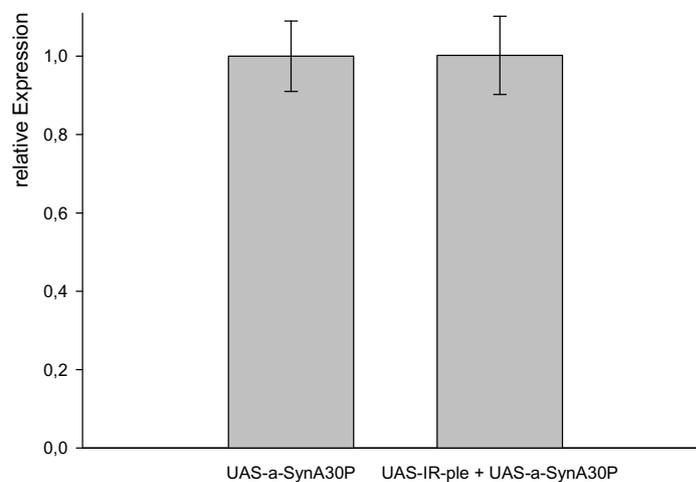


Abbildung 32: qRT-PCR der relativen Expression von α -SynA30P: UAS- α -SynA30P: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P*; UAS-IR-ple + UAS- α -SynA30P: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P, UAS-IR-ple*

Analog zur hSoD1- Koexpression muss überprüft werden, ob die α -SynA30P cDNA in den Rekombinanten mit vergleichbarer Effizienz abgelesen wird, wie in nicht-rekombinanten Tieren. Die qRT-PCR zeigt aber auch hier, dass hinsichtlich der α -

⁹ Der Datenbankeintrag des Vienna Drosophila Reserch Center (http://stockcenter.vdrc.at/control/product/~VIEW_INDEX=0/~VIEW_SIZE=100/~product_id=3308) gibt zur Linie *UAS-IR-ple* das zweite Chromosom als Insertionschromosom an. Die Bestimmung des Insertionschromosoms, die für diese Arbeit durchgeführt wurde, ergab allerdings, dass der Insertionsort auf dem dritten Chromosom liegt.

SynA30P- mRNA- Menge keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Genotypen *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* und *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple, UAS- α -SynA30P* bestehen.

Nachdem durch Überprüfung von Genotyp und Expressionseffizienz sichergestellt ist, dass die gezüchteten Fliegen geeignet sind, um Daten zur ursprünglichen Fragestellung nach der Relevanz des DA- Stoffwechsels für die α -SynA30P- Toxizität zu sammeln, kann mit der Untersuchung der Neurodegeneration fortgefahren werden.

Im Laufe der Alterung verlieren Fliegen, die unter der Kontrolle von *Th-Gal4* α -SynA30P exprimieren im Vergleich zu den Kontrollen nach drei Tagen ca. 19%, nach 20 Tagen ca. 40% und nach 35 Tagen ca. 45% ihrer dopaminergen Neurone. Fliegen, in denen zusätzlich zur Expression von α -SynA30P das *pale*-Silencing durchgeführt wird zeigen nach drei Tagen einen vergleichbaren Zellverlust von ca. 15%, jedoch nimmt das Ausmaß der Neurodegeneration auch im Verlauf der 35- tägigen Alterung nicht weiter zu (Abbildung 33).

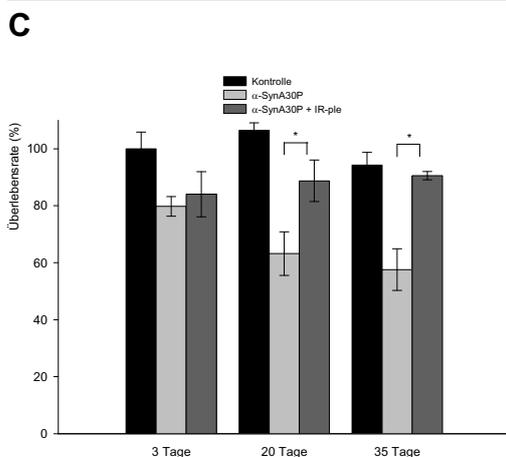
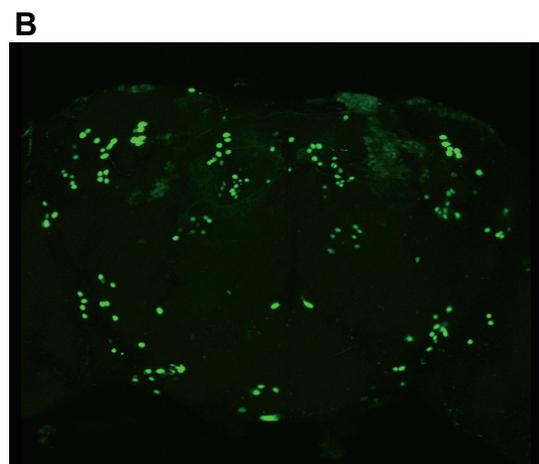
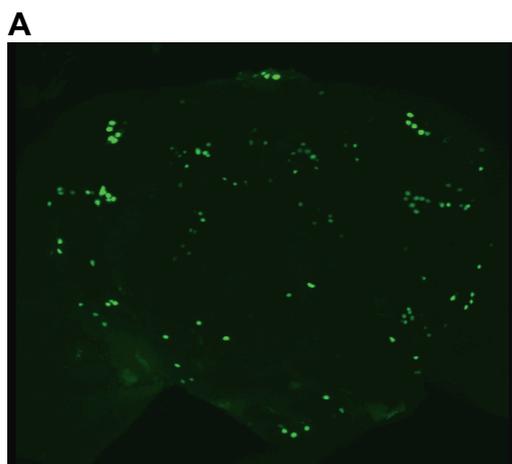


Abbildung 33: Rettung dopaminergener Neurone durch Silencing von *ple*:

A: Gehirn einer 20 Tage alten Fliege des Genotyps *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P*.

B: Gehirn einer 20 Tage alten Fliege des Genotyps *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P, UAS-IR-ple*.

C: Kontrolle: *UAS-Stinger; Th-Gal4*, (n=6), α -SynA30P: *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=10); α -SynA30p + IR-ple: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P, UAS-IR-ple* (n=10).

Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler. $p^* < 0.05$

Im Gegensatz zur Koexpression der hSoD1 spiegelt sich dieser Effekt auch vollständig in der Kletterfähigkeit der Tiere wieder (Abbildung 34). Nach fünf Tagen klettern die Fliegen der drei Genotypen mit einer Geschwindigkeit von ca. 1,2 cm/s. Im Alter von 20

Tagen führt die Expression von α -SynA30P in dopaminergen Neuronen zu einem fast vollständigen Verlust der Kletterfähigkeit ($v = 0,12$ cm/s), während Fliegen mit *pale*-Silencing und auch *Th-Gal4*- Kontrolltiere noch Geschwindigkeiten von 0,34 cm/s beziehungsweise 0,48 cm/s erreichen.

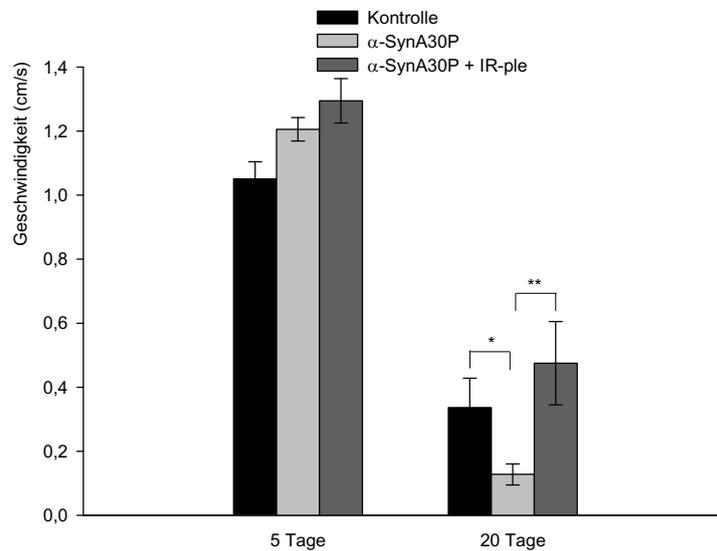


Abbildung 34: Rettung des negativen Geotaxis- Verhaltens durch das Silencing von *pale*: Kontrolle: *UAS-Stinger; Th-Gal4*, (n=30), α -SynA30P: *UAS-Stinger; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=30); α -SynA30p + hSoD1: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P* (n=30). Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler. $p^* < 0.05$; $p^{**} < 0.01$

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Toxizität von α -SynA30P durch die Unterdrückung des DA-Stoffwechsels oder die Entfernung zytoplasmatischer $\cdot O_2^-$ abgemildert werden kann. Im folgenden Abschnitt wird untersucht, ob sich die Erkenntnisse aus dem Modell der hereditären PD auch auf sporadische Modelle der PD übertragen lassen.

2. Bedeutung von oxidativem Stress und Dopamin- Stoffwechsel in Modellsystemen der sporadischen Parkinson'schen Krankheit

In dieser Arbeit wurden Neurodegenerationsmodelle mit den Pestiziden Rotenon und Paraquat etabliert und die daraus resultierende Degeneration anhand von Lebenserwartung, negativem Geotaxis- Verhalten und Bestimmung der Degenerationsrate dopaminergener Neurone an Gehirn- Wholemounts quantifiziert.

2.1 Rotenon und Paraquat als Modelle der sporadischen Parkinson'schen Krankheit

2.1.1 Rotenon- und Paraquatexposition setzen die Lebenserwartung herab

Männliche w^{1118} Fliegen, die mit einem Gemisch aus Rotenon und Saccharose gefüttert werden, haben eine maximale Lebenserwartung von ca. acht Tagen. Eine Futterlösung die mit Paraquat versetzt ist, reduziert die maximale Lebenserwartung auf fünf Tage (Abbildung 35).

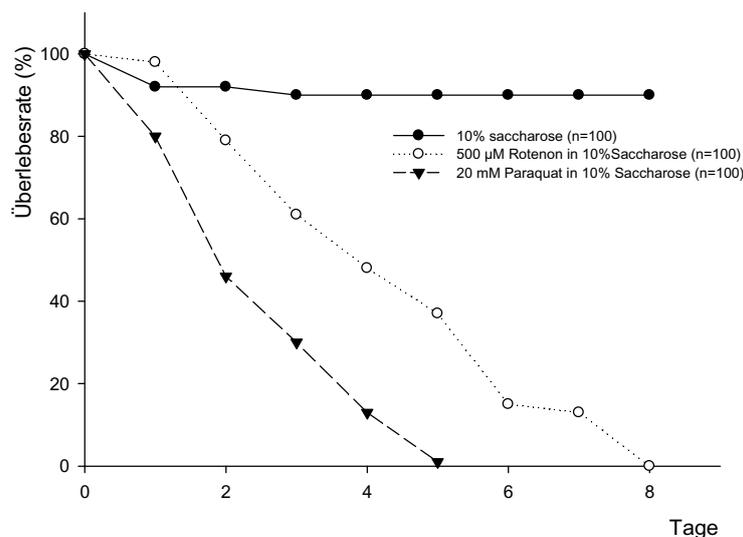


Abbildung 35: Lebenserwartung von w^{1118} Männchen unter Rotenon und Paraquatstress: LD_{50} Paraquat= 1,87 Tage, LD_{50} Rotenon= 3,85 Tage

Unter normalen Haltungsbedingungen erreichen Männchen des Stammes w^{1118} ein maximales Alter von ca. 70 Tagen. Die Fütterung mit Rotenon führt zu einer 90%-igen, die Fütterung mit Paraquat zu einer 95%-igen Verkürzung der Lebenszeit.

Die Tiere der Kontrollgruppe, die lediglich Saccharose und Wasser aufnehmen, zeigen im Beobachtungszeitraum keine erhöhte Mortalitätsrate. Darum kann für nachfolgende Experimente davon ausgegangen werden, dass Saccharose als Futter von Fliegen gut toleriert wird und daher ihr Einsatz als Kontrollmedium zulässig ist.

2.1.2 Rotenon- und Paraquatexposition führen zum Verlust von dopaminergen Neuronen im ZNS von *Drosophila*

Um zu untersuchen, ob neben der Verkürzung der Lebenserwartung und den Verhaltensveränderungen auch Neurodegeneration zu beobachten ist, wurden die dopaminergen Neurone in den Gehirnen der Fliegen nach Paraquat- und Rotenonbehandlung quantifiziert.

Nach beiden Behandlungsarten lassen sich Zellverluste am dopaminergen System im Gehirn nachweisen (Abbildung 36).

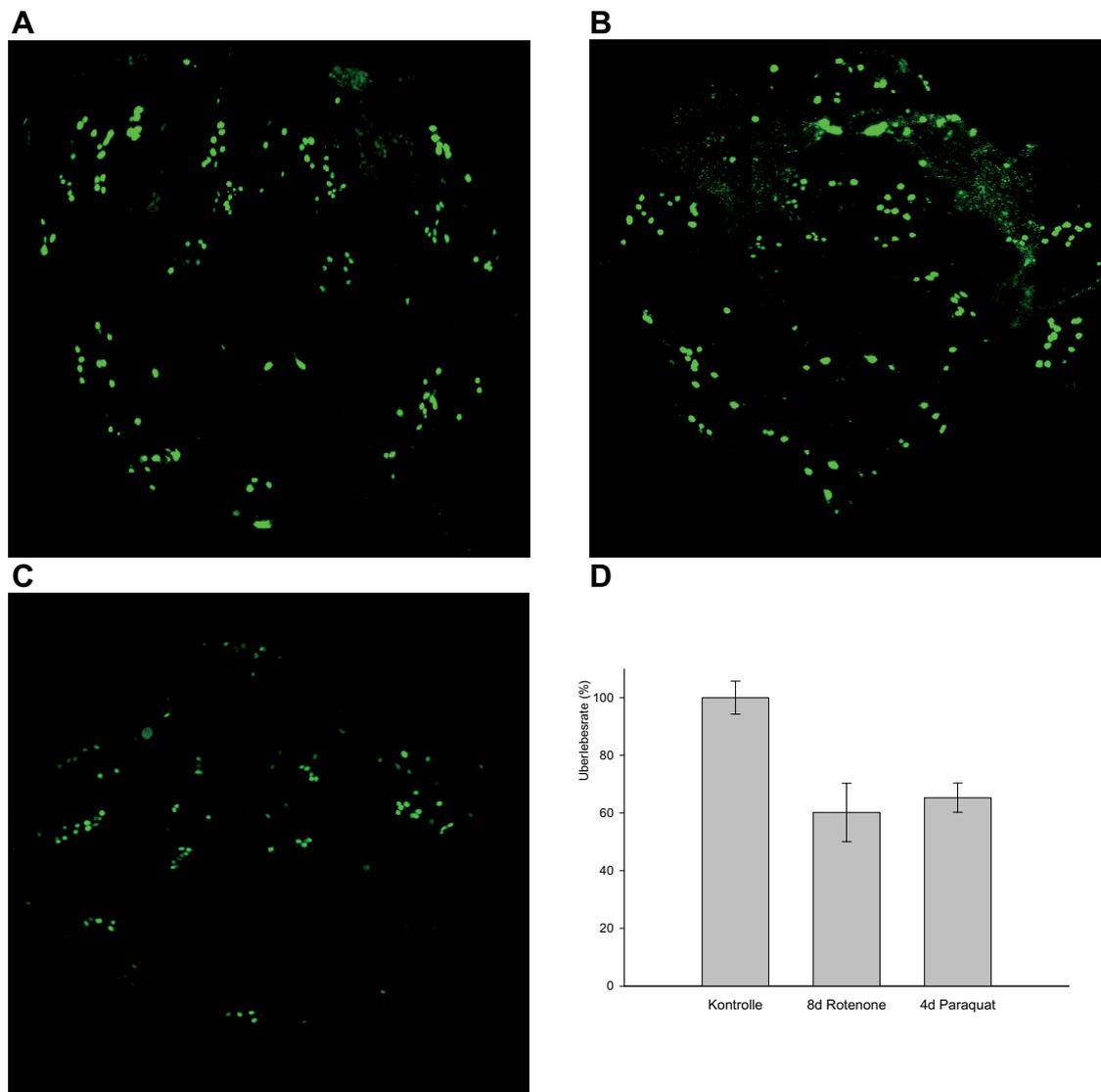


Abbildung 36: Verlust dopaminergener Neurone im Gehirn nach Rotenon- beziehungsweise Paraquatbehandlung:

A: acht Tage 10% Saccharose (Kontrolle)

B: acht Tage 10% Saccharose + 500 μ M Rotenon

C: acht Tage 10% Saccharose + 20mM Paraquat

D: Quantifizierung dopaminergener Neurone: Genotyp: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*. ** $p < 0,01$

Konkret nimmt die Anzahl an detektierbaren dopaminergen Neuronen nach achttägiger Rotenonbehandlung um 40 % ab, was auch mit bisher veröffentlichten Studien gut übereinstimmt (Coulom und Birman, 2004).

Nach viertägiger Paraquatexposition nimmt die Anzahl der dopaminergen Neurone um 35% ab. Chaudhuri *et al.*, (2007) beschreiben hierfür einen wesentlich stärker ausgeprägten Phänotyp, bei dem nach 24-stündiger Exposition schon 52% der dopaminergen Neurone abgestorben waren. Trotz dieser Unterschiede können beide Chemikalien als extrinsische Auslöser degenerativer Vorgänge am dopaminergen System von *Drosophila* eingesetzt werden.

2.1.3 Rotenon- und Paraquatexposition reduzieren die Fähigkeit zur negativen Geotaxis

Zusätzlich zur direkten Analyse der dopaminergen Neurone können auch Verhaltenstests Aufschluss über den Zustand des zentralen Nervensystems geben. Sowohl Rotenon als auch Paraquat führen bei *Drosophila* zur Reduzierung des negativen Geotaxis-Verhaltens (Abbildung 37).

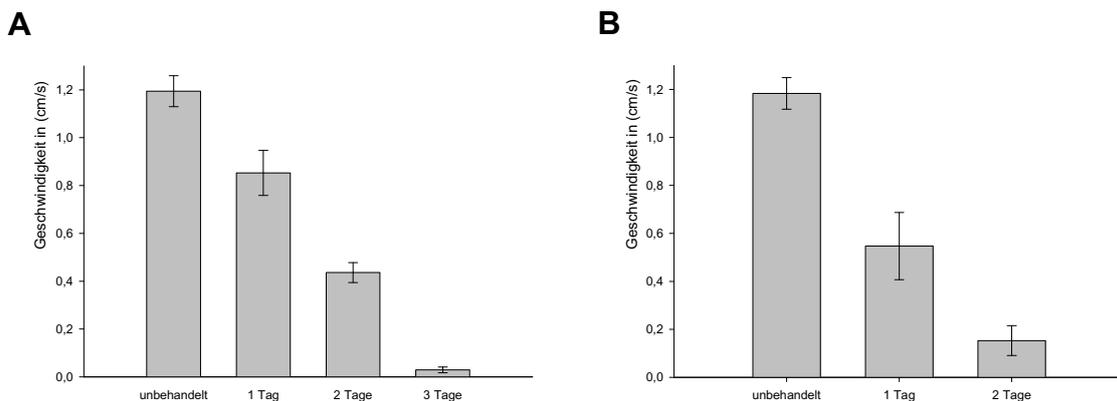


Abbildung 37: Verlust des negativen Geotaxis-Verhaltens während Rotenon- und Paraquatexposition: Genotyp: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*

A: 10% Saccharose + 500µM Rotenon

B: 10% Saccharose + 20mM Paraquat

Nach 72 beziehungsweise nach 48 Stunden führt die Behandlung zur fast vollständigen Bewegungsunfähigkeit. Fünf Tage alte Fliegen des gleichen Genotyps aus der unbehandelten Kontrollgruppe zeigen zu diesem Zeitpunkt normales Verhalten.

Zusammenfassend gilt, dass sowohl Rotenon als auch Paraquat gut geeignet sind, um Degenerationsvorgänge an dopaminergen Neuronen zu induzieren. Damit stehen zwei *Drosophila*-Modellsysteme der sporadischen PD zur Verfügung, die für die Suche nach Modifikatoren der Neurodegeneration eingesetzt werden können. Die gewählten

Paraquat- und Rotenonkonzentrationen lösen deutliche Effekte aus. Alle folgenden Experimente wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt.

2.2 Modifikation der Paraquat-Toxizität

In einigen toxikologischen Studien wird Paraquat als ein selektiver Inhibitor des mitochondrialen Komplex I der dopaminergen Neuronen beschrieben (McCormack *et al.*, 2002; Cocheme und Murphy, 2007). Dadurch wären diese Zellen der verstärkten Produktion von Superoxidradikalen durch die mitochondriale Atmung ausgesetzt. Dem folgend ist es nahe liegend, Modifikatoren der Paraquat-Toxizität in zellulären Stoffwechselwegen, die für die Entfernung von Superoxiden und anderen Radikalen verantwortlich sind, zu suchen.

2.2.1 hSoD1 erhöht die Lebenserwartung unter Paraquatstress

Wie bereits gezeigt, kann hSoD1 dopaminerge Neurone im Drosophila α -Syn- Modell der hereditären PD retten. Darum wurde getestet, ob die Überexpression der hSoD1 die Fliegen und ihre dopaminergen Neurone auch vor der Paraquat-Toxizität schützen kann.

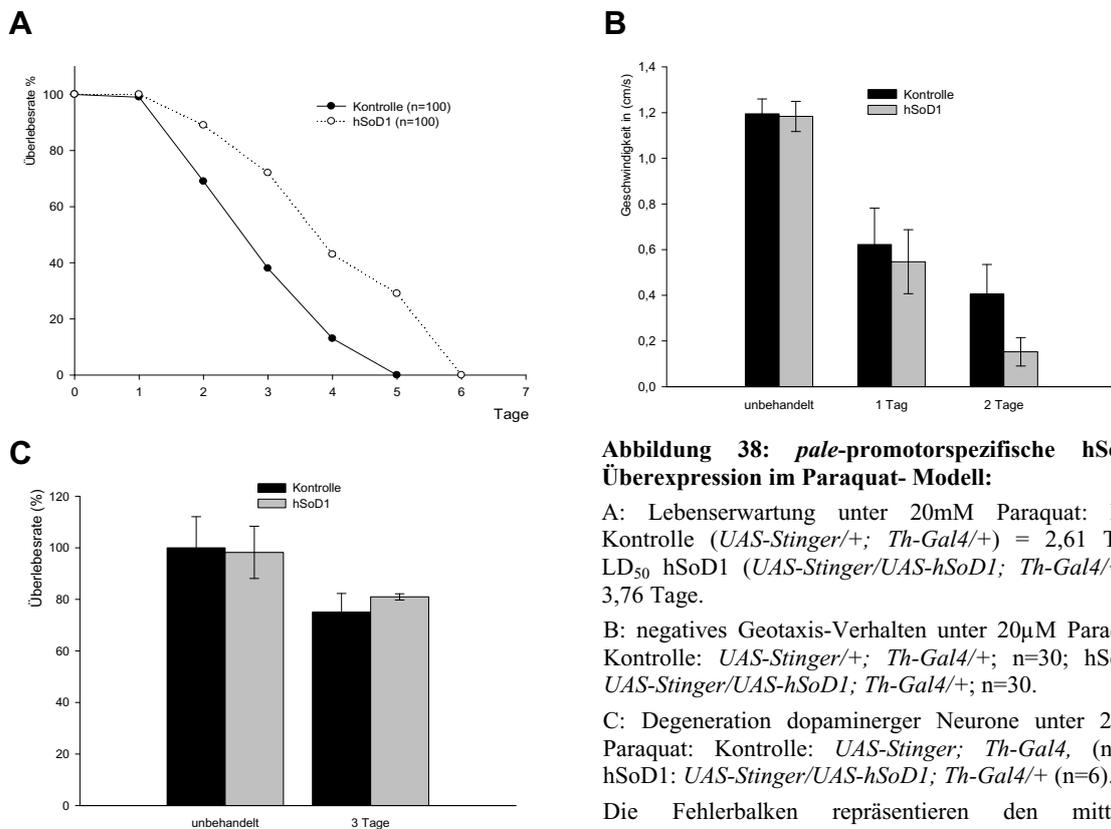


Abbildung 38: pale-promotorspezifische hSoD1-Überexpression im Paraquat-Modell:

A: Lebenserwartung unter 20mM Paraquat: LD₅₀ Kontrolle (*UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*) = 2,61 Tage; LD₅₀ hSoD1 (*UAS-Stinger/UAS-hSoD1; Th-Gal4/+*) = 3,76 Tage.

B: negatives Geotaxis-Verhalten unter 20µM Paraquat: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*; n=30; hSoD1: *UAS-Stinger/UAS-hSoD1; Th-Gal4/+*; n=30.

C: Degeneration dopaminergener Neurone unter 20µM Paraquat: Kontrolle: *UAS-Stinger; Th-Gal4*, (n=6); hSoD1: *UAS-Stinger/UAS-hSoD1; Th-Gal4/+* (n=6).

Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Durch die Überexpression der hSoD1 mit *TH-Gal4* verlängert sich die durchschnittliche und maximale Lebenserwartung von drei auf vier, respektive fünf auf sechs Tage (Abbildung 38A). Auf das Geotaxis- Verhalten wirkt sich die Expression der hSoD1

jedoch nicht vorteilhaft aus. Beide Genotypen verlieren ihre Kletterfähigkeit vollständig nach 72 Stunden Exposition. Nach 24 Stunden klettern die Fliegen beider Genotypen mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,6 cm/s, nach 48 Stunden klettern Fliegen ohne Transgen mit einer Geschwindigkeit von 0,41 cm/s sogar noch etwas besser als Fliegen mit Transgen, die dann nur noch 0,15 cm/s erreichen (Abbildung 38B).

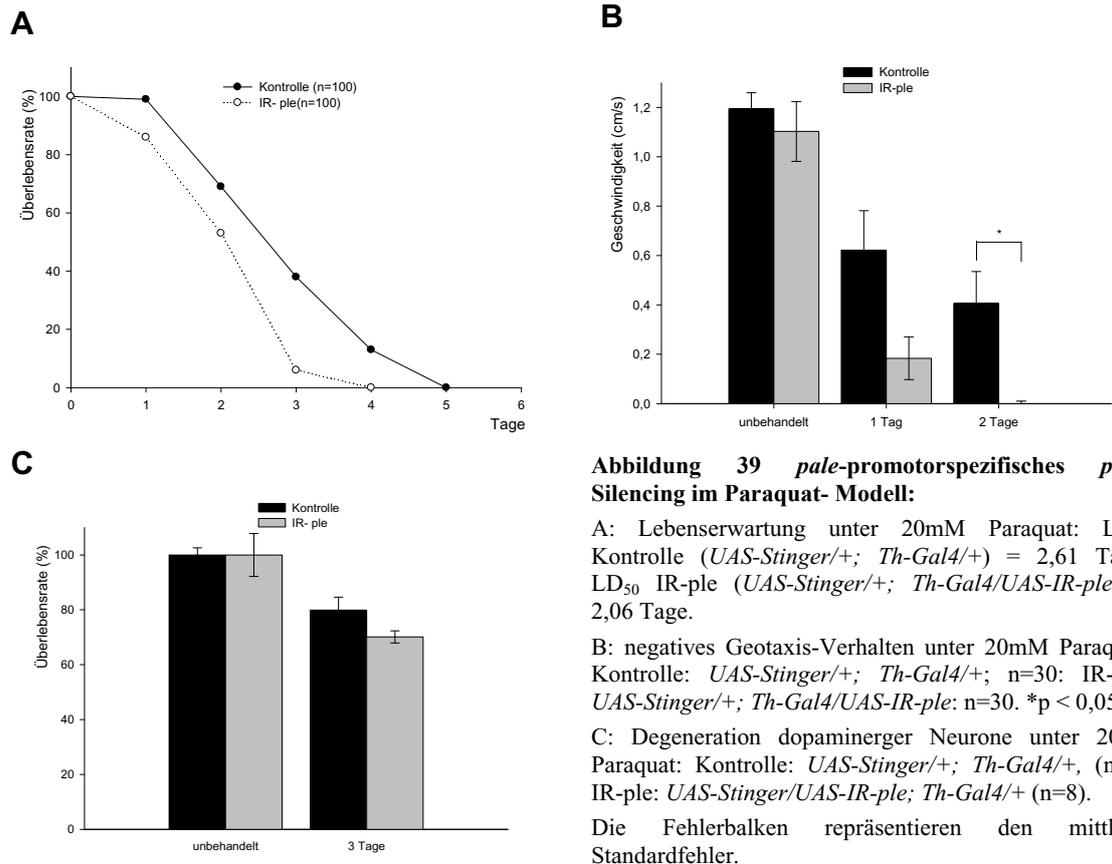
Auch die Degenerationsrate der dopaminergen Neurone wird durch hSoD1 nicht vermindert. Nach drei Tagen Paraquatstress sind in Fliegen, die hSoD1 exprimieren 20% der dopaminergen Neurone abgestorben. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 38C). Es ist davon auszugehen, dass die Verlängerung der Lebenserwartung wiederum eher auf die unspezifische Expression der hSoD1 in anderen Teilen des Organismus als auf die gerichtete ektopische Expression zurückzuführen ist (siehe Abschnitt 1.3.2).

2.2.2 Dopamin- Depletion verstärkt die Paraquattoxizität

Wie bereits gezeigt, kann auch die Verringerung der Menge an zellulärem DA eine Detoxifizierung von α -SynA30P bewirken. Um zu testen, ob DA auch in sporadischen PD-Modellen an *Drosophila* eine relevante Rolle für die Degeneration dopaminergener Neurone spielt, wurden Fliegen mit *pale-RNAi*- Silencing auf ihre Sensitivität gegenüber Paraquat untersucht.

Die mittlere und maximale Lebenserwartung von Tieren, bei denen das *pale*- Silencing unter der Kontrolle von *TH-Gal4* durchgeführt wird, ist unter Paraquatstress im Vergleich zu Kontrolltieren mit normaler *pale*- Expression um ca. einen halben, beziehungsweise einen ganzen Tag verkürzt (Abbildung 39A). Auch das Lokomotionsverhalten der *pale*- Knockdown- Tiere wird durch Paraquat stärker beeinträchtigt als das der Tiere der Kontrollgruppe (Abbildung 39B). Nach eintägiger Exposition erreichen sie lediglich durchschnittliche Klettergeschwindigkeiten von 0,24 cm/s, während die Kontrolltiere noch in der Lage sind, mit einer Geschwindigkeit von 0,62 cm/s zu klettern. Dieser Effekt bleibt auch nach 48 Stunden Expositionszeit erhalten. Nun sind die Knockdown- Tiere quasi vollständig narkoleptisch und paralysiert, die Kontrolltiere klettern aber noch mit einer Geschwindigkeit von 0,41 cm/s.

Auch die Degenerationsrate der dopaminergen Neurone wird durch die DA- Depletion tendenziell beschleunigt (Abbildung 39C). Nach drei Tagen Paraquat- Exposition sind in den Kontrollfliegen 21%, in DA- depletierten Fliegen 29% der dopaminergen Neurone abgestorben.



Diese Ergebnisse stellen auf den ersten Blick eine Diskrepanz zu den Resultaten zur α -Syn- detoxifizierenden Wirkung der DA- Depletion dar. Theoretisch wäre es allerdings auch möglich, dass durch den DA- Mangel in dopaminergen Neuronen im Rahmen einer Kompensationsreaktion Mechanismen für die Wiederherstellung des normalen zytosolischen DA- Spiegels aktiviert werden. Die Mehrproduktion von DA als ein solcher kompensatorischer Mechanismus kann in *pale*- Knockdown- Fliegen aufgrund der eindeutig reduzierten DA- Mengen ausgeschlossen werden. Eine andere Möglichkeit den DA-Spiegel zu erhöhen, wäre eine verstärkte Produktion des DA- Transporters (DAT, codierendes Gen: *fmn*), um die Wiederaufnahme von DA aus dem synaptischen Spalt zu beschleunigen.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die *fmn*- mRNA- Mengen in Köpfen von Fliegen mit und ohne *pale*- Silencing verglichen. Das Ergebnis der qRT-PCR zeigt, dass *fmn* im Hintergrund des *pale*- Silencings ca. fünffach hochreguliert ist (Abbildung 40). Da Paraquat möglicherweise via DAT in dopaminerge Neurone transportiert wird (Shimizu *et al.*, 2003; Ossowska *et al.*, 2005), erscheint es möglich, dass die stärker ausgeprägten degenerativen Phänotypen in *pale*- Knockdown- Fliegen schlicht durch ungleich höhere Paraquat- Belastung entstehen, und der eigentliche Effekt der DA- Depletion maskiert wird.

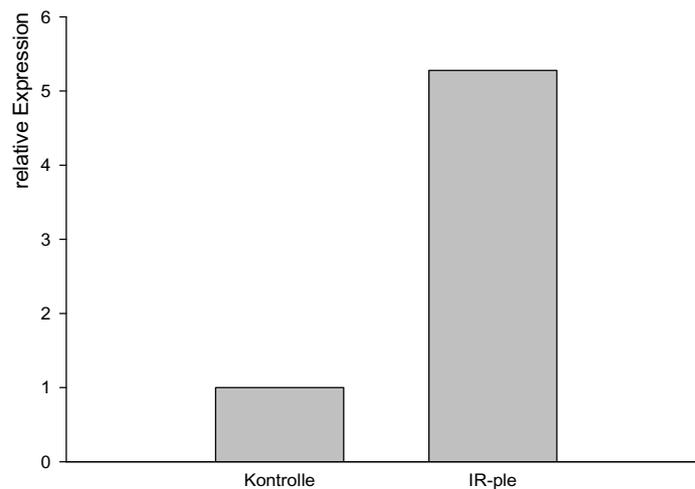


Abbildung 40: qRT-PCR der relativen Expression von *fmn* in Köpfen bei Silencings von *pale*: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+* (n=100); IR-ple: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple* (n=100)

Folglich sollte es möglich sein, das Ausmaß der Degeneration durch Manipulation von DAT zu modulieren. Darum wurde untersucht, ob eine DAT- Defizienz (*fmn*⁻) oder seine Überexpression die Lebenserwartung der Tiere oder die ihrer dopaminergen Neurone unter Paraquatstress beeinflusst.

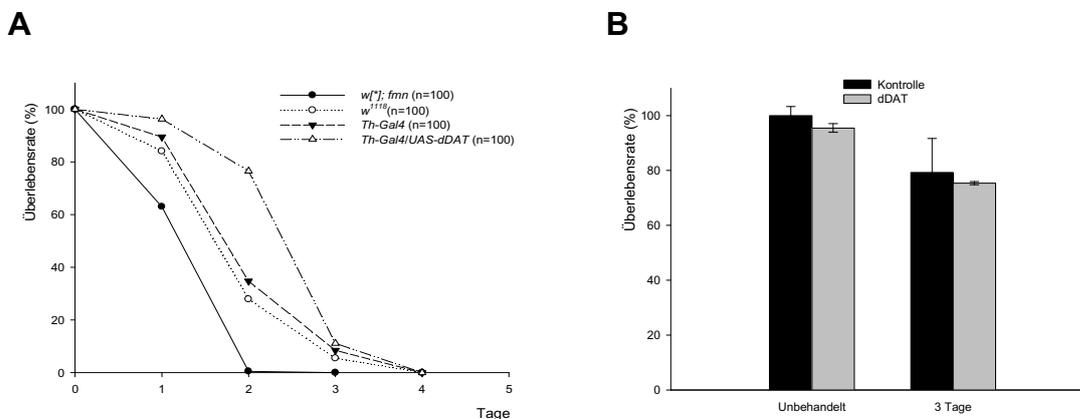


Abbildung 41: Auswirkungen von *fmn*-Defizienz und DAT- Überexpression im Paraquat- Modell:

A: Lebenserwartung unter 20mM Paraquat: LD₅₀ *w[*]; fmn* = 1,21 Tage; LD₅₀ *w¹¹¹⁸* = 1,61 Tage; LD₅₀ *Th-Gal4* = 1,72 Tage; LD₅₀ *Th-Gal4 ; UAS- dDat* = 2,41 Tag.

B: dDAT- Überexpression mit *Th-Gal4* unter 20mM Paraquat: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*, (n=5); dDAT: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-dDAT* (n=7);

Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Fliegen, die aufgrund einer Mutation in *fmn* kein DAT produzieren können, leben unter Paraquatstress fast zehn Stunden kürzer als Kontrolltiere der *w¹¹¹⁸* oder *Th-Gal4* Stämme. Die Überexpression von DAT führt dagegen im Vergleich zu den Kontrollen zur Verlängerung der mittleren Lebenserwartung um ca. 17 Stunden (Abbildung 41A). Dieses Ergebnis widerspricht obiger Hypothese. Die Degenerationsrate der dopaminergen Neurone unter Paraquatstress wird durch die Überexpression von DAT nicht verändert.

Die Neurone in Fliegen beider Genotypen degenerieren mit der selben Rate (Abbildung 41B), so dass nach dreitägiger Exposition 21% (Kontrolle), beziehungsweise 24% (dDAT) der Neurone abgestorben sind.

Obwohl das Abfangen von Superoxidradikalen durch hSoD1, als auch die Suppression der Produktion toxischer DA- Metabolite durch Silencing von *pale* im hereditären PD-Modell die α -Syn30P-Toxizität vermindern kann, greifen die protektiven Effekte im Paraquatmodell der sporadischen PD nicht. Der Mechanismus mit dem α -SynA30P dopaminerge Neurone schädigt, scheint vom Toxizitätsmechanismus des Paraquats verschieden zu sein.

Rotenon und Paraquat produzieren ähnliche degenerative Phänotypen. Allerdings ist der Toxizitätsmechanismus des Rotenons im Gegensatz zu demjenigen von Paraquat und α -Syn vollständig aufgeklärt.

2.3 Modifikation der Rotenontoxizität

Rotenon kann in alle Zellen eines Organismus eindringen und bewirkt wie Paraquat eine systemweite Hemmung des mitochondrialen Komplex I. Dies führt zu drastischer Mehrproduktion von Superoxidradikalen, die aus dem mitochondrialen Intermembranraum in die mitochondriale Matrix und das Zytoplasma diffundieren. HSoD1 könnte auch hier durch das Abfangen von Superoxiden protektiv eingreifen.

2.3.1 Steigerung der allgemeinen Rotenontoleranz durch hSoD1

Um zu testen, ob hSoD1 in der Lage ist, die Rotenontoleranz der Fliegen zu erhöhen, wurde untersucht, wie sich die Überexpression des Enzyms unter der Kontrolle von *Th-Gal4* auf die Überlebensrate des gesamten Organismus, seiner dopaminergen Neurone und das negative Geotaxis Verhalten auswirkt.

Kontrolltiere ohne hSoD1- Transgen zeigen auf Rotenon eine, für dieses Experiment typische mittlere Lebenserwartung von fünf Tagen. Durch die Expression von hSoD1 unter der Kontrolle von *Th-Gal4* kann die mittlere und maximale Lebenserwartung auf fünf beziehungsweise zehn Tage verdoppelt werden (Abbildung 42A). Neben der Verlängerung der Lebenserwartung behalten die hSoD1- exprimierenden Tiere ebenfalls die Fähigkeit zur negativen Geotaxis wesentlich länger. Während die Kontrolltiere ihre Kletterfähigkeit innerhalb von 72 Stunden stetig bis zur Inaktivität verlieren (24 Stunden: 0,2 cm/s, 48 Stunden: 0,05 cm/s, 72 Stunden: 0,03 cm/s), zeigen Tiere mit hSoD1- Expression nach derselben Expositionszeit noch eine mittlere Klettergeschwindigkeit von 0,32 cm/s (Abbildung 42B).

Beim Vergleich der unbehandelten Kontrollgruppen ist auffällig, dass hSoD1 exprimierende Tiere durchschnittlich etwas schneller klettern als Tiere die das hSoD1- Transgen nicht tragen. In dieser Arbeit wurde schon ein ähnlicher Effekt in den Ergebnissen der Experimente zur α -Syn- Toxizität beschrieben und auf ein ‚leaking‘ der *UAS- hSoD1*- Linie zurückgeführt (Kapitel III, Abschnitt 1.3.2). Um zu überprüfen, ob die hier beobachteten Rettungseffekte auf spezifischer Expression in dopaminergen Neuronen oder anderen Zellen, die im Expressionsbereich von *pale* liegen, zurückzuführen sind wurde nun den Experimenten zur Überlebensrate und negativer Geotaxis eine weitere Kontrollgruppe mit heterozygoten *UAS-hSoD1*- Tieren ohne *Gal4*- Treiber hinzugefügt. Aus deren Überlebensraten und Verhalten geht hervor, dass die Verbesserung nicht nur auf die *Th-Gal4*- getriebene Expression zurückgeführt werden

kann: Fliegen des Genotyps *UAS-hSoD1*, die das hSoD1 Transgen ungetrieben tragen zeigen ebenfalls eine deutliche Verlängerung der mittleren Lebenserwartung auf acht Tage und klettern nach 72 Stunden Expositionszeit noch mit einer mittleren Geschwindigkeit von 0,43 cm/s. Diese Beobachtung an den ungetriebenen Kontrollen ist höchstwahrscheinlich genauso auf das ‚leaking‘ der *UAS-hSoD1* Linie zurückzuführen.

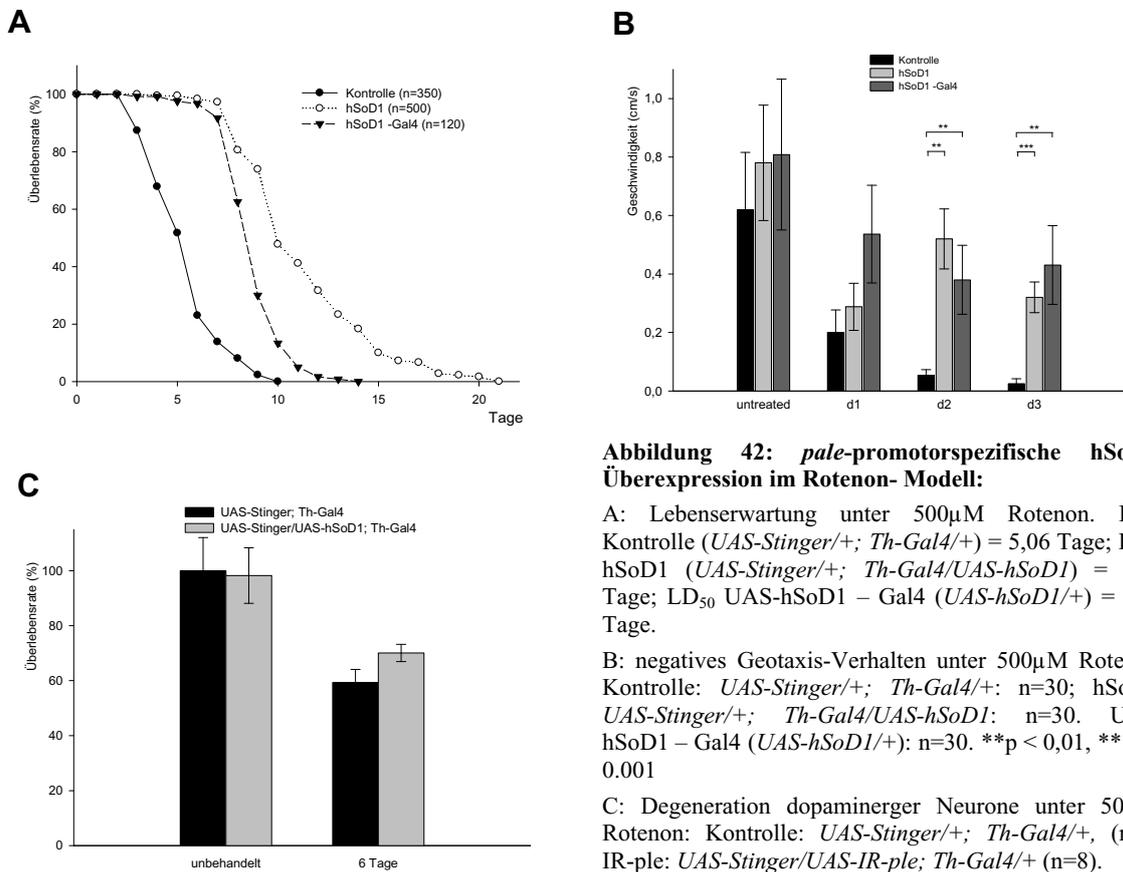


Abbildung 42: *pale*-promotorspezifische hSoD1-Überexpression im Rotenon-Modell:

A: Lebenserwartung unter 500µM Rotenon. LD₅₀ Kontrolle (*UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*) = 5,06 Tage; LD₅₀ hSoD1 (*UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-hSoD1*) = 9,92 Tage; LD₅₀ UAS-hSoD1 – Gal4 (*UAS-hSoD1/+*) = 8,34 Tage.

B: negatives Geotaxis-Verhalten unter 500µM Rotenon. Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*; n=30; hSoD1: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-hSoD1*; n=30. UAS-hSoD1 – Gal4 (*UAS-hSoD1/+*); n=30. **p < 0,01, ***p < 0.001

C: Degeneration dopaminergener Neurone unter 500µM Rotenon: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*, (n=8); IR-ple: *UAS-Stinger/UAS-IR-ple; Th-Gal4/+* (n=8).

Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Standardfehler.

Obwohl die beschriebenen Experimente zeigen, dass die generelle Präsenz der hSoD1 in der Fliege ausreicht, um eine allgemeine Steigerung der Rotenontoleranz zu bewirken, werden die dopaminergen Neurone nicht vollständig vor den Auswirkungen der Toxizität des Rotenons geschützt.

Sechstägige Rotenonbehandlung führt bei den Kontrolltieren zu einem Verlust von 40% der dopaminergen Neurone. Dopaminerge Neurone, die hSoD1 exprimieren, degenerieren etwas langsamer. Nach derselben Expositionszeit sind dann erst 30% der Zellen abgestorben. Jedoch ist die Abnahme der Degenerationsrate so gering, dass hier lediglich von einem tendenziellen Effekt gesprochen werden kann. Der gemessene Unterschied erreicht keine statistische Signifikanz (Abbildung 42C).

Allerdings kann aufgrund der unspezifischen, aber trotzdem deutlichen Rettung der Lebenserwartung und des negativen Geotaxis Verhalten durchaus davon ausgegangen

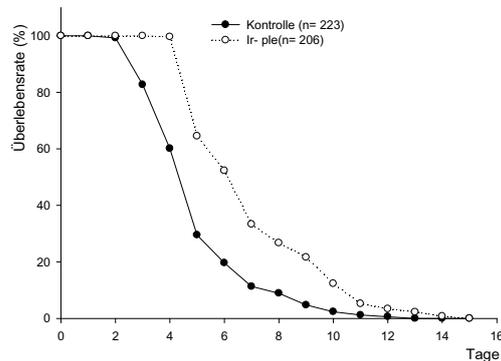
werden, dass die Entfernung von Superoxidradikalen der Rotenon-Toxizität entgegenwirkt. Dopaminerge Neurone werden auch, allerdings in geringerem Maße, geschützt. Dies bestätigt zum einen die höhere Sensitivität dopaminerger Neurone gegenüber oxidativem Stress und führt gleichzeitig zu der Überlegung, ob sich diese Zellen durch Silencing des DA-Stoffwechsel in einen Status versetzen lassen, in dem sie die Überproduktion der Superoxidradikale besser tolerieren können.

2.3.2 Dopamin-abhängige Rotenonsensitivität dopaminerger Neurone

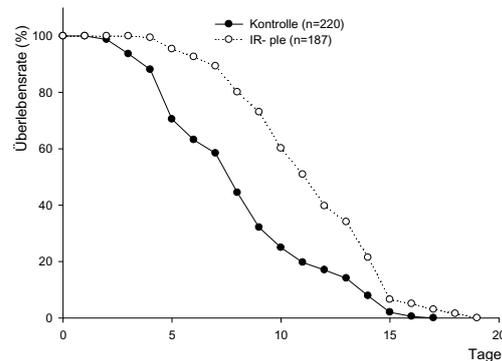
Fliegen mit reduziertem DA-Spiegel zeigen keine allgemein erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Allerdings kann das Silencing des DA-Stoffwechsels die Toxizität von α -SynA30P verringern. Darum wurde untersucht, ob dieser Mechanismus auch bei der Degeneration dopaminerger Neurone unter Rotenonstress greift.

Wird das *UAS-IR-ple* Konstrukt mit *Th-Gal4* getrieben, so verlängert sich die mittlere Lebenserwartung der Tiere um ca. 44% von viereinhalb auf über sechs Tage. Durch panneurales *pale*-Silencing kann die mittlere Lebenserwartung der Fliegen sogar von ca. siebeneinhalb auf über elf Tage verlängert werden (Abbildung 43A, B). Da männliche Fliegen des *elav-Gal4* Treiberstamms offensichtlich erhöhte Rotenontoleranz aufweisen, ist zwar auch davon auszugehen, dass dieser relativ große Effekt zum Teil auf den genetischen Hintergrund zurückgeführt werden muss; trotzdem zeigt das Experiment, dass allein die neuronale Expression des *UAS-IR-ple*-Konstrukts ausreicht, um die Lebenserwartung der Fliegen zu erhöhen. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die Lebensverlängerung bei der Expression mit *Th-Gal4* tatsächlich auf neuronalen, und nicht etwa auf epidermalen Vorgängen beruht.

A



B



C

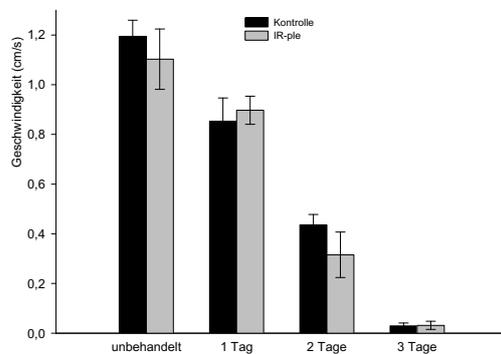


Abbildung 43: Lebenserwartung und negatives Geotaxis Verhalten von Fliegen mit reduziertem Dopaminstoffwechsel unter Rotenonstress:

A: Lebenserwartung unter 500µM Rotenon bei Silencing unter der Kontrolle von *Th-Gal4*: LD₅₀ IR-ple: (*UAS-Stinger*; *Th-Gal4/UAS-IR-ple*) = 4,33 Tage; LD₅₀ hSoD1 (*UAS-Stinger/+*; *Th-Gal4/UAS-IR-ple*) = 6,12 Tage

B: Lebenserwartung unter 500µM Rotenon bei Silencing unter der Kontrolle von *elav-Gal4*: LD₅₀ Kontrolle (*elav-Gal4/y*) = 7,60 Tage; LD₅₀ IR-ple (*elav-Gal4/y*; *UAS-IR-ple/+*) = 11,10 Tage

C: negatives Geotaxis-Verhalten unter 500µM Rotenon bei Silencing unter der Kontrolle von *Th-Gal4*: Kontrolle: *UAS-Stinger*; *Th-Gal4*; n= 30; IR-ple: *UAS-Stinger*; *Th-Gal4/UAS-IR-ple* n= 30.

Der Verlust des negativen Geotaxis- Verhaltens unter Rotenonstress scheint durch die DA- Depletion allerdings nicht beeinflusst zu werden. Die Tiere beider Genotypen verlieren ihre Kletterfähigkeit im Laufe von drei Tagen (Abbildung 43C).

Jedoch spiegelt sich die spezifische Verlängerung der Lebenserwartung in der Degenerationsrate der dopaminergen Neurone wieder (Abbildung 44). Dopaminerge Neurone von Fliegen mit unterdrückter DA- Produktion degenerieren unter Rotenonstress langsamer als die dopaminergen Neurone von Kontrolltieren. Während in den Tieren der Kontrollgruppe nach sechs Tagen Rotenonbehandlung 39% der dopaminergen Neurone sterben, sind im selben Zeitraum in Fliegen, die das *UAS-IR-ple*- Konstrukt überexprimieren, erst 20% der Zellen abgestorben.

Dies zeigt, dass die Sensitivität dopaminergen Neurone gegenüber Rotenon von der Präsenz des Dopamins beziehungsweise seiner Metabolite abhängig ist. Zusammen zeigen die Ergebnisse der bisher beschriebenen Experimente, dass die Reduktion zyttoplasmatischer freier Radikale, sei es durch die Überexpression von Radikalfängern oder durch die die Verringerung derer intrinsischen Produktion, ein Mittel für generelle Neuroprotektion und spezielle Protektion dopaminergen Neurone sein kann.

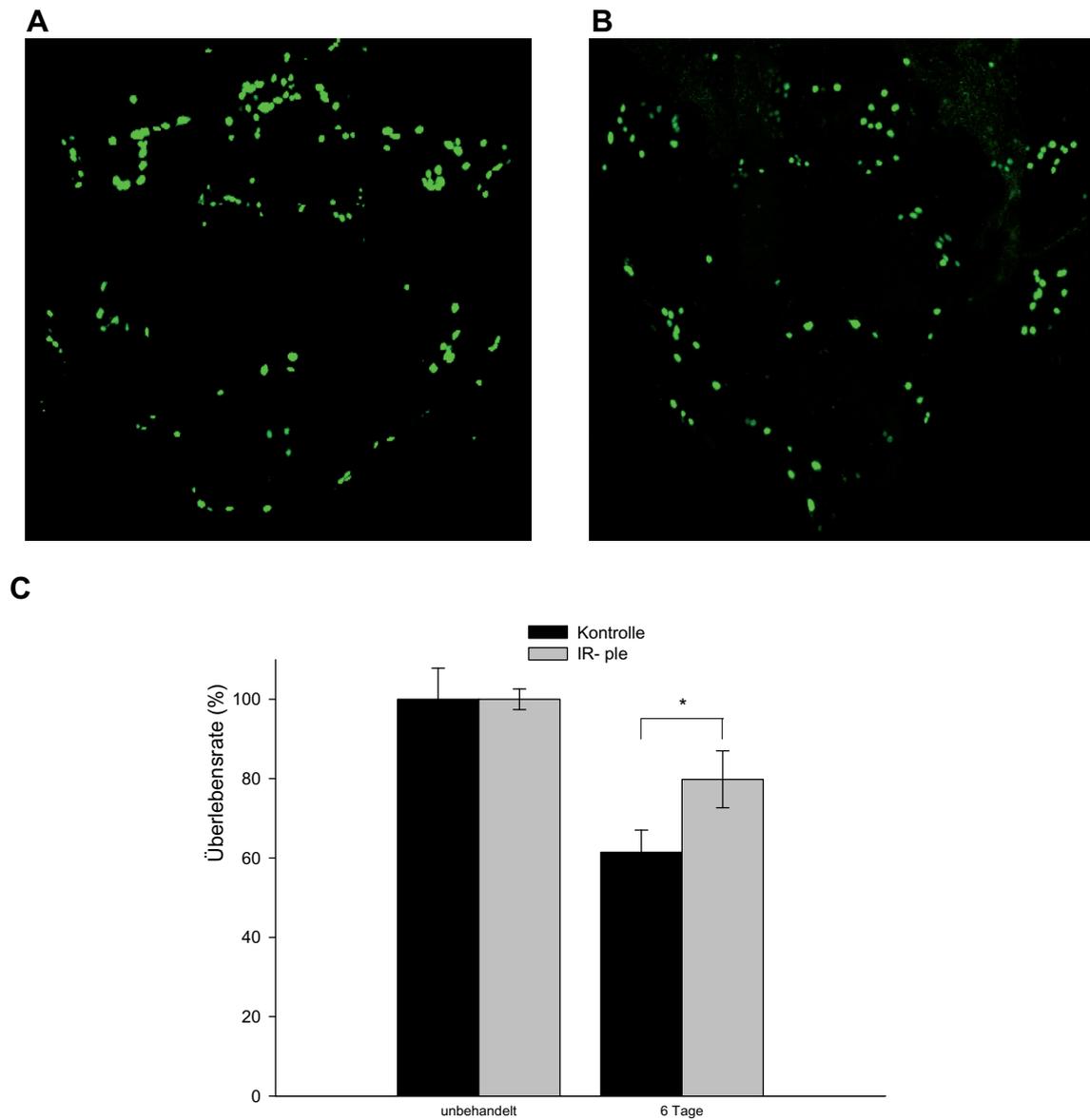


Abbildung 44: dopaminerge Neurone mit reduzierter Dopaminproduktion zeigen erhöhte Rotenontoleranz:

A: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple; 6 Tage Rotenon.*

B: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+; 6 Tage Rotenon.*

C: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+*, (n=6); IR-ple: *UAS-Stinger/UAS-IR-ple; Th-Gal4/+*. (n=12). *p < 0.05

3. Auswirkungen von oxidativem Stress auf die α -Syn-Aggregation in dopaminergen Neuronen von *Drosophila*

Ein Markenzeichen der Parkinson'schen Krankheit und anderer α -Synucleopathien ist die Bildung zytoplasmatischer Proteinaggregate mit unterschiedlichen α -Syn- Anteilen. Feany und Bender (2000) beschreiben das Auftreten solcher oder ähnlicher Aggregate bei panneuraler Expression von α -SynA30P im Gehirn gealterter Fliegen.

3.1 α -Syn- Aggregation in *Drosophila*

Mit den Expressionslinien und Methoden, die in dieser Arbeit benutzt wurden, kann dieser Effekt jedoch nicht reproduziert werden. Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen nach panneuraler Expression von α -Syn, α -SynA30P oder α -SynA53T zu keinem Zeitpunkt eindeutig identifizierbare Aggregate. Darüber hinaus geben auch native Westernblots keine Anhaltspunkte für die Präsenz von α -Syn- Aggregaten (siehe Kapitel V.2).

Vielmehr ist auffällig, dass α -SynA30P eine andere zelluläre Lokalisation als die wildtypische oder die α -SynA53T- Form aufweist. Während wildtypisches und α -SynA53T im Neuropil lokalisiert ist, zeigt die ABC-HRP- Färbung bei Fliegen, die α -SynA30P exprimieren sowohl im Neuropil als auch in den kortikalen Zellkörpern positive Färbung (Abbildung 45). Dieser gestörte Verteilungsprozess ist sowohl bei panneuraler als auch bei Expression in dopaminergen Neuronen zu beobachten. Wildtypisches α -Syn ist hauptsächlich in den, die Pilzkörper innervierenden, Dendriten und Axonen zu finden. α -SynA30P dagegen ist in den Zellkörpern aller dopaminergen Cluster nachweisbar (Abbildung 46). Obwohl das Expressionsniveau der α - Synucleine untereinander vergleichbar ist, wird α -SynA30P anscheinend nicht vollständig in die Axone transportiert. Daraus ergeben sich Hinweise auf veränderten, beziehungsweise behinderten axonalen Transport, durch den die erhöhte Toxizität von α -SynA30P mitunter bedingt sein könnte.

Außerdem scheinen die grundlegenden Mechanismen der α -Syn- Aggregation *in vivo* komplexer zu sein, als in der Literatur dargestellt. Das Studium der Resultate von *in vitro*- Experimenten und der Blick auf andere Modellorganismen gibt tiefere Einblicke in die Dynamik der α -Syn- Aggregation und stellt Ausgangspunkte für weiterführende Experimente dar.

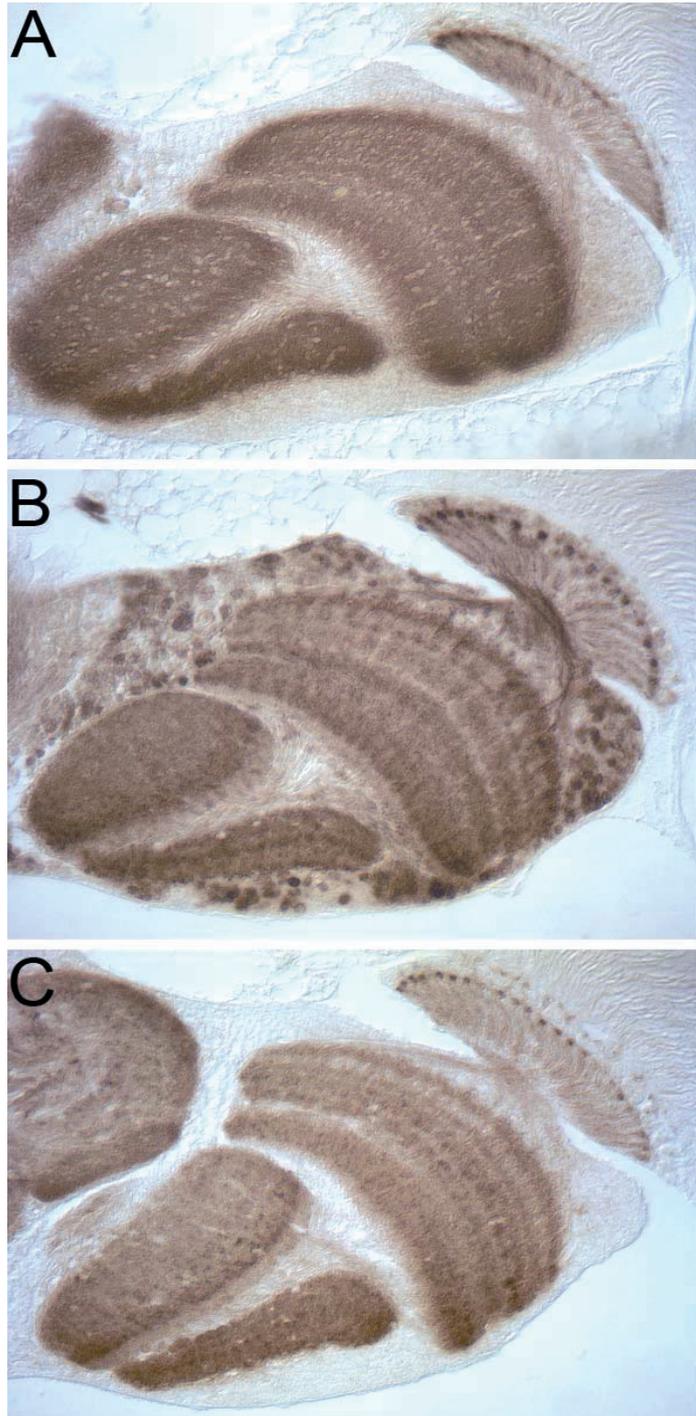


Abbildung 45: differentielle zelluläre Lokalisation der verschiedenen α -Syn- Formen bei panneuraler Expression: ABC-HRP gefärbte Paraffinschnitte durch die Gehirne fünf Tage alter Fliegen:

A: *elav-Gal4/y; UAS- α -Syn*

B: *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA30P*

C: *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA53T*

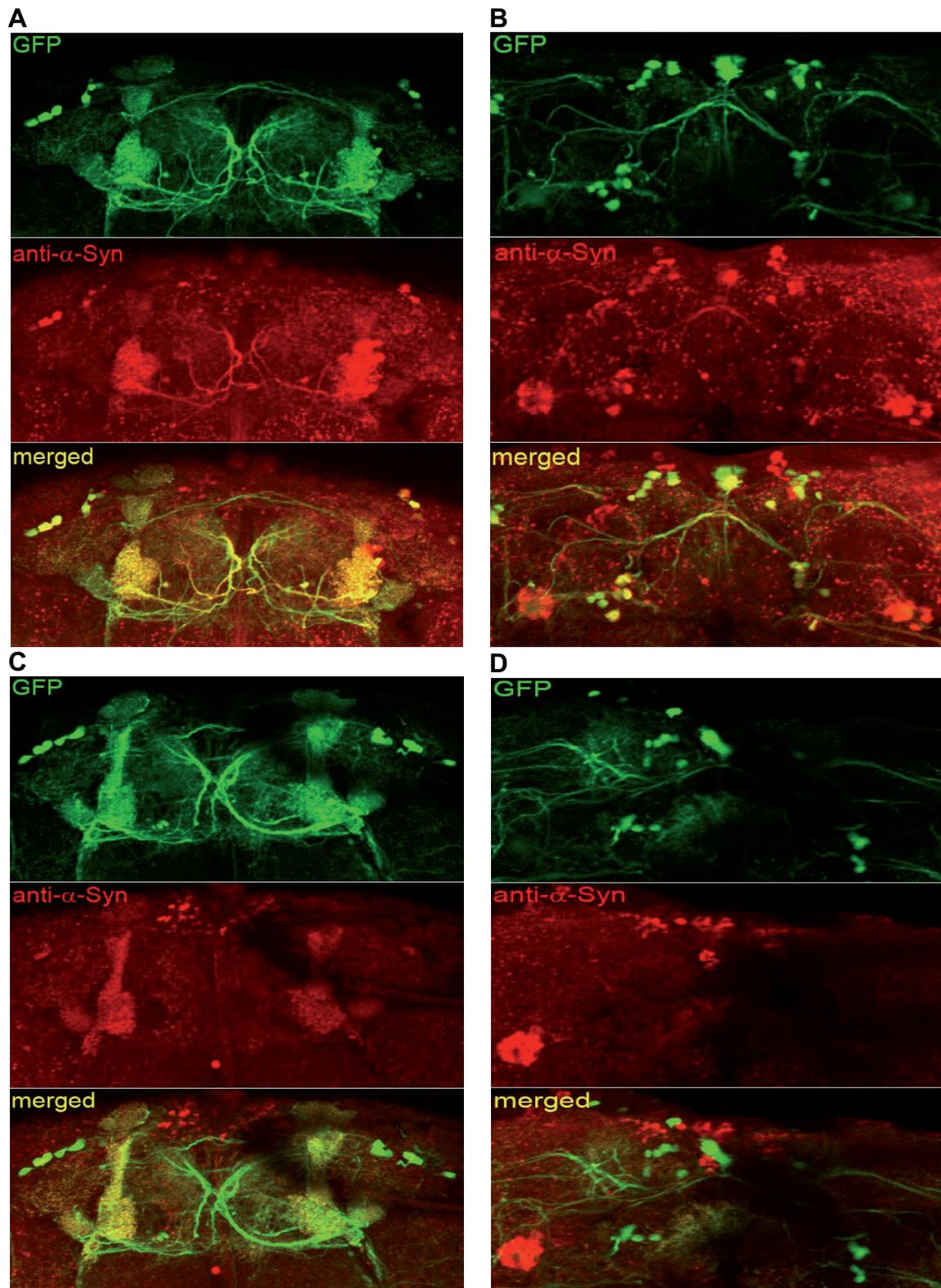


Abbildung 46: differenzielle zelluläre Lokalisation von α -Syn und α -SynA30P in dopaminergen Neuronen zehntage alter Fliegen: konfokalmikroskopische Aufnahmen von anti- α -Syn-Färbungen des dorsalen (A, C) und ventralen (B, D) dopaminergen Netzwerks.

A, B: *UAS-GFP/+; Th-Gal4/UAS- α -SynA30P*

C, D: *UAS-GFP/+; Th-Gal4/UAS- α -Syn*

3.2 Aggregation durch Modifikation des α -Syn C-Terminus - WTsynEGFP Δ 155

Im Zusammenhang mit der α -Syn- Aggregation konnte gezeigt werden, dass Aminosäureexpansionen am C-Terminus die Aggregation des Proteins dramatisch verstärken (McLean *et al.* 2001).

Um zu testen, ob der beobachtete Effekt auf Experimente in der Zellkultur beschränkt ist, oder ob er sich auch auf einen lebenden Organismus übertragen lässt, wurde die Expression von WTsynEGFP Δ 155 in *Drosophila* mittels des UAS/Gal4- Systems etabliert (siehe Kapitel V.3). Nach ubiquitärer Expression des WTsynEGFP Δ 155- Transgens (*UAS- SynT13*) unter der transkriptionellen Kontrolle des *actin*- Promotors können auf Westernblots zwei α -Syn- Spezies bei Größen von ca. 30kDa beziehungsweise ca. 25kDa detektiert werden (Abbildung 47).

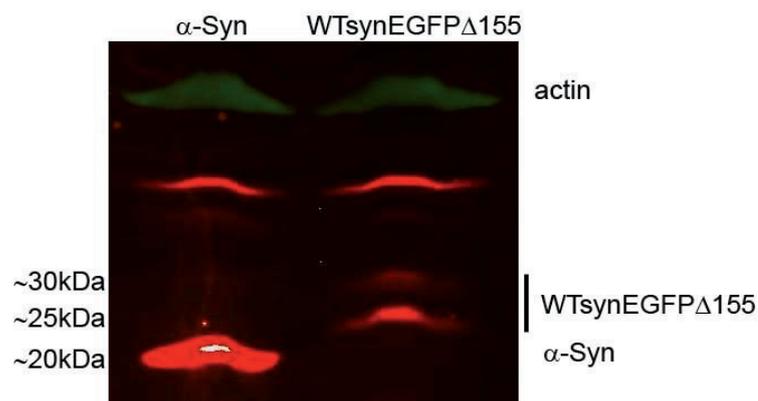


Abbildung 47: Ubiquitäre Expression von α -Syn und WTsynEGFP Δ 155: α -Syn: *actin-Gal4/UAS- α -Syn*;
WTsynEGFP Δ 155: *actin-Gal4/UAS-SynT13*

Möglicherweise handelt es sich bei der kleineren WTsynEGFP Δ 155- Spezies um ein Abbauprodukt der 30kDa Ausgangsform. Auffällig ist, dass die für diese Arbeit hergestellte *UAS-SynT13* Expressionslinie weniger Protein produziert als die *UAS- α -Syn*- Linie. Der Grund hierfür könnte sein, dass die humane Kozak- Sequenz des Transgens für die Translationsmaschinerie der Arthropoden nicht richtig kompiliert ist (Kozak, 1986; Cavener, 1987; Feng *et al.*, 1991).

Die Expressionsmenge ist jedoch ausreichend, um positive immunhistochemische Färbungen gegen WTsynEGFP Δ 155 durchzuführen. Wird WTsynEGFP Δ 155 panneural unter der Kontrolle des *elav*- Promotors exprimiert, so sind nach 40- tägiger Alterung Aggregate identifizierbar (Abbildung 48A, B). Vor allem in den dorsomedialen Cortices finden sich viele Zellen, die zum Teil mehrere hoch α -Syn immunreaktive

zytoplasmatische Aggregate aufweisen. Obwohl das α -Syn- Konstrukt wesentlich stärker exprimiert wird, zeigen die betreffenden Neurone in den Gehirnen der Kontrolltiere lediglich schwache und diffuse anti- α -Syn Färbung. Dieser Befund deshalb auch überzeugend, da der Hauptanteil nativen α -Synucleins in den Axonen lokalisiert ist und so für die Aggregation im Zytoplasma nicht zur Verfügung steht. Im dem hier beschriebenen Experiment zeigen die dorsomedialen Cluster den prominentesten Phänotyp. Allerdings können nach panneuraler Expression von WTsynEGFP Δ 155 auch Aggregate in anderen Bereichen des Cortex beobachtet werden.

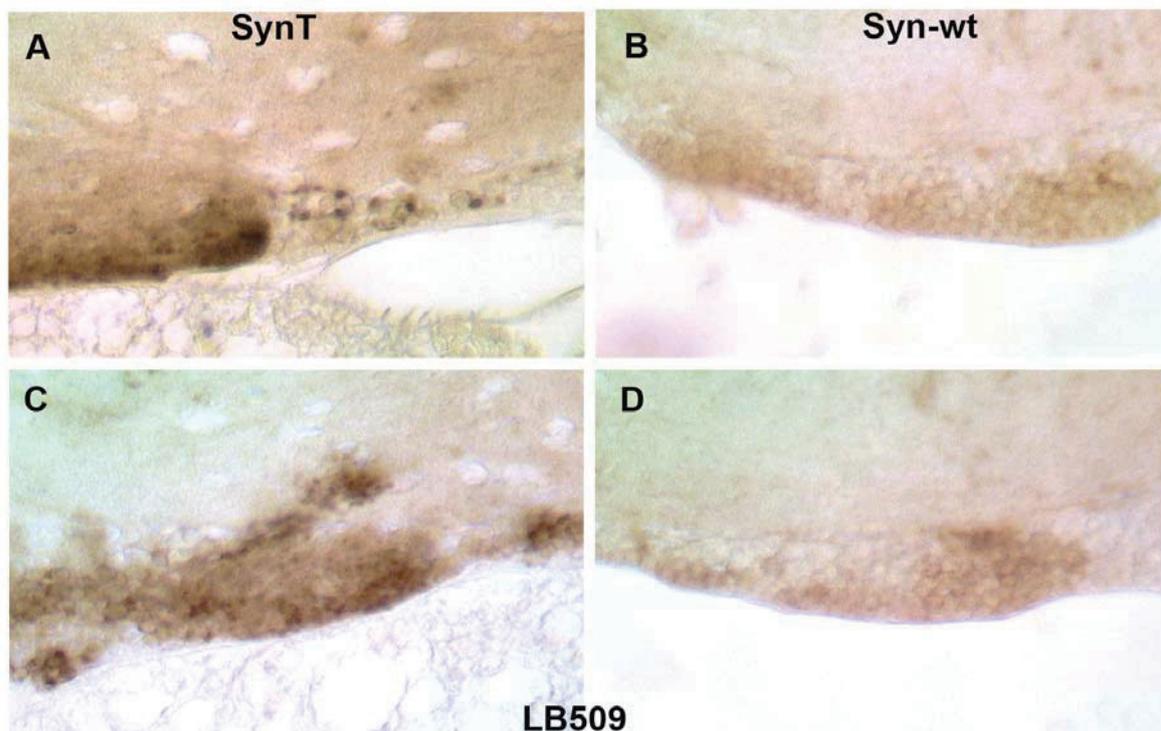


Abbildung 48: Aggregation von WTsynEGFP Δ 155 in den Zellen der dorsomedialen Cortices 40 Tage alter Fliegen nach panneuraler Expression: ABC-HRP gefärbte Paraffinschnitte durch die Gehirne fünf Tage alter Fliegen:

A, C: *elav-gal4/y; UAS-SynT13/+*

B, D: *elav-Gal4/y; UAS- α -Syn/+*

Die Gewebeschnitte zeigen zwar, dass WTsynEGFP Δ 155 allgemein in der Lage ist, in *Drosophila*- Neuronen zu aggregieren, erlauben aber keine Aussage, ob die Aggregation auch in dopaminergen Neuronen stattfindet. Um dies zu klären, wurde WTsynEGFP Δ 155 zusammen mit zytoplasmatisch lokalisiertem GFP in dopaminergen Neuronen getrieben. Dabei kam eine modifizierte WTsynEGFP Δ 155- Responderlinie zum Einsatz, deren cDNA vor dem Startcodon anstatt der humanen eine invertebrate Kozak-Konsensussequenz aufweist (*UAS-SynT- Δ IK*). Damit kann die Translationsmaschinerie der Invertebraten besser angesprochen und die Produktion größerer WTsynEGFP Δ 155-Mengen erreicht werden (Härtinger, 2008).

Bei der Expression von WTsynEGFP Δ 155 in dopaminergen Neuronen sind im Alter von acht Tagen zytoplasmatische α -Syn- immunreaktive Aggregate in den Zellen der dopaminergen Cluster PPL1, PPM1/2 und PPM3 nachweisbar (Abbildung 49A, B, C). Manche Zellen dieser Cluster haben zu diesem Zeitpunkt bereits mehrere individuelle Einschlusskörperchen ausgebildet. Teilweise bilden Anhäufungen mehrerer Aggregate Überstrukturen aus, die größere Areale des Zytoplasmas einnehmen (Abbildung 49D, E, F). In den restlichen Clustern des dopaminergen Systems treten weniger und kleinere Aggregate auf. Beispielsweise konnten im Großteil der Zellen des PAL- Clusters zu diesem Zeitpunkt keine Aggregate beobachtet werden.

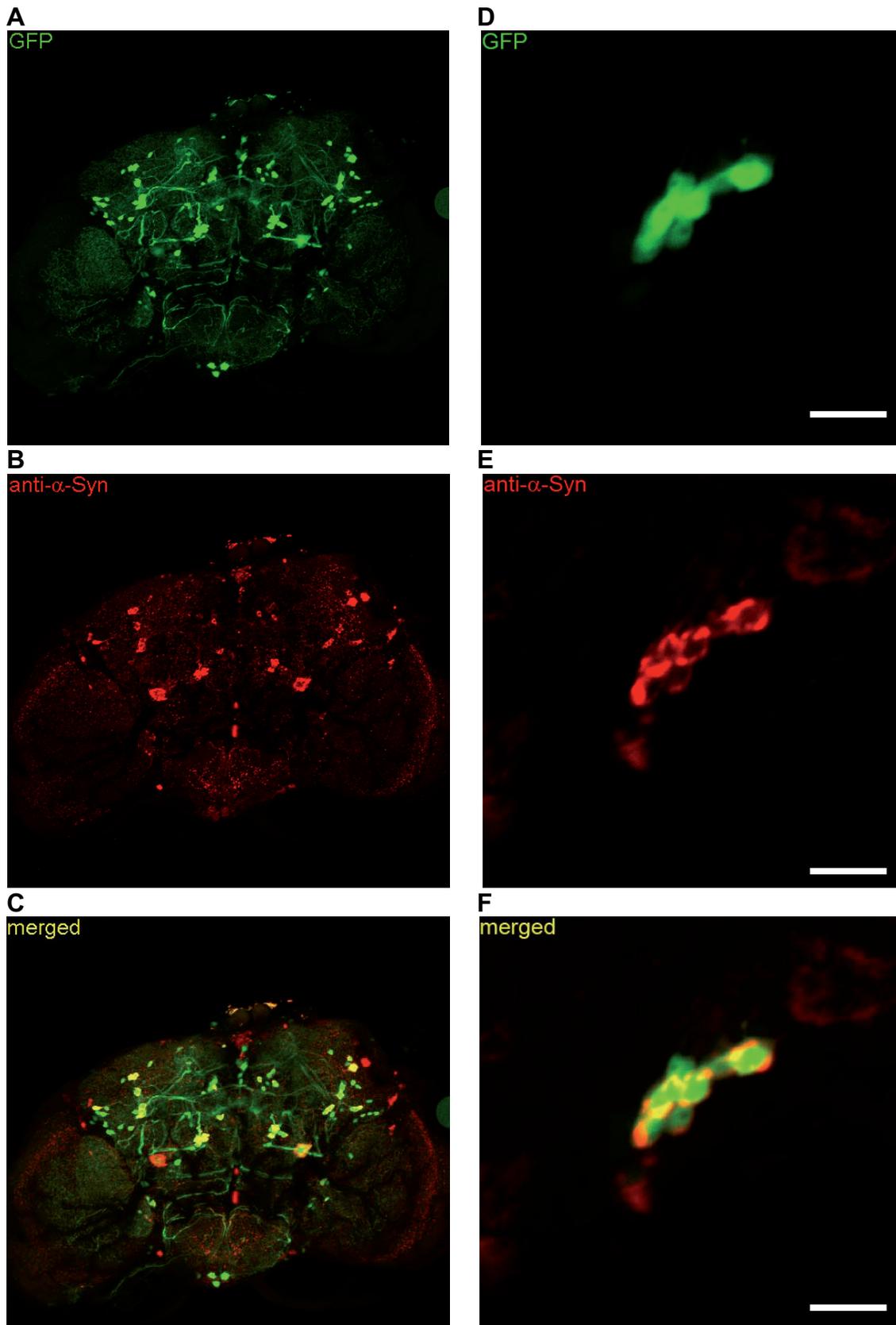


Abbildung 49: Aggregation von WTsynEGFP Δ 155 in dopaminergen Neuronen: konfokalmikroskopische Aufnahmen von anti- α -Syn-Färbungen an Gehirn- Wholemounts acht Tage alter Fliegen des Genotyps *UAS-GFP/+; Th-Gal4/UAS-SynT-IK*:

A, B C: WTsynEGFP Δ 155- Aggregate im dopaminergen System

D, E, F: WTsynEGFP Δ 155- Aggregate in den Zellen des PPM3- Clusters. Die Balken entsprechen 10µm.

3.3 Auswirkungen von Rotenon und Paraquat auf die Aggregation von WTsynEGFP Δ 155

In den vorhergehenden Teilen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Toxizität von α -Syn, Rotenon und teilweise auch Paraquat durch Entfernung zytosolischer ROS verringert werden kann. So ist die Frage, ob oxidativer Stress auch eine Rolle bei der Aggregation von α -Syn spielt, nahe liegend. Um eine Antwort auf diese Frage zu erhalten, wurden die oben beschriebenen Fliegen mit Rotenon und Paraquat behandelt und anti- α -Syn-Färbungen an den Gehirnen vorgenommen.

Um Einzelaggregate im Konfokalmikroskop zu identifizieren, war es nötig sehr hohe Auflösungswerte zu erreichen. Aus diesem Grund wurde der PPM3- Cluster als Umgebung für die Analyse der Aggregationsrate gewählt. In diesem Cluster bilden sich bei WTsynEGFP Δ 155- Expression auch unter Standardbedingungen Aggregate aus. Dabei muss berücksichtigt werden, dass durch Rotenon und Paraquat in diesem Cluster Degeneration dopaminerger Neurone ausgelöst wird (Abbildung 50), so dass die Ermittlung der absoluten Aggregat- Anzahl pro Cluster unter Umständen nicht zum korrekten Ergebnis führt.

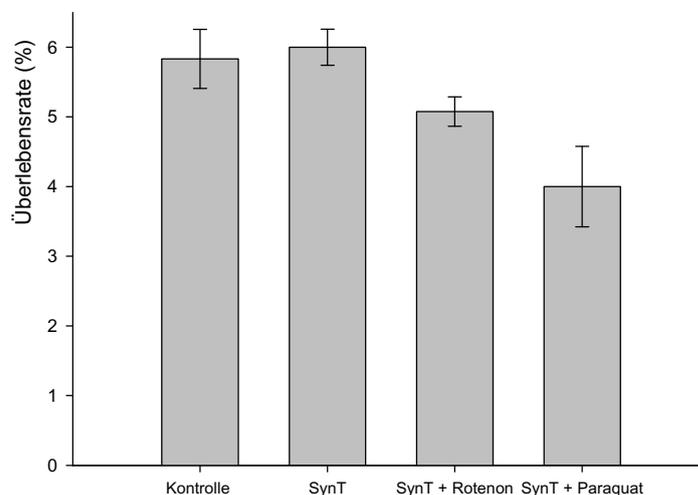


Abbildung 50: Verlust dopaminerger Neurone des PPM3-Clusters durch Rotenon- und Paraquatstress: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+* (n=12) 8 Tage Saccharose; SynT: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/SynT-IK* (n=6) 8 Tage Saccharose; SynT + Rotenon: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/SynT-IK* (n=14), 3 Tage Saccharose + 5 Tage Rotenon; SynT + Paraquat: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/SynT-IK* (n=6), 5 Tage Saccharose + 3 Tage Paraquat.

Darum wurde stattdessen der Quotient aus der Anzahl der Aggregate pro Cluster durch die Anzahl der überlebenden Zellen ermittelt. Konglomerate mehrerer individueller Einschlusskörperchen wurden dabei als ein einziges Aggregat gewertet.

Das Ergebnis zeigt, dass die Aggregation im PPM3- Cluster durch Rotenon und Paraquat beschleunigt wird (Abbildung 51).

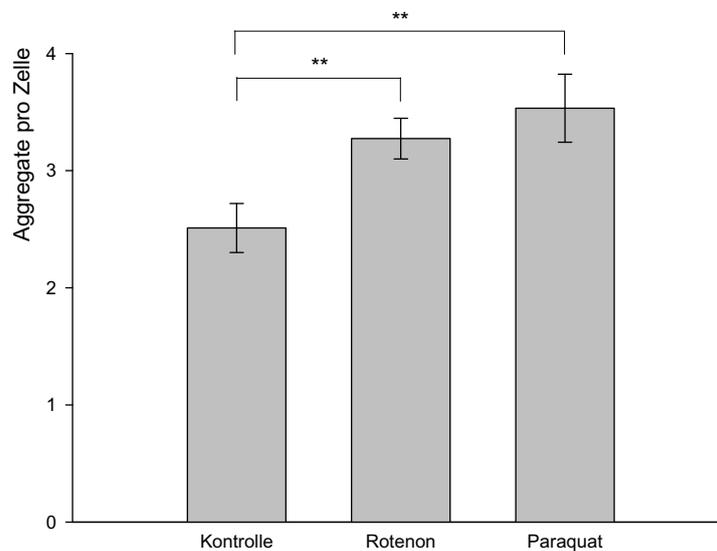


Abbildung 51: Quantifizierung von Aggregaten in PPM3-Zellen: *UAS-GFP/+; Th-Gal4/UAS-SynT-1K* Kontrolle: 8 Tage Saccharose (n= 36); Rotenon: 3 Tage Saccharose + 5 Tage Rotenon (n= 22); Paraquat: fünf Tage Saccharose + 3 Tage Paraquat (n= 12), *p< 0,01.

Zellen des PPM3- Clusters acht Tage alter Tiere, die auf Standardmedium gehalten wurden, haben durchschnittlich zwei bis drei Einschlusskörper pro Zelle (Abbildung 52A). In gleichaltrigen Tieren können nach fünftägiger Rotenon- oder dreitägiger Paraquatbehandlung drei bis vier, teilweise sogar fünf individuelle Aggregate pro Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 52B, C).

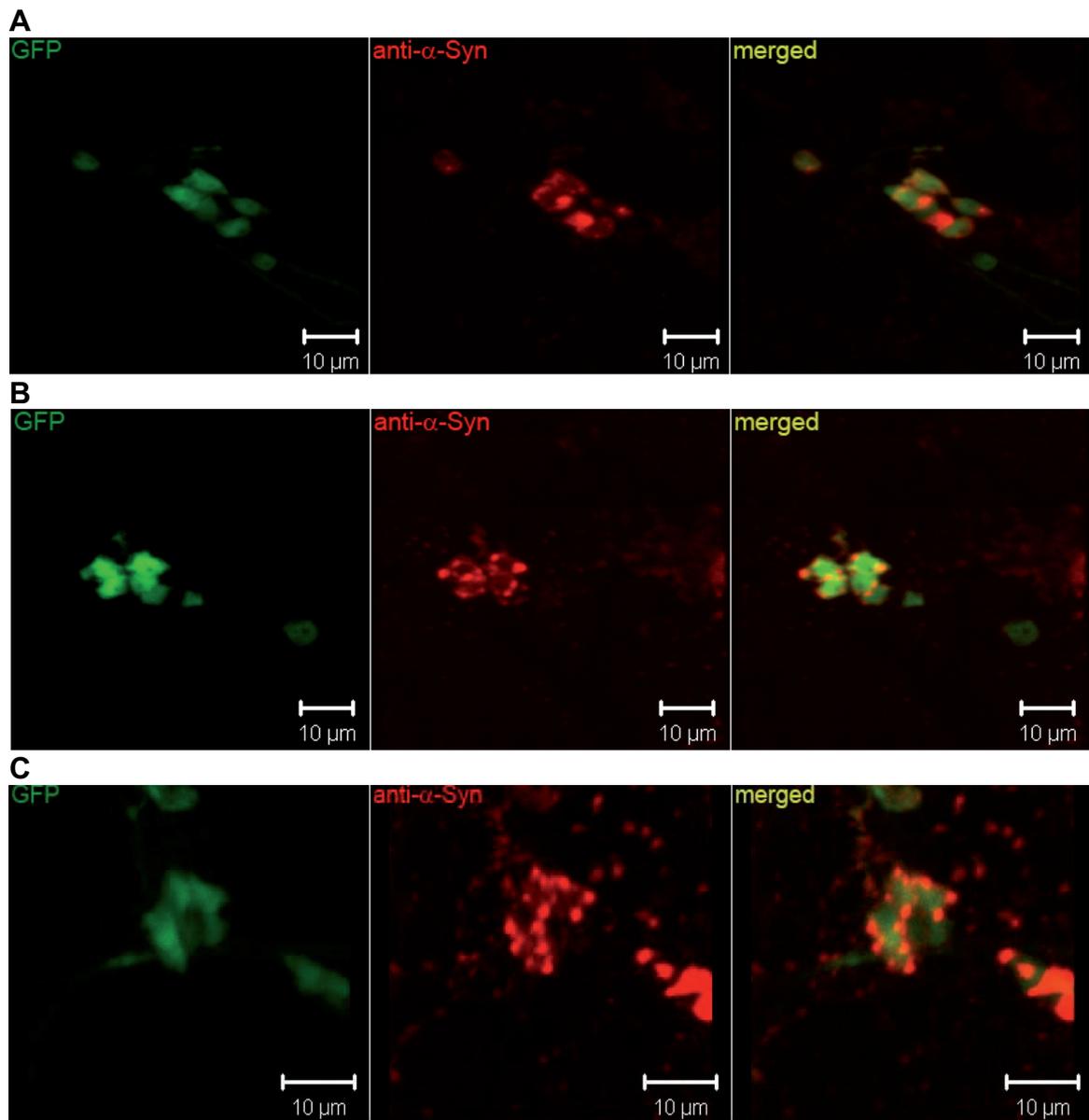


Abbildung 52: Verstärkung der WTsynEGFP Δ 155- Aggregation durch Rotenon und Paraquat in dopaminergen Neuronen des PPM3- Clusters: konfokalmikroskopische Aufnahmen der dopaminergen Neurone der PPM3- Cluster acht Tage alter Fliegen des Genotyps *UAS-GFP/+; Th-Gal4/UAS-SynT-1K*

A: unbehandelt

B: fünf Tage 5 μ M Rotenonbehandlung

C: drei Tage 20mM Paraquatbehandlung

Kapitel IV: Diskussion

1. Dopamin, oxidativer Stress und α -Syn- Toxizität

1.1 α -Syn- Toxizität in *Drosophila*

Die PD wurde über einen langen Zeitraum hinweg als rein sporadisch auftretende Krankheit angesehen. Erst, als hinter familiär erhöhtem Risiko an einer juvenilen Form der PD zu erkranken, ein dominanter Erbgang erkannt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass sowohl sporadische wie auch genetische Ursachen der Krankheit existieren. Der erste entdeckte PD- Erbgang beruht auf Mutationen im SNCA-Lokus (α -Syn- Gen) oder auf dessen Triplikation (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998; Singleton *et al.*, 2003).

In *Drosophila* ist die Expression von humanem α -Synucleins toxisch und führt zu altersabhängigem Verlust dopaminergener Neurone (Feany und Bender, 2000, Auluck *et al.*, 2002, Trinh *et al.*, 2008). Obwohl von α -SynA30P und α -SynA53T aufgrund ihrer Rolle bei der juvenilen PD zu erwarten wäre, höhere Degenerationsraten auszulösen, wird ihnen in den ursprünglichen Veröffentlichungen eine mit α -Syn äquivalente Toxizität zugeschrieben (Feany und Bender, 2000, Auluck *et al.*, 2002). Die Quantifizierungen in oben genannten Studien wurden lichtmikroskopisch an Gefrierschnitten durch ABC-HRP- Färbungen gegen TH vorgenommen. Dieses Vorgehen ist ausreichend, um Zellverluste zu beobachten, aber unter Umständen nicht exakt genug, um graduelle Unterschiede zu erkennen. Zum einen ist es generell schwierig, mit histologischen Schnitten genaue Zellquantifizierungen vorzunehmen, zum anderen können die entstehenden Signale bei dieser Methode selbst bei geringen Unregelmäßigkeiten im Färbeprotokoll stark fluktuieren. Zudem beschränken sich diese Studien auf die Analyse eines nicht näher definierten dorsomedialen TH- positiven Zellverbandes und nicht etwa auf die Analyse des gesamten dopaminergen Systems im Gehirn.

Aus diesem Grund wurden die Gehirne komplett als *Wholemout* konfokalmikroskopisch analysiert und die dopaminergen Neurone durch die Expression eines nukleären GFP- Reporters markiert. Diese Methode erfasst das dopaminerge System als ganzes ohne den Einsatz immunhistochemischer Methoden und ermöglicht außerdem die Anwendung eines maschinengestützten Auswertungsverfahrens. Durch die punktuellen und scharf begrenzten Signale des nukleären GFP- Reporters ist es möglich Einzelsignale maschinengestützt zu diskriminieren und zu quantifizieren.

Dadurch konnte einerseits altersabhängige Degeneration dopaminerger Neurone durch Expression von α -Syn, α -SynA30P und α -SynA53T nachgewiesen werden, andererseits ermöglichte das höhere Auflösungsvermögen der eingesetzten Methode tiefere Einblicke in die Auswirkungen der α -Syn- Expression. So konnte beobachtet werden, dass die Expression der beiden mutierten Formen zu wesentlich höheren Degenerationsraten als die Expression der wildtypischen Form des Proteins führt. Auf das gesamte dopaminerge System bezogen scheint wildtypisches α -Syn lediglich schwach toxisch zu wirken und hat nach 40 Tagen einen durchschnittlichen Verlust von ca. 20% der Neurone zu Folge. Die α -SynA30P- und α -SynA53T- Expression führt im gleichen Zeitraum zu Verlusten von 35% (α -SynA53T) und 45% (α -SynA30P) der Zellen. Da bei α -SynA30P schon nach kürzerer Alterungszeit mehr Zellverlust registriert wurde als bei α -SynA53T ist davon auszugehen, dass es sich bei α -SynA30P, zumindest in *Drosophila*, um die am stärksten toxische α -Syn- Form handelt.

In keinem Fall führte die Expression eines der α -Synucleine zu totalem Verlust der dopaminergen Neurone. Zudem lässt sich aus den Daten ablesen, dass sich zumindest bei α -SynA30P die anfängliche Degenerationsrate bei längerer Alterung zu verringern scheint. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass eine Subpopulation dopaminerger Neurone existiert, in denen die α -Syn- Expression nicht oder weniger toxisch ist.

In der Literatur divergieren die Angaben zu den Verlustzahlen dopaminerger Neurone durch α -Syn- Expression von 100% (Feany und Bender, 2000) über 50% (Auluck *et al.*, 2002) und 30% (Trinh *et al.*, 2008) bis 10% (Pesah *et al.*, 2005). Diese Arbeiten haben gemeinsam, dass lediglich ein kleiner Ausschnitt des dopaminergen Netzwerks begutachtet wurde. Da wildtypisches α -Syn weniger toxisch ist und manche dopaminerge Neurone offensichtlich unempfindlich gegenüber der α -Syn- Toxizität sind, ist es durchaus möglich, dass bei derart eingeschränktem Blickwinkel nur sehr geringe Degeneration beobachtet wird. Genauso ist es möglich, dass die teilweise beschriebene 100%-ige Degeneration auf methodisch bedingte Überinterpretation zurückzuführen ist, die entweder aus unvollständigen Schnittserien oder der Detektion dopaminerger Neurone durch die Färbung gegen TH resultieren. Beispielsweise ist es denkbar, dass dopaminerge Neurone die Expression der TH einstellen bevor der Zelltod eintritt. In einer solchen Situation könnten noch lebendige Zellen durch anti-TH- Färbungen nicht mehr detektiert werden.

Die hier vorliegenden Daten decken sich am besten mit denjenigen von Trinh *et al.*, (2008), stehen aber auch nicht im Widerspruch zu den restlichen Veröffentlichungen. Vielmehr stellen sie eine methodisch bedingte Verfeinerung des bisherigen Bildes dar. So konnte durch diese Verbesserungen auch erstmals differentielle Toxizität der verschiedenen α -Syn- Formen in *Drosophila* beobachtet werden.

Wie bereits Eingangs beschrieben beruht die erhöhte Toxizität von mutantern α -SynA30P und α -SynA53T auf einem toxischen *gain-of-function* Mechanismus (Rajagopalan und Andersen, 2001; Eriksen *et al.*, 2003). Zumindest im Fall von α -SynA30P ist das Ansteigen der Toxizität durch Strukturveränderungen am Protein erklärbar. In Lösung bildet α -Syn keine definierten Sekundärstrukturen aus. Erst beim Kontakt mit Membran-Phospholipiden formen sich am N-Terminus zwei antiparallele α - Helices. Der Vergleich der NMR-Strukturen von Micellen- assoziiertem α -Syn, α -SynA30P und α -SynA53T zeigt Veränderungen an der zweiten N- terminalen α -Helix des Proteins. Durch den Austausch von Alanin durch Prolin an Stelle 30 wird deren eigentlich stringent fortlaufende Struktur durch die Einführung eines Prolin- Turns unterbrochen. Die Mutation an Stelle 53 liegt ebenfalls innerhalb der zweiten α -Helix. Dieser Austausch von Alanin durch Tyrosin wirkt sich lediglich auf die direkte Nachbarschaft der ausgetauschten Aminosäure aus und hat keine Strukturveränderungen des *Backbone* zur Folge (Ulmer *et al.*, 2004; Ulmer und Bax, 2005). Interessanterweise wurde schon vorher beobachtet, dass humanes α -SynA30P im Gegensatz zu wildtypischem α -Syn nicht an Transportvesikel binden kann und darum wahrscheinlich nur schlecht in den Axonen kultivierter Neurone transportiert wird (Jensen *et al.*, 1998, Saha *et al.*, 2004). In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein ähnlicher Effekt erstmals *in vivo* beobachtet werden. Immunhistochemische Färbungen gegen α -Syn zeigen, dass bei panneuraler Expression wildtypische und A53T- Form des Proteins ausschließlich in den Axonen lokalisiert sind. α -SynA30P dagegen ist im Großteil der Neurone sowohl im Axon als auch im Zellkörper zu finden.

Es ist denkbar, dass nach mutationsbedingten Strukturveränderungen in α -SynA30P die Lipidbindung des Proteins verloren geht, was zur Akkumulation ungefalteter α -SynA30P- Monomere im Zytosol führt. Bei genügend hoher Monomerkonzentration ist es möglich, dass diese auch *in vivo* zu den oftmals *in vitro* beschriebenen α -Syn-Oligomeren, Protofibrillen und Fibrillen kondensieren. *Lewy- Bodies* stellen das

Endprodukt dieses Aggregationsprozesses dar. Noch ist unklar, ob *Lewy- Bodies* an sich toxisch sind, oder ob sie mehr oder weniger chemisch inerte Endlager für fehlgefaltete Proteine darstellen (Volles und Lansbury, 2003). Mittlerweile deuten aber mehrere Studien darauf hin, dass Protofibrillen die eigentlich toxische α -Syn- Spezies sind. (Galvin, 2006) Auch die Daten die in dieser Arbeit gesammelt wurden unterstützen diese Hypothese: obwohl die Expression von α -Syn, α -SynA30P oder α -SynA53T zur Degeneration dopaminergener Neurone im ZNS von *Drosophila* führt, konnten in keinem Fall Aggregate identifiziert werden (siehe auch Kapitel V, Abschnitt 3).

Der toxische *gain-of-function* Mechanismus von α -SynA30P kann also zumindest theoretisch durch Synthese von Literaturinformationen und den Ergebnissen dieser Arbeit erklärt werden. Im Fall von α -SynA53T ist dies bis dato nicht ohne weiteres möglich. Zwar konnten bei α -SynA53T, genau wie bei α -SynA30P, *in vitro* höhere Fibrillisationsraten als bei humanem wildtypischem α -Syn beobachtet werden (Conway *et al.*, 2000), jedoch konnte dies bis jetzt nicht direkt mit mutationsbedingten Veränderungen am Protein korreliert werden. Allerdings gelang es Moussa *et al.* (2007) die Aggregation von α -SynA53T *in vitro* durch DA zu verstärken. Erschwerend kommt hinzu, dass α -SynA53T die natürliche α -Syn- Form der Nager ist (Johnson, 2000). Darum sind Mausmodelle für die Untersuchung des A53T- *gain-of-function* möglicherweise nicht gut geeignet.

α -Syn kann im menschlichen Gehirn weiträumig nachgewiesen werden. Trotzdem sind sowohl bei sporadischer als auch hereditärer PD hauptsächlich die dopaminergen Neurone der SNpc von der Degeneration betroffen. Bei panneuraler Expression von α -Syn sind im Lichtmikroskop nur wenige, allerdings auffällig bilateralsymmetrisch lokalisierte, Zellen apoptotisch. Auch durch gezielte α -SynA30P- Expression in den nicht dopaminergen sLNv- Clustern wird kein Zellverlust ausgelöst. Da alle Tiere über den ganzen Beobachtungszeitraum hinweg mit der *pdf-Gal4*- Treiberlinie starke Expression des RFP- Reporters zeigen, ist davon auszugehen, dass das Ausbleiben der Degeneration nicht auf zu geringe α -SynA30P- Mengen zurückgeführt werden muss.

Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass speziell sLNvs höhere Toleranz gegenüber α -SynA30P besitzen. Andererseits wurde an *Drosophila* auch beobachtet, dass dopaminerge Neurone unter Rotenon schneller degenerieren als serotonerge Neurone (Coulom und Birman, 2004). Möglicherweise sind dopaminerge Neurone aufgrund

spezieller Zelleigenschaften sensitiver gegenüber neurotoxischen Agenzien oder α -SynA30P.

1.2 Anfälligkeit dopaminerger Neurone gegenüber oxidativem Stress

Die Anzahl der medizinischen Studien, die oxidativem Stress sowohl bei allgemeiner Neurodegeneration als auch speziell bei der PD eine wichtige Rolle zuordnen steigt ständig an (aktuelle Übersichtsartikel: Sayre *et al.*, 2008; Chinta und Andersen, 2008). Um diese Hypothese in *Drosophila* zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit Bedingungen erzeugt, unter denen die Fliegen erhöhtem oxidativem Stress oder einer erhöhten Akkumulation oxidativer Schäden ausgesetzt waren. Als Für die Erzeugung oxidativer Schäden wurde einerseits Hyperoxie eingesetzt, was sich bereits als geeignetes Mittel erwiesen hat, um in *Drosophila* allgemeine Neurodegeneration auszulösen. Parallel dazu wurde die altersabhängige Akkumulation oxidativer Schäden durch Einkreuzen der *sni¹*-Mutation provoziert. *Sni* codiert für ein Enzym mit Carbonylreduktase- Funktion, das für die Reparatur oxidativer Schäden benötigt wird (Botella *et al.*, 2004; Grünewald, 2006). Das dopaminerge System zeigt unter Hyperoxie deutliche Degenerationserscheinungen. Die Tiere überleben bis zu neun Tagen in der Sauerstoffatmosphäre und verlieren dabei im Durchschnitt 30% ihrer dopaminergen Neurone. Außerdem zeigen Fliegen, die die *sni¹*- Mutation tragen auch unter atmosphärisch normalen Bedingungen altersabhängige Degeneration von bis zu 50% dieser Zellen. Zusammen beweisen beide Experimente, dass massiver oxidativer Stress oder der Ausfall eines Reparaturmechanismus für oxidative Schäden zum Tod dopaminerger Neurone führt.

Auch hierbei scheinen dopaminerge Neurone vergleichsweise anfällig zu sein. sLNvs erweisen sich auch gegenüber Hyperoxie wiederum als wesentlich resistenter. An dieser Stelle sei allerdings darauf hingewiesen, dass unter Hyperoxie sicherlich nicht nur dopaminerge Neurone sterben. Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass die Sauerstoffbehandlung teilweise in katastrophaler, schwammartiger Zersetzung des Gehirns gipfelt, von der auch Gehirnregionen wie Lamina und Medulla betroffen sind, in denen keine dopaminergen Neurone liegen (siehe Abbildungen in Grünewald 2002; 2006). Als Schlussfolgerung bietet sich an, dass verschiedene Neuronentypen unterschiedliche Sensitivität gegenüber oxidativem Stress aufweisen. Dopaminerge Neurone sind offensichtlich besonders sensitiv. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass dopaminerge Neurone aufgrund ihres Catecholamin- Metabolismus von vorneherein erhöhter oxidativer Belastung ausgesetzt sind. DA ist an sich ungiftig, jedoch können

unter oxidierenden Bedingungen daraus toxische DA- Derivate wie DA- Quinone, Dopaminochrom und Adrenochrom entstehen. Dopaminochrom und Adrenochrom können weiter oxidieren und Neuromelanin bilden, während DA- Quinone mit L- Cystein auch zu 5- S- Cystenyl- DA weiterreagieren können. Dies führt einerseits zur Produktion von Quinoproteinen, wodurch diese Proteine redoxaktiv werden und ihre Enzymfunktion gestört wird (Asanuma *et al.*, 2004). Weitere Oxidationsschritte führen zur Bildung von DHBT-1¹⁰ (Zhang und Dryhurst, 1994, Shen und Dryhurst, 1996), welches die mitochondriale Außenmembran durchdringen kann und die NADH : Ubichinon-Oxidoreduktase des Komplex I effektiv und irreversibel hemmt (Li und Dryhurst, 1997). Dadurch wird der Schaden an den dopaminergen Neuronen noch weiter verstärkt, da durch die Entkopplung der Atmungskette noch mehr schädliche $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale produziert werden (Abbildung 53).

Da dopaminerge Neurone hinsichtlich der Toxizität von α -Syn interessanterweise ähnliche Attribute wie hinsichtlich der Toxizität von oxidativem Stress aufweisen, drängt sich die Frage auf, ob α -Syn und oxidativer Stress synergetisch zusammenwirken können.

1.3 Synergetische Neurotoxizität von α -Syn und Dopamin

Wenn Mutationen in *SNCA* beim Menschen hauptsächlich zur Degeneration dopaminergener Neurone führen und bevorzugt diese bei der spontanen Form der PD aufgrund zellphysiologisch bedingter erhöhter Belastung durch oxidativen Stress absterben, könnte es möglich sein, dass die Reaktionspfade, die zur Degeneration führen in beiden Fällen ähnlich oder miteinander verwoben sind.

Die Kombination beider Degenerationsmodelle gestaltet sich relativ einfach, da lediglich Fliegen, die α -Syn in dopaminergen Neuronen exprimieren der Hyperoxie ausgesetzt werden müssen. Dabei kann tatsächlich beobachtet werden, dass sich die Toxizität von oxidativem Stress und mutierten α -Syn- Varianten gegenseitig verstärken, während wildtypisches α -Syn die Degenerationsrate der dopaminergen Neurone unter Hyperoxie nicht beschleunigt.

Diese Daten bedeuten, dass die Neurodegeneration bei hereditären α -Syn- abhängigen PD- Varianten und der sporadischen PD möglicherweise auf denselben grundlegenden Mechanismen beruht. Darum kommen auch hier vor allem DA- Metabolite als Mediatoren der α -Syn- Toxizität in Frage.

¹⁰ 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-Benzothiazin-3-Kohlensäure

Zumindest bei α -SynA30P könnte verstärkte Protofibrillenbildung allein durch den fehlerhaften zellulären Transport und der daraus resultierenden Akkumulation möglich sein. Conway und Kollegen beobachteten außerdem *in vitro*, dass α -SynA30P und α -SynA53T schneller Protofibrillen bilden, die zudem stabiler sind als die Protofibrillen des wildtypischen α -Synucleins (Conway et al., 1998; Conway *et al.*, 2000). In der Annahme, dass Protofibrillen den eigentlich toxischen α -Syn Aggregatzustand darstellen, wurden verschiedene hypothetische Szenarien erdacht, bei denen sie für die Disruption synaptischer Vesikel verantwortlich gemacht werden, was verstärkte DA- Freisetzung ins Zytosol zur Folge haben würde (Volles *et al.*, 2001; Lotharius und Brundin, 2002; Volles und Lansbury, 2003). Auf diese Art und Weise wird eine Kaskade in Gang gesetzt, bei der oxidiertes DA (Conway *et al.*, 2001) oder ein DA- Metabolit die α -Syn-Protofibrillen stabilisiert und so eine toxische Rückkopplung auslöst. Die wahrscheinlichsten Kandidaten für diese Protofibrillen stabilisierenden DA- Derivate sind DA- Quinone (DAQ) und der MAO- Metabolit DOPAL¹¹ (Burke *et al.*, 2003). Beide können die Oligomerisierung von α -Syn stimulieren und Protofibrillen stabilisieren (Burke *et al.*, 2008).

Dieser Mechanismus (Abbildung 53) wird durch oxidativen Stress stark beschleunigt. DOPAL ist zwar schon in geringen Konzentrationen hochgiftig, es wird jedoch unter normalen Bedingungen von einer NAD- abhängigen Aldehyddehydrogenase (ALDH) rasch zu ungiftigem DOPAC abgebaut. Unter oxidativen Bedingungen ist jedoch wie oben beschrieben der mitochondriale Komplex I durch die Überproduktion an DAQ beziehungsweise DHBT-1 gehemmt, was nicht nur die $\cdot\text{O}_2^-$ - Produktion anregt, sondern auch zu einem NAD- Mangel führt. Dadurch wird der Abbau von DOPAL zu DOPAC verzögert und damit die α -Syn- Oligomerisierung weiter befördert (Galvin, 2006).

¹¹ 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd

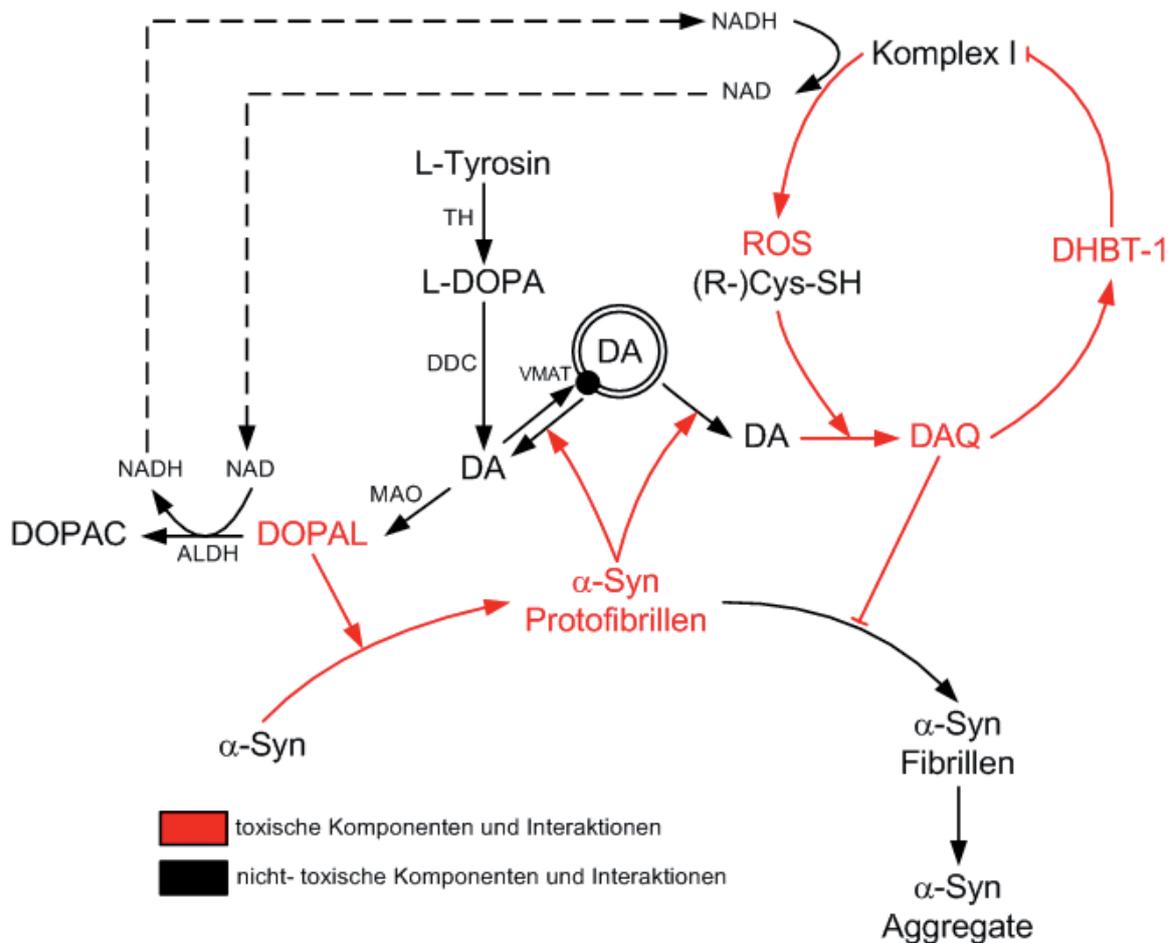


Abbildung 53: hypothetischer Mechanismus der synergetischen Toxizität von α -Syn und oxidativem Stress: (R)-Cys-SH: L- Cystein oder Cysteinrest; DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylacetat. Erläuterungen im Text.

Natürlich ist dies eine relativ einfache Modellvorstellung einer multifaktoriellen Pathologie wie derjenigen der PD. So fehlen in der hier präsentierten Hypothese wichtige Gesichtspunkte, wie beispielsweise die Schädigung des proteasomalen Proteinabbaus durch PD- assoziierte Mutationen in *parkin* oder *UHCL-1*, des verzögerten α -SynA30P-Abbaus am Lysosom oder auch Fehlfunktionen der mitochondrialen Stressreaktion durch Mutationen in *pink*. Allerdings würden sich auch diese Faktoren zumindest theoretisch mit der vorliegenden Modellvorstellung verweben lassen. Beispielsweise könnte ineffizienter α -Syn- Abbau am Proteasom oder Lysosom zur Anreicherung protofibrillärer Spezies beitragen. Fehlfunktionen der Mitochondrien könnten andererseits die oxidative Belastung verstärken. Beide Dysfunktionen würden das System lediglich aus anderen Stoßrichtungen heraus aufschaukeln lassen bis der Zelltod am Ende entweder durch übermäßige Schädigung multipler zellulärer Komponenten oder die Aktivierung apoptotischer Signalwege eintritt.

Dieser theoretische Hintergrund erlaubt zusammen mit den Daten dieser Arbeit zumindest die Schlussfolgerung, dass das toxische Potential von α -SynA30P und α -

SynA53T proportional zur oxidativen Belastung des Zytoplasmas ansteigt, und diese Stressbelastung ständig durch α -Syn selbst erhöht wird. Bei der eigentlichen PD laufen diese Vorgänge langsamer ab, da meist die beschleunigende Wirkung eines oxidativen Stressors fehlt.

1.4 Detoxifizierung von α -SynA30P

Um die Hypothese der ROS- abhängigen α -Syn- Toxizität zu verifizieren wurde mit verschiedenen Strategien versucht, die oxidative Belastung der Zellen oder dadurch entstandene Schäden zu reparieren.

Sniffer hat in *Drosophila* eine putative Funktion bei der Antwort auf oxidativen Stress. Der Verlust des Gens führt zu Hyperoxie- Hypersensitivität, seine ubiquitäre Überexpression erhöht die Lebenserwartung der Tiere unter Hyperoxie. Dies zeigt, dass Sniffer wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der zellulären Stressantwort einnimmt (Botella *et al.*, 2004). Darum könnte es auch möglich sein, die Auswirkungen der α -Syn Expression durch Sniffer- Koexpression abzumildern.

Die Experimente aus dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die Expression von Sniffer die α -SynA30P- induzierte Degeneration dopaminergener Neurone nicht aufhalten kann. Dies bedeutet, dass bei α -Syn andere Mechanismen als bei der Neurodegeneration in *sni*- Mutanten zum Tragen kommen. Falls das oben postulierte Modell zutreffend ist, ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich, da protektive Interaktionsmöglichkeiten dünn gesät wären. Keiner der im Modell als toxisch angesehenen DA- Metabolite ist ein bekanntes Substrat der putativen Carbonylreduktase Sniffer. Damit wäre der einzige hier denkbare protektive Mechanismus die Inhibition der Protofibrillenbildung und damit eine direkte Interaktion mit α -Syn selbst. Aufgrund der ausbleibenden Protektion ist demnach zu folgern, dass diese Interaktion nicht stattfindet, oder die Toxizität von α -Syn nicht auf der Oxidation von Carbonylgruppen beruht.

Eine alternative Strategie für die Reparatur oxidativer Schäden beinhaltet die Verringerung der oxidativen Belastung α -Syn- exprimierender Zellen direkt durch Entfernung von ROS aus dem Zytoplasma. Tatsächlich war die Koexpression der hSoD1 ausreichend, um dopaminerge Neurone, die α -SynA30P exprimieren weitgehend zu retten. Die dopaminergen Neurone überstehen die α -SynA30P- Expression trotz langer Alterung und auch die Kletterfähigkeit der Fliegen ist nicht so stark eingeschränkt wie bei

Tieren, die nur α -SynA30P exprimieren. Im Gegensatz zu Sniffer ist die hSoD1 in der Lage, an mehreren Stellen gleichzeitig in die degenerative Kaskade in dopaminergen Neuronen einzugreifen. hSoD1 ist ein Radikalfänger, der die ROS- Mengen hauptsächlich durch die Protonierung von $\cdot\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 verringert. Eine weitere Funktion der hSoD1 ist, dass sie auch als Semiquinon- Fänger agieren kann (Emdadul Haque *M et al.*, 2003). Wahrscheinlich ist der α -SynA30P-detoxifizierende Effekt der hSoD1 darauf zurückzuführen, dass die oxidative Belastung der dopaminergen Neurone allein durch die Verdünnung der $\cdot\text{O}_2^-$ während des kompletten Lebenszyklus von der Larve bis zum 40 Tage alten Adulten bedeutend vermindert ist. Dadurch akkumulieren oxidative Schäden wesentlich langsamer, was ein längeres Überleben der Zelle ermöglicht. Speziell in dopaminergen Neuronen ist außerdem davon auszugehen dass die DA- Oxidation durch den veränderten Redoxstatus in wesentlich geringerer Masse stattfindet. Entsteht trotzdem oxidiertes DA, kann es schon als Semiquinon abgefangen werden, wodurch die toxische mitochondriale Rückkopplung via DAQ und DHBT-1 neutralisiert wird. Die zweite toxische DA- Spezies, DOPAL, könnte zwar auftreten; allerdings steht nun ausreichend NAD zur Verfügung, um es via ALDH zu ungiftigem DOPAC zu reduzieren. Die Rettung der dopaminergen Neurone durch hSoD1 zeigt, dass eine direkte Verbindung zwischen oxidativem Stress und der α -Syn- Toxizität existiert. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die hSoD1 nicht nur in dopaminergen Neuronen wirkt, sondern in vielen Teilen des Organismus im Zuge der Stressantwort aktiviert aktiv sein kann. Darum ist es eher unwahrscheinlich, dass in der Natur DA- Metabolite in dopaminergen Neurone die Primärziele dieses Schutzmechanismus sind.

Die Hypothese vom Zusammenhang zwischen ROS aus dem DA- Metabolismus und α -Syn- Toxizität kann nur durch die direkte Manipulation des DA-Spiegels verifiziert werden. Wenn das Abfangen von ROS aus dem DA- Metabolismus tatsächlich ausreichend ist, um dopaminerge Neurone vor der Toxizität von α -Syn zu schützen, dann sollte es ebenso möglich sein, α -SynA30P durch die Unterdrückung der DA- Produktion zu detoxifizieren. Dafür wurden Fliegen gezüchtet, in denen die Expression des Gens *pale* in dopaminergen Neuronen durch ein RNAi- Silencing unterdrückt ist. In Larven und Köpfen konnte damit *pale*- mRNA- und TH- Mengen deutlich verringert werden. Die Tiere zeigen einen sehr deutlichen Rückgang der Körperpigmentierung, welche an den Albinismus bei Säugetieren erinnert. Auf biochemischer Ebene ist der DA- Spiegel in diesen Tieren um ca. 85% reduziert. Wird das Silencing durch Koexpression von *DicerII*

weiter verstärkt, ist kein DA mehr nachweisbar. Allerdings führt die vollständige DA- beziehungsweise TH- Defizienz ähnlich wie bei *pale*- Mutanten zu einer 90%-igen Mortalitätsrate bei gleichzeitiger Schädigung des dopaminergen Systems und quasi-narkoleptischem Verhalten. Dagegen scheinen Tiere mit ‚einfachem‘- *pale*- Silencing in Hinsicht auf Mortalitätsrate, das dopaminerge System und ihr Kletterverhalten nicht grundlegend beeinträchtigt zu sein. In jedem Fall stellen sie ein sehr gutes Werkzeug dar, mit dem die DA- Abhängigkeit der α -Syn- Toxizität untersucht werden kann.

So konnte beobachtet werden, dass die Unterdrückung der DA- Produktion sowohl dopaminerge Neurone als auch Kletterfähigkeit im Alterungsexperiment vor der Toxizität von α -SynA30P schützt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, in denen an humanen und *Drosophila*- Zellkulturen dopaminerge Neurone derselbe neuroprotektive Effekt nach Applikation von TH- Inhibitoren beschrieben wurde (Xu *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2007). Dies ist ein eindeutiger Beweis, dass die α -SynA30P-Toxizität in dopaminergen Neuronen auch *in vivo* mit DA in Verbindung steht, beziehungsweise sogar direkt von seiner Präsenz abhängt. Mit der 85%-igen Verringerung der DA- Produktion fällt mit größter Wahrscheinlichkeit auch der Großteil der toxischen DA- Metabolite DOPAL und DAQ aus dem System, was einerseits zu einer geringeren ROS- Belastung, andererseits zu einer Destabilisierung der α -Syn- Protofibrillen führt, so dass diese zerfallen oder zu inerten Fibrillen und Aggregaten kondensieren könnten.

2. Die Rolle von oxidativem Stress und Dopamin- Stoffwechsel bei *Drosophila*- Modellen der sporadischen Parkinson'schen Krankheit

Nach derzeitigem Wissenstand kann nur ein geringer Prozentsatz der PD- Fälle auf eine genetische Prädisposition zurückgeführt werden. Beim Großteil der Fälle handelt es sich um eine sporadische Form der PD, deren Auslöser weitgehend unbekannt sind. Allerdings wurden verschiedene Chemikalien entdeckt, die bei Menschen und Primaten PD auslösen können.

Damit kann getestet werden, ob die Degeneration dopaminerger Neurone bei Neurotoxin-basierenden Modellen der sporadischen PD ebenfalls mit dem DA- Stoffwechsel und freien Radikalen zusammenhängt.

2.1 Rotenon und Paraquat als Modelle der sporadischen Parkinson'schen Krankheit in *Drosophila*

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Rotenon oder Paraquat erfolgreich eine deutliche Degeneration dopaminerger Neurone bei gleichzeitigem Verlust der Lokomotoraktivität ausgelöst, und so die Ergebnisse vorhergehender Studien bestätigt werden (Coulom und Birman; 2004; Chaudhuri *et al.*, 2007). Die Gabe von Saccharose als Futtermedium scheint hierbei, zumindest im Beobachtungszeitraum, keinerlei negative Auswirkungen auf die Tiere zu haben, und es kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte aus der Exposition gegenüber Rotenon oder Paraquat resultieren.

Allerdings lassen sich Theorien, nach denen Rotenon und Paraquat selektiv für dopaminerge Neurone toxisch sind, nicht bedingungslos halten. Zwar kann Degeneration des dopaminergen Systems eine Erklärung für den Verlust der Lokomotoraktivität sein, doch lässt sich die Abnahme der Lebenserwartung nicht hinreichend durch selektive Neurodegeneration erklären. Eher ist dadurch impliziert, dass andere Systeme, die für *Drosophila* unter Umständen sogar lebenswichtiger sind als dopaminerge Neurone ebenfalls stark betroffen sind. Ein weiterer Widerspruch erhebt sich beim Vergleich mit dem α -Syn Modell, bei dem es nach Alterung zwar zu einem vergleichbaren Verlust dopaminerger Neurone und der Lokomotionsfähigkeit, jedoch nicht zur Verringerung der Lebenserwartung des Gesamtorganismus kommt.

Rotenon hemmt den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und verhindert den Transport von Wasserstoffanionen in die mitochondriale Matrix. Dies führt einerseits zu verringerter Energieproduktion durch die ATP- Synthase am Komplex V, zum anderen

zu einer übermäßigen Produktion von Superoxidradikalen, die sowohl ins Mitochondrium als auch ins Zytoplasma abgegeben werden. Die Schädigung der Zellen durch die Inhibition des Komplex I ist wohl mehr auf die Produktion freier Radikale als auf den verminderten Protonentransport zurückzuführen, da die ATP-Produktion aufgrund des noch immer funktionsfähigen Komplex II nur teilweise zum Erliegen kommt. Wegen der Ernährung mit Saccharose als alleiniger Energiequelle, ist es denkbar, dass es für die Fliegen unter diesen Versuchsbedingungen von vornherein möglich ist, relativ große ATP- Mengen glykolytisch zu produzieren. Zudem sind Mitochondrien in der Lage, ATP- Mangel zu kompensieren, indem sie ihre Atmungsgeschwindigkeit erhöhen (Löffler, 2001; Watabe und Nakaki, 2007a). Dies würde bei gleichzeitiger Hemmung des Komplex I unter Umständen sogar zu einer weiteren Steigerung der Superoxidradikal-Produktion führen und so die Toxizität einer Komplex I Hemmung weiter erhöhen. Nun ist jedoch zu beachten, dass all dies nicht auf dopaminerge Neurone beschränkt sein kann. Rotenon ist ein lipophiles Molekül und kann sowohl durch den gesamten Organismus diffundieren als auch in alle Zelltypen eindringen. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass seine Giftwirkung ausschließlich dopaminerge Neurone betrifft.

Auch Paraquat ist ein potentieller Komplex I- Inhibitor, der allerdings via DAT bevorzugt von dopaminergen Neuronen aufgenommen wird und darum hauptsächlich dort seine toxische Wirkung entfalten kann (Shimizu *et al.*, 2003). Das Hauptargument, welches diese Theorie stützt, beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit von Paraquat zu MPP⁺ (Snyder und D'Amato, 1985; Bové *et al.*, 2005; Miller, 2007). Trotzdem ist auch Paraquatexposition für *Drosophila* nach kurzer Zeit letal, was darauf hindeutet, dass Paraquat durchaus in der Lage ist, andere Zelltypen und nicht- neuronales Gewebe zu schädigen. In Säugermodellen lösen hohe Paraquat Dosen neben Gehirn- auch Lungen-, Leber- und Nierenschäden aus, die im Endeffekt zum Tod des Organismus führen (Uversky, 2004). Chaudhuri *et al.* (2007) beschreiben in *Drosophila* durch Paraquat ausgelöste allgemeine Neurodegeneration, die allerdings später als die Degeneration dopaminergener Neurone einsetzt. Richardson *et al.* (2005) präsentieren Ergebnisse, die für Paraquat sowohl den Transport via DAT als auch seine Fähigkeit, als Komplex I- Inhibitor zu fungieren, in Frage stellen. Ein denkbarer alternativer Toxizitätsmechanismus wäre Paraquat- induzierte, systemische Überproduktion freier Radikale, die zu nicht- zellspezifischen oxidativen Schäden führen (Bus *et al.*, 1974; Bus

et al., 1975), und unter Umständen auch die Aktivierung von Stress- Signalwegen mit darauf folgender Apoptose auslösen könnten (Ramachandrian *et al.*, 2006).

Zusammengenommen ist es in Anbetracht der Datenlage im Endeffekt wahrscheinlich korrekter, nicht von selektiver Toxizität des Rotenons oder Paraquats auf dopaminerge Neurone, sondern von erhöhter Sensitivität dopaminergere Neurone gegenüber Rotenon und Paraquat auszugehen.

2.2 Die Rolle von $\cdot\text{O}_2^-$ bei Modellen der sporadischen Parkinson'schen Krankheit

Die Beobachtung, dass hSoD1 dopaminerge Neurone im hereditären α -Syn- Modell schützen kann, zieht die Frage nach sich, ob diese Schutzwirkung auch bei Neurotoxin-basierten Modellen der PD greift. In einer früheren Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass hSoD1 dopaminerge Neurone vor Hyperoxie schützen kann (Botella *et al.*, 2008).

Die Expression des *UAS-hSoD1*- Konstruktes (Parkes *et al.* 1998) in dopaminergen Neuronen und Teilen des peripheren Nervensystems macht die Fliegen widerstandsfähiger gegenüber Rotenon, hat jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Toxizität von Paraquat.

Die einzige Veränderung, die bei der Expression von hSoD1 unter Paraquatstress auftritt, ist eine geringfügige Verlängerung der Lebenserwartung. Dieser Effekt spiegelt sich allerdings weder im Kletterverhalten der Tiere noch in der Degenerationsrate der dopaminergen Neurone wieder. Da der Toxizitätsmechanismus von Paraquat nicht aufgeklärt ist, kann auch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass tatsächlich die $\cdot\text{O}_2^-$ - Bildung am mitochondrialen Komplex I gesteigert wird. Falls, die Paraquattoxizität tatsächlich nicht über $\cdot\text{O}_2^-$ mediiert wäre, würde die Expression der hSoD1 aufgrund des Fehlens ihres primären Edukts ins Leere laufen.

Unter Rotenonstress sind wesentlich deutlichere Rettungseffekte erkennbar als unter Paraquatstress: Die durchschnittliche Lebenserwartung der Fliegen verdoppelt sich von fünf auf zehn Tage und die normale Lokomotionsfähigkeit bleibt erhalten. Hinsichtlich der Neurodegeneration weisen Fliegen, die hSoD1 exprimieren nach Rotenonbehandlung zwar durchschnittlich mehr Neurone auf als Fliegen ohne hSoD1- Transgen, doch ist dieser Effekt nicht deutlich genug, um statistische Signifikanz zu erreichen. Eine plausible Schlussfolgerung wäre, dass hSoD1 in Fliegen zwar in der Lage ist, bestimmte

überlebensrelevante Organe und neuronale Systeme zu schützen, seine protektive Wirkung jedoch für einen effektiven Schutz dopaminerger Neurone nicht ganz ausreichend ist. Da Rotenon *in vitro* auch für Gliazellen toxisch ist (Radad *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2008) wäre es möglich, dass auch in *Drosophila* Dysfunktionen bei der Versorgung von Neuronen die Degeneration verstärken.

Ohne die nötigen Kontrollexperimente würden die Ergebnisse dieser Versuche zu dem Schluss führen, dass die, auf dopaminerge Neurone und Teile des peripheren Nervensystems beschränkte Expression von hSoD1 ausreicht, um die Toxintoleranz und Lebenserwartung des gesamten Organismus zu steigern. Die hier verwendete *UAS-hSoD1*- Expressionslinie ist jedoch ‚leaky‘ und zeigt auch ohne eingekreuzten *Gal4*-Treiber stetige Transkription der *hSoD1* cDNA. Dementsprechend zeigen die Fliegen der Kontrollgruppe, in die kein *Gal4*-Treiber eingekreuzt wurde unter Rotenonstress ebenfalls eine deutliche Verlängerung der Lebenserwartung und Erhaltung der Lokomotionsfähigkeit. So kann unter Umständen auch erklärt werden, warum die Expression dieses Konstrukts in Motorneuronen bei wildtypischem genetischem Hintergrund die Lebenserwartung erhöht (Parkes *et al.*, 1998).

Die deutliche Verlängerung der Lebenserwartung, die Rettung des negativen Geotaxis-Verhaltens und die tendenzielle Verlangsamung der Degeneration dopaminerger Neurone lässt jedoch zumindest die Vermutung zu, dass das Abfangen von $\cdot\text{O}_2^-$ Zellen im allgemeinen und speziell auch in dopaminergen Neuronen vor Rotenon schützen kann. Damit wäre es auch möglich, dass die erhöhte Anfälligkeit dopaminerger Neurone gegenüber Rotenon und Paraquat wiederum in der Oxidation von DA begründet ist.

2.3 Dopamin als Mediator der Neurotoxizität bei Modellen der sporadischen Parkinson'schen Krankheit

Falls dies zutrifft, müsste es möglich sein, die Toxizität von Rotenon und Paraquat durch eine DA- Depletion abzumildern. Diese hat unter Rotenon und Paraquatstress jedoch erstaunlicherweise diametrale Auswirkungen.

So macht das Silencing von *pale* die Fliegen generell anfälliger gegenüber Paraquat, was sich in abnehmender Lebenserwartung und stärkerer Beeinträchtigung des Kletterverhaltens zeigt. Auch die dopaminergen Neurone degenerieren geringfügig schneller als bei Fliegen mit normaler DA- Produktion. Die Resultate entsprechen denjenigen von Chaudhuri und Kollegen (2007), die in der Lage waren an *Drosophila* die Paraquat- bedingte Degeneration dopaminerger Neurone durch pharmakologische Hemmung der TH zu beschleunigen. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass Paraquat,

genau wie DA über DAT in die Neurone aufgenommen wird. In einem Szenario, in dem dopaminerge Neurone nur sehr wenig DA produzieren können wäre es möglich, dass sie im Rahmen einer Kompensationsreaktion mehr DAT exprimieren um die Resorption von DA zu intensivieren. Da in dieser Situation im synaptischen Spalt allerdings nur sehr geringe Mengen DA vorhanden sind wird hauptsächlich Paraquat konkurrenzlos via DAT in die Zellen transportiert. Obwohl DAT in Folge des *pale*- Silencings tatsächlich deutlich stärker exprimiert ist, hält diese Hypothese einem weiteren Test nicht stand: unter Paraquatstress leben *fmn*⁻- Fliegen, die kein DAT produzieren können kürzer, während die Überexpression von DAT zu einer Verlängerung der Lebenserwartung führt. Im Endeffekt können die Daten nicht eindeutig interpretiert werden. Sie zeigen lediglich, dass DA kein direkter Mediator der Paraquattoxizität ist.

Ein ganz anderes Bild ergibt sich, wenn DA- depletierte Fliegen mit Rotenon gestresst werden. Durch die Verringerung der DA- Mengen kann sowohl die Lebenserwartung der Fliegen als auch die Überlebensrate ihrer dopaminergen Neurone signifikant verlängert werden. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass DA beim sporadischen Rotenon- Modell der PD eine wichtige Rolle spielt. Interessanterweise wurde bereits beobachtet, dass DA-Vesikel ihren Inhalt unter dem Einfluss von Rotenon ins Zytoplasma entleeren (Watabe und Nakaki, 2007b), der Verpackungsprozess hingegen durch geringere Expression von VMAT behindert wird (Sai *et al.*, 2008). Also wäre es möglich, dass die erhöhte Sensitivität dopaminergen Neurone unter Rotenonstress, genau wie im hereditären α -Syn Modell, auf eine gestörte Speicherung und anschließende Oxidation von DA im Zytoplasma zurückzuführen ist.

Da die DA- Depletion nicht zur Verdünnung der zytoplasmatischen ROS aus der Komplex I- Hemmung führt, ist der Schutz der dopaminergen Neurone nicht vollständig. Es bleibt zu testen, ob die Expression von hSoD1 bei gleichzeitiger DA- Depletion die vollständige Rettung bewirken kann.

Insgesamt zeigen die bisher diskutierten Resultate, dass durch die Manipulation von ROS und DA- Mengen die α -Syn- und Rotenontoxizität in dopaminergen Neuronen von *Drosophila* verringern lassen. Dies lässt die Vermutung zu, dass manche hereditären und sporadischen Formen der PD ähnliche molekulare Mechanismen zu Grunde liegen.

3. Oxidativer Stress und α -Syn- Aggregation

Vieles deutet darauf hin, dass die Toxizität von α -Syn auf seiner Fähigkeit beruht, Oligomere und Multimere zu bilden. Der am stärksten toxische α -Syn Aggregatzustand scheint dabei die Protofibrille zu sein, welche die erste Multimerisierungsstufe vom Monomer zum Aggregat darstellt. Das *Drosophila*-Modell der α -Syn-Toxizität ist unvollständig, solange es nicht in der Lage ist, diesen Aggregationsprozess, der beim Menschen im altersabhängigen Auftreten von *Lewy-Bodies* gipfelt, zu reproduzieren.

3.1 Aggregation von humanem α -Syn in *Drosophila*

Obwohl die Aggregation von humanem α -Synuclein in *Drosophila* bereits beschrieben wurde (Feany und Bender, 2000; Chen und Feany, 2005), traten derartige Aggregate hier nicht auf. Bei Expression von humanem α -Syn, α -SynA30P oder α -SynA53T konnten zu keinem Zeitpunkt des Alterungsprozesses eindeutig Einschlusskörperchen identifiziert werden. Weder mikroskopische Methoden noch native Immunoblots liefern Belege für die Existenz komplexerer, höhermolekularerer α -Syn-Spezies in *Drosophila*. Bei *Lewy-Bodies* handelt es sich um ein Phänomen, welches beim Menschen normalerweise erst in höherem Alter auftritt. Unter Umständen hat *Drosophila* als relativ kurzlebiger Organismus im Laufe der Evolution nie Mechanismen entwickelt, die die Aggregation von Proteinen befördern würden. Möglich wäre auch, dass die Fliegen gar nicht lange genug leben, um Aggregate auszubilden.

Im Zuge der immunhistochemischen Untersuchungen zur α -Syn-Aggregation wurde allerdings auch entdeckt, dass der axonale Transport von α -SynA30P gestört ist. Bei panneuraler Expression in dopaminergen Neuronen werden α -Syn und α -SynA53T vollständig ins Neuropil abtransportiert, während α -SynA30P teilweise im Cortex akkumuliert. Dies ist bemerkenswert, da α -Syn eigentlich als synaptisches Protein der axonalen Termini beschrieben wurde (Maroteaux *et al.*, 1988). Ähnliche Beobachtungen in Zellkultur führten zu dem Schluss, dass α -SynA30P aufgrund von Veränderungen seiner räumlichen Struktur nicht in der Lage ist, effektiv an Lipidstrukturen oder synaptische Transportvesikel zu binden (Jensen *et al.*, 1998; Jo *et al.*, 2002).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Toxizität von α -Syn unabhängig vom Auftreten der Aggregate ist, und bestätigen die Theorie, dass nicht α -Syn-Aggregate sondern Substrukturen unterhalb der Aggregatschwelle die eigentlich toxische Komponente sind.

Die in dieser Arbeit beobachtete gesteigerte Toxizität von α -SynA30P könnte auf beschleunigter Protofibrillenbildung, die durch die kortikale Akkumulation bedingt ist, beruhen.

Da die Aggregation der humanen α -Syn- Formen in *Drosophila* nicht stattfindet, oder auch nur sehr schwierig detektiert werden kann, wurden alternative Strategien verfolgt, um ein α -Syn- Aggregationsmodell zu etablieren.

3.2 Bedeutung des α -Syn C-Terminus beim Aggregationsprozess

An sich wird die zentral im α -Syn- Protein liegende NAC- Domäne funktionell mit der Aggregation in Verbindung gebracht. Mutationen in dieser Region führen zu verminderter, die Deletion dieser Region führt zum Ausbleiben der Aggregation (Giasson *et al.* 2001). Darüber hinaus können diese kurzen Peptide (AS71- AS82) untereinander wechselwirken, fibrillisieren und so Aggregationskeime für α -Syn Monomere darstellen. Dazu kommen McLean *et al.* (2001) zu der Erkenntnis, dass künstliche Modifikationen am C-Terminus von α -Syn *in vitro* zu einer veränderten Aggregationsdynamik führen können. Die Expansion des C-Terminus um einige Aminosäuren -in diesem Fall die neun Aminosäuren des „Linkers“, gefolgt von 86 N- terminalen Aminosäuren aus EGFP (WTsynEGFP Δ 155, Abbildung 54)- führt in Kombination mit N- terminalen α -Syn oder α -SynA53T, jedoch nicht mit α -SynA30P zur Bildung von Aggregaten.

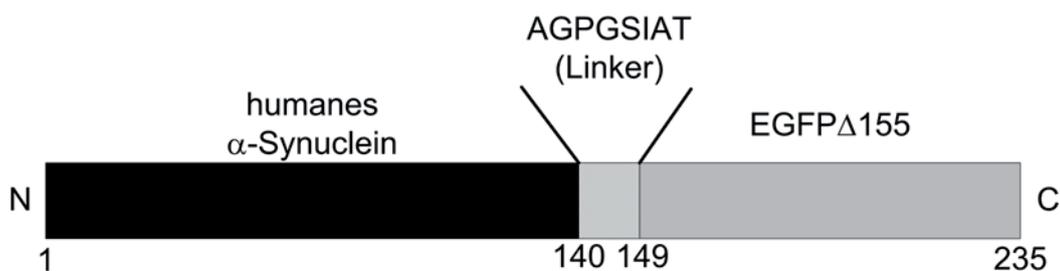


Abbildung 54: Schematische Darstellung von WTsynEGFP Δ 155: 155 Aminosäuren am C-Terminus des α -Syn- EGFP- Fusionsproteins sind deletiert.

Exprimiert man α -Syn aus Ratten in humanen H4 Neuroglioma Zelllinien, ist derselbe Effekt zu beobachten. Dies erklärt sich aus der Tatsache dass in der Ratte -im Gegensatz zum Menschen- eine zusätzliche Spliceform der *SNCA*- mRNA vorkommt, von der ein am C- Terminus verlängertes Protein abgelesen wird (McLean und Hyman, 2002).

Die Autoren dieser Studie postulieren einen Mechanismus, bei dem der unmodifizierte C-Terminus die NAC- Domäne abschirmt. Wird der C-Terminus verändert, kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins wodurch die NAC- Domäne expositioniert wird und mit anderen Proteinen beziehungsweise seinesgleichen interagieren kann. In

Drosophila wurde bereits ein ähnlicher Effekt beschrieben, bei dem eine natürliche Verkürzung des C- Terminus zu verstärkter Aggregation führt (Perquet *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit ist es gelungen, das WTsynEGFP Δ 155- Aggregationsmodell auf *Drosophila* zu portieren. Die WTsynEGFP Δ 155- cDNA codiert für ein 29kDa-Fusionsprotein (siehe Kapitel V.4), welches auf Immunoblots nachgewiesen werden kann. Daneben zeigen die Blots eine kleinere α -Syn- Spezies mit einer Größe von etwa 25kDa. Dieser Effekt kann auch *in vitro* beobachtet werden und spiegelt möglicherweise eine posttranslationale Modifikation des Fusionsproteins wieder. Nach 40 Tagen panneuraler WTsynEGFP Δ 155- Expression können im Zytoplasma vieler Neurone α -Syn- immunreaktive Einschlusskörperchen nachgewiesen werden. Eine parallel ablaufende Studie, die mit einer optimierten Responderlinie (*UAS-SynT-1K*) durchgeführt wurde kam zu denselben Ergebnissen. Der Phänotyp tritt damit allerdings schon nach kurzer Alterung auf und ist wesentlich deutlicher ausgeprägt. Der wahrscheinliche Grund dafür ist, dass mit der optimierten Responderlinie ungefähr die doppelte WTsynEGFP Δ 155- Menge exprimiert wird (Härtinger, 2008).

Der Mechanismus, durch den die Verlängerung des C-Terminus zur Aggregation führt, ist weitgehend unbekannt. Da in *Lewy- Bodies* in geringen Anteilen C-terminal-verkürztes α -Syn enthalten ist, wurde vorgeschlagen, dass posttranslationale Verkürzungen der C- Termini einiger einzelner α -Syn Monomere zur Bildung von Aggregationskeimen für größere Aggregate führen könnten (Crowther *et al.*, 1998). Da die Aggregation auch durch andere Peptidreste provoziert werden kann, und sie durch die A30P- Mutation im α -Syn- Teil des Proteins unterdrückt wird, wird davon ausgegangen, dass nicht der EGFP- Rest, sondern der α -Syn- Anteil die aggregierende Komponente des Fusionsproteins ist (McLean *et al.*, 2001).

Auch in dopaminergen Neuronen von *Drosophila* führt die Expression dieser Linie zu raschem Auftreten α -Syn- immunreaktiver Einschlusskörperchen. Dabei zeigen manche dopaminerge Cluster gleich mehrere Einschlusskörperchen pro Zelle, in anderen Clustern treten hingegen keine oder nur wenige Aggregate auf. Dies könnte bedeuten, dass der Aggregationsprozess dort später einsetzt, langsamer abläuft oder vollständig ausbleibt. Da die Stärke der GFP Expression über das dopaminerge System keine Unterschiede aufzuweisen scheint, ist es unwahrscheinlich, dass diese Beobachtung auf einem Sekundäreffekt wie beispielsweise regional fluktuierender oder unterschiedlicher *Gal4*-

Expression beruht. Es ist eher wahrscheinlich, dass eine Subpopulation der dopaminergen Neurone spezielle Eigenschaften aufweist, die die Aggregatbildung fördern.

3.3 Auswirkungen von oxidativem Stress auf die SynT- Aggregation

Da die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, dass oxidativer Stress in hereditären und sporadischen *Drosophila*- Modellen der PD am Degenerationsprozess dopaminergen Neurone beteiligt ist, wäre es interessant auch seine Auswirkungen auf die Aggregation von α -Syn zu kennen.

Tatsächlich zeigt das WTsynEGFP Δ 155- Aggregationsmodell eine deutliche Reaktion auf oxidativen Stress. Sowohl Rotenon als auch Paraquat fördern die Entstehung zytoplasmatischer α -Syn- Aggregate in dopaminergen Neuronen. Dies könnte bedeuten, dass zytosolische ROS durch Wechselwirkungen mit WTsynEGFP Δ 155 direkt dessen Aggregation beschleunigen, oder dass generell zelluläre Mechanismen existieren, die die Aggregation oxidativ modifizierter Proteine beschleunigen. Da bei der Behandlung mit Rotenon oder Paraquat eher mehr Einzelaggregate pro Neuron als vergrößerte Aggregate entstehen, ist es denkbar, dass oxidativer Stress die Aggregation induziert, das eigentliche Wachstum der Aggregate jedoch nicht beschleunigt. Wenn ausschließlich der α -Syn-Anteil des Fusionsproteins für die Aggregation verantwortlich ist, würde dies bedeuten, dass freie Radikale unter Umständen mit Hilfe von DA, möglicherweise die Bildung von α -Syn- Aggregationskeimen in dopaminergen Neuronen verstärken.

Allerdings zeigt sich bei panneuraler WTsynEGFP Δ 155 Expression, dass die Aggregation sowohl unter Standardbedingungen als auch in nicht- dopaminergen Neuronen stattfindet. Darüber hinaus ist zu beachten, dass der EGFP Δ 155- Peptidrest zwei Cysteine (Cys199 und Cys221, siehe Kapitel V.4) enthält. Da bereits beschrieben wurde, dass ROS in der Lage sind, Protein- Quervernetzungen über Schwefeldisulfidbrücken auszulösen (Durchschlag und Zipper, 2007; Wan *et al.*, 2008), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aggregation zumindest unter oxidativem Stress ein Artefakt eines solchen Mechanismus ist. Darum können nur zusätzliche Kontrollexperimente, wie beispielsweise die Einführung eines alternativen C- terminalen Tags, Aufschluss darüber geben, ob oxidativer Stress beim α -Syn- Aggregationsvorgang tatsächlich eine Rolle spielt.

Falls es möglich ist, auch in *Drosophila* nachzuweisen, dass die Aggregation unabhängig von der Gestalt der C- terminalen Expansion stattfindet, stellt WTsynEGFP Δ 155 eine wertvolle Erweiterung des *Drosophila*- Modells der PD dar.

Kapitel V:
Anhang

1. Verkürzung der Lebenserwartung durch Dopamin- Depletion

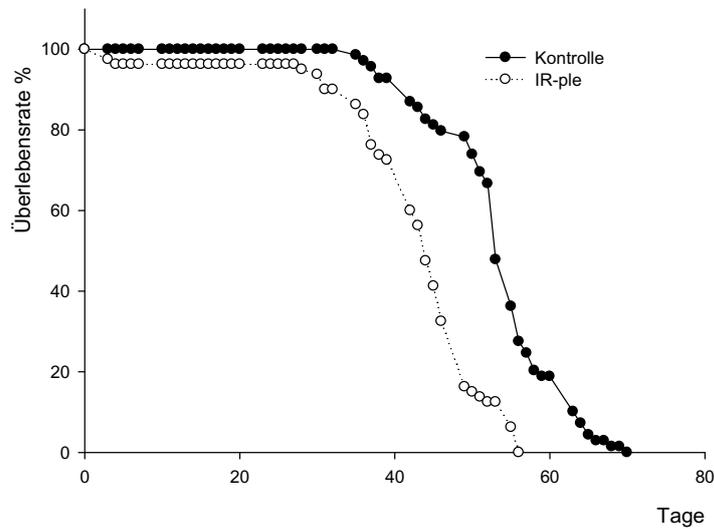


Abbildung A 1: Verkürzung der Lebenserwartung durch DA-Depletion: Kontrolle: *UAS-Stinger/+; Th-Gal4/+* (n=90); *UAS-IR-ple: UAS-Stinger/+; Th-Gal4/UAS-IR-ple* (n=80).

2. nativer Westernblot von Kopffextrakten

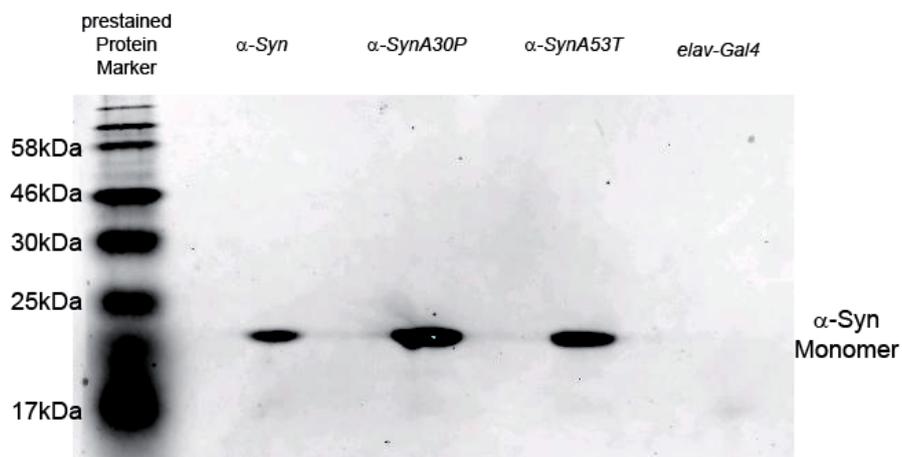
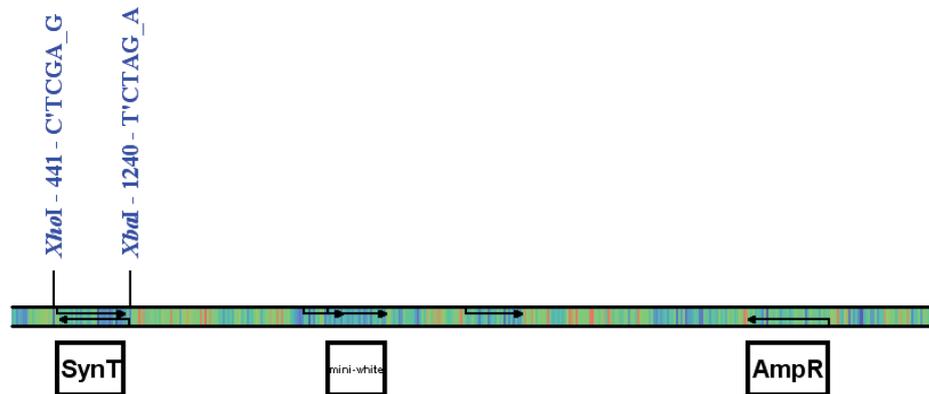


Abbildung A 2: nativer Westernblot von Kopffextrakten: α -Syn, α -SynA30P und α -SynA53T und nicht- transgene Kontrolle: α -Syn: *elav-Gal4/y; UAS- α -Syn/+*; α -SynA30P: *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA30P/+*; α -SynA53T: *elav-Gal4/y; UAS- α -SynA53T/+*; *elav-Gal4: elav-Gal4/+*.

3. SynT in pUAST



SynT in pUAST 9691 bp

GC% in 24 bp blocks

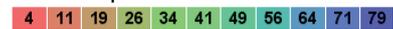


Abbildung A 3: linearisierte Darstellung von *UAS-SynT13*: Die 705bp WTSyn Δ 155EGFP-cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI in die *Multiple Cloning Site* von pUAST kloniert. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen

```

CTCGAGGACA GTGTGGTGTA AAGGAATTCA TTAGCCATGG ATGTATTCAT
GAAAGGACTT TCAAAGGCCA AGGAGGGAGT TGTGGCTGCT GCTGAGAAAA
CCAAACAGGG TGTGGCAGAA GCAGCAGGAA AGACAAAAGA GGGTGTTC
TATGTAGGCT CCAAACCAA GGAGGGAGTG GTGCATGGTG TGGCAACAGT
GGCTGAGAAG ACCAAAGAGC AAGTGACAAA TGTGGAGGA GCAGTGGTGA
CGGTGTGAC AGCAGTAGCC CAGAAGACAG TGGAGGGAGC AGGGAGCATT
GCAGCAGCCA CTGGCTTTGT CAAAAGGAC CAGTTGGGCA AGAATGAAGA
AGGAGCCCCA CAGGAAGGAA TTCTGGAAGA TATGCCTGTG GATCCTGACA
ATGAGGCTTA TGAAATGCCT TCTGAGGAAG GGTATCAAGA CTACGAACCT
GAAGCCGGTA CCGCGGGCCC GGGATCCATC GCCACCATGG TGAGCAAGGG
CGAGGAGCTG TTCACCGGGG TGGTGCCCAT CCTGGTCGAG CTGGACGGCG
ACGTAAACGG CCACAAGTTC AGCGTGTCCG GCGAGGGCGA GGGCGATGCC
ACCTACGGCA AGCTGACCCT GAAGTTCATC TGCACCACCG GCAAGCTGCC
CGTGCCCTGG CCCACCCTCG TGACCACCCT GACCTACGGC GTGCAGTGCT
TCAGCCGCTA CCCCAGCAC ATGAAGCAGC ACGACTTCTT CTAAGCGGCC
GCGCAAGGGC AATTCTGCAG ATATCCAGCA CAGTGGCGGC CGCATCGAGT
CTAGA

```

Abbildung A 4: Basensequenz der SynT- cDNA: rot: α -Syn; blau: Linker; grün: EGFP 4-260; schwarz: flankierende Sequenzen aus der *Multiple Cloning Site* von pCDNA3_1.

```

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVH 50
GVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQL 100
GKNEEGAPQEGILEDMVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPAGTAGPGSIAT 150
MVSKEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFICT 200
TGKLPVPWPPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDF

```

Abbildung A 5: Aminosäuresequenz von WTSyn Δ 155EGFP: rot: α -Syn; blau: Linker; grün: Δ 155EGFP

4. ProtParam- Analyse für WTSynD155EGFP

ProtParam

User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MDVFMKGLSK AKEGVVAAAAE KTKQGVAEAA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH G VATVAEKTK

      70      80      90     100     110     120
EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE G ILEDMPVDP

     130     140     150     160     170     180
DNEAYEMPSE EGYQDYEP EA GTAGPGSIAT MVSKGEELFT G VVPILVELD GDVNGHKFSV

     190     200     210     220     230
SGEGEGDATY GKLTLKFICT TGKLPVPWPT LVTTLTYGVQ CFSRYPDHMK QHDF

```

Number of amino acids: 235

Molecular weight: 24637.7

Theoretical pI: 4.84

Amino acid composition:

Ala (A)	22	9.4%
Arg (R)	1	0.4%
Asn (N)	4	1.7%
Asp (D)	11	4.7%
Cys (C)	2	0.9%
Gln (Q)	8	3.4%
Glu (E)	23	9.8%
Gly (G)	31	13.2%
His (H)	4	1.7%
Ile (I)	5	2.1%
Leu (L)	12	5.1%
Lys (K)	21	8.9%
Met (M)	6	2.6%
Phe (F)	8	3.4%
Pro (P)	11	4.7%
Ser (S)	9	3.8%
Thr (T)	21	8.9%
Trp (W)	1	0.4%
Tyr (Y)	7	3.0%
Val (V)	28	11.9%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 34

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 22

Atomic composition:

Carbon	C	1089
Hydrogen	H	1718
Nitrogen	N	280
Oxygen	O	353
Sulfur	S	8

Formula: $C_{1089}H_{1718}N_{280}O_{353}S_8$ **Total number of atoms:** 3448**Extinction coefficients:**

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 16055
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.652, assuming ALL Cys residues appear as half cystines

Ext. coefficient 15930
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.647, assuming NO Cys residues appear as half cystines

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 22.10

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 72.13**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.247

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dopaminsynthese.....	13
Abbildung 2: schematische Darstellung des DA- Metabolismus und der Reizübertragung an einer dopaminergen Synapse	14
Abbildung 3: Hauptprojektionsbahnen dopaminerg Neurone.....	15
Abbildung 4: Mögliche biochemische Interaktionen von ROS mit Zellkomponenten.....	18
Abbildung 6: Schema der Elektronentransportkette an den Komplexen I und II der mitochondrialen Atmungskette	20
Abbildung 8: dreidimensionale Struktur und schematische Darstellung der Domänenorganisation von α -Syn.....	23
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Verteilung dopaminerg Neurone im Gehirn von <i>Drosophila</i>	26
Abbildung 10: Expressionsmuster der <i>TH-Gal4</i> Treiberlinie	27
Abbildung 11: Schemazeichnung eines Objektträgers für Gehirn- <i>Wholemounds</i>	41
Abbildung 12: Softwaregestützte Quantifizierung dopaminerg Neurone	45
Abbildung 13: exemplarisches Kreuzungsschema für Experimente mit doppelter Überexpression.....	55
Abbildung 14: Kreuzungsschema für die Rekombination der <i>UAS-α-SynA30P</i> und <i>UAS-IR-ple-</i> p-Elemente	55
Abbildung 15: Expression von α -Syn im Gehirn von <i>Drosophila</i>	61
Abbildung 16: Verlust dopaminerg Neurone durch die Expression von α -Syn, α -SynA30P und α -SynA53T mit Th-Gal4: Kontrolle	63
Abbildung 17: Expression von α -SynA30P in den sLNv: Kontrolle.....	63
Abbildung 18: Neurodegeneration bei panneuraler Expression von α -SynA30P und α -SynA53T.....	65
Abbildung 19: Auswirkungen von oxidativen Stress auf dopaminerg Neurone und sLNvs.....	66
Abbildung 20: Der Verlust von <i>sniffer</i> führt zur Degeneration dopaminerg Neurone...67	67
Abbildung 21: Verlust dopaminerg Neurone unter Hyperoxie bei gleichzeitiger Expression von α -Syn, α -SynA30P oder α -SynA53T: Kontrolle	68
Abbildung 22: Effekt der Sni- Überexpression auf die Degeneration dopaminerg Neurone durch α -SynA30P: Kontrolle.....	69
Abbildung 23: Rettung dopaminerg Neurone durch die Expression hSoD1	71
Abbildung 24: Rettung des negativen Geotaxis- Verhaltens durch hSoD1	72
Abbildung 25: RT-PCR der hSoD1 m-RNA in Larven	73
Abbildung 26: qRT-PCR-Analyse der relativen Expression von α -SynA30P: UAS-hSoD1 + UAS- α -SynA30P	74
Abbildung 27: Verlust der Pigmentierung	76

Abbildung 28: <i>pale</i> - Expression in RNAi-Linien	77
Abbildung 29: Tyrosin- Hydroxylase- Färbungen an Gehirn-Wholemounts.....	78
Abbildung 30: DA- Mengen in Köpfen von Fliegen mit normalem und unterdrücktem DA- Stoffwechsel	79
Abbildung 31: RT-PCR für α -Syn zur Identifizierung rekombinater Fliegen	80
Abbildung 32: qRT-PCR der relativen Expression von α -SynA30P	80
Abbildung 33: Rettung dopaminergener Neurone durch Silencing von <i>ple</i>	81
Abbildung 34: Rettung des negativen Geotaxis- Verhaltens durch das Silencing von <i>ple82</i>	
Abbildung 35: Lebenserwartung von w^{1118} Männchen unter Rotenon und Paraquatstress	83
Abbildung 36: Verlust dopaminergener Neurone im Gehirn nach Rotenon- beziehungsweise Paraquatbehandlung.....	84
Abbildung 37: Verlust des negativen Geotaxis-Verhaltens während Rotenon- und Paraquatexposition	85
Abbildung 38: <i>pale</i> -promotorspezifische hSoD1- Überexpression im Paraquat- Modell	86
Abbildung 39 <i>pale</i> -promotorspezifisches <i>pale</i> - Silencing im Paraquat- Modell	88
Abbildung 40: qRT-PCR der relativen Expression von <i>fmn</i> in Köpfen bei Silencings von <i>pale</i> : Kontrolle.....	89
Abbildung 41: Auswirkungen von <i>fmn</i> -Defizienz und DAT- Überexpression im Paraquat-Modell.....	89
Abbildung 42: <i>pale</i> -promotorspezifische hSoD1- Überexpression im Rotenon- Modell.	92
Abbildung 43: Lebenserwartung und negatives Geotaxis Verhalten von Fliegen mit reduziertem Dopaminstoffwechsel unter Rotenonstress	94
Abbildung 44: dopaminerge Neurone mit reduzierter Dopaminproduktion zeigen erhöhte Rotenontoleranz.....	95
Abbildung 45: differentielle zelluläre Lokalisation der verschiedenen α -Syn- Formen bei panneuraler Expression: ABC-HRP gefärbte Paraffinschnitte durch die Gehirne fünf Tage alter Fliegen	97
Abbildung 46: differentielle zelluläre Lokalisation von α -Syn und α -SynA30P in dopaminergen Neuronen zehn Tage alter Fliegen.....	98
Abbildung 47: Ubiquitäre Expression von α -Syn und WTsynEGFP Δ 155: α -Syn: <i>actin-Gal4/UAS-α-Syn</i> ; WTsynEGFP Δ 155.....	99
Abbildung 48: Aggregation von WTsynEGFP Δ 155 in den Zellen der dorsomedialen Cortices 40 Tage alter Fliegen nach panneuraler Expression.....	100
Abbildung 49: Aggregation von WTsynEGFP Δ 155 in dopaminergen Neuronen	102
Abbildung 50: Verlust dopaminergener Neurone des PPM3-Clusters durch Rotenon- und Paraquatstress	103
Abbildung 51: Quantifizierung von Aggregaten in PPM3- Zellen	104
Abbildung 52: Verstärkung der WTsynEGFP Δ 155- Aggregation durch Rotenon und Paraquat in dopaminergen Neuronen des PPM3- Clusters.....	105

Abbildung 53: hypothetischer Mechanismus der synergetischen Toxizität von α -Syn und oxidativem Stress.....	114
Abbildung 54: Schematische Darstellung von WTsynEGFP Δ 155	124
Abbildung A 1: Verkürzung der Lebenserwartung durch DA-Depletion	128
Abbildung A 2: nativer Westernblot von Kopffextrakten	128
Abbildung A 3: linearisierte Darstellung von <i>UAS-SynT13</i>	129
Abbildung A 4: Basensequenz der SynT- cDNA.....	129
Abbildung A 5: Aminosäuresquenz von WTSyn Δ 155EGFP.....	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PARK- Loci mit codierten Genen	22
Tabelle 2: Liste der eingesetzten Primer	31
Tabelle 3: Liste der eingesetzten Vektoren	31
Tabelle 4: Liste der eingesetzten Antikörper.....	32
Tabelle 5: Liste der eingesetzten Fliegenstämme.....	35
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.....	37
Tabelle 7: Verwendete Software	38
Tabelle 8: Überlebensfähigkeit der F1-Generationen von IR-ple- Fliegen nach Kreuzung mit verschiedenen Treiberlinien.	75

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	GSHDAQ	Glutathion-Dopamin-Quinon
μ	mikro	H	Hyperoxie
μsek	Mikrosekunden	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
3D-NMR	dreidimensionale Nukleare Magnet Resonanz	HD	Huntington's Disease
3-MT	3- Methoxytyramin	HK	Housekeepinggen
5cysDAQ	5-Cystenosyl-Dopamin-Quinon	Hsc	Heat Shock Cognate
A30P	Aminosäureaustausch an Stelle 30; Prolin für Alanin	hSoD1	Humane Cu/Zn Superoxiddismutase
A53T	Aminosäureaustausch an Stelle 53; Threonin für Alanin	Hsp	Heat Shock Protein
Abb.	Abbildung	HVA	Homovanillinsäure
AD	Alzheimer's Disease	JNK	c-Jun N-terminal kinase
ALS	Amylotrophe Laterale Sklerose	kDa	Kilodalton
AP	Aktionspotential	l	Liter
AS	Aminosäure	LB	Lewy- Body
ATP	Adenosintriphosphat	L-DOPA	Levodopa
bp	base pairs	l-LNv	Große ventrale laterale Neurone
BSA	Bovines Serum Albumin	LNv	Ventrale laterale Neurone
ca.	circa	LRRK2	Leucine Rich Repeat Kinase 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	LSM	Laser Scaning Microscope
Cat	Catalase	m	Meter
cDNA	complementary DNA	M	Molar
cm	Zentimeter	MAO	Monoaminoxidase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	MAPK	Mitogen-aktivierte Protein- Kinase
COMT	Catechol-o-Metyltransferase	MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
CSP α	Cystein String Protein α	min	Minute
CT	Crossing Treshold	min	Minute
CyO	Balancer des zweiten Chromosoms	mM	Millimolar
D ₃	Dicreate, Balancer des dritten Chromosoms	MPDP+	1-methyl-4-phenyl-2,3-Dihydropyridinium
Da	Dalton	MPP+	1-methyl-4- Phenylpyridinium
DA	Dopamin	MPPP	1-methyl-4-phenyl-4-Propionoxypiperidin
DAQ	Dopamin-Quinon	MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
DAT	Dopamin Transporter	MSF	mittlerer Standard Fehler
dd	Doppelt destilliert	NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
Ddc	DOPA-Decarboxylase	NBIA	Neurodegeneration with brain iron accumulation
DEPC	Diethylpyrocarbonat	NCAP140	non-A β component of disease amyloid precursor
DJ-1		NCBI	National Center for Biotechnology Information
DNA	Desoxyribonucleinsäure	NO	Stickstoffmonoxyd
dNTP	Desoxy Nucleotid Triphosphat	O	Chemisches Symbol für Sauerstoff
DHBT-1	7-(2-Aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-Benzothiazin-3-Carboxylsäure	o.g.	oben genannte
DOPAC	Dihydroxiphenyllessigsäure	O ₂ ⁻	Sauerstoffradikal
DOPAL	Dihydroxiphenylaldehyd	OBP	Odysse Blocking Puffer
DsRed	kernlokalisiertes red fluorescent Protein	P	Parentalgeneration
E56K	Aminosäureaustausch an Stelle 53; Lysin für Glutaminsäure	PAL	dorsolaterale anterielle protocerebrale Neurone
F1	Filial 1: Erste Generation nach P	PAM	dorsomediale anterielle protocerebrale Neurone
F2	Filial 2: Generation nach F1	PBS	Phosphate Buffer Saline
FeS	Eisen Schwefel	PBST	Phospahte Buffer Saline mit Triton
FMN	Flavin Mono Nucleotid	PCD	Programed Cell Death
Gal4	Transkriptionsfaktor aus <i>S. cerevisiae</i>	PCR	Polymerase chain reaction
GFP	Green Fluorescent Protein	PD	Parkinson's Disease
GMR	Glass Multimer Reporter	Pdf	Pigment Dispersing Factor
Gp(x)	Glutathion Peroxidase	PPL1	dorsolaterale posteriorelle
GSH	Glutathion		

	protocerebrale Neurone	sni	sniffer
PPL2	laterale posteriore protocerebrale Neurone	SNPc	Substancia Nigra Pars compacta
PPM1/2/3	dorsomediale posteriore protocerebrale Neurone	TAE	Tris Aceticacid EDTA
PVDF	Polyvinylidenfluorid	Taq	Thermus aquaticus
qRT-PCR	Quantitative REAL-Time Polymerase Chain Reaction	TH	Tyrosinhydroxylase
Rh1	Rhodopsin 1	TM6B	Balancer des dritten Chromosoms
RNA	Ribonucleinsäure	UAS	Upstream Activating Sequence
RNAi	RNA- Intefferenz	UAS	upstream activating sequence, cis
ROI	Region of Interest	UCHL-1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1
ROS	reaktive oxigene Spezies	ÜN	über Nacht
RT	Reverse Transkription / Transkriptase	UQ	Ubichinon
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction	UQH ₂	Ubichinol
Sb	Suboesophgusganglion	VMAT	Vesikulärer Monoamin Transporter
SCNA	a-Synuclein, NCBI-Notation	w ¹¹¹⁸	white, mutiert
Sco	Scoutoid, Balancer des zweiten Chromosoms	wt	wildtyp
sek	Sekunde	wt ^{cs}	Wildtyp Canton S
s-LNv	kleine ventrale laterale Neurone	x	Mal
SNCA	α-Synuclein- Gen	z.B.	zum Beispiel
		ZG	Zielgen
		ZNS	Zentrales Nervensystem
		α-syn	α-Synuclein

Literaturverzeichnis:

Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. Jan;25(1):239-52.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. Mar 24;287(5461):2185-95.

Agarwal A, Said TM (2005) Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int*. 95(4):503-7.

Allam MF (2002) Smoking and PD in twins. *Neurology*. Dec 10;59(11):1821-2; author reply 1822.

Alting-Mees MA, Short JM (1989) pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res*. Nov 25;17(22):9494. No abstract available.

Arking R, Buck S, Wells RA, Pretzlaff R (1988) Metabolic rates in genetically based long lived strains of *Drosophila*. *Exp Gerontol*.;23(1):59-76.

Armstrong, J. Scott, (1985) *Long-Range Forecasting*. Tables for Statistical Significance with Multiple Comparisons. New York, John Wiley.

Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Ogawa N (2004) Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med Okayama*. Oct;58(5):221-33.

Ascherio A, Zhang SM, Hernán MA, Kawachi I, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC (2001) Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol*. Jul;50(1):56-63.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.

Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science*. Feb 1;295(5556):865-8.

Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. *Science*. Feb 1;295(5556):865-8.

Auluck PK, Meulener MC, Bonini NM (2005) Mechanisms of Suppression of {alpha}-Synuclein Neurotoxicity by Geldanamycin in Drosophila. *J Biol Chem*. Jan 28;280(4):2873-8.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.

Axelrod J. (1971) Noradrenaline: fate and control of its biosynthesis. *Science*. Aug 13;173(997):598-606.

Bayersdorfer F (2005) Untersuchungen zur Degeneration von dopaminergen Neuronen im Gehirn von Drosophila melanogaster. Universität Regensburg. Diplomarbeit.

Belin AC, Westerlund M (2008) Parkinson's disease: a genetic perspective. *FEBS J*. Apr;275(7):1377-83.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. Dec;3(12):1301-6.

Beyer K, Ariza A (2007) Protein aggregation mechanisms in synucleinopathies: commonalities and differences. *J Neuropathol Exp Neurol*. Nov;66(11):965-74.

Bonini NM, Giasson BI (2005) Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell*. Nov 4;123(3):359-61.

Bonini, N (2004.4) Bonini insertions. FBrf0178823

Botella JA, Ulschmid JK, Gruenewald C, Moehle C, Kretschmar D, Becker K, Schneuwly S (2004) The Drosophila carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr Biol*. May 4;14(9):782-6.

Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*. Jul;2(3):484-94.

- Boveris A, Chance B** (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* Jul;134(3):707-16.
- Brand AH, Perrimon N** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* Jun;118(2):401-15.
- Burke WJ, Kumar VB, Pandey N, Panneton WM, Gan Q, Franko MW, O'Dell M, Li SW, Pan Y, Chung HD, Galvin JE.** Aggregation of alpha-synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine. *Acta Neuropathol.* 2008 Feb;115(2):193-203. Epub 2007 Oct 27.
- 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.* Nov 7;989(2):205-13.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ** (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul;80(14):4546-50.
- Bus JS, Aust SD, Gibson JE** (1974) Superoxide- and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 4;58(3):749-55.
- Bus JS, Aust SD, Gibson JE** (1975) Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* May;11(1):31-8.
- Campos AR, Grossman D, White K** (1985) Mutant alleles at the locus *elav* in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis. *J Neurogenet*;197-218
- Cavener DR** (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* Feb 25;15(4):1353-61.
- Cavener DR, Ray SC** (1991) Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res.* Jun 25;19(12):3185-92.
- Chance B, Hollunger G** (1963) Inhibition of electron and energy transfer in mitochondrial complex. I. Effects of Amytal, thiopental, rotenone, progesterone, and methylene glycol. *J Biol Chem.* Jan;238:418-31.
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC** (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell.* Nov 4;123(3):383-96.
- Charles V, Mezey E, Reddy PH, Dehejia A, Young TA, Polymeropoulos MH, Brownstein MJ, Tagle DA** (2000) Alpha-synuclein immunoreactivity of huntingtin polyglutamine aggregates in striatum and cortex of Huntington's disease patients and transgenic mouse models. *Neurosci Lett.* Jul 28;289(1):29-32.
- Chaudhuri A, Bowling K, Funderburk C, Lawal H, Inamdar A, Wang Z, O'Donnell JM** (2007) Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* parkinsonism model. *J Neurosci.* Mar 7;27(10):2457-67.

Chen L, Feany MB (2005) Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat Neurosci.* May;8(5):657-63. Epub 2005 Apr 17.

Chinta SJ, Andersen JK (2008) Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* Nov;1780(11):1362-7. Epub 2008 Mar 4.

Chun HS, Gibson GE, DeGiorgio LA, Zhang H, Kidd VJ, Son JH (2001) Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *J Neurochem.* Feb;76(4):1010-21.

Clayton DF, George JM (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* Jun;21(6):249-54.

Cochemé HM, Murphy MP (2008) Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem.* Jan 25;283(4):1786-98.

Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.* Nov;4(11):1318-20.

Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Harper JD, Williamson RE, Lansbury PT Jr (2000) Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. *Ann N Y Acad Sci.* 920:42-5.

Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Di Monte DA (2008) Letter regarding: "Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research". *Toxicol Sci.* May;103(1):215-6; author reply 217-8.

Coulom H, Birman S (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* Dec 1;24(48):10993-8.

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* Aug 27;305(5688):1292-5.

Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* Dec;1(3):249-54.

Deuschl G, Goddemeier C (1998) Spontaneous and reflex activity of facial muscles in dystonia, Parkinson's disease, and in normal subjects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Mar;64(3):320-4.

Di Monte DA (2003) The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol.* Sep;2(9):531-8.

Dickson, B (1996.3.29). Transgenic lines 1010T2 and 1010T10. Personal communication to FlyBase. FBrf0086268

Dunnett SB, Robbins TW (1992) The functional role of mesotelencephalic dopamine systems. *Biol Rev Camb Philos Soc.* Nov;67(4):491-518.

Dunnett SB, Robbins TW. The functional role of mesotelencephalic dopamine systems. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1992 Nov;67(4):491-518.

Durchschlag H, Zipper P (2007) X-ray-based structural models for the in situ X-irradiation of a sulfur-containing enzyme. *Radiat. Phys. Chem.* 76, 1295-1301.

Emdadul Haque M, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K, Ogawa N (2003) Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 1619(1):39-52.

Eriksen JL, Dawson TM, Dickson DW, Petrucelli L (2003) Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron.* Oct 30;40(3):453-6.

Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* Mar 23;404(6776):394-8.

Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* Mar 23;404(6776):394-8.

Feng Y, Gunter LE, Organ EL, Cavener DR (1991) Translation initiation in *Drosophila melanogaster* is reduced by mutations upstream of the AUG initiator codon. *Mol Cell Biol.* Apr;11(4):2149-53.

Friggi-Grelin F, Coulom H, Meller M, Gomez D, Hirsh J, Birman S (2003a) Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol.* Mar;54(4):618-27.

Friggi-Grelin F, Iché M, Birman S (2003b) Tissue-specific developmental requirements of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms. *Genesis.* Apr;35(4):260-9.

Gaeta A, Hider RC (2005) The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol.* Dec;146(8):1041-59.

Galvin JE (2006) Interaction of alpha-synuclein and dopamine metabolites in the pathogenesis of Parkinson's disease: a case for the selective vulnerability of the substantia nigra. *Acta Neuropathol.* Aug;112(2):115-26.

George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron.* Aug;15(2):361-72.

Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem.* Jan 26;276(4):2380-6.

Girardot F, Monnier V, Tricoire H (2004) Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *drosophila melanogaster*. *BMC Genomics.* Sep 30;5(1):74.

Graham DG (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol.* Jul;14(4):633-43.

Grießl S (2005) *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus für die Parkinsonerkrankung: Untersuchungen von oxidativem Stress und der Proteasomenfunktion. Universität Regensburg. Diplomarbeit

Grünewald C. (2002) Bedeutung von oxidativem Stress für die Neurodegenerationsmutante *sniffer* in *Drosophila melanogaster*. Universität Regensburg. Diplomarbeit

Grünewald, C (2006) Oxidativer Stress und Neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*. Universität Regensburg. Dissertation.

Gureviciene I, Gurevicius K, Tanila H (2008) Aging and alpha-synuclein affect synaptic plasticity in the dentate gyrus. *J Neural Transm.* Nov 11.

Han Q, Fang J, Ding H, Johnson JK, Christensen BM, Li J (2002) Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochem J.* Nov 15;368(Pt 1):333-40.

Hartenstein V (1993) *Atlas of Drosophila Development*. Cold Spring Harbour Press

Härtinger T (2008) Expression, Aggregation und Toxizität von a-SynT in *Drosophila melanogaster*. Universität Regensburg. Diplomarbeit.

Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science.* Jun 29;224(4656):1451-3.

Hertzman C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne D (1990) Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med.* 17(3):349-55.

Höglinger GU, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem.* Feb;84(3):491-502.

Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron.* Sep;21(3):633-42.

Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Apr;79(4):368-76.

Jensen PH, Nielsen MS, Jakes R, Dotti CG, Goedert M (1998) Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J Biol Chem.* Oct 9;273(41):26292-4.

Jo E, Fuller N, Rand RP (2002) Defective membrane interactions of familial Parkinson's disease mutant A30P alpha-synuclein. *St George-Hyslop P, Fraser PE. J Mol Biol.* 25;315(4):799-807.

Johannessen JN, Markey SP (1984) Assessment of the opiate properties of two constituents of a toxic illicit drug mixture. *Drug Alcohol Depend.* Jul;13(4):367-74.

- Kahle PJ** (2008) alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.*
- Kaushik P, Gorin F, Vali S** (2007) Dynamics of tyrosine hydroxylase mediated regulation of dopamine synthesis. *J Comput Neurosci.* Apr;22(2):147-60.
- Kim S, Hwang J, Lee WH, Hwang DY, Suk K** (2008) Role of protein kinase Cdelta in paraquat-induced glial cell death. *J Neurosci Res.* Jul;86(9):2062-70.
- Kolata G** (1983) Monkey model of Parkinson's disease. *Science.* May 13;220(4598):705.
- Kozak M** (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* Jan 31;44(2):283-92.
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O** (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* Feb;18(2):106-8.
- Kume K, Kume S, Park SK, Hirsh J, Jackson FR** (2005) Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J Neurosci.* Aug 10;25(32):7377-84.
- Kuwahara T, Koyama A, Gengyo-Ando K, Masuda M, Kowa H, Tsunoda M, Mitani S, Iwatsubo T** (2006) Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* Jan 6;281(1):334-40.
- Lachowicz, J.E., Sibley, D.R** (1997) Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors. *Pharmacol. Toxicol.* 81,105-113.
- Landis GN, Abdueva D, Skvortsov D, Yang J, Rabin BE, Carrick J, Tavare S, Tower J** (2004) Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 18;101(20):7663-8.
- Li H, Dryhurst G** (1997) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBHT-1): a putative nigral endotoxin of relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.* Oct;69(4):1530-41.
- Lieberman A** (2006) Depression in Parkinson's disease -- a review. *Acta Neurol Scand.* Jan;113(1):1-8.
- Lin DM, Goodman CS** (1994) Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron.* Sep;13(3):507-23.
- Lindahl PE, Öberg KE** (1961) The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res.*
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC** (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology.* Jun;48(6):1583-8.
- Löffler, G** (2001) *Basiswissen Biochemie.* Springer

LoPachin RM, Gavin T (2008) Response to "Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research". *Toxicol Sci.* May;103(1):219-21; author reply 222-3.

Lotharius J, Brundin P (2002) Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* Oct 1;11(20):2395-407.

Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* Aug;8(8):2804-15.

Martí MJ, Tolosa E, Campdelacreu J (2003) Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord.* Sep;18 Suppl 6:S21-7.

Matsuzawa A, Ichijo H (2005) Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal.* Mar-Apr;7(3-4):472-81.

McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* Jul;10(2):119-27.

McLean PJ, Hyman BT (2002) An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation. *Neurosci Lett.* May 3;323(3):219-23.

McLean PJ, Kawamata H, Hyman BT (2001) Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience.* 104(3):901-12.

Miller GW (2007) Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. *Toxicol Sci.* Nov;100(1):1-2.

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78,189-225.

Moussa CE, Mahmoodian F, Tomita Y, Sidhu A (2008) Dopamine differentially induces aggregation of A53T mutant and wild type alpha-synuclein: insights into the protein chemistry of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 25;365(4):833-9.

Nagatsu T, Levitt M, Udernfriend S (1964) Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem.* Sep;239:2910-7.

Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, Kaufman SA, Martin F, Sitney K, Denis P, Louis JC, Wypych J, Biere AL, Citron M (1999) Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem.* Apr 2;274(14):9843-6.

Nässel DR, Elekes K (1992) Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res.* Jan;267(1):147-67.

Neckameyer WS, Quinn WG (1989) Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* tyrosine hydroxylase. *Neuron*. Feb;2(2):1167-75.

Neckameyer WS, White K (1993) *Drosophila* tyrosine hydroxylase is encoded by the pale locus. *J Neurogenet*. Apr;8(4):189-99.

Ossowska K, Wardas J, Kuter K, Nowak P, Dabrowska J, Bortel A, Labus Ł, Kwieciński A, Krygowska-Wajs A, Wolfarth S (2005) Influence of paraquat on dopaminergic transporter in the rat brain. *Pharmacol Rep*. May-Jun;57(3):330-5.

Park SS, Schulz EM, Lee D (2007) Disruption of dopamine homeostasis underlies selective neurodegeneration mediated by alpha-synuclein. *Eur J Neurosci*. 26(11):3104-12.

Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL (1998) Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet*. Jun;19(2):171-4.

Peng J, Mao XO, Stevenson FF, Hsu M, Andersen JK (2004) The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. *J Biol Chem*. Jul 30;279(31):32626-32.

Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Feany MB (2007) Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *J Neurosci*. Mar 21;27(12):3338-46.

Pesah Y, Burgess H, Middlebrooks B, Ronningen K, Prosser J, Tirunagaru V, Zysk J, Mardon G (2005) Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of alpha-Synuclein in *Drosophila*. *Genesis*. Apr;41(4):154-9.

Phillips JP, Parkes TL, Hilliker AJ (2000) Targeted neuronal gene expression and longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol*. Dec;35(9-10):1157-64.

Piette J (1991) Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B*. 11(3-4):241-60.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. Jun 27;276(5321):2045-7.

Radad K, Gille G, Rausch WD (2008) Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture. *Toxicol In Vitro*. Feb;22(1):68-74.

Rajagopalan S, Andersen JK (2001) Alpha synuclein aggregation: is it the toxic gain of function responsible for neurodegeneration in Parkinson's disease? *Mech Ageing Dev*. Sep 30;122(14):1499-510.

Ramachandiran S, Hansen JM, Jones DP, Richardson JR, Miller GW (2007) Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol Sci.* Jan;95(1):163-71.

Ratnakumar, K., Desplan, C (2004.10). P{longGMR-GAL4}2. FBrf0179874

Rice-Evans C, Burdon R (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res.* 32(1):71-110.

Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW (2005) Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci.* Nov;88(1):193-201.

Robertson, K (2001.1.31) P{UAS-GFP.nls}14. Personal communication to flybase. FBrf0132178

Ross CA, Smith WW (2007) Gene-environment interactions in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 13 Suppl 3:S309-15.

Ruan L, Yu Z, Fang B, He W, Wang Y, Shen P (2004) Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst Appl Microbiol.* May;27(3):286-9.

Saha AR, Hill J, Utton MA, Asuni AA, Ackerley S, Grierson AJ, Miller CC, Davies AM, Buchman VL, Anderton BH, Hanger DP (2004) Parkinson's disease alpha-synuclein mutations exhibit defective axonal transport in cultured neurons. *J Cell Sci.* Mar 1;117(Pt 7):1017-24.

Sai Y, Wu Q, Le W, Ye F, Li Y, Dong Z (2008) Rotenone-induced PC12 cell toxicity is caused by oxidative stress resulting from altered dopamine metabolism. *Toxicol In Vitro.* Sep;22(6):1461-8.

Sato M, Bremner I (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med.* Mar;14(3):325-37. Review.

Sayre LM, Perry G, Smith MA (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. Sayre LM, Perry G, Smith MA. *Chem Res Toxicol.* Jan;21(1):172-88. Epub 2007 Dec 4.

Schultz W (1999) The Reward Signal of Midbrain Dopamine Neurons. *News Physiol. Sci.* Dec;14:249-255.

Shen XM, Dryhurst G (1996) Further insights into the influence of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: reaction pathways of potential relevance to Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol.* Jun;9(4):751-63.

Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol.* Jan;179(1):9-16.

Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H (2003) Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res.* Jun 27;976(2):243-52.

- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K** (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. Oct 31;302(5646):841.
- Smargiassi A, Mutti A, De Rosa A, De Palma G, Negrotti A, Calzetti S** (1998) A case-control study of occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease in the Emilia-Romagna region of Italy. *Neurotoxicology*. Aug-Oct;19(4-5):709-12.
- Snyder SH, D'Amato RJ** (1985) Predicting Parkinson's disease. *Nature*. Sep 19-25;317(6034):198-9.
- Sweeney ST, Broadie K, Keane J, Niemann H, O'Kane CJ** (1995) Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron*. Feb;14(2):341-51.
- Trinh K, Moore K, Wes PD, Muchowski PJ, Dey J, Andrews L, Pallanck LJ** (2008) Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in *Drosophila* models of Parkinson's disease. *J Neurosci*. Jan 9;28(2):465-72.
- True JR, Edwards KA, Yamamoto D, Carroll SB** (1999) *Drosophila* wing melanin patterns form by vein-dependent elaboration of enzymatic prepatterns. *Curr Biol*. Dec 2;9(23):1382-91.
- Ulmer TS, Bax A** (2005) Comparison of structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein and Parkinson disease variants. *J Biol Chem*. Dec 30;280(52):43179-87.
- Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL** (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem*. Mar 11;280(10):9595-603. Epub 2004 Dec 22.
- Vekrellis K, Rideout HJ, Stefanis L** (2004) Neurobiology of alpha-synuclein. *Mol Neurobiol*. Aug;30(1):1-21
- Vincent HK, Taylor AG** (2006) Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. Mar;30(3):400-18.
- Volles MJ, Lansbury PT Jr** (2003) Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*. Jul 8;42(26):7871-8.
- Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT Jr** (2001) Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry*. Jul 3;40(26):7812-9.
- Wan L, Ottinger E, Cho S, Dreyfuss G** (2008) Inactivation of the SMN complex by oxidative stress. *Mol Cell*. 200825;31(2):244-54.
- Watabe M, Nakaki T** (2007a) ATP depletion does not account for apoptosis induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain in human dopaminergic cells. *Neuropharmacology*. Feb;52(2):536-41.

Watabe M, Nakaki T (2007b) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-elicited dopamine redistribution from vesicles to cytosol in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther.* Nov;323(2):499-507.

Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol.* 112:531-52.

Windholz M, Budavari S, Blumetti RF, Otterbein ES (1983) *The Merck Index.* Merck & Co Inc 2194 pp

Wittkopp PJ, True JR, Carroll SB (2002) Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development.* Apr;129(8):1849-58.

Wright TR (1987) The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet.*;24:127-222.

Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA (2002) Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med.* 8(6):600-6.

Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R, Lu B (2005) Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 20;102(38):13670-5.

Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P (1989) Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurol Scand Suppl.*;126:47-54.

Yu, S., Ueda, K., Chan, P (2005) Alpha-synuclein and dopamine metabolism. *Mol. Neurobiol.* 31, 243-254.

Zhang F, Dryhurst G (1994) Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *J Med Chem.* Apr 15;37(8):1084-98.

Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci.* Jul;13(7):290-6.

Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci.* Jul;13(7):290-6.

Dank an...

Prof. Dr. Stephan Schneuwly für bedingungslose Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Dr. José Botella für die fruchtbare Kooperation, die entscheidend für das Entstehen dieser Arbeit war.

Dr. Aaron Voigt für die HPLC- Messungen.

Dr. med. Jochen Klucken für die WTsynEGFP Δ 155- cDNA und die Zellkulturproben.

PD Dr. Alois Hofbauer für die fachliche und moralische Hilfe.

Dr. Helmut Durchschlag für die langjährige Förderung und Zusammenarbeit.

Dr. Juan Navarro, Dr. Christoph Grünewald, Dr. Monika Mügsl, Dr. Franz Glaser, Dr. Johannes Lanskron, Dr. Nikolai Peschl, Dr. Corinna Wülbeck, Dr. Dirk Rieger, Prof. Dr. Charlotte Förster und Prof. Dr. Ralf Stanewsky für die vielen Verbrauchsmaterialien und die fachlichen Ratschläge.

Ursula Roth und Renate Reng für die Unterstützung bei Histologie und Keimbahntransformation

Evi Köppel für das viele Fliegenfutter und die Hilfe beim Faxen und anderen administrativen Angelegenheiten.

Cornelia Bleyl für die Kommentare zum Manuskript.

meine Familie und meine Freunde für alles andere.

„An den Scheidewegen des Lebens stehen keine Wegweiser.“

Charlie Chaplin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegenden Dissertation selbständig angefertigt und dabei kein anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Daten und Abbildungen sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder einer Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

Regensburg, im Februar 2009

Florian Bayersdorfer