

**Identifizierung und Charakterisierung von  
ATP13A2-Varianten und ihre Bedeutung für  
neurodegenerative Erkrankungen**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln**

vorgelegt von  
André Heimbach  
aus Essen

Köln 2009

Die vorliegende Dissertation wurde mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln am Institut für Humangenetik (Direktorin: Prof. Dr. Brunhilde Wirth) der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thorsten Hoppe und Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Thorsten Hoppe

Prof. Dr. Christian Kubisch

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 12. Januar 2010

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.1.1	Parkinsonismus	1
1.1.2	Kufor-Rakeb Syndrom und <i>ATP13A2</i>	5
1.2	P-Typ ATPasen	6
1.2.1	Stofftransport durch biologische Membranen	6
1.2.2	ATP betriebene Pumpen	6
1.2.3	Struktur von P-Typ ATPasen	7
1.2.4	Funktionsmechanismus der P-Typ ATPasen	8
1.2.5	Klassifizierung der P-Typ ATPasen	10
1.2.5.1	Typ I ATPasen	11
1.2.5.2	Typ II ATPasen	11
1.2.5.3	Typ III ATPasen	11
1.2.5.4	Typ IV ATPasen	12
1.2.5.5	Typ V ATPasen	12
1.2.6	Mutationen in ATPasen als Ursache für Krankheiten	13
1.3	Zielsetzungen der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Chemikalien	16
2.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.3	Allgemeine Lösungen	16
2.4	Enzyme	17
2.5	Kommerzielle Reagenziensysteme (“Kits”)	17
2.6	Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	17
2.7	Klonierungsvektoren	18
2.8	Verwendete Geräte	18
2.9	Datenbanken und weitere Internetseiten	19
2.10	Software	20
2.11	Molekularbiologische Methoden	20
2.11.1	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	20
2.11.2	Primerdesign	20
2.11.3	PCR-Reaktionsansätze	21

2.11.3.1	2-Schritt-PCR	21
2.11.3.2	Multiplex-PCR	22
2.11.3.3	Sequenzier-PCR	23
2.11.3.4	Zielgerichtete Mutagenese	24
2.11.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	25
2.11.5	Gel-Elektrophorese	26
2.11.5.1	Aufreinigung von Nukleinsäuren	26
2.11.5.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	27
2.11.5.3	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	27
2.12	Expressionsanalyse	28
2.12.1	Herstellung der Hybridisierungssonde für den Northern-Blot	28
2.12.2	Radioaktive Markierung der Northern-Blot-Sonde	28
2.12.3	Northern-Blot Verfahren	28
2.12.4	Substanzen für Northern-Blot Analyse	29
2.13	Klonierung	29
2.13.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	30
2.13.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	30
2.13.3	TA-Klonierung	31
2.13.4	Klonierung über Restriktionsendonukleasen-Schnittstellen	32
2.13.5	Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	32
2.13.6	Dephosphorylierung	32
2.13.7	Ligation über Restriktionsschnittstellen	33
2.13.8	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	33
2.13.9	Glycerolstock von transformierten Bakterien	33
2.13.10	Gateway-Klonierung	34
2.13.11	DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (Plasmid-Präparation)	34
2.13.12	DNA-Isolierung aus einer BAC-Kultur	34
2.13.13	DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen	35
2.13.14	RNA-Isolierung aus Fibroblasten	36
2.14	Analyse genomischer Maus-DNA	36
2.14.1	Herstellung einer Southern-Blot Membran	36
2.14.2	Herstellung und radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde	37
2.14.3	Southern-Blot Verfahren	37
2.14.4	Puffer und Substanzen für Southern-Blot Verfahren	37
2.15	Zellbiologische Methoden	38
2.15.1	Kultivierung von Säugerzellen	38
2.15.2	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	39

2.15.3	Bestimmung der Zellzahl	39
2.15.4	Transfektion eukaryotischer Zellen	39
2.15.4.1	Transfektion von Plasmid-DNA mittels Lipofectamin 2000	39
2.15.4.2	Transfektion von Plasmid-DNA mittels FuGENE HD	40
2.15.5	Zell-Ernte und -Lyse	40
2.15.6	Proteinquantifizierung durch Bicinchoninsäure (BCA-Assay)	41
2.16	<i>Atp13a2</i> -Knock-Out	41
2.16.1	Murine embryonale Fibroblasten (MEFs)	41
2.16.2	Mitomycin C-Behandlung	41
2.16.3	Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen)	42
2.16.4	Aufreinigung des Targeting-Vektors	43
2.16.5	Transfektion von ES-Zellen	43
2.16.6	Selektion positiv-transfizierter ES-Klone	44
2.16.7	Isolierung von ES-Zellklonen	44
2.16.8	DNA-Isolierung aus ES-Zellen	45
2.16.9	Auftauen und Expandieren positiver ES-Klone	45
2.16.10	Blastozysten-Injektion und -Transfer	45
2.17	Proteinbiochemische Methoden	46
2.17.1	Western-Blot	46
2.17.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.17.1.2	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	47
2.17.1.3	Immunoblot	47
2.17.1.4	Chemilumineszenz-Detektion	48
2.17.1.5	Puffer und Substanzen zur Western-Blot Analyse	48
2.17.2	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	49
2.17.3	N-Glykosylierung	51
2.17.4	Ultrazentrifugation	51
2.17.5	MTT-Assay	52
2.17.6	Lipid-Analyse	53
2.17.7	Immunpräzipitation (IP)	53
2.18	Statistische Auswertungen	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
3.1	Ausgangssituation	54
3.2	Stammbaumanalyse	56
3.3	Expressionsanalyse von <i>ATP13A2</i>	57
3.4	Analyse von Fibroblasten eines KRS-Patienten	58

3.4.1	Sequenzierung von <i>ATP13A2</i>	58
3.4.2	Quantifikation der <i>ATP13A2</i> -Transkriptmenge	60
3.4.3	Zellvitalität nach Induktion von Zellstress	61
3.4.4	Einfluss von <i>ATP13A2</i> auf die Autophagie	63
3.4.5	Analyse des Lipidprofils	65
3.5	Charakterisierung verschiedener <i>ATP13A2</i> -Varianten in Säugerzellen	66
3.5.1	Übersicht über die untersuchten <i>ATP13A2</i> -Mutationen	66
3.5.2	Proteinstabilität der <i>ATP13A2</i> -Mutanten	68
3.5.3	N-Glykosylierung von <i>ATP13A2</i> und <i>ATP13A2</i> -Mutanten	69
3.5.4	Subzelluläre Lokalisation von <i>ATP13A2</i> und der KRS-Proteinmutanten	71
3.5.5	Subzelluläre Lokalisation mittels Immunfluoreszenzanalyse	72
3.5.6	Zelluläre Proteindegradierung von <i>ATP13A2</i> und <i>ATP13A2</i> -Mutanten	77
3.5.7	Halbwertszeit des <i>ATP13A2</i> -Proteins	79
3.5.8	Analyse einer Ubiquitinierung von <i>ATP13A2</i>	80
3.6	Generierung einer <i>Atp13a2 Knock-Out</i> Maus	81
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	Analyse des <i>ATP13A2</i> -Gendefekts anhand von KRS-Patientenfibroblasten	87
4.1.1	Einfluss von <i>ATP13A2</i> auf das Lipidprofil	87
4.1.2	Beteiligung von <i>ATP13A2</i> an der Autophagie	89
4.1.3	Analyse der Vitalität nach Induktion von Zellstress	91
4.2	Expressionsanalyse von <i>ATP13A2</i>	93
	Analyse von <i>ATP13A2</i> und weiteren Gen-Varianten anhand transienter	
4.3	Überexpression in Säugerzellen	94
4.4	<i>Atp13a2-Knock-Out</i> Maus	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>118</b>
	<b>Teilpublikation</b>	<b>123</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>124</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A	Adenin
AA	Aminosäure
A. dest	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ABI	Applied Biosystems
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure; 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure)
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	DNA-Kopie einer RNA
comp-het	<i>compound</i> -heterozygot
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylidol
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
Del	Deletion
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
dpc	<i>days post coitum</i>
DTT	Dethiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	embryonale Feederzellen (murin)
ER	endoplasmatisches Reticulum
ES	embryonale Stammzellen (murin)
F	<i>Forward</i> -Primer (Primer in Vorwärtsrichtung)
F <sub>ab</sub>	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
F <sub>c</sub>	konstanter Anteil eines Antikörpers
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm

h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i> (menschliche embryonale Leberzellen)
het	heterozygot
hom	homozygot
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin aus der Gruppe G
IgM	Immunglobulin aus der Gruppe M
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
J	Joule
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock out</i>
KRS	Kufor-Rakeb Syndrom
l	Liter
LAMP	Lysosom assoziiertes Membranprotein
LB	Luria Bertani
m	milli (Faktor 10 <sup>-3</sup> )
M	Molar
mA	Milli-Ampere
Mb	Megabasenpaare
min	Minuten
MMC	Mytomycin C
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
n	nano (Faktor 10 <sup>-9</sup> )
N	Normale
NaCl	Kochsalz
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
Neo	Neomycin
OD <sub>n</sub>	optische Dichte (Extinktion bei einer Wellenlänge von n Nanometern)
p	pico (Faktor 10 <sup>-12</sup> )

PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	<i>Parkinson Disease</i> (Parkinson Erkrankung)
PDI	Protein Disulfid Isomerase
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIC	Proteasen-Inhibitor-Cocktail
R	<i>Reverse-Primer</i> (Primer in Rückwärtsrichtung)
rH	<i>relative Humidity</i> (relative Luftfeuchtigkeit)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembrandomäne
U	<i>unit</i> - definierte Einheit der Enzymaktivität
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1. Einleitung

## 1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Unter dem Begriff Neurodegeneration wird eine Reihe von Erkrankungen zusammengefasst, die durch den fortschreitenden Verlust von Neuronen gekennzeichnet sind. Dazu gehören beispielsweise die Alzheimerkrankheit, Chorea Huntington und der Morbus Parkinson. Auch wenn es sich um verschiedene Krankheiten mit jeweils charakteristischen Symptomen handelt, zeigen sie auf zellulärer Ebene Gemeinsamkeiten, bei denen die Mechanismen wie Proteindegradierung, Mitochondrienfehlfunktion, programmierter Zelltod (Apoptose) und axonaler Transport beeinträchtigt sind. Da aufgrund einer zunehmend besseren medizinischen Versorgung sowie einer Verschiebung der Altersstruktur, die insbesondere in den Industriestaaten beobachtet wird, in der Zukunft von einer weiteren Erhöhung der Patientenzahl auszugehen ist, sind Fortschritte in Diagnose und Therapie von allgemeinem Interesse.

### 1.1.1 Parkinsonismus

Der Morbus Parkinson (PD) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen in Deutschland. Das Verständnis dieser Erkrankung zugrunde liegenden Pathomechanismen, die ein selektives Absterben von dopaminergen Neuronen zur Folge haben, ist bislang noch unvollständig. Dies ist der Hauptgrund, warum PD bis dato nicht heilbar ist und bei zunehmender Krankheitsdauer mit abnehmender Effizienz lediglich symptomatisch behandelt werden kann. Erste Symptome treten bei der PD im Allgemeinen in der fünften oder sechsten Lebensdekade auf und die schwerwiegenden motorischen Störungen verlaufen meist progressiv, mit einer altersabhängig steigenden Häufigkeit. Während man bei der Gesamtbevölkerung von einer 0,3 %igen Prävalenz ausgeht, steigt der Anteil betroffener Personen exponentiell mit dem Alter und beträgt für die Altersgruppe über 65 Jahre bereits 1 % und 5 % für die Altersgruppe von 85 Jahren (Lang and Lozano 1998a, b). Zu den Hauptsymptomen der Parkinson Krankheit zählen Tremor (unwillkürliches Zittern), Rigor (Muskelstarre), Akinese (Bewegungsmangel, bzw. verlangsamte Initiierung von Bewegungen) und posturale Instabilität (Haltungsinstabilität) (Lang and Lozano 1998a, b). Zusätzlich können verschiedene sensorische, vegetative, psychische und kognitive Begleitsymptome auftreten; in späteren Krankheitsstadien zeigen bis zu ein Drittel der Patienten eine Demenz. Die Ätiologie dieser fortschreitenden und schwer belastenden Gehirnerkrankung ist komplex und derzeit noch weitgehend unbekannt. Gesichert ist, dass sie auf einer Kombination aus genetischen Faktoren (siehe unten) und Umweltfaktoren basiert. Hinsichtlich verursachender Umweltfaktoren ist zum Beispiel bekannt, dass das Neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) ein Syndrom verursacht,

welches klinisch und pathologisch dem idiopathischen Parkinsonismus ähnelt (Langston *et al.*, 1983) und somit zum symptomatischen Parkinsonismus gezählt wird (Weiner, 2004). Diese Substanz gelangt nach ihrer Umsetzung zu MPP<sup>+</sup> in die dopaminergen Neuronen. Dort wirkt sie inhibitorisch auf den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, was schließlich zum Zelltod führt (Singer und Ramsay, 1999). Ein prinzipiell gleicher Effekt wird bei Rotenon beobachtet (Betarbet *et al.*, 2000).

Erst durch die wissenschaftliche Untersuchung seltener monogener PD-Formen, die ca. 5-10 % aller PD-Fälle ausmachen (Gasser, 2001), konnten molekulare Risikofaktoren und Mechanismen, die die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung erhöhen bzw. die Erkrankung auslösen, identifiziert werden. Die Identifizierung dieser Gene und ihrer Funktionen lieferte erste grundlegende Erkenntnisse über die Ursachen der PD und eröffnet somit die Möglichkeit, über das Verständnis der molekularen Pathogenese eine Optimierung der medizinischen Versorgung zu erhalten.

Tab. 1.1: Übersicht über die aktuell bekannten Gene, die mit einer monogen vererbten Form des Parkinsonismus assoziiert sind (nach Klein und Lohmann-Hedrich, 2007).

Akronym	Vererbung	Lokus	Gen	Bemerkung
<b>etablierte monogene PD-Formen</b>				
<i>PARK1</i>	AD	4q21-q23	<i>SNCA</i>	Hauptbestandteil des Lewy-Körpers
<i>PARK2</i>	AR	6q25-q27	<i>Parkin</i>	E3 Ubiquitin-Protein Ligase
<i>PARK4</i>	AD	4q21-q23	<i>SNCA</i>	Hauptbestandteil des Lewy-Körpers
<i>PARK6</i>	AR	1p35-p36	<i>PINK1</i>	Mitochondriale Proteinkinase
<i>PARK7</i>	AR	1p36	<i>DJ-1</i>	Chaperon, Schutz vor oxidativem Stress
<i>PARK8</i>	AD	12q12	<i>LRRK2</i>	Proteinkinase
<i>PARK9</i>	AR	1p36	<i>ATP13A2</i>	Lysosomale P-Typ ATPase
<b>monogene PD-Formen aus einzelnen Familien</b>				
<i>PARK5</i>	AD	4p14	<i>UCHL-1</i>	Funktion bei Ubiquitin-vermittelter Proteindegradierung
<i>PARK13</i>	unbekannt	2p12	<i>Omi/HtrA2</i>	Serin-Protease
nicht vergeben	unbekannt	5q23.1-q23.3	<i>Synphilin-1</i>	Interaktion mit SNCA; Substrat von Parkin, Bestandteil des Lewy-Körpers
nicht vergeben	unbekannt	2q22-q23	<i>NR4A2</i>	Mitglied einer nukleären Rezeptorfamilie
nicht vergeben	unbekannt	15q25	<i>POLG</i>	katalytische Untereinheit der mtDNA Polymerase
<b>monogene PD-Form mit unbekannter Relevanz</b>				
<i>PARK3</i>	AD	2p13	unbekannt	Mutation im/um Sepiapterin Reduktase Gen mit PD assoziiert

AD, autosomal-dominant; AR, autosomal-rezessiv; SNCA,  $\alpha$ -Synuclein; PINK1, *PTEN-induced kinase*; LRRK2, *leucine-rich repeat kinase 2*; UCHL-1, *ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1*; POLG, *DNA polymerase  $\gamma$*

Die bislang für die Parkinson Erkrankung bekannten Gene sind:  $\alpha$ -Synuclein (PARK1), Parkin (PARK2), UCH-L1 (PARK5; Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1), PINK1 (PARK6; PTEN induzierte Kinase-1), DJ-1 (PARK7) und LRRK2 (PARK8) (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002; Valente *et al.*, 2004; Bonifati *et al.*, 2003; Zimprich *et al.*, 2004). Zudem wurde kürzlich eine Assoziation des Gens *FBXO7* mit Parkinsonismus beschrieben (Shojaee *et al.*, 2008; Di Fonzo *et al.*, 2009). Mutationen in den assoziierten Genen führen zu verschiedenen funktionellen Zell- bzw. Organstörungen wie zum Beispiel einem erhöhten oxidativen Stress, einer quantitativen Zunahme falsch gefalteter Proteine mit pathologischer Proteinablagerung oder einer Beeinträchtigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems, das für den Proteinabbau mitverantwortlich ist (Rao und Bredesen, 2004). Durch die Identifizierung dieser Gene konnten somit molekulare Signalwege der Erkrankung erstmalig identifiziert werden, die wiederum weiter analysiert werden können, um die Pathogenese der PD zu verstehen und somit die Erkrankung zukünftig gezielter (zum Beispiel pharmakologisch) therapieren zu können. Es sind etwa zehn monogene Parkinson-Gene bzw. deren chromosomale Lokalisationen bekannt, wobei die Aufklärung jedes einzelnen Krankheitsgens eine wesentliche Wissenserweiterung über die Krankheitsentstehung bedeutet.

Auf pathologischer Ebene ist die Parkinson-Erkrankung durch den Verlust von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* gekennzeichnet, was zu einer Depletion des Dopamins (DA) führt. Bei DA handelt es sich um einen Neurotransmitter, der die Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin darstellt. Dieses Hormon ist zentral an der Steuerung der extrapyramidalen Motorik im nigrostriatalen DA-System beteiligt. Auf diesem Wege werden die Befehle des Nervensystems an die Muskulatur weitergeleitet. Zusätzlich können bei der PD neben den dopaminergen auch nicht-dopaminerge Zellgruppen beeinträchtigt sein. Des Weiteren kommt es in den meisten PD-Fällen zur Bildung cytoplasmatischer Einschlüsse, die Lewy-Körper (*Lewy Body*) genannt werden. Hierbei handelt es sich um kugelförmige, eosinophile Aggregate, die sich in allen betroffenen Gehirnregionen finden lassen und immuno-positiv für  $\alpha$ -Synuclein (Spillantini *et al.*, 1997), Ubiquitin (Iwatsubo *et al.*, 1996), proteasomale Untereinheiten (Li *et al.*, 1997) und andere Proteine wie Parkin oder UCHL1 (Schlossmacher *et al.*, 2002) sind. Es ist derzeit unklar, ob die Bildung dieser intrazellulären Einschlüsse cytotoxisch ist und somit das Fortschreiten der Neurodegeneration unterstützt, oder ob ihnen eine cytoprotektive Eigenschaft zugeschrieben werden kann, indem falsch gefaltete Proteine gebunden werden und somit zum Beispiel das Ubiquitin-Proteasom-Degradationssystem nicht überlastet wird.

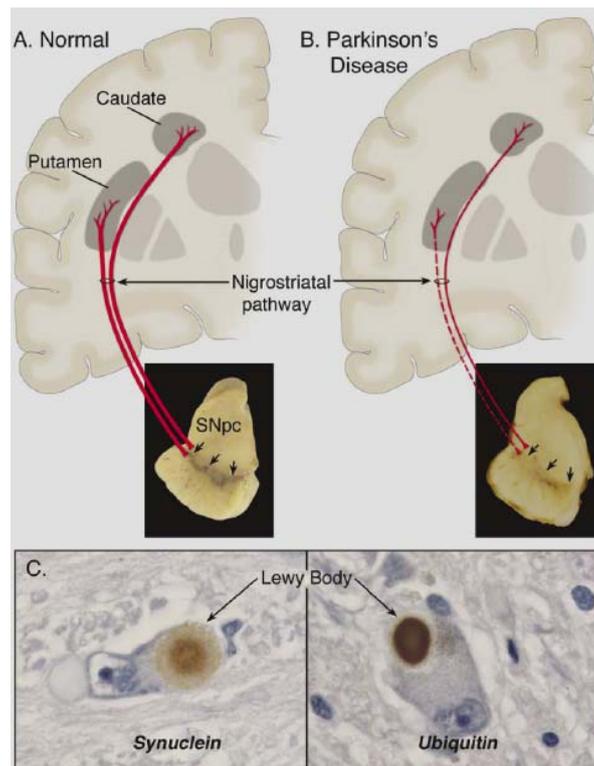


Abb. 1.1: In der oberen Bildreihe ist die nigrostriatale Nervenbahn (rot) einer gesunden Person (A) und eines PD-Patienten (B) dargestellt. Diese enthält dopaminerge Neuronen, deren Zellkörper in der *Substantia nigra pars compacta* liegen und zu den Basalganglien und Synapsen im Striatum (Putamen und Caudatus) projizieren. Im Vergleich zur gesunden Person kommt es beim PD-Patienten zu einem progressiven Verlust der dopaminergen Neurone, was mit einer Depigmentierung einhergeht (Pfeile). Die untere Bildreihe zeigt typische Zelleinschlüsse, die häufig in dopaminergen Neuronen beobachtet werden und Lewy-Körper genannt werden (C). Diese enthalten sowohl  $\alpha$ -Synuclein als auch Ubiquitin. Das Bild wurde einem Übersichtsartikel von W. Dauer und S. Przedborski (2003) entnommen.

Derzeit gibt es noch keinen Therapieansatz, der die Ursache der PD behandelt und somit die fortschreitende Degeneration der Nervenzellen stoppen könnte. Lediglich einzelne Symptome werden durch die Gabe von Medikamenten in den ersten Jahren bis Jahrzehnten nach dem Erstauftreten der Erkrankung gelindert. Bei der Therapie wird bevorzugt Levodopa (L-Dopa) (Cotzias *et al.*, 1969), eine Vorstufe des Dopamins, verwendet. Es kann im Gegensatz zum Dopamin selbst die Blut-Hirn-Schranke passieren. Zusätzlich werden Dopaminagonisten, die an den Dopaminrezeptoren die Wirkung von Dopamin nachahmen, sowie COMT-Inhibitoren, die das Dopamin und Levodopa abbauende Enzym Catechol-O-Methyl-Transferase hemmen, eingesetzt. Eine langfristige Parkinson-Behandlung mit L-Dopa führt allerdings bei etwa 75 % der Patienten zu motorischen Komplikationen. Zwar ist der pathogene Einfluss des Medikaments weitestgehend noch ungeklärt, jedoch könnte die Verabreichung das Risiko für diese Symptome erhöhen (Fahn, 1996). Daher existiert aktuell oftmals kein langfristiger effektiver Therapieansatz, so dass im Laufe der Erkrankung die Behandlung ständig an den sich verändernden Krankheitszustand angepasst werden muss und es häufig zu einer zunehmenden Verschlechterung der Behandelbarkeit kommt. Dies gilt insbesondere auch für das häufige begleitende Symptom der Demenz.

### 1.1.2 Kufor-Rakeb Syndrom und *ATP13A2*

Najim Al-Din berichtete erstmals 1994 von einer jordanischen Familie, in der einige Mitglieder neben den PD-Kardinalssymptomen zusätzlich unter pallido-pyramidaler Degeneration, supranukleärer Blickparese und Demenz litten (Najim Al-Din *et al.*, 1994). Entsprechend dem Heimatort der von Najim Al-Din beschriebenen Familie wurde diese Erkrankung Kufor-Rakeb Syndrom (KRS) genannt. Während die Patienten bei der Geburt und in der Kindheit unauffällig waren, manifestierten sich die ersten Symptome dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung im Jugendalter (zwischen 12 bis 16 Jahren), was beispielsweise zu einer generellen Verlangsamung der motorischen Aktivität führte (Hypokinesie). Davon betroffen waren Sprache, Mimik und Extremitäten. Es wurden keine Abnormalien bezüglich des Skeletts oder kardiovaskulären Systems festgestellt. Allerdings ergaben MRT-Analysen, dass die Patienten eine in Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer teilweise weitreichende Gehirnatrophie aufzeigten. Die Behandlung mit Levodopa wirkte sich positiv auf die extrapyramidale Dysfunktion aus (Najim Al-Din *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2005).

Erst anhand einer zweiten Familie aus Chile, in der betroffene Personen KRS-typische Symptome zeigten, konnte die genetische Ursache dieser Erkrankung sowohl in der jordanischen als auch in der chilenischen Familie aufgeklärt werden (Ramirez *et al.*, 2006). Insgesamt wurden von Ramirez *et al.* drei verschiedene Mutationen im *ATP13A2*-Gen identifiziert, welches für eine lysosomale P-Typ Typ V ATPase kodiert.

Während bei den Betroffenen in der jordanischen Familie aufgrund der konsanguinen Beziehung der Eltern die *ATP13A2*-Mutation c.1632\_1653dup22 homozygot vorlag, waren die chilenischen Patienten *compound*-heterozygot für zwei verschiedene *ATP13A2*-Mutationen (c.1306+5G→A, c.3057delC). Über die genaue Funktion und Substratspezifität von *ATP13A2* liegen bislang keine detaillierten Erkenntnisse vor. Da diese drei Mutationen zu einem präterminalen Stop der Proteintranslation und folglich zu einer Trunkierung dieses Membranproteins führen, ist es wahrscheinlich, dass diese strukturellen Störungen zu einem Funktionsverlust der ATPase führen.

## 1.2 P-Typ ATPasen

Die Gruppe der ATP betriebenen Pumpen, die im Allgemeinen dem Transport von Ionen und Molekülen durch biologische Membranen dienen, gliedert sich in vier Gruppen. Dazu gehören ABC-Transporter sowie die F-Typ-, V-Typ- und P-Typ ATPasen.

### 1.2.1 Stofftransport durch biologische Membranen

Die biologische Membran stellt eine selektive Barriere zwischen Zelle und ihrer Umwelt bzw. Cytosol und den Zellkompartimenten dar und dient dem gerichteten Stoff-, Energie- und Informationsaustausch. Da vor allem hydrophile Moleküle wie zum Beispiel Glukose, Aminosäuren und Ionen die Membran nicht durchdringen können, wird ihr Transport durch integrale Transmembranproteine ermöglicht. Man unterscheidet zwei Transportprinzipien. Zum einen ermöglicht die passive Diffusion über kanalbildende Proteine den Transport von kleinen hydrophoben Molekülen entlang eines Konzentrationsgradienten, der keine Energie benötigt. Im Gegensatz dazu erfolgt der aktive Transport von Molekülen entgegen eines Konzentrationsgefälles und benötigt Energie. Diese stammt entweder aus der ATP-Hydrolyse oder dem parallelen Co-Transport eines anderen Stoffes. Dabei handelt es sich oftmals um  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{H}^+$ -Ionen.

### 1.2.2 ATP betriebene Pumpen

Die ATPasen dienen dem Transport von Ionen oder kleinen Molekülen, der oftmals entgegen eines Gradienten erfolgt. Die dafür nötige Energie stammt aus der Hydrolyse von ATP. Man unterscheidet vier Klassen membranständiger ATPasen:

Bei der ersten handelt es sich um die ABC-Transporter (*ATP binding cassette*), die sowohl für Prokaryoten als auch für Eukaryoten beschrieben worden sind. Neben ihrer Exportfunktion von zum Beispiel toxischen Stoffen aus der Zelle, sorgen sie bei Prokaryoten zusätzlich für den Import von Nährstoffen. Die meisten eukaryotischen ABC-Transporter liegen als Dimere vor und setzen sich aus einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer hydrophilen Domäne, die die ATP-Kassette enthält, zusammen. Ein bekannter Vertreter ist CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), dessen gestörte Funktion zur cystischen Fibrose führt (Kerem *et al.*, 1989).

Die F-Typ ATPasen finden sich in Chloroplasten, Mitochondrien und Bakterien. Sie werden auch ATP-Synthasen genannt, da sie den Transport von Protonen entlang des elektrochemischen Gradienten zur ATP-Synthese nutzen. Dabei bildet die membranständige  $F_0$ -Untereinheit den Kanal und der  $F_1$ -Abschnitt dient der ATP-Synthese.

Bei den V-Typ ATPasen verhält es sich funktionell umgekehrt. Sie nutzen die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie zur Generierung eines Protonengradienten. Der strukturelle Aufbau ähnelt dem der F-Typ ATPasen. So bildet der  $V_0$ -Teil den Kanal und die  $V_1$ -Untereinheit katalysiert die ATP-Hydrolyse. Sie finden sich in vielen Kompartimenten wie zum Beispiel Lysosomen, Vakuolen und Vesikeln und haben dort Einfluss auf den niedrigen pH-Wert (Wilkens *et al.*, 1999).

Die vierte Gruppe bilden die P-Typ ATPasen, die in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Eukaryoten vorkommen und häufig dem Transport von ein- und zweiwertigen Kationen dienen. Dabei ist jeder Vertreter auf ein oder wenige Substrate festgelegt. Ein spezifisches Kennzeichen für diese Transporter ist, dass sie während des Transportprozesses an einem konservierten Aspartat des Proteins phosphoryliert werden. Die meisten P-Typ ATPasen besitzen nur eine Untereinheit ( $\alpha$ -UE), während es nur wenige Vertreter dieser Gruppe gibt, die eine zusätzliche  $\beta$ -Untereinheit benötigen. Zu den wenigen Ausnahmen gehört die bekannte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe.

### 1.2.3 Struktur von P-Typ ATPasen

Die Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums (SERCA) wurde mittels Röntgenkristallographie bei einer Auflösung von bis zu 2,6 Å entschlüsselt (Toyoshima *et al.*, 2000). Aufgrund der relativ hohen Homologien können die gewonnenen Erkenntnisse im Wesentlichen auch für andere P-Typ ATPasen übernommen werden. Dabei zeigte sich, dass sie sich aus vier Bereichen aufbaut. Die Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne), die am stärksten konserviert ist, bildet den katalytischen Kern. Sie enthält das für die P-Typ ATPasen charakteristische Phosphorylierungsmotiv DKTGTLT, bei dem der Asparaginsäure-Rest (D) während der ATP-Hydrolyse phosphoryliert wird. Die Nukleotidbindedomäne (N-Domäne) stellt einen Einschub in die P-Domäne dar. Ihr zentrales Element ist eine  $\beta$ -Faltblattstruktur, die zumindest bei SERCA aus sieben Strängen besteht. Die Aktuatordomäne (A-Domäne) ist ebenfalls stark konserviert und enthält das in allen P-Typ ATPasen vorkommende GE-Sequenzmotiv, welches in vielen P-Typ ATPasen auf das TGE-Motiv erweitert werden kann. Dieses ist für den molekularen Mechanismus der ATPase von Bedeutung, indem es während des Transportprozesses mit der P-Domäne interagiert. Die Membrandomäne besteht typischerweise aus zehn Transmembranhelices. Allerdings sind einige Ausnahmen bekannt. Dieser Bereich ist vergleichsweise weniger stark konserviert. Da sich sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende der P-Typ ATPasen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran befinden, haben diese Membranproteine eine gerade Anzahl von Transmembranhelices.

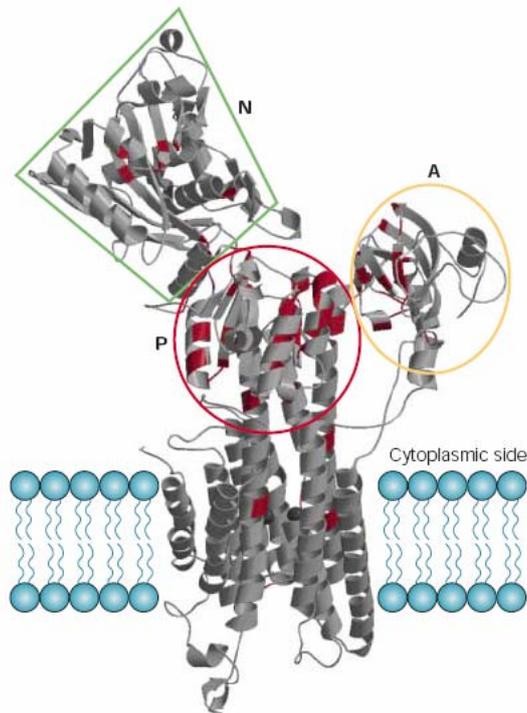


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der sarkoplasmatisch retikulären  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA. Die Struktur wurde mittels Röntgenkristallographie entschlüsselt und zeigt die zehn Transmembrandomänen, die Phosphorylierungsdomäne (P), die Aktivierungsdomäne (A) und die Nukleotidbindedomäne (N). Bildquelle: W. Kühlbrandt (2004).

#### 1.2.4 Funktionsmechanismus der P-Typ ATPasen

Bereits vor etwa 30 Jahren war bekannt, dass die P-Typ ATPasen bei dem Transportprozess von Ionen großen strukturellen Veränderungen unterliegen (Jorgensen, 1975). Damals wurde von zwei Konformationen ausgegangen, die als E1 (Enzym 1) und E2 (Enzym 2) beschrieben wurden und sich bezüglich der Affinität des zu transportierenden Ions und des ATPs unterscheiden. Obwohl inzwischen geklärt ist, dass es mehr als diese zwei Zustände gibt (Jencks, 1989), wird an dieser E1-E2-Nomenklatur festgehalten.

Eine schematische Darstellung des Funktionsmechanismus von P-Typ ATPasen ist in Abbildung 1.3 wiedergegeben. Ausgangsposition ist der E1-Zustand der ATPase. Zunächst bindet im Cytoplasma das Ion  $\text{X}^+$  an eine hochaffine Stelle der Transmembrandomäne, an die es über einen entsprechenden Kanal gelangt. Anschließend erfolgt die Bindung des ATP-Moleküls an die entsprechende Domäne (N-Domäne). An das Nukleotid ist ebenfalls ein  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion gebunden. Es kommt zu einer geringen Konformationsänderung und es entsteht der E1-P-Zustand. Aufgrund der räumlichen Nähe zur Phosphorylierungsdomäne erfolgt nach der Hydrolyse des ATPs die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphats auf die dortige Asparaginsäure des DKTGT-Motivs. Der nukleophile „Angriff“ der Asparaginsäure auf die Phosphatgruppe des Nukleotids wird wahrscheinlich durch das  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion unterstützt, indem es die elektrostatische Abstoßung reduziert und so den Übergangszustand stabilisiert. Dabei kommt es nur zur Übertragung, wenn sämtliche Bindestellen für das Ion  $\text{X}^+$  besetzt sind

(Jorgensen *et al.*, 2003), deren Bindungsenergie zu einer Bewegung der P-Domäne führt. Beim anschließenden Übergang zu E2-P kommt es zu einer Rotation der Aktivierungsdomäne und die TGE-Schleife gelangt in die Nähe der Phosphorylierungsstelle. Dadurch wird die Phosphorylgruppe gegen ihre Hydrolyse geschützt und das ADP wird freigesetzt. Durch die Rotation der A-Domäne wird die Pore geschlossen und zusätzlich geht die hohe Affinität der Bindestellen für das Ion  $X^+$  verloren. Es kommt folglich zur Freisetzung dieser in den extrazellulären Raum bzw. das Lumen. Parallel dazu entstehen Bindestellen für das Ion  $Y^+$ , an die es mit hoher Affinität bindet. Durch die anschließende Hydrolyse der phosphorylierten Asparaginsäure wird zunächst der E2-Zustand und durch die anschließende Dissoziation des Phosphats und des  $Mg^{2+}$  die E1-Phase erreicht. Schließlich verlässt das Ion  $Y^+$  die ATPase über den „Kanal“ und ein neues Ion  $X^+$  kann gebunden werden.

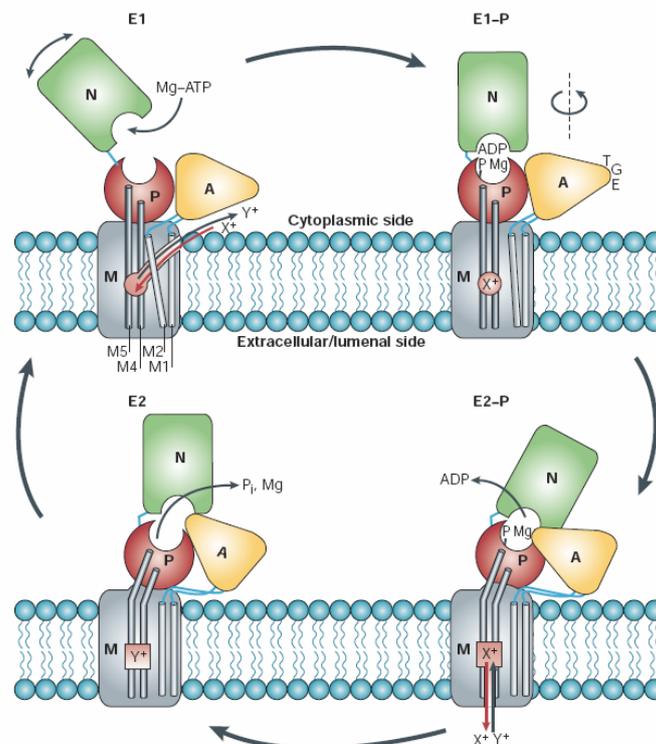


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Funktionsmechanismus der P-Typ ATPasen unter Berücksichtigung der veränderten räumlichen Orientierung der vier funktionellen Bereiche Phosphorylierungsdomäne (P), Aktuator-domäne (A), Nukleotidbindedomäne (N) und Membrandomäne (M). Das Bild wurde einem Übersichtsartikel von W. Kühlbrandt (2004) entnommen.

### 1.2.5 Klassifizierung der P-Typ ATPasen

Basierend auf der Untersuchung von Sequenzhomologien werden die Mitglieder der Familie der P-Typ ATPasen in fünf Gruppen eingeteilt (Typ I bis Typ V). Innerhalb dieser unterscheidet man die elf Subzweige IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIIA, IIIB, IV, VA und VB (Axelsen & Palmgren, 1998; Palmgren & Axelsen, 1998; Møller *et al.*, 2008), von denen sich jede durch spezifische Transportsubstrate auszeichnet (Abb. 1.4). Alle haben gemeinsam, dass es sich hierbei um Transmembranproteine handelt, die sich aus mehreren Domänen zusammensetzen und ein Molekulargewicht von 70 bis 150 kDa haben. Sie konnten bis auf einige Ausnahmen sowohl für Prokaryoten als auch für Eukaryoten beschrieben werden.

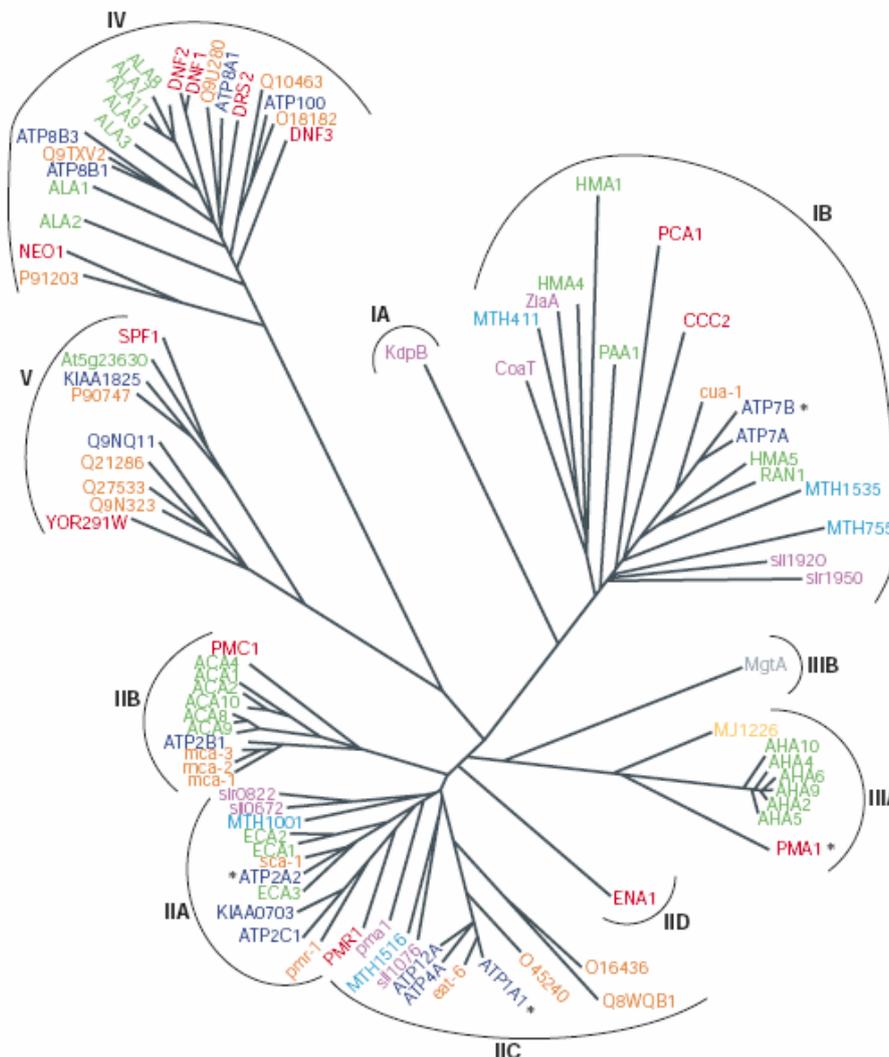


Abb.1.4: Dargestellt ist der phylogenetische Stammbaum der Familie der P-Typ ATPasen, der von Axelsen und Palmgren (1998) entwickelt wurde. Er berücksichtigt sowohl die Sequenzhomologien als auch die Substratspezifitäten. Die Farben kennzeichnen die verschiedenen Spezies, aus denen die ATPase-Gene stammen: dunkel-blau: *Homo sapiens*, grün: *Arabidopsis thaliana*, orange: *Caenorhabditis elegans*, grau: *Escherichia coli*, hell-blau: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, gelb: *Methanococcus jannaschii*, lila: *Synechocystis PCC6803* und rot: *Saccharomyces cerevisiae*. Das Bild wurde einem Übersichtsartikel von W. Kühlbrandt (2004) entnommen.

### 1.2.5.1 Typ I ATPasen

Bei den Typ I ATPasen handelt es sich um die am einfachsten strukturierten und vermutlich ursprünglichsten Ionenpumpen, die sich in zwei Gruppen gliedern. Typ IA ist eine vergleichsweise kleine Gruppe, zu der die bakteriellen  $K^+$ -Ionenpumpen gezählt werden. Dabei wird die Kdp- $K^+$ -Pumpe (*E. coli*) als Prototyp angesehen, die aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist (Altendorf *et al.*, 1998) und weniger als zehn Transmembranhelices besitzt (Lutsenko & Kaplan, 1995). Die Mitglieder der Typ IB Gruppe dienen dem Transport von Metallionen wie Kupfer, Silber, Zink, Cadmium, Cobalt und Palladium und sind somit sowohl für die Entfernung von bestimmten Ionen, die in größeren Mengen eine toxische Wirkung auf die Zelle haben, als auch für die Homöostase von wichtigen Spurenelementen verantwortlich (Rosen, 2002; Nelson, 1999). Sie besitzen acht Transmembrandomänen und bestehen aus nur einem Protein.

### 1.2.5.2 Typ II ATPasen

Die Mitglieder der Typ II ATPasen dienen der Generierung und Aufrechterhaltung von Membranpotentialen in tierischen und pflanzlichen Zellen. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für den Organismus wurde diese Gruppe, die sich in vier Untergruppen gliedert, eingehend untersucht. Zur Gruppe Typ IIA gehört die  $Ca^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Reticulums (SERCA). Ebenfalls  $Ca^{2+}$ -Transporter sind die Mitglieder der Typ IIB-ATPasen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Zur Typ IIC-Gruppe gehören einige der bekanntesten ATPasen. Dazu zählt die  $Na^+/K^+$ -Pumpe, die für das Membranpotential in Säugerzellen verantwortlich ist, indem sie pro Zyklus für den Austausch von drei Natriumionen gegenüber zwei Kaliumionen sorgt, sowie die im Magen vorkommende  $H^+/K^+$ -Pumpe, die entscheidend an der Bildung der Magensäure beteiligt ist. Zur kleinen Gruppe der Typ IID-ATPasen gehören die  $Na^+$ -Ionen transportierenden ATPasen der Eukaryoten.

### 1.2.5.3 Typ III ATPasen

Die Typ III-ATPasen gliedern sich in zwei Gruppen. Die Typ IIIA-ATPasen finden sich fast ausnahmslos in der Plasmamembran von Pflanzen und Pilzen und dienen dem Protonentransport. Sie ermöglichen die Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes von etwa 6,6 gegenüber einem Wert von 3,5 im extrazellulären Raum (Eraso & Gancedo, 1987). Das bedeutet, dass das resultierende Membranpotential im Gegensatz zu tierischen Zellen auf einem Protonengradienten beruht und einem Wert von -180 mV entspricht. Zur Gruppe der Typ IIIB gehören bakterielle  $Mg^{2+}$ -ATPasen.

#### 1.2.5.4 Typ IV ATPasen

Die zu dieser Gruppe gehörenden ATPasen wurden bisher nur in Eukaryoten entdeckt. Sie stellen die größte Gruppe der P-Typ ATPasen dar (Muthusamy *et al.*, 2009) und werden erst seit wenigen Jahren als eigenständige Untergruppe angesehen. Die so genannten Phospholipidtranslokasen (Flippasen) sind am Transport von Aminophospholipiden sowie an der Generierung und Aufrechterhaltung der Lipiddoppelmembran-Asymmetrie beteiligt (Tang *et al.*, 1996; Auland *et al.*, 1994). Man nimmt an, dass sie die Lipide von der äußeren zur inneren Membranschicht bewegen. Dies wurde in der Plasmamembran von Erythrozyten (Daleke, 2003) und in Hefen beobachtet (Pomorski *et al.*, 2003).

#### 1.2.5.5 Typ V ATPasen

In der Gruppe Typ V werden ATPasen zusammengefasst, deren Substratspezifität und biologische Funktion unbekannt ist. Bisher wurden sie ausschließlich bei Eukaryoten identifiziert, eine Funktion als Ionentransporter ist bis jetzt lediglich vermutet worden. Ein charakteristisches Sequenzmotiv der Typ V ATPasen ist PPXXP, welches in der vierten Transmembrandomäne lokalisiert ist und für das eine Funktion als Ionenbindestelle angenommen wird (Axelsen & Palmgren, 1998). Basierend auf den Ergebnissen neuerer phylogenetischer Analysen werden die Typ V ATPasen in zwei Gruppen unterteilt (Møller *et al.*, 2008). Dabei finden sich die Typ VA ATPasen in allen Eukaryoten und besitzen das charakteristische Motiv PP(D/E)LPXE, bei dem negativ geladene Aminosäuren blau dargestellt sind. Demgegenüber wurden die Typ VB ATPasen, die sich durch das Motiv PP(A/V)LPAX auszeichnen, nicht in den drei eukaryotischen Linien Excavata, Entamoeba und Landpflanzen gefunden. Bei den hier rot markierten Positionen handelt es sich um hydrophobe Aminosäuren. Daher wird vermutet, dass sich dieser Austausch nachhaltig auf die Ligandenbindungseigenschaften auswirkt und folglich die Typ VA und VB ATPasen unterschiedliche Substratspezifitäten haben könnten.

Eine Hypothese über die Funktion dieser Proteine ist, dass es sich bei den Typ V ATPasen um Anionen-Transporter handeln könnte. So wurde eine durch Anionen stimulierte ATPase-Aktivität für einige Gewebe und Organismen beobachtet (Gerencser, 1996). Schließlich wurde im Darmtrakt von *Aplysia californica* eine elektrogene Chloridpumpe in der Plasmamembran entdeckt, die einer P-Typ ATPase ähnelt (Gerencser & Purushotham, 1996). Außerdem gibt es elektrophysiologische Anzeichen auf eine elektrogene Chloridpumpe in der Plasmamembran von *Acetabularia* (Gradmann *et al.*, 1982). Ob jedoch tatsächlich die Typ V ATPasen diesen Transportvorgängen molekular zugrunde liegen, ist nicht experimentell bewiesen, so dass die Substratspezifität dieser Subklasse nach wie vor unbekannt ist. Allerdings wurde kürzlich für die Typ VB ATPase CATP-5 des Fadenwurms

*Caenorhabditis elegans* eine Beteiligung am Polyamintransport beschrieben (Heinick *et al.*, 2009). Weitere interessante Hinweise auf die mögliche funktionelle Bedeutung einer Typ V ATPase liefern die Arbeiten von C. Suzuki (Suzuki & Shimma, 1999; Suzuki, 2001). Er stellte fest, dass eine Mutation im *Spf1*-Gen der Hefe, welches eine Typ V ATPase kodiert, zum Verlust der Sensitivität gegenüber dem toxischen Giftstoff SMKT (*salt mediated killer toxin*) führt. Zusätzlich führt der Funktionsverlust des Spf1-Proteins zu einer Hypoglykosylierung von Invertasen und zu einer Aktivierung der *Unfolded Protein Response* (UPR) (Vashist *et al.*, 2002). Auch wenn die Substratspezifität dieser Gruppe weiterhin ungeklärt ist, so gibt es zumindest Hinweise, dass sie an der Regulierung der Ionenhomöostase in der Zelle beteiligt sind.

### 1.2.6 Mutationen in ATPasen als Ursache für Krankheiten

Die Untersuchung dieser großen Proteinfamilie ist neben grundsätzlich physiologischem Interesse zudem interessant, weil eine Reihe von Erkrankungen auf eine Mutation in einem P-Typ ATPase-Gen zurückzuführen ist.

Bei der Menkes-Krankheit, die X-chromosomal rezessiv vererbt wird, liegt eine Störung des vom *ATP7A*-Gen kodierten Proteins vor (Chelly *et al.*, 1993). *ATP7A* transportiert Kupfer und ist der Gruppe der Typ IB ATPasen zugeordnet. Patienten leiden an einem Kupfermangel in Gehirn, Knochen, Leber, Haaren und Arterien, was sich mannigfaltig auswirkt. Beispielhaft dafür sind Krämpfe, Hypothermie, Entwicklungsstörung, brüchige Haare und eine psychomotorische Retardierung bzw. eine Neurodegeneration. Die Wilson-Krankheit beruht auf einer Mutation im *ATP7B*-Gen (Bull *et al.*, 1993), das auf Chromosom 13q14.3 lokalisiert ist. Das Gen wird hauptsächlich in Leber und Gehirn exprimiert, kodiert für eine  $\text{Cu}^{2+}$ -ATPase und gehört zur Untergruppe IB. Durch diese autosomal-rezessive Erkrankung wird das Kupfer aus der Leber nicht in die Galle abtransportiert. Die resultierende Akkumulation wirkt sich toxisch auf Leber und Gehirn aus. Charakteristisch sind ebenfalls der sogenannte Kayser-Fleischer-Kornealring und eine Leberzirrhose.

Die selten vorkommende Brody-Myopathie ist durch steife Muskeln, die nicht relaxieren können und dadurch verkrampfen, gekennzeichnet. Diese Störung beruht auf einer Mutation im *ATP2A1*-Gen (Odermatt *et al.*, 1996), das für die im sarkoplasmatischen Reticulum (SR) vorkommende  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe SERCA1 kodiert. Diese wird der Untergruppe IIA der P-Typ ATPasen zugeordnet. Die Folge ist eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme ins SR. Der Genlocus liegt auf Chromosom 16p12.1-12.2. Mutationen des *ATP2A2*-Gens, das stark in Keratinozyten exprimiert wird und für das Protein SERCA2 kodiert, führen zur Darier-White-Erkrankung (Sakuntabhai *et al.*, 1999). Diese autosomal-dominante Hautstörung ist durch den Verlust der Adhäsion zwischen den Epidermalzellen und eine abnorme Keratinisierung gekennzeichnet. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe gehört zur IIA-Untergruppe der P-Typ ATPasen.

Das *ATP2C1*-Gen kodiert ebenfalls für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe und wird der Untergruppe IIA der P-Typ ATPasen zugeordnet. Durch eine Mutation in diesem Gen kommt es zur autosomal-dominant vererbten Hailey-Hailey-Krankheit (Hu *et al.*, 2000). Ihre Symptome sind dauerhafte Blasenbildungen und Erosionen der Haut, welche auf einen gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport zurückgeführt werden. Das *ATP2C1*-Gen wird in einer Reihe von Geweben exprimiert.

Das *ATP8B1*-Gen kodiert für eine ATPase der Untergruppe IV und transportiert Aminophospholipide. Es wird angenommen, dass sie eine besondere Rolle beim enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren spielt. Durch eine Mutation in diesem Gen, das auf dem Chromosom 18q21 lokalisiert ist, kommt es zur Cholestase (Bull *et al.*, 1998), einer Störung des Galleflusses. Dies wird auch als Bylers-Krankheit bezeichnet.

Das *ATP1A2*-Gen letztlich kodiert für die  $\alpha 2$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe (Untergruppe IIC). Durch eine Mutation des auf Chromosom 1q23 lokalisierten Gens entsteht eine besondere Form der Migräne (familiäre hemiplegische Migräne Typ 2) (De Fusco *et al.*, 2003), die durch Kopfschmerzen und eine vorübergehend auftretende Halbseitenlähmung gekennzeichnet ist.

Nicht nur Mutationen in Genen, die für P-Typ ATPasen kodieren, führen zu pathologischen Auffälligkeiten. So wurde gezeigt, dass die infantile, maligne Osteopetrose unter anderem auf einer Störung im *OC116*-Gen beruht (Kornak *et al.*, 2000), was zu einer fehlerhaften  $\alpha 3$ -Untereinheit der Protonenpumpe (V-Typ) führt. Die Folge ist eine fehlerhafte Knochenresorption, die auf der Dysfunktion der Osteoklasten basiert und es kommt zur Osteosklerose, Hepatosplenomegalie und Panzytopenie.

### 1.3 Zielsetzungen der Arbeit

Mutationen in der humanen Typ V P-Typ ATPase ATP13A2 führen zum neurodegenerativen Kufor-Rakeb Syndrom (KRS), das eine seltene Form des juvenilen Parkinsonismus darstellt. Da sowohl Proteinfunktion als auch Substratspezifität dieser ATPase unbekannt waren, gab es keine konkreten Erkenntnisse über den zugrunde liegenden Pathomechanismus. Zudem erfordert die zelluläre und molekulare Untersuchung der detaillierten Auswirkung des ATP13A2-Funktionsverlustes das Arbeiten mit Gehirnmateriale und Neuronen menschlicher Patienten, was aus ethischen und praktischen Gründen nicht möglich ist. Somit sollte am Tiermodell dieser Gendefekt hinsichtlich Pathologie sowie der komplexen motorischen und kognitiven Funktionsstörung des Gehirns untersucht werden. Daher war ein Ziel dieser Arbeit die Generierung eines *Knock-Out* Mausmodells, in dem das murine Ortholog konstitutiv ausgeschaltet werden sollte. Dieser Organismus ist für solche Versuche gut geeignet, da es zum Menschen im Allgemeinen und zur ATPase ATP13A2 im Speziellen eine hohe Homologie zeigt und somit die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sein sollten. Zusätzlich ist das Verfahren zum gezielten Ausschalten eines Gens in der Maus weitestgehend etabliert und es existieren bereits verschiedene *Knock-Out* Mäuse, in denen Parkinson-relevante Gene deletiert sind. Zusätzlich zur Generierung des Mausmodells sollten Fibroblasten eines KRS-Patienten und seines gesunden Bruders hinsichtlich verschiedener Aspekte wie Sensitivität gegenüber Zellstress oder Autophagie untersucht und miteinander verglichen werden. Nach der Identifikation der genetischen Ursache für KRS wurden weltweit bei verschiedenen Parkinson-Patienten weitere Mutationen in *ATP13A2* identifiziert. Diese sollten letztlich im Rahmen dieser Arbeit mittels *in vitro* Analysen in Säugerzellen hinsichtlich ihrer Bedeutung und Funktion für das Protein näher untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien, organische Substanzen und Lösungsmittel mit der Qualitätsbezeichnung „pro analysis“ verwendet und von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Freiburg)	Invitrogen (Karlsruhe)
AppliChem (Darmstadt)	Merck (Darmstadt)
BD Biosciences Clontech (Heidelberg)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Calbiochem (Darmstadt)	Perkin Elmer (Massachusetts/USA)
Difco Lab (Sparks/USA)	Pierce (Rockford/USA)
Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot)	Roche (Mannheim)
Fluka (Taufkirchen)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
GE Healthcare (München)	

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Plastikwaren und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

### 2.3 Allgemeine Lösungen

Sofern es im Protokoll nicht anders angegeben war, wurde für alle Puffer, Lösungen und Medien destilliertes Wasser (A. dest) verwendet.

#### TE-Puffer (pH 8)

10 mM	Tris-HCl
1 mM	EDTA
ad 500 ml	HPLC-H <sub>2</sub> O
steril filtrieren, Lagerung bei -20° C	

#### TE<sup>-4</sup>-Puffer (pH 8)

10 mM	Tris-HCl
0,1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
steril filtrieren, Lagerung bei -20° C	

#### 10 X PBS (pH 7,4)

80 g	NaCl
2 g	KCl
14,4 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1 l	H <sub>2</sub> O
autoklavieren, Lagerung bei RT	

## 2.4 Enzyme

Die Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen. Für den jeweiligen Versuchsansatz wurde der in der Lieferung enthaltene und vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet und die angegebenen Inkubationsbedingungen berücksichtigt.

<b>Fermentas</b>	Restriktions-Endonukleasen
<b>Invitrogen</b>	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
<b>New England Biolabs</b>	Restriktions-Endonukleasen
<b>Roche</b>	T4 DNA-Ligase <i>High Fidelity</i> DNA-Polymerase alkalische Phosphatase
<b>Sigma</b>	<i>RedTaq</i> DNA-Polymerase

## 2.5 Kommerzielle Reagenziensysteme (“Kits”)

**Tab. 2.1:** Verwendete kommerzielle Reagenziensysteme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	ABI
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma
HiSpeed Plasmid Midikit	Qiagen
ProbeQuant G-50	GE Healthcare
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick-PCR-Purification Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis	Stratagene
Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-CTP)	GE Healthcare
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

## 2.6 Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)

dNTPs wurden von den Firmen NEB und Fermentas bezogen. Die Stammlösung von jeweils 100 mM je dNTP wurde für die Arbeitslösung auf eine Endkonzentration von 10 mM verdünnt.

## 2.7 Klonierungsvektoren

**Tab. 2.2:** Verwendete Vektoren (Vektorkarten im Anhang)

Bezeichnung	Beschreibung	Größe [bp]	Quelle
pcDNA 3.1 V5/His	Expressionsvektor	5523	Invitrogen
pDONR221	Klonierungsvektor	4762	Invitrogen
pcDNA-DEST53	Expressionsvektor	7767	Invitrogen
PPNT	<i>Targeting</i> -Vektor	7200	AG Zimmer
pEasyFlox	<i>Targeting</i> -Vektor	7314	AG Brüning

## 2.8 Verwendete Geräte

**Tab. 2.3:** Verwendete technische Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik
Brutschrank	Hera Cell 150	Thermo
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT	Bio-Rad
	X-Cell Sure Lock	Invitrogen
Elektroporationsgerät	Gene Pulser System	Biorad
	Capacitance Extender	Biorad
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa
Geigerzähler	LB 124	Berthold
Gel-Dokumentations-System	Chemidoc XRS	Biorad
Heiz-/ Rührplatte	MR 3001	Heidolph
Hybridisierungsschrank	Typ 30 Special Hyb	Bachofer
Inkubationsschüttler	Innova 44	New Brunswick Scientific
Mikroskop	Axioplan2	Zeiss
Nukleinsäure-/ Protein-Meßgerät	Nano Drop ND-1000	PeqLab
pH-Meßgerät	inoLab pH Level 1	WTW
Pipettierhilfe	Research	Eppendorf
	Easypet	Eppendorf
Real-Time PCR System	7500 Real Time PCR System (Taq-Man)	Applied Biosystems
Reinstwasseranlage	Milli-Q; Q-Gard 2	Millipore
Rollschüttler	Roller Mixer SRT 1	Stuart

Sequenzierer	ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Spannungsgeräte	Power Ease 500	Invitrogen
	Power Pac Basic	Bio-Rad
sterile Werkbank	Hera Safe KS 12	Kendro
Thermoblock	Heatblock II	VWR
Thermocycler	iCycler	Biorad
	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
Thermomixer	compact	Eppendorf
Tischschüttler	KS 260 basic	IKA
Tischzentrifuge	Galaxy Mini	VWR
Transfermodul	X-Cell II Blot-Modul	Invitrogen
Ultraschallbad	USC 100T	VWR
Ultrazentrifuge	Avanti J 20 XPi	Beckman Coulter
UV-Crosslinker	CL-1000 UV Crosslink	UVP
UV-Kammer	GS Gene Linker UV Chamber	Bio Rad
Vortex	Reax Top	Heidolph
Waage	Acculab Vicon	Sartorius
Waage (Feinwaage)	ARJ 120-4M	Kern
Wasserbad	WB22	Memmert
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Allegra X-22R	Beckman Coulter
	Varifuge 3.0 RS	Kendro

## 2.9 Datenbanken und weitere Internetseiten

BACPAC Resources Center	<a href="http://bacpac.chori.org/">http://bacpac.chori.org/</a>
BDGP	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>
BioTools: wwwtacg v3.0	<a href="http://biotools.umassmed.edu/tacg/WWWtacg.php">http://biotools.umassmed.edu/tacg/WWWtacg.php</a>
CBS Prediction Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/">http://www.cbs.dtu.dk/services/</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
NEB	<a href="http://www.neb.de">http://www.neb.de</a>
P-Typ ATPasen	<a href="http://biobase.dk/~exe/Patbase.html">http://biobase.dk/~exe/Patbase.html</a>
UCSC	<a href="http://genome.cse.ucsc.edu/index.html">http://genome.cse.ucsc.edu/index.html</a>
Vector Designer	<a href="https://vectordesigner.invitrogen.com/login.cfm">https://vectordesigner.invitrogen.com/login.cfm</a>

## 2.10 Software

ABI	GeneAmp PCR System 9700 Version 3.03
ABI	Sequencing Analysis Version 3.7
Biorad	iCycler Version 4.006
Conor McCarthy	Chromas Version 2.0
Microsoft	Microsoft Office 2003
Nano Drop	Version 3.0.1
Schuler <i>et al.</i> , 1991	MACAW Version 2.05 Win 32i
Stöffler	Mausoleum Version 4.18

## 2.11 Molekularbiologische Methoden

### 2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die PCR ermöglicht die *in vitro* Amplifikation von Nukleinsäuren, für die zwei spezifische Primer, dNTPs und eine thermostabile Polymerase benötigt werden (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Wichtige Grundvoraussetzung ist die Kenntnis der Bereiche, die die Zielsequenz flankieren. Anhand dieser werden Oligonukleotide (Primer) generiert, die später als Startpunkt der DNA-Synthese fungieren, indem sie über komplementäre Basenpaarbindungen an die *Template*-DNA binden. Erst diese doppelsträngigen Bereiche erlauben das Ansetzen der DNA-Polymerase und ermöglichen so die Verlängerung der Nukleinsäure. Dabei haben die Primer zueinander eine entgegengesetzte Orientierung. Das bedeutet, ihre 3'-Enden zeigen aufeinander zu, da nur hier weitere Nukleotide eingebaut werden können. Prinzipiell gliedert sich die PCR in die Abschnitte Denaturierung (DNA-Strangtrennung), *Annealing* (Primerbindung) und Elongation (DNA-Synthese). Diese wiederholen sich in mehreren Zyklen und ermöglichen die exponentielle Vermehrung einer spezifischen Nukleinsäure. Die PCR erfolgt in einem Thermocycler. Entsprechend der Zielsetzung und der verwendeten Komponenten wurde das Temperaturprofil programmiert.

### 2.11.2 Primerdesign

Basierend auf der DNA-Sequenz wurden auf dem *Sense*- und dem *Antisense*-Strang nach kurzen Abschnitten gesucht, die als Primer dienen. Durch Berücksichtigung nachfolgender Kriterien sollten die Risiken von 3'-Ende-Selbstkomplementaritäten oder Genunspezifitäten minimiert werden:

- Länge: 18-24 bp (gleichmäßige Verteilung aller vier Basen)
- GC-Gehalt: 45-65 %
- keine repetitive Sequenzen
- Dinukleotid GC, GG, CC oder CG am 3'-Ende

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Das Lyophilisat wurde in steril filtriertem TE<sup>4</sup>-Puffer gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Anschließend wurde eine Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 10 pmol/µl angefertigt. Die Primer wurden bei -20° C gelagert.

### 2.11.3 PCR-Reaktionsansätze

Der Standardansatz einer PCR-Reaktion hatte ein Volumen von 25 µl und setzte sich aus den Komponenten *Template*-DNA, DNA-Polymerase, Primer, dNTPs, Puffer und PCR-Wasser zusammen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden je nach Anforderung die *ReadyMix RedTaq*- und *AccuTaq*-Polymerasen (Sigma) sowie die *High Fidelity* Polymerase (Roche) verwendet. Daraus ergaben sich für die Reaktionsansätze folgende Zusammensetzungen:

**Tab. 2.4:** PCR-Reaktionsansätze mit (A) *RedTaq*-Polymerase und (B) *AccuTaq* bzw. *High Fidelity* Polymerase. Es wurden 50 ng genomische DNA bzw. etwa 300 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

(A)

Komponente	Mengenangabe [µl]
DNA	1
F-Primer	1 [10 pmol/µl]
R-Primer	1 [10 pmol/µl]
H <sub>2</sub> O	ad 12,5
ReadyMix	12,5

(B)

Komponente	Mengenangabe [µl]
DNA	1
F-Primer	1 [10 pmol/µl]
R-Primer	1 [10 pmol/µl]
dNTPs	1
AccuTaq/High Fidelity Polymerase	0,25
H <sub>2</sub> O	ad 25

Das Ansetzen der Reaktion erfolgte auf Eis um unspezifische Polymeraseaktivitäten zu verhindern. Dabei wurden zunächst alle Komponenten mit Ausnahme der DNA gemischt und auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Danach folgte die Zugabe der DNA. Zum Ausschluss einer Kontamination war in jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle enthalten, bei der Wasser an Stelle von DNA eingesetzt wurde.

#### 2.11.3.1 2-Schritt-PCR

Da Faktoren wie GC-Gehalt der *Template*-DNA, Primerlänge und -Zusammensetzung, Größe des Amplifikats und verwendete Polymerase maßgeblich die Programmierung des PCR-Profiles bestimmen, gibt es keinen Standard-Ansatz. Daher diente folgendes Profil zur ersten Orientierung, die entsprechend der Ausbeute modifiziert wurde.

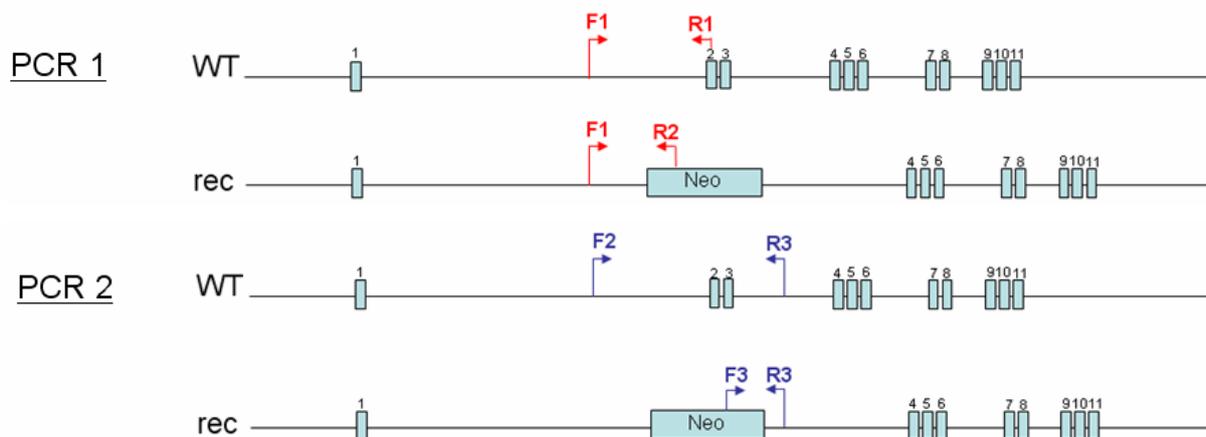
**Tab. 2.5:** Programmierungsprofil einer 2-Schritt-PCR

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	0:30	15
Annealing	62	0:30	
Elongation	72	1:00	
Denaturierung	95	0:30	25
Annealing	60	0:30	
Elongation	72	1:00	
finale Elongation	72	10:00	1
Lagerung	10	∞	

Diese Programmierung wird 2-Schritt-PCR genannt, weil es hier zwei unterschiedliche *Annealing*-Temperaturen gibt. Während die anfänglich höhere Einstellung eine spezifische Primerbindung und somit auch DNA-Synthese erlaubt, führt das Senken der Temperatur in den späteren Zyklen zu einer Erhöhung der Ausbeute.

### 2.11.3.2 Multiplex-PCR

Mittels Multiplex-PCR wurde untersucht, ob der Nachwuchs der chimären Mäuse bezüglich des *Atp13a2* WT-Allels homozygot waren oder ob sie neben dem WT- auch das rekombinante Allel trugen. Dazu wurden in einem PCR-Reaktionsansatz zwei *Atp13a2*-spezifische Primer (PCR 1:F1/R1; PCR 2: F2/R3) und ein Primer, der komplementär zu einem Abschnitt in der Neomycin-Kassette ist (PCR 1: R2; PCR 2: F3), eingesetzt. Somit wurden in homozygoten Tieren ein und in heterozygoten Mäusen zwei Fragmente amplifiziert.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Multiplex-PCR

Diese 2-Schritt-PCR hatte ein Volumen von 25 µl und wurde mit Hilfe der *RedTaq*-Polymerase durchgeführt. Die Primerhybridisierung erfolgte zuerst für 15 Zyklen bei 63° C und anschließend für 25 Zyklen bei 61° C. Die Elongationsphase dauerte 1,5 min bei 72° C. Für die entsprechenden Primerpaare wurden folgende Fragmente erwartet:

**PCR 1**

F1/R1 480 bp  
F1/R2 385 bp

**PCR 2**

F2/R3 820 bp  
F3/R3 620 bp

**2.11.3.3 Sequenzier-PCR**

Der Ansatz für die Sequenzier-PCR setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

**Tab. 2.6:** Reaktionsansatz für die Sequenzier-PCR

Komponente	Mengenangabe [µl]
DNA	1
Big Dye	0,5
Puffer (5 X)	2
Primer	0,25
H <sub>2</sub> O	7,25

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde standardmäßig 1 µl Probe eingesetzt, was in der Regel einer DNA-Menge von 200 bis 400 ng entsprach. Zur Analyse von PCR-amplifizierten Fragmenten oder genomischer DNA wurden etwa 50 ng DNA verwendet. Die Programmierung der Sequenzier-PCR sah wie folgt aus:

**Tab 2.7:** Programmierungsprofil der Sequenzier-PCR

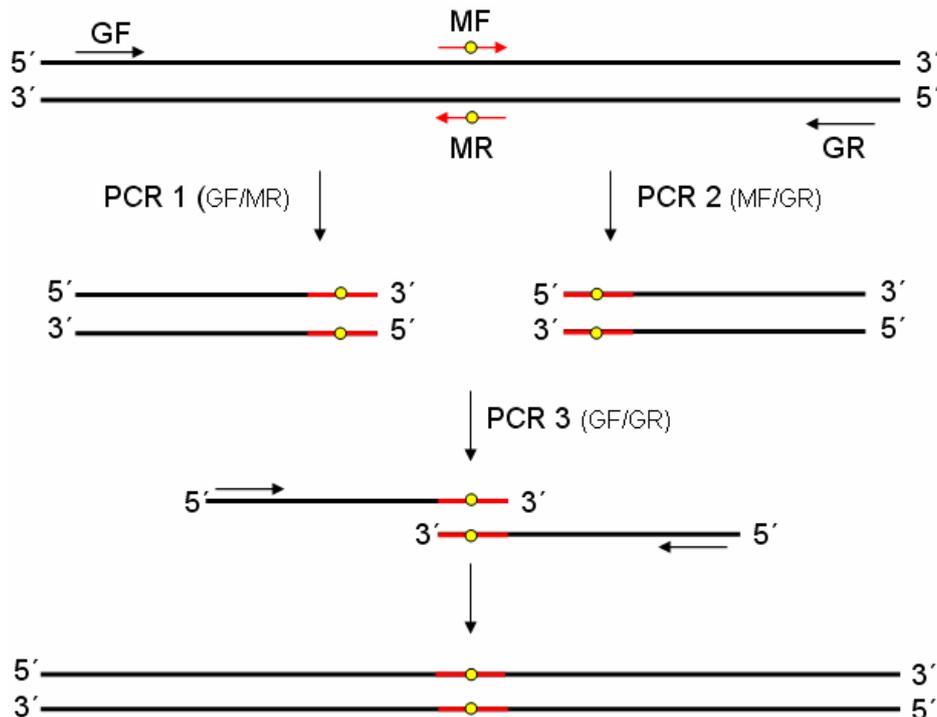
	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	94	5:00	1
Denaturierung	96	0:12	26
<i>Annealing</i>	50	0:05	
Elongation	60	4:00	
finale Elongation	60	20:00	1
Lagerung	10	∞	

Nach der PCR wurden 10 µl PCR-H<sub>2</sub>O zum Reaktionsansatz gegeben. So wurde verhindert, dass die Kapillaren des Sequenziergerätes während des Sequenzierprozesses Luft ziehen.

### 2.11.3.4 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Einführung einer Mutation an eine definierte Position innerhalb einer DNA-Sequenz wird eine Mutagenese-PCR durchgeführt (Hutchinson *et al.*, 1978). Dazu werden zwei komplementäre Primer hergestellt, die die entsprechende Veränderung enthalten und als innere Primer fungieren (MF und MR). Zusätzlich werden je ein genspezifischer Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer benötigt (GF und GR; äußere Primer). In der ersten PCR werden in zwei parallelen Ansätzen anhand der Primerpaare GF/MR bzw. MF/GR der 5'- bzw. der 3'-Bereich der Zielsequenz, die durch die Primer GF und GR begrenzt ist, amplifiziert. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte (vergleiche Kapitel 2.11.5.1) werden in der zweiten Mutagenese-PCR neben den beiden genspezifischen Primern die beiden DNA-Fragmente eingesetzt, die sich während der Primer-Hybridisierungsphase über die komplementäre Sequenz aneinanderlagern. Die DNA-Stränge werden an den 3'-Enden verlängert und es entsteht ein Doppelstrang, der die gewünschte Mutation trägt und durch weitere PCR-Zyklen vervielfältigt wird.

Die Mutationen P3 bis P7 wurden mit dem *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) generiert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese. Primer sind durch Pfeile gekennzeichnet. Dabei sind die genspezifischen Primer schwarz und die Mutagenese-Primer rot dargestellt. Der gelbe Punkt steht für die eingeführte Mutation.

### 2.11.4 Quantitative *Real-Time* PCR

Die quantitative *Real-Time* PCR ermöglicht gleichzeitig die Amplifikation von Nukleinsäuren und ihre Quantifikation mittels Fluoreszenzmessungen. Dazu wurde das *Quantitect SYBR Green Kit for One-Step PCR* (Qiagen) verwendet. Bei SYBR-Green handelt es sich um einen Cyan-Fluoreszenzfarbstoff, der nur in doppelsträngige DNA interkaliert. Dieser DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei 522 nm. Mittels Fluorimeter wird die Lichtemission nach jedem PCR-Zyklus gemessen, wobei die Fluoreszenz nur in der exponentiellen Phase proportional zur Menge an doppelsträngigem PCR-Produkt ist. In dieser Arbeit wurde mittels quantitativer *Real-Time* PCR die *ATP13A2*-Transkriptmenge in humanen Fibroblasten ermittelt. Zur relativen Quantifizierung wurde parallel die Transkriptmenge der Referenzgene *GAPDH* oder *Aktin* gemessen.

**Tab. 2.8:** Reaktionsansatz für die quantitative *Real-Time* PCR

Komponente	Mengenangabe [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O (RNase frei)	4,85
Quantitect-RT-SYBR-Green Mix (2 X)	10
Primer-Mix [10 pmol/ $\mu$ l]	2
RNA [5 ng/ $\mu$ l]	3
Quantitect-RT-Enzym-Mix	0,15

Die Messung erfolgte mit dem *Real-Time* PCR System 7500 Gerät (TaqMan, Applied Biosystems) und einem internen Fluorimeter. Die Fluoreszenzintensität wurde innerhalb der exponentiellen Phase während der Elongation ermittelt. Die PCR-Programmierung sah wie folgt aus:

**Tab. 2.9:** Programmierungsprofil der quantitativen *Real-Time* PCR

Schritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	50	30:00	1
DNA-Polymerase Aktivierung	95	15:00	
Denaturierung	94	0:15	40
<i>Annealing</i>	55	0:30	
Elongation	72	0:35	
Schmelzpunktbestimmung			

Da der SYBR-Green-Farbstoff auch unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, kann zwischen unterschiedlichen PCR-Produkten nicht unterschieden werden. Dieses Problem wurde durch die Schmelzkurvenbestimmung umgangen, bei der die Temperatur kontinuierlich von 50 $^{\circ}$  C bis 95 $^{\circ}$  C erhöht wird. Dabei denaturiert jedes Amplifikat bei einer spezifischen Schmelztemperatur, was mit einer Freisetzung von SYBR-Green und somit einer Fluoreszenzabnahme einhergeht. Auf diese Weise kann die Spezifität des PCR-Produktes abgeschätzt werden.

### 2.11.5 Gel-Elektrophorese

Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Dabei ist die Wandergeschwindigkeit der Moleküle antiproportional zum Logarithmus ihrer Größe. Das bedeutet, dass kleinere DNA-Moleküle schneller durch das Agarose-Gel gelangen als größere. Ihre Visualisierung erfolgt durch die Zugabe von Ethidiumbromid, das sich in die helikale Struktur einer Nukleinsäure einlagert. Dadurch macht es diese unspezifisch sichtbar, da der Fluoreszenzfarbstoff unter UV-Bestrahlung im orangenen Spektrum Licht emittiert und so die Bereiche des Gels hervorhebt, in denen DNA-Moleküle enthalten sind, während die Bereiche ohne DNA dunkel bleiben. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur DNA-Menge. Mit einem parallel zu den Proben aufgetragenen Längenstandard (2-log-Standard, NEB) kann die DNA-Größe und -Menge ermittelt werden. Je nach Zielsetzung wurden 0,8 bis 3,0 %ige Agarose-Gele mit 1 X TAE-Puffer hergestellt.

#### TAE (1 X)

500 ml TAE (10 X)  
ad 5 l A. dest

#### Ethidiumbromidlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid  
Lagerung bei 4°C; lichtgeschützt

#### Ladepuffer (pH 8)

10 ml Formamid  
10 mg Xylencyanol  
10 mg Bromophenolblau  
10 mM EDTA

#### 2-log DNA-Standard

50 µl Marker [1 mg/ml]  
850 µl 1 X TAE  
100 µl Ladepuffer

#### 2.11.5.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Für eine Vielzahl von Anwendungen ist es essentiell, dass die Nukleinsäure von störenden Komponenten wie Puffer, Enzymen, Primern oder Agarose getrennt wird (Vogelstein und Gillespie, 1979). Dazu wurden das *QIAquick-PCR-Purification* und das *-Gel Extraction-Kit* (Qiagen) verwendet. Beide nutzen eine Silica-Gel-Membran als Reinigungssäule für die selektive DNA-Adsorption zur Trennung von störenden Komponenten. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend den Herstellervorgaben.

### 2.11.5.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Aufgrund der proportionalen Beziehung zwischen Lichtabsorption und Konzentration kann die Menge einer Nukleinsäure photometrisch quantifiziert werden. Dazu wurde mit dem NanoDrop ND-1000 die Absorption bei 260 nm gemessen.

$$OD_{260} = \text{DNA / RNA}$$

$$OD_{280} = \text{Protein}$$

$$OD_{260/280} = \text{Reinheit der DNA / RNA}$$

Während Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm maximal absorbieren, ist dies für Proteine bei 280 nm der Fall. Somit ist es nicht nur möglich die Konzentration der Nukleinsäure anhand der Absorption zu ermitteln, sondern auch Rückschlüsse auf ihre Reinheit anhand des Quotienten  $A_{260/280}$ . Werte zwischen 1,8 und 2,0 sprechen für eine reine Probe. Niedrigere Werte können auf eine Verunreinigung durch Proteine hindeuten.

### 2.11.5.3 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen basieren auf der von F. Sanger etablierten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Der Ansatz entspricht dem einer Standard-PCR, der neben den unter 2.11.3 genannten Komponenten zusätzlich Dideoxynukleotide (ddNTP) enthält. Da ihnen sowohl am 2'- als auch am 3'-Kohlenstoff des Zuckermoleküls eine Hydroxylgruppe fehlt, können sie mit dem nächsten dNTP keine Phosphodiesterbindung bilden, was den sofortigen Abbruch der DNA-Synthese zur Folge hat. Da statistisch gesehen an jeder Stelle der Sequenz ein ddNTP anstelle eines dNTPs eingebaut werden kann, entstehen während der PCR unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die sich nur um eine Basenpaarlänge unterscheiden und durch den spezifischen Fluoreszenzmarker des letzten ddNTPs markiert sind. Die PCR wurde mit dem ABI PRISM *BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing* Kit durchgeführt. Nach der Aufreinigung des Reaktionsansatzes folgte im Sequenziergerät die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Länge. Dabei detektiert ein Laser das jeweilige Fluorochrom am endständigen ddNTP und identifiziert so die spezifische Base. Mittels eines Computerprogramms werden die Ergebnisse verarbeitet und in die entsprechende DNA-Sequenz übersetzt. Die Aufreinigung und Sequenzierung der Proben wurde vom *Cologne Center for Genomics* (CCG) unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Nürnberg durchgeführt.

## 2.12 Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse anhand des Northern-Blot Verfahrens dient dem Nachweis von RNA-Transkripten in unterschiedlichen Geweben. Diese beruht auf der komplementären Hybridisierung einer genspezifischen Sonde, die radioaktiv markiert ist, an der auf einer Nylon- oder Nitrocellulose-Membran immobilisierten Ziel-RNA (Alwine *et al.*, 1977). Die Auswertung erfolgt mittels Autoradiographie, bei der die Signalintensität mit der RNA-Menge korreliert und somit als Maß der Genexpression dient.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Northern-Blot Membranen verwendet. Auf der ersten (*Human 12-Lane Multiple Tissue Northern Blot*, Clontech) ist die RNA von zwölf verschiedenen Geweben aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit dieser war es möglich die Transkriptgröße von *ATP13A2* zu bestimmen. Bei der zweiten Membran, dem *Dot-Blot* (Clontech), sind sämtliche RNA-Transkripte aus insgesamt 84 Geweben punktuell aufgetragen und ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Genexpression.

### 2.12.1 Herstellung der Hybridisierungssonde für den Northern-Blot

Als Sonde fungierte ein PCR-amplifiziertes DNA-Fragment mit einer Länge von 420 bp, das mit dem Primerpaar cATP11F/ATP29R generiert wurde. Danach wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und mit dem Längenstandard verglichen. Anschließend wurde die DNA ausgeschnitten, aufgereinigt, in TE-Puffer eluiert und komplett sequenziert.

### 2.12.2 Radioaktive Markierung der Northern-Blot Sonde

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde erfolgte mit dem *Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)* Kit (Amersham) nach dem Protokoll des Vertreibers. Das dazu nötige Isotop [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP wurde bei der Firma New England Nuclear (Perkin Elmer) erworben. Zum Entfernen von nicht-gebundenen  $^{32}\text{CTPs}$  erfolgte die Aufreinigung über eine Sephadex-Säule (ProbeQuant G-50K) durch Zentrifugation nach Herstellerangaben.

### 2.12.3 Northern-Blot Verfahren

Zu Beginn äquillibrierte die Membran für eine Minute in 2 X SSC-Puffer und wurde danach in einer Hybridisierungsröhre platziert. Es folgte die Prähybridisierungsphase, was dem Absättigen von unspezifischen Bindestellen diente. Dazu wurde die Membran unter ständiger Rotation für mindestens 30 min bei 65° C in 10 ml Hybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Sonde radioaktiv markiert (vergleiche Kapitel 2.12.2), für 5 min bei 97° C denaturiert, für weitere 5 min auf Eis gehalten und danach zu 15 ml Hybridisierungslösung gegeben. In dieser wurde die Membran über Nacht bei 65° C unter

ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgekippt und die unspezifisch an die Membran gebundene Radioaktivität mittels mehrmaliger kurzer Waschschrte bei 65° C mit den Waschlösungen 1 und 2 entfernt. Dies erfolgte so lange, bis die mit dem Geigerzähler ermittelte Signalintensität 80 Becquerel betrug. Danach wurde die Membran in Folie eingeschweißt und in eine Röntgenkassette gelegt. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette bei -70° C gelagert. Je nach Signalstärke wurde der Film für 24 Stunden bis mehrere Tage exponiert.

#### 2.12.4 Substanzen für Northern-Blot Analyse

<b>BD Biosciences</b>	ExpressHyb Hybridisierungslösung
<b>Clontech</b>	Human 12-Lane Multiple Tissue Northern-Blot Multiple Tissue Expression Dot-Blot
<b>GE Healthcare</b>	Probe Quant G-50 Micro Columns (Aufreinigungssäule) Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-CTP)
<b>Perkin Elmer</b>	Isotop [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP

#### Waschlösung 1

2 X	SSC
1 %	SDS
ad 1000 ml	A. dest.

#### Waschlösung 2

0,1 X	SSC
0,5 %	SDS
ad 600 ml	A. dest.

#### 2.13 Klonierung

Unter Klonierung versteht man die Integration einer gewünschten DNA-Sequenz in einen bakteriellen Vektor. Hierbei handelt es sich um ein extrachromosomales DNA-Molekül, das sich unabhängig vom Wirtsgenom vermehrt. Zu Selektionszwecken ist es mit einem Resistenzgen gegen ein Antibiotikum ausgestattet und fungiert so als Transportvehikel der DNA in eine Empfängerzelle (Avery et al, 1944). Der Prozess der DNA-Aufnahme wird Transformation genannt. Standardmäßig wird dazu ein Stamm des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet.

Tab. 2.10: Zur Klonierung verwendete Bakterienstämme

Bakterium	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>	ccdB Survival	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>fhuA::IS2</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$ (TOP10)	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD</i> 139 $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen

### 2.13.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Zur Kultivierung wurde eine sterile Pipettenspitze durch die Kolonie gezogen und in ein mit Antibiotikum versetztes LB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C und 210 rpm in einem Inkubationsschüttler. Je nach weiterem Verwendungszweck und gewünschter DNA-Ausbeute wurden 4 ml (Mini-Kultur) bzw. 100 ml LB-Medium (Midi-Kultur) angeimpft, aus denen bis zu 20 bzw. 200 µg Plasmid-DNA präpariert werden konnten.

#### SOC-Medium

2 % (w/v) Bacto Trypton  
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt  
 10 mM NaCl  
 2,5 mM KCl  
 20 min autoklavieren  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 20 mM Glucose  
 steril-filtriert

#### LB-Nährboden (pH 7,0)

siehe Protokoll für LB-Medium  
 1,5 % (w/v) Agar  
 20 min autoklavieren, Medium auf 55°C abkühlen, Antibiotikumzugabe, Platten gießen (Durchmesser 10 cm). Lagerung bei 4° C.

#### LB-Medium (pH 7,0)

1,0 % Trypton  
 0,5 % Hefe-Extrakt  
 1,0 % NaCl  
 20 min autoklavieren

#### Ampicillin-Stammlösung

100 mg Ampicillin  
 ad 1 ml A. dest  
 steril-filtriert; Lagerung bei -20°C

#### Kanamycin-Stammlösung

10 mg Kanamycin  
 ad 1 ml A. dest  
 steril-filtriert; Lagerung bei -20°C

### 2.13.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden die entsprechenden Bakterien rekultiviert. Dazu wurden 5 ml LB-Medium, das ein entsprechendes Antibiotikum enthielt, mit 10 µl chemisch kompetenter Zellen angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C und 210 rpm. Anschließend wurde eine 200 ml LB-Kultur mit 2 ml der Bakterienkultur angeimpft, die bis zum Erreichen einer OD von 0,6 bei 37° C und 210 rpm schüttelte. Danach wurde sie für 15 min auf Eis gestellt und für 15 min bei 6000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 60 ml eiskaltem Tfb1-Puffer resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis und eine Zentrifugation bei den oben genannten Bedingungen. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 8 ml eiskaltem Tfb2-Puffer gelöst. Diese Bakteriensuspension wurde in einem Volumen von 100 µl aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70° C gelagert.

**TfB1-Puffer (pH 5,8)**

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
30 mM	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub>
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 %	Glycerin

**TfB2-Puffer (pH 6,8)**

10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 %	Glycerin
steril-filtriert, Lagerung bei 4° C	

**2.13.3 TA-Klonierung**

Die TA-Klonierung macht sich die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase zunutze. Da diese keine Exonukleaseaktivität besitzt, wird von ihr an die 3'-Enden des PCR-Produktes unspezifisch das Nukleotid Adenin angehängt. Darauf basierend sind die für die TA-Klonierung verwendeten Vektoren entsprechend modifiziert und tragen an ihren 3'-Enden ein einzelnes Thymin, sodass die Integration des DNA-*Inserts* über die komplementäre Basenpaarbindung zwischen T (Vektor) und A (*Insert*) erfolgt. Ergänzt wird dieses System durch die Ligaseaktivität einer Typ-I-DNA-Topoisomerase des *Vaccinia*-Virus. Mittels Sequenzierung oder Restriktionsverdau wurde die richtige *Insert*-Orientierung überprüft. Zur Selektion der transformierten Zellen enthielt der verwendete Vektor pcDNA3.1/V5-HisTOPO das Ampicillin-Resistenzgen. Somit konnten auf den mit diesem Antibiotikum versetzten Agarplatten nur die Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen hatten.

Wurde für die Generierung des PCR-Produktes nicht die *Taq*-Polymerase verwendet, so wurde das Amplifikat aufgereinigt und nachträglich ein Adenin an das 3'-Ende angehängt. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei 72° C.

**Tab. 2.11:** Reaktionsansatz für Adenin-Überhang am 3'-Ende

Komponente	Mengenangabe [µl]
PCR-Produkt	10
<i>Taq</i> -Puffer [10 X]	1,5
dATP [10 mM]	1
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	0,5
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl]	0,5
H <sub>2</sub> O	1,5

Für die TA-Ligation wurden 4 µl des amplifizierten PCR-Produkts mit 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor gemischt und für 30 min bei RT inkubiert.

### 2.13.4 Klonierung über Restriktionsendonukleasen-Schnittstellen

Bei den Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen, die Bakterien zur Abwehr von Fremd-DNA (zum Beispiel von Phagen) einsetzen (Nathans und Smith, 1975). Entscheidend für ihre Aktivität, bei der interne Phosphodiester-Bindungen der DNA abgebaut werden, ist das Vorliegen einer für jedes Enzym charakteristischen Erkennungssequenz von vier bis acht Basenpaaren, die oft gegenläufig gleich ist (Palindrom). Während einige DNasen die DNA bündig schneiden (*blunt-end*), entstehen bei anderen Enzymen einzelsträngige Überhänge am 5'- bzw. 3'-Ende (*sticky-end*). Umgekehrt können zwei DNA-Fragmente über die DNA-Ligase miteinander verbunden werden, die die Phosphodiester-Bindungen wieder herstellt.

### 2.13.5 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für den Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen müssen optimale Voraussetzungen geschaffen werden. Dazu zählen Faktoren wie Temperatur, Puffer und Salzgehalt des Ansatzes. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

**Tab. 2.12:** Reaktionsansatz eines enzymatischen DNA-Verdaus

Komponente	Mengenangabe [ $\mu$ l]
DNA	0,5-1,5 $\mu$ g
Puffer (10 X)	3
BSA (10 X)	3
Enzym	1 [10.000 U/ml]
H <sub>2</sub> O	ad 30

Beim Standardansatz wurden 0,5 bis 1,5  $\mu$ g DNA eingesetzt und die Inkubation erfolgte bei 37° C für mehrere Stunden oder über Nacht. Anschließend wurde die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und das entsprechende Fragment ausgeschnitten und aufgereinigt.

### 2.13.6 Dephosphorylierung

Im Rahmen einer Ligation wurde das Plasmid, das als Vektor fungieren sollte, nach der Restriktion zusätzlich mit der alkalischen Phosphatase behandelt, welche die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Dadurch sollte die Möglichkeit einer Religation des Vektors unterbunden und die Wahrscheinlichkeit der Integration der *Insert*-DNA erhöht werden. Zum Standard-Restriktionsansatz wurden 1,5  $\mu$ l AP (= 1,5 U) und 3,5  $\mu$ l Puffer (10 X) gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37° C.

### **2.13.7 Ligation über Restriktionsschnittstellen**

Der Ligationsansatz setzte sich aus den Komponenten DNA, T4-DNA-Ligase (1 µl), Ligasepuffer (2 µl) und gegebenenfalls H<sub>2</sub>O (ad 20 µl) zusammen. Die DNA wurde entsprechend des gewünschten molaren Verhältnisses zwischen Vektor und *Insert* eingesetzt. Der Vertreiber der Ligase empfahl zur *sticky-end*-Ligation von Vektor und *Insert* ein Verhältnis von 1:1 bis 1:3, bzw. 1:5 für eine *blunt-end*-Ligation. Die Inkubation erfolgte bei 10-16° C und über Nacht.

### **2.13.8 Transformation chemisch kompetenter Bakterien**

Für die Transformation tauten die chemisch kompetenten Bakterien auf Eis auf. Anschließend wurde eine entsprechende Menge des Ligationsansatzes hinzugegeben. Das entspricht für die TA-Klonierung bzw. für die Klonierung über RE-Schnittstellen dem halben Volumen des Ligationsansatzes. Für die Re-Transformation isolierter Plasmid-DNA wurden 20 ng DNA eingesetzt. Danach inkubierten die Bakterien für weitere 30 min auf Eis. Während dieser Inkubationsphase erfolgte die Anlagerung der Fremd-DNA an die Bakterienzellmembran. Beim anschließenden Hitzeschock bei 42° C für 30 sec im Wasserbad wurde die Bakterienmembran permeabilisiert, was die DNA-Aufnahme begünstigte. Es folgten eine Inkubation auf Eis für 5 min, die Zugabe von 500 µl SOC-Medium und das Schütteln der Bakterien für 1 h bei 37° C und 210 rpm. Danach wurde ein entsprechendes Volumen der Bakteriensuspension auf einer Antibiotikum-versetzten Selektionsplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C im Bakterienbrutschrank.

### **2.13.9 Glycerolstock von transformierten Bakterien**

Zur langfristigen Lagerung von transformierten Bakterien bei gleichzeitiger Beibehaltung ihrer Vitalität wurden Glycerolstammlösungen angelegt. So können auch nach Monaten oder Jahren die entsprechenden Bakterien rekultiviert werden. Je nach Lagerungstemperatur variierte der Glyceringehalt, der das Durchfrieren der Probe verhinderte, zwischen 50 % (Lagerung bei -20° C) und 20 % (Aufbewahrung bei -70° C).

### **2.13.10 Gateway-Klonierung**

Dieses Verfahren ermöglicht ein schnelles und effizientes Ein- und Umklonieren von DNA-Sequenzen in unterschiedliche Expressionsvektoren. Dabei macht sich diese Methode das sequenzspezifische Rekombinationssystem des Phagen  $\lambda$  zu Nutze, bei der die Virus-DNA anhand des Phagenenzym Integrase sowie der *E. coli*-Untereinheiten IHF a und IHF b in das Wirtsgenom eingebaut wird. Die Rekombination erfolgt nicht zufällig sondern nur an bestimmten Stellen über definierte Erkennungssequenzen (*attachment sites*). Daher wurde der zu klonierende DNA-Abschnitt mit Primern amplifiziert, die neben der genspezifischen Sequenz zusätzlich diese *attachment sites* enthielten. Die Rekombination der DNA in den pDONR221 Vektor bzw. einen entsprechenden Expressionsvektor erfolgte mit der BP- bzw. LR-Clonase II nach Herstellerangaben.

### **2.13.11 DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (Plasmid-Präparation)**

Für die DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen wurde das GenElute Plasmid-Mini-Prep Kit (Sigma) oder das HiSpeed-Midi-Prep Kit (Qiagen) verwendet. Beide basieren auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim und Doly, 1979) und der anschließenden Trennung der DNA von den restlichen Zellkomponenten durch spezifische Bindung an eine Silica-Gel-Membran. Dazu wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

### **2.13.12 DNA-Isolierung aus einer BAC-Kultur**

Die DNA-Isolierung aus einer BAC-Kultur erfolgte nach einem Protokoll der Zytogenetik von der Universität in Bonn. Dazu wurden 50 ml LB-Medium mit 50  $\mu$ l Chloramphenicol versetzt, mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C und 210 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien für 20 min bei 4000 rpm und 4° C zentrifugiert und das Pellet in 1,2 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 5 min wurden 3,6 ml Lysepuffer hinzugeben und die Suspension für 5 min auf Eis gehalten. Diese Reaktion wurde mit 3 ml Neutralisierungspuffer abgestoppt und die Probe für 30 min bei 4000 rpm und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weitere 15 min bei 4000 rpm und 4° C zentrifugiert. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 5 ml Isopropanol gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Nach der 30 minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm und 4° C wurde der Überstand verworfen, die DNA für 5 min bei RT getrocknet und anschließend in 600  $\mu$ l TE-Puffer gelöst, was durch eine kurze Inkubation bei 65° C unterstützt wurde. Zur Fällung von Proteinen wurden 600  $\mu$ l Ammoniumacetat hinzugegeben. Nach 10 min bei RT wurde die Probe für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 720  $\mu$ l Isopropanol gemischt, 10 min auf Eis gehalten und für weitere 10 min bei 13000 rpm

und 4° C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde 15 min bei 45° C getrocknet und anschließend in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen.

**Ammoniumacetat**

4 M            C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>  
ad 100 ml    A. dest

**Neutralisierungspuffer**

3 M            C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>  
2 M            Essigsäure  
ad 100 ml    A. dest

**Lysepuffer**

200 mM      NaOH  
1 %            SDS  
ad 100 ml    A. dest

**Resuspensionspuffer**

1 % (w/v)    Glukose  
25 mM        Tris-HCl (pH 8)  
10 mM        EDTA (pH 8)  
ad 100 ml    A. dest  
20 min autoklavieren

**Chloramphenicol-Stammlösung**

20 mg        Chloramphenicol  
ad 1 ml      A. dest

**2.13.13 DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen**

Die DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen erfolgte nach einem Protokoll von der AG Brüning an der Universität Köln. Dazu wurden etwa 2 mm Gewebe in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und über Nacht bei 56° C und 1100 rpm auf einem Thermoblock inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt. Nach der Zentrifugation von 30 min bei 13000 rpm und dem Verwerfen des Überstandes wurde das Nukleinsäurepellet mit 300 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Danach trocknete die DNA für 1 h bei 37° C und wurde anschließend in einem entsprechenden Volumen TE<sup>-4</sup>-Puffer für 45 min bei 56° C gelöst.

**Lysepuffer**

100 mM      Tris-HCl (pH 8,5)  
200 mM      NaCl  
0,2 %        SDS  
5 mM        EDTA (pH 8,0)  
ad 500 ml    A. dest

**TE<sup>-4</sup>-Puffer**

5 ml            TE<sup>-4</sup>-Puffer  
50 µg/ml      RNase A (vor Gebrauch  
10 min bei 95° C inkubieren)

### **2.13.14 RNA-Isolierung aus Fibroblasten**

Das Arbeiten mit RNA erfordert besondere Vorkehrungen, da diese sehr anfällig für den Abbau durch RNasen ist. Diese Enzyme sind praktisch allgegenwärtig und stabil. Um das Risiko der katalytischen Hydrolyse zu minimieren, wurden alle Geräte, Hilfsmittel, etc. vor dem Gebrauch gereinigt. Das beinhaltete das Reinigen mit Spülmittel, A. dest, Ethanol (70 %) und *RNase-Away*-Lösung. Zusätzlich wurden nur Verbrauchsmaterialien verwendet, die RNase-frei waren. Für die RNA-Isolierung aus humanen Fibroblasten wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet, welches sowohl auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Silica-Gel-Membran als auch auf der Mikrozentrifugationstechnik basiert. Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### **2.14 Analyse genomischer Maus-DNA**

Das von Edwin Southern entwickelte Verfahren dient der Analyse von genomischer DNA (Southern, 1975). Dazu wird die DNA durch Restriktionsendonukleasen verdaut, elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend mittels spezifischer Hybridisierung einer Sonde detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit diente diese Technik der Identifizierung positiv transfizierter ES-Klone.

#### **2.14.1 Herstellung einer Southern-Blot Membran**

Im ersten Schritt wurden mittels Restriktionsendonukleasen 10-15 µg genomische DNA über Nacht bei 37° C im Wasserbad fragmentiert. Das Reaktionsvolumen betrug 35 µl und enthielt neben der DNA 0,3 mM DTT, 0,6 mM Spermidin, 1 X BSA (10 mg/ml), 150 µg/ml RNase A, 1 X Puffer, 100 U Enzym und A. dest. Am nächsten Tag wurde die Probe auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und mit einer Spannung von 25 V elektrophoretisch aufgetrennt. Eine vollständige Spaltung der DNA wurde unter UV-Bestrahlung als uniforme Bahn sichtbar. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurde das Gel zuerst kurz in A. dest gewaschen und anschließend für 10 min im Depurinierungspuffer auf einem Schüttler inkubiert. Dies bewirkte die Einführung von Brüchen in der DNA, die den Transfer von größeren Fragmenten (>10 kb) auf die Membran erleichterte. Danach wurde das Gel für 5 min in A. dest gewaschen und für 30 min auf einem Schüttler zur DNA-Denaturierung in Transferpuffer äquillibriert. Der Transfer im alkalischen Milieu erfolgte über Nacht. Dabei wurde die DNA mittels aufwärtsgerichteter Kapillarkraft auf die Nylonmembran übertragen. Am nächsten Tag wurde die Membran mit der DNA-Seite nach oben bei RT getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der DNA an die Membran mittels UV-Strahlung im Crosslinker (120.000 µJ/cm<sup>2</sup>). Am Ende wurde die Membran in Frischhaltefolie eingepackt und geschützt bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

### 2.14.2 Herstellung und radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde

Als Sonde fungierte ein PCR-amplifiziertes DNA-Fragment mit einer Länge von 480 bp, das mit dem Primerpaar KOS-F2/R2 generiert wurde (vergleiche Kapitel 2.12.1 und 2.12.2).

### 2.14.3 Southern-Blot Verfahren

Zu Beginn äquillibrierte die Membran in 2 X SSC-Puffer und wurde anschließend in der Hybridisierungsröhre platziert. Zum Absättigen von nicht-spezifischen Bindestellen auf der positiv geladenen Nylonmembran wurde sie im Prähybridisierungspuffer bei 65° C und ständiger Rotation inkubiert. Zur Denaturierung der enthaltenen Lachs-Spermien-DNA wurde die Lösung vor Gebrauch für 10 min bei 96° C erhitzt und für weitere 5 min auf Eis gehalten. Nach 2-4 h wurde die Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Sonde gemischt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65° C im Drehinkubator. Am nächsten Tag wurde der Hybridisierungspuffer verworfen und die Membran kurz mit Waschpuffer umspült, welcher anschließend durch neuen Waschpuffer ersetzt wurde. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 65° C unter ständiger Rotation. Danach wurde die radioaktive Strahlung der Membran mit einem Geigerzähler gemessen. Das Waschen wurde so lange fortgesetzt bis die Signalstärke der Radioaktivität, je nach Größe der Membran, 50-100 Becquerel betrug. Nach dem Waschen wurde die Membran in Folie eingeschweißt und in eine Röntgenkassette eingeklebt. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette bei -70° C gelagert. Je nach Signalstärke variierte die Expositionsdauer zwischen 24 h und mehreren Tagen.

### 2.14.4 Puffer und Substanzen für Southern-Blot Verfahren

#### Depurinierungspuffer

0,185 M HCl  
ad 500 ml Millipore-H<sub>2</sub>O

#### (Prä-) Hybridisierungspuffer

0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
7 % SDS  
2 ml Millipore-H<sub>2</sub>O  
1 mM EDTA (pH 8)  
50 µg Salmon Sperm

#### Transferpuffer

0,5 M NaOH  
1,5 M NaCl  
ad 2 L Millipore-H<sub>2</sub>O

#### Waschpuffer

0,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,1 mM SDS  
1 mM EDTA (pH 8)  
ad 1 l Millipore-H<sub>2</sub>O

<b>Amersham</b>	Hybond-XL
<b>GE Healthcare</b>	Probe Quant G-50 Micro Columns (Aufreinigungssäule) Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-CTP)
<b>Perkin Elmer</b>	Isotop [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP

## 2.15. Zellbiologische Methoden

### 2.15.1 Kultivierung von Säugerzellen

Da Säugerzellen anfällig für Kontaminationen durch Bakterien und Pilze sind, wurden bei der Kultivierung ausschließlich sterile Lösungen und Geräte verwendet und das Arbeiten erfolgte an der Sterilwerkbank. Zusätzlich enthielt das verwendete Medium (DMEM) neben dem Serum-Supplement fötales Kälberserum (FKS), welches Transport- und Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren, niedermolekulare Nährstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren sowie ein breites Spektrum an Makromolekülen lieferte, noch die Antibiotika Penicillin und Streptomycin und das Antimykotikum Amphotericin B. Die Inkubation erfolgte bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser. Zur Beibehaltung der optimalen Wachstumsbedingungen musste das Medium alle drei bis vier Tage gewechselt werden. Dabei wurde die Kultur „gesplittet“. Das bedeutet, nur ein Teil der Zellen wurde in eine neue Schale überführt und so ein Überwachsen verhindert. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Schale mit sterilem 1 X PBS gewaschen und die adhären gewachsenen Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA vom Schalenboden gelöst. Nach der Inaktivierung des Trypsins mit frischem Medium wurden die verbliebenen Zellverbindungen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gelöst und eine entsprechende Menge der Einzelzellsuspension in eine neue Schale überführt.

#### Fibroblastenmedium

500 ml	DMEM + Glutamax
10 %	FKS
1 mM	Natriumpyruvat
1 X	Nicht-essentielle AA
2 mM	L-Glutamin
100 µg/ml	Penicillin / Streptomycin
2,5 µg/ml	Amphotericin B

#### Kultivierungsmedium

500 ml	DMEM
10 %	FKS
100 µg/ml	Penicillin / Streptomycin
2,5 µg/ml	Amphotericin B
<b>Invitrogen</b>	Opti-MEM Lipofectamin 2000
<b>Roche</b>	FuGENE HD
<b>Sigma-Aldrich</b>	Trypsin-EDTA (1 X)

### **2.15.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen**

Zum Einfrieren eukaryotischer Zellen wurden die Zellen einer konfluenten Schale trypsiniert, für 10 min bei 1500 rpm und 4° C zentrifugiert und anschließend in 1 ml Einfriermedium (900 µl FKS und 100 µl DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Cryo-Röhrchen überführt, auf Eis gelagert, und anschließend bei -80° C eingefroren. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in Flüssigstickstoff.

Zum Auftauen wurden eukaryotische Zellen in einem Wasserbad bei 37° C erwärmt, in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

### **2.15.3 Bestimmung der Zellzahl**

Mittels der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde ein Volumen von 10 µl einer Einzelzellsuspension eingesetzt und vier der neun Großquadranten mit einem jeweiligen Fassungsvermögen von 0,1 µl ausgezählt. Die durchschnittliche Zellzahl wurde mit dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert. Daraus ergab sich die Konzentration Zellzahl pro Milliliter. Je nach Versuch wurde eine entsprechende Zellzahl in einer Kulturschale vorgelegt.

### **2.15.4 Transfektion eukaryotischer Zellen**

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen zellfremder DNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird die Plasmid-DNA entweder nur kurzweilig (transient) eingebracht oder stabil ins Genom integriert. Ziel ist die Expression eines Gens, welches vorher in einen eukaryotischen Expressionsvektor inkloniert worden war, und die anschließende Funktionsanalyse des entsprechenden Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Transfektion durch Lipofektion. Dabei bindet die negativ geladene DNA an kationische Lipide und bildet so einen Liposom-Nukleinsäure-Komplex (Felgner et al, 1987). Dessen positive Gesamtladung ermöglicht eine hohe Transfektionseffizienz, indem er mit der negativ geladenen Membran der Zielzelle assoziiert und schließlich mittels Endozytose aufgenommen wird.

#### **2.15.4.1 Transfektion von Plasmid-DNA mittels Lipofectamin 2000**

Am Vortag der Transfektion wurde je nach Art des Experimentes die entsprechende Menge an zu transfizierenden Zellen vorgelegt. Am nächsten Tag wurden parallel zwei Lösungen vorbereitet, bei denen jeweils 500 µl Opti-MEM mit 10 µl Lipofectamin 2000 bzw. mit 6 µg Plasmid-DNA gemischt wurden. Beide Ansätze inkubierten für 5 min bei RT und wurden anschließend in ein Reaktionsgefäß vereint. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei RT. Da die

Mediumkomponenten FKS, Antibiotika und Antimykotikum die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen können, wurde in der Zwischenzeit das Medium von den Schalen abgesaugt und durch Medium ohne Zusätze ersetzt. Im Anschluss wurde das Gemisch aus Opti-MEM, Lipofectamin 2000 und DNA hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für etwa 24 Stunden unter Standardbedingungen. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder auf neue Schalen verteilt oder direkt geerntet.

#### 2.15.4.2 Transfektion von Plasmid-DNA mittels FuGENE HD

Am Vortag der Transfektion wurde je nach Art des Experimentes die entsprechende Menge an zu transfizierenden Zellen vorgelegt. Im ersten Schritt der Transfektion wurden Opti-MEM und Plasmid-DNA zusammenpipettiert und gemischt. Nach der Zugabe von FuGENE HD inkubierte die Probe für 15 min bei RT. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank unter Standardbedingungen. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder auf neue Schalen verteilt oder direkt geerntet.

**Tab. 2.13:** Transfektionstabelle: In Abhängigkeit der Zellmenge wurden entsprechende Kulturschalen sowie Mengen an Plasmid-DNA, Opti-MEM und FuGENE HD verwendet.

Schalen- durchmesser [cm]	Zellzahl	Plasmid-DNA [µg]	Opti-MEM [µl]	FuGENE HD [µl]
3,5	0,4x10 <sup>6</sup>	1	100	2,5
6	1,1x10 <sup>6</sup>	2	250	5
10	2,2x10 <sup>6</sup>	4	500	10

#### 2.15.5 Zell-Ernte und -Lyse

Für weitere funktionelle Analysen wurden die Zellen einen Tag nach der Transfektion geerntet. Dazu wurden sie mit kaltem 1 X PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen eingefroren, was die Effizienz der Lyse verstärkte. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurden die Proben am nächsten Tag auf Eis aufgetaut, für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

#### RIPA-Lysepuffer

50 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
1 %	Igepal
0,5 %	DOC
0,1 %	SDS

### 2.15.6 Proteinquantifizierung durch Bicinchoninsäure (BCA-Assay)

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce). Dazu wurden die Protokollvorgaben des Herstellers berücksichtigt. Mit dem NanoDrop ND-1000 und einer BSA-Eichkurve (0,2 bis 4 µg/µl) als Referenz wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt.

## 2.16 *Atp13a2*-Knock-Out

### 2.16.1 Murine embryonale Fibroblasten (MEFs)

Bei MEFs handelt es sich um mitotisch inaktivierte Fibroblasten, die als Versorgungszellen (*Feeder*-Zellen) für embryonale Stammzellen (ES) fungieren und so zur Aufrechterhaltung deren Pluripotenz beitragen. Im Allgemeinen werden sie aus Mausembryonen im Alter von 13 bis 14 Tagen gewonnen. Wegen der späteren Selektion positiver ES-Klone mit Antibiotika besitzen MEFs das Resistenzgen gegen Neomycin. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MEFs wurden von der AG Brüning bereitgestellt. Die Kultivierung erfolgte im MEF-Medium bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

#### MEF-Medium

500 ml	DMEM
10 %	FKS
1 mM	Natriumpyruvat

### 2.16.2 Mitomycin C-Behandlung

Die Kultivierung von ES-Zellen erfolgt auf MEFs, die mit Mitomycin C (MMC) mitotisch inaktiviert wurden. Dazu wurden 2 mg MMC in 200 ml MEF-Medium gelöst und steril filtriert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen für 2-4 h mit 10 ml MEF-Medium-MMC behandelt (Endkonzentration: 10 µg/ml). Anschließend wurden die Schalen dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen bis zum nächsten Tag in MEF-Medium inkubiert. Damit war sichergestellt, dass alle MMC-Reste beseitigt worden waren. Ein weiterer Effekt des MMCs ist, dass die behandelten Zellen nach dem Splitten nicht mehr von selbst an den Schalenboden anhaften können. Dies wurde erst durch die Behandlung der Schalen mit einer 0,2 %igen Gelatine-PBS-Lösung für 15 min bei 37° C möglich.

### 2.16.3 Murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

ES-Zellen stammen aus der inneren Zellmasse eines Mausembryos, der Blastozyste (3,5 dpc). Sie sind pluripotent, das heißt, sie können sich beinahe zu allen Zelltypen weiterentwickeln, und können zudem *in vitro* unbegrenzt kultiviert werden (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Wichtige Voraussetzung dafür ist ihre Kultivierung auf mitotisch inaktivierten Fibroblasten (*Feeder*-Zellen), die eine proliferationsfördernde und differenzierungshemmende Wirkung besitzen (Martin und Evans, 1975). Zusätzlich haben die ES-Zellen den Vorteil, dass sie nach einer genetischen Manipulation *in vitro* (Gossler *et al.*, 1986; Robertson *et al.*, 1986) in die Blastozyste reinjiziert werden können und nach deren Transfer in pseudoschwangere Weibchen am Aufbau aller fötalen Gewebe beteiligt sind (Bradley *et al.*, 1984). Ziel des Ansatzes ist die sogenannte Keimbahntransmission der rekombinanten Zellen, durch die die Modifikation stabil an die nächsten Generationen weitergegeben wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden V6.5 ES-Zellen (Eggan *et al.*, 2002) verwendet. Diese stammen von Mäusen mit einem männlichen 129/Sv und einem weiblichen C57Bl/6 Elterntier. Sie wurden auf gelatinisierten und mit MEFs beschichteten, MMC behandelten Petrischalen kultiviert (Evans und Bozdech, 1981). Das ES-Medium wurde täglich gewechselt und die Kultivierung erfolgte in einem Inkubationsschrank bei 37° C und 10 % CO<sub>2</sub>. Zur Verhinderung der Differenzierung durch eine zu hohe Konfluenz wurden die ES-Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Dies wurde durch die Zugabe des Zytokins LIF (*leukemia inhibitory factor*) unterstützt (Smith, 1988). Da die V6.5 ES-Zellen in CB20-Blastozysten injiziert wurden, zeigten die Nachkommen einen schwarz-weißen Fellchimärismus, anhand dessen der Anteil manipulierter Zellen an der Embryogenese abgeschätzt wurde.

**Tab. 2.14:** Verwendete Mauszelllinien

Zelllinie	Ursprung	Verwendung
MEF	Murine embryonale Fibroblasten, Neo-resistent	Wachstumsschicht für ES-Zellen
V6.5 (ES-Zellen)	ICM einer ♂129/Sv x ♀C57Bl/6 Blastozyste (Eggan <i>et al.</i> 2002)	Transfektion des Atp13a2 <i>Targeting</i> - Vektors

**Tab. 2.15:** Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Quelle	Beschreibung
C57BL/6	Charles River (USA), Jackson Laboratories (USA)	Inzucht-Stamm, schwarze Fellfarbe
CB20	Erhaltungszucht des Institutes für Genetik der Universität Köln	F1 von C57Bl/6 x BALB/c, 20x auf BALB/c zurückgekreuzt, weiße Fellfarbe

**ES-Medium**

---

500 ml	DMEM
15 %	FKS
1 mM	Natriumpyruvat
2 mM	L-Glutamin
1 X	nicht-essentielle AA
1,2 ml	LIF
0,2 µM	β-Mercaptoethanol

**2.16.4 Aufreinigung des *Targeting*-Vektors**

Die Aufreinigung des *Targeting*-Vektors für die anschließende Transfektion in ES-Zellen erfolgte anhand der Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der DNA, RNA sowie Proteine voneinander getrennt werden. Dazu wurde die linearisierte Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 500 µl in TE-Puffer aufgenommen und mit einem Volumen Phenol gemischt. Nach der Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm wurde die obere, wässrige Phase, die die DNA und RNA enthält, vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wiederum mit dem gleichen Volumen an Phenol gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand zum Entfernen von Phenolresten zweimal mit einem Volumen Chloroform gemischt, zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit einem Volumen Isopropanol gemischt, wodurch die enthaltene DNA gefällt wurde. Nach der Zentrifugation von 30 min bei 13000 rpm wurde die DNA mit 200 µl Ethanol (70 %) gewaschen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20° C gelagert.

**2.16.5 Transfektion von ES-Zellen**

Die Transfektion von ES-Zellen erfolgte über Elektroporation (Neumann *et al.*, 1982; Potter *et al.*, 1984). Dazu wurde 4 h vor Beginn das Medium gewechselt, damit sich die ES-Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion in der Synthesephase befinden, was für die Rekombination eine unerlässliche Voraussetzung ist. Später wurden 40 bis 50 µg DNA (linearisierter *Targeting*-Vektor) in 400 µl Transfektionsmedium aufgenommen und mit den ES-Zellen (etwa  $1 \times 10^7$ ) gemischt, die ebenfalls in 400 µl Transfektionsmedium vorlagen. Anschließend wurde diese Suspension in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation, bei der die Membran durch ein elektrisches Feld permeabilisiert wird, erfolgte mit einem Elektroporator bei 240 V und 500 µF. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die Zellen in 40 ml ES-Medium überführt und auf vier MMC-behandelten MEF-Schalen aufgeteilt. Jeder Transfektionsansatz wurde in doppelter Ausführung vorgenommen.

### 2.16.6 Selektion positiv-transfizierter ES-Klone

Nach der Transfektion der ES-Zellen mussten die Zellen identifiziert werden, in denen der *Targeting*-Vektor ins Genom integriert wurde. Dies erfolgte anhand zweier Selektionsmarker. Da das Konstrukt das Neomycin-Resistenzgen enthielt, wurde die Positivselektion mit einem Neomycin-Analogon durchgeführt. Dazu wurde dem ES-Medium ab dem zweiten Tag nach der Transfektion G418 (Endkonzentration 225 µg/ml) beigefügt. Da der *Targeting*-Vektor sowohl zufällig als auch über homologe Rekombination ins Genom integriert werden kann, war zusätzlich das Thymidinkinase-Gen des Herpes simplex-Virus für eine Negativselektion enthalten. Dieses bleibt nur im Falle einer zufälligen Integration erhalten und geht bei homologer Rekombination verloren (Folger *et al.*, 1982). Zur Negativselektion wurde dem ES-Medium ab dem fünften Tag nach der Transfektion Ganciclovir (Endkonzentration 2 µM) beigefügt, welches durch die Thymidinkinase phosphoryliert werden kann. Nach einer fortführenden Phosphorylierung durch zelluläre Enzyme wird diese Substanz schließlich bei der Replikation in die DNA eingebaut, was zum Zelltod führt und somit ES-Klone deletiert, in denen DNA zufällig integriert wurde. Positiv- und Negativselektion wurde bis zur Isolierung der ES-Klone durchgeführt.

### 2.16.7 Isolierung von ES-Zellklonen

Je nach Selektionsverlauf wurden die verbliebenen ES-Klone zwischen dem achten und dem zehnten Tag nach der Transfektion isoliert. Dazu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und danach ein weiteres Mal mit PBS bedeckt. Danach wurden unter semi-sterilen Bedingungen am Stereomikroskop nur runde, scharfkantige ES-Klone mittels Pipette in einem Volumen von 20 µl aufgenommen und in eine Vertiefung einer 96-Well Platte überführt, in der bereits 50 µl Trypsin vorlagen. Nach 30 min wurden die ES-Kolonien für 5 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abstoppen dieser Reaktion mit ES-Medium wurden die Zellen auf drei gelatinisierte und MEF-MMC-beschichtete 96-Well Platten verteilt. Nach drei bzw. vier Tagen wurde jeweils eine Platte mit PBS gewaschen, mittels Trypsin für 5 min bei 37° C gelöst und in Einfriermedium (80 % FKS, 20 % DMSO) aufgenommen. Die Platten lagerten bis zum weiteren Gebrauch bei -80° C und dienten der Archivierung potentiell positiver ES-Klone. Die Zellen der dritten Platte wurden auf drei neue 96-Well Platten verteilt, bis zur Konfluenz expandiert und anschließend bei -20° C gelagert. Sie wurden für die Identifikation positiver Klone mittels Southern-Blot Verfahren verwendet.

### 2.16.8 DNA-Isolierung aus ES-Zellen

Zur DNA-Isolierung wurden die ES-Zellen in 50 µl Lysepuffer inkubiert. Dies erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 55° C im Wasserbad. Am nächsten Tag wurden die Platten zuerst auf RT abgekühlt und die DNA durch Zugabe von 100 µl Ethanol (100 %) und einer Inkubation bei RT für 4 h gefällt. Nach dem vorsichtigen Invertieren der Platten wurden 100 µl Ethanol (70 %) zum DNA-Pellet gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach dem vorsichtigen Abkippen des Alkohols trocknete die DNA für 15 min bei RT. Daran schloss sich der Verdau der DNA mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease an. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37° C in einer feuchten Kammer im Wasserbad.

#### Lysepuffer

10 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
10 mM	EDTA
0,5 %	Sarkosyl
0,4 mg/ml	Proteinase K

### 2.16.9 Auftauen und Expandieren positiver ES-Klone

Nach der Identifikation positiver ES-Klone anhand des Southern-Blot Verfahrens wurden die entsprechenden Zellen von der Archivierungsplatte in Kultur genommen und in eine Vertiefung einer 24-Well Platte, auf der Feeder-Zellen ausgesät waren, überführt. Einige Tage später wurden sie auf eine 6-Well Platte passagiert und wiederum ein paar Tage später auf drei 10 cm-Schalen verteilt. Die Zellen von zwei Schalen wurden entsprechend der Konfluenz portioniert und in Flüssigstickstoff gelagert. Die Zellen der dritten Schale wurden geerntet, die DNA isoliert und anschließend die Ergebnisse der ersten Southern-Blot Analyse verifiziert.

### 2.16.10 Blastozysten-Injektion und -Transfer

Mittels Mikromanipulator (Leica) wurden 10 bis 15 der vorbereiteten ES-Zellen in eine Blastozyste von CB20-Weibchen mikroinjiziert und bis zum Transfer in pseudoschwangere Weibchen in Blastozystenmedium bei 37° C inkubiert. Die Injektion und der Transfer der Blastozysten erfolgten im Zentrum für Mausgenetik des Instituts für Genetik der Universität zu Köln.

## **2.17 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.17.1 Western-Blot**

Für die Proteinanalyse mittels Western-Blot Verfahren wurden im Allgemeinen 5-10 µg Totallysat in einem Verhältnis von 1:1 mit 2 X Ladepuffer, der sich aus SDS-Ladepuffer, β-Mercaptoethanol und PIC zusammensetzt, gemischt und anschließend eingefroren. Da es sich zeigte, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ATPase ATP13A2 Hitze-sensitiv ist, wurden die Proben am nächsten Tag auf Eis aufgetaut und ohne Hitzedenaturierung direkt auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nur so war eine Detektion des Zielproteins in Form einer diskreten Bande möglich.

#### **2.17.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes (Laemmli, 1970). Bei SDS handelt es sich um eine anionische Detergenz. Durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den eigenen Kohlenwasserstoffketten und den Proteinseitenketten kommt es zur Bildung von Komplexen, die ein annähernd konstantes Verhältnis zwischen SDS und Protein von etwa 1,4:1 (w/w) zeigen. Daraus ergibt sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen der angelagerten SDS-Menge und dem Molekulargewicht des Polypeptids, auf dem die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen basiert. Durch die stark negative Ladung des SDS kann die Ladung des Proteins vernachlässigt werden, so dass die Mobilität in erster Linie durch die Masse des SDS-Protein-Komplexes bestimmt wird.

Das Trägermaterial der SDS-PAGE ist das Polyacrylamid (PAA), ein Polymer aus Acrylamid und Methylen-Bisacrylamid. Während die Porenweite des Polyacrylamid-Gels von der Acrylamidkonzentration abhängt, bleibt das Verhältnis zwischen Acrylamid und Methylen-Bisacrylamid konstant. Zur schärferen Auftrennung der Proteine verfügt es über verschiedene Porengrößen. Daher spricht man auch von einer diskontinuierlichen Elektrophorese.

Bei dem verwendeten Puffer handelte es sich um einen 1 X SDS-Laufpuffer. Die Western-Blot Analyse wurde mit einem von Invitrogen vertriebenen System durchgeführt. Dabei wurden zur Auftrennung der Proteine kommerzielle NuPAGE 3-8 % Tris-Acetat-Gele und NuPAGE 4-12 % Bis Tris Gele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min mit einer Spannung von 200 V. Die Elektrophorese und der Transfer wurden in der XCell SureLock-Minizelle durchgeführt. Während das Tris-Acetat Gel besonders für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einer Größenordnung von 80-160 kDa geeignet war, wurde das Bis-Tris Gel für kleinere Proteine verwendet.

### 2.17.1.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

An die elektrophoretische Auftrennung der Proteine schloss sich ihr Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Amersham Biosciences) an, um sie anschließend mittels Antikörperbindung zu detektieren. Dabei wanderten die negativ geladenen Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf die Membran. Da die PVDF-Membran einen extrem hydrophoben Charakter hat, musste sie vor Gebrauch aktiviert werden, indem sie für 30 sec in Methanol inkubierte. Anschließend wurde das überschüssige Methanol mit Wasser abgewaschen und die Membran äquibrierte für mindestens 15 min im Transferpuffer. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel auf die Membran gelegt und, umgeben von ebenfalls in Transferpuffer eingeweichten Filterpapieren und Blotting-Polstern, in das XCell-II-Blot-Modul eingesetzt. Der Aufbau erfolgte so, dass die Membran zwischen dem Gel und der Anode lag. Dadurch war garantiert, dass die negativ geladenen Polypeptide vom Gel in Richtung Anode wandern und an der dazwischen liegenden Membran immobilisiert werden. Für den Transfer wurde für 1 h eine Spannung von 32 V und ein Widerstand von 230 mA angelegt.

### 2.17.1.3 Immunoblot

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde ihre Expression durch Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. Dazu wurde die Membran nach dem Proteintransfer zum Entfernen überschüssigen Methanols in A. dest gewaschen und inkubierte anschließend für 1 h in einer 6 %igen Milchpulver-PBST-Lösung auf einem Schüttler, was dem Absättigen von unspezifischen Bindestellen diente. Daran schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper an, der einer 3 %igen Milchpulver-PBST-Lösung in einer entsprechenden Konzentration zugesetzt war. Dieser bindet spezifisch an die Erkennungssequenz des Antigens (Epitop). Das geschieht entweder proteinspezifisch oder über einen Protein-Affinitäts-Tag, welcher N- oder C-terminal an das Zielprotein fusioniert ist. Dabei rotierte die Membran entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C. Danach wurde sie zum Entfernen von nicht gebundenen AK dreimal für 5 min in PBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der einer 3 %igen Milchpulver- PBST-Lösung zugesetzt war. Dieser ist spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und ist zusätzlich an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Nach dem Abwaschen ungebundener AK mit PBST für 1 h, bei dem der Puffer mehrfach gewechselt wurde, erfolgte die Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz.

### 2.17.1.4 Chemilumineszenz-Detektion

Beim Prozess der sogenannten Chemilumineszenz kommt es durch die Einwirkung der HRP zu einer oxidativen Freisetzung von Stickstoff aus Luminol, was eine Abstrahlung von Lichtenergie zur Folge hat. Dabei hat das emittierte Licht eine Wellenlänge von 400 bis 700 nm. Das Ausmaß der Reaktion kann quantifiziert werden, indem ein Film aufgelegt wird. Je stärker die Oxidation, desto intensiver die Schwarzfärbung.

Für die Chemilumineszenzreaktion wurden Luminol und der Peroxidpuffer in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Danach wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine Glasplatte gelegt, die Chemilumineszenzlösung gleichmäßig verteilt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran abgetropft, in Folie eingepackt und in eine Filmkassette eingeklebt. Danach wurde ein Film für unterschiedliche Zeiträume exponiert.

### 2.17.1.5 Puffer und Substanzen zur Western-Blot Analyse

<b>GE Healthcare</b>	Hybond-P PVDF Membran Hyperfilm ELC
<b>Invitrogen</b>	NuPAGE Novex 3-8 % Tris Acetat Gel NuPAGE Novex 4-12 % Bis Tris Gel NuPAGE LDS Ladepuffer NuPAGE SDS Laufpuffer (Tris-Acetat, MES, MOPS) NuPAGE Transferpuffer Novex Sharp Standard (Protein-Leiter) Antioxidant
<b>Perbio</b>	Super Signal West Dura Luminol/Enhancer Solution Super Signal West Dura Stable Peroxide Buffer

#### Ladepuffer

500 µl	LDS Ladepuffer (4 X)
350 µl	H <sub>2</sub> O
100 µl	Protease Inhibitor Cocktail
50 µl	DTT (2 M)

#### Transferpuffer

25 ml	Transferpuffer (20 X)
50 ml	Methanol
500 µl	Antioxidant
ad 500 ml	A. dest

#### Laufpuffer

40 ml	SDS-Laufpuffer (20 X)
ad 800 ml	A. dest

#### Blockierungslösung

4 g	Milchpulver
ad 100 ml	PBST

#### PBST

2 ml	Tween 20
100 ml	PBS (10 X)
ad 1 l	A. dest

### 2.17.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurde die indirekte Immunfluoreszenzanalyse angewandt. Dazu wurden Primärantikörper eingesetzt, die spezifisch an die zu untersuchenden Proteine bzw. an Markerproteine für bestimmte Zellorganelle binden. Die Visualisierung der Primärantikörper kann auf zwei Arten geschehen. Zum einen können Spezies-spezifische Anti-Immunglobulin-Sekundärantikörper verwendet werden, die mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelt sind. Grundvoraussetzung dafür ist, dass die eingesetzten Primärantikörper von unterschiedlichen Spezies stammen, da es sonst zu einer Kreuzreaktion der Sekundärantikörper kommen würde. Da dies nicht immer möglich war, wurde alternativ die Zenon-Technologie eingesetzt, bei der Fluorochrom-markierte Sonden eingesetzt werden. Hierbei handelt es um den Antigen-bindenden Teil eines Antikörpers ( $F_{ab}$ -Fragment), der spezifisch an den konstanten Bereich ( $F_c$ -Fragment) der jeweils verwendeten IgG-Isoform des Primärantikörpers bindet. Somit konnten die eingesetzten Primärantikörper von der gleichen Spezies stammen, mussten sich allerdings in ihrer IgG-Isoform unterscheiden.

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die transfizierten Zellen auf Deckgläschen unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ihre Fixierung mittels Dehydrierung. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 1 ml eines Methanol-Aceton-Gemisches (Verhältnis 1:1) für 15 min fixiert. Zum Trocknen blieben die Kulturschalen für 10 min offen stehen. Danach wurden sie bis zum weiteren Gebrauch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Färbung wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe einer PBS-Triton X-100 (Anteil: 1 %)-Lösung permeabilisiert. Die Inkubation dauerte 15 min. Nach drei Waschschritten mit PBS für jeweils 5 min wurden unspezifische AK-Bindestellen mit einer PBS-BSA (Anteil: 3 %)-Lösung für 30 min geblockt. In der Zwischenzeit wurde der Zenon-Komplex vorbereitet. Dazu wurden 1-2  $\mu\text{g}$  Antikörper mit 10  $\mu\text{l}$  Zenon-Sonde gemischt. Nach der Inkubation von 5 min im Dunkeln bei RT erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Blockierreagenz. Darin enthalten sind unspezifische IgG-AK, die nicht gebundene Sonden abfangen und so ein unspezifisches Binden in der Zelle verhindern. Diese Reaktion erfolgte wiederum für 5 min im Dunkeln bei RT. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zu der PBS-BSA Lösung gegeben. Die Färbung erfolgte auf dem Schüttler entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS für jeweils 5 min wurde die Zenon-Sonde mit einer PBS-Formaldehyd-Lösung (3,7 % Formaldehydanteil) für 15 min fixiert. Nach einem letzten Waschen mit PBS wurde das Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert. Dazu wurden eine Kern-färbende DAPI- und eine Fluoreszenz-*Mounting*-Medium-Lösung in einem Verhältnis von 1:5 gemischt und ein Volumen von 10  $\mu\text{l}$  auf einen Objektträger vorgelegt. Darauf wurde, mit der Zellenseite nach unten, vorsichtig das Deckgläschen gelegt und überschüssiges Medium mittels Filterpapier

ausgestrichen. Die Präparate wurden anschließend direkt am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert oder lichtgeschützt bei 4° C gelagert.

**BSA/PBS (3 %)**

300 mg BSA  
ad 10 ml PBS

**Permeabilisierungslösung (1 %)**

10 ml Triton X-100  
ad 1 l PBS

**Fixierlösung (4 %)**

40 ml Formaldehyd  
ad 1 l PBS

**Molecular Probes**

Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 568

**Vector Laboratories**

Mounting Medium with DAPI H-1500

Mounting Medium for fluorescence H-1400

**Antikörper**

**Tab. 2.16:** Verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Organismus</b>	<b>Isoform</b>	<b>Hersteller</b>
β-Aktin	1 : 20.000	Maus	IgG <sub>2a</sub>	Sigma
ATP13A2	1 : 1.000	Kaninchen	IgG	Sigma
Calnexin	1 : 500	Maus	IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences
GAPDH	1 : 10.000	Kaninchen	IgG	Cell Signaling Technology
GM130	1 : 1.000	Maus	IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences
H4B4 (LAMP2)	1 : 1.000	Maus	IgG <sub>1</sub>	Hybridoma
LC3	1 : 1.000	Kaninchen	IgG	Novus Biologicals
p62	1 : 1.000	Maus	IgG <sub>1</sub>	MBL
PDI	1 : 1.000	Maus	IgG <sub>1</sub>	Stressgen
Ubiquitin	1 : 1.000	Maus	IgG <sub>2a</sub>	Calbiochem
V5	1 : 5.000	Maus	IgG <sub>2a</sub>	Invitrogen
α-Kaninchen	1 : 5.000	Ziege	IgM	Perbio
α-Maus	1 : 5.000	Ziege	IgM	Perbio

### 2.17.3 N-Glykosylierung

Die Analyse des ATP13A2-Wildtyps und der acht PD-Mutanten mittels Western Blot Verfahren zeigte zwei Banden mit einem Größenunterschied von wenigen Kilodalton. Zur Überprüfung einer möglichen N-Glykosylierung wurden die Proteine mit N-Glykosidase verdaut. Während unglykosylierte Proteine nach der Behandlung keinen Unterschied im Molekulargewicht zeigen, sollte man bei N-glykosylierten Proteinen nur ein Signal auf Höhe der unteren Bande sehen.

Zunächst wurden Hek293T-Zellen mit den ATP13A2-Expressionsvektoren transient transfiziert, am nächsten Tag die Proteine mittels RIPA-Lysepuffer isoliert und anschließend mit der N-Glykosidase behandelt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tab. 2.17:** Reaktionsansatz des N-Glykosidase-Verdaus

Komponente	Mengenangabe
Lysat	10 µg
SDS-Ladepuffer (4 X)	7,5 µl
β-Mercaptoethanol	1,5 µl
Reaktionspuffer	3 µl
NP-40	3 µl
N-Glykosidase (250 U)	1 µl
Wasser	ad 30 µl

Die Inkubation erfolgte für 30 Min bei RT. Daran schloss sich die Analyse der behandelten Proben mittels Western-Blot an (vergleiche Kapitel 2.17.1).

### 2.17.4 Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation erlaubt eine subzelluläre Trennung von cytosolischen und membranständigen Proteinen, bei der die Zellbestandteile schonend in einem Sucrose-Puffer entsprechend ihrer Größe und Dichte aufgetrennt werden (Marsh *et al.*, 1987).

In einer 10 cm Schale wurden  $1,8 \times 10^6$  Hek293T-Zellen kultiviert und mit 4 µg des entsprechenden Expressionsvektors (ATP13A2-WT und KRS-Mutanten) transient transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie mit 6 ml kaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend in PBS geerntet. Nach dem Pelletieren für 10 min bei 500 g und 4° C wurden die Zellen in 1,8 ml Sucrose-Puffer und 200 µl PIC (10 X) resuspendiert und in einen Glaskolben überführt. Die Homogenisierung erfolgte durch wiederholtes Auf- und Abziehen des Pistills (ca. 50x). Anschließend wurde die Suspension in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation für 10 min bei 700 g und 4° C pelletiert. Etwa 1,6 ml des Überstandes wurden in ein Beckmann-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 50.000 g zentrifugiert. Während das Pellet sämtliche membranständige Proteine

enthielt, lagen die cytosolischen Proteine im Überstand vor. Nach ihrer Überführung in ein neues Reaktionsgefäß, wurden die Membranproteine in RIPA-lysepuffer aufgenommen.

Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche und saubere Fraktionierung wurden beim Western-Blot Verfahren Antikörper gegen das Membranprotein Calnexin und das cytosolische Protein  $\beta$ -Aktin eingesetzt.

### **Sucrose-Puffer**

250 mM	Sucrose
10 mM	Triethanolamin (pH 7,8)
10 mM	Essigsäure

### **2.17.5 MTT-Assay**

Beim MTT-Versuch handelt es sich um einen *in vitro* Zelltoxizitätstest, bei dem das wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumsalz (MTT) anhand zellulärer Dehydrogenasen (zum Beispiel NADH, NADPH und Succinat-Dehydrogenasen) zum violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird (Mosmann, 1983). Je höher der Anteil lebender Zellen, desto stärker ist diese Reaktion. Somit können Aussagen über die Lebensfähigkeit von Zellen gemacht werden, nachdem sie beispielsweise einer zellstressverursachenden Substanz ausgesetzt waren.

Zu Versuchsbeginn wurden etwa 10.000 Zellen pro *Well* vorgelegt und für weitere 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Stressapplikation mit der entsprechenden Substanz. Die Dauer der Inkubation variiert zwischen einigen Stunden bis zu zwei Tagen. Anschließend wurde das verbrauchte Medium durch frisches Medium mit einer MTT-Konzentration von 0,5 mg/ml ersetzt. Nach einer Inkubation von 3 h unter Standardbedingungen wurde eine mit Salzsäure versetzte Isopropanollösung zu den Zellen gegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die violetten Formazan-Kristalle vom Boden gelöst. Die photometrische Absorptionsmessung erfolgte mit dem Tecan-Platten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 550 nm.

### **MTT-Stocklösung [12.1 M]**

50 mg	MTT
10 ml	PBS

### **Isopropanol-Stocklösung**

50 ml	Isopropanol
0,033 N	HCl

Für jeden Versuch frisch ansetzen

### 2.17.6 Lipidanalyse

Die Lipidanalyse der Fibroblasten, die aus dem Zahnfleisch eines KRS-Patienten sowie einer gesunden Kontrollperson gewonnen wurden, erfolgte in einer Kooperation mit Prof. Dr. Konrad Sandhoff vom Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie an der Universität Bonn und wurde von Herrn Dr. Hany Farwanah durchgeführt. Dazu wurden die Lipide aus den Zellen mittels eines Chloroform-Methanol Gemisches extrahiert und anschließend auf Hochleistungsdünnschichtchromatographieplatten analysiert.

### 2.17.7 Immunpräzipitation (IP)

Ziel der Immunpräzipitation ist die Isolierung eines gewünschten Antigens aus dem Gesamtlysat mit Hilfe eines Antikörpers. Dabei wird zunächst zur Zellsuspension ein Antikörper gegeben, der spezifisch an das zu untersuchende Antigen bindet. Anschließend erfolgte die Zugabe von Agarose, auf deren Oberfläche Protein A (Protein in der Zellwand von *Staphylococcus aureus*) und Protein G (Protein in der Zellwand von bestimmten Streptococccen-Stämmen) angeheftet sind, welche mit einer hohen Affinität an die F<sub>c</sub>-Region vieler Säugetier-Immunglobuline binden und so den Antigen-Antikörper-Komplex aus einer Lösung präzipitieren. Zunächst wurden Hek293T-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und am Folgetag auf zwei Schalen verteilt. Nach dem Anhaften wurden die Zellen für 12 h mit 10 µM des Proteasominhibitors MG-132 behandelt. Anschließend wurden sie geerntet, mittels RIPA-Lysepuffer lysiert und die Proteinkonzentration mit der BCA-Methode quantifiziert. Für die IP wurden 50-100 µg Gesamtlysat in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und das Gesamtvolumen auf 800 µl mit RIPA-Puffer eingestellt. Nach der Zugabe von 1-2 µg V5-Antikörper inkubierten die Proben für 3 h bei 4° C bei ständiger Rotation. Anschließend wurden zu den Proben 35 µl Protein A/G-Agarose hinzugegeben und die Inkubation erfolgte über Nacht bei gleichbleibenden Konditionen. Am nächsten Tag wurde die Agarose mittels Tischzentrifuge pelletiert, dreimal mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen und in 20 µl Ladepuffer (2 X) und 2 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen. Danach wurden die Proben für 7 min bei 95° C denaturiert, was zum Dissoziieren der Proteine von der Agarose führte, und bis zur Analyse mittels Western-Blot Verfahren auf Eis gehalten.

### 2.18 Statistische Auswertungen

Nach Möglichkeit wurden die Versuche mehrfach durchgeführt. Darauf basierend wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Mit Hilfe des Student'schen T-Test (Excel, MS Office) wurde eine mögliche statistische Signifikanz der Ergebnisse ermittelt. Die P-Werte sind in den Diagrammen mit einem Stern (\*) markiert. Es gilt: \* = p<0,05; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p<0,001.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ausgangssituation

Das Kufor-Rakeb Syndrom (KRS) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte neurodegenerative Erkrankung, die bislang lediglich bei einer jordanischen Familie beschrieben worden war (Najim al-Din, 1994). Zwar war die genaue genetische Ursache unbekannt, doch wurde in vorangegangenen Kopplungsanalysen der Locus dieser Erkrankung auf einen 9 cM großen Bereich auf Chromosom 1p36 eingegrenzt (Hampshire *et al.*, 2001). In einer nicht-konsanguinen Familie aus Chile, in der vier von elf Kindern KRS-Symptome zeigten, wurden zunächst Kandidatengene/-loci untersucht, die an der Pathogenese einer autosomal-rezessiv vererbten PD-Erkrankung beteiligt sein können. Dazu gehörten PARK2 (*Parkin*), PARK7 (*DJ-1*) und PARK6 (*PINK1*). Nachdem diese Gene mittels direkter Sequenzierung der kodierenden Exons ausgeschlossen waren, wurde eine Haplotypanalyse im Bereich der benachbarten PARK7-KRS-PARK6 Loci mit den in Abbildung 3.1 aufgeführten Mikrosatelliten durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle KRS-Patienten die Kombination derselben Haplotypen im Bereich des KRS-Lokus besaßen, welche durch den gelben und den roten Balken gekennzeichnet sind und die bei keinem der gesunden Familienangehörigen vorlag. Dadurch konnte die Region auf 6,6 cM bzw. 3,2 Mb weiter eingegrenzt werden, in der etwa 40 Gene lagen.

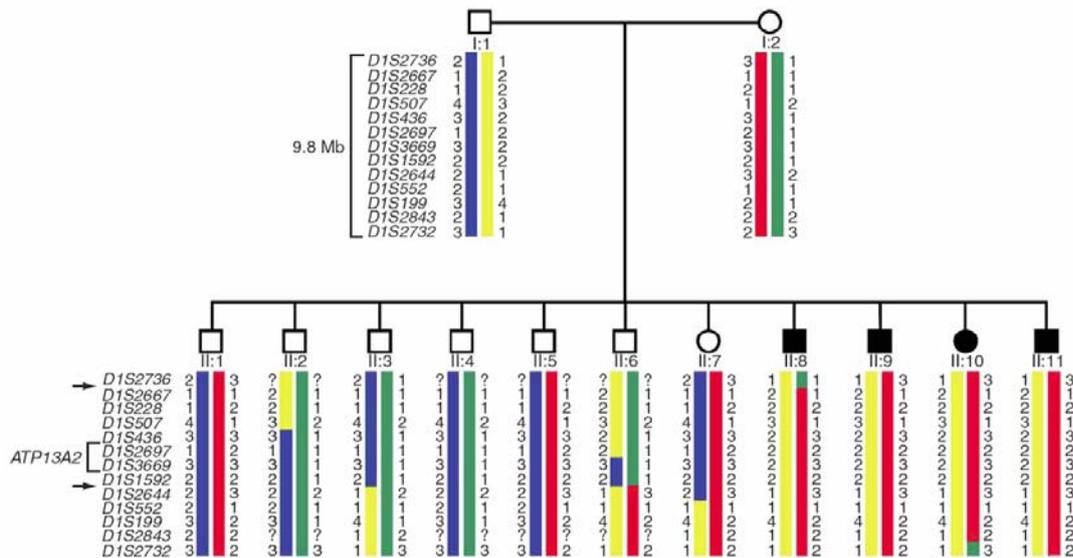


Abb. 3.1: Dargestellt sind der Stammbaum und die Haplotypanalyse der chilenischen Familie. Die Quadrate symbolisieren männliche Personen, die Kreise stehen für weibliche. KRS-Patienten sind durch ausgefüllte Symbole dargestellt. Am linken Rand sind die untersuchten Mikrosatelliten aufgelistet. Die Patienten haben einen Haplotypen gemeinsam, der hier durch den gelben und roten Balken gekennzeichnet ist. Die Pfeile kennzeichnen Rekombinationen bei II:8 und II:6, durch die die KRS-Region weiter eingegrenzt werden konnte.

Anhand direkter Sequenzierung aller kodierenden Exons des *ATP13A2*-Gens bei Mitgliedern der chilenischen Familie wurden zwei Mutationen identifiziert, die bei allen KRS-Patienten im *compound*-heterozygoten Zustand vorlagen. Bei der vom Vater vererbten Mutation handelt es sich um einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Position +5 der Donorspleißstelle von Exon 13 (c.1306+5G→A; K1). Dies führt zu einer Reduktion der Spleißeffizienz, bei der der *in silico* prädizierte Wert (Datenbank: BDGP) von 0,98 auf 0,11 fällt und folglich das Exon 13 deletiert wird. Diese 111 bp-Deletion hat einen nachhaltigen Effekt, da das Exon 13 für einen Teil der dritten Transmembrandomäne kodiert und folglich Einfluss auf die Proteinstruktur hat. Bei der zweiten Mutation, die von der Mutter vererbt wurde, handelt es sich um die Deletion eines Cytosins an Position 3057 (c.3057delC bzw. p.1019GfsX1021; K3). Hierbei kommt es zu einer Leserasterverschiebung und zu einem vorzeitigen Stop-Codon nach zwei Aminosäuren. Die Folge ist das Fehlen der letzten 160 AA des nativen Proteins, was zum Wegfall der Transmembrandomänen acht bis zehn führt. Zur Bestätigung, dass Mutationen im *ATP13A2*-Gen die genetische Ursache für das Kufor-Rakeb Syndrom sind, wurde dieses Gen in der jordanischen Familie anhand von direkter Sequenzierung untersucht. Dabei wurde bei den Patienten und den heterozygoten Anlagenträgern eine Insertion von 22 bp in Exon 16 (c.1632\_1653dup22 bzw. p.552LfsX788; K2) identifiziert. Aufgrund der konsanguinen Beziehung der beiden Elternteile zueinander, lag diese Mutation bei allen KRS-Patienten wie erwartet im homozygoten Zustand vor.

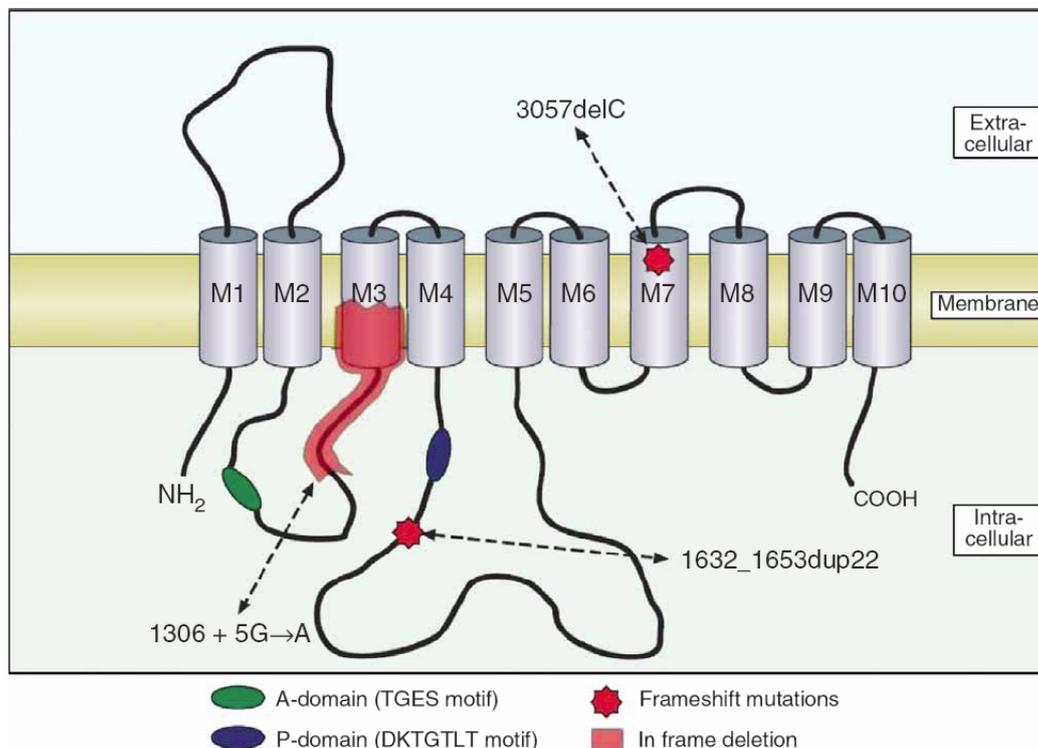


Abb. 3.2: Dargestellt ist die putative Topologie von *ATP13A2*. Für das Protein werden zehn Transmembrandomänen vorhergesagt. Aktivierungs- und Phosphorylierungsdomänen sind durch ein grünes bzw. blaues Feld hervorgehoben. Die beiden roten Sterne kennzeichnen die Mutationen, die den Leserahmen verändern (c.1632\_1653dup22 und c.3057delC). Der von Exon 13 kodierende Proteinabschnitt ist durch die rote Schattierung dargestellt.

Anhand *in silico* Klonierung und PCR-basierender Amplifikation wurde ermittelt, dass *ATP13A2* einen offenen Leserahmen von 3543 bp hat und für ein Protein mit 1180 AA kodiert. Auf genomischer Ebene ist das Gen 26 kb groß und enthält 29 kodierende Exons. Aufgrund des charakteristischen Aminosäuremotivs DKTGTL gehört sie zu den P-Typ ATPasen und wurde in die Subgruppe Typ V eingeordnet, über deren Funktion und Substratspezifität bislang nichts bekannt war. Anhand einer Hydrophobizitätsanalyse, die auf einem von Kyte und Doolittle entwickelten Algorithmus basiert, wurden für *ATP13A2* zehn Transmembrandomänen prädiagnostiziert (Kyte und Doolittle, 1982). Somit entsprach ihre Proteinstruktur den Erkenntnissen, die sich auf den Ergebnissen der Röntgenkristallographie von SERCA stützen (Toyoshima *et al.*, 2000).

### 3.2 Stammbaumanalyse

Datenbankanalysen (NCBI, UCSC) ergaben, dass vier weitere humane Gene eine hohe Homologie zu *ATP13A2* aufzeigten und vermutlich somit der gleichen Genfamilie angehören. Zur Untersuchung einer möglichen verwandtschaftlichen Beziehung wurde das Programm ClustalX verwendet (Thompson *et al.*, 1997), mit dem die Aminosäuresequenzen der einzelnen ATPasen miteinander verglichen wurden.



Abb. 3.3: Das von ClustalX berechnete Dendrogramm zeigt die verwandtschaftliche Beziehung der fünf P-Typ ATPasen ATP13A1 bis ATP13A5.

Die größten Homologien bestehen zwischen ATP13A3, ATP13A4 und ATP13A5, die alle in einer gemeinsamen chromosomalen Region auf 3q29 lokalisiert sind. Als nächstes folgt ATP13A2 (Chromosom 1p36.13). ATP13A1 ist am wenigsten zu den übrigen ATPasen homolog und der Genlocus liegt auf 19p13.11.

Basierend auf ihrer Substratspezifität werden die P-Typ ATPasen in fünf Gruppen gegliedert. Die ATPasen 13A1 bis 13A5 gehören zur fünften Gruppe, über deren Substratspezifität und Funktion bislang nichts bekannt war.

### 3.3 Expressionsanalyse von *ATP13A2*

Zur Charakterisierung des *ATP13A2*-Gens wurde mittels Northern-Blot Analyse die Expression von *ATP13A2* untersucht. Zur Ermittlung der Transkriptgröße wurde die *Human multiple-tissue* RNA Membran (BD Biosciences) verwendet, auf der zwölf humane Gewebe aufgetragen sind.

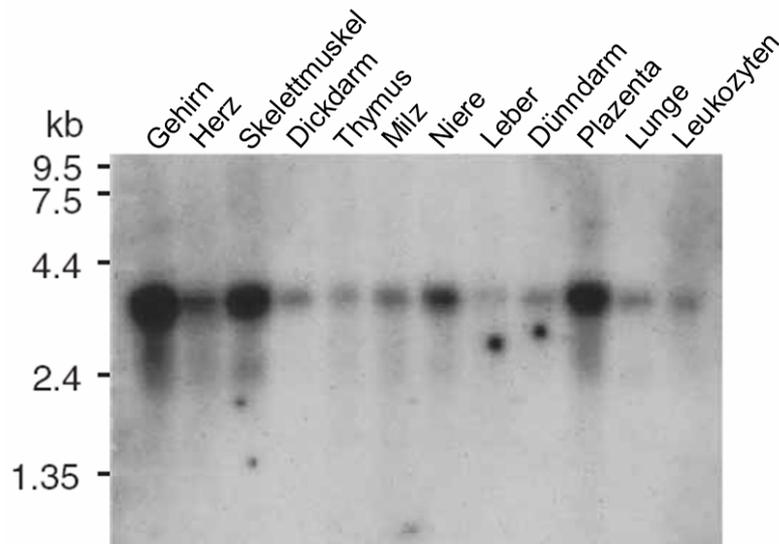


Abb. 3.4: Expressionsanalyse von *ATP13A2* mit der *Human multiple-tissue* RNA Membran. Das Gen wird ubiquitär in allen untersuchten Geweben als 3,8 kb großes Transkript exprimiert. Die stärkste Expression wurde in den Geweben Gehirn, Skelettmuskel, Plazente und Niere nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass das Gen ubiquitär als 3,8 kb großes Transkript exprimiert wird. Die stärksten Signale wurden in Gehirn, Skelettmuskel, Plazenta und Niere detektiert. Anschließend wurden diese Expression von *ATP13A2* mit dem *Dot-Blot*, auf dem 84 Gewebeproben (inklusive Negativkontrollen) enthalten sind, detaillierter untersucht.

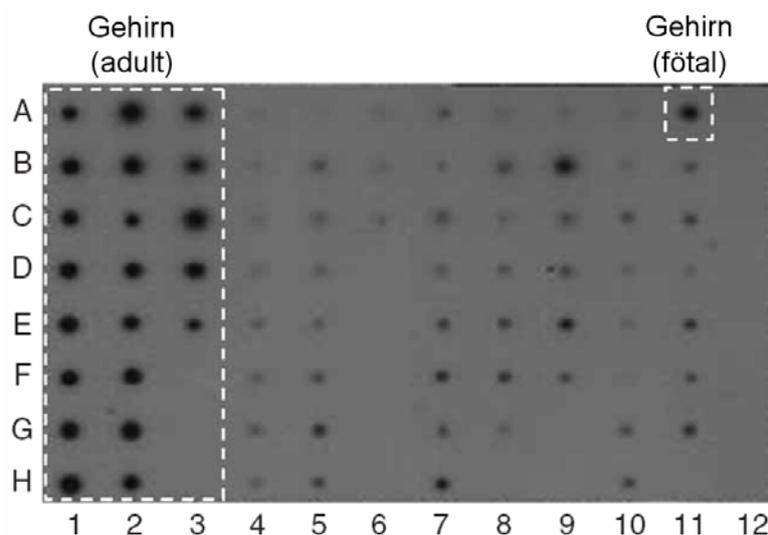


Abb. 3.5: Expressionsanalyse von *ATP13A2* mit dem *Dot-Blot*. Das Gen wird ubiquitär in allen untersuchten Geweben exprimiert. Die stärksten Signale wurden im Gehirn (inklusive sämtlicher Subregionen und dem fötalen Gehirn) detektiert.

Anhand dieser Membran konnte die ubiquitäre Expression von *ATP13A2* bestätigt werden. Besonders große Transkriptmengen fanden sich in allen untersuchten Arealen des Gehirns, darunter auch die *Substantia nigra* (A3), die bei der Pathogenese der Parkinsonschen Krankheit von zentraler Bedeutung ist. Die Analyse zeigt weiter, dass *ATP13A2* bereits im fötalen Gehirn stark exprimiert wird (A11). Die vergleichsweise starken Signale in Skelettmuskel (B7) und Plazenta (B8) vom Northern-Blot konnten hier nicht reproduziert werden. Dafür wurde im Pankreas (B9) eine relativ große Transkriptmenge detektiert.

### 3.4 Analyse von Fibroblasten eines KRS-Patienten

Im Rahmen einer zahnärztlichen Untersuchung der chilenischen KRS-Familie wurde von zwei Personen, einem KRS-Patienten (II:9) und einem gesunden Bruder (II:4), eine Stanze aus dem Zahnfleisch entnommen und daraus Fibroblasten isoliert. Anhand dieser Zellen wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Transkriptmenge von *ATP13A2* sowie eine unterschiedliche Toleranz gegenüber zellstressverursachenden Substanzen oder Unterschiede im Lipidprofil gab.

#### 3.4.1 Sequenzierung von *ATP13A2*

Bevor die ersten Untersuchungen mit den Fibroblasten begonnen wurden, sollte nach Erhalt der Zellen aus Chile der jeweilige Genotyp bestätigt werden. Diese Analyse erfolgte sowohl mit genomischer DNA als auch mit RNA. Dazu wurde die entsprechende Nukleinsäure isoliert, der Bereich um die zu untersuchende Mutation mittels PCR amplifiziert und danach direkt sequenziert.

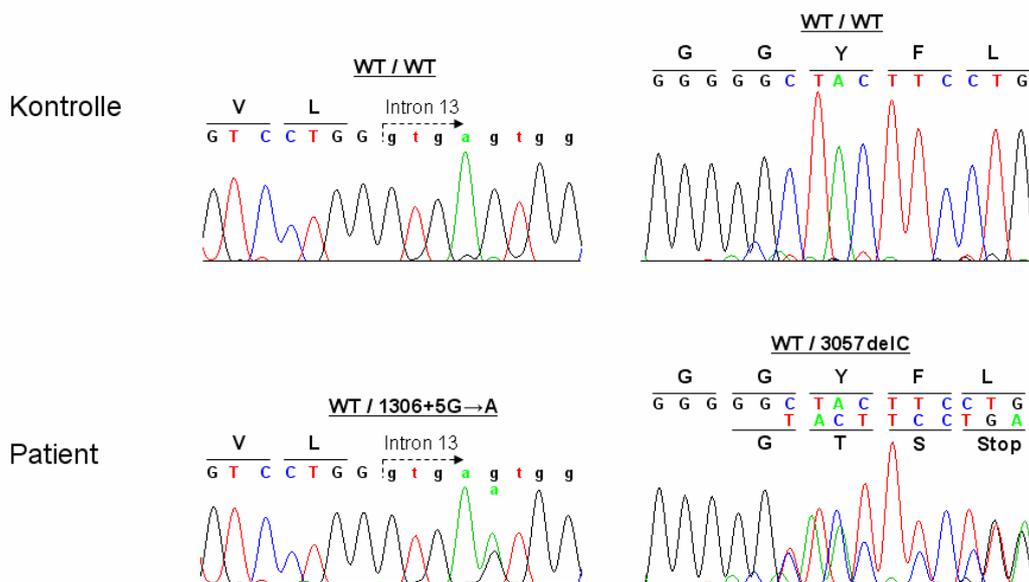


Abb. 3.6: Gezeigt sind die für die Fibroblasten ermittelten Elektropherogramme eines KRS-Patienten (II:9) und eines gesunden Bruders (II:4). Zum Nachweis der beiden Mutationen c.1306+5G→A (K1) und c.3057delC (K3) wurde nach der Isolierung der genomischen DNA mittels PCR der Übergang von Exon 13 zu Intron 13 (links) bzw. Exon 26 (rechts) amplifiziert und direkt sequenziert.

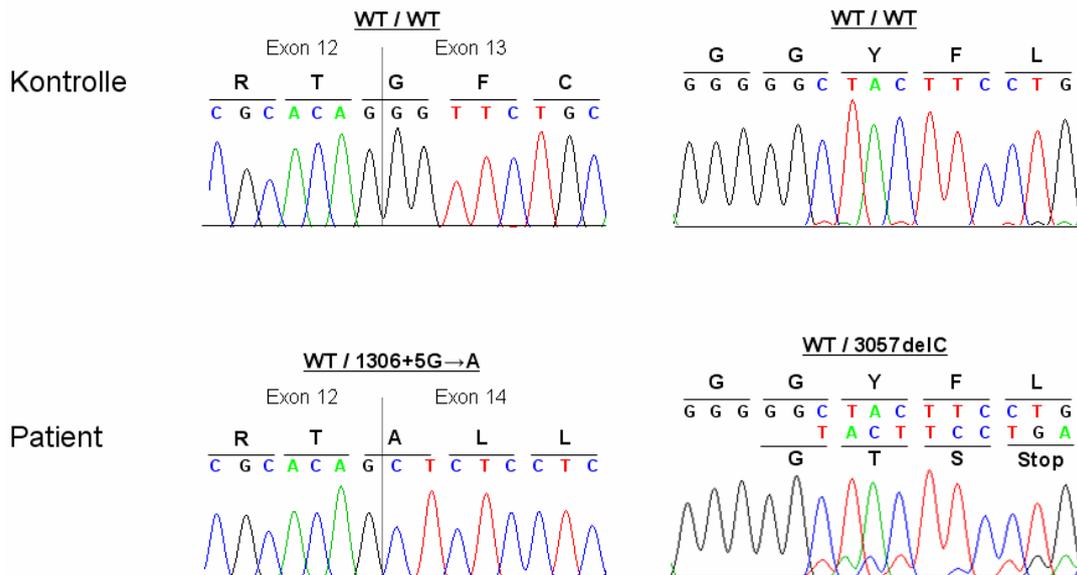


Abb. 3.7: Gezeigt sind die für die Fibroblasten ermittelten Elektropherogramme eines KRS-Patienten (II:9) und eines gesunden Bruders (II:4). Zum Nachweis der beiden Mutationen c.1306+5G→A (K1) und c.3057delC (K3) wurde nach der Isolierung der RNA mittels PCR der Übergang von Exon 13 zu Exon 14 (links) bzw. Exon 26 (rechts) amplifiziert und direkt sequenziert.

Durch die Sequenzanalyse wurde der Genotyp beider Zelllinien bestätigt. Während die Fibroblasten der gesunden Kontrollperson sowohl auf genomischer als auch auf RNA-Ebene die Wildtypsequenz zeigten, wurden bei den Fibroblasten des KRS-Patienten beide Mutationen nachgewiesen, die im *compound*-heterozygoten Zustand vorlagen. So führte ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin in der Donorspleißstelle von Exon 13 (Abb. 3.6, links) zu einem fehlerhaften Spleißen und folglich zum *Skipping* dieses Exons (Abb. 3.7, links). Zusätzlich wurde die Deletion eines Cytosins in Exon 26, das unter anderem die siebte Transmembrandomäne kodiert, festgestellt, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon nach zwei Aminosäuren führt (Abb. 3.6 und 3.7, rechts).

### 3.4.2 Quantifikation der *ATP13A2*-Transkriptmenge

Mittels quantitativer *Real-Time* PCR, bei der die Transkriptmenge von *ATP13A2* in den Kontroll- und Patientenfibroblasten bestimmt wurde, wurde der Effekt der beiden Mutationen auf die Genexpression untersucht. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden Zelllinien zu erreichen, wurden zusätzlich die Mengen der beiden Haushaltsgene  $\beta$ -Aktin und GAPDH, die in den Kontroll- und Patientenfibroblasten annähernd gleich sein sollten, ermittelt und so die Werte normalisiert. Als weitere Kontrolle wurde die Transkriptmenge des verwandten *ATP13A1*-Gens untersucht. Die RT-PCR, für die jeweils exakt 15 ng RNA eingesetzt wurden, wurde einmal durchgeführt. Dabei wurde jede Probe vierfach angesetzt.

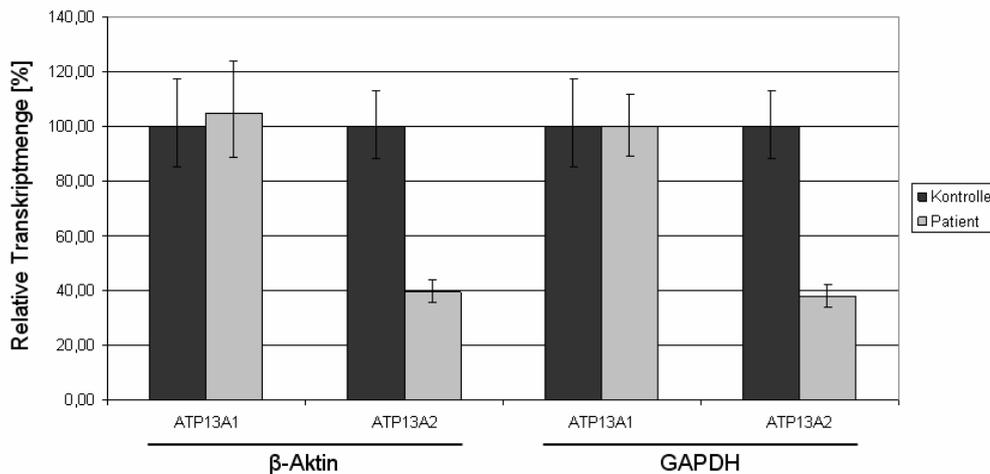


Abb. 3.8: Dargestellt ist die Bestimmung der relativen Transkriptmenge von *ATP13A1* und *ATP13A2* in den Kontroll- und Patientenfibroblasten mittels *Real-Time* PCR. Die Normalisierung erfolgte sowohl mit  $\beta$ -Aktin als auch mit GAPDH. Während die *ATP13A1*-Transkriptmenge in beiden Zelllinien vergleichbar war, liegt der *ATP13A2*-Gehalt in den Patientenfibroblasten im Vergleich zur Kontrollperson bei etwa 40 %.

Während die Transkriptmenge des *ATP13A1*-Gens in den Kontroll- und den Patientenfibroblasten nahezu gleich ist, unterscheiden sich die beiden Zelllinien bei der Expression von *ATP13A2* deutlich. So enthalten die *ATP13A2*-defizienten Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle nur etwa 40 % Transkript. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der als *Nonsense mediated mRNA decay* (NMR) bezeichnete Kontrollmechanismus sein. Dieser erkennt Mutationen, die zu einem frühzeitigen Stop-Codon führen, bereits auf mRNA-Ebene und verhindert so die Synthese von trunkierten Proteinen. Da es sich beim *Exon-Skipping* um eine *in frame* Deletion handelt, führt wahrscheinlich die zweite Mutation, bei der ein Nukleotid deletiert ist (c.3057), zum NMR-vermittelten mRNA-Abbau.

### 3.4.3 Zellvitalität nach Induktion von Zellstress

Es sollte untersucht werden, ob die Patientenfibroblasten aufgrund der Mutationen in *ATP13A2* im Vergleich zu Kontrollzellen mit einer unterschiedlichen Sensitivität auf Zellstress reagieren. Anhand des MTT-Tests wird die Aktivität von zellulären Dehydrogenasen, die diese Substanz umsetzen, photometrisch analysiert und ermöglicht so Rückschlüsse auf die Lebensfähigkeit der Fibroblasten. Dazu wurden etwa 20.000 Zellen in einer Vertiefung einer 48-Well Platte vorgelegt und ab dem folgenden Tag für 24 und 48 h zum einen mit dem Proteasominhibitor MG132 und zum anderen mit Tunicamycin, das die N-Glykosylierung hemmt, behandelt. Da beide Substanzen in DMSO gelöst waren, wurden parallel Zellen mit dieser Reagenz allein behandelt und dienten somit als Negativkontrolle. Die zum Zeitpunkt 0 h gemessenen Werte wurden als 100 % definiert und die zu den späteren Zeitpunkten 24 h und 48 h ermittelten Ergebnisse zeigen das Wachsen und Sterben der Zellen. Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei wurde jede Probe vierfach angesetzt.

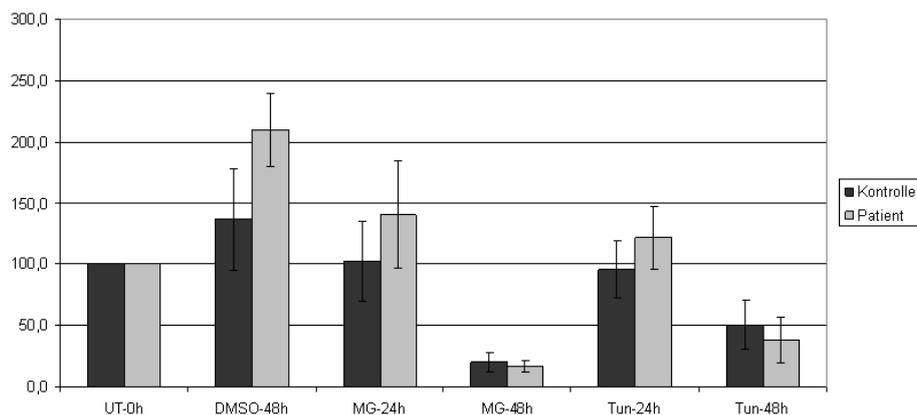


Abb. 3.9: Gezeigt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen MTT-Versuchen. Dabei wurden Kontroll- und Patientenfibroblasten jeweils für 24 und 48 h mit MG132 bzw. Tunicamycin behandelt. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle Zellen mit DMSO stimuliert. Die Werte zum Zeitpunkt 0 h wurden als 100 % gewertet. Während die Zellen unter DMSO-Einfluss weiter wachsen, hat die Behandlung sowohl mit MG132 als auch mit Tunicamycin einen negativen Effekt auf beide Zelllinien, der besonders nach 48 h deutlich wird. Allerdings scheinen die Patientenfibroblasten generell ein höheres Wachstumspotential als die Kontrollzellen zu haben.

Während die Fibroblasten unter DMSO-Einfluss wachsen, hat die Behandlung mit MG132 bzw. Tunicamycin einen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Diese Darstellung der Ergebnisse lässt nur schwer erkennen, welche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien im Wachstum nach der Behandlung mit MG132 bzw. Tunicamycin bestehen. Auffällig hierbei ist auch, dass die Patientenfibroblasten im DMSO-versetzten Medium besser wachsen als die Kontrolle. Während für die *ATP13A2*-defizienten Zellen nach 48 h ein Zuwachs von 110 % beobachtet wird, liegt dieser bei der Kontrolle bei 37 %. Um die unterschiedlichen Wachstumsraten beider Zelllinien zu berücksichtigen wurde daher die in Abbildung 3.10 wiedergegebene Darstellung gewählt, bei der die DMSO-Behandlung nach 48 h als 100 % angenommen wird.

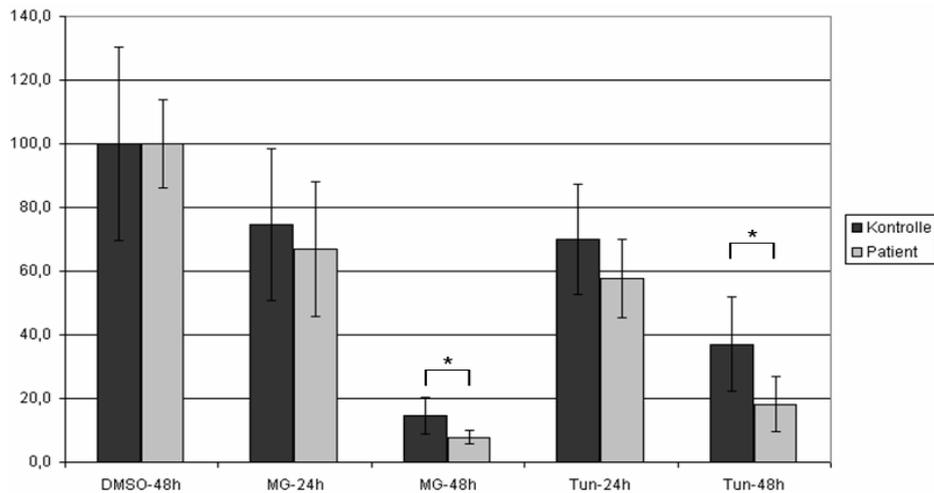


Abb. 3.10: Gezeigt sind die Ergebnisse von drei MTT-Versuchen nach Berücksichtigung der unterschiedlichen Wachstumsraten. Dabei wurden Kontroll- und Patientenfibroblasten für 24 und 48 h mit MG132 bzw. Tunicamycin behandelt. Die Werte nach 48 h DMSO-Behandlung wurden als 100 % gewertet. Die Behandlung der Fibroblasten mit zellstressverursachenden Reagenzien führt zum Sterben der Zellen. Es scheint, als würden die Patientenzellen etwas sensitiver auf den Zellstress reagieren als die Kontrollfibroblasten. Dieser Unterschied nach der Behandlung mit MG132 bzw. Tunicamycin für 48 h ist mit einem P-Wert von  $p < 0,05$  [-] (Student'scher T-Test) statistisch signifikant.

Es wird deutlich, dass beide Zelllinien sensitiv auf Zellstress reagieren, wobei dieser Effekt nach der MG132-Behandlung etwas ausgeprägter zu sein scheint als bei der Inkubation mit Tunicamycin. Das ist besonders nach 48 h Inkubation der Fall. Beim Vergleich der Kontroll- mit den Patientenfibroblasten fällt auf, dass ihre Lebensfähigkeit zu jedem Messpunkt 10 bis 20 % höher ist. Das entspricht nach 24 h MG132 bzw. Tunicamycin einer Differenz von 11 bzw. 17%. Nach 48 h sind es 47 bzw. 51 %. Das bedeutet, nach zwei Tagen Stimulation mit einer Zellstress auslösenden Substanz liegen in etwa doppelt so viele Kontrollzellen wie Patientenfibroblasten vor. Dieser Unterschied zwischen den beiden Zelllinien hinsichtlich einer Sensitivität gegenüber Zellstress ist mit einem P-Wert von  $p < 0,05$  [-] statistisch signifikant (Student'scher T-Test). Im Anschluss wurden keine zusätzlichen Experimente durchgeführt. Zum einen lag es daran, dass zu diesem Zeitpunkt keine zusätzlichen Kontroll- bzw. Patientenfibroblasten verfügbar waren. Zum anderen sollte mit dieser Versuchsreihe untersucht werden, ob Unterschiede in der Toleranz von Zellstress existieren. Um nun die konkrete Bedeutung des *ATP13A2*-Gendefekts hinsichtlich der unterschiedlichen Sensitivität detaillierter zu untersuchen, sollten Zellen verwendet werden, die im Rahmen dieser neurodegenerativen Erkrankung direkt betroffen sind.

### 3.4.4 Einfluss von ATP13A2 auf die Autophagie

Bei ATP13A2 handelt es sich um ein lysosomales Membranprotein. Da dieses Zellkompartiment maßgeblich für einen der beiden Hauptabbauwege von zelleigenem oder -fremdem Material verantwortlich ist, sollte getestet werden, ob die gestörte Proteinfunktion Einfluss auf die Autophagie haben könnte. Daher wurde diese in den Kontroll- und Patientenfibroblasten induziert und anhand bestimmter Marker analysiert. Dazu zählt zum einen LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*), das homolog zu Apg8p ist, und dessen essentielle Bedeutung für die Autophagie am Hefemodell gezeigt werden konnte (Kabeya *et al.*, 2000). In der Zelle kommt es in zwei Isoformen vor. Während die erste Isoform (LC3-I) ein Molekulargewicht von 18 kDa aufweist und cytosolisch ist, ist die zweite (LC3-II) mit einem Molekulargewicht von 16 kDa in der Autophagosomenmembran eingebettet. LC3-II hat aufgrund seiner Lokalisation in einem Degradationsorganell nur eine kurze Halbwertszeit. Somit spiegeln die Signale der Western-Blot Analyse nur eine Momentaufnahme der Autophagie wider. Daher empfiehlt es sich, mit einem zweiten Marker die Autophagieaktivität einer Zelle zu untersuchen. Dazu eignet sich das p62-Protein. Es bindet an LC3 und fungiert somit als selektives Autophagiesubstrat (Bjørkøy *et al.*, 2005).

In einem ersten Versuch wurden die Zellen für 4, 8, 12 und 24 h zur Induktion der Autophagie mit Rapamycin behandelt. Diese Substanz inhibiert mTOR (*mammalian target of rapamycin*), welches eine zentrale Bedeutung bei der Regulation des Zellwachstums spielt. Dabei stimuliert es die Proteinsynthese, indem es die wichtigen Translationsregulatoren S6K1 und 4EBP1 phosphoryliert. Als Negativkontrolle diente die parallele Behandlung mit DMSO. Mittels Western-Blot wurde der Effekt auf die Autophagie untersucht.

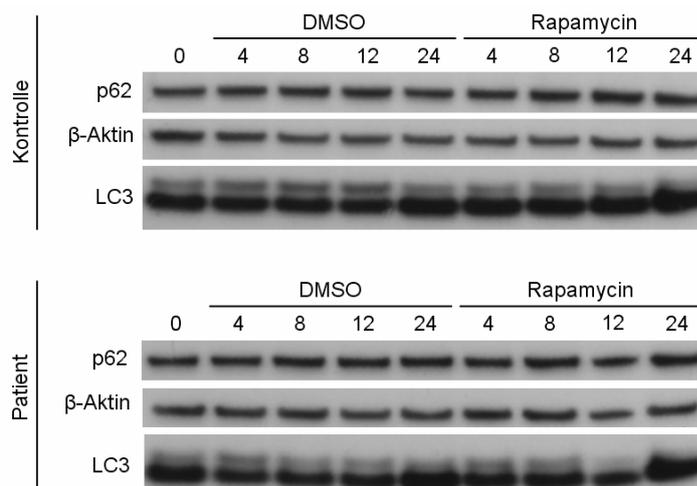


Abb. 3.11: Gezeigt ist der Western-Blot nach der Autophagieinduktion. Kontroll- und Patientenfibroblasten wurden für 4, 8, 12 und 24 h mit Rapamycin bzw. DMSO, das als Negativkontrolle fungierte, behandelt. Die Autophagie wurde anhand der spezifischen Marker LC3 und p62 untersucht. Es wurden 5 µg Proteinlysate eingesetzt und als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Nach der Behandlung der beiden Zelllinien mit 10  $\mu$ M Rapamycin ist kein Effekt zu erkennen. Unabhängig von einer Stimulierung mit DMSO oder Rapamycin bleibt das p62-Signal sowohl bei den Kontrollfibroblasten als auch bei den Patientenzellen nahezu konstant. Allerdings zeigt sich ein leichter Effekt auf die LC3-I- und LC3-II-Menge. Hier ist bei der Kontrolle eine leichte Zunahme der kleineren Isoform (LC3-II) nach 24 h mit DMSO und bei Rapamycin-Behandlung (4-24 h) erkennbar, was gleichzeitig mit einer Abnahme von LC3-I einhergeht. Bei den Patientenzellen ist LC3-II-Zunahme erst nach 24 h Stimulation (DMSO und Rapamycin) der Fall. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Induktion der Autophagie in den ATP13A2-defizienten Zellen beeinträchtigt ist.

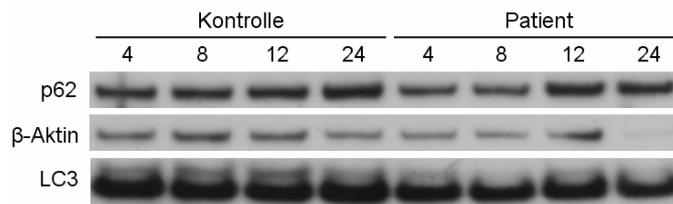


Abb. 3.12: Gezeigt ist der Western-Blot nach der Autophagie-Induktion. Parallel zum in Abbildung 3.11 dargestellten Versuch wurden Kontroll- und Patientenfibroblasten für 4, 8, 12 und 24 h in einem Mangelmedium kultiviert. Die Autophagie wurde anhand der spezifischen Marker LC3 und p62 untersucht. Es wurden 5  $\mu$ g Totallysat eingesetzt und als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

Im zweiten Versuch sollte die Autophagie durch die Inkubation der Zellen für 4, 8, 12 und 24 h in Mangelmedium induziert werden. Eine Auswertung ist schwierig, da das  $\beta$ -Aktin-Signal nicht in allen Proben aufgrund technischer Schwierigkeiten beim Blotten einheitlich ist und in der letzten Patientenprobe fast komplett fehlt. Es kann aber auch hier festgestellt werden, dass die LC3-II-Menge in der Kontrolle geringfügig höher ist als bei den Patienten. Allerdings korreliert das nicht mit einer gleichzeitigen Reduktion des LC3-I.

Anhand dieser Versuche konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zelllinien hinsichtlich der Induktion der Autophagie festgestellt werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen, die am Hefemodell gewonnen wurden. Dort wurde anhand zweier unabhängiger Experimente für YOR291, dem Hefeortholog von ATP13A2, ebenfalls keine Beteiligung an der Autophagie festgestellt (Stiller und Kubisch, unveröffentlicht). Aus diesem Grunde wurden keine weiteren Versuche hinsichtlich der Autophagie durchgeführt.

### 3.4.5 Analyse des Lipidprofils

Vor wenigen Jahren wurde für die Typ IV P-Typ ATPasen, mit denen die Typ V P-Typ ATPasen am nächsten verwandt sind, gezeigt, dass sie Phospholipide transportieren (Auland et al, 1994; Tang et al., 1996). Zusätzlich ist es bekannt, dass manche neurodegenerativen Erkrankungen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung von Zellen haben können. Um dies für das Kufor-Rakeb Syndrom zu prüfen, erfolgte die Lipidanalyse der Kontroll- und Patientenfibroblasten in einer Kooperation mit Prof. Dr. Konrad Sandhoff vom Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie an der Universität Bonn. Dazu wurden die Lipide aus den Zellen mittels eines Chloroform-Methanol Gemisches extrahiert und anschließend auf Hochleistungsdünnschichtchromatographieplatten analysiert. Das Verfahren wurde von Herrn Dr. Hany Farwanah durchgeführt.



Abb. 3.13: Dargestellt ist eine Hochleistungsdünnschichtchromatographieplatte nach der Lipidanalyse der Kontroll- und Patientenfibroblasten, die hier, entsprechend ihrer Initialen, mit AMA bzw. IMA abgekürzt sind. Es wurden die Mengen der folgenden Lipide untersucht: Sphingomyelin (SM), Globotetrasylceramid (GB4), Globotriasylyceramid (GB3), Lactosylceramid (LacCer) und Glucosylceramid (GlucCer).

In der Analyse wurden folgende Lipidmengen gemessen:

Tab. 3.1: Angegeben sind die ermittelten Mengen der untersuchten Lipide. Die Werte beziehen sich auf ng [Lipid] pro µg [Protein].

	Sphingo- myelin	Globotetrasyl- ceramid	Globotriasy- ceramid	Lactosyl- ceramid	Glukosyl- ceramid
Kontrolle	7,04	10,01	5,41	6,24	1,15
Patient	5,08	8,58	3,93	7,56	1,60

Die Lipidanalyse der Fibroblasten wurde einmalig durchgeführt, wobei jede Probe doppelt aufgetragen wurde. Nach Einschätzung von Herrn Dr. Hany Farwanah wurden sie - insbesondere im Vergleich zu anderen Erkrankungen mit pathologischen Lipidmustern - als nicht auffällig gewertet, so dass keine weiteren diesbezüglichen Analysen indiziert waren.

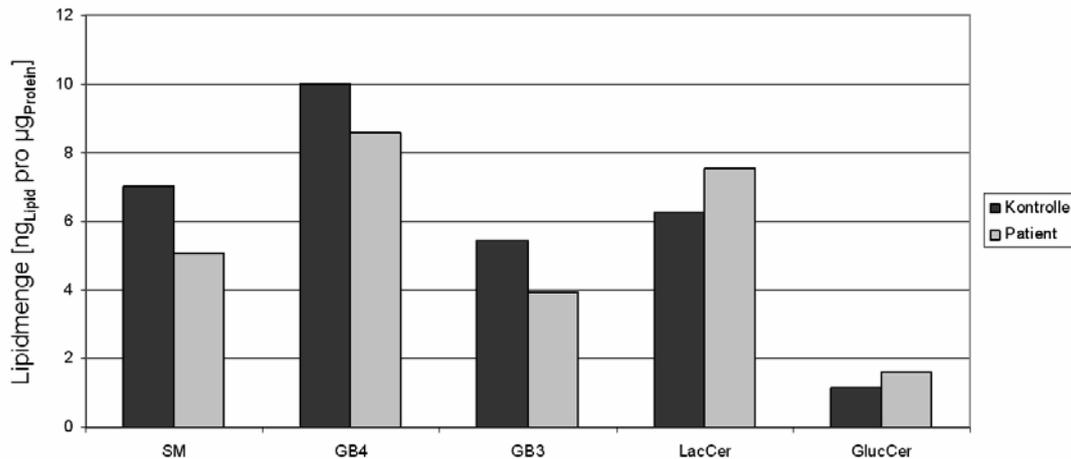


Abb. 3.14: Gezeigt ist die graphische Darstellung der für die Kontroll- und Patientenfibroblasten ermittelten Mengen der untersuchten Lipide Sphingomyelin (SM), Globotetracycleramid (GB4), Globotriacycleramid (GB3), Lactosylceramid (LacCer) und Glukosylceramid (GluCer). Es wurden keine auffälligen Unterschiede in den Lipidmengen festgestellt.

### 3.5 Charakterisierung verschiedener *ATP13A2*-Varianten in Säugerzellen

Nach der Identifizierung der Mutationen in *ATP13A2* als genetische Ursache für das Kufor-Rakeb Syndrom wurden weltweit in Kollektiven mit Patienten, die an einem idiopathischen Parkinson-Syndrom leiden, nach weiteren Mutationen in diesem Gen gesucht, um somit festzustellen, inwieweit dieses seltene monogene Syndrom auch eine Bedeutung für den relativ häufigen idiopathischen PD hat. Tatsächlich wurden hierbei eine ganze Reihe von nicht annotierten *Missense*-Varianten gefunden. Zusätzlich wurden weitere Patienten mit *ATP13A2*-Mutationen beschrieben, die eine KRS-typische Symptomatik zeigen. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Konsequenzen sich aus diesen Veränderungen für das Protein ergeben und ob eine Unterscheidung von KRS- und PD-Mutanten *in vitro* möglich ist und ob die PD-Veränderungen tatsächlich einen pathogene Rolle spielen könnten. Dazu wurden die Mutationen anhand einer PCR-basierenden Mutagenese in das Wildtypkonstrukt eingefügt und anhand transienter Überexpression in Hek293T-Zellen untersucht.

#### 3.5.1 Übersicht über die untersuchten *ATP13A2*-Mutationen

In dieser Arbeit wurden insgesamt 15 Mutationen in *ATP13A2* untersucht, die weltweit bei einzelnen Personen oder bei mehreren Mitgliedern einer Familie beschrieben wurden. Davon fanden sich sieben bei Personen mit KRS-typischen Symptomen und acht bei PD-Patienten. Die Mutationen aus der jordanischen und chilenischen Familie sind mit K1 (gestörtes Spleißen von Exon 13), K2 (Insertion von 22 bp in Exon 16) und K3 (Deletion eines Cytosins an Position c.3057) gekennzeichnet. Die später identifizierten Mutationen wurden mit K4 bis K7 (KRS) bzw. P1 bis P8 (PD) abgekürzt.

Tab. 3.2: Übersicht über alle in dieser Arbeit untersuchten KRS-Mutationen im *ATP13A2*-Gen. Das homozygote bzw. *compound*-heterozygote Vorliegen der jeweiligen Veränderung wurde mit hom bzw. comp-het abgekürzt. Zur groben Übersicht der Mutationsstelle im Protein dient die Angabe der nächsten Transmembrandomäne (TM).

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
DNA	c.1306+5G→A	c.1632_1653dup22	c.3057delC	c.1510G→C	c.546C→A	c.3176T→G	c.3253delC
Protein	p.Del399_435	p.552LfsX788	p.1019GfsX1021	p.Gly504Arg	p.Phe182Leu	p.Leu1059Arg	p.DelC1085
Zygotie	comp-het	hom	comp-het	hom	hom	comp-het	comp-het
Erste Symptome [Alter]	12-18	11-16	12-18	12	22	19 + 18	
Geschlecht	♂ + ♀	♂ + ♀	♂ + ♀	♂	♀	♂ + ♀	
Herkunft	Chile	Jordanien	Chile	Brasilien	Japan	China	
Erstbeschreibung der Mutation	Ramirez et al., 2006			Di Fonzo et al., 2007	Ning et al., 2008	Kubisch, unveröffentlicht	
Mutationsstelle im Protein	teilw. 3. TM	nach 4. TM	7. TM	nach 4. TM	vor 2. TM	8. TM	9. TM

Tab. 3.3: Übersicht über alle in dieser Arbeit untersuchten PD-Mutationen im *ATP13A2*-Gen. Jede dieser acht Veränderungen liegt im heterozygoten (het) Zustand vor. Zur groben Übersicht der Mutationsstelle im Protein dient die Angabe der nächsten Transmembrandomäne (TM).

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8		
DNA	c.35C→T	c.1597G→A	c.746C→T	c.844A→T	c.881G→A	c.1346G→A	c.2939G→A	c.2236G→A		
Protein	p.Thr12Met	p.Gly533Arg	p.Ala249Val	p.Ser282Cys	p.Arg294Gln	p.Arg449Gln	p.Arg980His	p.Ala746Thr		
Zygotie	het	het	het	het	het	het	het	het		
Erste Symptome [Alter]	30	40	31	20	33	36	35	53	50	39
Geschlecht	♂	♂	♀	♂	♂	♂	♀	♀	♂	♂
Herkunft	Brasilien	Brasilien	Deutschland	Norwegen	Deutschland	Persien	Serbien	China		
Erstbeschreibung der Mutation	Di Fonzo et al., 2007		Djarmati et al., 2009					Lin et al., 2008		
Mutationsstelle im Protein	vor 1. TM	nach 4. TM	vor 2. TM	nach 2. TM	nach 2. TM	nach 3. TM	6. TM	nach 4. TM		

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 15 Mutationen im *ATP13A2*-Gen untersucht, die weltweit identifiziert wurden. Neben den bereits beschriebenen Mutationen (K1-K3), die in der jordanischen und der chilenischen Familie identifiziert wurden (vergleiche Kapitel 3.1), liegt bei 11 weiteren Personen eine *Missense*-Mutation vor, die zu einem Aminosäurenwechsel führt aber keine Veränderung der Proteinelänge mit sich bringt (P1-P8; K4-K6). Zusätzlich ist bei einer Person mit KRS-Symptomatik ein Cytosin deletiert (K7), was ein frühzeitiges Stop-Codon und somit eine Trunkierung des Proteins zur Folge hat. Dabei ist kein Genbereich besonders häufig von Mutationen betroffen, sondern sie verteilen sich relativ gleichmäßig über die gesamte Proteinsequenz. Die drei Mutationen K6, K7 und P7 liegen in einer Transmembrandomäne. Daher könnte besonders bei diesen angenommen werden, dass es zu strukturellen Störungen des Membranproteins kommt. Weiter fällt auf, dass die KRS-Patienten bereits im Teenager-Alter die ersten Symptome zeigten. Die PD-Patienten waren mit durchschnittlichen 37 Jahren deutlich älter. Lediglich der Patient mit der Mutation P4 war mit 20 Jahren jünger. Die KRS-Mutationen K1 und K3 bzw. K6 und K7 lagen bei dem jeweiligen Patienten im *compound*-heterozygoten Zustand vor. Die Mutationen K2, K4 und K5 waren homozygot und sämtliche PD-Mutationen heterozygot.

### 3.5.2 Proteinstabilität der ATP13A2-Mutanten

Im ersten Versuchsteil wurden die PD- und KRS-Varianten hinsichtlich ihrer Proteinstabilität untersucht. Dazu wurden Hek293T-Zellen mit dem jeweiligen ATP13A2-Expressionsvektor transient transfiziert und am folgenden Tag lysiert. Anschließend wurde die Proben anhand des Western-Blot Verfahrens untersucht.

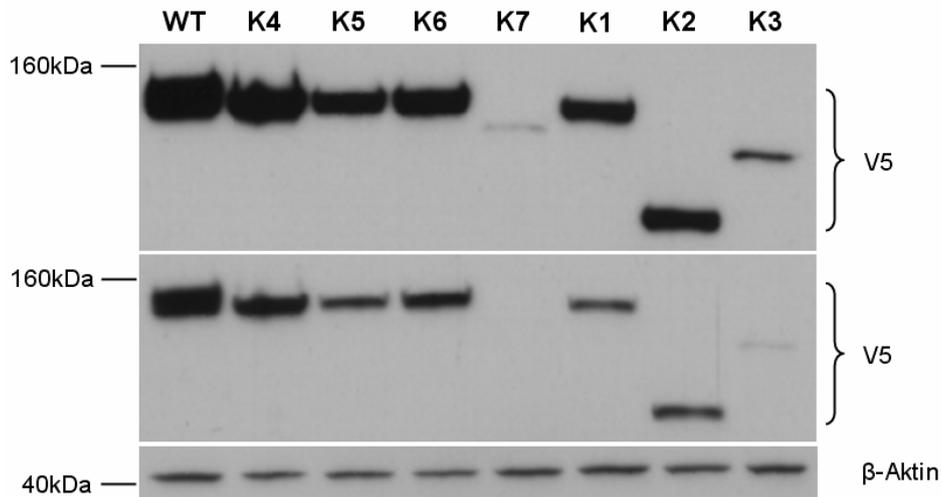


Abb. 3.15: Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot zur Analyse des ATP13A2-WT-Proteins und der KRS-Proteine. Es wurden 10 µg Totallysat eingesetzt. Die Detektion des Zielproteins erfolgte anhand des V5-Antikörpers. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurde zusätzlich das Haushaltsprotein β-Aktin nachgewiesen. Der Nachweis der Zielproteine ist doppelt dargestellt. Während der obere Teil das Vorliegen aller KRS-Mutanten zeigt, gibt der untere Teil die Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Proteinen repräsentativer wieder. Das ATP13A2-WT-Protein wird in Form einer Doppelbande detektiert. Die Signalintensitäten der Mutanten K4, K5 und K6 ist in etwa mit der der unteren WT-Bande vergleichbar. Die Mutanten K1 und K2 sind etwas instabiler und die beiden Deletionsmutanten K3 und K7 sind kaum detektierbar.

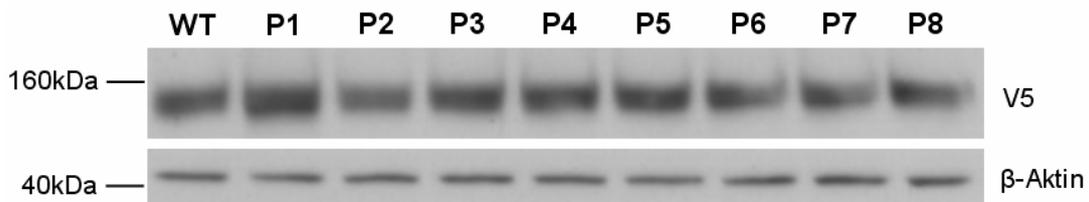


Abb. 3.16: Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot zur Analyse des ATP13A2-WT-Proteins und der PD-Varianten. Es wurden 10 µg Totallysat eingesetzt. Die Detektion des Zielproteins erfolgte anhand des V5-Antikörpers. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurde zusätzlich das Haushaltsprotein β-Aktin nachgewiesen. Alle hier untersuchten ATP13A2-Mutanten haben eine vergleichbare Stabilität wie das ATP13A2-WT-Protein.

Die Untersuchung der verschiedenen ATP13A2-Mutanten anhand der Western-Blot Analyse zeigt erkennbare Unterschiede hinsichtlich der Proteinstabilität. So sind die PD-Proteine in etwa so stabil wie der Wildtyp. Dies konnte in unabhängigen Western-Blots, bei der Lysate aus sechs unabhängigen Transfektionen untersucht wurden, beobachtet werden. Dabei wurde das Zielprotein jeweils als Doppelbande detektiert (vergleiche Abb. 3.16). Demgegenüber stehen die KRS-Proteine, bei denen jeweils die obere der beiden Banden fehlte. Die Signalintensitäten der Proteine K4, K5 und K6 sind in etwa mit der der unteren

Bande des WT-Proteins vergleichbar, somit aber insgesamt bezüglich der WT-Proteinmenge reduziert. Die Mutanten K1 und K2 sind etwas instabiler. Die beiden anderen Mutanten K3 und K7, bei denen ein Cytosin in der neunten bzw. siebten Transmembrandomäne fehlt, werden erst nach längerer Exposition des Films detektiert. Diese Proteinstabilität der KRS-Proteine wurde ebenfalls in mehreren unabhängigen Western-Blot Analysen beobachtet, in denen Lysate aus sechs unabhängigen Transfektionen untersucht wurden.

### 3.5.3 N-Glykosylierung von ATP13A2 und ATP13A2-Mutanten

Nach der transienten Transfektion von Hek293T-Zellen mit den ATP13A2-Expressionsvektoren wurde bei der anschließenden Analyse mittels Western-Blot Verfahren in den Proben, die ATP13A2-WT oder eine PD-Mutante exprimierten, eine Doppelbande detektiert. Der Größenunterschied entsprach in etwa 10 kDa und wurde sowohl mit dem V5- als auch mit einem spezifischen ATP13A2-Antikörper sichtbar (vergleiche Abb. 3.18). Dies wurde bei den mit den KRS-Mutanten transfizierten Zellen nicht beobachtet. Eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen von Transmembranproteinen, die in der Regel im endoplasmatischen Reticulum stattfindet, ist die N-Glykosylierung, bei der Zuckerreste an ein Stickstoffmolekül der Polypeptidkette angehängt werden. Dabei fungiert Asparagin-X-Serin/Threonin als Akzeptorsequenz, bei der X für eine beliebige Aminosäure steht. Daher wurde vermutet, dass das ATP13A2-WT-Protein bzw. die PD-Proteine posttranslational modifiziert werden und dieser Prozess bei den KRS-Mutanten gestört sein könnte. Um dies zu untersuchen wurde zunächst *in silico* anhand des NetNGlyc 1.0 Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) nach putativen N-Glykosylierungsstellen gesucht.

MSADSSPLVGSTPTGYGTLTIGTSDIPLESSSVSSVRLSGYCGSPWRVIGYHVVVVHHAGIPLLLFRWKPLWGVRLRLRPC	80
NLAHAETLVIEIRDKEDSSWQLFTVQVQTEAIGESLEPSQQAEDGRSQAQAVGAVPEGAWKDTAQLHKSEEAHSVQGK	160
RVLRYLLFQGGQRYIWIETQQAFYQVSLLDHGRSCDDVHRSRHGLSLQDQMVKAIYGNVISIPVKSYPQLLVDEALNPY	240
YGFQAFSIALWLDADHYWYALCIFLISSISICLSLYKTRKQSQTLRDMVKLSMRVCVCRPGGEEEMVDSSELVPGDCLVL	320
PQEGGLMPCDAALVAGECHVNESSLTGESIPVLKLTALPEGLGPHYCAETHRRHTLFCGTLILQARAYVGPVHLAVVTRTF	400
CTAKGGLVSSILHPRPINFKFKYKSMKFAALSVALLLGTIYSIFILYRNRVPLNEIVIRALDLVTVVPPALPAANTVC	480
TLYAQSRLRRQGFICIHPLRINLGGKQLVCFDKTGTLEDGLDVMGVVPLKGAFLPLVPEPRRLPVGPLLRLALATCHA	560
LSRLQDTPVGDPMDLKMVESTGWVLEEEPAADSAGTQVLAVMRPPLWEPQLQAMEPPVPSVLRHFPFSSALQRMSV	640
VAMPGATQPEAYVKGSPFELVAGLCNPETVPTDFAQHLQSYTAAGYRVVALASKPLPTVPSLEAAQQLTRDTEVDLSLLG	720
LLVHRNLLKPTTPVVIQALRRTRIRAVHVTGDNLQTAVTVARCGGHVAPQEHLLIVHATHPERGQPASLEFLPHESPTAV	800
NGVKPDQQAASYTVEPDPRSRHLALSGPTFGIIVKHFPKLLPKVLVQGTVFARNAPEQKTELVCLEKQLQYCVMGDGA	880
NDCGALKAADVGISLSQAEASVVSPFTSSMASIECVPHVIREGRCSLDTSFSVFKYMALYSLTQFISVLILYTIINTNLGD	960
LQFLAIDLVIITTTAVLMSRTGPALVLRVRRPFGALLSVPVLSLLLQMVLTGVQLGGYFLTLAQPWFVPLNRTVAAPD	1040
NLPNYENTVVFSLSSFOYLILAAAVSKGAPFRPLYTNVFFLVALALLSSVLVGLVLPGLLQGPLALRNITDGTGFKLL	1120
LGLVTLNFGVFMLESVLDQCLPACLRRLRPKRASKRKFQLERELAEQWPPLPAGPLR	

Abb. 3.17: Dargestellt ist die ATP13A2-WT-Proteinsequenz, die hinsichtlich einer möglichen N-Glykosylierung untersucht wurde. Während die blauen Bereiche die drei vorkommenden Akzeptorsequenzen (Asn-X-Ser/Thr) anzeigen, sind die zwei putativen N-glykosylierten Asparagin-Aminosäuren rot gekennzeichnet.

Das verwendete Programm erkennt in der ATP13A2-WT-Proteinsequenz an den drei Stellen p.341, p.1033 und p.1110 die Akzeptorsequenz für eine N-Glykosylierung. Allerdings wird nur für p.1033 und p.1110 ein N-glykosyliertes Asparagin prädiziert.

Anschließend wurde die N-Glykosylierung *in vitro* analysiert. Dazu wurde ein N-Glykosidase-Verdau von Zelllysaten, die zuvor mit dem entsprechenden Expressionsvektor transient transfiziert worden waren, durchgeführt und anschließend mittels Western-Blot Verfahren analysiert. Das Enzym PNGase F stammt aus dem Organismus *Flavobacterium meningosepticum* und spaltet sämtliche Typen Asparagin-gebundener N-Glykane vom Proteinrückgrat ab.

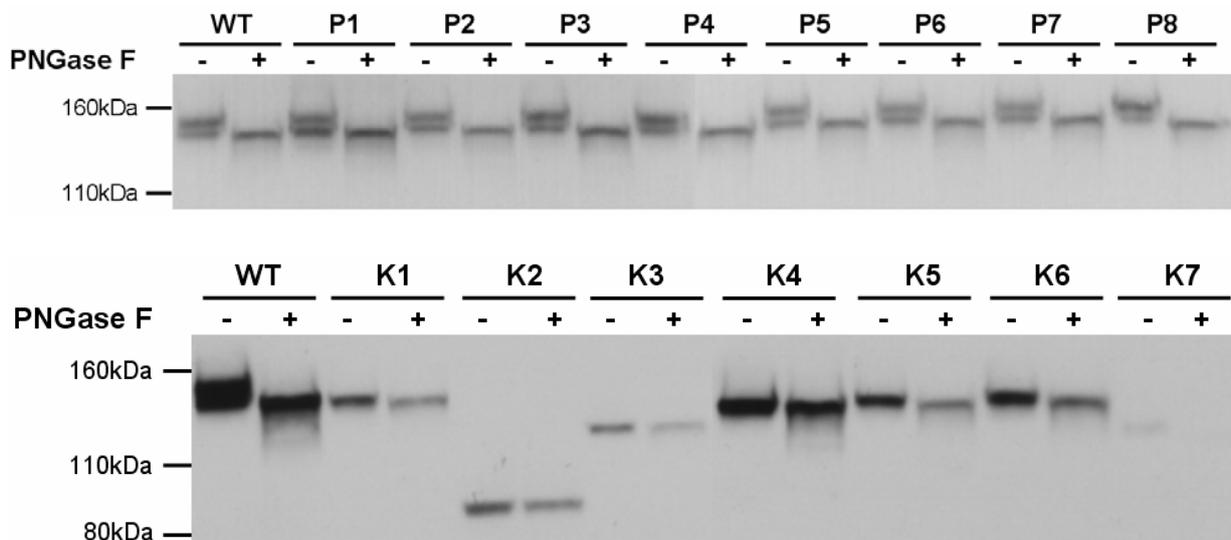


Abb. 3.18: Dargestellt ist der Western-Blot nach dem N-Glykosidase Verdau. Dazu wurden Hek293T-Zellen mit ATP13A2-WT bzw. der jeweiligen Mutante transient transfiziert. Für die PNGase F-Behandlung wurden 10 µg Totallysat eingesetzt. Zur Detektion des Zielproteins wurde der V5-Antikörper verwendet.

Während die PNGase F-unbehandelten WT- und PD-Lysate jeweils eine Doppelbande zeigten, war in den entsprechenden behandelten Proben nur ein Signal auf Höhe der unteren Bande erkennbar. Die Behandlung der KRS-Lysate mit der PNGase F führte demgegenüber zu keinem detektierbaren Unterschied im Molekulargewicht des Zielproteins. Daher lässt sich aus diesem Versuch ableiten, dass es sich bei der in den WT- und PD-Proben detektierten Doppelbande um die glykosylierte und die nicht-glykosylierte Proteinform handelt. Diese posttranslationale Modifikation kann bei den KRS-Mutanten nicht nachgewiesen werden.

### 3.5.4 Subzelluläre Lokalisation von ATP13A2 und der KRS-Proteinmutanten

Die Behandlung mit PNGase F zeigte, dass ATP13A2-WT und die PD-Mutanten N-glykosyliert sind, während die KRS-Mutanten nicht auf diese Weise posttranslational modifiziert werden (vergleiche Kapitel 3.5.3). Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob die gestörte Modifikation der KRS-Mutanten sich auch in einer veränderten subzellulären Lokalisation widerspiegelt. Dazu wurden diese zuerst mittels subzellulärer Fraktionierung untersucht, bei der cytosolische und membranständige Proteine voneinander getrennt werden. Zunächst wurden Hek293T-Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren transient transfiziert und am folgenden Tag in einem milden Sucrose-Puffer homogenisiert. Zur Trennung der beiden Fraktionen wurden die Lysate ultrazentrifugiert und mittels Western-Blot Verfahren analysiert. Als Kontrolle für eine saubere Trennung der beiden Fraktionen wurden zusätzlich Antikörper gegen das cytosolische  $\beta$ -Aktin und das Membranprotein Calnexin verwendet.

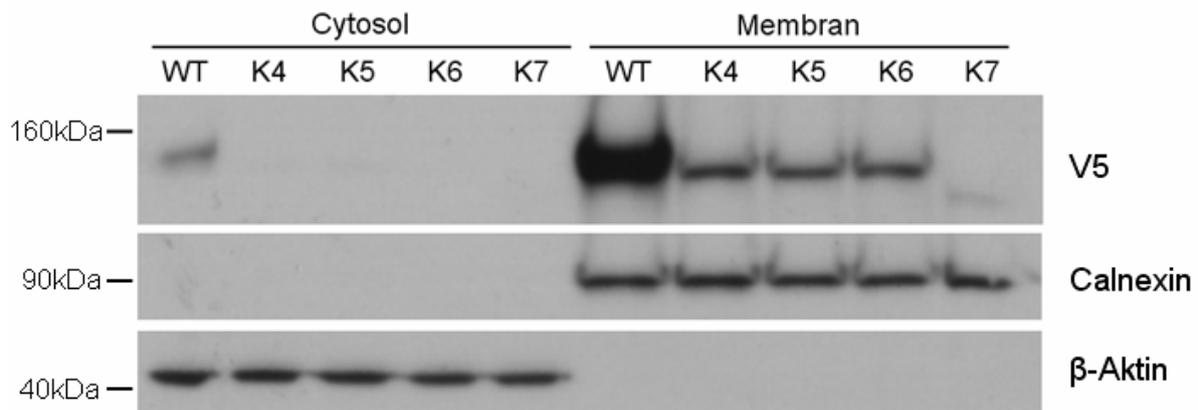


Abb. 3.19: Dargestellt ist eine Western-Blot Analyse nach der subzellulären Fraktionierung durch Ultrazentrifugation, bei der Hek293T-Zellen zuvor mit dem Expressionsvektor kodierend für ATP13A2-WT bzw. die jeweilige KRS-Mutante transient transfiziert worden war. Es wurden 5  $\mu$ g Totallysat des Proteins eingesetzt. Zur Detektion des Zielproteins wurde der V5-Antikörper eingesetzt. Die Trennung der cytosolischen von den membranständigen Proteinen wurde mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin (Cytosolmarker) bzw. Calnexin (Membranmarker) überprüft. Alle hier untersuchten Proteine werden in der Membranfraktion detektiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das ATP13A2-WT-Protein als auch die Proteine der vier KRS-Mutanten K4-K7 in der Fraktion vorlagen, die die membranständigen Proteine enthält. In der cytosolischen Fraktion wurden lediglich geringe ATP13A2-WT-Proteinmengen detektiert. Daraus kann man schlussfolgern, dass die KRS-Mutationen keinen Einfluss auf die Integration des Proteins in eine Membran haben. Es kann von einer sauberen Trennung von cytosolischen und membranständigen Proteinen ausgegangen werden, da weder Calnexin noch  $\beta$ -Aktin in der jeweils anderen Fraktion detektiert wurde.

### 3.5.5 Subzelluläre Lokalisation mittels Immunfluoreszenzanalyse

Anschließend wurde die subzelluläre Lokalisation von ATP13A2-WT und sämtlicher Mutanten anhand der Immunfluoreszenzanalyse bestimmt, bei der die unterschiedlichen Zellkompartimente Lysosom, endoplasmatisches Reticulum sowie Mitochondrien untersucht wurden. Dazu wurden cos7-Zellen mit dem jeweiligen Expressionsvektor transient transfiziert und am nächsten Tag mit einem Fluorochrom angefärbt.

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der spezifischen Anfärbung des Zielproteins sowie des zu untersuchenden Zellorganells mit einem roten bzw. einem grünen Fluorochrom und dem anschließenden Übereinanderlegen der beiden Bilder. Im Falle einer Co-Lokalisierung von Zielprotein und Kompartiment würde man ein gelbes Signal erhalten. Zusätzlich wurde der Zellkern mit DAPI markiert, was zu einer Blaufärbung führte.

Zunächst wurde das ATP13A2-WT-Protein untersucht, für das nach transients Transfektion in einem ersten Versuch in cos7-Zellen eine intrazellulär vesikuläre Struktur detektiert wurde. Daraufhin wurde eine mögliche Co-Lokalisierung mit Lysosomen und Mitochondrien überprüft. Dazu wurde ein grün markierter H4B4-Antikörper, der das lysosomale Membranprotein LAMP2 erkennt, sowie der rot emittierende *Mitotracker*, der sich in aktiven Mitochondrien ansammelt, verwendet.

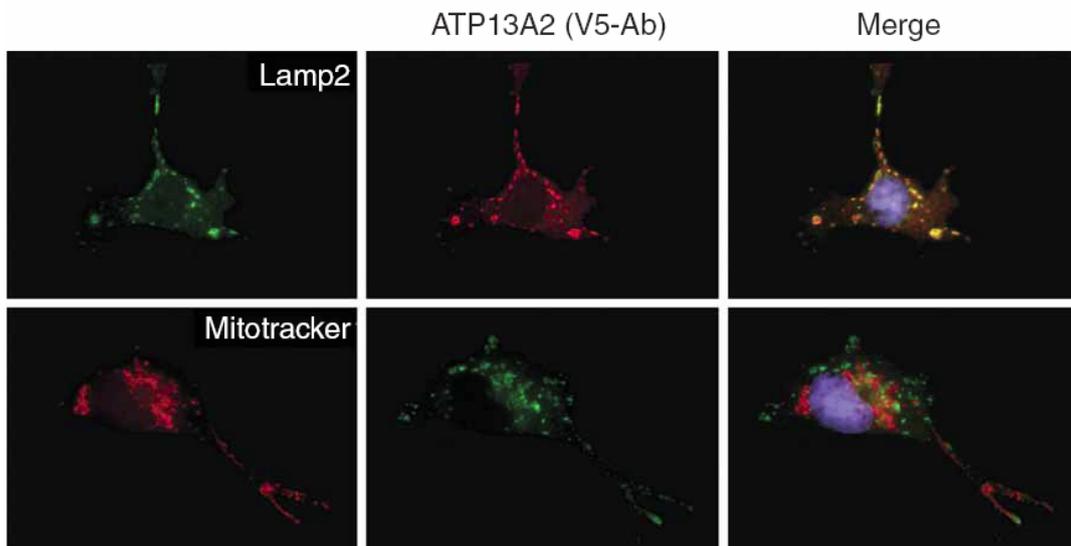


Abb. 3.20: Gezeigt ist die Immun-Lokalisation von ATP13A2-WT, bei der die Zellorganellen Lysosom und Mitochondrium untersucht wurden. Die Detektion des Zielproteins erfolgte über den V5-Antikörper, der in der oberen Reihe rot und in der unteren Reihe grün-fluoreszierend ist. Parallel wurden die Lysosomen grün (obere Reihe) bzw. die Mitochondrien rot (untere Reihe) markiert. Anschließend wurden beide Bilder übereinander gelegt. Das hier untersuchte ATP13A2-WT-Protein co-lokalisiert mit dem Lysosom, aber nicht mit den Mitochondrien.

Nach dem Anfärben des Zielproteins und der Mitochondrien und dem anschließenden Übereinanderlegen der Bilder ist kein gelbes Signal zu erkennen (Abb. 3.23, untere Reihe). Stattdessen werden durch die verwendeten Antikörper unterschiedliche Bereiche der Zelle gefärbt. Daher konnte keine Co-Lokalisierung von ATP13A2-WT und den Mitochondrien gezeigt werden.

Anders sieht es beim zweiten Versuchsteil aus, bei dem das Lysosom angefärbt wurde (Abb. 3.23, obere Reihe). Beim Übereinanderlegen des vesikulären Signals des Zielproteins mit diesem Organell kommt es an mehreren Stellen zu einer Co-Lokalisierung, die hier in Form von gelben Punkten sichtbar wird.

Anschließend wurden *cos7*-Zellen mit den KRS-Mutanten K1-K3 transient transfiziert. Da in einem ersten Versuch alle drei Zielproteine als netzwerkartige Struktur sichtbar wurden, wurde eine subzelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Reticulum (ER) überprüft. Während die ATP13A2-Mutanten durch den rot markierten V5-Antikörper detektiert wurden, wurde das Kompartiment mit dem grün leuchtenden PDI-Antikörper nachgewiesen.

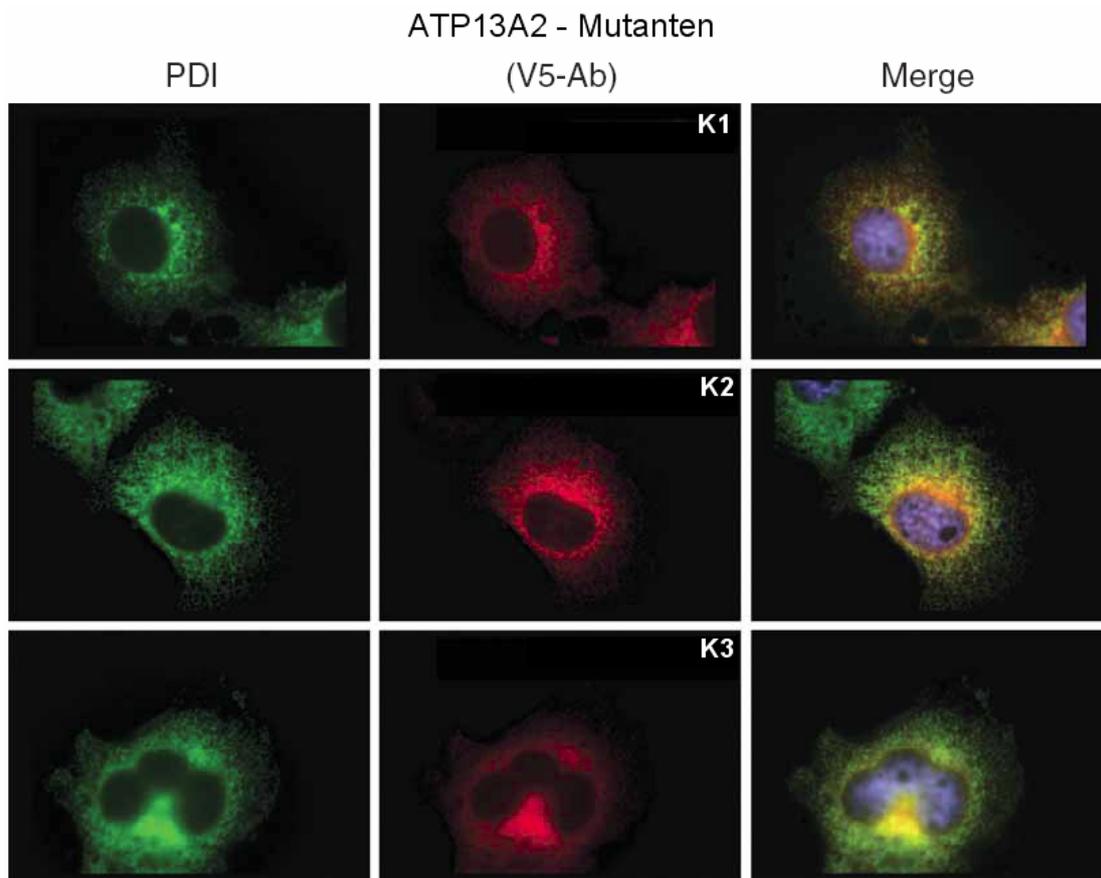


Abb. 3.21: Gezeigt ist die Immun-Lokalisation der drei KRS-Mutanten K1-K3, bei der das endoplasmatische Reticulum (ER) untersucht wurde. Die Detektion des Zielproteins erfolgte über den V5-Antikörper, der mit einem roten Fluorochrom markiert wurde. Das Kompartiment wurde durch den PDI-Antikörper nachgewiesen, der hier grün leuchtet. Alle drei KRS-Mutanten co-lokalisieren mit dem ER.

Für alle drei ATP13A2-Mutanten, deren jeweilige Mutation entweder zu einer *in frame*-Deletion (K1) oder zu einer Trunkierung des Proteins (K2 und K3) führen, kann die vesikuläre Struktur, die das WT-Protein hat, nicht gezeigt werden. Stattdessen co-lokalisieren sie mit dem ER. Beim Übereinanderlegen der Bilder kommt es zur gelben Mischfarbe.

Anschließend wurde untersucht mit welchem Zellkompartiment die ATP13A2-Mutanten K4-K7 co-lokalisieren, die ebenfalls bei KRS-Patienten gefunden wurden. Dazu wurden cos7-Zellen transient mit einem Expressionsvektor transfiziert, bei dem das grün-fluoreszierende Protein (GFP) N-terminal an das jeweilige ATP13A2-Protein fusioniert war. Somit musste nur noch das zu untersuchende Zellorganell rot markiert werden.

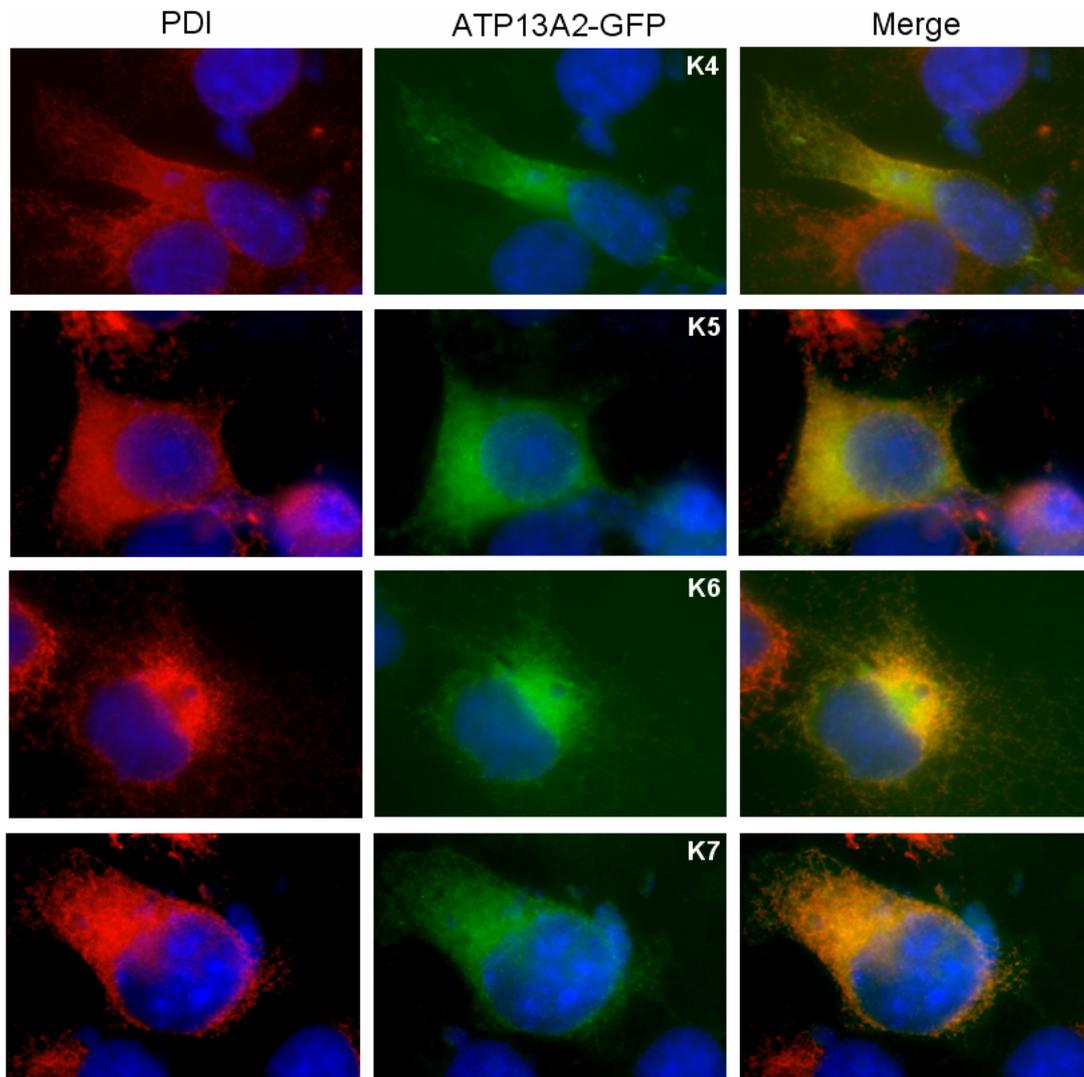
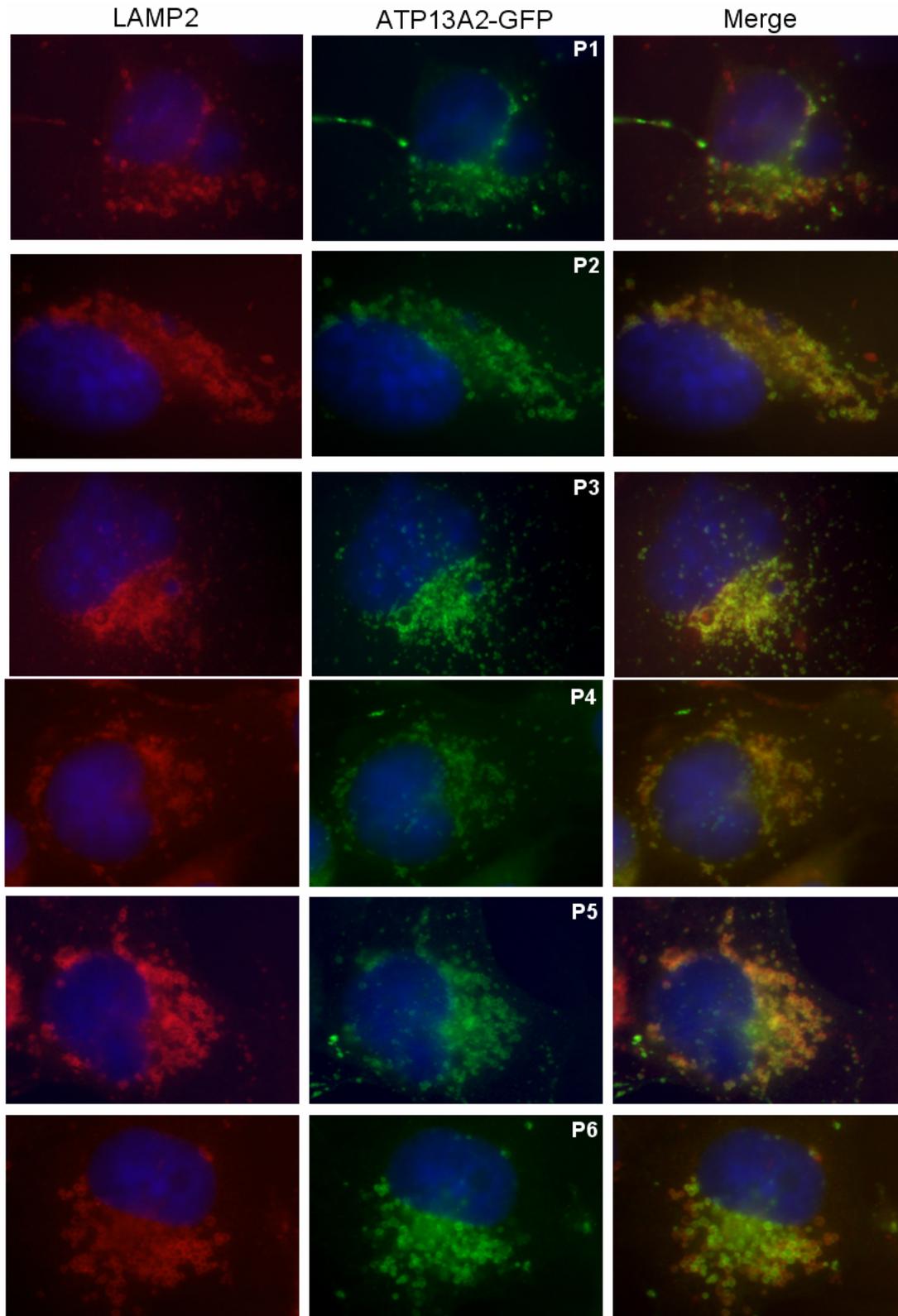


Abb. 3.22: Gezeigt ist die Immun-Lokalisation der vier ATP13A2-Mutanten K4-K7, die bei KRS-Patienten identifiziert wurden. Das GFP ist N-terminal an das Zielprotein fusioniert. Zusätzlich wurde ein rot-markierter PDI-Antikörper verwendet, der das ER detektiert. Alle KRS-Mutanten co-lokalisieren mit dem ER.

Analog zu den KRS-Mutationen K1-K3 kann auch hier keine vesikuläre Struktur wie die des ATP13A2-WT-Proteins beobachtet werden. Stattdessen co-lokalisieren die KRS-Mutanten K4-K7 mit dem ER.

Im Anschluss daran wurde die subzelluläre Lokalisation der acht ATP13A2-Mutanten untersucht, die bei PD-Patienten gefunden worden sind. Hierbei war das GFP N-terminal an das Zielprotein fusioniert und somit musste das Zielprotein nicht mit einem Fluorochrom markiert werden.



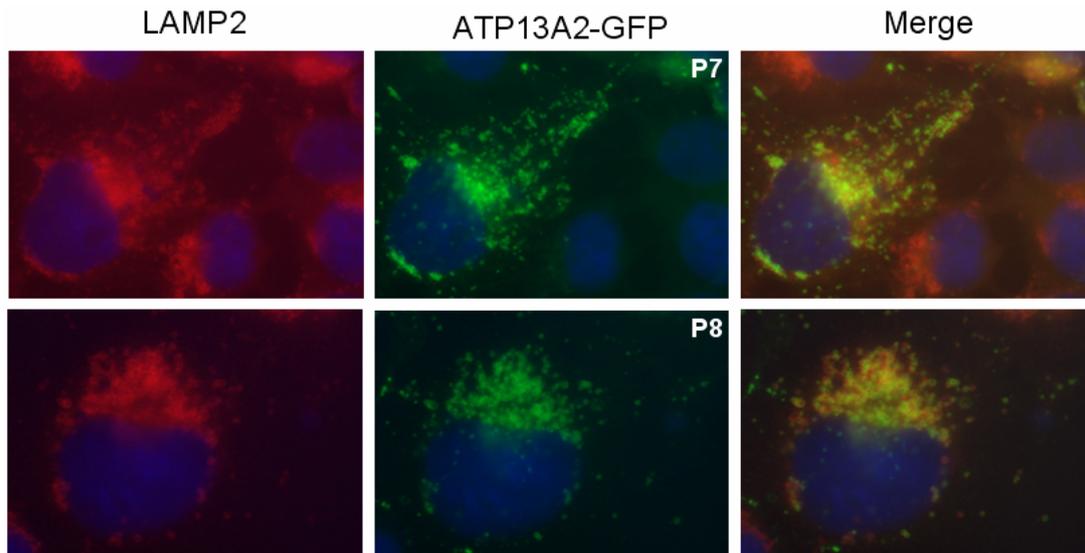


Abb. 3.23: Gezeigt ist die Immun-Lokalisation der acht ATP13A2-Mutanten, die bei PD-Patienten identifiziert wurden. Das GFP ist N-terminal an das Zielprotein fusioniert. Zusätzlich wurde ein rot-markierter H4B4-Antikörper verwendet, der das LAMP2 in der Lysosomenmembran detektiert. Alle PD-Mutanten co-lokalisieren mit dem Lysosom.

Für alle hier untersuchten PD-Mutanten konnte eine Co-Lokalisierung mit den Lysosomen gezeigt werden. Zum einen wird das mit GFP fusionierte Zielprotein in der charakteristischen Vesikelstruktur detektiert, zum anderen ist nach dem Übereinanderlegen mit den lysosomalen Signalen die gelbe Mischfarbe zu erkennen.

### 3.5.6 Zelluläre Proteindegradierung von ATP13A2 und ATP13A2-Mutanten

In der Zelle gibt es zwei große Abbaumechanismen, über die die meisten Proteine abgebaut und recycelt werden. Dabei handelt es sich zum einen um das Proteasom-Ubiquitin-System und zum anderen um das Lysosom. Zur Prüfung über welchen Weg insbesondere die KRS-Mutanten degradiert werden, wurden Hek293T-Zellen mit dem jeweiligen Expressionsvektor transient transfiziert und anschließend für mehrere Stunden mit MG132, einem spezifischen Proteasominhibitor, behandelt. Die Analyse erfolgte anschließend anhand der Western-Blot Analyse.

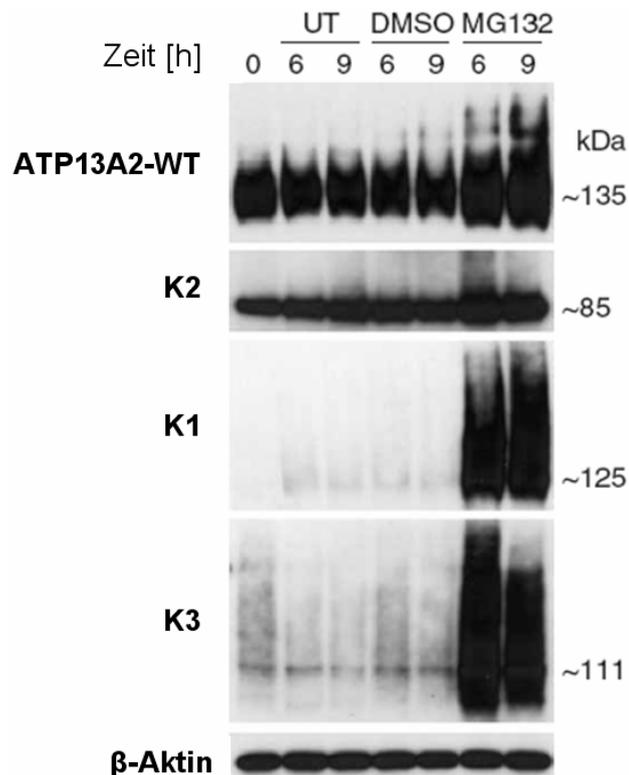


Abb. 3.24: Dargestellt ist der Western-Blot, bei dem die Proteinstabilität nach der Inhibition des Proteasoms untersucht wurde. Dabei wurden ATP13A2-WT und die drei KRS-Mutanten K1-K3 für 0, 6 und 9 h stimuliert. Während manche Zellen unbehandelt blieben, wurden andere mit 10  $\mu$ M MG132 bzw. mit dem gleichen Volumen an DMSO inkubiert. Die Detektion des Zielproteins erfolgte mit dem V5-Antikörper. Da die Proben vor dem Western-Blot durch Hitze denaturiert wurden, ist das Proteinsignal als Schmier erkennbar. Als Ladekontrolle diente das  $\beta$ -Aktin. Die Inhibition des Proteasoms führt in allen Ansätzen zur Stabilisierung des jeweiligen Zielproteins.

Für alle der hier untersuchten Proteine wurde beobachtet, dass die Behandlung mit MG132 für 6 und 9 h zu einer Zunahme der Zielproteinmenge führt. Das gilt im Besonderen für K1 und K3, die zu Versuchsbeginn kaum detektierbar waren und bei denen eine massive Stabilisierung der Mutante erkennbar ist. Da der Proteasominhibitor in DMSO gelöst war, wurden die Zellen parallel auch mit dieser Substanz stimuliert. Durch diese Negativkontrolle konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Effekt allein auf der Wirkung von MG132 beruht. Zusätzlich blieben manche Zellen unbehandelt, wodurch die neutrale Wirkung des DMSOs auf das Zielproteine bestätigt wurde.

Anschließend wurde dieser Versuch für die neu beschriebenen KRS- und PD-Mutanten durchgeführt. Nach transienter Transfektion mit dem jeweiligen Expressionsvektor wurden Hek293T-Zellen für 6, 9 und 12 h mit 10  $\mu$ M MG132 bzw. dem gleichen Volumen an DMSO behandelt.

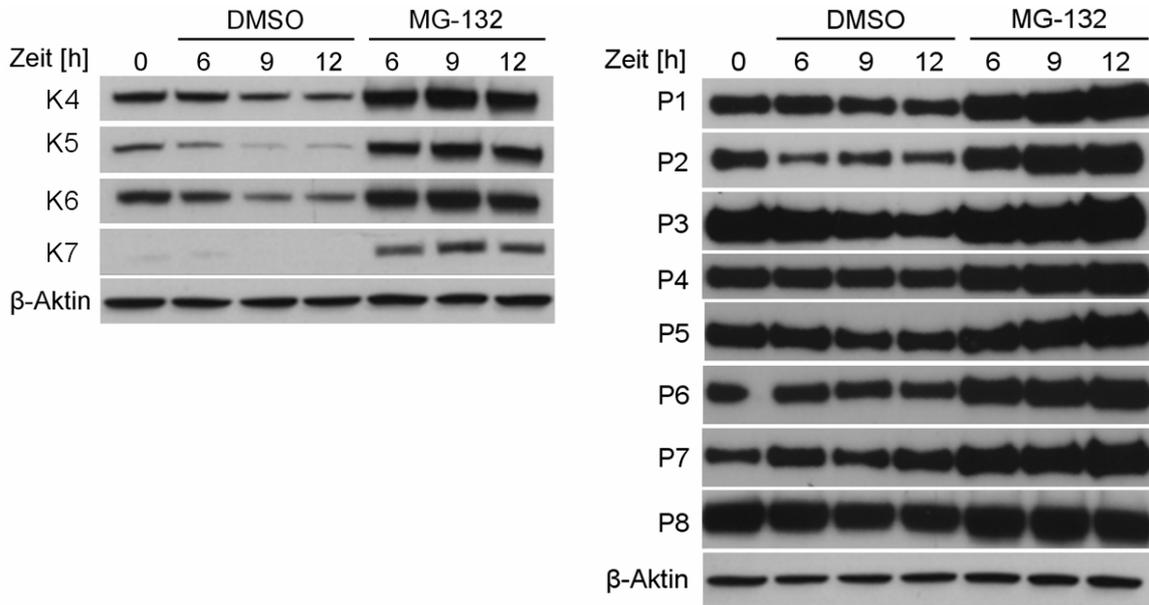


Abb. 3.25: Dargestellt ist ein Western-Blot, bei dem die Proteinstabilität nach Inhibition des Proteasoms untersucht wurde. Dabei wurden alle KRS- und PD-Mutanten für 0, 6, 9 und 12 h entweder mit 10  $\mu$ M MG132 oder mit dem gleichen Volumen an DMSO stimuliert. Die Detektion des Zielproteins erfolgte mittels V5-Antikörper. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Die Inhibition des Proteasoms führt in allen Ansätzen zur Stabilisierung des jeweiligen Zielproteins.

Für alle hier untersuchten KRS- und PD-Mutanten konnte durch die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 für 6, 9 und 12 h eine Stabilisierung des Zielproteins beobachtet werden. Allgemein ist dieser Effekt bei den KRS-Mutanten offensichtlicher, da hier das jeweilige Zielprotein im unbehandelten Zustand bzw. in Anwesenheit von DMSO teilweise instabil ist. Dies wird besonders bei der Mutante K7 deutlich, die im unbehandelten Zustand kaum detektierbar ist, aber durch die Hemmung der Abbaumaschinerie besser nachweisbar wird. Durch die höhere Grundstabilität der PD-Mutanten scheint der Stabilisierungseffekt des MG132 etwas weniger stark ausgeprägt zu sein. Jedoch ist die Zunahme der Proteinmenge erkennbar.

### 3.5.7 Halbwertszeit des ATP13A2-Proteins

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl das ATP13A2-WT-Protein als auch die Mutanten durch das Proteasom abgebaut werden, wurde die Halbwertszeit des Proteins untersucht. Dazu wurden Hek293T-Zellen mit dem jeweiligen Expressionsvektor transient transfiziert und anschließend für mehrere Stunden mit MG132 behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 250 µg/ml Cycloheximid behandelt. Diese Substanz hemmt die Aktivität der Peptidyltransferase an der 60S-Ribosomuntereinheit, wodurch die Translation und somit die Proteinsynthese inhibiert wird. Anschließend wurden die Proben via Western-Blot analysiert.

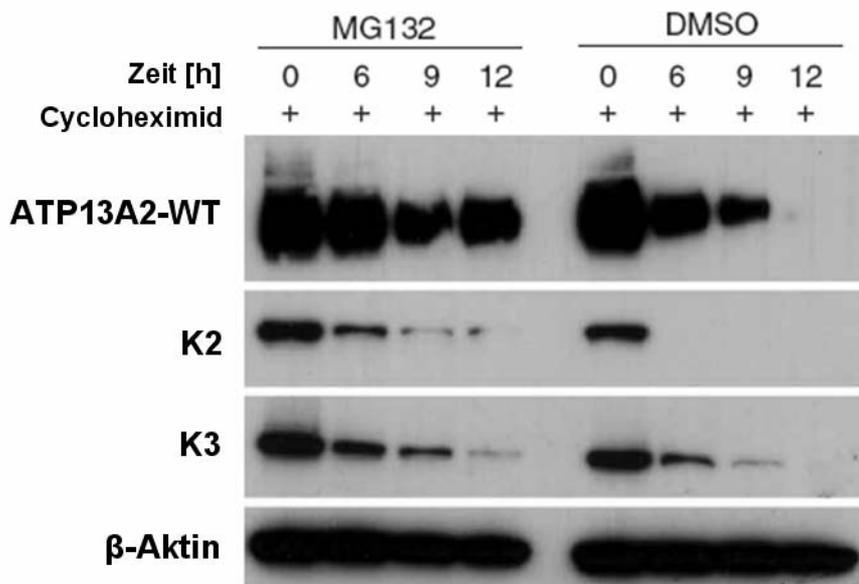


Abb. 3.26: Gezeigt ist der Western-Blot zur Untersuchung der Halbwertszeit von ATP13A2-WT und den beiden KRS-Mutanten K2 und K3. Die Zellen wurden für 6, 9 und 12 h gleichzeitig mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (250 µg/ml) und dem Proteasomhemmer MG132 (10 µM) bzw. einer äquivalenten DMSO-Menge stimuliert. Die Detektion des Zielproteins erfolgte mit dem V5-Antikörper. Als Ladekontrolle diente das β-Aktin.

Der Effekt von Cycloheximid im Zusammenspiel mit MG132 bzw. DMSO ist deutlich erkennbar. Im Gegensatz zum vorangegangenen Versuch kommt es hier durch die Proteasominhibition nicht zu einer Proteinakkumulation, sondern aufgrund der gleichzeitigen Hemmung der Proteinneusynthese zu einem langsamen Abbau der Zielproteine. Zwar wird dieser Prozess durch die MG132-Behandlung verlangsamt, jedoch wird er nicht komplett gestoppt. Daraus lässt sich ableiten, dass die hier untersuchten Proteine auch über einen alternativen Weg degradiert werden. Anhand der Signalintensitäten lässt sich ableiten, dass die relative Halbwertszeit von ATP13A2-WT bei ca. 4-6 h liegt. Die Mutante K1 ist in der Abbildung nicht mit einbezogen, da sie sehr instabil war und zum Zeitpunkt 0 h kaum detektiert werden konnte.

### 3.5.8 Analyse einer Ubiquitinierung von ATP13A2

Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Proteasoms durch MG132 zu einer Stabilisierung von ATP13A2-WT und den KRS- bzw. PD-Mutanten führt, wodurch sich weiter ableiten lässt, dass sie über diesen Abbauweg degradiert werden. Ein sehr häufig zu beobachtendes Kennzeichen dabei ist die Markierung des abzubauenen Substrates durch die kovalente Bindung eines Ubiquitinmoleküls, über das wiederum weitere Moleküle binden können. Dieses Protein besteht aus 76 Aminosäuren und ist hochkonserviert. Von besonderer funktioneller Bedeutung sind das Glycin an Position G76, über das das Ubiquitin an das Zielprotein gebunden wird, und die beiden Lysine an den Positionen K48 und K63, über die weitere Ubiquitinmoleküle angehängt werden können. Dieses so genannte Ubiquitin-Proteasom-System ist für die Proteinqualitätskontrolle von zentraler Bedeutung.

Um eine mögliche Ubiquitinierung von ATP13A2-WT und der drei KRS-Mutanten K1-K3 zu untersuchen, wurden cos7-Zellen transient mit dem jeweiligen Expressionsvektor transfiziert. Anschließend wurden sie für 12 h parallel mit 20  $\mu$ M MG132 bzw. einem gleichen Volumen an DMSO stimuliert. Danach wurde das Zielprotein mit dem V5-Antikörper und Protein A/G-Agarose aus dem Lysat präzipitiert und eine mögliche Ubiquitinierung mittels Western-Blot überprüft.

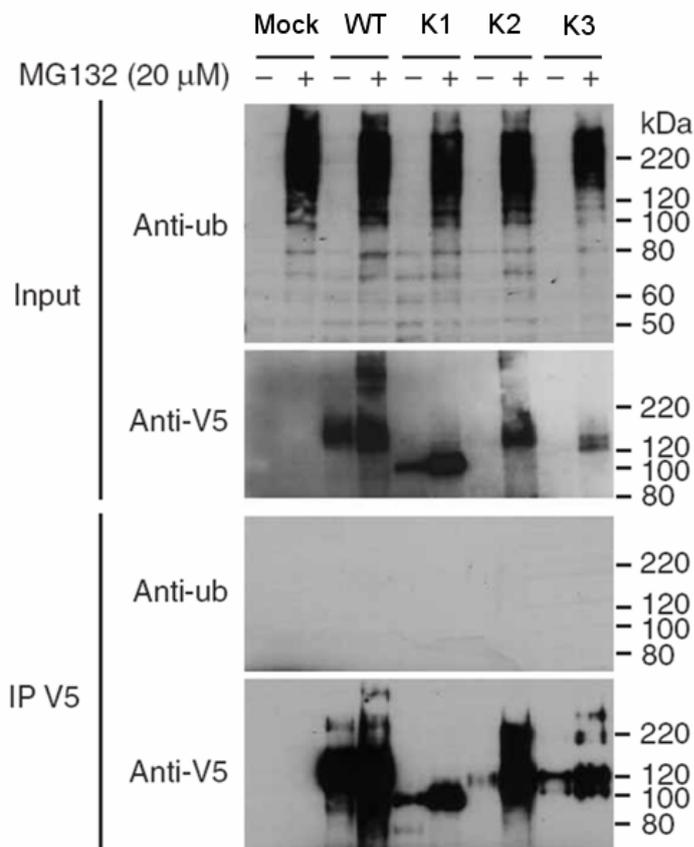


Abb.3.27: Untersucht wurde eine mögliche Ubiquitinierung von ATP13A2-WT und den drei KRS-Mutanten K1-K3. Dabei wurden die Lysate mit und ohne den Proteasominhibitor MG132 behandelt. Das Zielprotein wurde mit dem V5-Antikörper präzipitiert. Zur Detektion der ATP13A2-Proteine im *Input* und im Präzipitat wurden der V5- und der Ubiquitin-Antikörper verwendet. Für keine der untersuchten Proteine konnte eine Ubiquitinierung gezeigt werden.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen transienten Transfektion der Zellen wurde zunächst der *Input* untersucht, bei dem es sich um das Totallysat handelt. Hier konnte in allen Proben die Expression des jeweiligen Zielproteins anhand des V5-Antikörpers nachgewiesen werden. Für die beiden Mutanten K1 und K3 war dies nur durch eine gleichzeitige Proteasominhibition möglich. Parallel wurden mit einem entsprechenden Antikörper alle ubiquitinierten Proteine detektiert. Da diese von einem aktiven Proteasom umgehend abgebaut werden, lassen sie sich nur nach der MG132-Behandlung nachweisen. Diese erscheinen häufig als Signal-Schmier, da das abzubauen Protein polyubiquitiniert sein kann. Anschließend wurde die Effizienz der Präzipitation untersucht. Da für diese der V5-Antikörper verwendet worden ist, sollten alle ATP13A2-Konstrukte mit demselben Antikörper nachgewiesen werden können.

Da gezeigt werden konnte, dass dies der Fall war, wurde abschließend geprüft, ob Ubiquitin kovalent an das Zielprotein gebunden ist. Dies konnte allerdings nicht bestätigt werden. Folglich konnte eine Ubiquitinierung des ATP13A2-WT-Proteins oder einer der drei untersuchten KRS-Mutanten im Zusammenhang einer proteasomalen Degradierung nicht experimentell nachgewiesen werden.

### **3.6 Generierung einer *Atp13a2* Knock-Out Maus**

Die in den vorangegangenen Experimenten verwendeten Systeme haben den Nachteil, dass unklar ist, inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse die Situation *in vivo* widerspiegeln. Zum einen wurde in einem Ansatz das Zielprotein transient überexprimiert und somit artifiziell *in vitro* untersucht. Zum anderen wurden Fibroblasten analysiert, die von einem KRS-Patienten und einem gesunden Bruder stammen, allerdings handelt es sich bei diesen Zellen um Fibroblasten, die aus dem Zahnfleisch isoliert wurden. Da das Kufor-Rakeb Syndrom eine neurodegenerative Erkrankung ist, die in erster Linie das Gehirn betrifft, ist ungewiss, ob diese Zellen für eine detaillierte Analyse geeignet sind. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Maus generiert werden, bei der das murine *Atp13a2*-Gen konstitutiv ausgeschaltet ist. Um dies zu erreichen, wurden zwei Strategien in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Zimmer und nachfolgend mit Prof. Dr. Jens Brüning entwickelt. Für die Durchführung der dazu notwendigen Tierversuche lag eine Genehmigung vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen vor (Aktenzeichen: 8.87-50.10.31.08.030).

Das Ziel des ersten Ansatzes war die Deletion eines möglichst großen Teils der genomischen *Atp13a2*-Sequenz. Dies sollte über Rekombinationsereignisse zwischen Mausgenom und *Targeting*-Vektor erreicht werden, bei denen es letztendlich über homologe Bereiche (Arme), zum Austausch der Exons 14 bis 23 mit einem Antibiotikum-Resistenzgen kommt. Der lange Arm, der vor der Neomycin-Kassette liegt, war 6,7 kb groß. Der kurze Arm hatte eine Länge von 2,3 kb (vergleiche Abb. 3.28).

Die Folge wäre die Deletion von 4385 bp der genomischen Sequenz bzw. von 427 Aminosäuren. Darin sind der für die dritte und vierte Transmembrandomäne kodierende Bereich sowie die Phosphorylierungsstelle enthalten. Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Störung könnte davon ausgegangen werden, dass die Translation der übrig gebliebenen Sequenz zu keinem aktiven Protein führt.

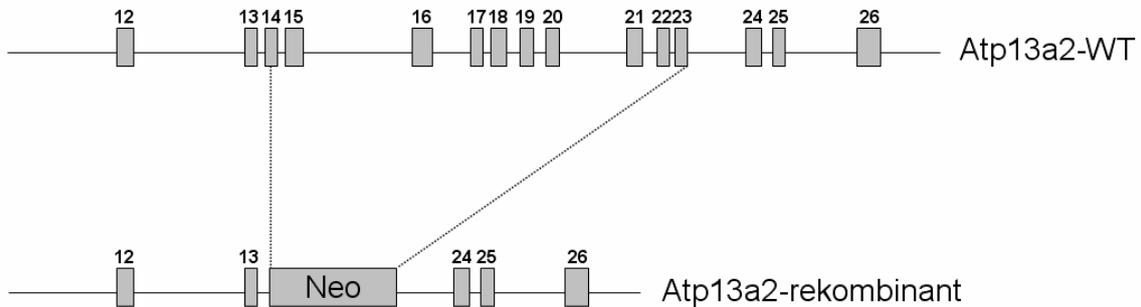


Abb. 3.28: Schematische Darstellung der ersten *Knock-Out* Strategie. Anhand homologer Rekombination werden die Exons 14 bis 23 des murinen *Atp13a2*-Gens durch die Neomycin-Kassette ausgetauscht. Dabei kommt es zum Verlust der dritten und vierten Transmembrandomäne sowie der Phosphorylierungsstelle, die für die Proteinfunktion von essentieller Bedeutung ist.

Nachdem der lange und der kurze Arm in den *Targeting*-Vektor pPNT1 einkloniert waren, wurde dieser durch die Restriktionsendonuklease *HpaI* linearisiert, aufgereinigt und anschließend mittels Elektroporation in die ES-Zelllinie V6.5 eingeschleust. Es wurden zwei Transfektionen durchgeführt, bei denen insgesamt 672 ES-Kolonien mit G418 und Ganciclovir selektiert und näher untersucht wurden. Mittels Southern-Blot Verfahren, bei der die ES-DNA mit *EcoRI* geschnitten wurde, wurden diese Klone hinsichtlich einer homologen Rekombination analysiert. Durch die Hybridisierung einer spezifischen, radioaktiv-markierten Sonde sollte das *Atp13a2*-WT- und das rekombinante Allel als 17 kb bzw. 7,5 kb großes Fragment detektiert werden. In allen untersuchten ES-Klonen wurde ausschließlich das WT-Signal nachgewiesen. Daher wurde eine zweite Strategie zur Generierung der *Atp13a2*-*Knock-Out* Maus verfolgt.

Im zweiten Ansatz wurden auf genomischer Ebene die Exons zwei und drei sowie das dazwischen liegende Intron deletiert, was einer Länge von 389 bp bzw. 93 AA entspricht (vergleiche Abb. 3.29). Das führte zum Verlust der ersten Transmembrandomäne und zusätzlich zu einer Verschiebung des Translationsleserasters. Folglich ist anzunehmen, dass basierend auf der so veränderten Sequenz kein funktionelles Protein synthetisiert werden könnte. Für die Rekombination wurden homologe Bereiche ausgewählt, die 5 kb (langer Arm; vor der Neomycin-Kassette) bzw. 2 kb (kurzer Arm; hinter der Neomycin-Kassette) groß waren.

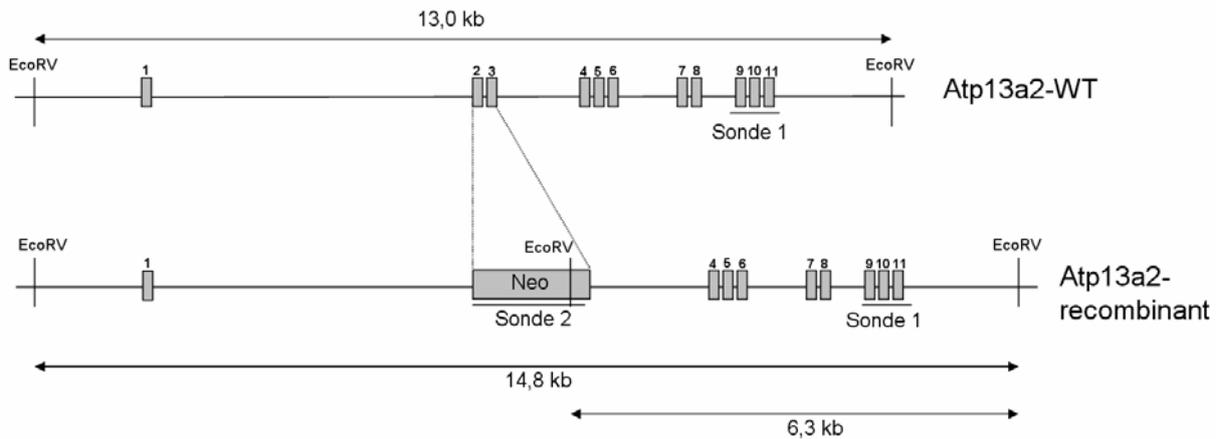


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der zweiten *Knock-Out* Strategie. Anhand homologer Rekombination werden die Exons 2 und 3 des murinen *Atp13a2*-Gens durch die Neomycin-Kassette ausgetauscht. Dabei käme es zum Verlust der ersten Transmembrandomäne sowie zur Verschiebung des Translations-Leserasters und folglich zu einem trunkierten Protein ohne Aktivität.

Als *Targeting*-Vektor fungierte hier das pEasyfloxFRTGK12-Plasmid. Nach der Einklonierung der homologen Abschnitte wurde das Plasmid mit dem Enzym *NotI* linearisiert, aufgereinigt und via Elektroporation in die Zelle eingeführt. In zwei Transfektionsansätzen wurden nach der Selektion mit G418 und Ganciclovir insgesamt 1056 ES-Klone expandiert, von denen 588 Klone mittels Southern-Blot, bei dem die DNA mit *EcoRI* verdaut wurde, analysiert wurden. Insgesamt wurden so neun positive ES-Klone identifiziert. Durch die Integration der Neomycin-Kassette ins Genom, die im Austausch mit den Exons zwei und drei erfolgte, wird eine zusätzliche Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* eingefügt. Nach dem enzymatischen Verdau der DNA erfolgte die Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten Sonde, die das *Atp13a2*-WT-Allel und - im Falle einer homologen Rekombination - das rekombinante Allel als 13 kb bzw. 6,3 kb großes Fragment detektierte.

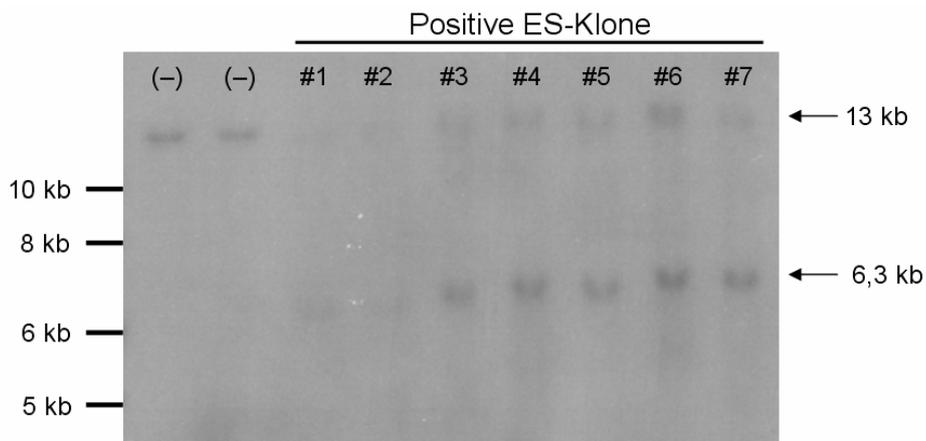


Abb. 3.30: Überprüfung positiver ES-Klone mittels Southern-Blot. Durch homologe Rekombination mit dem *Targeting*-Vektor wurden auf einem der beiden *Atp13a2*-WT-Allele die Exons 2 und 3 durch die Neomycin-Kassette ausgetauscht. Die Hybridisierung einer radioaktiv-markierten Sonde führte zur Detektion eines WT- und eines rekombinanten Fragments mit einer Größe von 13 kb bzw. 6,3 kb. Neben den sieben positiven ES-Klonen aus der ersten ES-Transfektion wurden zusätzlich zwei WT-DNA-Proben als Negativkontrollen analysiert.

Nach der Identifizierung positiver ES-Klone, wurden diese in der Zellkultur expandiert und hinsichtlich der integrierten Neomycin-Kassette via Southern-Blot ein zweites Mal überprüft (vergleiche Abb. 3.30). Anschließend wurden im Rahmen dieser Arbeit sieben der insgesamt neun positiven ES-Klone in Blastozysten bzw. Morulae injiziert und in pseudoschwangere Weibchen transferiert.

Tab. 3.4: Übersicht über die sieben injizierten ES-Klone. Von den 83 Tieren gab es insgesamt 42 Chimäre, deren Anteil an schwarzem Fell zwischen 5 und 95 % lag. Acht Mal wurden die ES-Zellen in Blastozysten eingebracht. Einmal wurde eine Morulainjektion durchgeführt.

ES-Zellen	ES-Klon	Injektionsdatum	Anzahl injizierter Blastozysten	Anzahl Ammen/Schwangerschaften	Nachkommen/Geburtsdatum	Chimären	Injektion
V6.5	C1	09.05.2007	20 CB20	1/0	0	0	Blastozyste
V6.5	A8	10.05.2007	53 CB20	4/4	26/27.05.07	11 (7x♂ 5, 20, 25, 25, 25, 75, 90%, 4x♀ 5, 25, 80, 80%)	Blastozyste
V6.5	E7	15.11.2007	5 CB20+ 11 B6	1/1	1/02.12.07	1x♂ 20%	Blastozyste
V6.5	C9	16.11.2007	54 CB20	3/0	0	0	Blastozyste
V6.5	F12	17.01.2008	30 CB20	2/2	10/17.01.08	7x♂ 20, 20, 30, 30, 30, 40, 50%	Blastozyste
V6.5	E11	18.01.2008	30 CB20	2/2	17/04.02.08	10 (7x♂ 65, 70, 70, 80, 85, 90, 95, 3x♀ 80, 80, 80%)	Blastozyste
V6.5	F12	10.09.2008	86 C57Bl/6	5/2	Babies gefressen	0	Blastozyste
V6.5	A8	30.10.2008	39 CB20	3/3	22/16.11.08	11/10 left (6x♂ 5, 30, 40, 50, 55, 55, 4x♀ 20, 20, 20, 30%)	Blastozyste
V6.5	F3	31.10.2008	56 CB20	4/2	7/17.11.08	3 (2x♂ 30, 65%, 1x♀ 30%)	Morula

Daraus gingen Nachkommen hervor, die einen Fellchimärismus zeigten, da die V6.5-Zellen von Mäusen mit schwarzem Fell stammen und die CB20-Blastozysten von weißen Mäusen. Für die Kreuzung mit Bl6-Tieren wurden zunächst Chimäre genommen, die mindestens 50 % schwarzes Fell hatten. Erst im weiteren Verlauf wurden auch Tiere verwendet, die nur zu 30 bis 40 % ein schwarzes Fell hatten. Es wurden bevorzugt männliche Chimären für die Verpaarung eingesetzt, da die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission, das heißt die stabile Vererbung der eingeführten Mutation im *Atp13a2*-Gen, höher ist.

Insgesamt wurden die Nachkommen von 17 chimären Tieren, bei denen der Anteil schwarzer Fellfarbe zwischen 30 bis 95 % lag, untersucht. In der Regel wurde die Verpaarung nach acht Würfen beendet. Wenn es innerhalb von zwei bis drei Monaten keinen neuen Wurf gab, wurde das Bl6-Tier ausgetauscht. Gab es in der Folgezeit noch immer keine Nachkommen, wurde die Chimäre aus dem Bestand genommen. Zudem ist es gelegentlich vorgekommen, dass das chimäre Elterntier verstorben ist.

Insgesamt wurde bei 840 Mäusen das Vorliegen des rekombinanten *Atp13a2*-Allels mittels Multiplex-PCR analysiert. Dabei wurde jede Probe parallel in zwei Ansätzen mit unterschiedlichen Primern untersucht.

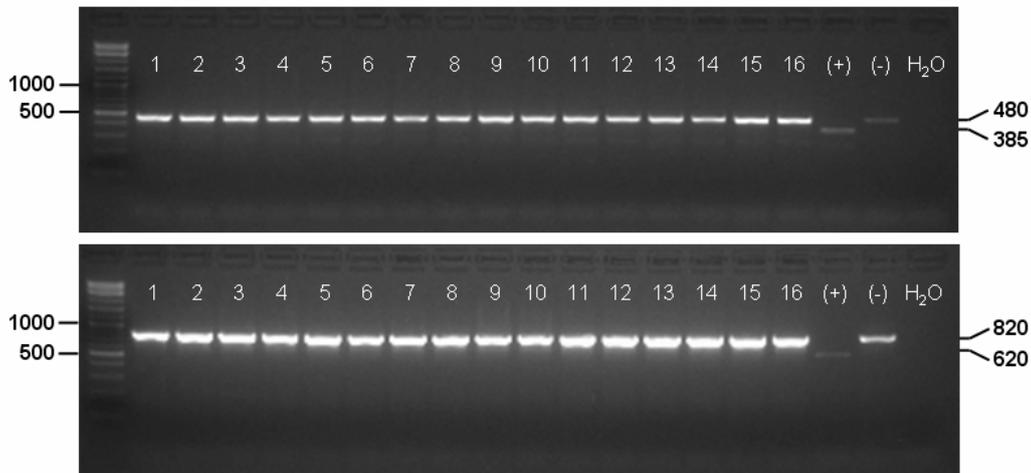


Abb. 3.31: Gezeigt sind die Ergebnisse einer Multiplex-PCR, bei der das Vorliegen des rekombinanten *Atp13a2*-Allels überprüft wurde. Jede Probe wurde in zwei Ansätzen mit unterschiedlichen Primern untersucht. Während die Amplifikate für das WT-Allel 480 bp (PCR 1) und 820 bp (PCR 2) groß waren, waren sie für das rekombinante Allel 385 bp (PCR 1) und 620 bp groß. Bei keiner der 840 untersuchten Mäuse lag das rekombinante Allel vor.

Die Abbildung 3.31 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Multiplex-PCR, bei der 16 Mäuse untersucht wurden. Zusätzlich enthielt jeder Ansatz eine Positiv- und eine Negativkontrolle, bei der DNA eines positiven bzw. negativen ES-Klons verwendet wurde. Zur Prüfung einer spezifischen Amplifikation gab es zudem einen Leerwert, bei dem keine DNA enthalten war.

Während im ersten PCR-Ansatz das *Atp13a2*-WT-Allel als 480 bp großes Fragment nachgewiesen wurde, war das rekombinante Allel 385 bp lang. In der zweiten PCR waren die Amplifikate 820 bp (WT) bzw. 620 bp (rekombinant) groß.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in keinem der 840 untersuchten Tiere das rekombinante *Atp13a2*-Allel nachgewiesen.

Tab. 3.5: Übersicht über alle eingesetzten Chimäre. Ihr Anteil an schwarzem Fell lag zwischen 30 und 95 %. Insgesamt wurden 19 Verpaarungen angesetzt, aus denen 840 Nachkommen hervorgingen. Bis auf eine Ausnahme hatten alle eine braune Fellfarbe. Mittels Multiplex-PCR wurde das Vorliegen des rekombinanten *Atp13a2*-Allels untersucht.

ES-Klon	ES-Zellen	Blastozysten-Stamm	Chimären	gekreuzt mit	Start Züchtung	Anzahl der Würfe	Anzahl der Nachkommen	Farbe schwarz/braun
A8	V6.5	CB20	# 415 (♀) 90%	B6	26.07.2007	3	20	0/20
			# 420 (♂) 75%			7	57	0/57
			# 423 (♀) 80%			9	75	1/75
			# 424 (♀) 80%			8	52	0/52
E11	V6.5	CB20	# 633 (♂) 40%	B6	25.03.2008	4	31	0/31
			# 637 (♂) 50%			7	62	0/62
			# 640 (♂) 90%			9	62	0/62
			# 641 (♂) 80%			9	60	0/60
			# 642 (♂) 70%			5	43	0/43
			# 643 (♂) 70%			7	59	0/59
			# 644 (♂) 95%			7	54	0/54
			# 645 (♂) 85%			7	48	0/48
			# 646 (♂) 65%			2	11	0/11
			A8			V6.5	CB20	# 23 (♂) 55%
# 24 (♂) 40%	6	51		0/51				
# 25 (♂) 30%	6	51		0/51				
# 28 (♂) 55%	0	0		0				
# 29 (♂) 50%	6	50		0/50				
F3	V6.5	CB20	# 35 (♂) 30%	B6	14.01.2009	5	54	0/54

## 4. Diskussion

### 4.1 Analyse des *ATP13A2*-Gendefekts anhand von KRS-Patientenfibroblasten

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fibroblasten, welche aus dem Zahnfleisch entnommen wurden, handelt es sich nicht um Zellen, die primär bei neurodegenerativen Erkrankungen - wie die in diesem Falle Parkinson - betroffen sind. Da allerdings eine Untersuchung von Neuronen aus ethischen und praktischen Gründen nicht möglich war, stellen sie eine Alternative zur Untersuchung von grundlegenden Zusammenhängen auf zellulärer Ebene dar. Sie haben den Vorteil, dass *ATP13A2* in allen Patientenzellen funktionslos ist und man deshalb von konstanten Bedingungen hinsichtlich des Gendefekts ausgehen kann.

#### 4.1.1 Einfluss von *ATP13A2* auf das Lipidprofil

In der Literatur gibt es Hinweise, die auf einen Zusammenhang zwischen einem gestörten Lipidmetabolismus und der Entwicklung einer Neurodegeneration hindeuten. So wurden funktionelle Defizite im Komplex I der mitochondrialen Atmungskette beschrieben, die sich nicht nur in Zellen aus der *Substantia nigra* von PD-Patienten fanden, sondern auch in peripheren Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten zu beobachten waren (Schapira *et al.*, 1989; Winkler-Stuck *et al.*, 2004). Dieser Bereich des Mitochondriums gilt als Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies wie ROS (*reactive oxygen species*), die für oxidativen Stress innerhalb einer Zelle verantwortlich gemacht werden. Allerdings scheint bei PD-Patienten die ROS-Detoxifizierung unzureichend zu sein, da im Gehirn eine gesteigerte Lipidperoxidation beobachtet werden kann (Yoritaka *et al.*, 1996). Hierbei handelt es sich um die oxidative Degradierung von Lipiden durch freie Radikale, welche beim Vergleich der *Substantia nigra* von PD-Patienten mit anderen Gehirnregionen oder auch mit gesunden Kontrollpersonen anhand erhöhter Mengen an Malondialdehyd (MDA) bzw. Cholesterol Lipid-Hydroperoxid sichtbar wird (Dexter *et al.*, 1989; Dexter *et al.*, 1994). Dies kann sogar vor der Manifestierung der ersten klinischen Symptome und somit in einem frühen Stadium der PD-Pathogenese beobachtet werden. Bei der Analyse von PD-Patientenfibroblasten, die homozygot die *PINK1*-Mutation p.G309D tragen, wurden ebenfalls erhöhte MDA-Mengen gemessen (Hoepken *et al.*, 2007). Ein zweiter Aspekt basiert auf der zentralen Funktion des Lysosoms, d.h. dem Abbau von körpereigenen und -fremden Molekülen und Substanzen. Kommt es hier zu einer Störung, die die Aktivität eines daran beteiligten Proteins beeinträchtigt, kann es zu einer Ansammlung des abzubauenen Substrates innerhalb der Zelle kommen. Dies kann sich schließlich auf den gesamten Organismus ausweiten. Davon besonders betroffene Organe sind Leber, Milz, Haut, Knochen und das Nervensystem. Eine sehr häufige lysosomale Speicherkrankheit ist die Gaucher-Krankheit (GK). Sie beruht auf

Mutationen im  $\beta$ -Glucocerebrosidase-Gen, die zu einem gestörten Fettstoffwechsel führen. Im Laufe der letzten Jahre wurde in mehreren Studien für Patienten, die an der adulten GK-Form (Typ I; nicht-neuronopathisch) leiden, PD-typische Symptome beschrieben (Turpin *et al.*, 1987; Neudorfer *et al.*, 1996). Ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen besteht darin, dass Lipide einen Einfluss auf die Toxizität von  $\alpha$ -Synuclein haben können (Scherzer und Feany, 2004). Wenn auch der exakte Zusammenhang zwischen den bei PD-Patienten identifizierten  $\beta$ -Glucocerebrosidase-Mutationen und der Zusammensetzung der Lipidmembran bislang noch unklar ist, kann die Ansammlung von  $\beta$ -Glucocerebrosidase zu einem Anstieg der Zellmembrankomponente Phosphatidylcholin führen was in einer veränderten Zusammensetzung der Zellmembran resultiert (Wong *et al.*, 2004). Dies könnte die Bindung des  $\alpha$ -Synuclein, das von Natur aus eine niedrige Bindungsaffinität für Phospholipide besitzt, weiter reduzieren und so den Anteil des freien cytosolischen  $\alpha$ -Synuclein erhöhen. Als Folge dessen könnte dieses wiederum aggregieren.

Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass die P-Typ Typ IV ATPasen, die mit den Typ V ATPasen am nächsten verwandt sind, Aminophospholipide transportieren, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Mutationen in *ATP13A2* ebenfalls eine Anreicherung von Lipiden in Zellen verursachen (Palmgren und Axelsen, 1998; Tang *et al.*, 1996; Auland *et al.*, 1994). Daher wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Hany Farwanah aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sandhoff vom Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie an der Universität Bonn die Mengen von Sphingomyelin, Globotetrasylceramid, Globotriasylyceramid, Lactosylceramid und Glucosylceramid in den Patienten- und Kontrollfibroblasten ermittelt. Allerdings waren in der mittels Hochleistungsdünnschichtchromatographie durchgeführten Lipidanalyse keine nennenswerten Unterschiede im Lipidprofil zwischen den beiden Zelllinien nachweisbar. Sowohl bei KRS bzw. PD als auch bei GK-Typ I handelt es sich um Erkrankungen, die jeweils auf einen congenitalen Gendefekt beruhen, während die ersten Symptome allerdings meist erst nach Jahren oder Jahrzehnten auftreten. Dies bedeutet, dass der Organismus zunächst in der Lage zu sein scheint, die Beeinträchtigungen auf zellulärer Ebene auszugleichen bis die Kompensationsgrenze zu einem bestimmten Zeitpunkt überschritten wird und eine Zellschädigung eintritt. Es wäre daher denkbar, dass die Mutationen in *ATP13A2* nur zu einer diskreten Veränderung im Lipidprofil führen und dessen Folgen sich erst später manifestieren. Möglicherweise ist der Unterschied so gering, dass dieser mit diesem Verfahren nicht eindeutig detektierbar wäre. Zudem besteht die Möglichkeit, dass dieser kaum erkennbare Unterschied einen sekundären Effekt hat, der letztendlich erst zur PD-Pathogenese führt. Somit könnten Mutationen in *ATP13A2* die Zusammensetzung der Lipidmembran verändern, so wie es am Beispiel der  $\beta$ -Glucocerebrosidase beschrieben ist. Dies könnte dazu führen, dass ein zweiter Faktor - wie das  $\alpha$ -Synuclein - in seiner Funktion eingeschränkt ist und den daraus resultierenden toxischen Charakter erhöhen, wodurch es letzten Endes zum Entstehen der

neurodegenerativen Erkrankung kommt. Umgekehrt konnte sowohl in der Hefe als auch bei *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden, dass die Überexpression des jeweiligen *ATP13A2*-Orthologs die Toxizität von überexprimierten  $\alpha$ -Synuclein reduziert (Gitler *et al.*, 2009). Dieser Effekt wurde auch für *ATP13A2* in primären Neuronen beobachtet. Während nur 5 bis 10 % der PD-Fälle eine monogene Ursache haben, beruhen die verbliebenen 90 bis 95% auf einem komplexen Zusammenspiel von Faktoren, die auf einer genetischen Prädisposition und Einfluss von Umweltfaktoren basieren (komplexe Erkrankungen).

Abschließend kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich beim Transportsubstrat der P-Typ Typ V ATPasen um Lipide handelt. Doch um dies endgültig zu klären, sind weitere Analysen notwendig, in denen weitere Lipide mit einbezogen werden. Da bei den lysosomalen Speichererkrankungen die Ansammlung des abzubauenen Materials die Morphologie stark beeinträchtigen kann, indem beispielsweise die Lysosomen stark vergrößert sind, könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen der Fibroblasten weitere Hinweise liefern. Allerdings wurde in den letzten Jahren in unabhängigen Studien für das Hefeortholog YPK9 gezeigt, dass es am Transport von Schwermetallen (wie zum Beispiel Mangan) beteiligt ist (Schmidt *et al.*, 2009). Daher ist es zum aktuellen Zeitpunkt eher unwahrscheinlich, dass die Typ V ATPasen Lipide transportieren.

#### **4.1.2 Beteiligung von ATP13A2 an der Autophagie**

Die zentrale Funktion von Lysosomen besteht in der Degradierung von Proteinen und Organellen, was als Autophagie bezeichnet wird (Klionsky und Emr, 2000). Dabei unterscheidet man drei Formen der Autophagie. Bei der Makroautophagie wird das abzubauenende Substrat im Cytosol von einer Doppelmembran umschlossen und dabei das so genannte Autophagosom gebildet, welches anschließend mit dem Lysosom fusioniert. Es kommt dabei zur Hydrolasen-vermittelten Degradierung von Proteinen. Dieser Prozess wird vor allem durch einen Nährstoffmangel ausgelöst und dient dem Recycling (Mortimore und Poso, 1986). So wurde im Laufe der Jahre deutlich, dass die lysosomale Degradierung nicht nur beim Abbau langlebiger und stabiler Proteine, sondern ebenso beim Abbau falsch gefalteter Proteine und Proteinaggregate für den Organismus von Bedeutung ist. Da bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen Proteinaggregate beschrieben wurden, stellt die Makroautophagie im Hinblick auf die Neurodegeneration einen wesentlichen Faktor dar. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA; *chaperon-mediated autophagy*) handelt es sich um eine spezifische Form der Degradierung. Grundvoraussetzung dafür ist, dass das abzubauenende Protein das Aminosäuremotiv KFERQ besitzt, über das es von einem cytosolischen Chaperonkomplex erkannt wird. Anschließend wird dieses Substrat durch eine Interaktion mit dem Membranprotein LAMP2a (*lysosome associated membrane protein 2a*) ins Lysosom geschleust und abgebaut (Massey *et al.*, 2006; Dice, 2007).

Die spezifische Degradierung von Organellen wie Mitochondrien und Peroxisomen wird als Mito- bzw. Pexophagie bezeichnet. Da zum Beispiel die Mitochondrien eine Lebensdauer von 10 bis 20 Tagen besitzen, ist eine ständige Qualitätskontrolle und Erneuerung dieses Organells erforderlich. So wurde erst kürzlich in der Hefe gezeigt, dass die Degradierung von Mitochondrien ein selektiver Prozess ist (Kissova *et al.*, 2004).

Der Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) wurde bereits hinreichend untersucht und die aus einer Fehlfunktion des UPS resultierende Ansammlung von falsch gefalteten Proteinen mit der PD-Pathogenese in Verbindung gebracht (McNaught *et al.*, 2003). Dies wird beispielsweise durch Mutationen in *Parkin* deutlich, die die Ubiquitin-Ligase Aktivität in der *Substantia nigra* reduzieren (Shimura *et al.*, 2000 und 2001). Inzwischen konnte auch die enge Beziehung zwischen Neurodegeneration und Autophagie mehrfach gezeigt werden. Dabei sind Mausmodelle, bei denen die Autophagie-relevanten Gene *Atg5* und *Atg7* konditional ausgeschaltet wurden und die Mäuse motorische Beeinträchtigungen zeigten, von großer Bedeutung. Bei der anschließenden Untersuchung des Gehirns wurden Proteinablagerungen und eine Degeneration von Neuronen nachgewiesen (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006). Weitere Hinweise stammen aus Studien mit  $\alpha$ -Synuclein. Dieses Protein wird *in vitro* sowohl über das Proteasom als auch über die Autophagie abgebaut (Webb *et al.*, 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die häufig bei PD-Patienten vorkommenden Mutanten p.A30P und p.A53T nicht mittels CMA degradiert werden. Dabei verhindern sie nicht nur ihren eigenen Abbau, sondern auch den anderer Proteine, indem sie LAMP2a, das hierbei als Membranrezeptor fungiert, blockieren (Cuervo *et al.*, 2004).

Da die ATPase ATP13A2 ein lysosomales Membranprotein ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit initial untersucht werden, ob sich der Gendefekt auf die Induktion oder den Ablauf der Autophagie auswirkt. Diese wurde anhand der Proteinmengen der spezifischen Marker p62 und LC3 detektiert. Zusammenfassend kann man sagen, dass es schwierig ist, einen deutlichen Unterschied in der Autophagie zwischen den beiden Zelllinien festzustellen. Zum einen wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der p62-Proteinmenge festgestellt. Zum anderen wurde eine leichte Tendenz beobachtet, bei der im Vergleich zu den Patientenzellen bei den Kontrollzellen zu einem etwas früheren Zeitpunkt mehr LC3-II und somit mehr Autophagosomen aufgrund einer induzierten Autophagie vorlagen und dass dieses Antwortverhalten der Zellen auf Stress beim KRS-Patienten geringfügig beeinträchtigt sein könnte. Zusammenfassend gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keinen eindeutigen Hinweis, dass ATP13A2 für die Autophagie von zentraler Bedeutung ist. Diese Einschätzung deckt sich mit Ergebnissen, die am Hefemodell gewonnen wurde.

Hier konnte in zwei unabhängigen Versuchen eine Beteiligung von YPK9, dem Hefeortholog von ATP13A2, an der durch ein Mangelmedium-induzierten Makrophagie nicht bestätigt werden (Stiller und Kubisch, unveröffentlicht), so dass auf weitere diesbezügliche Studien im Fibroblasten-Modell verzichtet wurde.

#### 4.1.3 Analyse der Vitalität nach Induktion von Zellstress

Neben den häufig in neurodegenerativen Erkrankungen beobachteten Proteinaggregaten und einer beeinträchtigten Proteindegradierung trägt zusätzlich zellulärer Stress zur Toxizität einer Zelle bei, die letztendlich zum Absterben der dopaminergen Neurone führt. In diesem Zusammenhang ist das Mitochondrium von zentraler Bedeutung, das einen wesentlichen Anteil an wichtigen zellulären Funktionen wie zum Beispiel Aminosäurebiosynthese, Steroidmetabolismus, Fettsäureoxidation und Apoptose einnimmt. Die wichtigste Aufgabe im Rahmen des oxidativen Energiemetabolismus liegt jedoch in der Generierung von Energie in Form von ATP. Daher ist es naheliegend, dass Störungen in der mitochondrialen Aktivität für den Organismus ein großes Problem darstellen, bei der es einerseits zum Verlust von Energie und andererseits zur Generierung von ROS kommt. Herz, Skelettmuskel und Gehirn sind die Organe mit dem höchsten Energiebedarf und sind daher von einer mitochondrialen Dysfunktion besonders stark betroffen. Der Zusammenhang zwischen Mitochondrium und PD wurde erstmals durch Studien mit MPTP deutlich, welches den Komplex I der Atmungskette inhibiert und schließlich zu Parkinson-ähnlichen Symptomen führt. Daraufhin wurde in PD-Patienten ein Funktionsdefizit von 30 bis 40 % dieses Komplexes sowie eine oxidative Schädigung der *Substantia nigra* beobachtet (Mann *et al.*, 1992). Des Weiteren ist bekannt, dass das PD-relevante  $\alpha$ -Synuclein als Hauptbestandteil der Lewy-Körper (LB) mit der Cytochrom C Oxidase, welche ein wesentlicher Bestandteil des Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette ist, direkt interagiert (Elkon *et al.*, 2002). Umgekehrt führt *in vitro* die Inhibition der Atmungskette zu einer Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein in LB (Lee *et al.*, 2002).

Wenn auch die genaue Bedeutung von Parkin hinsichtlich der Mitochondrienfunktion bis dato unbekannt ist, wurde im ventralen Mittelhirn von entsprechenden *Knock-Out* Mäusen ein verändertes Vorkommen von Proteinen festgestellt, die für die mitochondriale Aktivität und der Bewältigung von oxidativen Stress von großer Bedeutung sind (Palacino *et al.*, 2004). Zusätzlich zeigten *Drosophila Parkin*-Null-Mutanten eine mitochondriale Pathologie, die vor allem in der Flugmuskulatur vorlag (Greene *et al.*, 2003). Des Weiteren hatte die Überexpression von DJ-1 gegenüber mitochondrialen Schädigungen einen protektiven Effekt, während *Knock-Down* Modelle eine erhöhte Sensitivität für oxidativen Stress zeigten (Canet-Aviles *et al.*, 2004; Yokota *et al.*, 2003). Schließlich schützt die mitochondriale Kinase PINK1 vor oxidativem Stress, indem es beispielsweise das Mitochondrien-Chaperon TRAP1

phosphoryliert (Pridgeon *et al.*, 2007). Neben dem Mitochondrium können auch andere Organellen von zellulärem Stress betroffen sein. Dazu zählt das endoplasmatische Reticulum (ER), dessen zentrale Aufgabe die Proteinfaltung und Qualitätskontrolle ist. Falsch gefaltete Substrate werden von dort aus dem Ubiquitin-Proteasom System zum Abbau zugeführt. Somit können Mutationen oder äußere Faktoren, die die Faltung eines Proteins beeinträchtigen, zu ER-Stress führen. An dieser Stelle wird wiederum die Bedeutung von Parkin deutlich, da es als E3-Ubiquitinligase die Proteine markiert, die proteasomal abgebaut werden sollen. Es ist bekannt, dass Mutationen in *Parkin* zu ER-Stress-induziertem Zelltod führen bzw. eine Überexpression von *Parkin* protektiv wirkt (Imai *et al.*, 2000). Ein Beispiel dafür ist der Pael-Rezeptor (*Parkin-associated endothelin receptor-like*), der als Parkin-Substrat identifiziert wurde (Takahashi *et al.*, 2003). Schließlich spielen hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen häufig Proteinaggregate eine große Rolle. Im Zusammenhang mit PD handelt es sich um die Lewy-Körper, die immunopositiv für  $\alpha$ -Synuclein sind und nicht degradiert werden können. Allerdings bleibt es bislang ungeklärt, ob die Proteinaggregate toxisch sind oder ob es sich hierbei um einen Schutzmechanismus der Zelle handelt, bei dem falsch gefaltete Proteine, die nicht degradiert werden können, praktisch endgelagert werden.

Anhand des MTT-Versuchs wurde die Lebensfähigkeit der Fibroblasten nach Induktion von Zellstress untersucht und miteinander verglichen. Die Auswertung ergab für beide verwendeten Substanzen, dass die Inkubation für 24 und 48 Stunden zu einer deutlichen Reduzierung der Fibroblastenanzahl führte. Nach Berücksichtigung der unterschiedlichen Wachstumsraten wurde festgestellt, dass die Zellen des KRS-Patienten sensibler auf Zellstress reagierten als die Kontrollfibroblasten. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Unabhängig von der applizierten Substanz gab es etwa doppelt so viel Kontroll- wie Patientenzellen.

Zwar handelt es sich bei MG132 und Tunicamycin um Substanzen, die zu allgemeinem Zellstress führen. Dennoch gelang es anhand dieses Versuches, einen ersten Hinweis auf eine unterschiedliche Sensitivität der beiden Zelllinien zu beobachten. Auf diesen Erkenntnissen basierend könnten Versuche entwickelt werden, die dies konkreter untersuchen. Zum einen sollten weitere Reagenzien appliziert werden, von denen einige im Hinblick auf PD eine spezifischere Art von Zellstress verursachen. Dazu eignet sich beispielsweise  $H_2O_2$ , das oxidativen Stress auslöst. Des Weiteren wurde in diesem Ansatz lediglich der Endpunkt einer Kaskade dokumentiert, der schließlich zum Zelltod führte. Daher sind weitere Analysen nötig, die zum einen zeigen sollen, welche Mechanismen in Gang gesetzt wurden und zum anderen auf welcher Ebene und an welchem Punkt der Bewältigung von Zellstress die ATP13A2-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten einen Nachteil entwickeln, der schließlich zu einer höheren Sensitivität führt.

#### 4.2. Expressionsanalyse von *ATP13A2*

Beim KRS handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, bei der neben motorischen Beeinträchtigungen auch weitere neuronale Defizite beobachtet werden. Daher wurde die Expression von *ATP13A2* in unterschiedlichen Geweben untersucht. Mittels Northern-Blot Analyse wurde gezeigt, dass *ATP13A2* zwar ubiquitär exprimiert wird, es fanden sich jedoch besonders große Transkriptmengen im Gehirn. Selbiges gilt auch für das murine Ortholog *Atp13a2* (Schultheis *et al.*, 2004). Dabei ist die Expression nicht auf ein oder wenige Gehirnareale begrenzt, sondern gilt für alle untersuchten Bereiche. So fanden sich beim Dot-Blot in allen 21 untersuchten Gewebeproben des zentralen Nervensystems starke Expressionssignale. Und auch im fötalen Gehirn wird *ATP13A2* bereits exprimiert. In einem alternativen Verfahren, der *in situ* Hybridisierung, wurde die breite neuronale Expression bestätigt (Ramirez *et al.*, 2006). Dies gilt auch für die PD-relevanten Areale Cortex, Thalamus und *Substantia nigra*. In dieser Arbeit konnte zusätzlich mittels RT-PCR die Expression von *Atp13a2* in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* sowie dem VTA (*ventral tegmental area*) gezeigt werden. Anhand einer quantitativen *Real-Time* PCR wurden für das ventrale Mittelhirn, in der unter anderem die *Substantia nigra* liegt, die höchsten *ATP13A2*-mRNA-Mengen ermittelt. Die gemessenen Werte sind dabei in etwa fünfmal so hoch sind wie die in den ebenfalls untersuchten Arealen Globus pallidus, Putamen, Hippocampus, Motorcortex, primärer visueller Cortex und temporaler Cortex medialis. Die niedrigsten Werte wurden für das Kleinhirn ermittelt. Zusätzlich wurde die relative *ATP13A2*-Expression *post mortem* in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* bei Patienten mit idiopathischem Parkinsonismus untersucht und mit der von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Die Analyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR ergab eine bis zu zehnfach höhere *ATP13A2*-mRNA-Transkriptmenge bei PD-Patienten.

Diese Expressionsstudien belegen sowohl eine ubiquitäre als auch eine dominierend neuronale Expression von *ATP13A2*. Somit erscheint es plausibel, dass Genmutationen, die vermutlich mit einem Funktionsverlust der ATPase einhergehen, zum neurodegenerativen KRS führen können. Aus der fötalen Expression lässt sich ableiten, dass *ATP13A2* bereits in frühen Entwicklungsstadien funktionell aktiv ist, ohne dabei eine primär entwicklungsbiologische Funktion zu haben. Da die Patienten erst nach etwa 12 bis 15 Jahren die ersten Symptome zeigen, könnte daraus abgeleitet werden, dass der Organismus die zelluläre Störung zunächst kompensieren kann. Das gelingt zumindest so lange, bis eine gewisse Toleranzgrenze erreicht bzw. überschritten wird und schließlich die ersten Anzeichen der Erkrankung sichtbar werden.

#### 4.3. Analyse von ATP13A2 und weiteren Gen-Varianten anhand transienter Überexpression in Säugerzellen

Nach der Identifizierung von insgesamt drei Mutationen in *ATP13A2* als genetische Ursache des Kufor-Rakeb Syndroms wurden in den letzten Jahren weitere Mutationen bzw. Genveränderungen unklarer Pathogenität beschrieben. Diese fanden sich bei Patienten, die entweder eine PD-typische oder eine KRS-typische Symptomatik zeigten. Da es neben zentralen Übereinstimmungen auch charakteristische Unterschiede zwischen diesen Erkrankungen gibt, stellt sich nun die Frage, welchen Effekt jede einzelne Genveränderung hinsichtlich der Neurodegeneration ausübt. In den jeweiligen Versuchen wurden diese als Mutanten bzw. Mutation bezeichnet, da sie die ATPase auf DNA- und Proteinebene verändern. Allerdings ist ihre Relevanz für die Pathogenese von PD bzw. KRS unklar.

Da sowohl Substrat als auch Funktion dieser lysosomalen ATPase unbekannt waren, war es nicht möglich, die jeweilige Pathogenität direkt anhand eines funktionellen Versuchs zu bestimmen. Daher wurde anhand einiger Experimente auf Proteinebene zunächst nach Gemeinsamkeiten bzw. Unterschieden dieser Mutanten gesucht. Insgesamt wurden 15 Genveränderungen analysiert. Bei elf von ihnen lag ein Aminosäureaustausch vor (P1-P8; K4-K6), zweimal war ein Nukleotid deletiert (K3 und K7), einmal konnte eine Insertion von 22 bp beobachtet werden (K2) und die letzte führte zu einer Deletion von Exon 13 (K1). Es ist anzunehmen, dass die drei Mutationsformen *Exon-Skipping*, Insertion und Deletion, die allesamt bei KRS-Patienten identifiziert wurden, zu einer Trunkierung des Proteins aufgrund eines präterminalen Stops der Translation führen. Somit haben sie im Hinblick auf die Proteinstruktur und wahrscheinlich auch auf die Funktion den größten pathogenen Charakter. Die übrigen elf Mutationen dürften eine geringere Wirkung auf die Struktur haben, da hier lediglich eine Aminosäure ausgetauscht ist und das Protein nicht trunkiert wird. Allerdings liegt die Mutation in drei Fällen innerhalb einer Transmembrandomäne (K3, K4 und P7), und könnte daher im Vergleich zu den übrigen eine etwas stärkere Wirkung haben. Daher ist besonders der Vergleich der Mutanten P1-P6 und P8 mit K4-K6 interessant, da hier im Prinzip die gleiche Art von Mutation vorliegt, die allerdings einerseits zur PD und andererseits zum KRS führen soll.

Um eventuell erste Rückschlüsse auf die Funktion der P-Typ ATPase zu gewinnen, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation des Wildtypoteins mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Dabei wurde eine Co-Lokalisierung mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP2 beobachtet, die durch eine alternative Färbung bestätigt wurden (Ramirez *et al.*, 2006). Für die ATPasen ATP13A1 und ATP13A3, die zur gleichen Proteinfamilie wie ATP13A2 gehören, ergaben Studien eine Co-Lokalisierung mit dem endoplasmatischen Reticulum (ER) bzw. dem Golgi-Apparat (Stiller und Kubisch, unveröffentlicht; Heimbach und Kubisch, unveröffentlicht). Es kann daher spekuliert werden, dass diese Proteine, die

allesamt ubiquitär exprimiert werden, innerhalb der Zelle auf unterschiedliche Zellorganellen spezialisiert sind und dort spezifische Funktionen übernehmen.

Die subzelluläre Lokalisation der acht *ATP13A2*-Mutanten, die ausschließlich bei PD-Patienten identifiziert wurden (P1 bis P8), ergab für alle eine lysosomale Co-Lokalisierung mit LAMP2. Die hier untersuchten PD-Mutanten haben gemeinsam, dass es sich bei der jeweiligen Mutation um einen Aminosäureaustausch handelt. Somit weisen diese Ergebnisse und zusätzlich durchgeführte *in silico* Analysen nicht auf eine wesentliche strukturelle Veränderung des jeweiligen Proteins hin. Zwar wurden Veränderungen der Proteinstruktur anhand dieser Untersuchungen nicht nachgewiesen, jedoch konnten sie auch nicht ausgeschlossen werden. Dem gegenüber gelangen die KRS-Mutanten nicht zu ihrem Zielorganell, sondern verbleiben im ER, was durch eine Co-Lokalisierung mit dem ER-Marker Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) sichtbar wird. Dabei sind die Mutationen K1 bis K3 besonders interessant, da hier im Prinzip die gleiche Art von Mutation wie bei den PD-Mutanten vorliegt (d.h. eine *Missense*-Mutation). Allerdings scheinen in diesem Fall die strukturellen Veränderungen gravierender zu sein, da sie zu einer Fehllokalisierung der jeweiligen Proteine führen. Zum einen dient das ER der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, der Organellen-Biogenese sowie der Bereitstellung von Lipiden für andere Kompartimente (Papp *et al.*, 2003; Geuze *et al.*, 2003; van Meer und Sprong, 2004). Zum anderen stellt dieses Organell ein Kontrollsystem dar, das Prozesse wie die Proteinfaltung und Degradierung überwacht (Anfinsen, 1973; Ellgaard und Helenius, 2001; Sitia und Braakman, 2003). Etwa ein Drittel aller Proteine werden ins ER transloziert, um dort ihre funktionelle Konformation unter Ausbildung von Disulfidbrücken zu erreichen, was durch die transiente Interaktion mit Chaperonen wie zum Beispiel Calnexin, Calreticulin und BiP (*binding protein*) unterstützt wird (Matlack *et al.*, 1998; Walter und Johnson, 1994). Da nicht alle Moleküle ihre native Form erreichen, muss verhindert werden, dass diese die ER-Aktivität behindern. Dazu dient das Kontrollsystem ERAD (ER assoziierte Degradierung), das falsch gefaltete und inaktive Proteine erkennt und diese aus dem ER ins Cytosol zurückführt (Tsai *et al.*, 2002), wo sie durch das 26S Proteasom abgebaut werden. Dieses Konstrukt setzt sich aus dem proteolytischen 20S Kernsegment und einem 19S regulatorischen Komplex zusammen (Voges *et al.*, 1999). Allgemeines Kennzeichen eines Abbausubstrates ist ein kovalent gebundenes Ubiquitinmolekül über welches im Anschluss weitere Ubiquitinmoleküle angehängt werden (Hershko und Ciechanover, 1998). Aus der Fehllokalisierung der KRS-Mutanten lässt sich ableiten, dass sie aufgrund der Mutations-bedingten strukturellen Veränderungen nicht ihre native Konformation erreichen und stattdessen vermutlich anschließend proteasomal abgebaut. Eine Möglichkeit diese These zu untersuchen, ist die Proteinsynthese zu inhibieren, damit keine weiteren Substrate ins ER gelangen. Danach werden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten für die subzelluläre Lokalisation vorbereitet. Basierend auf der ERAD-bedingten Retrotranslokation des Proteins ins Cytosol

wird das Signal des Zielproteins im ER schwächer werden. Zur Verhinderung eines sofortigen Abbaus und zur Darstellung einer cytosolischen Lokalisation kann zusätzlich das Proteasom gehemmt werden.

Die anschließende Analyse der Proteinstabilität ergab zwei Dinge. Zum einen ist die Stabilität der acht PD-Mutanten in diesem *in vitro* Versuch im Vergleich zur Wildtypform nicht signifikant beeinträchtigt (vergleiche Abb. 3.16) und deckt sich somit mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzanalyse, bei der die „mutierten“ Proteine trotz des jeweiligen Basenaustausches die komplexen Prozesse der Qualitätskontrolle im ER durchlaufen und letztendlich ihr Zielorganell, das Lysosom, erreichen. Ein entscheidendes Kriterium stellt dabei sehr wahrscheinlich die Proteinstabilität dar. Zum zweiten zeigten die untersuchten KRS-Mutanten bei den durchgeführten Western-Blot Analysen ein im Vergleich zum ATP13A2-Wildtyp schwächeres Proteinsignal auf (vergleiche Abb. 3.15). Die dabei beobachteten unterschiedlichen Signalstärken reichen von einer relativ geringen Abschwächung der Mutanten K1, K2, K4, K5 und K6 bis hin zu einer signifikanten reduzierten Proteinstabilität der mutierten Proteine K3 und K7. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte darin bestehen, dass die Art der drei mutierten Proteine K4 bis K6 in Form eines Aminosäureaustausches lediglich einen geringen Einfluss auf die jeweilige Proteinstabilität ausübt. Vermutlich liegen hierbei keine größeren beeinträchtigenden, strukturellen Konformationsveränderungen des Proteins vor, die zu einem proteasomalen Abbau führen. Wenn auch die beiden Mutationen K1 und K2 jeweils in einer Trunkierung des Proteins um etwa 10 kDa bzw. 50 kDa resultieren, liegt in diesen Fällen eine moderat verminderte Expressionsstärke, aber dennoch ein stabil exprimiertes Protein vor. Dies lässt vermuten, dass sie möglicherweise strukturellen Konformationsveränderungen unterliegen und dadurch im ER zurückbleiben, aber nicht vollständig abgebaut werden. Ihr Funktionsverlust beruht vermutlich vielmehr auf der Fehllokalisierung als auf der Proteininstabilität allein. Die größte Instabilität zeigen die beiden Mutanten, die auf einer Deletion eines Cytosins beruhen (K3 und K7). In beiden Fällen führt dies zu einer Leserasterverschiebung und zu einem frühzeitigen Stop-Codon. Da sie allerdings vergleichsweise spät in der Sequenz von *ATP13A2* auftreten, kommt es zu einer Reduzierung des Molekulargewichtes um ca. 10 bis 15 kDa. Dennoch ist diese Art der Mutation so nachhaltig, dass das Protein kaum detektierbar ist. Ein Erklärungsansatz könnte im daraus resultierenden Verlust der letzten drei bzw. vier Transmembrandomänen liegen. Allerdings fehlen diese auch bei der Mutante K2, die allerdings deutlich stabiler ist. Somit müssen noch andere Faktoren existieren, die die Proteinstabilität zusätzlich negativ beeinflussen. Theoretisch denkbar wäre, dass die Leserasterverschiebung und die sich daraus ergebende veränderte Proteinsequenz ein Motiv generiert, welches ein Degradierungssignal darstellt, von denen einige bekannt sind. So handelt es sich beim KFERQ um ein Erkennungssignal für eine Degradierung via Chaperon vermittelte

Autophagie (Dice, 1988; Olson *et al.*, 1991). Ein zweites Beispiel ist die PEST-Sequenz, die häufig C-terminal liegt (Rechsteiner und Rogers, 1996). Sie kennzeichnet ebenfalls ein Substrat für eine schnelle Degradierung, die entweder über das Proteasom erfolgt oder von Calpain vermittelt wird (Rogers und Rechsteiner, 1986; Shumway *et al.*, 1999; Reverte *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2004). Die These des neu entstandenen Degradierungssignals scheidet allerdings aus dem Grunde aus, weil das frühzeitige Stop-Codon nur wenige Aminosäuren nach der Deletion die Translation des Proteins terminiert. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass die Mutanten K3 und K7 vom *nonsense mediated RNA decay* detektiert werden und somit die Synthese von trunkierten Proteinen reduziert wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Wildtypprotein und die acht PD-Mutanten glykosyliert sind, was beim Western-Blot Verfahren zu einer Detektion einer Doppelbande führte. Hierbei handelt es sich um eine der häufigsten posttranslationalen Prozessierungen, die vor allem bei Plasmamembran- und sekretorischen Proteinen vorkommt. Sie erfolgt im ER sowie im Golgi-Apparat und dient im Allgemeinen der finalen Faltung, Stabilität und Funktion von Proteinen. Diese Modifikation fehlt bei allen sieben KRS-Mutanten, wodurch das Western-Blot Signal im Vergleich zu ATP13A2 schwächer schien (vergleiche Abb. 3.15). Zwar bleibt die konkrete Bedeutung dieser Modifikation für ATP13A2 weiter ungeklärt, aber es dürfte für die Aktivität der ATPase prinzipiell eine essentielle Voraussetzung darstellen. Zumal der enge Zusammenhang zwischen einer gestörten Glykosylierung und einigen Erkrankungen seit längerem bekannt ist (Freeze, 2006). Ein Defizit in der Glykosylierung wurde bereits im Hefemodell beschrieben und konnte auf eine Mutation in *SPF1*, dem Hefeortholog von *ATP13A1*, zurückgeführt werden (Suzuki und Shimma, 1999). Während die N-Glykosylierung von luminalen lysosomalen Proteinen als Erkennungssignal für den Mannose-6-Phosphat gerichteten Transport von Enzymen ins Lysosom dient (Bagshaw *et al.*, 2005), ist die der lysosomalen Membranproteine unklar, da diese anhand verschiedener Sortierungssignale zum Zielorganell gelangen (Bonifacino und Traub, 2003). Es ist bekannt, dass LAMP-Proteine hochglykosyliert sind (Carlsson *et al.*, 1988) und dass diese Zuckerreste auf der luminalen Lysosomenseite eine Glykokalyx bilden, um dort die hydrolytisch empfindlichen Peptidbindungen der Membranproteine vor dem proteolytischen Abbau zu schützen (Hyunh *et al.*, 2007). So wurde für LIMP1 bis LIMP3 (*lysosomal integral membrane protein*) gezeigt, dass eine Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin zu einer deutlichen Verkürzung der Halbwertszeit dieser lysosomalen Membranproteine führt (Barriocanal *et al.*, 1986). Daher ist es wahrscheinlich, dass sich dies ebenfalls auf die ATPase ATP13A2 übertragen lässt.

Anhand einer selektiven Proteasominhibition konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sowohl ATP13A2 als auch sämtliche PD- bzw. KRS-Mutanten proteasomal degradiert werden. Allerdings scheint dies auf einem Ubiquitin-unabhängig Weg zu erfolgen. Diese seltene Form des Abbaus ist nur für wenige Proteine wie beispielsweise die Ornithin-Carboxylase (ODC)

und p21<sup>Cip1</sup> bekannt (Murakami *et al.*, 1992; Sheaff *et al.*, 2000). Ihre genaue Bedeutung ist aktuell unbekannt. Eine Theorie geht von einer standardmäßigen Degradierung einiger weniger Proteinen durch das 20S Proteasom aus. So wurde herausgefunden, dass der Tumorsuppressor p53 neben der Ubiquitin-abhängigen 26S Proteasom-Degradierung, auch unabhängig von einer Ubiquitin-Ligase und Ubiquitin durch das 20S Proteasom abgebaut wird (Asher *et al.*, 2002; Asher *et al.*, 2005). Studien mit ODC, das nur als Homodimer aktiv und stabil ist, ergaben für das Monomer eine Degradierung sowohl durch das 26S als auch durch das 20S Proteasom (Coffino, 2001; Asher *et al.*, 2005), allerdings sind die Dimere gegen das 20S Proteasom resistent. Während das ubiquitäre Protein NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase-1 (NQO1) als „Torwächter“ des 20S Proteasoms fungiert, liegt solch eine Assoziation mit dem 26S Proteasom nicht vor. Weiter ist bekannt, dass NQO1 p53, p73 $\alpha$  bzw. ODC bindet und sie vor dem Abbau schützt (Asher *et al.*, 2005; Asher *et al.*, 2005). Beim p21<sup>Cip1</sup> handelt es sich um ein in seiner Form unstrukturiertes Protein, das fast ausschließlich in einem Komplex vorliegt und durch das 20S Proteasom abgebaut wird (Touitou *et al.*, 2001). Dabei wurde eine negative Beziehung zwischen p21<sup>Cip1</sup>-Beteiligung am Komplexaufbau und proteasomaler Degradierung festgestellt. Allerdings wurde auch ein Ubiquitin-abhängiger Abbau beschrieben, der im Besonderen durch UV-Licht induziert wurde (Bloom *et al.*, 2003; Bendjennat *et al.*, 2003). Aus diesen Indizien ergibt sich ein Modell, bei dem bestimmte Substrate, die aus unterschiedlichen Gründen instabil sind, frühzeitig und standardmäßig auf eine Ubiquitin-unabhängige Weise vom 20S Proteasom erkannt und degradiert werden. Erst eine strukturelle Veränderung, wie zum Beispiel eine Dimerisierung (siehe ODC) bzw. Komplexierung, oder das Binden eines Stabilisators (siehe NQO1) bzw. Interaktionspartners führt zu einer Stabilisierung des Proteins, was zu einer weiteren Reifung führt. Sollte es im weiteren Verlauf der Prozessierung Probleme geben, würde das Protein über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden. Diese These lässt sich auch auf die Parkinsonsche Erkrankung übertragen. So ist bekannt, dass Mutationen in SNCA ( $\alpha$ -Synuclein) zur PD führen können. Außerdem ist diese Erkrankung durch das Vorliegen von Proteinaggregaten (Lewy-Körpern) gekennzeichnet, die große Mengen von  $\alpha$ -Synuclein enthalten. Hierbei handelt es sich um ein Protein, dessen Funktion unbekannt ist und das in seiner monomeren Form ebenfalls keine definierte Struktur hat. Allerdings konnte gezeigt werden, dass es Ubiquitin-unabhängig vom 20S Proteasom degradiert wird (Tofaris *et al.*, 2001). Demgegenüber sind die multimeren Strukturen sehr viel stabiler und können nicht abgebaut werden. Daher hat es den Anschein, als würde das 20S Proteasom die Mengen an monomeren  $\alpha$ -Synuclein niedrig halten und somit eine mögliche Oligomerisierung verhindern. Allerdings bleibt die Frage, ob dieses Modell auch auf die ATPase ATP13A2 übertragbar ist, unbeantwortet. Derzeit gibt es keine Anzeichen für eine Dimerisierung des Proteins bzw. eine Interaktion mit anderen Proteinen, die einen stabilisierenden Effekt haben könnten.

Zusammenfassend fällt auf, dass die Mutationen, die bei PD-Patienten gefunden wurden, auf Proteinebene unauffällig sind. Sie sind zumindest *in vitro* genauso stabil wie das ATP13A2-Wildtypprotein und sind zudem in der Lysosomenmembran integriert. Demgegenüber führen die Mutationen, die bei KRS-Patienten auftraten, zu einer gestörten N-Glykosylierung und subzellulären Fehllokalisation. Es scheint, als würden diese mutierten Proteine im ER zurückgehalten werden, da sie höchstwahrscheinlich die dortige Qualitätskontrolle nicht bestehen. Somit ist letztendlich nur bei diesen KRS-Mutanten ein deutlicher Unterschied im Vergleich zum Wildtypprotein erkennbar und somit kann diesen anhand der erzielten Ergebnisse ein pathogener Effekt zugeschrieben werden, der schließlich zum KRS führt. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den PD-Mutanten vermutlich eher um Genvarianten, die keinen bislang nachweisbaren Einfluss auf die PD-Pathogenese haben. Schließlich wurden sie erst nach der Identifizierung von *ATP13A2* als KRS-relevantes Gen nachträglich bei Personen identifiziert, die an PD litten. Um diese Theorie weiter zu bestätigen, müsste das *ATP13A2*-Gen auch bei einer Vielzahl von gesunden Kontrollpersonen analysiert und das Vorkommen von natürlichen Varianten mit einer neutralen Wirkung untersucht werden.

Wenn auch derzeit lediglich geringe Erkenntnisse über die genaue Funktion von ATP13A2 innerhalb der Zelle existieren, liegen diesbezüglich in der aktuellen Forschung interessante Hinweise vor. Einerseits konnte am Hefemodell gezeigt werden, dass Mutationen im vakuolären YPK9, dem Hefeortholog der humanen ATPase ATP13A2, zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Schwermetallionen wie Cadmium, Mangan, Nickel und Selen führt (Schmidt *et al.*, 2009). Denkbar wäre also eine Funktion, die der Detoxifizierung des Organismus dient. Dies würde auch erklären, warum erst nach einigen Jahren die ersten Symptome auftreten und es letztendlich zur Neurodegeneration kommt. Andererseits ist auch ein anderes Modell denkbar. Während die P-Typ ATPasen Typ I bis III allesamt Ionen als Substrat haben, transportieren die Typ IV ATPasen, mit denen die Typ V ATPasen am nächsten verwandt sind, Phospholipide. Daher ist es möglich, dass auch sie keine Transporter von Schwer- bzw. Lichtmetallen sind. Dies deckt sich mit einer aktuellen Studie, bei der für eine Typ VB ATPase des Fadenwurms Polyamine als Transportsubstrat beschrieben und eine Beteiligung an der RNA-Interferenz gezeigt wurde (Heinick *et al.*, 2009). Somit könnte auch die humane ATPase ATP13A2 an Prozessen wie Transkription und Translation beteiligt sein und im Falle von vorliegenden Mutationen die Expression bestimmter Gene beeinträchtigen, die schließlich zum Entstehen des neurodegenerativen KRS führen.

Da diese Erklärungsansätze noch nicht für den Menschen untersucht wurden, ist es aktuell noch immer schwierig zu erklären, warum Mutationen in diesem Gen letztendlich zum neurodegenerativen Kufor-Rakeb Syndrom führen. Basierend auf Ergebnissen in dieser Arbeit gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze.

Da es sich bei der P-Typ ATPase ATP13A2 um ein lysosomales Membranprotein handelt, ist es einerseits denkbar, dass Genmutationen die Aktivität des Lysosoms als Degradierungsmaschinerie oder als Organell der Detoxifizierung negativ beeinträchtigen. Andererseits könnte die Ursache des KRS nicht primär in einer Lysosomenstörung liegen, sondern vielmehr in einer Überlastung des zweiten Abbauweges, des Ubiquitin-Proteasom-Systems, indem ATP13A2-Mutanten nicht ihre native Konformation erreichen und folglich das ER, als das zentrale Organell verantwortlich für Faltung, Kontrolle und Degradierung von Proteinen, blockieren. Unabhängig davon bleibt es unklar, inwieweit pathogene Genveränderungen zum Entstehen des neurodegenerativen Kufor-Rakeb Syndroms beitragen, das auf histologischer und zellulärer Ebene unzureichend untersucht wurde.

#### **4.4 *Atp13a2-Knock-Out* Maus**

Eine detaillierte *in vivo* Analyse des *ATP13A2*-Gendefekts an humanem Gehirnmateriale ist aus ethischen und praktischen Gründen nicht möglich. Daher sollte die Bedeutung dieser lysosomalen ATPase hinsichtlich ihrer Funktion und ihrer Bedeutung für die Pathogenese des Kufor-Rakeb Syndroms (KRS) am Mausmodell untersucht werden. Das Ziel war der konstitutive *Atp13a2-Knock-Out* in allen Geweben. Allerdings konnten trotz der wiederholten Injektion mehrerer positiv-transfizierter ES-Klone in keinem der insgesamt 840 untersuchten Mäuse das rekombinante Allel im heterozygoten Zustand identifiziert werden.

Das Ausbleiben der Keimbahntransmission basiert wahrscheinlich auf technischen Gründen. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür könnte beispielsweise eine nicht ausreichende Qualität der ES-Zellen selbst sein, was zur verfrühten Differenzierung und somit letztendlich zum Verlust des pluripotenten Charakters führt. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass keiner der insgesamt sieben verschiedenen positiv-transfizierten, in Blastozysten injizierten ES-Klone zu einer Keimbahntransmission führte.

Eine generelle Problematik bei Projekten, in denen eine humane Erkrankung am Tiermodell Maus untersucht werden soll, ist ihre Übertragbarkeit. Es gibt Fälle, in denen der generierte Gendefekt einen unerwarteten Nebeneffekt entwickelt. Ein Beispiel dafür ist Connexin 26, das in der Maus konstitutiv deletiert werden sollte (Gabriel *et al.*, 1998). Genmutationen führen beim Menschen zu einer nicht-syndromischen Taubheit (Kelsell *et al.*, 1997). Allerdings wurde für den homozygoten *Knock-Out* ein embryonal-letal Effekt beobachtet, der letztendlich auf einem zwischen Mensch und Maus unterschiedlichen Plazentaaufbau, an dem Connexin 26 beteiligt ist, zurückzuführen ist. Allerdings ist die Situation in diesem Projekt grundsätzlich eine andere. Da hierbei keine heterozygoten Mäuse identifiziert wurden, müsste man demnach davon ausgehen, dass bereits das Vorliegen einer fehlerhaften *Atp13a2*-Genkopie einen embryonal-letal Effekt hat. Jedoch führt dieser Gendefekt beim Menschen erst im homozygoten Zustand zum KRS.

Heterozygote Anlagenträger zeigen hierbei keine Beeinträchtigungen und gelten als gesund. Solche Beispiele, in denen die Vererbung eines Gens in Mensch und Maus auf unterschiedlichen Erbgängen beruhen, sind in der Literatur nicht beschrieben. Unabhängig davon gibt es für die PD-Gene *Parkin*, *PINK1* und *DJ-1*, die wie *ATP13A2* auf einem autosomal-rezessiven Erbgang beruhen, bereits Mausmodelle. Während in *Parkin* jeweils das Exon 2, Exon 3 bzw. Exon 7 (Perez und Palmiter, 2005; Itier *et al.*, 2003; Goldberg *et al.*, 2003; Von Coelln *et al.*, 2004;) deletiert wurden, waren es in *Pink1* die Exons 4-7 (Kitada *et al.*, 2007) und in *Dj-1* Exon 1 bzw. Exon 2 (Goldberg *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). In keinem dieser Modelle wurde für heterozygote Mäuse ein embryonal-letaler Effekt festgestellt, weshalb solch eine Wirkung des heterozygoten *Atp13a2-Knock-Outs* als unwahrscheinlich einzuschätzen ist.

Wenn auch keine direkten Hinweise für eine Beeinträchtigung oder gar eine Letalität einer homozygoten *Atp13a2-Knock-Out* Maus vorliegen, könnten mögliche unerwünschten Effekte des konstitutiven Gendefekts für den Gesamtorganismus reduziert werden, indem *Atp13a2* anhand des Cre-Lox-Systems konditional ausgeschaltet wird. Dazu müssten Mäuse generiert werden, in denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Neuronenspezifischen Promotor steht. Dafür eignet sich zum einen der Dopamin-Transporter-Promotor und zum anderen der Tyrosin-Hydroxylase-Promotor, die spezifisch für die dopaminergen Neuronen im ventralen Mittelhirn (Zhuang *et al.*, 2005; Backman *et al.*, 2006; Turiault *et al.*, 2007) bzw. für alle catecholaminergen Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem sind (Lindeberg *et al.*, 2004; Gelman *et al.*, 2003). Anschließend erfolgt die Kreuzung mit einer zweiten Mauslinie, bei der *Atp13a2* durch die *loxP*-Sequenzen (*locus of crossover (x) in P1*) flankiert wird und somit bei den Nachkommen die Cre-Rekombinase gewebespezifisch exprimiert wird (Kühn *et al.*, 1995).

## 5. Zusammenfassung

Das Kufor-Rakeb Syndrom (KRS) ist eine seltene, neurodegenerative Erkrankung, bei der die Patienten neben charakteristischen Kennzeichen des Parkinsonismus zusätzliche Symptome wie eine Spastik und eine Demenz entwickeln. Es handelt sich um eine autosomal rezessive Erkrankung, deren erste Symptome bereits im Jugendalter auftreten. Die genetische Ursache des KRS sind biallelische Mutationen im *ATP13A2*-Gen auf Chromosom 1p36. *ATP13A2* kodiert für eine P-Typ Typ V ATPase mit zehn prädizierten Transmembrandomänen und einem Molekulargewicht von etwa 135 kDa, dessen Funktion und Substratspezifität allerdings bislang unbekannt sind.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung beschriebener Genvarianten in *ATP13A2* auf zellulärer Ebene zum besseren Verständnis der Pathogenese des KRS bzw. verwandter Formen des Parkinsonismus. Zur *in vivo* Analyse der motorischen und kognitiven Funktionsstörungen sollte zusätzlich eine *Knock-Out* Maus generiert werden, bei der *Atp13a2* konstitutiv deletiert ist.

Insgesamt wurden 15 verschiedene humane Mutationen *in vitro* untersucht, von denen acht bei Patienten mit typischer Parkinsonerkrankung (PD-Mutationen) und sieben bei KRS-Patienten identifiziert worden waren. Bei elf dieser Veränderungen handelte es sich um *Missense*-Veränderungen (P1-P8; K4-K6). Es gibt keinen Hinweis darauf, dass der jeweilige Aminosäureaustausch einen Effekt auf die Konformation des Proteins hat. In zwei Fällen der bei KRS-Patienten identifizierten *ATP13A2*-Veränderungen war ein Nukleotid deletiert (K3 und K7). Dies führte jeweils zu einer Verschiebung des Leserasters und resultierte in einem präterminalen Stop der Translation und einer Trunkierung des Proteins. Ebenso führte die Insertion von 22 bp in Exon 16 (K2) aufgrund der Verschiebung des Leserasters zu einem trunkierten Protein. Schließlich wurde ein Basenaustausch in einer hochkonservierten Donorspleißstelle analysiert, der zu einer *in frame* Deletion des Exon 13 führte (K1).

Die subzelluläre Lokalisation mittels Immunfluoreszenzanalyse ergab für das *ATP13A2*-Wildtypprotein und alle PD-Mutanten eine Co-Lokalisierung mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP2. Dagegen zeigten alle KRS-Mutationen eine subzelluläre Co-Lokalisierung mit dem endoplasmatischen Reticulum (ER). Da das ER maßgeblich an wichtigen Prozessen wie Faltung und Degradierung von Proteinen beteiligt ist, ist diese Fehllokalisierung sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese Mutanten von dem Organell als defizitär erkannt werden. Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutationen bzw. Mutationstypen ließen sich auch hinsichtlich der Proteinstabilität feststellen. Während die PD-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine gleichbleibende Stabilität zeigten, waren die KRS-Mutanten weniger stabil. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die KRS-Mutanten nicht posttranslational modifiziert wurden, während für *ATP13A2*-WT und die PD-Mutanten eine N-Glykosylierung festgestellt wurde. Für alle hier untersuchten Proteine konnte gezeigt

werden, dass sie durch das Proteasom degradiert werden. Allerdings scheint dies auf einem Ubiquitin-unabhängigen Weg zu erfolgen, der erst für wenige Proteine beschrieben worden ist. Es wurden demnach ausschließlich für die KRS-Mutationen Veränderungen der Proteineigenschaften bzw. Proteinlokalisierung nachgewiesen, die vermutlich eine Reduktion der ATPasen-Funktion zur Folge haben und somit höchstwahrscheinlich einen pathogenen Effekt besitzen. Bei den so genannten PD-Mutationen konnte dies nicht gezeigt werden. Daher handelt es sich bei ihnen eher um Genvarianten, die eine neutrale Wirkung auf das Protein haben und somit nicht ursächlich am Krankheitsgeschehen beteiligt sind.

Die zentrale Aufgabe des Lysosoms ist die Degradierung von Proteinen und Organellen. Da funktionelle Störungen dieses Kompartiments mehrfach mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden sind, sollte die Bedeutung von ATP13A2 für die Autophagie anhand von Fibroblasten eines KRS-Patienten untersucht werden. Es konnte jedoch keine offensichtliche Beteiligung an diesem Abbaumechanismus gezeigt werden. Des Weiteren kann ein gestörter Lipidmetabolismus zum Entstehen einer neurodegenerativen Erkrankung beitragen. Zusätzlich sind die nah verwandten P-Typ Typ IV ATPasen am Lipidtransport beteiligt. Daher wurde das Lipidprofil der KRS-Fibroblasten mit dem von Kontrollzellen verglichen. Auch hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Neben genetischen Aspekten tragen auch Umweltfaktoren, die zum Zellstress führen, zur Entstehung des Parkinsonismus bei. Diesbezüglich konnte für *ATP13A2*-defiziente Zellen im Vergleich zu Kontrollfibroblasten eine statistisch signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Formen des Zellstresses gezeigt werden, die auf einen möglichen molekularen Zusammenhang zwischen Umwelt-bedingten und genetischen Risikofaktoren hinweisen könnte.

Die *in vivo* Analyse des *Atp13a2*-Gendefekts hinsichtlich Funktion und Bedeutung für die Pathogenese des KRS war bislang nicht möglich, da die Keimbahntransmission des rekombinanten Allels in unabhängig verfolgten Strategien nicht gelang.

## 6. Abstract

Kufor-Rakeb syndrome (KRS) is a rare neurodegenerative disease. Beside characteristic features of Parkinsonism, patients additionally present symptoms like spasticity and dementia. In this autosomal recessive disease first symptoms appear at a young age. The genetic cause of KRS lies in biallelic mutations in *ATP13A2* on chromosome 1p36. *ATP13A2* codes for a P-type Type V ATPase with ten predicted transmembrane domains and a molecular weight of 135 kDa. Protein function as well as substrate specificity are still unknown.

The aim of this work was to characterise described gene variants in *ATP13A2* on a cellular level to better understand the pathogenesis of KRS and related forms of Parkinsonism. For analysing motor and cognitive disturbances *in vivo*, it was intended to additionally generate a knock-out mouse with constitutively deleted *Atp13a2*.

All in all 15 different human mutations were analysed *in vitro*. While eight of them were identified in patients suffering from typical Parkinsonism (PD mutations), the other seven were found in KRS patients. Eleven mutations were caused by a missense exchange (P1-P8; K4-K6). However, there is no hint that the relevant change of an amino acid has an impact on the conformation of the particular protein. Deletion of a single nucleotide was observed in two KRS patients (K3 and K7), resulting in a shift of the open reading frame, which in turn led to a premature stop of translation and finally to protein truncation. The same truncating effect was observed for a mutation where 22 bp were additionally inserted in exon 16 (K2). Finally, a change of a nucleotide in a highly conserved donor splice site led to an in frame deletion of exon 13 (K1).

The subcellular localisation by immunofluorescence analysis revealed for *ATP13A2* wild-type protein and all PD mutants a co-localisation with the lysosomal membrane protein LAMP2. In contrast, all KRS mutants showed co-localisation with the endoplasmic reticulum (ER), which is involved in important cellular processes like folding and degradation of proteins. Thus, it is likely that the mislocalisation of the mutants correlates with detecting them as deficient. Further differences among the mutations and types of mutation were found regarding protein stability. While PD mutants showed a similar stability as the wild type protein, the KRS mutants were less stable and no posttranslational modification was detected. Contrary to that finding, *ATP13A2* wild type and the PD mutants were N-glycosylated. All investigated proteins are degraded by the proteasome, which seems to happen in an ubiquitin-independent manner. This has so far been reported only for a few proteins. Consequently, changes in protein properties and protein localisation were only found for the KRS mutants, which probably reduce the function of the ATPase and hence exert a pathogenic effect. This could not be shown for the PD mutants. Therefore, these are rather gene variants with a neutral impact on the protein, which are not causative for developing the disease.

The central role of the lysosome is degradation of proteins and organelles. As functional disturbances of this compartment have repeatedly been associated with neurodegenerative disorders, the involvement of ATP13A2 in autophagy was analysed in fibroblasts of a KRS patient. However, no obvious participation in this degradation pathway was observed. Furthermore, a dysfunctional lipid metabolism can contribute to neurodegenerative diseases. Additionally, closely related P-type type IV ATPases are involved in lipid transport. In view of this fact, the lipid profile of KRS fibroblasts was compared to that of control cells. But, once again, no significant differences were found. Beside genetic aspects also environmental factors which result in cellular stress contribute to developing Parkinsonism. It could be shown that ATP13A2-deficient cells show a higher sensitivity towards different forms of cell stress compared to control fibroblasts. This may point to a molecular connection between environmental and genetic risk factors.

The *in vivo* analysis of the *Atp13a2* gene defect regarding function and relevance for KRS pathogenesis has not been possible so far, because germline transmission of the recombinant allele has not been successful by independent strategies.

## 7. Literaturverzeichnis

- Altendorf K, Gassel M, Puppe W, Mollenkamp T, Zeeck A, Boddien C, Fendler K, Bamberg E, Droese S (1998) Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*. *Acta Physiol Scand Suppl* 643: 137-46
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-4
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-30
- Asher G, Bercovich Z, Tsvetkov P, Shaul Y, Kahana C (2005) 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. *Mol Cell* 17: 645-55
- Asher G, Lotem J, Sachs L, Kahana C, Shaul Y (2002) Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13125-30
- Asher G, Tsvetkov P, Kahana C, Shaul Y (2005) A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev* 19: 316-21
- Auland ME, Roufogalis BD, Devaux PF, Zachowski A (1994) Reconstitution of ATP-dependent aminophospholipid translocation in proteoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10938-42
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944. *J experim Med* 79: 137-158
- Axelsen KB, Palmgren MG (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46: 84-101
- Backman CM, Malik N, Zhang Y, Shan L, Grinberg A, Hoffer BJ, Westphal H, Tomac AC (2006) Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *Genesis* 44: 383-90
- Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW (2005) Lysosomal membrane proteomics and biogenesis of lysosomes. *Mol Neurobiol* 32: 27-41
- Barriocanal JG, Bonifacino JS, Yuan L, Sandoval IV (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J Biol Chem* 261: 16755-63
- Bendjennat M, Boulaire J, Jascur T, Brickner H, Barbier V, Sarasin A, Fotedar A, Fotedar R (2003) UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell* 114: 599-610
- 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* 3: 1301-6

- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603-14
- Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M (2003) Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* 115: 71-82
- Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72: 395-447
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P (2003) DJ-1( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 24: 159-60
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309: 255-6
- Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, Klomp LW, Lomri N, Berger R, Scharschmidt BF, Knisely AS, Houwen RH, Freimer NB (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 18: 219-24
- Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW (1993) The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 5: 327-37
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9103-8
- Carlsson SR, Roth J, Piller F, Fukuda M (1988) Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *J Biol Chem* 263: 18911-9
- Chelly J, Tumer Z, Tonnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, Monaco AP (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat Genet* 3: 14-9
- Coffino P (2001) Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 188-94
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280: 337-45
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305: 1292-5
- Daleke DL (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 44: 233-42
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909

- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, Ballabio A, Aridon P, Casari G (2003) Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 33: 192-6
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52: 381-9
- Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD (1994) Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* 9: 92-7
- Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G, Fabbrini G, Marconi R, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, Squitieri F, Horstink MW, Montagna P, Libera AD, Stocchi F, Goldwurm S, Ferreira JJ, Mecocci G, Martignoni E, Lopiano L, Jardim LB, Oostra BA, Barbosa ER, Bonifati V (2007) ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 68: 1557-62
- Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LO, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJ, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V (2009) FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 72: 240-5
- Dice JF (1988) Microinjected ribonuclease A as a probe for lysosomal pathways of intracellular protein degradation. *J Protein Chem* 7: 115-27
- Dice JF (2007) Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3: 295-9
- Djarmati A, Hagenah J, Reetz K, Winkler S, Behrens MI, Pawlack H, Lohmann K, Ramirez A, Tadic V, Bruggemann N, Berg D, Siebner HR, Lang AE, Pramstaller PP, Binkowski F, Kostic VS, Volkmann J, Gasser T, Klein C (2009) ATP13A2 variants in early-onset Parkinson's disease patients and controls. *Mov Disord*
- Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R (2002) Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol* 20: 455-9
- Elkon H, Don J, Melamed E, Ziv I, Shirvan A, Offen D (2002) Mutant and wild-type alpha-synuclein interact with mitochondrial cytochrome C oxidase. *J Mol Neurosci* 18: 229-38
- Ellgaard L, Helenius A (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13: 431-7
- Eraso P, Gancedo C (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett* 224: 187-92
- Evans JJ, Bozdech MJ (1981) Hypokalemia in nonblastic chronic myelogenous leukemia. *Arch Intern Med* 141: 786-7
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6
- Fahn S (1996) Is levodopa toxic? *Neurology* 47: S184-95

- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7413-7
- Folger KR, Wong EA, Wahl G, Capecchi MR (1982) Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol* 2: 1372-87
- Freeze HH (2006) Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet* 7: 537-51
- Gabriel HD, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol* 140: 1453-61
- Gasser T (2001) Genetics of Parkinson's disease. *J Neurol* 248: 833-40
- Gelman DM, Noain D, Avale ME, Otero V, Low MJ, Rubinstein M (2003) Transgenic mice engineered to target Cre/loxP-mediated DNA recombination into catecholaminergic neurons. *Genesis* 36: 196-202
- Gerencser GA (1996) The chloride pump: a Cl<sup>-</sup>-translocating P-type ATPase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31: 303-37
- Gerencser GA, Purushotham KR (1996) Reconstituted Cl<sup>-</sup> pump protein: a novel ion(Cl<sup>-</sup>)-motive ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 28: 459-69
- Geuze HJ, Murk JL, Stroobants AK, Griffith JM, Kleijmeer MJ, Koster AJ, Verkleij AJ, Distel B, Tabak HF (2003) Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol Biol Cell* 14: 2900-7
- Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Cooper AA, Rochet JC, Lindquist S (2009) Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet* 41: 308-15
- Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, Meloni EG, Wu N, Ackerson LC, Klapstein GJ, Gajendiran M, Roth BL, Chesselet MF, Maidment NT, Levine MS, Shen J (2003) Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278: 43628-35
- Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, Tong Y, Martella G, Tscherter A, Martins A, Bernardi G, Roth BL, Pothos EN, Calabresi P, Shen J (2005) Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 45: 489-96
- Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9065-9
- Gradmann D, Tittor J, Goldfarb V (1982) Electrogenic Cl<sup>-</sup> pump in *Acetabularia*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299: 447-57
- Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ (2003) Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4078-83

- Hampshire DJ, Roberts E, Crow Y, Bond J, Mubaidin A, Wriekat AL, Al-Din A, Woods CG (2001) Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J Med Genet* 38: 680-2
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885-9
- Heinick A, Urban K, Roth S, Spies D, Nunes F, Phanstiel Ot, Liebau E, Luersen K (2009) *Caenorhabditis elegans* P5B-type ATPase CATP-5 operates in polyamine transport and is crucial for norspermidine-mediated suppression of RNA interference. *Faseb J*
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-79
- Hoepken HH, Gispert S, Morales B, Wingerter O, Del Turco D, Mulsch A, Nussbaum RL, Muller K, Droese S, Brandt U, Deller T, Wirth B, Kudin AP, Kunz WS, Auburger G (2007) Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobiol Dis* 25: 401-11
- Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T, Epstein EH, Jr. (2000) Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* 24: 61-5
- Hutchison CA, 3rd, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, Smith M (1978) Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* 253: 6551-60
- Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *Embo J* 26: 313-24
- Ii K, Ito H, Tanaka K, Hirano A (1997) Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 125-31
- Imai Y, Soda M, Takahashi R (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 275: 35661-4
- Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, Laville M, Pratt J, Corti O, Pradier L, Ret G, Joubert C, Periquet M, Araujo F, Negroni J, Casarejos MJ, Canals S, Solano R, Serrano A, Gallego E, Sanchez M, Deneffe P, Benavides J, Tremp G, Rooney TA, Brice A, Garcia de Yébenes J (2003) Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 12: 2277-91
- Iwatsubo T, Yamaguchi H, Fujimuro M, Yokosawa H, Ihara Y, Trojanowski JQ, Lee VM (1996) Purification and characterization of Lewy bodies from the brains of patients with diffuse Lewy body disease. *Am J Pathol* 148: 1517-29
- Jencks WP (1989) Utilization of binding energy and coupling rules for active transport and other coupled vectorial processes. *Methods Enzymol* 171: 145-64
- Jorgensen PL (1975) Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. *Biochim Biophys Acta* 401: 399-415

- Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* 65: 817-49
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19: 5720-8
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387: 80-3
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-80
- Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, You-Ten AJ, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW (2005) Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5215-20
- Kissova I, Deffieu M, Manon S, Camougrand N (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem* 279: 39068-74
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-8
- Kitada T, Pisani A, Porter DR, Yamaguchi H, Tschertner A, Martella G, Bonsi P, Zhang C, Pothos EN, Shen J (2007) Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11441-6
- Klein C, Lohmann-Hedrich K (2007) Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 20: 453-64
- Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-21
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-4
- Kornak U, Schulz A, Friedrich W, Uhlhaas S, Kremens B, Voit T, Hasan C, Bode U, Jentsch TJ, Kubisch C (2000) Mutations in the a3 subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. *Hum Mol Genet* 9: 2059-63
- Kuhlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 282-95
- Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269: 1427-9
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105-32

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339: 1044-53
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339: 1130-43
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-80
- Lee HJ, Shin SY, Choi C, Lee YH, Lee SJ (2002) Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J Biol Chem* 277: 5411-7
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395: 451-2
- Lin CH, Tan EK, Chen ML, Tan LC, Lim HQ, Chen GS, Wu RM (2008) Novel ATP13A2 variant associated with Parkinson disease in Taiwan and Singapore. *Neurology* 71: 1727-32
- Lindeberg J, Usoskin D, Bengtsson H, Gustafsson A, Kylberg A, Soderstrom S, Ebendal T (2004) Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. *Genesis* 40: 67-73
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT, Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111: 209-18
- Lutsenko S, Kaplan JH (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* 34: 15607-13
- Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapira AH, Marsden CD (1992) Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115 ( Pt 2): 333-42
- Marsh M, Schmid S, Kern H, Harms E, Male P, Mellman I, Helenius A (1987) Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *J Cell Biol* 104: 875-86
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-8
- Martin GR, Evans MJ (1975) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1441-5
- Massey AC, Zhang C, Cuervo AM (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 73: 205-35
- Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92: 381-90

- McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 179: 38-46
- Moller AB, Asp T, Holm PB, Palmgren MG (2008) Phylogenetic analysis of P5 P-type ATPases, a eukaryotic lineage of secretory pathway pumps. *Mol Phylogenet Evol* 46: 619-34
- Mortimore GE, Poso AR (1986) The lysosomal pathway of intracellular proteolysis in liver: regulation by amino acids. *Adv Enzyme Regul* 25: 257-76
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360: 597-9
- Muthusamy BP, Natarajan P, Zhou X, Graham TR (2009) Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochim Biophys Acta* 1791: 612-9
- Najim al-Din AS, Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M (1994) Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurol Scand* 89: 347-52
- Nathans D, Smith HO (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* 44: 273-93
- Nelson N (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *Embo J* 18: 4361-71
- Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, Zimran A (1996) Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *Qjm* 89: 691-4
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1: 841-5
- Ning YP, Kanai K, Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Yoshino H, Sato S, Asahina M, Kuwabara S, Takeda A, Hattori T, Mizuno Y, Hattori N (2008) PARK9-linked parkinsonism in eastern Asia: mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. *Neurology* 70: 1491-3
- Odermatt A, Taschner PE, Khanna VK, Busch HF, Karpati G, Jablecki CK, Breuning MH, MacLennan DH (1996) Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase, are associated with Brody disease. *Nat Genet* 14: 191-4
- Olson TS, Terlecky SR, Dice JF (1991) Targeting specific proteins for lysosomal proteolysis. *Biomed Biochim Acta* 50: 393-7
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279: 18614-22

- Palmgren MG, Axelsen KB (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1365: 37-45
- Papp S, Dziak E, Michalak M, Opas M (2003) Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-handling proteins. *J Cell Biol* 160: 475-9
- Perez FA, Curtis WR, Palmiter RD (2005) Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity. *BMC Neurosci* 6: 71
- 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* 276: 2045-7
- Pomorski T, Lombardi R, Riezman H, Devaux PF, van Meer G, Holthuis JC (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* 14: 1240-54
- Potter H, Weir L, Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 7161-5
- Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L (2007) PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* 5: e172
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38: 1184-91
- Rao RV, Bredesen DE (2004) Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol* 16: 653-62
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71
- Reverte CG, Ahearn MD, Hake LE (2001) CPEB degradation during *Xenopus* oocyte maturation requires a PEST domain and the 26S proteasome. *Dev Biol* 231: 447-58
- Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445-8
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-8
- Rosen BP (2002) Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 689-93
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91

- Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S, Smith M, Munro CS, O'Donovan M, Craddock N, Kucherlapati R, Rees JL, Owen M, Lathrop GM, Monaco AP, Strachan T, Hovnanian A (1999) Mutations in ATP2A2, encoding a Ca<sup>2+</sup> pump, cause Darier disease. *Nat Genet* 21: 271-7
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1: 1269
- Scherzer CR, Feany MB (2004) Yeast genetics targets lipids in Parkinson's disease. *Trends Genet* 20: 273-7
- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, Langston JW, Mizuno Y, Hyman BT, Selkoe DJ, Kosik KS (2002) Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 160: 1655-67
- Schmidt K, Wolfe DM, Stiller B, Pearce DA (2009) Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Se<sup>2+</sup> toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. *Biochem Biophys Res Commun* 383: 198-202
- Schuler GD, Altschul SF, Lipman DJ (1991) A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins* 9: 180-90
- Schultheis PJ, Hagen TT, O'Toole KK, Tachibana A, Burke CR, McGill DL, Okunade GW, Shull GE (2004) Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 731-8
- Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE (2000) Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* 5: 403-10
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25: 302-5
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293: 263-9
- Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M, Elahi E (2008) Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet* 82: 1375-84
- Shumway SD, Maki M, Miyamoto S (1999) The PEST domain of I $\kappa$ B $\alpha$  is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *J Biol Chem* 274: 30874-81
- Singer TP, Ramsay RR (1990) Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett* 274: 1-8
- Sitja R, Braakman I (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426: 891-4

- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336: 688-90
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17
- Spencer ML, Theodosiou M, Noonan DJ (2004) NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif. *J Biol Chem* 279: 37069-78
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-40
- Suzuki C (2001) Immunochemical and mutational analyses of P-type ATPase Spf1p involved in the yeast secretory pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2405-11
- Suzuki C, Shimma YI (1999) P-type ATPase spf1 mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT. *Mol Microbiol* 32: 813-23
- Takahashi R, Imai Y, Hattori N, Mizuno Y (2003) Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci* 991: 101-6
- Tang X, Halleck MS, Schlegel RA, Williamson P (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272: 1495-7
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82
- Tofaris GK, Layfield R, Spillantini MG (2001) alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett* 509: 22-6
- Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ (2001) A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *Embo J* 20: 2367-75
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-55
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 246-55
- Turiault M, Parnaudeau S, Milet A, Parlato R, Rouzeau JD, Lazar M, Tronche F (2007) Analysis of dopamine transporter gene expression pattern -- generation of DAT-iCre transgenic mice. *Febs J* 274: 3568-77
- Turpin JC DG, Brice A, Masson M, Nadaud MC, Boutry JM SA, Tager JM, Baumann N (1987) Parkinsonian symptomatology in a patient with type 1 (adult) Gaucher's disease.: 103-4
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304: 1158-60

- van Meer G, Sprong H (2004) Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol* 16: 373-8
- Vashist S, Frank CG, Jakob CA, Ng DT (2002) Two distinctly localized p-type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control. *Mol Biol Cell* 13: 3955-66
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 615-9
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68: 1015-68
- Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, Hess EJ, Dawson VL, Dawson TM (2004) Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10744-9
- Walter P, Johnson AE (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10: 87-119
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC (2003) Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 278: 25009-13
- Weiner WJ (2005) A differential diagnosis of Parkinsonism. *Rev Neurol Dis* 2: 124-31
- Wilkens S, Vasilyeva E, Forgacs M (1999) Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J Biol Chem* 274: 31804-10
- Williams DR, Hadeed A, al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ (2005) Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord* 20: 1264-71
- Winkler-Stuck K, Wiedemann FR, Wallesch CW, Kunz WS (2004) Effect of coenzyme Q10 on the mitochondrial function of skin fibroblasts from Parkinson patients. *J Neurol Sci* 220: 41-8
- Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK, Morrison A, Lwin A, Colegial C, Allman JM, Schiffmann R (2004) Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 82: 192-207
- Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H (2003) Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 1342-8
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2696-701
- Zhuang X, Masson J, Gingrich JA, Rayport S, Hen R (2005) Targeted gene expression in dopamine and serotonin neurons of the mouse brain. *J Neurosci Methods* 143: 27-32
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44: 601-7

## 8. Anhang

### 8.1 Liste aller verwendeter Oligonukleotide

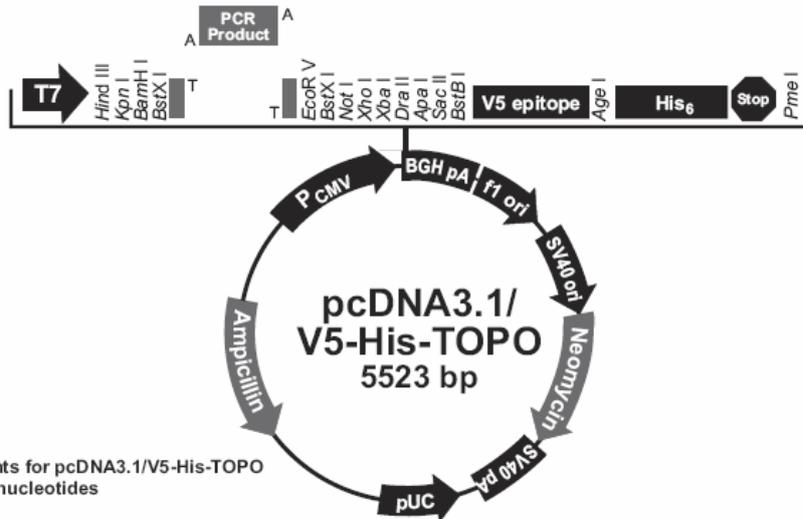
Tab. 8.1: Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer. Angegeben ist der jeweilige Name, die Sequenz in 5'→3'-Richtung und die Funktion des Primers.

Primername	Sequenz	Funktion
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-R3	AGCGGTGGACGTCGTCACAAGAGC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-R12	CTGTGCGGGTCACCACTGCCAGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-F2	TGCTGCGGTATTACCTCTTCCAGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-F12	AGTGCTGAAGACGGCACTGCC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-F4	CCTGGTGAGCTCCATCTTGACC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-R7	GGCTTCAGTAGGTTCTCATGACC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-M3R	GGACAGCGAGATGCCGACATCAGC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-26delICR	GGTCAGGAAGTAGCCCCCTAGCTGC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
ATP13A2-delSTOP	CGTGGGCCTGCACGACCTCAGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (cDNA)
Mut1-F	TCTCGTGGGCAGCATGCCACCGTTATGG	Mutagenese - P1
Mut1-R	GGTGGGCATGCTGCCACGAGAGG	Mutagenese - P1
Mut2-F	GCATCAACCTGCGGGGCAAGCTGC	Mutagenese - K4
Mut2-R	GCAGCTTGCCCCGCAGGTTGATGC	Mutagenese - K4
Mut3-F	TGCCCCGAAGAGGCAGGCATTCC	Mutagenese - P2
Mut3-R	AATGCCTGCCTCTTCAGGGGCACC	Mutagenese - P2
Mut4-F	TTCCAGTACCGCATCCTGGCTGC	Mutagenese - K6
Mut4-R	CAGCCAGAGTGCGGTA CTGGAAGC	Mutagenese - K6
Mut5-F	CCTGGTGGCCTGGCGCTCCTGAGC	Mutagenese - K7
Mut5-R	GCTCAGGAGCGCCAGGCCACCAGG	Mutagenese - K7
Mut6-F	CAGGCCTTCAGCATCGTGCTGGCTGGCTGACCAC	Mutagenese - P3
Mut6-R	GTGGTCAGCCAGCCACAGCAGATGCTGAAGGCCTG	Mutagenese - P3
Mut7-F	GTACAAGACCAGAAAGCAATGCCAGACTCTAAGGGAC	Mutagenese - P4
Mut7-R	GTCCCTTAGAGTCTGGCATTGCTTTCTGGTCTTGTAC	Mutagenese - P4
Mut8-F	GGTCAAGTTGTCCATGCAGGTGTGCGTGTGC	Mutagenese - P5
Mut8-R	GCACACGCACACCTGCATGGACA ACTGACC	Mutagenese - P5
Mut9-F	GCATCTTCATCCTCTACCAAACCGGGTGCCTC	Mutagenese - P6
Mut9-R	GAGGCACCCGGTTTTTGGTAGAGGATGAAGATGC	Mutagenese - P6
Mut10-F	CAGTGCTCATGAGCCACACGGGGCCAGCGCTG	Mutagenese - P7
Mut10-R	CAGCGCTGGCCCCGTGTGGCTCATGAGCACTG	Mutagenese - P7
Mut11-F	CGAGACCCAGCAAGCCTTATACCAGGTCAGCCTCC	Mutagenese - K5
Mut11-R	GGAGGCTGACCTGGTATAAGGCTTGCTGGGTCTCG	Mutagenese - K5
Mut12-F	GGACCCGCATCCGCACCGTCATGGTGACAGG	Mutagenese - P8
Mut12-R	CCTGTCACCATGACGGTGCGGATGCGGGTCC	Mutagenese - P8
KOS-F2	CAAGCCTTCAGCATCGCACTGTGG	SB-Sonde
KOS-R2	GGCTTACCTGTCAGGGAGCTCTCG	
cATP11F	AGTACCTCATCCTGGCTGCAGC	NB-Sonde
cATP-29R	TGGCTCAGAGGCAGGGAGTTCC	

## Anhang

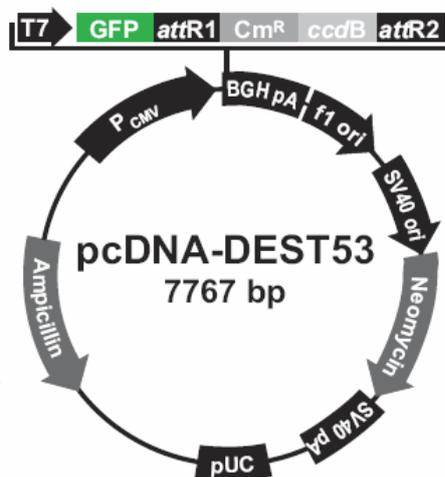
Primername	Sequenz	Funktion
ATP1sF	GAGCCTGGTGGCCCAGGTGC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exon 1)
ATP1R	GCTGCGAGCGGGCGGCCATCC	
ATP2F	AGCAAGAGGAGAAGGTGCCTCC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 2+3)
ATP3R	GGTTGGCACCCAAGCATCCTCC	
ATP4F	CCTTGATTCTGCCTTCTCCAGC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 4+5)
ATP5R	GCACAGATCATGAAACCGAGGC	
ATP6F	CAGCATAAGCACACTGCTTCTGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exon 6)
ATP6R	CATGCCATGCCACCGTCTGTGC	
ATP7F	ATAGTCTCCAGCCTGCACAGGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 7+8)
ATP8R	CTGGTTGCCACCGTAAAGTGGC	
ATP9F	CACAGGAGACCCAGCCTGTGGC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 9-11)
ATP11R	CCTGGACAACAGAGTGAAACTCCG	
ATP12F	CCTCTCTGAGCCTCAGTGTCC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exon 12)
ATP12R	GGCCCAACTTCTGCTAAGATGGG	
ATP13F	TTGCAACTCCAGAGGCACGGGTCG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 13-15)
ATP15R	TAGACAGGACCTGGCATCCTGTGG	
ATP16F	AGAGGGAATCACATGTGCCAAGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exon 16)
ATP16R	CGTTACAGGTGTGAGCCACTGC	
ATP17F	ACGTATTCCAGGTCACCCAACAGC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 17-19)
ATP19R	ACCAGGCAGGGCATCTTCTTGG	
ATP20F	CCAAGGAAGATGCCCTGCCTGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exon 20)
ATP20R	ATGGGTTCTTGAAGTCACTCC	
ATP21F	GGCAGACGGATTTTCATCCAGCC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 21-23)
ATP23R	GGACAAGCTCAGTCTCCGCAGG	
ATP24F	CCCAGCTGTCATCATATTCTGCC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 24+25)
ATP25R	CCCACGTCATCTATTCTGGGACC	
ATP26F	GGGCCTCTGCTATCAGACTAGG	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 26+27)
ATP27R	GTGCACGCCAGTCTTCCACTCG	
ATP28F	CGAGTGGAAGACTGGCGTGAC	Sequenzierung <i>ATP13A2</i> (genomisch-Exons 28+29)
ATP29R	TGGCTCAGAGGCAGGGAGTTCC	
13a2-KOL-F3	GTCGAGAGATCACACTCG	Multiplex-PCR
KOLA-R4	CCCTCCATGGACTGCCACAGTAGC	Multiplex-PCR
GK-KOL-R1	GCTAAAGCGCATGCTCCAGACTGC	Multiplex-PCR
13a2-KOL-F11	TGACGACAGGGACGTCAATCG	Multiplex-PCR
GK-KOK-F4	CCATCAGAAGCTGACTCTAGATCC	Multiplex-PCR
13a2-KOK-R4	TGGTCTGGCTAGTGTAAGAGAGC	Multiplex-PCR
13a2-KOL-F2	TGCCGCGGCCGCAATGCACTCCTGACCTACACAGAAAGCTTGC	Targeting-Vektor - langer Arm (AG Brüning)
13a2-KOL-R2	GCTGGCGATCGCGCCAGGCCCTTACCGGTGCTAGACAATCC	
13a2-KOK-F2	CATACTCGAGTATCCAGTCTGAGCGGTGGACAGAGGCAGC	Targeting-Vektor - kurzer Arm (AG Brüning)
13a2-KOK-R1	GCCGAGTGATACATGTCTGTCACCCCTGAGGTATATGTTCCATGC	
KL-4F	TGCAGACTGAGGCTGTTGTTTCAGG	Targeting-Vektor - langer Arm (AG Zimmer)
KL-8R	GCTGTAGACGGTGCCTAGCAGAGC	
KOKA-5F	CCCAATAGTCTGTGGAGGCTCAGG	Targeting-Vektor - kurzer Arm (AG Zimmer)
KOKA-7R	AGTGAGACAGCAGTCAGCACTTCC	

## 8. 2 Vektorkarten



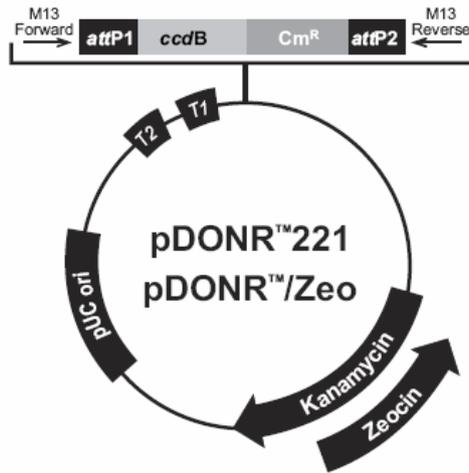
**Comments for pcDNA3.1/V5-His-TOPO  
5523 nucleotides**

CMV promoter: bases 209-863  
 T7 promoter/priming site: bases 863-882  
 Multiple cloning site: bases 902-1019  
 TOPO® Cloning site: 953-954  
 V5 epitope: bases 1020-1061  
 Polyhistidine tag: bases 1071-1088  
 BGH reverse priming site: bases 1111-1128  
 BGH polyadenylation signal: bases 1110-1324  
 f1 origin of replication: bases 1387-1800  
 SV40 promoter and origin: bases 1865-2190  
 Neomycin resistance gene: bases 2226-3020  
 SV40 polyadenylation signal: bases 3039-3277  
 pUC origin: bases 3709-4382  
 Ampicillin resistance gene: bases 4527-5387



**Comments for pcDNA-DEST53  
7767 nucleotides**

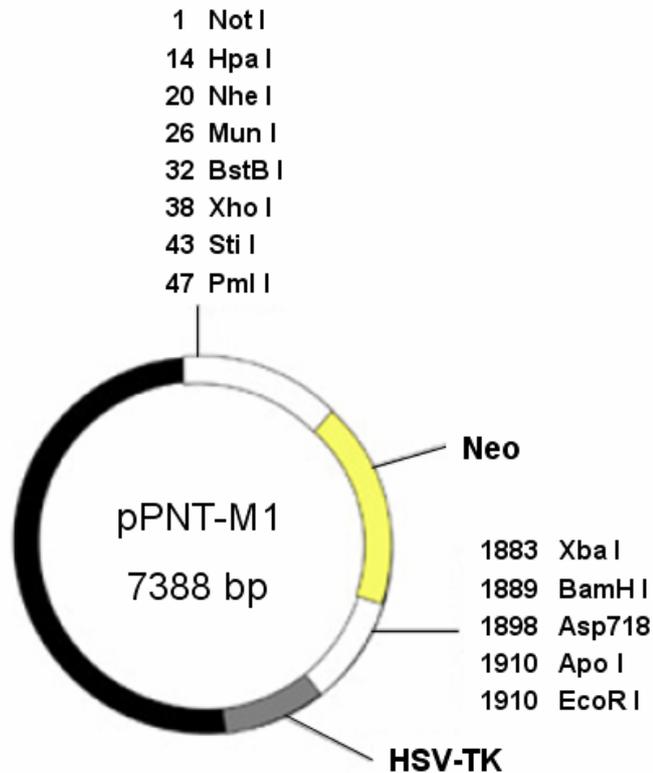
CMV promoter: bases 232-819  
 T7 promoter: bases 863-882  
 Cycle 3 GFP (N-terminal): bases 905-1621  
 attR1 recombination site: bases 1643-1767  
 Chloramphenicol resistance gene: bases 1876-2535  
 ccdB gene: bases 2856-3161  
 attR2 recombination site: bases 3202-3326  
 BGH polyadenylation region: bases 3361-3588  
 f1 origin: bases 3634-4062  
 SV40 early promoter and origin: bases 4089-4397  
 Neomycin resistance ORF: bases 4472-5266  
 SV40 early polyadenylation region: bases 5440-5570  
 pUC origin: bases 5953-6626  
 Ampicillin resistance ORF (*bla*): bases 6771-7631 (c)  
*bla* promoter: bases 7632-7730 (c)  
 (c) = complementary strand

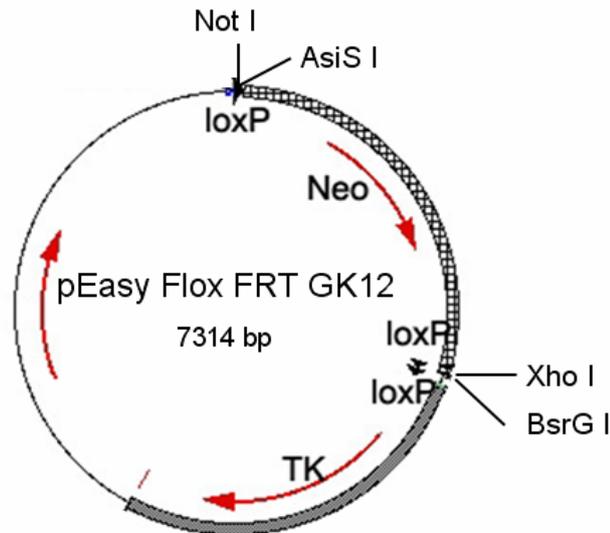


Comments for:

	pDONR™221 4761 nucleotides	pDONR™/Zeo 4291 nucleotides
<i>rrnB</i> T2 transcription termination sequence (c):	268-295	268-295
<i>rrnB</i> T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
<i>attP1</i> :	570-801	570-801
<i>ccdB</i> gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1825-2505	1847-2506
<i>attP2</i> (c):	2753-2984	2754-2985
M13 Reverse priming site:	3026-3042	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3155-3964	—
EM7 promoter (c):	—	3486-3552
Zeocin resistance gene (c):	—	3111-3485
pUC origin:	4085-4758	3615-4288

(c) = complementary strand





### 8.3 Proteinsequenz von ATP13A2

<b>P1</b>	MSADSSPLVGS <b>I</b> PTGYGTLTIGTSDPLSSSVSSVRLSGYCGSPWR <b>VIGY</b>	100	<b>TMD 1</b>
	<b>HVVVWMMAGIPLLLFRW</b> KPLWGVRLRLRPCNLAHAETLVI EIRDKEDSSW		
	QLFTVQVQTEAIGEGSLEPSPQQAEDGRSQAAVGAVPEGAWKDTAQLHK		
<b>K6</b>	SEEAVSVGQKRVLRYYLFQGRYIWIETQQA <b>F</b> YQVSLLDHGRSCDDVHRS	200	
<b>P3</b>	RHGLSLQDQMRKAIYGNVISIPVKSYPQLLVDEALNPYYGFQAFST <b>A</b> L		
<b>P4+5</b>	WLADH <b>YYWYALCIFI</b> LISSISICLS <b>LY</b> KTRKQ <b>S</b> QTLRDMVKLSM <b>F</b> VCVCRP	300	<b>TMD 2</b>
	GGESEWVDSSELVPGDCLVLPQEGGLMPCDAALVAGECMVNESSLTGESI		
<b>K1</b>	PVLKTALPEGLGPYCAETHRRHTLFCGTLILQARAYVGPVHLAVVTRT <b>GF</b>	400	
<b>P6</b>	<b>CTAKGGLVSSILHPRPINFKFKYKHSMKFVAALS<b>V</b>L</b> ALLGTIYSIFILY <b>R</b> N	500	<b>TMD 3</b> <b>TMD 4</b>
	RVPLNEIVIRALDLVTVVVPPALPAAMTVCTLYA <b>Q</b> SRLRRQGI <b>F</b> CIHPLR		
<b>K4+P2+K2</b>	INL <b>G</b> GKLQLVCFDKTGTLTEDGLDVMGVVPLK <b>G</b> QAFPLVPEP <b>P</b> RLPVGP	600	
	LLRALATCHALSRLQDTPVGDPMCLKMVESTGWVLEEEPAADS <b>A</b> FGTQVL		
	AVMRPPLWEPQLQAMEEPPVPSVLRHFPFSSALQMSVVVAWP <b>G</b> ATQPE	700	
	AYVKGSP <b>E</b> LVAGLCNPETVPTDFAQMLQSYTAAGYRVVALASKPLPTVPS		
<b>P8</b>	LEAAQQLTRD <b>T</b> VEGDL <b>S</b> LLGLLVMRNL <b>L</b> KPQ <b>T</b> TPVIQALRRTRIR <b>A</b> VMVT	800	
	GDNLQTA <b>V</b> TVARCGM <b>V</b> APQ <b>E</b> HLIIVHATHPERGQ <b>P</b> ASLEFL <b>P</b> MESPTAV	900	
	NGVKDPDQAAS <b>Y</b> TV <b>E</b> PDPRSRHLALS <b>G</b> PT <b>F</b> GIIVKH <b>F</b> PKLLPKVLVQ <b>G</b> TV		
	FARMAPEQKTEL <b>V</b> CELQ <b>L</b> KLQ <b>Y</b> CVGMCGDGANDCGALKAAD <b>V</b> GISLSQ <b>E</b> EA		
	SVVSPFTSSMASIECVPMVIREGRCSLDTSFSV <b>F</b> K <b>Y</b> MA <b>L</b> Y <b>S</b> LT <b>Q</b> FIS <b>V</b> LI	1000	<b>TMD 5</b>
<b>P7</b>	<b>L</b> YTIN <b>T</b> NLGD <b>L</b> QFLAIDLVITTT <b>V</b> AVLMS <b>R</b> TGPALV <b>L</b> GRVRPPGALL <b>S</b> VP	1100	<b>TMD 6</b>
<b>K3</b>	VLSS <b>L</b> LLQ <b>M</b> VL <b>V</b> TGVQ <b>L</b> GG <b>Y</b> FLTLAQ <b>P</b> WFVPLN <b>R</b> TVAAPDNL <b>P</b> NYEN <b>T</b> VV		<b>TMD 7+8</b>
<b>K6+7</b>	<b>F</b> SLSS <b>F</b> Q <b>Y</b> L <b>I</b> LAAAVSKGAP <b>F</b> RRPLYTN <b>V</b> P <b>F</b> LV <b>A</b> L <b>L</b> SS <b>V</b> LVGLV <b>L</b> VP <b>G</b>	1100	<b>TMD 9</b>
	LLQ <b>G</b> PLALRNITDT <b>G</b> FK <b>L</b> LL <b>L</b> GL <b>V</b> TLN <b>F</b> VG <b>A</b> FM <b>L</b> ES <b>V</b> L <b>D</b> QCL <b>P</b> ACL <b>R</b> RLR	1180	<b>TMD 10</b>
	PKRASKKR <b>F</b> K <b>Q</b> LERELAEQPWP <b>P</b> LP <b>A</b> GPLR		

Abb. 8.1: Dargestellt ist die Proteinsequenz von ATP13A2. Die zehn prädierten Transmembrandomänen sind gelb markiert. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Genvarianten sind rot gekennzeichnet. Dabei ist bei den Mutationen P1-P8 und K4-K6 jeweils eine Aminosäure ausgetauscht. Die Mutation K1 führt zur Deletion von Exon 13, wodurch unter anderem die ersten acht Aminosäuren der dritten Transmembrandomäne verloren gehen (FVAALS**V**L). Bei den Mutationen K3 und K7 ist die Aminosäure markiert, in der das jeweilige Nukleotid deletiert ist. Bei der Mutation K2 ist die erste Aminosäure hervorgehoben, in von der Insertion der 22 bp betroffen ist.

## Teilpublikation

Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. Nat Genet. 2006 Oct;38 (10):1184-91.

## Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Kubisch bin ich sehr für die Überlassung dieses spannenden Projektes, die außerordentlich gute Betreuung, Anregungen und die fachliche Unterstützung in den vergangenen Jahren dankbar.

Bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Hoppe bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Kloppenburg für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Für die kompetente Beratung und die Betreuung im Rahmen des *Atp13a2*-Knock-Out Projektes gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Jens Brüning. Dabei bedanke ich mich auch bei Dr. Thomas Wunderlich für die fachliche und praktische Unterstützung.

Ich danke Frau Dr. Anne Plücke und allen Mitarbeitern des Zentrums für Mausgenetik und des Tierstalls für die Versorgung der Mäuse.

Für die Bereitstellung des pPNT-Plasmids sowie die Beratung beim *Atp13a2*-Knock-Out Projekt danke ich Prof. Dr. Andreas Zimmer.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Konrad Sandhoff und Herrn Dr. Hany Farwanah für die fachliche Beratung und die Zusammenarbeit im Rahmen der Lipidanalyse.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Kubisch für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, den besonderen Zusammenhalt, den wissenschaftlichen Austausch sowie ihre Freundschaft.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und den fachlichen Austausch.

Ich danke Frau Dr. Boi-Dinh Chung und Herrn Dr. Gökhan Yigit für die Durchsicht des Manuskripts.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und gefördert hat und die in jeder Lebenslage für mich da war.

Schließlich danke ich meinen Freunden für ihre Unterstützung, Geduld und die Ablenkung vom Laboralltag.

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, André Heimbach, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch und von Herrn Prof. Dr. Thorsten Hoppe betreut worden.

Köln, 03. November 2009

André Heimbach