

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt
Neurodegenerative Erkrankungen

Genetische Untersuchungen zur α -Synuklein-Expression

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Brenner, Steffen

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

- 1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser
- 2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ueffing
- 3. Berichterstatter: Professor Dr. U. Wüllner
- 4. Berichterstatter: Professor Dr. O. Garaschuk

Tag der Disputation: 13.03.2017

Den Menschen, die mir nahestehen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Klassifikation der Parkinson-Syndrome	1
1.2 Synukleinopathien	4
1.2.1 Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS).....	4
1.2.2 Multisystematrophie (MSA).....	8
1.2.3 Demenz mit Lewy-Körpern (DLB).....	11
1.3 Genetik des Parkinson-Syndroms.....	15
1.4 PARK1/4 (<i>SNCA</i>) und sein Genprodukt α -Synuklein (α SYN)	17
1.4.1 Überblick	17
1.4.2 Physiologie	18
1.4.3 Pathophysiologie	19
1.4.4 Aufbau des Gens	21
1.5 Transkriptionsfaktoren für <i>SNCA</i>	23
1.5.1 C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta)	23
1.5.2 GATA2.....	23
1.5.3 ZSCAN21 (zinc finger and SCAN domain containing 21)	24
1.6 Single-nucleotide-polymorphisms (SNPs).....	25
1.6.1 Überblick	25
1.6.2 Zusammenhänge zwischen SNPs im <i>SNCA</i> -Gen und dem IPS	27
1.6.3 Zusammenhänge zwischen SNPs im <i>SNCA</i> -Gen und der MSA sowie der DLB.....	27
1.7 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit	28
2. Material und Methoden	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Geräte und Software	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits	32
2.1.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien	33
2.1.4 Primer	37
2.1.5 Antikörper	39
2.1.6 Proben	40
2.2 Methoden	41

2.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut	41
2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung	41
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.2.5 Extraktion der Kernproteine aus den Hirngewebeproben zur Immunodetektion und für die EMSAs	43
2.2.6 Western Blotting	43
2.2.7 Immunopräzipitationen (IP)	46
2.2.8 Bioinformatik	47
2.2.9 Chromatin-Immunopräzipitationsassays (ChIP Assays)	47
2.2.10 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) und Delta-Delta-C _T -Methode	50
2.2.11 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)	51
2.2.12 Schmelzkurvenanalysen	53
2.2.13 Sequenzierungen	54
3. Ergebnisse	57
3.1 Nachweis der Transkriptionsfaktoren in Hirngewebeproben	57
3.1.1 Ergebnisse Western Blotting	57
3.1.2 Ergebnisse Immunopräzipitationen	60
3.2 Bioinformatische Analyse des <i>SNCA</i> -Gens	61
3.2.1 Bestimmung möglicher Promotorbereiche des <i>SNCA</i> -Gens	61
3.2.2 Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen	63
3.3 Nachweis und Charakterisierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen	64
3.3.1 Ergebnisse Chromatin-Immunopräzipitationsassays	64
3.3.2 Ergebnisse Electrophoretic Mobility Shift Assays	67
3.4 Detektion von SNPs in den identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen	71
3.4.1 Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen	71
3.4.2 Ergebnisse Sequenzierungsanalysen	78
3.4.3 Identifikation bereits bekannter SNPs	82
4. Diskussion	86
4.1 Einordnung und Stellenwert dieser Arbeit	86
4.2 Diskussion der Patientenproben und der Methodik	88
4.2.1 Hirngewebeproben und Spender	88
4.2.2 Patientenauswahl für das Screening nach SNPs	89
4.2.3 Western Blotting und Immunopräzipitationen	90

4.2.4 Der Einsatz bioinformatischer Programme.....	91
4.2.5 CHIP Assays und EMSAs	92
4.2.6 Schmelzkurvenanalysen und Sequenzierungen	93
4.2.7 Bewertung der verwendeten Proben und der eingesetzten Methodik.....	94
4.3 Diskussion der Ergebnisse	94
4.3.1 Vorhandensein der C/EBP β -, GATA2- und ZSCAN21-Transkriptionsfaktoren in humanem Hirngewebe	94
4.3.2 Potentielle Promotorbereiche und Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren innerhalb des <i>SNCA</i> -Gens.....	95
4.3.3 Identifizierte Bindungsstellen der GATA2- und ZSCAN21- Transkriptionsfaktoren.....	97
4.3.4 Die Rolle der C/EBP β -Transkriptionsfaktoren	100
4.3.5 SNPs in den identifizierten GATA2- und ZSCAN21-Bindungsstellen.....	102
4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick	106
5. Zusammenfassung.....	109
6. Anhang	111
6.1 Abbildungsverzeichnis	111
6.2 Tabellenverzeichnis	112
6.3 Literaturverzeichnis.....	113
6.4 Erklärungen zum Eigenanteil.....	134
6.5 Veröffentlichungen.....	135
6.6 Abschließende Bemerkung	135
Danksagung	136
Lebenslauf.....	137

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
X x g	X-faches der Erdbeschleunigung
27-OHC	27-Hydroxycholesterol
AA	Aminosäure(n)
AD	autosomal dominant
Anlag.-Temp.	Anlagerungstemperatur
AR	autosomal rezessiv
aSYN	α -Synuklein (Protein)
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	circa
CBD	kortikobasale Degeneration
C/EBP β	CCAAT/enhancer binding protein beta
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Cl	Chlorid
cm ³	Kubikzentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CT	Computertomografie
Cys	Cystein
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DLB	Demenz mit Lewy-Körpern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalografie
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
fmol	Femtomol (1 fmol = 10^{-15} mol)
FTDP-17	frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus
GBA	Glucocerebrosidase
GCI	gliale zytoplasmatische Einschlüsse
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz ($1\text{Hz} = \frac{1}{s}$)
i.d.R.	in der Regel
IP	Immunopräzipitation
IPS	idiopathische Parkinson-Syndrom
kb	Kilobasen (1 kb = 1000 Basen)
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1000 Dalton)
l	Liter
L-Dopa	Levodopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin)
LK	Lewy-Körper
LXR	Liver X receptor
M	Molarität ($1\text{ M} = 1 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$)
mA	Milliampere ($1\text{ mA} = 10^{-3}$ Ampere)
MAF	minor allele frequency
MAO-B	Monoaminoxidase-B
Mg	Magnesium
µg	Mikrogramm ($1\text{ µg} = 10^{-6}$ Gramm)
mg	Milligramm ($1\text{ mg} = 10^{-3}$ Gramm)

MIBG	Metaiodbenzylguanidin
min	Minute(n)
μ l	Mikroliter (1 μ l = 10^{-6} Liter)
ml	Milliliter (1 ml = 10^{-3} Liter)
μ M	Mikromolarität (1 μ M = 10^{-6} M)
mM	Millimolarität (1 mM = 10^{-3} M)
μ m	Mikrometer (1 μ m = 10^{-6} Meter)
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	Mol (Stoffmenge)
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
MSA	Multisystematrophie
NaCl	Natriumchlorid
NACP-Rep1	non-A β -component precursor of Alzheimer's disease amyloid repeat 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm (1 ng = 10^{-9} Gramm)
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer (1 nm = 10^{-9} Meter)
NMDA	N-methyl-D-aspartat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pax6	paired box 6
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET (FDG)	Positronenemissionstomografie (mit Fluordesoxyglukose als Tracer)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSP	progressive supranukleäre Blickparese
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
REM	rapid eye movement

RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
SCA	spinocerebelläre Ataxie
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SN	Substantia nigra
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SNCA	SNCA-Gen
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single- nucleotide-polymorphism)
sog.	sogenannte(r/s)
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomografie
SSRI	selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor(en)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Spannung <i>oder</i> Unit(s)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
vgl.	vergleiche
ZNF219	zinc finger 219
ZSCAN21	zinc finger and SCAN domain containing 21
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Innerhalb der knapp 200 Jahre nach James Parkinsons Veröffentlichung „An Essay on the Shaking Palsy“ [1], in der er 1817 eine Krankheit beschrieb, die sich durch einen Ruhetremor, Akinese, posturale Instabilität und durch vegetative Störungen auszeichnete, hat sich der Blick auf diese später nach ihm benannte Krankheit mehrfach verändert. Zwar wird die Diagnose noch immer vor allem klinisch gestellt [2]. Doch während die Erkrankung lange Zeit für sporadisch gehalten wurde, werden seit nun mehr als 15 Jahren immer mehr genetische Hintergründe bekannt [3]. Viele Jahre vor der Genetik lieferte bereits die Neuropathologie wichtige Erkenntnisse über die Krankheit. Schon 1912 beschrieb Friedrich H. Lewy die später nach ihm benannten Lewy-Körper (LK) bei Parkinson-Patienten [4]. Außerdem erkannte man, dass es zur Degeneration dopaminerger Neurone hauptsächlich in der Substantia nigra (SN), aber auch in anderen Hirnregionen kommt und daraus ein Mangel an Dopamin in den nigrostriatalen Projektionen resultiert [5]. Letztlich zeigte sich, dass es neben dem Morbus Parkinson weitere Erkrankungen gibt, die mit Symptomen einhergehen, wie man sie auch beim Morbus Parkinson findet. Nachfolgend werden diese Parkinson-Syndrome und der Morbus Parkinson bzw. das idiopathische Parkinson-Syndrom näher erläutert und eine Systematik anhand der klinischen, genetischen und neuropathologischen Erkenntnisse aufgezeigt.

1.1 Klassifikation der Parkinson-Syndrome

Eine häufig verwendete Einteilung ist jene in primäre, sekundäre und atypische Parkinson-Syndrome [6]. Dabei versteht man unter den primären Parkinson-Syndromen den Morbus Parkinson bzw. das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), das durch den Verlust dopaminerger Neurone in der SN und häufig durch LK gekennzeichnet ist [5, 6]. Primäre Parkinson-Syndrome treten sowohl sporadisch als auch erblich auf [6]. Sekundäre Parkinson-Syndrome werden auch als symptomatische Parkinson-Syndrome bezeichnet und sind durch erkennbare strukturelle, metabolische oder toxische Ursachen charakterisiert [6,

7]. Beispielsweise zählen hierzu Schädigungen der Basalganglien durch mikrovaskuläre Läsionen oder durch Toxine. Bei den atypischen Parkinson-Syndromen tritt die Parkinson-Symptomatik im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen auf [6]. Hierzu zählen die Multisystematrophie (MSA) und die Demenz mit Lewy-Körpern (DLB), die wie das IPS zu den Synukleinopathien gehören, sowie die progressive supranukleäre Blickparese (PSP) und die kortikobasale Degeneration (CBD), die zu den Tauopathien gerechnet werden [2, 7]. Während die Synukleinopathien Proteinaggregationen zeigen, die hauptsächlich α -Synuklein (aSYN) enthalten, sind die Tauopathien durch Proteinaggregationen, deren Hauptbestandteil das mikrotubuliassoziierte Protein Tau ist, charakterisiert. Gemeinsam ist den atypischen Parkinson-Syndromen, dass sie einen rasch progredienten Verlauf, ein schlechtes Ansprechen auf eine Therapie mit Levodopa (L-Dopa) und zusätzliche Symptome, die schon früh im Krankheitsverlauf auftreten [8], zeigen.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über diese Klassifikation. Im Folgenden werden dann die Synukleinopathien näher besprochen, da die Erkenntnisse dieser Arbeit für alle Synukleinopathien wichtig sein könnten.

Tabelle 1: Klassifikation der Parkinson-Syndrome

Primäre Parkinson-Syndrome		<ul style="list-style-type: none"> • Hereditäre familiäre Parkinson-Syndrome • Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS)
Sekundäre, symptomatische Parkinson-Syndrome	metabolisch	<ul style="list-style-type: none"> • Morbus Wilson • Hämochromatose • Hypothyreose • Hypoparathyreoidismus
	toxisch	<ul style="list-style-type: none"> • MPTP • Kohlenstoffmonoxid (CO) • Paraquat • Mangan
	medikamentös	<ul style="list-style-type: none"> • Antidopaminergika • Calciumkanalblocker • Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) • Antihistaminika • Zytostatika • Antikonvulsiva • u.v.a.m.
	(para-)infektiös	<ul style="list-style-type: none"> • Encephalitis lethargica • AIDS-Enzephalopathie
	sonstige	<ul style="list-style-type: none"> • Subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie • Normaldruckhydrozephalus • Tumorbedingt • posttraumatisch
Atypische Parkinson-Syndrome (im Rahmen anderer neuro-degenerativer Erkrankungen)	mit aSYN-Pathologie	<ul style="list-style-type: none"> • Demenz mit Lewy-Körpern (DLB) • Multisystematrophie (MSA)
	mit tau-Pathologie	<ul style="list-style-type: none"> • Progressive supranukleäre Blickparese (PSP) • Kortikobasale Degeneration (CBD) • Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17) • Morbus Alzheimer
	sonstige	<ul style="list-style-type: none"> • Morbus Huntington • Spinocerebelläre Ataxien (SCA) • Dopa-responsive Dystonie • Neuroakanthozytose

1.2 Synukleinopathien

1.2.1 Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS)

Überblick: Das IPS ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer. Der Verlauf der Erkrankung ist stets chronisch progredient [2]. Eine aktuelle Studie schätzt die Zahl der an einem IPS erkrankten Menschen über 50 Jahren auf 4,1 bis 4,6 Millionen weltweit [9]. Mit der zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung ist damit zu rechnen, dass sich diese Zahl weiter erhöhen wird. Während die Erkrankung in den meisten Fällen sporadisch auftritt, zeigt sich bei etwa 5-10% aller Betroffenen eine familiäre Vererbung nach den mendel'schen Gesetzen [5]. Zu den Kardinalsymptomen des Morbus Parkinson zählen Ruhetremor, Bradykinese und Rigor [10]. Das neuropathologische Korrelat der Erkrankung, nämlich der Verlust dopaminerger Neurone in der SN, wurde bereits früh erkannt. Die biochemischen und zellbiologischen Mechanismen, die dieser Neurodegeneration zugrunde liegen, sind jedoch nach wie vor ungeklärt.

Epidemiologie: Der Morbus Parkinson manifestiert sich zumeist um das 60. Lebensjahr. Allerdings ist sowohl ein wesentlich früherer als auch ein wesentlich späterer Beginn möglich [11]. Nach einer Studie aus Olmsted County, Minnesota, USA beträgt die Inzidenz 10,8 : 100 000 [12]. Andere Studien kommen teilweise zu noch höheren Inzidenzraten [13]. Allen Studien gemeinsam ist jedoch ein Anstieg der Inzidenz mit dem Lebensalter. Die kumulative Inzidenz im Alter von 90 Jahren, an einem Parkinson-Syndrom zu erkranken, beträgt 7,5%, unter der Annahme, dass es keine anderen konkurrierenden Todesursachen gibt [12]. Männer scheinen ein etwas höheres Risiko zu haben, an einem Parkinson-Syndrom zu erkranken [14]. Die Prävalenz steigt ebenfalls mit dem Lebensalter und liegt bei 100-200 : 100 000 [15].

Neuropathologie: Neuropathologisch ist das IPS durch einen Verlust dopaminerger Neurone vorwiegend in der Substantia nigra pars compacta charakterisiert [16]. Typisch ist auch das Auftreten von LK, intrazytoplasmatische eosinophile Einschlüsse, die neben zahlreichen anderen

aggregierten Proteinen hauptsächlich α SYN enthalten [17, 18]. Außer in der SN finden sich diese charakteristischen Veränderungen, abhängig vom Krankheitsstadium, auch in anderen Hirnregionen, u.a. im Locus coeruleus, in den Raphekernen, im Nucleus basalis Meynert, im Kortex sowie im Bulbus olfactorius und im autonomen Nervensystem [19-21]. Dabei legen Befunde von Braak *et al.* [22] nahe, dass diese Pathologie immer nach demselben zeitlichen Muster auftritt: Zunächst sind der Bulbus olfactorius und der dorsale Vagus Kern betroffen (Stadium I und II nach Braak). Dies könnte die frühzeitig auftretenden Riechstörungen und autonomen Dysfunktionen erklären. Erst dann werden die SN und die Raphekerne des Mittelhirns befallen (Stadium II und IV nach Braak), was zu den motorischen Symptomen des IPS führt. Noch später erreicht die Pathologie limbische, meso- und neokortikale Strukturen (Stadium V und VI nach Braak). Dies könnte das Korrelat für die dann auftretende Parkinson-Demenz darstellen.

Klinik: Patienten, die an einem IPS leiden, präsentieren sich mit Akinese, Rigor, Ruhetremor und Haltungsinstabilität in variabler Ausprägung und Kombination [5]. Unter Akinese versteht man eine Verlangsamung („Bradykinese“) bzw. den kompletten Verlust willkürlicher Bewegungen. Häufig zeigen die Patienten einen kleinschrittigen Gang mit fehlendem Armschwung. Des Weiteren äußert sich die Bewegungsstörung in einem kleinen Schriftbild („Mikrografie“) und in einer verminderten Mimik („Hypomimie“) [2, 6]. Rigor bezeichnet eine „wächserne“ Tonuserhöhung bei passiven Bewegungen, die von der Bewegungsgeschwindigkeit unabhängig ist. Wenn gleichzeitig ein Tremor vorhanden ist, entsteht das sog. „Zahnradphänomen“, das ein ruckartiges Nachgeben des Muskelwiderstandes bezeichnet [2, 6]. Der Ruhetremor hat i.d.R. eine Frequenz von 4-6 Hz [23] und verstärkt sich bei emotionaler Anspannung oder Stress. Häufig wird der Ruhetremor von einem Haltetremor begleitet [6]. Die posturale Instabilität geht meist mit einer erhöhten Fallneigung einher [24]. Zusätzlich zeigen Patienten häufig vegetative Symptome wie Seborrhö („Salbengesicht“), orthostatische Dysregulation, Obstipation, Inkontinenz und Potenzstörungen [2, 25]. In späteren Krankheitsstadien leiden

die Patienten häufig an psychischen (Depression, Stimmungslabilität, Psychosen) und an kognitiven Störungen (Demenz, Denkverlangsamung) [26].
 Diagnostik: Die Diagnose wird vor allem klinisch gestellt. Dazu haben sich die Diagnosekriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank als besonders verlässlich herausgestellt [27]. Dabei wird zunächst ein Parkinson-Syndrom diagnostiziert und dann mittels Ein- und Ausschlusskriterien überprüft, ob es sich einem IPS zuordnen lässt oder nicht. Tabelle 2 gibt einen Überblick über diese Kriterien.

Tabelle 2: Klinische Diagnosekriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank (nach [27])

Schritt 1: Diagnose eines Parkinson-Syndroms:

- Bradykinese (Verlangsamung der Initiation von Willkürbewegung mit fortschreitender Verminderung der Geschwindigkeit und der Amplitude repetitiver Bewegungen)
- Und mindestens eines der folgenden Symptome:
 - Rigor
 - Ruhetremor (4-6 Hz)
 - Haltungsinstabilität

Schritt 2: Ausschlusskriterien für ein IPS

- Wiederholte Schlaganfälle mit langsam fortschreitender Parkinson-Symptomatik
- Wiederholte Schädel-/Hirntraumata in der Vergangenheit
- Gesicherte Enzephalitis in der Vergangenheit
- Blickkrampf
- Neuroleptische Medikation beim Auftreten der Symptome
- Mehr als ein betroffener Verwandter
- Anhaltende Remission
- Streng einseitige Symptome nach 3-jähriger Krankheitsdauer
- Progressive supranukleäre Blickparese (PSP)
- Kleinhirnzeichen
- Frühzeitige schwere autonome Symptomatik
- Frühzeitige schwere Demenz mit Apraxie und Störung des Gedächtnisses und der Sprache
- Positives Babinski-Zeichen
- Kleinhirntumor oder Hydrocephalus communicans im Computertomogramm
- Fehlendes Ansprechen auf L-Dopa (wenn eine Malabsorption ausgeschlossen ist)
- Exposition gegenüber MPTP (= 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)

Fortsetzung Tabelle 2 von Seite 6

Schritt 3: Unterstützende Kriterien für ein IPS (für die Diagnose eines IPS werden mindestens 3 benötigt)

- Einseitiger Beginn
- Ruhetremor
- Fortschreitende Erkrankung
- Persistierende Asymmetrie zugunsten der erstbetroffenen Seite
- Exzellentes Ansprechen auf L-Dopa (70-100%)
- Schwere L-Dopa-induzierte Chorea
- Ansprechen auf L-Dopa für mindestens 5 Jahre
- Klinischer Verlauf über 10 Jahre oder mehr

Neben der klinischen Präsentation und den in Tabelle 2 dargestellten Kriterien werden bildgebende Verfahren besonders zur Abgrenzung eines primären Parkinson-Syndroms von sekundären und atypischen Parkinson-Syndromen eingesetzt.

Therapie: Für die symptomatische Therapie eines IPS stehen medikamentöse und nicht-medikamentöse Behandlungen sowie operative Verfahren zur Verfügung [6]. Keine der Behandlungen stellt eine Kausaltherapie dar. Es kann lediglich symptomatisch behandelt werden. Medikamentös wird versucht, Dysbalancen im Neurotransmitterhaushalt auszugleichen. Dabei geht es in erster Linie darum, das Dopamindefizit zu ersetzen [28]. Dies kann durch die Gabe von L-Dopa, das im Körper durch Decarboxylasen für aromatische L-Aminosäuren in Dopamin umgewandelt wird, oder durch die Gabe direkter Dopaminagonisten geschehen [6, 29]. Eine andere Möglichkeit, den Dopaminspiegel zu erhöhen, ist die medikamentöse Hemmung des Dopamin-Abbaus [29]. Hier kann entweder die Monoaminoxidase-B (MAO-B), die den Abbau von Dopamin durch Desaminierung fördert [30], oder die Catechol-O-methyltransferase (COMT), die die Metabolisierung von L-Dopa zu 3-O-methyldopa katalysiert [31], gehemmt werden. Durch den Dopaminmangel kommt es außerdem zu einer gesteigerten Ausschüttung von Acetylcholin in striatalen Interneuronen und zu einer Aktivitätsänderung in Projektionsneuronen, die vom Striatum zum Pallidum, zum Nucleus subthalamicus und zur SN führen [6]. Für diese Aktivitätsänderung spielen auch

erregende N-Methyl-D-aspartat-(NMDA)-Rezeptoren eine wichtige Rolle [6]. Somit bietet der Einsatz von Anticholinergika und NMDA-Rezeptor-Antagonisten weitere Therapieoptionen [28]. Als nicht-medikamentöse Maßnahmen sollten Patienten, die an einem IPS leiden, Krankengymnastik und Logopädie erhalten. Physiotherapie kann helfen, die Beweglichkeit und die Bewältigung von Alltagsaktivitäten zu verbessern [32]. Mit der Logopädie werden Schluck- und Sprechstörungen behandelt. Als operatives Behandlungsverfahren steht die tiefe Hirnstimulation zur Verfügung. Bei Patienten mit fortgeschrittenem IPS und schweren motorischen Störungen konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung in Kombination mit Medikamenten effektiver ist als die medikamentöse Behandlung alleine [33].

1.2.2 Multisystematrophie (MSA)

Überblick: Die MSA zählt zu den atypischen Parkinson-Syndromen, tritt sporadisch auf und ist gekennzeichnet durch Degeneration des zentralen und autonomen Nervensystems mit den entsprechenden Symptomen [8]. Die Bezeichnung geht zurück auf Graham und Oppenheimer [34], die diese 1969 vorgeschlagen hatten. Ihnen war aufgefallen, dass Erkrankungen, die vorher als Striatonigrale Degeneration, Olivopontocerebelläre Atrophie und Shy-Drager-Syndrom bezeichnet wurden, viele Gemeinsamkeiten haben und deshalb wahrscheinlich nur eine Krankheitsentität mit unterschiedlich starken Ausprägungen darstellen. Dies konnte später durch die Entdeckung oligodendroglialer zytoplasmatischer Einschlüsse bei MSA-Patienten bestätigt werden [35]. Die MSA ist wesentlich seltener als ein IPS, schreitet schneller fort und spricht schlechter auf eine Therapie mit L-Dopa an [36].

Epidemiologie: Das mittlere Manifestationsalter der MSA beträgt 60 Jahre [37]. Männer und Frauen scheinen gleichermaßen betroffen zu sein [37]. Je nach Studie findet sich eine Prävalenz von 1,9 : 100 000 bis 4,9 : 100 000 [38]. Die geschätzte Inzidenz bei über 50-Jährigen beträgt 3 : 100 000 [39]. Die mittlere Überlebenszeit beträgt weniger als 9 Jahre [40].

Neuropathologie: Neuropathologisch ist die MSA charakterisiert durch neuronalen Zelluntergang und Gliose in den Basalganglien, im Kleinhirn, im

Pons, in den unteren Olivenkernen und im Rückenmark [41]. Ein typischer Befund sind die bereits erwähnten glialen zytoplasmatischen Einschlüsse (GCI) [35]. Es zeigte sich, dass der Hauptbestandteil der GCI α SYN ist [42, 43]. Neben diesen glialen Einschlüssen zeigen neuere Untersuchungen, dass fibrilläres α SYN auch im Zytoplasma, in den Zellkernen und in den Neuriten von Neuronen akkumuliert [44]. Deshalb kann die MSA den Synukleinopathien zugerechnet werden.

Klinik: Die Hauptsymptome der MSA sind autonomes Versagen, zerebelläre Ataxie, Parkinsonismus und Pyramidenbahnzeichen [45] in verschiedener Ausprägung und Kombination. Je nach vorherrschender klinischer Präsentation werden zwei Subtypen unterschieden: Bei der MSA-P steht das Parkinson-Syndrom im Mittelpunkt der Symptomatik, bei der MSA-C die zerebelläre Ataxie [8]. In Europa und in den USA ist die MSA-P zwei- bis viermal häufiger als die MSA-C [45, 46]. Dagegen scheint in der japanischen Bevölkerung der MSA-C-Subtyp vorherrschend zu sein [47]. Das Parkinson-Syndrom bei MSA-Patienten ist besonders durch progrediente Akinese und Rigor gekennzeichnet [36]. Ein Ruhetremor kann hinzukommen. Dieser unterscheidet sich dann aber oft von dem klassischen „Pillendreher-Tremor“ des Morbus Parkinson [36]. Zusätzlich wird immer wieder ein irregulärer ruckartiger posturaler Tremor beobachtet [8]. Die Ataxie zeigt sich sowohl durch eine Gangataxie, Dysmetrie, Dysdiadochokinese, skandieren Dysarthrie als auch durch zerebelläre und nicht-zerebelläre Okulomotorikstörungen [38]. Urogenitale Dysfunktionen sind die häufigste Manifestation der Dysautonomie bei MSA [45]. Diese zeigen sich besonders durch eine frühe erektile Dysfunktion bei Männern sowie durch eine Dranginkontinenz. Darüber hinaus lässt sich in der Mehrzahl der Fälle eine orthostatische Hypotonie nachweisen, die jedoch nur selten zu Synkopen führt [36].

Diagnostik: Für die klinische Diagnose werden die Konsensuskriterien nach Gilman *et al.* verwendet, die erstmals 1999 [48] publiziert und zuletzt 2008 [49] überarbeitet wurden. Die überarbeiteten Kriterien beinhalten auch neuroradiologische Verfahren und sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Diagnosekriterien nach Gilman [49] (modifiziert nach [8])

Wahrscheinliche MSA

Sporadische, fortschreitende Erkrankung mit Beginn im Erwachsenenalter (>30 Jahre) mit folgenden Charakteristika:

- Urininkontinenz (und erektile Dysfunktion bei Männern) oder
- Orthostatische Dysregulation mit Abfall des systolischen Blutdrucks von mindestens 30 mm Hg oder des diastolischen Drucks von mindestens 15 mm Hg innerhalb von 3 min nach dem Aufstehen und entweder
- Schlecht auf L-Dopa ansprechendes Parkinson-Syndrom (Bradykinese mit Rigor, Tremor oder posturale Instabilität) oder
- Zerebelläres Syndrom (Gangataxie, Dysarthrie, Extremitäten-Ataxie und zerebellär bedingte Störung der Okulomotorik)

Mögliche MSA

Sporadische, fortschreitende Erkrankung mit Beginn im Erwachsenenalter (>30 Jahre) mit folgenden Charakteristika:

- Parkinson-Syndrom (Bradykinese mit Rigor, Tremor oder posturale Instabilität) oder
- Zerebelläres Syndrom (s.o.) und
- Mindestens ein klinisches Zeichen, das auf eine autonome Dysfunktion hinweist (anders nicht zu erklärender starker oder häufiger Harndrang oder unvollständige Blasenentleerung, erektile Dysfunktion oder orthostatische Dysregulation, die die Kriterien einer wahrscheinlichen MSA nicht erfüllt) und
- Mindestens eines der folgenden Zeichen:

Mögliche MSA-P oder MSA-C

- Babinski-Zeichen mit Hyperreflexie
- Stridor

Mögliche MSA-P

- Rasch progredientes Parkinson-Syndrom
- Schlechtes Ansprechen auf L-Dopa
- Posturale Instabilität innerhalb von 3 Jahren nach Beginn motorischer Symptome
- Gangataxie, zerebelläre Dysarthrie, Extremitäten-Ataxie oder zerebellär bedingte Störung der Okulomotorik
- Dysphagie innerhalb von 5 Jahren nach Beginn motorischer Symptome
- MRT: Atrophie des Putamens, des mittleren zerebellären Schenkels, des Pons' oder des Kleinhirns
- PET (FDG): Hypometabolismus im Putamen, Hirnstamm oder Kleinhirn

Mögliche MSA-C

- Parkinson-Syndrom (Bradykinese und Rigor)
- MRT: Atrophie des Putamens, des mittleren zerebellären Schenkels oder des Pons'
- PET (FDG): Hypometabolismus im Putamen
- SPECT/PET: präsynaptische Verminderung dopaminerger Neurone

Therapie: Auch die MSA kann nur symptomatisch und nicht kausal behandelt werden. Dafür stehen medikamentöse und nicht-medikamentöse Verfahren zur Verfügung. Das Vorgehen richtet sich nach den klinischen Symptomen. Die häufig auftretende erektile Dysfunktion bei Männern kann durch den Einsatz von Sildenafil verbessert werden [50]. Blasenentleerungsstörungen können Selbst- oder Fremdkatheterisierung nötig machen [8, 51]. Die Dranginkontinenz kann durch den Einsatz von Anticholinergika verbessert werden [51]. Dies konnte beispielweise für Oxybutynin gezeigt werden [52]. Bei der Behandlung der orthostatischen Hypotonie sollte auf genügende Flüssigkeitsaufnahme [53] und salzreiche Diät geachtet sowie Stützstrümpfe getragen werden [8]. Pharmakologisch kann der α_1 -Agonist Midodrin eingesetzt werden [54]. Die Behandlung der Ataxie gestaltet sich schwierig und ist bisher durch keine Therapie effektiv möglich [38]. Auch wenn das Parkinson-Syndrom bei MSA schlechter auf L-Dopa anspricht als beim IPS und die Wirkung typischer Weise nach wenigen Jahren nachlässt [55], sollte ein Behandlungsversuch initiiert werden. Dabei können auch hohe Dosen eingesetzt werden, sofern dies nötig ist und diese toleriert werden [56]. Wie beim IPS können auch bei der MSA Physio-, Logo- und Ergotherapie eingesetzt werden [51].

1.2.3 Demenz mit Lewy-Körpern (DLB)

Überblick: Die DLB ist wahrscheinlich die zweithäufigste degenerative Demenz nach dem Morbus Alzheimer [57], tritt meist sporadisch auf [58] und ist durch die Kombination eines Parkinson-Syndroms mit im ersten Krankheitsjahr beginnendem progredienten kognitiven Abbau charakterisiert [8]. Die Bezeichnung wurde 1996 nach dem ersten Treffen des DLB-Konsortiums eingeführt [59]. Davor waren u.a. die Bezeichnungen diffuse Lewy-Körper-Erkrankung, Lewy-Körper-Variante der Alzheimer-Erkrankung, senile Demenz vom Lewy-Körper-Typ und Alzheimer-Erkrankung mit begleitender Lewy-Körper-Erkrankung gebräuchlich [60]. Da viele Patienten, die an einem IPS leiden, im Krankheitsverlauf eine Demenz entwickeln [61, 62] und sich das IPS und die DLB auch neuropathologisch ähneln, ist noch nicht endgültig geklärt, ob es sich hierbei tatsächlich um zwei verschiedene Entitäten handelt oder

vielmehr um unterschiedliche Ausprägungen einer Erkrankung [63]. Besonders in neueren Arbeiten wird die eigenständige Rolle der DLB angezweifelt und die Parkinson-Erkrankung, die DLB (Demenz in einem frühen Krankheitsstadium) sowie die Parkinson-Erkrankung mit Demenz (Demenz in einem späteren Krankheitsstadium) eher als Kontinuum betrachtet [63, 64].

Epidemiologie: Bisher gibt es nur wenige epidemiologische Studien zur DLB. Je nach Studie findet sich eine Prävalenz von bis zu 5% [65]. Der Anteil der DLB an allen Demenzerkrankungen wird auf bis zu 30,5% geschätzt [60]. Männer scheinen etwas häufiger betroffen zu sein als Frauen [58]. Die Inzidenz wird mit 0,1% [66] angegeben. Die Erkrankung beginnt i.d.R. erst jenseits des 55.-60. Lebensjahrs und hat eine mittlere Erkrankungsdauer von 3-6 Jahren [58].

Neuropathologie: Pathologisches Hauptmerkmal sind die namengebenden LK, die weit verteilt vom Hirnstamm bis zum Kortex auftreten können [67]. Aber auch einige Merkmale der Alzheimer-Erkrankung wie senile Plaques können auftreten [68]. Je nach Verteilung dieser Pathologie in verschiedenen Hirnstrukturen lassen sich drei Typen voneinander abgrenzen [68]: Der Hirnstammtyp zeigt besonders viele LK im Hirnstamm und im Zwischenhirn, aber nur vereinzelt im Kortex und in den Basalganglien. Beim limbischen oder Übergangstyp zeigt sich die Lewy-Pathologie besonders im Hirnstamm, im Zwischenhirn und im limbischen System, aber weniger im Kortex und in den Basalganglien. Der diffuse neokortikale Typ zeigt zahlreiche LK im Hirnstamm, im Zwischenhirn, im Kortex und in den Basalganglien. Außerdem geht dieser Typ häufig mit Alzheimer-typischen Plaques und Neurofibrillen einher [58].

Klinik: Die DLB ist durch eine Parkinson-Symptomatik zusammen mit einer im ersten Krankheitsjahr beginnenden progredienten demenziellen Entwicklung charakterisiert [8], die eine schnellere Progression als beim IPS zeigt [67]. Bei der Demenz stehen weniger Gedächtnisstörungen als vielmehr Fluktuationen der Aufmerksamkeit und der kognitiven Leistung sowie visuelle Halluzinationen im Vordergrund [68]. Oftmals ist es im klinischen Alltag schwierig, die Fluktuationen zu erkennen und richtig einzuordnen [69]. Die visuellen Halluzinationen treten schon früh im Krankheitsverlauf auf [68], sind detailliert und haben typischerweise Gestaltcharakter [59]. Das Parkinson-Syndrom ist

häufig nur mäßig ausgeprägt [59] und axial betont. Ein Ruhetremor ist weniger typisch [68]. Dafür treten häufiger Haltungsinstabilität und Gangschwierigkeiten auf als bei Patienten, die an einem IPS ohne Demenz leiden [70]. Darüber hinaus können wie beim IPS REM-Schlaf-Störungen und autonome Dysfunktionen auftreten [68].

Diagnostik: Für die klinische Diagnose werden die Konsensuskriterien des DLB-Konsortiums verwendet, die erstmals 1996 [59] publiziert und zuletzt 2005 [68] überarbeitet wurden. Die überarbeiteten Kriterien beinhalten auch neuroradiologische Verfahren, die die Diagnose stützen und helfen können, die DLB von einem IPS abzugrenzen. Tabelle 4 stellt die Konsensuskriterien des DLB-Konsortiums von 2005 dar.

Tabelle 4: Diagnosekriterien des DLB-Konsortiums [68] (modifiziert nach [8])

Hauptmerkmale

- Progredientes dementielles Syndrom
- Ausgeprägte oder persistierende Gedächtnisstörungen müssen in den Frühstadien der Erkrankung nicht vorhanden sein, treten aber im weiteren Verlauf meist hinzu
- Defizite sind besonders in der Aufmerksamkeit, in den exekutiven Funktionen sowie in den visuell-räumlichen Fähigkeiten nachzuweisen

Kardinalsymptome

- Fluktuationen der Hirnleistung mit ausgeprägten Schwankungen der Wachheit und Aufmerksamkeit
- Wiederholte visuelle Halluzinationen, typischerweise gut ausgeformt und detailliert
- Spontane Parkinson-Symptome

Mögliche DLB: 1 Kardinalsymptom muss vorhanden sein

Wahrscheinliche DLB: mindestens 2 Kardinalsymptome müssen vorhanden sein

Typische Symptome

(Treten ein typisches Symptom oder mehrere auf, kann bei Vorhandensein eines oder mehrerer Kardinalsymptome die Diagnose wahrscheinliche DLB gestellt werden. Fehlen Kardinalsymptome, so ist mindestens ein typisches Symptom für die Diagnose mögliche DLB ausreichend. Die Diagnose einer wahrscheinlichen DLB sollte nicht alleine auf der Basis typischer Symptome gestellt werden)

- REM-Schlaf-Störung
- Ausgeprägte Neuroleptikasensitivität
- Verminderter Dopamin-Transporter-Uptake in den Basalganglien (SPECT oder PET)

Fortsetzung Tabelle 4 von Seite 13

Unterstützende Symptome

- Wiederholte Stürze und Synkopen
- Vorübergehender unerklärter Bewusstseinsverlust
- Schwere autonome Dysfunktion
- Halluzinationen anderer Sinnesmodalitäten
- Systematisierter Wahn
- Depression
- Relative Verschonung mesiotemporaler Strukturen im CT/MRT
- Globale zerebrale Hypoperfusion im SPECT/PET unter Einschluss okzipitaler Strukturen
- Abnorme MIBG-Myokardszintigrafie
- Prominente EEG-Verlangsamung mit transienten temporalen Sharp Waves

Die Diagnose einer DLB ist weniger wahrscheinlich

- Bei zerebrovaskulären Erkrankungen mit neurologischen Herdhinweisen oder Strukturanomalien im CT oder MRT
- Bei anderen Hirn- bzw. systemischen Erkrankungen, die das klinische Bild erklären könnten
- Bei Auftreten von Parkinson-Symptomen in einem fortgeschrittenem Demenz-Stadium

Temporale Sequenz der Symptome

- Die Diagnose einer DLB sollte dann gestellt werden, wenn die Demenz vor oder bis zu einem Jahr nach dem Parkinson-Symptom aufgetreten ist
- Die Diagnose Parkinson-Demenz sollte dann erfolgen, wenn sich die Demenz im Rahmen einer voll entwickelten Parkinson-Krankheit manifestiert

Therapie: Die DLB kann wie das IPS und die MSA nur symptomatisch behandelt werden. Das Vorgehen ist multidimensional. Sowohl die kognitiven und neuropsychiatrischen Störungen als auch das Parkinson-Syndrom sind einer medikamentösen Behandlung zugänglich. Bzgl. der kognitiven Dysfunktionen zeigte sich, dass bei Patienten, die an einer DLB leiden, eine Störung der cholinergen Transmission vor allem in parietookzipitalen Hirnabschnitten vorliegt [71]. Dies rechtfertigt den Einsatz von Substanzen wie Cholinesterasehemmer, die den Abbau von Acetylcholin hemmen und damit das cholinerge Defizit ausgleichen können [72]. Beispielsweise konnte die Wirksamkeit des Cholinesterasehemmers Rivastigmin in einer placebokontrollierten randomisierten Studie nachgewiesen werden [73]. Oftmals

bessern Cholinesteraseinhibitoren auch neuropsychiatrische Störungen [73]. Wenn eine darüber hinausgehende Medikation notwendig sein sollte, sollte unbedingt auf klassische Neuroleptika verzichtet und auf atypische zurückgegriffen werden [68]. Klassische Neuroleptika führen häufig zu schweren motorischen und autonomen Störungen oder gehen sogar mit einem malignen neuroleptischen Syndrom einher [74]. Da für das Parkinson-Syndrom wie beim IPS ein Dopaminmangel angenommen werden kann, konzentriert sich die medikamentöse Therapie darauf, dieses auszugleichen. Dabei konnte für L-Dopa eine Wirksamkeit nachgewiesen werden, auch wenn das Ansprechen auf diese Therapie geringer ist als beim IPS [75, 76].

1.3 Genetik des Parkinson-Syndroms

In der Ätiologie des Parkinson-Syndroms sprach zunächst wenig für eine genetische Ursache. Es wurden vor allem Umweltfaktoren und Infektionen mit dem Parkinson-Syndrom in Verbindung gebracht. So gab es nach dem ersten Weltkrieg Berichte über ein Parkinson-Syndrom in der Folge einer Enzephalitis (Encephalitis lethargica [77]). Außerdem beobachtete man in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts, dass sich nach missbräuchlicher intravenöser Injektion von MPTP ein schweres Parkinson-Syndrom einstellte [78]. Auch Zwillingsstudien konnten lange Zeit keine erhöhte Konkordanz bei eineiigen im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen nachweisen [79]. Später konnte jedoch durch den Einsatz der PET gezeigt werden, dass auch bei einem Teil der nicht erkrankten Zwillingen eine Reduktion der präsynaptischen dopaminergen Terminale nachweisbar ist und dass es zu einer schnelleren Degeneration dopaminergener Neurone bei nicht erkrankten eineiigen Zwillingen im Vergleich zu zweieiigen kommt [80]. Außerdem werden seit der Entdeckung einer Mutation im *SNCA*-Gen, die zu einem familiären Parkinson-Syndrom führt [81], immer mehr genetische Hintergründe bekannt [3]. Die familiären Formen des Parkinson-Syndroms machen zwar nur einen geringen Anteil an allen Erkrankungsfällen aus [2]. Neuere histologische, genetische und molekularbiologische Erkenntnisse legen jedoch nahe, dass zumindest einige der identifizierten Gene und Signalwege auch in den häufigen sporadischen

Fällen eine wichtige Rolle spielen [5]. Somit hat die Entdeckung dieser Gene unser Wissen über die molekulargenetischen Hintergründe des Parkinson-Syndroms extrem erweitert. Tabelle 5 gibt einen Überblick über alle bisher identifizierten Gene und Genloci, die mit PARK1-20 bezeichnet werden.

Tabelle 5: Überblick über alle bisher identifizierten PARK-Loci mit Vererbungsmechanismus, Erkrankungsalter und wichtigsten pathologischen Veränderungen (AD = autosomal dominant, AR = autosomal rezessiv, X = X-chromosomal, LK = Lewy-Körper, Deg. = Degeneration, NFT = Alzheimer-typische Neurofibrillen, aSYN = α -Synuklein, ? = unbekannt/unsicher)

Locus-name	Gen-locus	Gen, Protein	Vererbung	Erkrankungsalter	Pathologie	Referenz
PARK1	4q21	<i>SNCA</i> , α -Synuklein	AD	früh	Nigrale Deg. mit LK	[5, 6, 81]
PARK2	6q25-27	<i>Parkin</i> , Parkin	AR	früh	Nigrale Deg. ohne LK	[5, 6, 82]
PARK3	2p13	<i>SPR</i> ?	AD	spät	Nigrale Deg. mit LK, NFT	[83-85]
PARK4	4q21	<i>SNCA</i> , α -Synuklein	AD	früh	Nigrale Deg. mit LK	[5, 6, 86, 87]
PARK5	4p14	<i>UCH-L1</i> , UCH-L1	AD	mittel	?	[5, 6, 88]
PARK6	1p35-36	<i>PINK1</i> , PINK1	AR	früh	Nigrale Deg. mit LK	[5, 6, 89]
PARK7	1p36	<i>DJ-1</i> , DJ-1	AR	früh	?	[5, 6, 90]
PARK8	12cen	<i>LRRK2</i> , LRRK2,	AD	spät	Nigrale Deg., aSYN u. Tau- Pathologie	[5, 6, 91]
PARK9	1p36	<i>ATP13A2</i> , ATPase13A2	AR	früh	?	[92, 93]
PARK10	1p32	<i>EIF2B3</i> ? <i>HIVEP3</i> ? <i>USP24</i> ?	AD	spät	?	[94-97]
PARK11	2q36-37	?	AD	spät	?	[98-100]
PARK12	Xq21- 25	<i>IL13RA1</i> ?, IL-13R α 1 ?	X	spät	?	[101, 102]
PARK13	2p12	<i>HTRA2</i> , HtrA2	AD	spät	LK	[103]
PARK14	22q13.1	<i>PLA2G6</i> , PL-A2-G6	AR	juvenil	Eisen-Akku- mulation, LK, NFT	[92, 104- 106]
PARK15	22q12.3	<i>FBXO7</i> , F-box7	AR	früh	Nigrale Deg. u. LK ?	[92, 107, 108]

Fortsetzung Tabelle 5 von Seite 16						
PARK16	1q32	?	?	?	?	[109, 110]
PARK17	16q12	VPS35, VPS35	AD	spät	?	[111, 112]
PARK18	3q27.1	EIF4G1, eiF4G1	AD	spät	Lewy-Körper, NFT ?	[113, 114]
PARK19	1p31.3	DNAJC6, DnaJC6	AR	juvenil	?	[115, 116]
PARK20	21q22.2	SYNJ1, Synaptojanin1	AR	juvenil	Nigrale Deg.?	[117, 118]

Als sicher pathogene Gene gelten bisher PARK1, 2, 4, 6, 7 und 8 [6]. Die mit PARK9, 14 und 15 bezeichnete Formen gelten als Multisystemerkrankungen, bei denen neben der Parkinson-Symptomatik auch eine Spastik und eine Demenz auftreten können. Sie werden deshalb nicht im engeren Sinne zu den erblichen Parkinson-Syndromen gerechnet [6]. Der Status der übrigen PARK-Loci ist noch nicht eindeutig geklärt. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf weitere Gene, die einen Risikofaktor für die Entwicklung eines IPS darstellen. Beispielsweise gehen heterozygote Mutationen im Glucocerebrosidase-(GBA-) Gen, die im homozygoten Zustand den Morbus Gaucher verursachen, mit einem erhöhten Risiko einher, an einem IPS zu erkranken [119]. Durch Koppelungsanalysen oder die Entdeckung neuer Interaktionspartner der bereits bekannten Gene ist davon auszugehen, dass die Liste der PARK-Loci zukünftig noch erweitert werden wird. Im Folgenden wird auf PARK1/4 (SNCA) näher eingegangen, um relevante Informationen bzgl. des Gens, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt, darzustellen.

1.4 PARK1/4 (SNCA) und sein Genprodukt α -Synuklein (aSYN)

1.4.1 Überblick

aSYN wurde erstmals 1988 durch Maroteaux und Kollegen [120] beschrieben. Bereits damals erkannten die Forscher, dass das Protein besonders in Neuronen exprimiert wird, vor allem an den präsynaptischen Endigungen und am Zellkern vorkommt und eine Assoziation zum axonalen Transport und zu den synaptischen Vesikeln besteht [120]. Heute ist bekannt, dass die

Hauptfunktion des Proteins wohl in der Aufrechterhaltung des synaptischen Vesikelpools liegen dürfte [121]. Allerdings sind die genauen molekularbiologischen Mechanismen noch immer nicht geklärt und erschwerend kommt hinzu, dass es eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse gibt, an denen aSYN beteiligt zu sein scheint [121]. *SNCA* war das erste Gen, das mit der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht wurde [5]. Sowohl Punktmutationen [81, 122, 123] als auch Multiplikationen [86, 87] des Gens führen zu seltenen familiären Parkinson-Erkrankungen. Darüber hinaus ist das durch *SNCA* kodierte Protein aSYN Hauptbestandteil der LK und Lewy-Neuriten, die als wichtige pathologische Kennzeichen sowohl in familiären als auch in sporadischen Fällen der Parkinson-Erkrankung zu finden sind [18]. Neben den neuropathologischen Hinweisen, dass aSYN auch mit den häufigen sporadischen Fällen verknüpft ist, zeigten große genomweite Assoziationsstudien eine eindeutige Assoziation von bestimmten allelischen Varianten des Gens mit der Erkrankung [109, 110, 124]. Diese Assoziation konnte durch Gründemann und Kollegen [125] bekräftigt werden. Sie konnten zeigen, dass überlebende dopaminerge Neuronen in der SN von IPS-Patienten signifikant höhere *SNCA* mRNA-Level aufwiesen als entsprechende Neuronen nicht erkrankter Personen. Somit scheint dem Gen bzw. dem seinem Genprodukt aSYN eine Schlüsselrolle sowohl in der Pathogenese von familiären als auch von sporadischen Parkinson-Erkrankungen zuzukommen.

1.4.2 Physiologie

Wie bereits erwähnt hat aSYN eine wichtige Aufgabe in der Aufrechterhaltung des synaptischen Vesikelpools und der präsynaptischen Funktion [121]. Darauf lassen vor allem die hohe Konzentration des Proteins in den präsynaptischen Endigungen sowie elektrophysiologische Untersuchungen an Knock-out-Mäusen schließen [126, 127]. Diese Funktion scheint besonders für die Dopaminausschüttung wichtig zu sein. Mehrere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass das Protein aktivitätsabhängig die Ausschüttung des Neurotransmitters verringern kann [128, 129]. Folglich entstehen dadurch auch weniger reaktive Dopaminmetabolite, weshalb aSYN eine neuroprotektive

Wirkung haben könnte. Die Hypothese der neuroprotektiven Wirkung wird durch weitere Befunde gestützt. So konnte gezeigt werden, dass α SYN Zellen gegen oxidativen Stress und andere Schädigungen schützt [130, 131]. Diese schützende Wirkung könnte zum einen durch die Aktivierung des Hitzeschockproteins Hsp70 und zum anderen durch die strukturelle Ähnlichkeit von α SYN zu kleinen Hitzeschockproteinen bedingt sein [132]. α SYN zeigt darüber hinaus strukturelle und vor allem funktionelle Homologien zu anderen Chaperonklassen außer den kleinen Hitzeschockproteinen [133]. Es fungiert damit also auch als Chaperon [134]. Diese Funktion scheint u.a. für den Aufbau von SNARE-Proteinen, die für die Verschmelzung von Neurotransmittervesikeln mit der Plasmamembran entscheidend sind, wichtig zu sein [135]. Diese Beobachtung unterstreicht erneut die wichtige Rolle des Proteins bei der Aufrechterhaltung des synaptischen Vesikelpools und der Neurotransmitterfreisetzung. Neben der schützenden Wirkung für Neurone ist α SYN jedoch auch in der Regulation von Mechanismen, die zur Neurodegeneration führen, beteiligt. Beispielsweise hemmt es die Aktivität des Proteasoms [136], das für den Abbau fehlgefalteter Proteine entscheidend ist. Besonders dopaminerge Neurone scheinen anfällig für die Belastung durch ungefaltete Proteine zu sein und könnten so in den Zelltod getrieben werden [137].

1.4.3 Pathophysiologie

Der Zusammenhang zwischen *SNCA* bzw. α -Synuklein und der Parkinson-Erkrankung ist unbestritten und konnte über viele unterschiedliche Beobachtungen hergestellt werden (siehe Abschnitt 1.4.1). Ähnliches gilt für die anderen Synukleinopathien. Der genaue Pathomechanismus ist dennoch unklar. Seit die Assoziation zwischen α SYN und neurodegenerativen Prozessen bekannt ist, wurden hierzu einige Hypothesen postuliert, von denen die wichtigsten im Folgenden dargestellt werden. Bei vielen dieser Hypothesen scheint die Gendosis von *SNCA* oder die Aminosäuresequenz des Proteins entscheidend zu sein [121]. Dies steht im Einklang sowohl mit den beschriebenen Gen-Multiplikationen, bei denen sich erhöhte α SYN-Level

messen lassen [138], als auch mit den bekannten Mutationen, die Einfluss auf die Aminosäureabfolge haben.

Eine Hypothese, wie es zur Neurodegeneration durch aSYN kommt, bezieht sich auf den bereits unter Abschnitt 1.4.2 beschriebenen Einfluss des Proteins auf die Proteasomaktivität. Hierbei könnte es durch erhöhte aSYN-Level zur Hemmung des Proteasoms und so zum Zelltod kommen. Ein anderer Ansatz stützt sich auf den Dopaminmetabolismus. Hierbei entstehen reaktive Sauerstoffspezies und andere hoch reaktive Substanzen, die oxidativen Stress, mitochondriale Dysfunktionen und Zelltod auslösen können [121]. Dabei wurde beobachtet, dass bei einer Überexpression von *SNCA*, insbesondere seiner mutierten Formen, überproportional viele solcher für die Zellen toxischer Substanzen entstehen und diese schädigen [139]. Ein weiterer Ansatz, bei dem die Gendosis von *SNCA* entscheidend sein könnte, begründet sich in der Beobachtung, dass man bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen vermehrt aktivierte Mikrogliazellen findet [140]. Diese können über entzündliche Prozesse zur Neurodegeneration bei der Parkinson-Erkrankung führen [141, 142]. aSYN wird dabei als Aktivator der Mikroglia diskutiert. Zumindest konnte dies an einer Zelllinie gezeigt werden [143]. Neben der Parkinson-Erkrankung finden sich aktivierte Mikrogliazellen, die zur Neurodegeneration führen, auch bei der MSA [144].

Unter Abschnitt 1.4.2 wurden auch einige neuroprotektive Mechanismen, an denen aSYN beteiligt ist, beschrieben. Eine Verringerung des Proteins könnte daher auch zum Untergang von Neuronen führen. Dies klingt zunächst verwirrend, da sich alle bisher beschriebenen pathophysiologischen Prozesse auf eine Erhöhung der Gendosis bezogen. Der Prozess wird jedoch verständlich, wenn man die Aggregation von aSYN bei den neurodegenerativen Erkrankungen mit einbezieht. Bei diesem Vorgang fällt das eigentlich lösliche Protein aus und verliert seine physiologische Funktion. Die Aggregation selbst wird dabei durch eine erhöhte Konzentration oder veränderte Struktur des Proteins begünstigt [121]. Neben dem Effekt, dass weniger funktionsfähiges aSYN zur Verfügung steht, konnte zudem gezeigt werden, dass die Aggregate selbst toxisch für Zellen sind [145]. Die Aggregation ist somit ein

Schlüsselereignis in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung und verwandter neurodegenerativer Erkrankungen [121].

Weitere Mechanismen, die in der Pathophysiologie in Betracht gezogen werden, sind die Bildung von Poren in der Zellmembran, die Hemmung des axonalen Transports sowie Schädigungen im Bereich des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien [121].

1.4.4 Aufbau des Gens

SNCA befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (4q21.3-q22) [146] und besteht aus sechs Exons [147], von denen fünf proteinkodierend sind (Abb. 1). Das Startcodon ATG wird von Exon 2, das Stopcodon TAA von Exon 6 kodiert [121]. Die mRNA kann unterschiedlich gespleißt werden, was zu vier verschiedenen Isoformen führt. Die vorherrschende Isoform ist 140 Aminosäuren lang [148]. Eine zweite Isoform besteht aus 126 Aminosäuren und entsteht durch eine Deletion des Exons 3 [149]. Bei der dritten Isoform, die aus 112 Aminosäuren besteht, wird Exon 5 heraus gespleißt [149]. Die vierte Isoform, bei der sowohl Exon 3 als auch Exon 5 fehlen, ist 98 Aminosäuren lang [150] (Abb. 1).

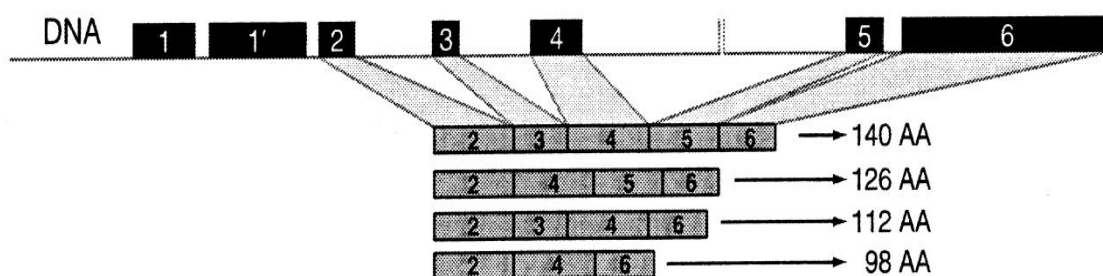


Abb. 1: *SNCA*-Gen und mRNA-Varianten:

Dargestellt sind die Exons (schwarze Boxen) im Bereich des *SNCA*-Locus. Darunter die bekannten Spleißvarianten der mRNA mit Angabe der Aminosäurelänge der jeweils daraus resultierenden Isoform (AA = Aminosäuren). (modifiziert nach [121])

SNCA wird in vielen Bereichen des Hirns stark exprimiert [5]. Der Promotor erstreckt sich auf einen Bereich ca. 10 kb upstream des Startcodons und beinhaltet zudem mindestens das erste Intron [147, 151-153]. Diese Region

enthält zahlreiche mögliche Bindungsstellen [147] sowohl für transkriptionale Enhancer- als auch für Suppressorelemente [151, 152]. Dennoch ist über die Initiation der Transkription durch solche Elemente nur wenig bekannt. Möglicherweise sind Wachstumsfaktoren wie NGF und bFGF in der Lage, die Genexpression von *SNCA* zu erhöhen [154]. Außerdem wurden acht Regionen im Promotorbereich beschrieben, die den Transkriptionsfaktor (TF) C/EBP β binden können. C/EBP β könnte die Expression von *SNCA* unter dem Einfluss von Dopamin erhöhen [155]. Darüber hinaus wurden die beiden Zinkfingerproteine GATA2 und ZSCAN21 als TF für *SNCA* identifiziert [152, 153]. Für beide konnte gezeigt werden, dass sie die Expression von *SNCA* in Zellmodellen erhöhen und dass siRNA gegen GATA2 bzw. ZSCAN21 in Lage ist, die aSYN-Level in diesen Zellen zu erniedrigen [152, 153]. Die Rolle zweier weiterer TF, ZNF219 und Pax6, ist unklar, da sie je nach Zelltyp und dem Vorhandensein bzw. Fehlen von weiteren Faktoren sowohl als Enhancer als auch als Suppressor fungieren können [152, 156]. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass 27-Hydroxycholesterol (27-OHC) über Liver X Rezeptoren (LXR) an den *SNCA*-Promotor bindet und die Expression des Gens erhöht [157]. Auf TF, die für diese Arbeit wichtig sind, wird im Abschnitt 1.5 eingegangen.

Darüber hinaus scheinen Polymorphismen im *SNCA*-Gen die Expression zu beeinflussen. Zunächst wurde dabei ein Dinukleotid-Repeat-Polymorphismus (NACP-Rep1) im 5'-Promotor entdeckt, der abhängig von seiner Länge mit einem erhöhten Risiko einhergeht, an einem Parkinson-Syndrom zu erkranken [158]. Dieses Risiko lässt sich möglicherweise auf eine erhöhte Transkription zurückführen [151], was sich im Einklang mit dem Effekt der bereits erwähnten Gen-Multiplikationen befindet, die zu seltenen familiären Parkinson-Erkrankungen führen. Neben diesem Dinukleotid-Polymorphismus zeigte sich, dass Polymorphismen einzelner Nukleotide, die vor allem in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten vorkommen, mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einem IPS zu erkranken [159]. Auch in diesen Fällen lässt sich das Risiko wahrscheinlich auf erhöhte aSYN-Level zurückführen [160]. Auf diese sog. Single-nucleotide-polymorphisms (SNPs) wird im Abschnitt 1.6 näher eingegangen.

1.5 Transkriptionsfaktoren für SNCA

Bisher wurden in der Literatur im Wesentlichen sechs TF beschrieben, die die Genexpression von SNCA steuern könnten [152, 153, 155-157]. In dieser Arbeit wurden drei dieser TF (C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21) untersucht, die im Folgenden näher charakterisiert werden. Diese wurden ausgewählt, da sie zum Beginn der Untersuchungen am ehesten als aktivierende Elemente der Genexpression von SNCA infrage kamen. Bei den TF ZNF219 und Pax6 ist unklar, ob sie als Enhancer oder Suppressor fungieren [152, 156]. 27-OHC wurde erst später identifiziert [157].

1.5.1 C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta)

Der TF C/EBP β gehört zur Familie der C/EBP-TF, die aus mindestens fünf eindeutig dieser Familie zuordenbaren Isoformen besteht (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ϵ) [161]. C/EBP β hat eine molekulare Masse von 32 kDa [161] und wurde zuerst als TF für leberspezifische Gene beschrieben [162]. Später zeigte sich, dass der TF an der Regulation des Wachstums und der Differenzierung vieler verschiedener Zelltypen beteiligt ist [163]. Dies gilt insbesondere auch für neuronale Zellen [163]. Wie alle C/EBP-TF hat auch C/EBP β eine hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne und zählt zu den Leucin-Zipper-TF [161, 163]. TF aus der C/EBP-Familie interagieren häufig miteinander oder mit TF aus anderen TF-Familien, um dann als Dimer an die DNA binden zu können [161, 164]. Das Gen, das für C/EBP β kodiert, befindet sich auf Chromosom 20q13.1 [165] und wird in vielen verschiedenen Zelltypen und Geweben exprimiert [164], darunter auch neuronale [166]. In Bezug auf den Menschen wurde das Protein bisher lediglich im frontalen Kortex nachgewiesen [167]. Für die Aktivität des TF scheinen auch posttranskriptionale Modifikationen eine Rolle zu spielen [161]. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivität beispielsweise durch Phosphorylierung ansteigt [168, 169].

1.5.2 GATA2

Der TF GATA2 hat eine molekulare Masse von ca. 50 kDa [170] und gehört zur Familie der GATA-TF, die aus sechs Isoformen besteht [171]. Diese werden mit

GATA1-6 bezeichnet und können in zwei Gruppen eingeteilt werden [172]: Die TF GATA1-3 kommen hauptsächlich in Zellen der Hämatopoese vor und sind dort wichtig für die Differenzierung von myeloischen und lymphatischen Zellen. Dagegen finden sich die TF GATA4-6 hauptsächlich in Geweben meso- und endodermalen Ursprungs. Darüber hinaus zeigte sich jedoch, dass GATA2 und GATA3 auch in Hirn und Rückenmark exprimiert werden und dort in Entwicklungsprozesse involviert sind [173, 174]. Im Hinblick auf menschliches Hirngewebe konnte GATA2 in der SN und im frontalen Kortex auf Proteinebene nachgewiesen werden [153]. Die DNA-Bindungsdomäne der GATA-TF ist hoch konserviert [171] und entspricht der Konsensussequenz (T/A)GATA(A/G), die erstmals durch Evans *et al.* beschrieben wurde [175]. Von dieser Sequenz leitet sich auch der Name der TF-Familie ab. Die DNA-Bindungsdomäne besteht aus zwei Zinkfingern, die nicht nur für die Bindung an die DNA sondern auch für Interaktionen mit anderen Transkriptions- und/oder Co-Faktoren wichtig sind [171]. Für die Bindungseigenschaften der GATA-TF sind diese Interaktionen ebenso wichtig wie posttranskriptionale Modifikationen [171].

1.5.3 ZSCAN21 (zinc finger and SCAN domain containing 21)

ZSCAN21 gehört wie die GATA-TF zur großen Gruppe der Zinkfinger-TF [176], die eine der größten Proteingruppen des menschlichen Genoms darstellen [177]. Da ZSCAN21 zusätzlich über eine sog. SCAN-Domäne verfügt, ein evolutionär konserviertes Motiv aus 84 Aminosäuren [176, 178], kann es dieser Subgruppe der Zinkfinger-TF zugeordnet werden, die ausschließlich bei Wirbeltieren zu finden ist [177]. Beim Menschen sind 64 derart aufgebaute TF beschrieben worden [176]. Wie fast alle TF dieser Subgruppe besteht ZSCAN21 aus Cys₂His_s-Zinkfingerproteinen vom *Krüppel*-Typ [176]. Dabei besitzt das Protein sieben solcher Zinkfinger, die am C-Terminus lokalisiert sind [176, 179]. Diese Zinkfinger dienen nicht nur zur DNA-Bindung, sondern sind auch für Interaktionen mit anderen zellulären Faktoren wichtig [176, 178]. Bei der SCAN-Domäne handelt es sich um eine N-terminal lokalisierte Region des Proteins, die reich an Leucin ist [178] und über die es zu Interaktionen mit anderen Regionen innerhalb eines ZSCAN21-Proteins aber auch zu anderen

Proteinen kommen kann [180]. Sowohl über die Zinkfinger als auch über die SCAN-Domäne bildet ZSCAN21 Homo- und Heterodimere aus, die entscheidend für die DNA-Bindung sind [176, 178]. Die Funktion vieler Zinkfinger-TF, die eine SCAN-Domäne enthalten, ist bisher unbekannt. ZSCAN21 konnte zunächst mit der Spermatogenese [179] sowie mit der Proliferation von Vorläuferzellen während der Embryogenese des Kleinhirns und der Haut [181] in Verbindung gebracht werden. Der TF wird wie viele TF dieser Gruppe relativ schwach in vielen Geweben exprimiert, u.a. auch im ZNS [176, 182]. Bislang gab es jedoch keine Studie, die den TF in menschlichem Hirngewebe auf Proteinebene nachgewiesen hat. Die molekulare Masse des Proteins wird mit ca. 54 kDa angegeben [183].

1.6 Single-nucleotide-polymorphisms (SNPs)

1.6.1 Überblick

Durch Sequenzierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Genome verschiedener Menschen zu 99,9% identisch sind [184]. Damit unterscheiden sich Individuen in 0,1% der DNA-Sequenz, was bei einer Genomgröße von ca. 3×10^9 Basenpaaren [185] 3 000 000 Basenpaaren entspricht. Etwa 90% dieser Unterschiede gehen auf einzelne Basenpaarvariationen zurück [186] und werden mit dem englischen Begriff Single-nucleotide-polymorphism (SNP) bezeichnet. In der Terminologie werden diese Einzel-Nukleotid-Variationen oftmals willkürlich von den „klassischen Mutationen“ dadurch abgegrenzt, dass SNPs in der allgemeinen Bevölkerung mit einer Frequenz $\geq 1\%$ vorkommen [187]. Die restlichen 10% der Basenpaarvariationen werden beispielsweise durch sog. Mini- oder Mikrosatelliten, Wiederholungen einfacher Sequenzmotive wie A, AC, AAT, AAC u.a. [185, 188], oder auch durch kleinere Insertionen und Deletionen (sog. „InDels“) ausgemacht, die bereits vor den SNPs entdeckt wurden. Heute sind insgesamt etwa 18 Millionen SNPs in den menschlichen Genomen beschrieben [189]. SNPs sind nicht gleichmäßig über das Genom hinweg verteilt, sondern kommen an manchen Stellen wesentlich häufiger vor als an anderen [190]. Außerdem zeigte sich, dass SNPs i.d.R. nur zwei und nicht drei oder vier Allele besitzen, wie man zunächst vermuten

würde. Da jedes der vier Nukleotide an jeder Stelle des Genoms vorkommen kann, ist dies prinzipiell zwar möglich [188, 190], tatsächlich kommen tri- oder tetraallelische Polymorphismen jedoch fast nicht vor [190]. Der Grund hierfür ist, dass SNPs durch Punktmutationen entstehen, die relativ stabil weitervererbt werden und es äußerst unwahrscheinlich ist, dass in den nachfolgenden Generationen erneut eine Mutation an genau der gleichen Stelle auftritt [188]. Das häufigere der beiden Allele wird dabei als „major allele“ das seltenere als „minor allele“ bezeichnet und die Häufigkeit in einer Population dementsprechend als „major allele frequency“ bzw. als „minor allele frequency“ angegeben [187]. SNPs können eingeteilt werden in solche, die in kodierenden Regionen vorkommen und in SNPs, die in nicht-kodierenden Regionen liegen [187, 190]. SNPs in kodierenden DNA-Regionen sind wesentlich seltener und werden weiter unterteilt in synonyme und nicht-synonyme kodierende SNPs [187, 190, 191]. Im Gegensatz zu den nicht-synonymen SNPs verändern synonyme SNPs die Aminosäuresequenz des Proteins, für das der jeweilige DNA-Abschnitt kodiert, nicht [187, 191]. Der Zusammenhang zwischen nicht-synonymen SNPs und bestimmten Erkrankungen scheint offensichtlich: Durch eine veränderte Aminosäuresequenz eines Proteins ändert sich dessen Struktur und damit auch seine Funktion [187]. Dennoch können auch synonyme SNPs und SNPs in nicht-kodierenden Regionen mit bestimmten Erkrankungen in Verbindung gebracht werden [159, 192, 193]. Sie verändern zwar nicht direkt die Aminosäuresequenz, sie können jedoch indirekt die Transkription und Translation eines Proteins beeinflussen [187, 191]. Denkbar ist, dass solche SNPs die Bindung von TF oder anderen regulatorischen Proteinen an die DNA verändern [191, 194]. Durch nicht-kodierende oder synonyme SNPs kann es zudem zu einem alternativen Spleißen der mRNA kommen [195]. Außerdem können sich solche SNPs auf die RNA-Stabilität und Sekundärstruktur auswirken [196]. Letztlich könnte die Geschwindigkeit und die Genauigkeit der Translation beeinflusst werden, beispielsweise dadurch, dass der Pool an tRNA passend zu den alternativen Codons begrenzt ist [191]. Im Folgenden wird auf die Bedeutung solcher SNPs für das IPS sowie für die MSA und die DLB eingegangen.

1.6.2 Zusammenhänge zwischen SNPs im SNCA-Gen und dem IPS

Wie bereits im Abschnitt 1.4.4 erwähnt konnten einige SNPs im SNCA-Gen identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einem IPS zu erkranken [159, 197-199]. Dabei zeigte die Studie von Müller *et al.* [159], dass heterozygote Träger des Risikohaplotyps ein 1,4-fach erhöhtes Risiko haben, an Parkinson zu erkranken. Das relative Risiko für homozygote Träger betrug ca. 2. Die durch die vier Studien identifizierten SNPs finden sich vor allem im 5'-Promotorbereich und in der 3'-Region von SNCA. Keiner dieser SNPs befindet sich in einer kodierenden Region. Wie diese SNPs das Risiko genau beeinflussen ist unklar. Allerdings konnten mehrere Studien zeigen, dass SNPs, die das Risiko erhöhen, an einem IPS zu erkranken, mit erhöhten aSYN-Level im Blut und Hirn einhergehen [160, 200, 201]. Daher scheinen diese SNPs die Expression von SNCA zu beeinflussen. Wie SNPs in nicht-kodierenden Regionen die Genexpression verändern können, wurde bereits in Abschnitt 1.6.1 geschildert. Allerdings ist unklar, ob diese Mechanismen durch die identifizierten SNPs selbst oder durch andere Polymorphismen, die mit diesen SNPs zusammen vererbt werden, ausgelöst werden. Genomweite Assoziationsstudien konnten jedoch bestätigen, dass SNPs in nicht-kodierenden Regionen des SNCA-Gens mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einem IPS zu erkranken [124].

1.6.3 Zusammenhänge zwischen SNPs im SNCA-Gen und der MSA sowie der DLB

Bisher wurden nur sehr wenige Studien publiziert, die sich mit den Zusammenhängen zwischen SNPs im SNCA-Gen und der MSA bzw. der DLB befassen. Besonders für die DLB ist die Datenlage gering. Die größte Studie hierzu, die erstmals signifikante Ergebnisse zeigt, wurde erst kürzlich veröffentlicht [202].

Im Gegensatz zur Parkinson-Erkrankung wurden bislang keine Mutationen im SNCA-Gen entdeckt, die zu einer erblichen Form der MSA führen. Da die sporadisch auftretende Erkrankung jedoch auch aSYN-Ablagerungen aufweist [49], liegt der Verdacht nahe, dass ähnliche genetische Mechanismen wie beim

sporadisch auftretenden IPS eine Rolle spielen könnten. Tatsächlich konnten einige Studien eine Assoziation zwischen SNPs im *SNCA*-Gen und dem Auftreten einer MSA nachweisen [192, 203, 204]. Das Risiko lag dabei je nach SNP und Studie für heterozygote Träger des Risikohaplotyps bei 1,3-1,75-fach und für homozygote Träger bei bis zu 5,9-fach höher als ohne Risikohaplotyp [192, 204]. Die durch die Studien identifizierten SNPs befinden sich im Intron 4 und in der 3'-Region von *SNCA*. Wie beim IPS liegt keiner dieser SNPs in einer kodierenden Region. Aufgrund dieser Befunde kann ein ähnlicher Mechanismus wie beim IPS angenommen werden, auch wenn es bislang keine Studien gibt, die den Zusammenhang zwischen der Gendosis und den Risiko-SNPs untersucht haben.

Lange Zeit existierte nur eine Studie [193], die die Zusammenhänge zwischen SNPs im *SNCA*-Gen und der DLB untersuchte. In dieser zeigte sich zwar ein Trend, dass die DLB mit bestimmten SNPs assoziiert sein könnte, statistische Signifikanz konnte jedoch für keinen dieser SNPs nachgewiesen werden. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Bras *et al.* [202] konnte nun eine statistisch signifikante Assoziation zwischen SNPs im *SNCA*-Gen und der DLB nachgewiesen werden. Besonders interessant an diesen Ergebnissen ist, dass andere SNPs als beim IPS statistische Signifikanz zeigten. Bei der DLB liegen diese vermehrt in der 5'-Region, beim IPS eher in der 3'-Region von *SNCA*. Gemeinsam ist den SNPs erneut, dass sie in nicht-kodierenden Regionen liegen. Es kann folglich auch für die DBL ein ähnlicher Mechanismus wie beim IPS und der MSA angenommen werden, auch wenn diese Annahme noch durch weitere Studien belegt werden muss.

1.7 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Wie aus den vorherigen Abschnitten hervorgeht sind besonders das IPS und die DLB häufige Erkrankungen, für die bislang keine kausale Therapie existiert. Dies stellt uns bereits heute vor große Herausforderungen und wird es zukünftig noch stärker, da mit der zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung damit zu rechnen ist, dass die Zahl dieser Erkrankungen weiter ansteigen wird. Eine zentrale Stellung für diese Erkrankungen nimmt das *SNCA*-Gen bzw. sein

Genprodukt α SYN ein. Diese konnten sowohl auf genetischer als auch auf pathologischer Ebene mit dem IPS, der MSA und der DLB in Verbindung gebracht werden. Für die Pathogenese scheint besonders die Gendosis entscheidend zu sein. Dies gilt insbesondere für die häufigste Erkrankung unter den Synukleinopathien, dem sporadisch auftretenden IPS. Ein entscheidender Schritt in der Genexpression und damit für die Gendosis ist die Initiation der Transkription durch TF. Dies ist auch im Hinblick auf eine zukünftige kausale Therapie wichtig, da TF einen pharmakologischen Ansatzpunkt bieten, um die Genexpression zu modulieren. Über TF des *SNCA*-Gens ist bisher nur wenig bekannt. Sämtliche Erkenntnisse beruhen auf Untersuchungen an speziellen Zellmodellen. Zentrale Fragestellungen dieser Arbeit sind deshalb:

- Sind die bisher identifizierten TF für *SNCA* auf Proteinebene in menschlichem Hirngewebe vorhanden, und wenn ja
- binden diese tatsächlich an die DNA und spielen so als Initiatoren der Transkription eine wichtige Rolle in der Genexpression?
- Falls sich solche Interaktionen nachweisen lassen: Wie sind die Bindungseigenschaften der TF an die DNA beschaffen?

Da auch SNPs die Genexpression von *SNCA* verändern können und dies u.a. durch die Beeinflussung der Bindung von TF an die DNA geschehen könnte, ergab sich eine weitere Fragestellung:

- Falls sich Interaktionen der identifizierten TF mit der DNA nachweisen lassen: Sind die Bindungsstellen der TF bei IPS-Patienten durch SNPs verändert?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Software

Allgemein benutzte Geräte

Autoklav	Systec VX-150, Systec GmbH, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph MR 3000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
pH-Meter	SCHOTT [®] Instruments BlueLine Elektroden, SI Analytics GmbH, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research Plus, Eppendorf AG, Deutschland
Schüttler	Stuart gyro-rocker SSL3, Bibby Scientific, UK
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Deutschland und HTM130, HLC Biotech, Deutschland
Waagen	OHAUS Explorer [®] Pro, Ohaus Europe GmbH, Schweiz und SI-234, Denver Instrument GmbH, Deutschland
Wasseraufbereitung	Millipore Wasseraufbereitungsanlage mit Millipak 0,22 µm Filter, Millipore, USA
Wasserbad	WB 10, P-D Industriegesellschaft mbH, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf Centrifuge 5415D und Eppendorf Centrifuge 5810 R, alle Eppendorf AG, Deutschland sowie Biofuge pico, Heraeus Holding GmbH, Deutschland

Geräte und Software für die Proteinbestimmung

ELISA-Reader	Model 680 Microplate Reader und Software, Bio-Rad Laboratories, USA
Inkubator	Binder B 28, BINDER GmbH, Deutschland

Geräte für Western Blotting, Immunopräzipitationen und EMSAs

Entwicklersystem	Fujifilm FPM 800A, FUJIFILM Japan
Gelsystem	PerfectBlue™ Double Gel System Twin S, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Homogenisierer	15 ml Tissue Grinder Dounce mit dem Einsatz „loose“, Wheaton Science Products, USA
Netzgerät	Power supply consort E 835, Rhys Scientific Ltd, UK
Elektroblotter	Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, USA

Geräte und Software für ChIP Assays und quantitative real-time PCR

DNA-Konzentrationsbestimmung	NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 und Software, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Homogenisierer	15 ml Tissue Grinder Dounce mit dem Einsatz „loose“, Wheaton Science Products, USA
Thermocycler und Thermocycler-Software	LightCycler®480 und LightCycler®3-Software, Version 3.5, Roche, Schweiz
Stab-Ultraschallgerät	Sonopuls, Bandelin electronic, Deutschland

Geräte und Software für Agarosegele und Gelelektrophorese

Digitalkamera und Software	FUSION-SL und Software, Vilber Lourmat, Frankreich
Gelsysteme	PerfectBlue™ Gelsystem Mini S, und PerfectBlue™ Gelsystem Maxi S, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland

Netzgerät Power supply consort E 835, Rhys Scientific Ltd,
UK

Geräte und Software für die Schmelzkurvenanalysen

Thermocycler und LightCycler[®]480 und
Thermocycler-Software LightCycler[®]3-Software, Version 3.5, Roche,
Schweiz

Geräte und Software für die Sequenzierungen

Sequenzierautomat und ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer und
Software Software, Applied Biosystems, USA
Software zur Pregap4 und Gap4 Software, Staden Package,
Sequenzanalyse England
Thermocycler PTC-220 Dyad PCR System, Bio-rad (MJ
Research), USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

Kit für die Proteinbestimmung

Proteinbestimmungs kit Pierce[®] BCA Protein Assay Kit von Thermo
Scientific Inc., USA

Verbrauchsmaterialien und Kits für Western Blotting, IP und EMSAs

Filme Amersham Hyperfilm[™] ECL, GE Healthcare, UK
Zellkernextraktionskit DUALXtract Nuclear and cytoplasmic protein
extraction kit, Dualsystems Biotech AG, Schweiz
PDVF-Membranen Immun-Blo[™] PVDF Membrane 0,2 µm, Bio-Rad
Laboratories, USA
Whatman-Filter-Papier Whatman-Paper, Whatman plc., England
EMSA-Kit Gelshift[™] Chemiluminescent EMSA kit, Active
Motif, Belgien
Nylonmembranen Blotting-Nylon 66 membranes, type B, positive,
Sigma Aldrich, USA

Kit für die quantitative real-time PCR

qRT-PCR-Kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Roche,
Schweiz

Kit für die Schmelzkurvenanalysen

Schmelzkurvenanalyse-Kit LightCycler® 480 High Resolution Melting Master,
Roche, Schweiz

Kit für die Sequenzierungen

Sequenzierungskit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit,
Applied Biosystems, USA

2.1.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien

Western Blotting, Immunopräzipitationen und EMSAs

Tris-Puffer	Tris-Cl pH 7,7 EDTA 1 mM EGTA 1 mM NaCl 150 mM
(+Proteaseinhibitoren)	Protease inhibitor cocktail, Roche, Schweiz
Laemmli-Puffer	Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories, USA + 5% β -Mercaptoethanol
Laufpuffer	25 mM Tris-Cl pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Transferpuffer	25 mM Tris-Cl pH 8,3 192 mM Glycin 20 % Methanol
Coomassie-Blue	50 % Methanol 0,05 % Coomassie brilliant blue R-250, Thermo Scientific Inc., USA 10 % Essigsäure 39,95 % ddH ₂ O

Entfärberlösung	5 % Methanol 7 % Essigsäure 88 % ddH ₂ O
Stripping-Lösung	62,5 mM Tris-Cl pH 7,6 2 % SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
TTBS-Puffer	50 mM Tris-Cl pH 7,4 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
4X Tris-Cl/SDS pH 6,8	0,5 M Tris-Cl pH 6,8 0,4 % SDS
4X Tris-Cl/SDS pH 8,8	1,5 M Tris-Cl pH 8,8 0,4 % SDS
TEMED	TEMED 99%, p.a., Carl Roth GmbH, Deutschland
TBE-Puffer	89 mM Tris-Cl pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
Protein A/G-Agarose- Beads	Protein A Agarose und Protein G Agarose 1:1, beide Roche, Schweiz
Blocking-Lösung	5 % Magermilchpulver in TTBS oder 5 % bzw. 10 % Western Blocking Reagent, Roche, Schweiz in TTBS
Marker	SeeBlue [®] Plus2 Prestained Standard, Invitrogen GmbH, Deutschland
Polyacrylamid	30 % Acrylamide/Bis Solution 29:1 und 40 % Acrylamide Solution, beide Bio-Rad Laboratories, USA
HRP-Lösung	Immobilon [™] Western HRP Substrate Peroxide Solution, Millipore, USA

ChIP Assays

Tris-Puffer	siehe Western Blotting, Immunopräzipitationen und EMSAs
PBS-Puffer	Dulbecco's PBS without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Österreich
Zellyse-Puffer	5 mM PIPES pH 8,0 85 mM Kaliumchlorid 0,5% NP-40 Protease inhibitor cocktail, Roche, Schweiz
Kernlyse-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,1 10 mM EDTA 1% SDS Protease inhibitor cocktail, Roche, Schweiz
ChIP-Verdünnungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0 2 mM EDTA 1% Triton X-100 150 mM NaCl
Salmon-Sperm-DNA/ Protein A/G-Agarose- Beads	Protein A Agarose und Protein G Agarose 1:1, beide Roche, Schweiz mit 500 µg/ml BSA und 200 µg/ml fragmentierter Salmon-Sperm-DNA, beide Sigma Aldrich, USA
Waschpuffer 1	20 mM Tris-HCl pH 8,0 2 mM EDTA 1% Triton X-100 0,1% SDS 150 mM NaCl 1 mM PMSF
Waschpuffer 2	20 mM Tris-HCl pH 8,0 2 mM EDTA 1% Triton X-100 0,1% SDS 500 mM NaCl

Waschpuffer 3	1 mM PMSF 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA 1% NP-40 250 mM Lithiumchlorid 1% Natriumdesoxycholat
TE-Puffer	10 mM Tris-Cl pH 8,0
Elutionspuffer	1% SDS 0,1 M Natriumhydrogencarbonat
RNase	RNase A, Sigma Aldrich, USA
Proteinase K	Proteinase K, Qiagen, Deutschland
Glykogen	Glycogen solution, 5 PRIME GmbH, Deutschland
Phenol/Chloroform/	Roti [®] P/C/I, Carl Roth GmbH, Deutschland
Isoamylalkohol 25:24:1	
Chloroform/	Roti [®] C/I, Carl Roth GmbH, Deutschland
Isoamylalkohol 24:1	
Agarosegele	
TBE	siehe Western Blotting, Immunopräzipitationen und EMSAs
Ladepuffer (10X)	20 % Ficoll 400 0,1 M Di-Natrium-EDTA pH 8,0 1 % SDS 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol
Agarose	MetaPhor [®] Agarose, Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Marker	GeneRuler [™] DNA Ladder mix, Fermentas GmbH, Deutschland
Sequenzierungen	
PCR-Puffer	GoTaq [®] Flexi Buffer
dNTPs	PCR Nucleotide Mix

Taq-Polymerase	GoTaq [®] DNA Polymerase, alle Promega, Deutschland
----------------	---

DNA-Extraktion

Erylysepuffer	155 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogenkarbonat 0,1 mM EDTA
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA
Proteinase K	siehe ChIP Assays
TE Puffer	siehe ChIP Assays

2.1.4 Primer

Alle Primer wurden mit dem Primer-designing-tool „Primer-BLAST“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) designt und durch das Tool „e-PCR“ (ebenfalls NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/epcr>) auf ihre Spezifität hin überprüft. Die durch die Primer amplifizierten DNA-Abschnitte für die qRT-PCR hatten eine Länge von 77-262 bp. Die DNA-Abschnitte für die Schmelzkurvenanalysen und Sequenzierungen hatten eine Länge von 86-148 bp. Damit die Primer spezifisch waren, waren 3 unterschiedliche Anlagerungstemperaturen nötig. Die Spezifität wurde mittels Schmelzkurvenanalyse, durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein 2%-Agarosegel oder durch beide Methoden (je nach Experiment) bestätigt. Alle Primer wurden von metabion international AG, Deutschland hergestellt und waren HPLC aufgereinigt. Die folgenden Tabellen enthalten die Sequenzen der einzelnen Primerpaare sowie die Anlagerungstemperaturen:

Tabelle 6: Primer für potentielle GATA2-Bindungsstellen (Anlag.-Temp. = Anlagerungstemperatur)

Nummer	Richtung	Sequenzen	Anlag.-Temp.
#1	Forward	5'-AGTTGATGGCTCACCCCGCG-3'	66°C
	Reverse	5'-CTGCTTCCCTGCAGCGTGC-3'	66°C
#2	Forward	5'-AAAGCCTTCTCTCCATCCTTCTTCC3'	60°C
	Reverse	5'-GAATGAGATAACACCGGGGCCCA-3'	60°C
#3	Forward	5'-TCAAATTATCTTCTCACTGGGCCCC-3'	60°C
	Reverse	5'-CCCCTTTGTTCCCACATCACATGTC-3'	60°C
#4	Forward	5'-ATTGGAGAGGACCTCCTGTTAGCTG-3'	64°C
	Reverse	5'-GCACCACTCCCTCCTTGGTTTTGG-3'	64°C
#5	Forward	5'-AGGAGGGAGTGGTGCATGGT-3'	60°C
	Reverse	5'-GGAATCTTGAATACTGGGCCACAC-3'	60°C
#6	Forward	5'-TCTGCTTTTCCAAGGGCAGACCA-3'	60°C
	Reverse	5'-ACCACAAGGAACAGGAAGCAAATGA-3'	60°C
#7	Forward	5'-CCGGTAGGCTAAATCACGCTGG-3'	60°C
	Reverse	5'-GCGGTCCTAAGGCTTTTCGCTC-3'	60°C
#8	Forward	5'-CTGGCAGGCGCTGATTGGTGG-3'	66°C
	Reverse	5'-CCGGAAGGGTCCTGAGGGTGA-3'	66°C
#9	Forward	5'-GCTGCCACCATGATTAAGTGTTCA-3'	60°C
	Reverse	5'-GGCCTATTTTCAGTACTGGCTGAAG-3'	60°C
#10	Forward	5'-AAGTAAGCAAGCTGCGTTTGGCA-3'	60°C
	Reverse	5'-CCCGAGGGGGCGTTCTCAG-3'	60°C
#11	Forward	5'-AAAAGAGGGACCTGCCAACAGGCTC-3'	60°C
	Reverse	5'-CGTACCGGGAGAGTGGGGTGGA-3'	60°C
#12	Forward	5'-TGTTTTCCAGTGTGGTGTAAAGGAA-3'	60°C
	Reverse	5'-CCATCACTCATGAACAAGCACCA-3'	60°C

Tabelle 7: Primer für potentielle C/EBP β -Bindungsstellen (Anlag.-Temp. = Anlagerungstemperatur)

Nummer	Richtung	Sequenzen	Anlag.-Temp.
#1	Forward	5'-AGTCTCACACTTTGGAGGGTTTCTC-3'	60°C
	Reverse	5'-AGCCACAACCTCCCTCCTTGGC-3'	60°C
#2	Forward	5'-CCTTCTTGCTCTGGTCCTAAGC-3'	60°C
	Reverse	5'-CCACAAGGAACAGGAAGCAAATGAT-3'	60°C
#3	Forward	5'-GGGCAGACCAATAGTTCAAGGAAG-3'	60°C
	Reverse	5'-ATGCTTTGTCTGATTCTTGCCT-3'	60°C
#4	Forward	5'-CATTTGCTTCTGTTCCCTTGTGGT-3'	60°C
	Reverse	5'-TGCTTTGTCTGATTCTTGCCTAA-3'	60°C

Tabelle 8: Primer für potentielle ZSCAN21-Bindungsstellen (Anlag.-Temp. = Anlagerungstemperatur)

Nummer	Richtung	Sequenzen	Anlag.-Temp.
#1	Forward	5'-TCGGCTCTCCCAGGGCGACTC-3'	60°C
	Reverse	5'-GTGGAGATCGGGAGCGGTTGGG-3'	60°C
#2	Forward	5'-GAATGGTCGTGGGCACCGGG-3'	66°C
	Reverse	5'-GCGGATCCCGGAGAAGCAGC-3'	66°C

Tabelle 9: Primer für Amyloid Precursor Protein (Anlag.-Temp. = Anlagerungstemperatur)

Name	Richtung	Sequenzen	Anlag.-Temp.
APP	Forward	5'-GGCCAACATGATTAGTGAACC-3'	60°C
	Reverse	5'-ACAGAGTCAGCCCCAAAAGA-3'	60°C

Tabelle 10: Primer für die Schmelzkurvenanalysen und Sequenzierungen (Anlag.-Temp. = Anlagerungstemperatur)

Bindungsstelle	Richtung	Sequenzen	Anlag.-Temp.
GATA2	Forward	5'-TCAAATTATCTTCTCACTGGGCCCC-3'	64°C
	Reverse	5'-CCCCTTTGTTCCCACATCACATGTC-3'	64°C
ZSCAN21	Forward	5'-GTCGACCCTCAGGCCCTCGG-3'	64°C
	Reverse	5'-TCGGGAGCGGTTGGGCTAGG-3'	64°C

2.1.5 Antikörper

Die folgenden Tabellen listen alle verwendeten Antikörper auf. Primäre Antikörper wurden für Western Blots, Immunopräzipitationen und für die ChIP Assays eingesetzt. Sekundärantikörper waren peroxidasegekoppelt und dienten dazu, die Primärantikörper, die für Western Blots und Immunopräzipitationen eingesetzt wurden, sichtbar zu machen.

Tabelle 11: Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
GATA2	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz (H-116)
C/EBPβ	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz (C-19)
ZSCAN21	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz (H-68)

Tabelle 12: Sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller
Kaninchen	Ziege (polyklonal)	Thermo Scientific, Pierce (31461)

2.1.6 Proben

***Post mortem* Hirngewebe für Western Blots, Immunopräzipitationen und ChIP Assays**

Zugang zu den humanen Hirngewebeproben bestand durch die Deutsche Brain Bank („Brain-Net“). Das Gewebe wurde nach dem Tod der Spender, die sich Zeit ihres Lebens nach umfassender Aufklärung freiwillig hierfür entschieden hatten, entnommen und unbehandelt schockgefroren (-80°C). Die Spender litten an keiner neurologischen oder psychiatrischen Erkrankung. Dies wurde soweit möglich auch histologisch bestätigt. Die Gewebeproben stammten aus unterschiedlichen Hirnregionen (frontaler Cortex, Gyrus cinguli, Medulla oblongata). Die Spender hatten ein Alter von 67-78 Jahre und waren sowohl männlichen als auch weiblichen Geschlechts. Bis die Proben verwendet wurden, waren sie stets bei -80°C eingefroren, wurden dann auf Eis aufgetaut und direkt verwendet.

DNA-Proben für das Screening nach SNPs

Zugang zu den DNA-Proben bestand durch die Biobank des Hertie Instituts für klinische Hirnforschung, Tübingen. Die DNA stammte ausschließlich von Patienten, die an einem idiopathischem Parkinson-Syndrom erkrankt waren. Die Diagnosestellung erfolgte anhand der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Kriterien ([27] und Abschnitt 1.2.1) und wurde von Spezialisten für Bewegungsstörungen getroffen. Das Alter der Patienten lag zwischen 25 und 87 Jahren (Mittel: 64 Jahre). Es wurde die DNA von 150 Frauen und 150 Männern untersucht. Die DNA-Extraktion aus Vollblut erfolgte anhand eines etablierten Protokolls (siehe Abschnitt 2.2.1).

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Es wurden jeweils 10 ml EDTA-Blut in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und dieses zur Aufspaltung der Blutzellen mit Erylysepuffer aufgefüllt. Nach einer kurzen Inkubationszeit (10 min bei -20°C) wurden die Röhrchen zentrifugiert (10 min, 1700 U/min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde erneut in 30 ml Erylysepuffer gelöst, 10 min bei -20°C inkubiert, anschließend abzentrifugiert (10 min, 1700 U/min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das jetzt verbleibende Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer gelöst und die noch vorhandenen Proteine durch die Zugabe von 500 μl 10% SDS-Lösung und 5 μl Proteinase K (20mg/ml) aufgespalten und denaturiert. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2,5 ml NaCl-Lösung (5M) hinzugegeben, gevortext und 10 min bei 4°C mit 2700 U/min zentrifugiert. Dadurch setzten sich die verbliebenen Proteine als Pellet ab. Der Überstand, in dem die DNA gelöst war, wurde nun in ein mit 15 ml 100%igem Ethanol gefülltes Röhrchen überführt und das Röhrchen über Kopf geschwenkt bis die DNA ausfiel. Die ausgefallene DNA wurde am Rand des Röhrchens abgefangen und das Ethanol verworfen. Nach zwei Waschschrritten mit jeweils 10-15 ml 70%igem Ethanol wurde die DNA in ein neues Röhrchen überführt und je nach Größe des Pellets in 200-500 μl TE-Puffer gelöst. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels eines NanoDrop Spectrophotometers bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.2) und die Röhrchen bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mittels eines PEQLAB NanoDrop Spectrophotometers bestimmt. Das Gerät bestimmt die optische Dichte (OD) bei 260 nm der Probe im Vergleich zum Leerwert und berechnet damit nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die DNA-Konzentration. Dabei wird beachtet, dass eine OD bei 260 nm von 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA entspricht.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte wurden auf 2%igen Agarosegelen, die DNA-Fragmente nach der Ultraschall-Fragmentierung bei den ChIP Assays auf 1%igen Gelen aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die gewünschte Menge an Agarose in 0,5X TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst, anschließend 0,5 µg Ethidiumbromid/ml hinzugegeben und die Gele dann zur Aushärtung in die gewünschten Gelkammern gegossen. Die Laufbedingungen für Agarosegele in kleinen Gelkammern waren $U = 120 \text{ V}$ für 60-90 min, für Gele in großen Gelkammern wurde $U = 200 \text{ V}$ für ebenfalls 60-90 min gewählt. Zu jeweils 10 µl DNA in Lösung wurden 2 µl 10 X Ladepuffer gegeben und anschließend ca. 10 µl davon in die Geltaschen gefüllt. Die Proben wurden dann mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera abfotografiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden jeweils 4 µl eines kommerziellen Markers eingesetzt (GeneRuler™ DNA Ladder mix).

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit nach der Methode der Biuretreaktion. Dabei entstehen blauviolette Komplexverbindungen aus Kupfer(II)ionen der Bioretlösung und den Peptidverbindungen der Proteine. Je mehr Peptidverbindungen und damit auch Proteine vorhanden sind, desto mehr Komplexe entstehen. Anhand der Stärke des Farbumschlags kann so mittels einer Eichkurve aus Standards auf die Proteinkonzentration geschlossen werden. Es wurde dabei verfahren, wie in der Gebrauchsanweisung angegeben: In eine 96-Well-Mikroplatte wurden pro Ansatz zu 25 µl Standard oder unbekannter Probe jeweils 200 µl Farbreagenz gegeben und diese 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Absorptionen bei 550 nm mit einem ELISA-Reader gemessen. Die Standards zur Erstellung der Eichkurven hatten eine Proteinkonzentration von 25 µg/µl aufsteigend bis 1500 µg/µl. Damit die Absorptionen der Proben sicher in den linearen Bereich der Eichkurve fielen, wurden Verdünnungsreihen hergestellt, anhand derer die Gesamtproteinkonzentration berechnet wurde. Alle Messungen wurden als Duplett durchgeführt.

2.2.5 Extraktion der Kernproteine aus den Hirngewebeproben zur Immunodetektion und für die EMSAs

Die Kernproteine wurden mittels des DUALXtract Nuclear and cytoplasmic protein extraction Kits gewonnen. Es wurde dabei folgendermaßen verfahren: Ca. 0,5 cm³ Hirngewebe wurden auf Eis aufgetaut und mit kaltem PBS-Puffer gespült. Anschließend wurde das Gewebe in PBS-Puffer zusammen mit Proteaseinhibitoren in einem Homogenisierer homogenisiert. Verbleibende größere Gewebestücke wurden durch Filtration des Homogenisats entfernt. Die übrige Lösung wurde 5 min mit 250 x g bei 4°C zentrifugiert. Dabei setzten sich die Zellen am Boden des Tubes ab. Diese wurden nun mit „Cell lysis buffer“, dem Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt wurde, versetzt, gevortext und 10 min inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (7min, 500 x g, 4°C) wurde die zytoplasmatische Proteinfraction von der nukleären getrennt und verworfen. Die verbleibende Zellkernfraction wurde zweimal mit „Nuclei washing buffer“, dem DTT und Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden, gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in „Nuclei storage buffer“, dem ebenfalls DTT und Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden, gelöst. Dieser Lösung wurde nun „Nuclei lysis reagent“ hinzugefügt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Das so entstandene Kernlysate wurde durch einen letzten Zentrifugationsschritt (5 min, 20000 x g, 4°C) aufgereinigt.

2.2.6 Western Blotting

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte mit Trenngelen, die eine Gesamtpolyacrylamidkonzentration von 10% hatten (Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, pH 8,8). Es wurde das von Laemmli entwickelte diskontinuierliche System verwendet, bei dem die Proteine zunächst in einem Sammelgel (3,9% Polyacrylamid, Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, pH 6,8) aufkonzentriert und anschließend im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Hierzu wurden die Gelkammern zusammengebaut und als erstes die Trenngele (10% Acrylamid, 0,27% Bisacrylamid, 1 X Tris-Cl/SDS pH 6,8 sowie 25 µl 10% APS und 5 µl TEMED je 5 ml Ansatz) gegossen. Um eine scharfe Linie zwischen den Trenn- und

Sammelgelen zu erhalten, wurden die Trenngele mit Isopropanol überschichtet, das nach der Aushärtung wieder entfernt wurde. Sobald die Trenngele auspolymerisiert waren, wurden die Sammelgele (3,9% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid, 1 X Tris-Cl/SDS pH 8,8 sowie 50 µl 10% APS und 10 µl TEMED je 15 ml Ansatz) hergestellt, diese auf die Trenngele gegossen und die gewünschten Kämme eingesetzt. Bei beiden Gelarten wurden TEMED (Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) als letztes hinzugefügt, da durch TEMED als Katalysator und APS als Radikalbildner die Polymerisation des Acrylamids in Gang gesetzt wurde. Als das Gel vollständig auspolymerisiert war, wurden die Kämme für die Taschen entfernt und das System mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinlysate (Lysate der Kernproteine) wurden 1:1 mit Laemmli-Puffer (+β-Mercaptoethanol) vermengt und bei 85°C ca. 20 min in einem Wasserbad denaturiert. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde die gewünschte Menge an Lysat in die Geltaschen geladen. Zur Größenbestimmung wurden 7,5 µl eines kommerziellen Markers eingesetzt (SeeBlue[®] Plus2 Prestained Standard). Für die Negativkontrollen wurde bovines Serumalbumin anstatt der Lysate der Kernproteine verwendet. Positivkontrollen wurden nicht integriert, da GATA2 und C/EBPβ bereits auf Proteinebene in frontalem Kortex nachgewiesen werden konnten [153, 167] und somit die Proben aus dem Gewebe des frontalen Kortex' als indirekte Positivkontrollen dienten. Darüber hinaus konnte über den Abgleich des Molekulargewichts sichergestellt werden, dass die richtigen Proteine detektiert wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromspannung von 40 V bis die Proben das Trenngeld erreicht hatten. Dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

Elektroblotting

Die separierten Proteine aus den SDS-PAGE-Gelen wurden mittels eines Elektroblotters auf eine PVDF-Membran transferiert. Nachdem die PVDF-Membranen 10 min in Methanol aktiviert und anschließend wenige Minuten in Wasser getaucht worden waren, wurde sie zusammen mit den Schwämmen und dem Whatman-Filter-Papier in einer Schale mit Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurden die Membranen auf einen Schwamm und ein

Whatman-Filter-Papier gelegt. Das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel wurde passend auf einer Membran positioniert und anschließend ein weiteres Filterpapier und ein weiterer Schwamm aufgelegt. Dann wurde die Presse geschlossen und in den mit Transferpuffer gefüllten Tank-Blotter gehängt. Dabei wurden die Membranen zur Anode und die Gele zur Kathode hin ausgerichtet, um die durch das SDS negativ geladenen Proteine in den Gelen in Richtung des positiven Pols auf die Membranen zu transferiert (Abb. 2). Der Transfer erfolgte bei 100 V für 2 h bei 4°C.

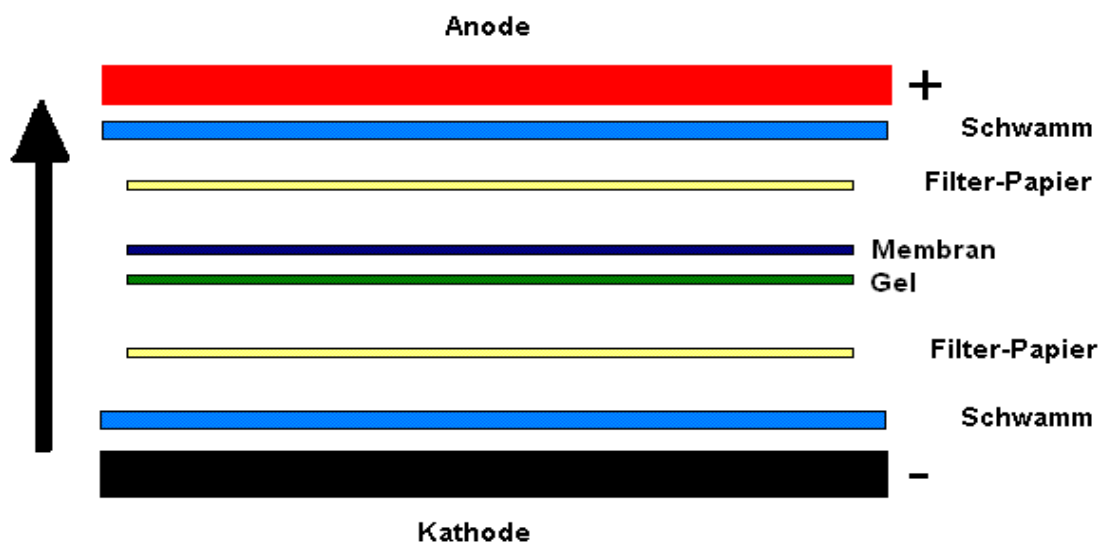


Abb. 2: Schemazeichnung ElektrobloTTing:
Die negativ geladenen Proteine auf dem Gel werden in Pfeilrichtung zur Anode auf die PVDF-Membran übertragen. (modifiziert nach [205])

Coomassie-Blue-Färbung und Immunodetektion der Proteine

Nach dem Transfer wurden die PVDF-Membranen zunächst kurz in TTBS-Puffer gegeben und dann 2 h in Blocking Lösung geblockt. Die Gele wurden zwischenzeitlich in Coomassie-Blue-Lösung gegeben, für 2 h gefärbt und danach mit Entfärberlösung behandelt, um die Qualität des Transfers beurteilen zu können. Nach dem Blocken der PVDF-Membranen, das unspezifische Wechselwirkungen mit dem Antikörper verhindern sollte, wurde die Blocking Lösung abgegossen und der gewünschte Primärantikörper (siehe Abschnitt 2.1.5) im Verhältnis 1:1000 in Blocking Lösung dazugegeben. Die Membranen

wurden über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung mit dem Primärantikörper entfernt und die Membranen dreimal 5 min mit TTBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Sekundärantikörper (Peroxidase gekoppelt; siehe Abschnitt 2.1.5) im Verhältnis 1:15000 in Blocking Lösung hinzugegeben und die Membranen 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Entfernen des Sekundärantikörpers folgten fünf Waschschriffe für jeweils 5 min in TTBS-Puffer. Die Detektion erfolgte mit der Immobilon™ Western HRP Substrate Peroxide Solution. Dabei katalysiert die Peroxidase die Chemolumineszenzreaktion des in der Lösung enthaltenen Luminols. Nachdem die Membranen 1 min in dieser Lösung inkubiert worden waren, konnten die Signale auf autoradiografischen Filmen nachgewiesen werden.

„Stripping“ von Membranen

Nach der Immunodetektion konnten die Membranen erneut – auch mit anderen Antikörpern – verwendet werden. Um die gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln mit der Stripping-Lösung behandelt, diese abgegossen und anschließend die Membranen dreimal 5 min mit TTBS-Puffer gewaschen. Danach konnten die Membranen erneut geblockt und die Proteine mittels Primär- und Sekundärantikörper wie beschrieben sichtbar gemacht werden.

2.2.7 Immunopräzipitationen (IP)

Bei den IP wurden die nachzuweisenden Proteine zunächst durch Antikörper und Agarose-Beads aus dem Kernproteinlysate extrahiert, dadurch aufkonzentriert und erst dann per Western Blotting sichtbar gemacht. Dazu wurden 500 µl des Proteinlysats in einer Konzentration von $c = 1 \text{ mg/ml}$ eingesetzt. In einem ersten Schritt wurde dem Lysat 50 µl einer Suspension aus Protein A/G-Agarose-Beads hinzugefügt. Der Ansatz wurde 1 h bei 4°C rotierend inkubiert, anschließend die Agarosebällchen bei 6000 x g für 2 min bei 4°C abzentrifugiert und dann der Überstand verwendet, um unspezifische Bindungen der Protein-A- und Protein-G-Agarose mit Lysatbestandteilen zu vermeiden. Zu dem Überstand wurden 2 µg des gewünschten Antikörpers

hinzupipettiert und der Ansatz bei 4°C über Nacht rotierend inkubiert. Für die Negativkontrollen wurde ein irrelevanter Antikörper des gleichen Isotyps verwendet. Am folgenden Tag wurde den Ansätzen jeweils 50 µl der Protein A/G-Agarose-Beads hinzugegeben und damit 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Agarosebällchen mit den anhaftenden Immunkomplexen 2 min mit 16000 x g bei 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Die verbleibenden Pellets wurden mit jeweils 500 µl Tris-Puffer mit Proteaseinhibitoren zweimal gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in jeweils 50 µl Tris-puffer mit Proteaseinhibitoren gelöst. Diese Lösungen wurden dann 1:1 mit Laemmli-Puffer vermengt, bei 85°C ca. 20 min in einem Wasserbad denaturiert und anschließend per Western Blotting (siehe Abschnitt 2.2.6) sichtbar gemacht.

2.2.8 Bioinformatik

Die bioinformatischen Vorhersagen zu potentiellen Promotorbereichen und Bindungsstellen für TF wurden mit dem Programm MatInspector der Version 8.0.4 mit der MatInspector Library Version 8.3 von Genomatix gemacht [206]. Dabei wurden von dem Programm nach einem speziellen Algorithmus zunächst Promotorbereiche definiert und dann innerhalb dieser Bereiche nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gesucht. Das Programm benutzte hierfür sogenannte positionsgewichtete Matrizen, da diese eine genauere Vorhersagbarkeit als Konsensussequenzen ermöglichen [207]. Abschließend wurden auch Regionen außerhalb der festgelegten Promotorbereiche durchsucht. In diesen Bereichen wurde von dem Programm ein anderer interner Cut-off für die Wahrscheinlichkeit einer möglichen TF-Bindung an die DNA gesetzt.

2.2.9 Chromatin-Immunopräzipitationsassays (ChIP Assays)

Zur Identifikation von Bindungsstellen für TF mittels ChIP Assays wurden ca. 0,5 cm³ Hirngewebe verwendet. Das Gewebe wurde in PBS-Puffer homogenisiert und die an die DNA gebundenen TF durch die Zugabe von Formaldehyd in einer Gesamtkonzentration von 1% fixiert. Dabei bilden sich

Methylenverbindungen aus, die die TF-DNA-Komplexe stabilisieren. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von Glycin in einer Gesamtkonzentration von 125 mM gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (4 min, 200 x g, 4°C) pelletiert und das Pellet zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 3 ml Zellyse-Puffer mit Proteaseinhibitoren gelöst, 10 min auf Eis inkubiert und dann 3 min mit 12000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der enthaltenen Zytoplasmafraktion wurde verworfen und die verbleibende Zellkernfraktion in 3 ml Kernlyse-Puffer zusammen mit Proteaseinhibitoren gelöst. Nach einer weiteren 10-minütigen Inkubationszeit wurde die jetzt freigesetzte DNA mittels Stab-Ultraschallgerät fragmentiert. Folgende Einstellungen des Stab-Ultraschallgeräts wurden gewählt: Power 72%, Zeit 10 s, Puls 50%. Nach 12 Zyklen wurde ein kleiner Teil der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und so die Länge der DNA-Fragmente überprüft. Gegebenenfalls wurden weitere Zyklen durchgeführt, um die angestrebte mittlere Länge von 500 bp der DNA-Fragmente zu erreichen. Die Lösung mit den DNA-Fragmenten wurde dann durch Zentrifugieren (5 min, 12000 x g, 4°C) aufgereinigt und fünffach mit CHIP-Verdünnungspuffer verdünnt. Dem Lysat wurden daraufhin 80 µl Salmon-Sperm-DNA/Protein A/G-Agarose-Beads hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 4°C rotierend inkubiert und anschließend die Agarosebällchen mit 6000 x g für 2 min bei 4°C abzentrifugiert, um unspezifische Bindungen der Protein-A- und Protein-G-Agarose mit Lysatbestandteilen zu vermeiden. Ein Teil des Überstandes, der als „ChIP-Input“ (= fragmentierte genomische DNA) diente, wurde bei -20°C eingefroren, um später zusammen mit den Proben weiter aufgearbeitet zu werden. Zu jeweils 1000 µl der übrigen Lösung wurden 50 µg des gewünschten Antikörpers (GATA2, C/EBPβ, ZSCAN21; siehe Abschnitt 2.1.5) gegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Zu einem weiteren Ansatz wurde anstatt eines Antikörpers ddH₂O gegeben. Dieser Ansatz diente als Negativkontrolle. Am folgenden Tag wurde den Ansätzen jeweils 60 µl Salmon-Sperm-DNA/Protein A/G-Agarose-Beads hinzugegeben und damit 3 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Agarosebällchen mit den

anhaftenden Immunkomplexen und DNA-Fragmenten 2 min mit 2000 x g bei 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in CHIP-Verdünnungspuffer resuspendiert und dann nach folgendem Schema gewaschen:

1. Einmal mit 1 ml Waschpuffer 1
2. Einmal mit 1,5 ml Waschpuffer 1
3. Einmal mit 1,5 ml Waschpuffer 2
4. Einmal mit 1,5 ml Waschpuffer 3
5. Zweimal mit 1 ml TE-Puffer

Nach jedem Waschschrift wurden die Agarosebällchen mittels Zentrifugation (2 min, 2000 U/min, 4°C) pelletiert. Anschließend wurden die TF-DNA-Komplexe durch Zugabe von 250 µl Elutionspuffer, einer 15-minütigen Inkubationszeit und einem weiteren Zentrifugationsschritt (3 min, 14000 U/min, 4°C) eluiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch der CHIP-Input aufgetaut und mit SDS in einer Gesamtkonzentration von 0,5% versetzt. Sowohl die eluierten Proben als auch der CHIP-Input wurden über Nacht bei 65°C mit 10 µg RNase behandelt. Am folgenden Tag wurden die noch vorhanden Proteine in den Proben und im CHIP-Input durch die Zugabe von 20 µg Proteinase K weiter aufgespalten. Die DNA wurde dann durch die Zugabe von 1-1,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, einem Zentrifugationsschritt (2 min, Maximalgeschwindigkeit) und der anschließenden Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol und einem zweiten Zentrifugationsschritt (2 min, Maximalgeschwindigkeit) extrahiert. Durch die Zugabe von Ethanol/Natriumacetat-Lösung (24:1) wurde die DNA über Nacht bei -20°C präzipitiert. Um eine möglichst hohe DNA-Menge zu erzielen, wurden den Ansätzen zusätzlich 20 µg Glykogen hinzugefügt. Am nächsten Tag wurde die präzipitierte DNA durch eine Zentrifugation (20 min, Maximalgeschwindigkeit, 4°C) pelletiert, die Ethanol/Natriumacetat-Lösung abgegossen und anschließend die DNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die so gewonnene DNA wurde in TE-Puffer gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.10 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) und Delta-Delta-C_t-Methode

Die DNA-Konzentrationen aus den ChIP Assays wurden relativ im Vergleich zum ChIP-Input (= genomische DNA) bestimmt. Hierzu wurden qRT-PCRs mit Primern, die passend zu den mit MatInspector identifizierten Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren designt wurden (siehe Abschnitt 2.1.4), für alle Proben und die jeweiligen ChIP-Inputs durchgeführt. Dabei wurde das LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Kit in einem LightCycler[®] 480-Thermocycler verwendet. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die entstehenden PCR-Produkte einlagert. Folglich steigt die Fluoreszenz mit den neu entstehenden PCR-Produkten an, was von dem Gerät in Echtzeit registriert wird. Bei den Messungen wurde ähnlich, wie in der Gebrauchsanweisung des Kits angegeben, verfahren: In eine LightCycler[®] 480 Multiwell-Platte wurden ddH₂O, Primer, Mastermix und die jeweilige DNA für Ansätze mit 10 µl zusammenpipettiert. Die Primerkonzentration betrug 0,5 µM pro Primer. Es wurden jeweils ca. 10 ng DNA eingesetzt. Als die Ansätze zusammenpipettiert worden waren, wurde die Platte mit einer dazugehörigen Sealing-Folie verschlossen und kurz zentrifugiert, damit sich die Ansätze sicher auf dem Boden der dünnen Wells absetzten. Ansätze mit Primern, die dieselbe Anlagerungstemperatur hatten (siehe Abschnitt 2.1.4), konnten zusammen auf einer Platte gemessen werden. Es wurden 50 PCR-Zyklen durchgeführt und alle Ansätze als Duplett gemessen. Dabei wurden die C_t-Werte, also die Werte, die den Beginn des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenzmuster des SYBR Green I Masters markieren, mit der LightCycler[®]-Software berechnet (Abb. 3). Alle PCR-Produkte wurden durch Schmelzkurvenanalysen und durch Visualisierung mittels Gelelektrophorese auf ihre Spezifität hin untersucht.

Aus den C_t-Werten wurden die relativen DNA-Konzentrationen mittels der Delta-Delta-C_t-Methode berechnet. Hierfür wurden die C_t-Werte der immunpräzipitierten Proben von den jeweiligen C_t-Werten der ChIP-Input-DNA abgezogen. Die Expression der jeweiligen Zielsequenzen wurde mit einem Referenzgen (Amyloid Precursor Protein) normalisiert, um Unterschiede in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA auszugleichen. Die PCR-Effizienz

wurde für jedes Experiment anhand einer Standardkurve bestimmt und in die Berechnungen mit einbezogen. Die Formel der Delta-Delta-C_t-Methode lautet:

relative Anreicherung der ChIP DNA gegenüber der Input DNA

$$= \frac{E^{\text{Zielsequenz}} \cdot \text{Ct Zielsequenz Input DNA} - \text{Ct Zielsequenz ChIP DNA}}{E^{\text{Referenzgen}} \cdot \text{Ct Referenzgen Input DNA} - \text{Ct Referenzgen ChIP DNA}}$$

mit E = PCR-Effizienz.

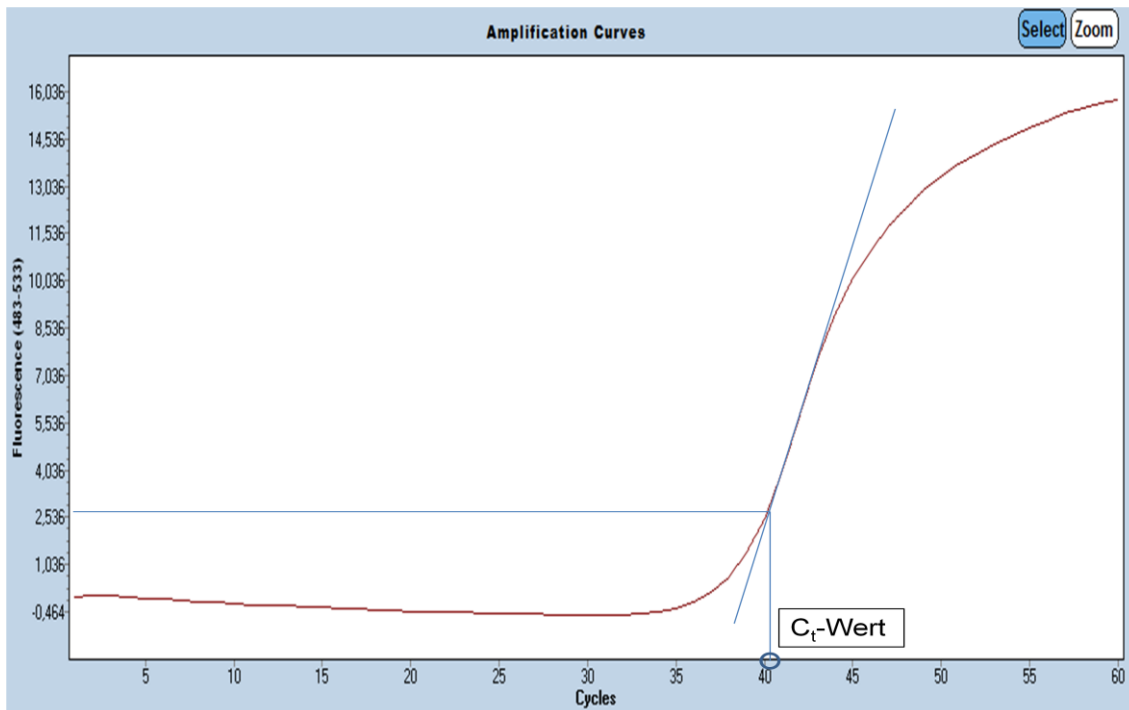


Abb. 3: qRT-PCR-Kurve und Bestimmung des Ct-Wertes:

Dargestellt ist eine beispielhafte Kurve aus einer qRT-PCR-Messung (braune Kurve). Die blauen Hilfsgeraden zeigen, wie der Ct-Wert, also der Wert, der den Beginn des exponentiellen Anstiegs des Fluoreszenzmusters markiert, bestimmt werden kann.

x-Achse: Anzahl der PCR-Zyklen; y-Achse: Fluoreszenzmuster der Probe im Bereich 483-533 nm in relativen Einheiten.

2.2.11 Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs)

Für die Assays wurden Doppelstrang-DNA-Oligonukleotide passend zu den mittels ChIP identifizierten Bindungsstellen für GATA2 (5'-GGCCCCGGTGT TATCTCATTCTTTT-3') und ZSCAN21 (5'-GACGAGGGGTAGGGGGTGGTC CC-3') designt. Die Oligonukleotide wurden von metabion international AG, Deutschland hergestellt und am 3'-Ende mit Biotin markiert.

Um später die Proben aufzutrennen, wurden nicht-denaturierende Polyacrylamidgele mit 4% Gesamtpolyacrylamidgehalt gegossen. Hierzu wurden die Gelkammern zusammengebaut und anschließend die Gele mit 0,5 X TBE-Puffer, 4% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid und 150 µl APS sowie 70 µl TEMED pro 60-ml-Ansatz gegossen. Auch bei diesen Gelen wurde durch TEMED als Katalysator und APS als Radikalbildner die Polymerisation des Acrylamids in Gang gesetzt. Als die Gele ausgehärtet waren, wurden die vorher eingesetzten Käbme für die Taschen entfernt und das System mit 0,5 X TBE-Puffer befüllt. Auf die Systeme mit den leeren Gelen wurde bereits 30-60 min vor der eigentlichen Elektrophorese eine Spannung von 100 V angelegt.

Die EMSAs wurden mithilfe des Gelshift™ Chemiluminescent EMSA Kits durchgeführt. Dabei wurden für jeden Ansatz 20 fmol Biotin-markierte Oligonukleotide zusammen mit 1 X „binding buffer“ aus dem Kit, 50 ng poly(dI/dC), 14,3% Glycerol, 200 mM Kaliumchlorid, 17,9 mM Magnesiumchlorid und 18 µg Zellkernextrakt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde den Ansätzen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren „Loading buffer“ aus dem Kit in 1 X Konzentration hinzugefügt und die Taschen der Gele mit jeweils 20 µl der Ansätze geladen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V. Um die Proben von den Gelen auf eine Nylon-Membran zu transferieren, wurde ein Elektrobloetter benutzt. Die Membranen wurden für 10 min in 0,5 X TBE-Puffer inkubiert und dann für den Transfer auf einen Schwamm und ein Whatman-Filter-Papier gelegt. Die Gele wurden passend auf den Membranen positioniert und anschließend ein weiteres Filterpapier und ein weiterer Schwamm aufgelegt. Dann wurde die Presse geschlossen und in den mit 0,5 X TBE-Puffer gefüllten Tank-Blotter gehängt (vgl. Abschnitt 2.2.6 und Abb. 2). Dabei wurden die Membranen zur Anode und die Gele zur Kathode hin ausgerichtet, damit die negativ geladenen Proteine und Nukleinsäuren in den Gelen in Richtung des positiven Pols auf die Membranen transferiert wurden. Der Transfer erfolgte bei 380 mA für 45 min bei 4°C. Nach dem Transfer erfolgte der Cross-link der DNA an die Membranen. Hierfür wurden die Membranen 10 min mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Die mit Biotin markierte DNA wurde dann mit Streptavidin, das mit

HRP gekoppelt war, sichtbar gemacht. Dabei bindet Streptavidin Biotin mit hoher Affinität und die HRP katalysiert die Chemolumineszenzreaktion des Luminols. Die Membranen wurden hierfür zunächst 15 min mit „Blocking Buffer“ geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Dann wurde der „Blocking Buffer“ abgegossen und Streptavidin-HRP-Konjugat im Verhältnis 1:300 in „Blocking Buffer“ dazugegeben. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubationszeit wurde auch diese Lösung abgegossen und die Membranen viermal 5 min mit jeweils 20 ml „Wash Buffer“ gewaschen. Nach den Waschsritten wurden die Membranen für 5 min in „Equilibration Buffer“ inkubiert und dann dieser gegen das Chemolumineszenzreagenz ersetzt. Die Signale der Chemolumineszenzreaktion wurden auf Amersham Hyperfilmen nachgewiesen.

2.2.12 Schmelzkurvenanalysen

Es wurden Schmelzkurvenanalysen zu den mittels ChIP Assays identifizierten Bindungsstellen für GATA2 und ZSCAN21 mit der DNA von 300 Patienten, die an einem IPS erkrankt waren, durchgeführt. Die Durchführung der Assays erfolgte mithilfe des High Resolution Melting Master Kits von Roche in einem LightCycler[®] 480. Dabei wurden in eine LightCycler[®] 480 Multiwell-Platte ddH₂O, Primer (siehe Abschnitt 2.1.4), Mastermix und die jeweilige DNA für Ansätze mit 20 µl zusammenpipettiert. Die Primerkonzentration betrug 0,25 µM pro Primer und die Magnesiumchlorid-Konzentration 1,25 mM. Es wurden jeweils 50 ng DNA eingesetzt. Nachdem die Ansätze zusammenpipettiert worden waren, wurde die Platte mit einer dazugehörigen Sealing-Folie verschlossen und kurz zentrifugiert, damit sich die Ansätze sicher auf dem Boden der dünnen Wells absetzen. Anstatt einer starren Anlagerungstemperatur für die Primer wurde nach einem sog. Touch-down-Protokoll verfahren, bei dem mit einer hohen Anlagerungstemperatur begonnen wird, um eine höhere Bindungsspezifität der Primer zu bewirkt. Die Anlagerungstemperatur betrug während des ersten PCR-Zyklus 71°C und wurde dann pro Zyklus um 1°C auf 60°C erniedrigt und bei dieser Temperatur gehalten. Nach 45 PCR-Zyklen erfolgte die Schmelzkurvenanalyse. Dabei

wurden die PCR-Produkte durch langsame Temperaturerhöhung denaturiert, wodurch SYBR Green I, das sich in die PCR-Produkte einlagert, freigesetzt wurde. In der Folge nahm die Fluoreszenz ab, was durch regelmäßige Messungen detektiert und durch die LightCycler[®]3-Software grafisch dargestellt wurde. Je nach der Basenzusammensetzung ergaben sich so spezifische Schmelzkurven für die PCR-Produkte. Pro Messung wurde die DNA von 30 Patienten mit den gleichen Primerpaaren entsprechend zu den Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Schmelzkurven der 30 DNAs wurden in einem Graphen zusammen dargestellt. Schmelzkurven, die von der Mehrheit der Kurven abwichen, wurden als „auffällig“ betrachtet und die jeweiligen DNA-Proben nachfolgend sequenziert. Zusätzlich wurden diejenigen DNA-Proben, die jeweils die höchste und die niedrigste Schmelztemperatur pro Messung aufwiesen, als „auffällig“ betrachtet und ebenfalls sequenziert.

2.2.13 Sequenzierungen

Alle DNA-Proben, die in den Schmelzkurvenanalysen eine auffällige Schmelzkurve zeigten, wurden mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert. Dabei wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte zunächst durch eine PCR angereichert. Als optimale Bedingungen für diese sog. Anreicherungs-PCR ließen sich folgende Konzentrationen ermitteln: 0,2 µM von jedem Primer, 200 µM dNTP-Mix und 0,5 U Taq DNA-Polymerase zusammen mit 1 X PCR-Puffer von Promega. Die PCRs wurden als 20 µl Ansätze mit 40 ng DNA durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, bei dem die DNA durch ddH₂O ersetzt wurde. Die Anlagerungstemperatur für die Primer betrug 64°C. Nach 35 Amplifikationszyklen wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Spezifität der Reaktionen zu überprüfen. Wenn die Produkte spezifisch waren, wurden sie durch Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation aufgereinigt. Dabei wurde den Ansätzen 50 µl Ethanol/Natriumacetat-Lösung (24:1) hinzugegeben und diese 45 min mit 3220 x g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Ethanol/Natriumacetat-Lösung abgegossen und die Proben zweimal mit 100 µl 70%igem Ethanol und einem folgenden Zentrifugationsschritt (20 min, 3220 x g, 4°C) gewaschen. Nach den

Waschschritten wurde das Ethanol durch kurze Zentrifugation (1 min, 600 x g, 4°C) der Platte umgekehrt auf Zellstoff vollständig entfernt und die Proben in 15 µl ddH₂O gelöst. So konnten die Produkte für die Sequenzierungs-PCR eingesetzt werden. Für die eigentliche Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet. Es wurde, wie in der Gebrauchsanweisung angegeben, zunächst die Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Dabei wurden zu 6 µl Mastermix, bestehend aus 1,25 µl PCR-Puffer, 2,25 µl ddH₂O, 1,5 µl BigDye-Puffer und 1 µl Primer (10µM), 4 µl gelöste DNA aus der Anreicherungs-PCR gegeben. Im Gegensatz zur Anreicherungs-PCR enthielten die Ansätze jeweils nur einen Primer und keine Primerpaare. Außerdem waren in den Puffern neben den 4 dNTPs zusätzlich ddNTPs (2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphate) enthalten, die jeweils an ein anderes Fluorochrom gekoppelt waren. Bei der Sequenzierungs-PCR kam es so zur linearen Amplifikation mit Fragmenten unterschiedlicher Länge, da durch den zufälligen Einbau der ddNTPs Kettenabbrüche induziert wurden. Dies ist für die Sequenzierungsmethode nach Sanger *et. al* [208] entscheidend. Bei der Sequenzierungs-PCR wurden durch den Einsatz einer Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 60°C lag, nicht die klassischen triphasisch PCR-Zyklen mit Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation durch die Polymerase benötigt, sondern biphasische (Anlagerung der Primer und Elongation in einem Schritt). Nach 30 solcher Zyklen wurden die PCR-Produkte erneut durch Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation aufgereinigt. Es wurde genauso verfahren wie bereits bei der Anreicherungs-PCR beschrieben. Jeweils 7 µl dieser PCR-Produkte wurden zusammen mit 10 µl Formamid in 96-Well-Platten für den Sequenzierautomaten pipettiert. Die Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese erfolgte in einem ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer von Applied Biosystems. Dabei wurden die Fragmente zunächst nach ihrer Größe aufgetrennt und dann die mittels eines Lasers angeregten Fluorochrome durch den Sequenzierautomaten detektiert. Da sich die Fluorochrome der vier Basen unterschieden, entstanden auf diese Weise farbstoff- und folglich auch basenspezifische Längenprofile, aus denen die DNA-Sequenz ermittelt werden konnte (Abb. 4). Die Sequenzanalyse und der

Abgleich der Basenabfolge mit der Referenzsequenz, die über die Internetseite Nucleotide (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/226693341?report=fasta&from=5001&to=119198>) bezogen wurde, erfolgte mit den Programmen Pregap4 und Gap4 von Staden Package. Zusätzlich zum softwareunterstützten Abgleich der Basenabfolge wurden sämtliche Sequenzen visuell auf SNPs hin untersucht.

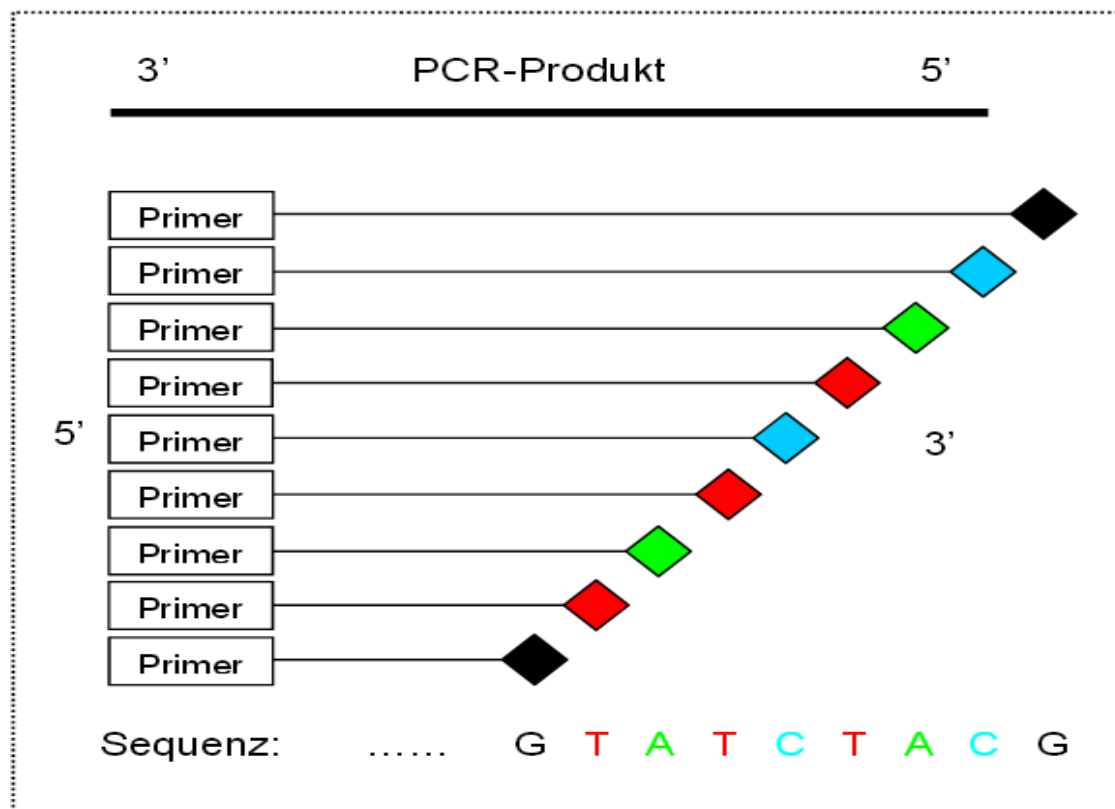


Abb. 4: Schematische Darstellung der Sequenzierung nach Sanger: Primer lagern sich am 3'-Ende der PCR-Produkte aus der Anreicherungs-PCR an. Bei Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTP (durch farbige Raute gekennzeichnet) kommt es zum Kettenabbruch. Die Fragmente werden nach der Länge aufgetrennt und die Fluorochrome angeregt. Auf diese Weise kann die DNA-Sequenz bestimmt werden. (aus [209])

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der Transkriptionsfaktoren in Hirngewebeproben

Wie bereits aus Abschnitt 1.5 hervorgeht, gibt es bisher nur wenige Kenntnisse über das Vorkommen von C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21 auf Proteinebene in menschlichem Hirngewebe. Eine geringe Anzahl an Studien konnte bisher C/EBP β und GATA2 in wenigen Hirnregionen, insbesondere im frontalen Kortex, nachweisen. Die eingesetzten Proteinlysate aus diesem Gewebe dienten somit zugleich als Positivkontrolle für C/EBP β und GATA2. Für den Nachweis von ZSCAN21 auf Proteinebene in menschlichem Hirngewebe existiert bisher gar keine Studie. Folglich ergab sich als erste Fragestellung, ob sich C/EBP β -, GATA2- und ZSCAN21-Proteine in menschlichem Hirngewebe nachweisen lassen. Da in eukaryontischen Zellen TF im Zellkern an die DNA binden, sollten diese sich dort nachweisen lassen.

3.1.1 Ergebnisse Western Blotting

Zu diesem Zweck wurden Western Blots mit dem Kernlysate (Lysate der Proteine aus den Zellkernen) aus verschiedenen Hirnregionen (Medulla oblongata, Gyrus cinguli und frontaler Kortex) durchgeführt (Abb. 5). Es wurden jeweils 50 μ g dieser Lysate auf ein Gel aufgetragen und verfahren wie unter Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Dabei ließen sich C/EBP β und GATA2 in allen drei Hirnregionen nachweisen (Abb. 5 A und B). Antikörper, die gegen diese zwei Proteine gerichtet waren, zeigten spezifische Banden. Dies konnte über den Abgleich mit der molekularen Masse und durch Negativkontrollen, die neben den Kernlysaten auf das Gel aufgetragen wurden, bestätigt werden.

Trotz mehrerer Optimierungsversuche dieses Assays für ZSCAN21 und dem Einsatz größerer Mengen an Kernlysate (bis 100 μ g) konnte ZSCAN21 in keinem der drei Kernlysaten nachgewiesen werden. Die Filme zeigten für diese wie für die Negativkontrollen stets keine Banden (Abb. 5 C). Da ZSCAN21 noch nie auf Proteinebene in menschlichem Hirngewebe nachgewiesen wurde, konnte das Kernlysate aus dem Gewebe des frontalen Kortex hier nicht als Positivkontrolle herangezogen werden. Im Rahmen anderer Untersuchungen wurden weitere

Gewebe mittels Western Blotting und den Antikörpern gegen ZSCAN21 untersucht. Dabei konnte das Protein in Hirngewebe von Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 5 D), was als Positivkontrolle herangezogen werden kann. Da das Protein nachfolgend durch die IP nachgewiesen werden konnte (Abb. 6), ist davon auszugehen, dass die Antikörper suffizient an ihr Epitop binden.

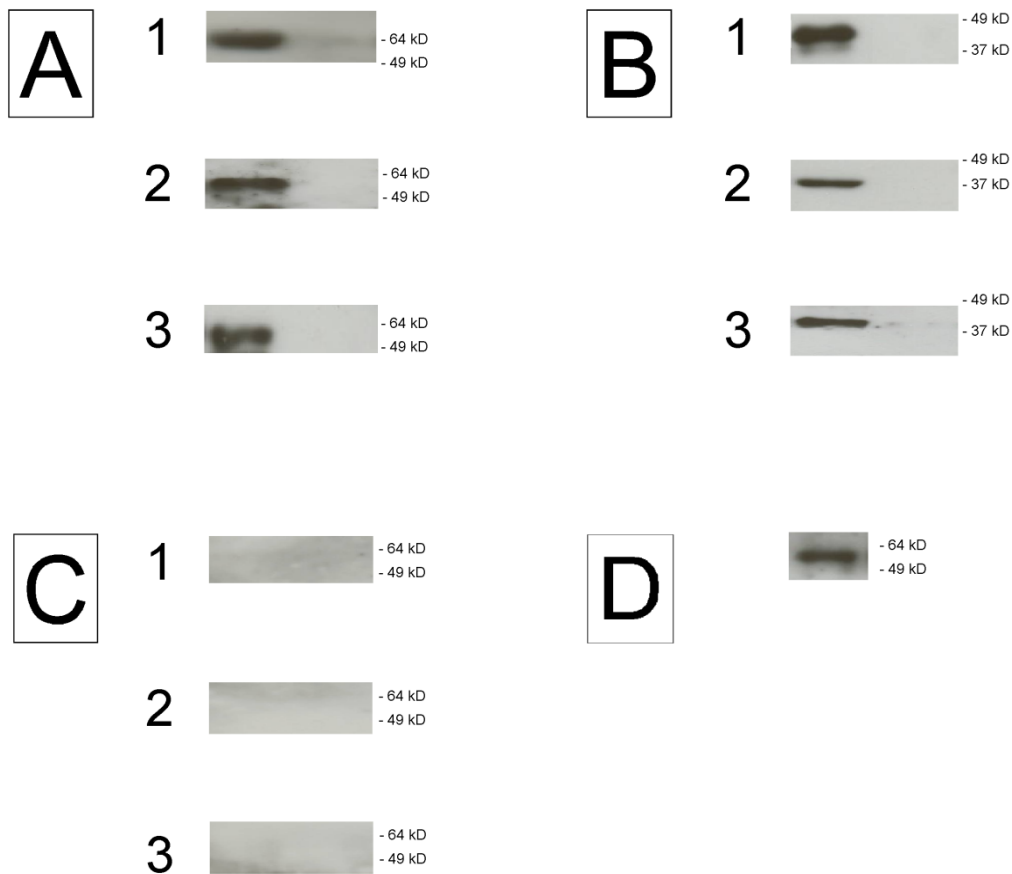


Abb. 5: Ergebnisse Western Blotting:

Es wurden jeweils 50 µg Kernlysate (Proteine der Zellkerne) (linke Geltasche) und 50 µg bovines Serumalbumin als Negativkontrolle (rechte Geltasche) auf die Gele aufgetragen und zur Separation und Immunodetektion dieser Proteine so verfahren, wie unter Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Am rechten Rand ist die molekulare Masse in kDa aufgetragen, die mittels eines kommerziellen Markers bestimmt wurde. Zur Detektion wurden Primärantikörper, die gegen GATA2 (A), C/EBPβ (B) und ZSCAN21 (C) gerichtet waren, eingesetzt. Das Kernlysate stammte aus unterschiedlichen Hirnregionen: (1) frontaler Kortex, (2) Gyrus cinguli, (3) Medulla oblongata. Während sich GATA2 und C/EBPβ in allen untersuchten Hirnregionen nachweisen ließen (A und B), konnte ZSCAN21 mit dieser Methode nicht detektiert werden (C). Für GATA2 (A) und C/EBPβ (B) dienten jeweils die Proben aus dem Gewebe des frontalen Kortex' (1) als indirekte Positivkontrollen. Da ZSCAN21 noch nie auf Proteinebene in menschlichem Hirngewebe nachgewiesen wurde, konnte das Kernlysate aus dem Gewebe des frontalen Kortex' hier nicht als Positivkontrolle herangezogen werden. Im Rahmen anderer Untersuchungen wurden weitere Gewebe mittels Western Blotting und den Antikörpern gegen ZSCAN21 untersucht. Dabei konnte das Protein in Hirngewebe von Mäusen nachgewiesen werden. (D) zeigt eine repräsentative Bande, die als Positivkontrolle für ZSCAN21 herangezogen werden kann. (modifiziert nach [210])

3.1.2 Ergebnisse Immunopräzipitationen

Da sich ZSCAN21 mittels Western Blotting nicht nachweisen ließ, wurde versucht, das Protein durch eine IP nachzuweisen. Dies begründete sich zum einen damit, dass generell neben dem Western Blotting eine weitere Nachweismethode versucht werden sollte. Zum anderen ist bekannt, dass ZSCAN21 in vielen Geweben nur schwach exprimiert wird (vgl. Abschnitt 1.5.3) und durch die IP die Proteine vor der Immunodetektion „aufkonzentriert“ werden können (vgl. Abschnitt 2.2.7).

Die IP wurde ebenfalls mit Kernlysate (Lysate der Proteine aus den Zellkernen) aus Gewebe, das von der Medulla oblongata, dem Gyrus cinguli und dem frontalen Kortex stammte, durchgeführt (Abb. 6). Es wurde verfahren wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben. Mit dieser Methode ließ sich ZSCAN21 nun in allen drei Hirnregionen nachweisen (Abb. 6, 1-3). Antikörper, die gegen ZSCAN21 gerichtet waren, zeigten spezifische Banden. Dies konnte über den Abgleich mit der molekularen Masse und durch Negativkontrollen, die neben den Kernlysaten auf das Gel aufgetragen wurden, bestätigt werden.

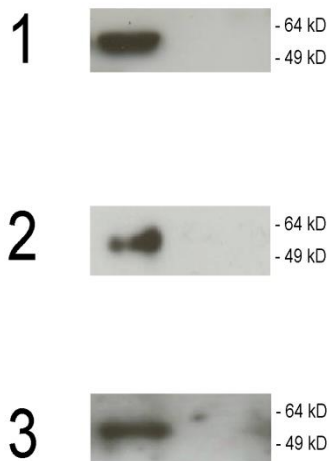


Abb. 6: Ergebnisse Immunopräzipitationen:

Die IP wurden wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Auch für die IP wurde Kernlysate (Proteine der Zellkerne) unterschiedlicher Hirnregionen verwendet: (1) frontaler Kortex, (2) Gyrus cinguli, (3) Medulla oblongata. Nach der Zugabe des Laemmli-Puffers und dem Denaturierungsschritt wurden die Geltaschen mit jeweils 50 µl des Gemisches beladen (linke Geltasche). Für die Negativkontrollen (rechte Geltasche) wurde ein irrelevanter Antikörper des gleichen Isotyps verwendet und die Geltasche ebenfalls mit 50 µl beladen. Die Immunodetektion erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Es wurden primäre Antikörper, die gegen ZSCAN21 gerichtet waren, eingesetzt. Mit dieser Methode ließ sich das Protein in allen untersuchten

Hirnregionen nachweisen. Am rechten Rand ist die molekulare Masse in kDa aufgetragen, die mittels eines kommerziellen Markers bestimmt wurde. (modifiziert nach [210])

3.2 Bioinformatische Analyse des *SNCA*-Gens

Wie bereits aus Abschnitt 1.4.4 hervorgeht, besitzt das *SNCA*-Gen einen sehr komplexen Promotorbereich, der sich nicht nur auf die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) erstreckt, sondern auch intronische Sequenzen mit einbezieht. Das verwendete Programm zur Vorhersage von möglichen Bindungsstellen traf deshalb zunächst eine Vorhersage über mögliche Promotorbereiche in der 5'-Region von *SNCA*. In einem zweiten Schritt wurden diese Bereiche auf mögliche Bindungsstellen für die TF durchsucht. Abschließend wurden auch Regionen außerhalb der festgelegten Promotorbereiche durchsucht. In diesen Regionen wurde von dem Programm ein anderer interner Cut-off für die Wahrscheinlichkeit einer möglichen TF-Bindung gesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.8).

3.2.1 Bestimmung möglicher Promotorbereiche des *SNCA*-Gens

Mithilfe des Programms MatInspector konnten insgesamt sechs mögliche Promotorbereiche in der 5'-Region von *SNCA* identifiziert werden (Abb. 7). Bemerkenswert war, dass sich die Mehrzahl dieser Bereiche in Intron 1 befand. Drei der Promotorbereiche waren vollständig hierin lokalisiert. Ein vierter beinhaltete lediglich noch einen Bereich in Exon 2. In der 5'-UTR war nur ein einziger Promotorbereich lokalisiert und selbst dieser beinhaltete neben dem ersten Exon einen kleinen Bereich in Intron 1. Ein letzter möglicher Promotorbereich wurde von dem Programm in Intron 2 vorhergesagt. Dieser Bereich schloss neben dem Exon 3 auch einen kurzen Abschnitt des dritten Introns mit ein. Die Promotorbereiche wurden von dem Programm mit dem Kürzel „GXP“ benannt. Abbildung 7 B gibt einen Überblick hierüber. Die genauen Koordinaten der Promotorbereiche können Tabelle 13 entnommen werden.

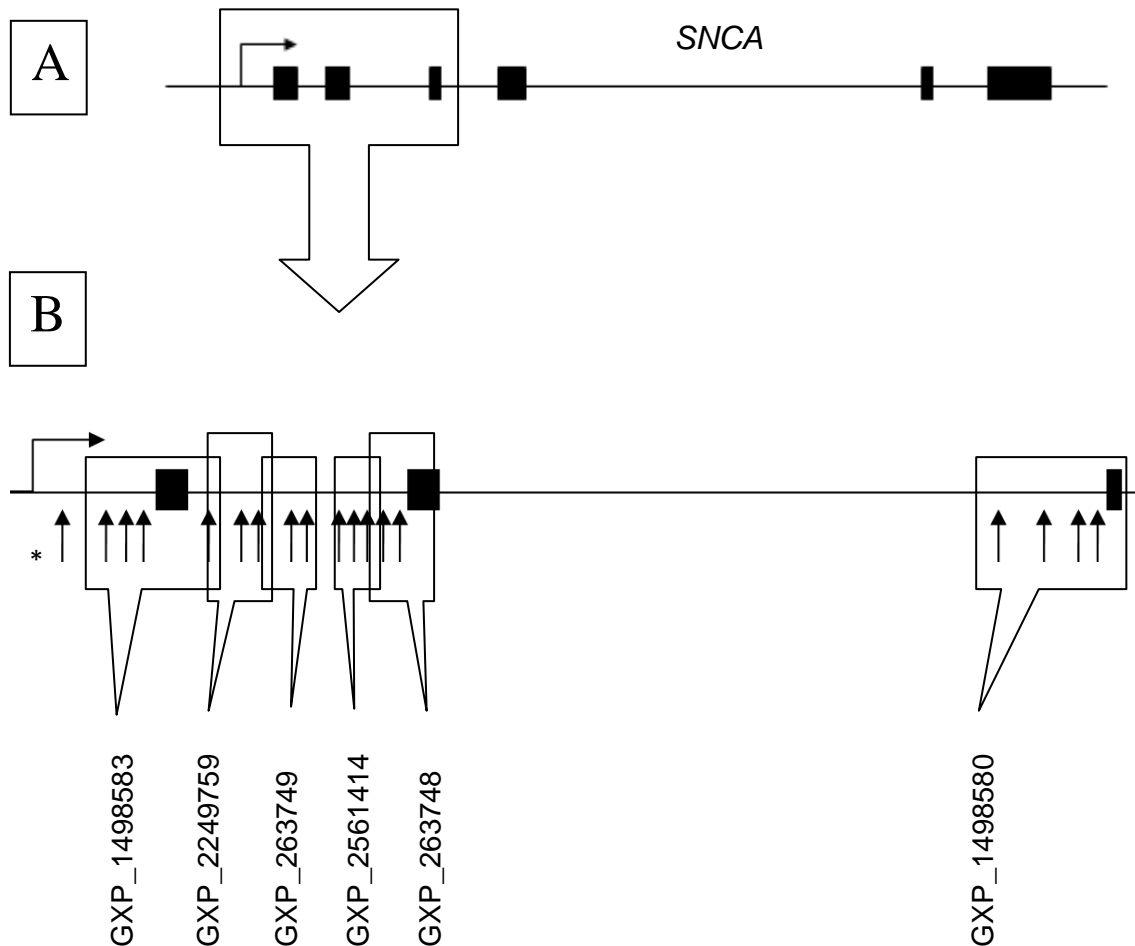


Abb. 7: Ergebnisse MatInspector-Analyse:

(A) Dargestellt ist das *SNCA*-Gen mit seinen sechs Exons (schwarze Boxen). (B) Vergrößerung der 5'-Promotorregion des *SNCA*-Gens mit den ersten drei Exons. Die bioinformatische Vorhersage mit dem MatInspector-Programm zeigte sechs mögliche Promotorbereiche (GXP_1498583, GXP_2249759, GXP_263749, GXP_2561414, GXP_263748, GXP_1498580), die sich in der 5'-UTR, in Intron 1, Intron 2 und z.T. in Intron 3 befanden. Innerhalb dieser Promotorbereiche konnten insgesamt 17 mögliche Bindungsstellen für die untersuchten TF (C/EBP β , GATA2, ZSCAN21) identifiziert werden (Pfeile). Eine zusätzliche potentielle Bindungsstelle für GATA2 wurde außerhalb der zunächst festgelegten Promotorbereiche identifiziert (*). Die genauen Koordinaten der Promotorbereiche und eine Aufschlüsselung der darin enthaltenen möglichen Bindungsstellen der jeweiligen TF sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Identifizierte Promotorbereiche und darin enthaltene mögliche Bindungsstellen der TF. (alle Angaben zu den Basenpaaren beziehen sich auf Nucleotide Build 37.2 [NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/226693341?report=fasta&from=5001&to=119198>]) (aus [210])

Promotorbereich (bp)	Mögliche TF-Bindungsstellen in diesen Bereichen	Position der Bindungsstellen
ohne	GATA2	90.800.344 - 90.800.381
GXP_1498583 (90.759.347 - 90.759.966)	C/EBP β	90.759.818 - 90.759.846
	GATA2	90.759.722 - 90.759.734
	C/EBP β	90.759.611 - 90.759.755
	C/EBP β	90.759.625 - 90.759.648
GXP_2249759 (90.758.725 - 90.759.325)	GATA2	90.759.026 - 90.759.038
	GATA2	90.758.876 - 90.758.888
GXP_263749 (90.758.027 - 90.758.850)	GATA2	90.758.429 - 90.758.441
	ZSCAN21	90.758.190 - 90.758.212
GXP_2561414 (90.757.264 - 90.757.864)	ZSCAN21	90.757.754 - 90.757.760
	GATA2	90.757.541 - 90.757.553
	GATA2	90.757.450 - 90.757.485
GXP_263748 (90.756.731 - 90.757.331)	C/EBP β	90.757.218 - 90.757.232
	GATA2	90.756.731 - 90.756.807
GXP_1498580 (90.749.245 - 90.749.845)	GATA2	90.749.821 - 90.749.833
	GATA2	90.749.663 - 90.749.675
	GATA2	90.749.639 - 90.749.651
	GATA2	90.749.635 - 90.749.647

3.2.2 Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Als nächstes wurde mithilfe des Programms MatInspector nach möglichen Bindungsstellen für C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21 gesucht. Für diese ergaben sich insgesamt 18 potentielle Bindungsstellen. Die Verteilung dieser TF-Bindungsstellen über die ermittelten Promotorbereiche ist in Abbildung 7 B dargestellt (Pfeile) und kann zusätzlich Tabelle 13 entnommen werden. Die meisten potentiellen Bindungsstellen wurden für GATA2 ermittelt. Für diese

konnten 12 mögliche TF-DNA-Interaktionsstellen identifiziert werden, die sich über alle ermittelten Promotorbereiche erstrecken (Tab. 13). Eine der möglichen GATA2-Bindungsstellen befindet sich in der 5'-UTR außerhalb der ermittelten Promotorbereiche (Abb. 7 B, Pfeil mit Stern). Sie wurde detektiert, als Bereiche außerhalb der festgelegten Promotorbereiche auf mögliche Bindungsstellen untersucht wurden und ist die einzige solche Bindungsstelle. Für C/EBP β wurden insgesamt vier mögliche Bindungsstellen identifiziert, die sich in den Promotorbereichen GXP_1498583 und GXP_263748 befinden (Tab. 13). Zwei potentielle Bindungsstellen ergaben sich für ZSCAN21, die sich in den Promotorbereichen GXP_263749 und GXP_2561414 befinden (Tab. 13). Neben den Bindungsstellen für C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21 enthielten die Promotorbereiche viele weitere mögliche Bindungsstellen für eine Vielzahl anderer TF (nicht abgebildet).

3.3 Nachweis und Charakterisierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

3.3.1 Ergebnisse Chromatin-Immunoprecipitationsassays

Da es sich bei allen mittels MatInspector identifizierten Bindungsstellen lediglich um *in silico*-Vorhersagen handelt, mussten diese durch *in vitro*-Verfahren untersucht werden, um festzustellen, welche dieser Bindungsstellen tatsächlich eine funktionelle Bedeutung besitzen. Zu diesem Zweck wurden ChIP Assays mit Gewebe verschiedener Hirnregionen (Medulla oblongata, Gyrus cinguli und frontaler Kortex) durchgeführt wie unter Abschnitt 2.2.9 beschrieben. Die Auswertung erfolgte mittels qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.2.10).

Bei der Untersuchung aller 18 mittels MatInspector identifizierten Bindungsstellen zeigte sich jeweils eine spezifische TF-DNA-Interaktion für GATA2 und für ZSCAN21. Während sich die Interaktionsstelle für GATA2 in Intron 2 befindet, ist die Bindungsstelle für ZSCAN21 in Intron 1 lokalisiert. Für C/EBP β konnte keine Interaktion mit der DNA nachgewiesen und damit auch keine der vorhergesagten Bindungsstellen bestätigt werden. Dasselbe gilt für alle anderen vorhergesagten Bindungsstellen für GATA2 und ZSCAN21. Die Beobachtung, dass nur GATA2 und ZSCAN21 mit jeweils einer speziellen

Bindungsstelle interagieren, konnten mit allen untersuchten Hirnregionen gemacht werden.

Abbildung 8 gibt einen Überblick über diese Ergebnisse. In Abbildung 8 C sind die Ergebnisse der CHIP Assays als n-fache Anreicherung der DNA aus den Immunopräzipitationen (weiße Balken) im Vergleich zum CHIP-Input (= genomische DNA) dargestellt, wie sie mit der qRT-PCR gemessen wurde. Negativkontrollen werden als schwarze Balken dargestellt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen. Die jeweiligen C_T -Werte zu diesem Diagramm können Tabelle 14 entnommen werden. Das Balkendiagramm ist mit einer Schemazeichnung der 5'-Promotorregion des *SNCA*-Gens verknüpft, in dem die mittels MatInspector vorhergesagten möglichen Bindungsstellen als Pfeile markiert sind (Abb. 8 B). Hieraus wird ersichtlich, welche dieser Bindungsstellen tatsächlich eine funktionelle Bedeutung besitzen. Die exakten Koordinaten der potentiellen Bindungsstellen sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

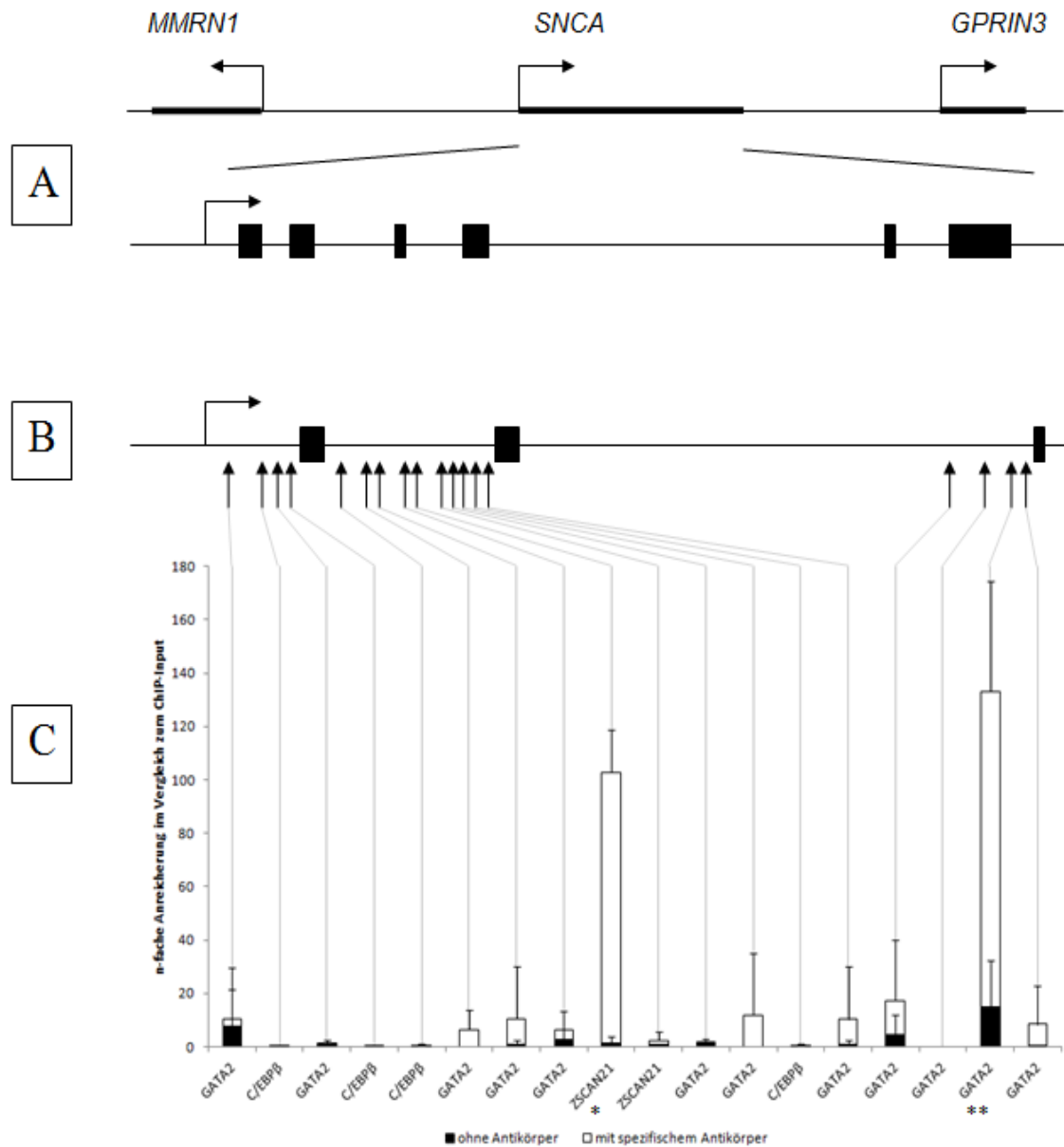


Abb. 8: Ergebnisse Chromatinimmunopräzipitationen (ChIP):
 (A) Ausschnitt aus dem Chromosom 4 mit dem *SNCA*-Gen und den benachbarten Genen. Darunter ist der Aufbau des *SNCA*-Lokus' mit seinen sechs Exons (schwarze Boxen) gezeigt. (B) Vergrößerung der 5'-Promotorregion des *SNCA*-Genes mit den ersten drei Exons. Die Pfeile zeigen mögliche Bindungsstellen für C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21 (Vorhersagen des MatInspector-Programms) an. (C) Die Ergebnisse aus den ChIP-Experimenten sind grafisch dargestellt. Dabei zeigte sich jeweils eine Interaktion für ZSCAN21 (*) und für GATA2 (**) mit der DNA. Für C/EBP β zeigten sich keine Interaktionen. Die Balken zeigen die n-fache Anreicherung der DNA aus den Immunopräzipitationen mit (weiße Balken) und ohne (schwarze Balken) Antikörper in der qRT-PCR im Vergleich zum ChIP-Input an (relative Einheiten). Immunopräzipitationen ohne Antikörper dienten als Negativkontrollen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen. (modifiziert nach [210])

Tabelle 14: C_t-Werte zu den Chromatin-Immunopräzipitationen. Die Tabelle zeigt die einzelnen C_t-Werte zu den Mittelwerten, die als Balkendiagramm in Abb. 8 C dargestellt sind. Alle Werte wurden auf zwei Dezimalstellen gerundet. (aus [210])

TF-Bindungsstellen in der Reihenfolge des Auftretens	Mit spezifischem Antikörper		Ohne Antikörper	
	C _t -Werte	Mittelwerte	C _t -Werte	Mittelwerte
GATA2	0,42; 0,00; 1,03; 39,38	10,22	0,00; 1,14; 0,25; 28,32	7,43
C/EBPβ	0,00; 0,00; 0,00; 0,02	0,00	0,00; 0,00; 0,00; 0,00	0,00
GATA2	0,00; 0,77; 1,34; 1,50	0,90	0,00; 2,99; 0,00; 0,00	0,75
C/EBPβ	1,03; 0,00; 0,00; 0,23	0,31	0,01; 0,00; 0,00; 0,00	0,00
C/EBPβ	0,14; 0,08; 0,75; 0,78	0,46	0,00; 0,12; 0,01; 0,05	0,05
GATA2	8,34; 0,81; 0,30; 15,87	6,33	0,00; 0,01; 0,00; 0,00	0,00
GATA2	0,00; 0,66; 0,92; 39,82	10,35	0,00; 0,34; 0,00; 3,18	0,88
GATA2	1,29; 0,42; 6,65; 15,87	6,06	0,00; 0,59; 2,05; 8,20	2,71
ZSCAN21	86,28; 117,60; 104,74	102,86	0,00; 3,17; 1,12	1,43
ZSCAN21	1,86; 0,95; 6,13; 0,39	2,33	0,34; 1,33; 0,62; 0,55	0,71
GATA2	0,83; 0,46; 1,77; 1,07	1,03	0,74; 2,73; 2,43; 0,54	1,61
GATA2	0,00; 0,00; 0,59; 46,52	11,78	0,00; 0,49; 0,00; 0,00	0,12
C/EBPβ	0,01; 0,19; 0,24; 1,54	0,50	0,00; 0,00; 0,09; 0,00	0,02
GATA2	0,14; 0,00; 1,06; 40,09	10,32	0,00; 0,11; 0,00; 2,94	0,77
GATA2	15,12; 3,15; 1,15; 49,74	17,29	0,00; 0,40; 0,00; 15,63	4,24
GATA2	0,00; 0,00; 0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,00; 0,00; 0,00	0,00
GATA2	105,20; 103,29; 192,14; 132,02	133,16	0,00; 37,75; 19,65; 2,15	14,89
GATA2	3,44; 0,52; 0,00; 30,14	8,53	0,00; 0,97; 0,00; 0,01	0,24

3.3.2 Ergebnisse Electrophoretic Mobility Shift Assays

Nachdem die Bindungsstellen für GATA2 und ZSCAN21 identifiziert worden waren, sollten diese TF-DNA-Interaktionen weiter untersucht werden. Aus diesem Grund wurden EMSAs mit den identifizierten Bindungsstellen und dem

Kernlysate (Lysate der Proteine aus den Zellkernen) aus den drei untersuchten Hirnregionen (Medulla oblongata, Gyrus cinguli und frontaler Kortex) durchgeführt. Es wurde verfahren wie unter Abschnitt 2.2.11 beschrieben.

Wie erwartet, zeigten sich deutliche Shifts der Banden, als die markierten DNA-Bindungsstellen für GATA2 und die ZSCAN21 mit dem Kernlysate inkubiert wurden (Abb. 9 A-C, 2 bzw. Abb. 10 A-C, 2). Bei Hinzugabe eines 200-fachen Überschusses eines spezifischen Kompetitors (unmarkierte Kontroll-DNA mit derselben Sequenz wie die markierte DNA) verschwand dieser Banden-Shift für die Proben der GATA2-Bindungsstelle (Abb. 9 A-C, 3). Für die Proben der ZSCAN21-Bindungsstelle zeigte sich eine deutliche Reduktion des Banden-Shifts (Abb. 10 A-C, 3). Wurde hingegen ein 200-facher Überschuss eines unspezifischen Kompetitors hinzugegeben (unmarkierte DNA mit einer anderen Sequenz als der identifizierten Bindungsstelle), zeigten sich erneut deutliche Shifts der Banden sowohl für die Proben der GATA2-Bindungsstelle als auch für die Proben der ZSCAN21-Bindungsstelle (Abb. 9 A-C, 4 bzw. Abb. 10 A-C, 4). Diese Beobachtungen konnten mit den Kernlysaten aller untersuchter Hirnregionen gemacht werden. Somit wurden die Ergebnisse der CHIP Assays bestätigt. Die möglicherweise geringere Menge an ZSCAN21 in den Kernlysaten führte zu Banden-Shifts, die die gleiche Intensität hatten wie die, die durch GATA2 bedingt waren. Der Verlust bzw. die Reduktion der Shifts durch den Überschuss eines spezifischen Kompetitors, nicht aber durch den Überschuss eines unspezifischen Kompetitors, zeigt, dass es sich bei den Shifts der Banden, um spezifische TF-DNA-Interaktionen handelt. Diese Spezifität und die Tatsache, dass die Shifts auch zusammen mit poly(dI/dC) und dem unspezifischen Kompetitor auftraten, verdeutlichen zudem, dass die TF diese DNA-Sequenzen mit einer hohen Affinität binden.

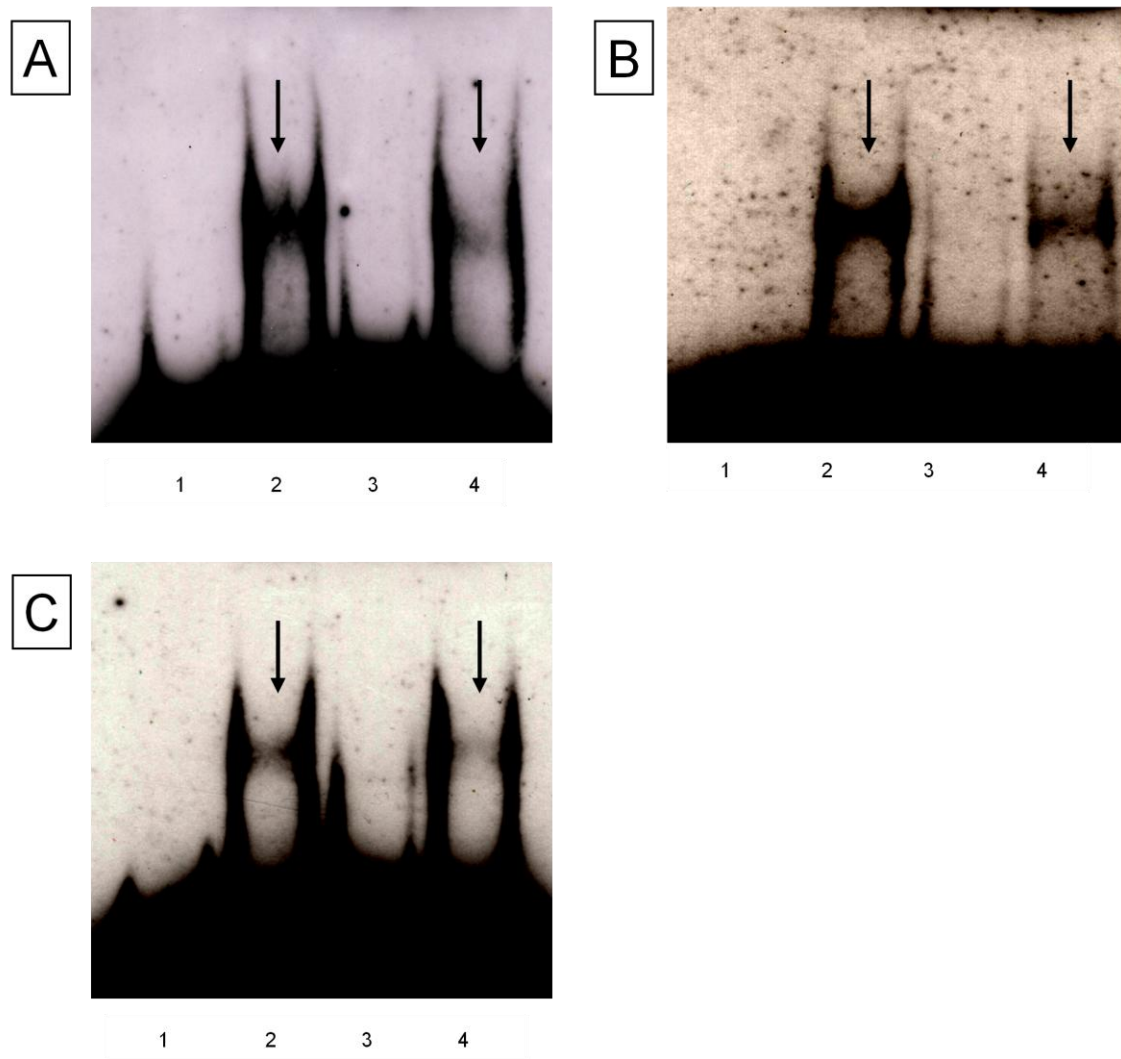


Abb. 9: Ergebnisse EMSAs für die identifizierte GATA2-Bindungsstelle:

Oligonukleotide mit der Sequenz für die identifizierte GATA2-Bindungsstelle wurden zusammen mit Kernextrakt (Proteine des Zellkerns) aus Geweben unterschiedlicher Hirnareale inkubiert: Hirngewebe aus der Medulla oblongata (A), aus dem Gyrus cinguli (B) und aus dem frontalen Kortex (C). In die erste Gelkammer wurde jeweils die DNA ohne Kernextrakt gegeben (1). Bei Hinzugabe des Kernextrakts zeigten sich deutliche Shifts der Banden (2, Pfeile), die bei Hinzugabe eines 200-fachen Überschusses eines spezifischen Kompetitors (unmarkierte Kontroll-DNA mit derselben Sequenz wie die markierte DNA) wieder verschwanden (3). Wenn dagegen ein 200-facher Überschuss eines unspezifischen Kompetitors hinzugegeben wurde (unmarkierte DNA mit einer anderen Sequenz als der identifizierten Bindungsstelle), zeigten sich erneut deutliche Banden-Shifts (4, Pfeile).

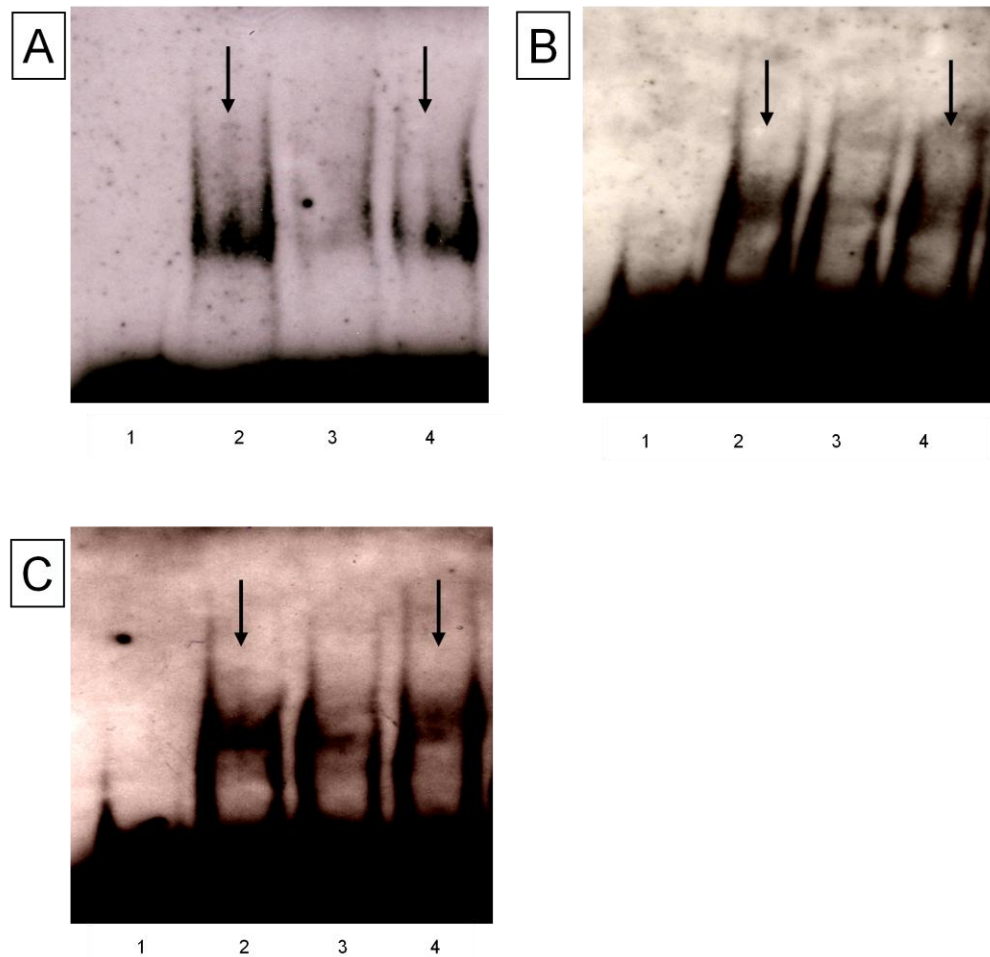


Abb. 10: Ergebnisse EMSAs für die identifizierte ZSCAN21-Bindungsstelle: Oligonukleotide mit der Sequenz für die identifizierte ZSCAN21-Bindungsstelle wurden zusammen mit Kernextrakt (Proteine des Zellkerns) aus Geweben unterschiedlicher Hirnareale inkubiert: Hirngewebe aus der Medulla oblongata (A), aus dem Gyrus cinguli (B) und aus dem frontalen Kortex (C). In die erste Geltasche wurde jeweils die DNA ohne Kernextrakt gegeben (1). Bei Hinzugabe des Kernextrakts zeigten sich deutliche Shifts der Banden (2, Pfeile), die sich durch die Hinzugabe eines 200-fachen Überschusses eines spezifischen Kompetitors (unmarkierte Kontroll-DNA mit derselben Sequenz wie die markierte DNA) abschwächen ließen (3). Wenn dagegen ein 200-facher Überschuss eines unspezifischen Kompetitors hinzugegeben wurde (unmarkierte DNA mit einer anderen Sequenz als der identifizierten Bindungsstelle), zeigten sich die Banden-Shifts wieder kräftiger (4, Pfeile).

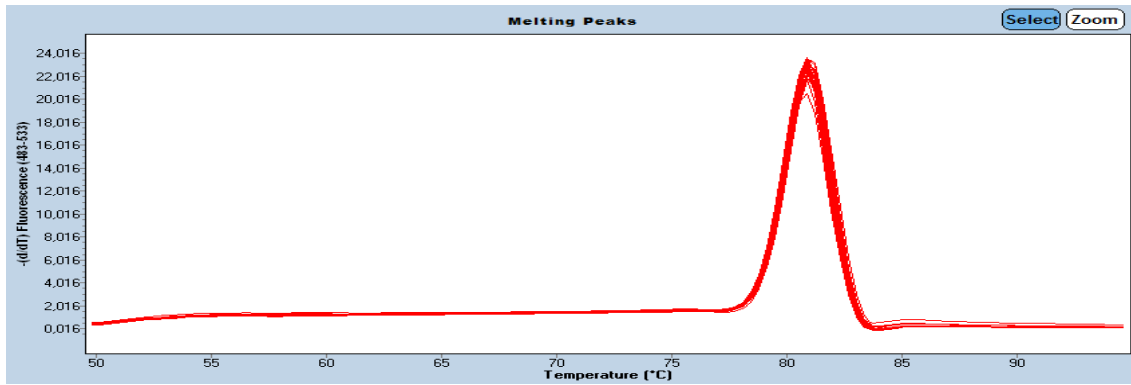
3.4 Detektion von SNPs in den identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Wie bereits aus Abschnitt 1.6.2 hervorgeht, wurden SNPs identifiziert, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an Parkinson zu erkranken, und die zu erhöhten α SYN-Level im Blut und Hirn führen. Besonders SNPs im Promotorbereich könnten die Genexpression von *SNCA* durch Veränderung der TF-Bindungsstellen beeinflussen. Zu diesem Zweck sollten die identifizierten TF-Bindungsstellen bei Parkinson-Patienten auf SNPs untersucht werden. Dabei wurden DNA-Proben von Parkinson-Patienten zunächst mittels Schmelzkurvenanalyse auf mögliche SNPs in den TF-Bindungsstellen gescreent. Proben, die eine auffällige Schmelzkurve aufwiesen, wurden dann in einem zweiten Schritt sequenziert.

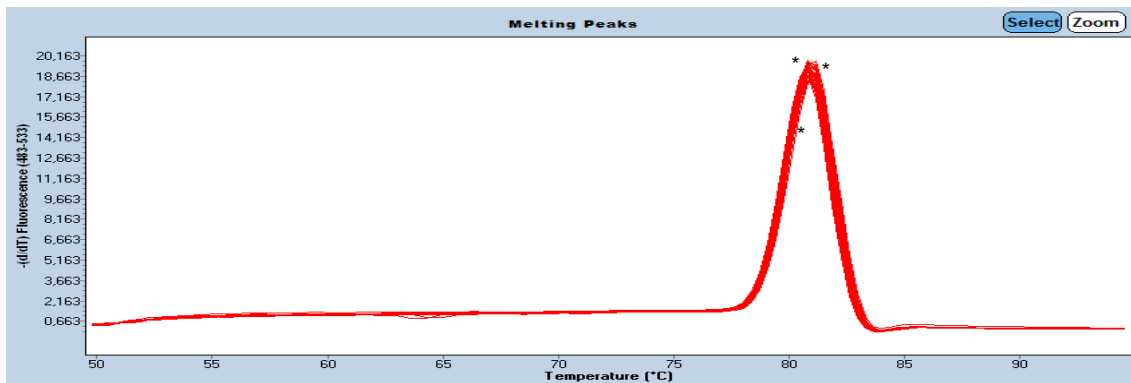
3.4.1 Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen

Es wurden DNA-Proben von 300 Patienten, die an einem IPS erkrankt waren, auf SNPs in den identifizierten TF-Bindungsstellen untersucht. Dabei wurde verfahren wie unter Abschnitt 2.2.12 beschrieben. Zur Auswertung wurden neben den eigentlichen Schmelzkurven besonders die sog. Melting Peaks, also die erste negative Ableitung der Schmelzkurven, herangezogen, da sich Abweichungen in der DNA-Sequenz in diesen häufig besser darstellen.

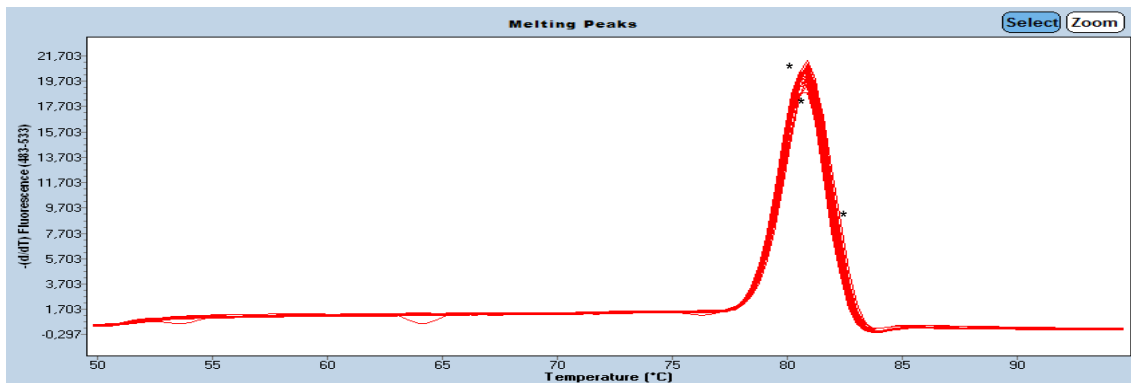
Die Schmelzkurven bzw. die Melting Peaks der GATA2-Bindungsstelle zeigten sich sehr homogen (Abb. 11). Damit durch dieses Screening-Verfahren keine SNPs unentdeckt blieben, wurden folglich auch minimale Abweichungen als „auffällig“ betrachtet. Zusätzlich wurden jeweils die Schmelzkurven mit der höchsten und der geringsten Schmelztemperatur als „auffällig“ erachtet. Durch dieses Vorgehen wurden insgesamt 42 DNA-Proben ausgewählt, die später sequenziert wurden. In Abbildung 11 sind die Melting Peaks der DNA-Proben in zehn Messungen mit jeweils 30 Proben dargestellt. Proben, die nicht aufgrund der höchsten oder geringsten Schmelztemperatur, sondern aufgrund ihres Abweichens von der Mehrheit der Kurven ausgewählt wurden, sind mit einem Stern markiert.



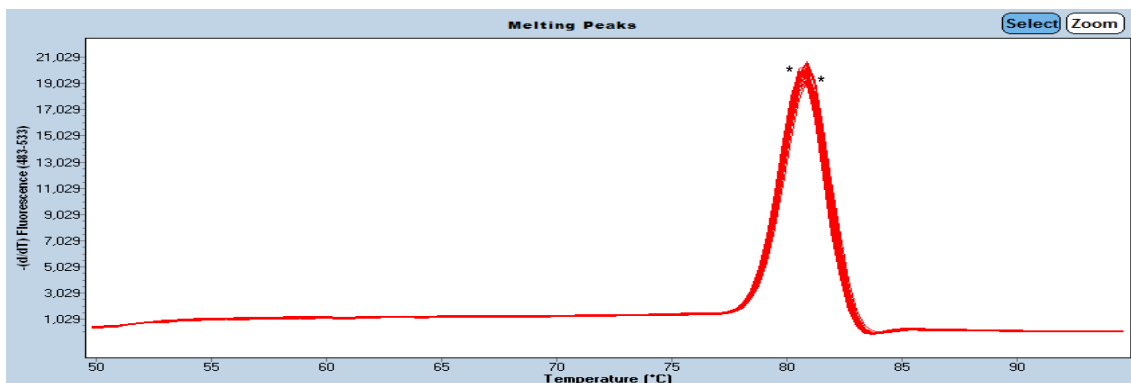
A



B

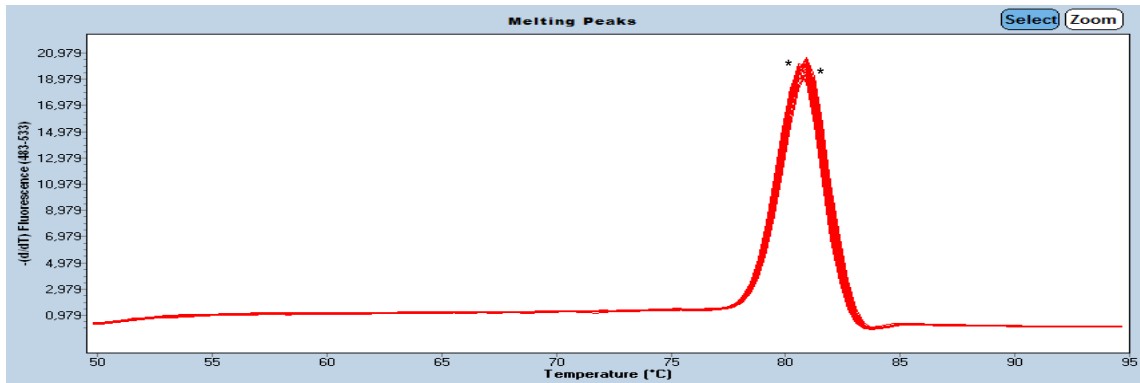


C

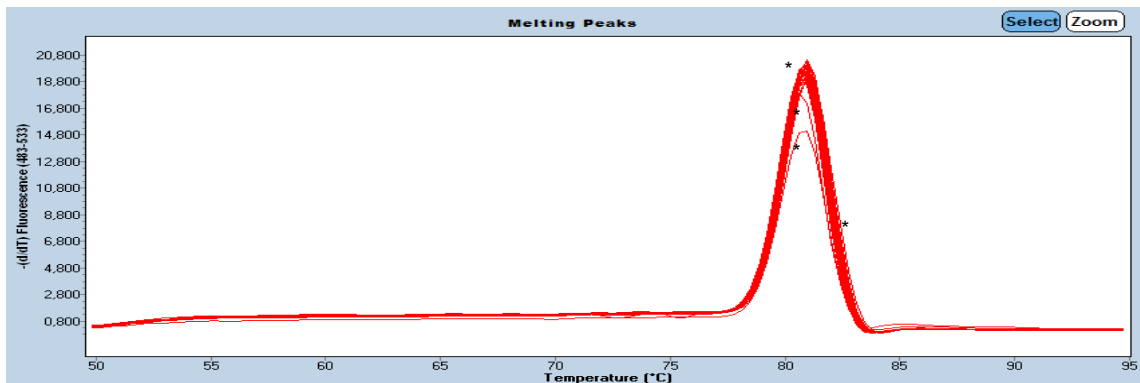


D

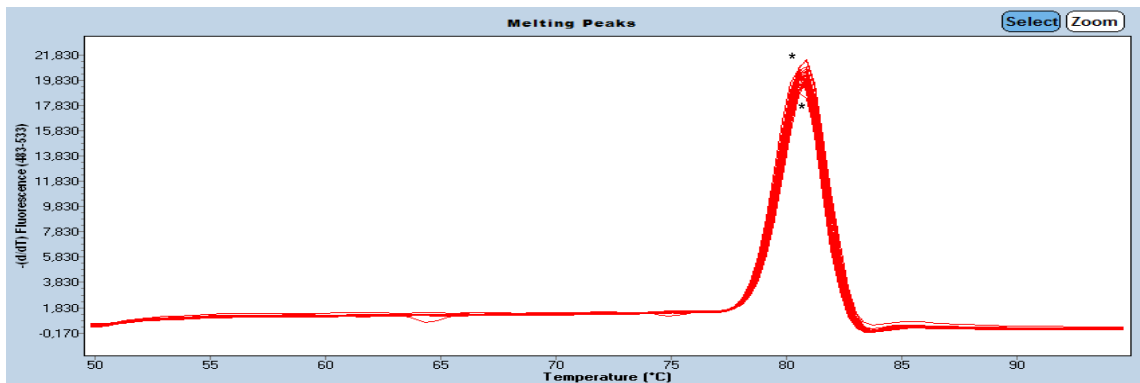
Abb. 11 A-D: Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die GATA2-Bindungsstelle (Fortsetzung s. nächste Seite)



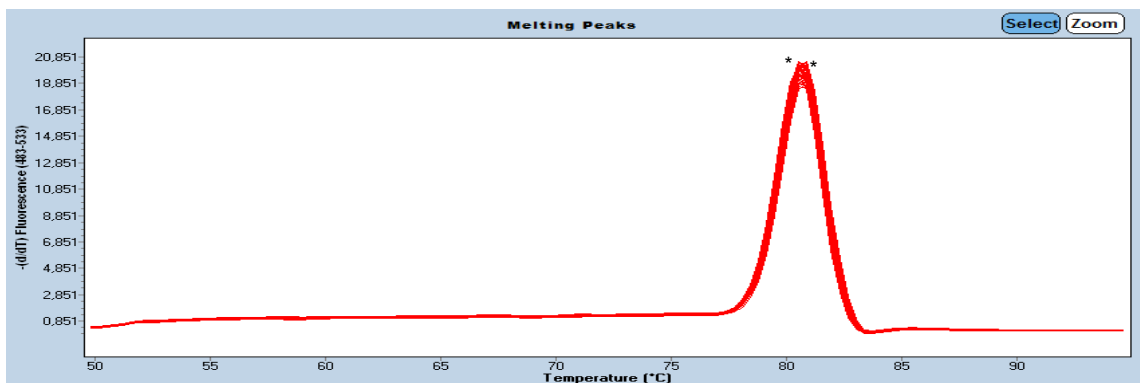
E



F



G



H

Abb. 11 E-H: Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die GATA2-Bindungsstelle (Fortsetzung s. nächste Seite)

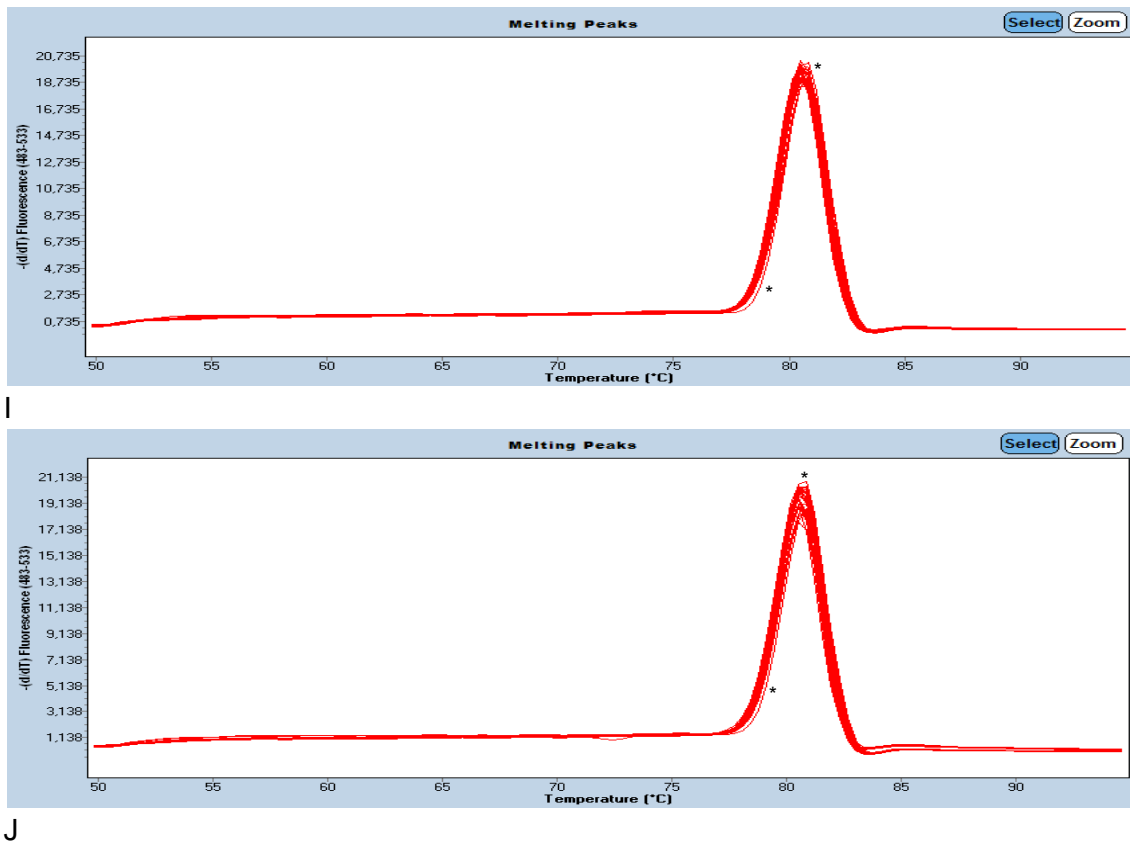
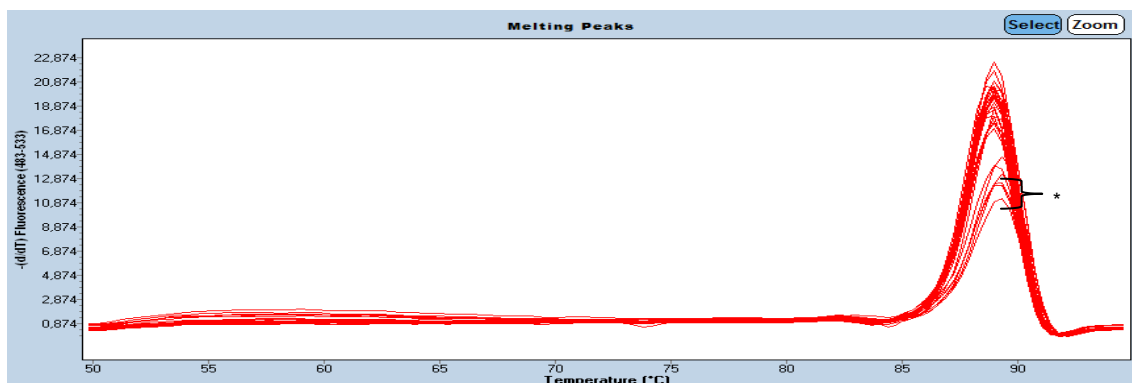


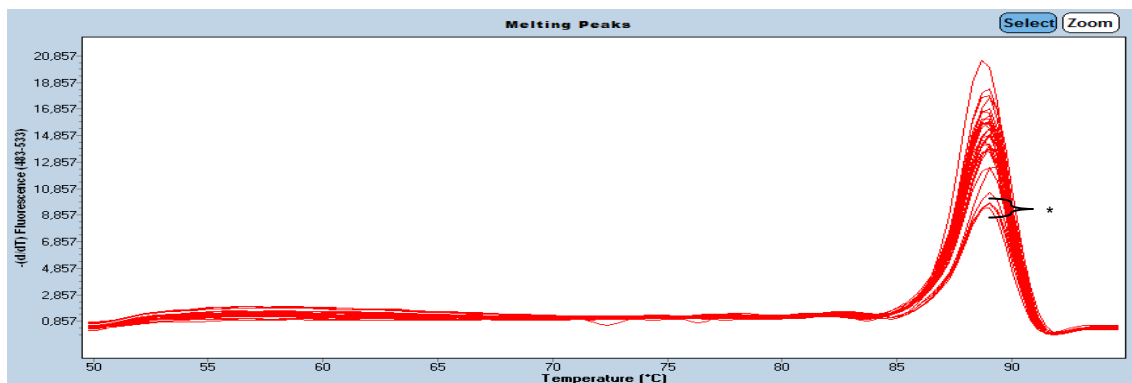
Abb. 11: Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die GATA2-Bindungsstelle: Dargestellt sind die „Melting Peaks“ (erste negative Ableitung der eigentlichen Schmelzkurven) der Proben, die mit der LightCycler[®]3-Software generiert wurden. Pro Messung wurden jeweils 30 Proben untersucht und die „Melting Peaks“ in einem gemeinsamen Schaubild aufgetragen (A-J). Schmelzkurven, die von der Mehrheit der Kurven abwichen, wurden als „auffällig“ betrachtet (*). Außerdem wurden jeweils die Schmelzkurven mit der höchsten und der niedrigsten Schmelztemperatur als „auffällig“ erachtet (in den Schaubildern A-J Peak bei der höchsten bzw. niedrigsten Temperatur). x-Achse: Temperatur in °C; y-Achse: erste negative Ableitung des Fluoreszenzmusters der Proben im Bereich 483-533 nm in relativen Einheiten.

Die Schmelzkurven bzw. die Melting Peaks der ZSCAN21-Bindungsstelle zeigten sich wesentlich inhomogener (Abb. 12). Folglich wurden kleinere Abweichungen in den Schmelzkurven toleriert und nur solche als „auffällig“ betrachtet, die deutlich von der Mehrheit der Kurven abwichen. Zusätzlich wurden auch bei diesen Messungen die Schmelzkurven mit der jeweils höchsten und geringsten Schmelztemperatur als „auffällig“ erachtet. In Abbildung 12 A-J sind die Melting Peaks der DNA-Proben in zehn Messungen mit jeweils 30 Proben dargestellt. Proben, die nicht aufgrund der höchsten oder

geringsten Schmelztemperatur, sondern aufgrund ihres Abweichens von der Mehrheit der Kurven ausgewählt wurden, sind mit einem Stern markiert. Da bei einigen PCR-Reaktionen Probleme auftraten (Abb. 12 G, H, J; blaue Kurven), wurden diese in einer gemeinsamen Messung wiederholt. Die Melting Peaks dieser Messung wurden ebenfalls in einem gemeinsamen Graphen aufgetragen (Abb. 12 K) und für die Auswahl „auffälliger“ Kurven ebenso verfahren, wie bei den Messungen zuvor. Durch dieses Vorgehen wurden insgesamt 97 DNA-Proben ausgewählt, die später sequenziert wurden.

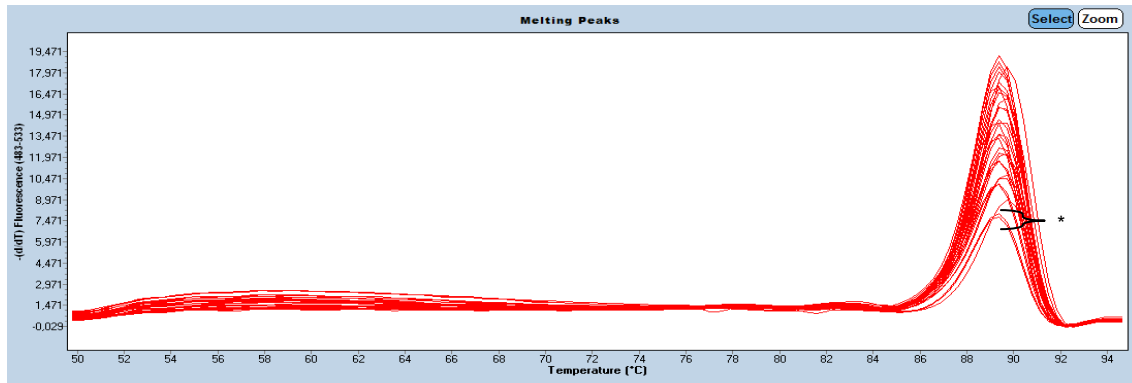


A

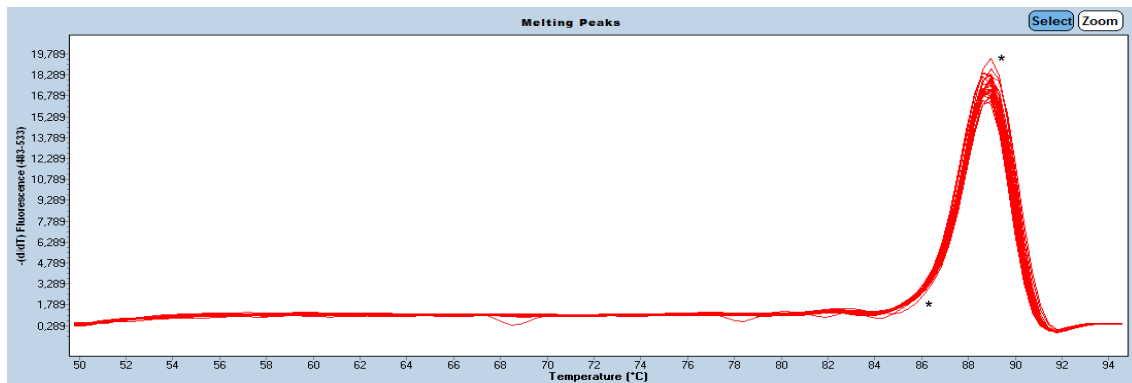


B

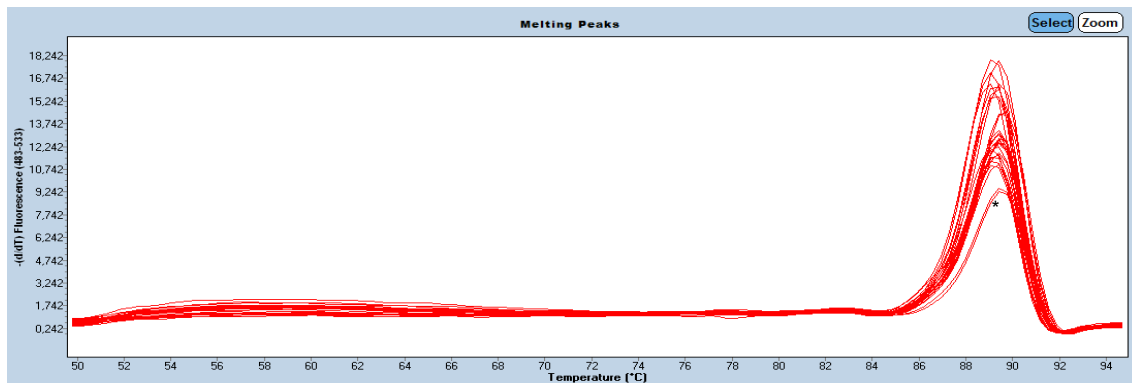
Abb. 12 A-B: Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die ZSCAN21-Bindungsstelle (Fortsetzung s. nächste Seite)



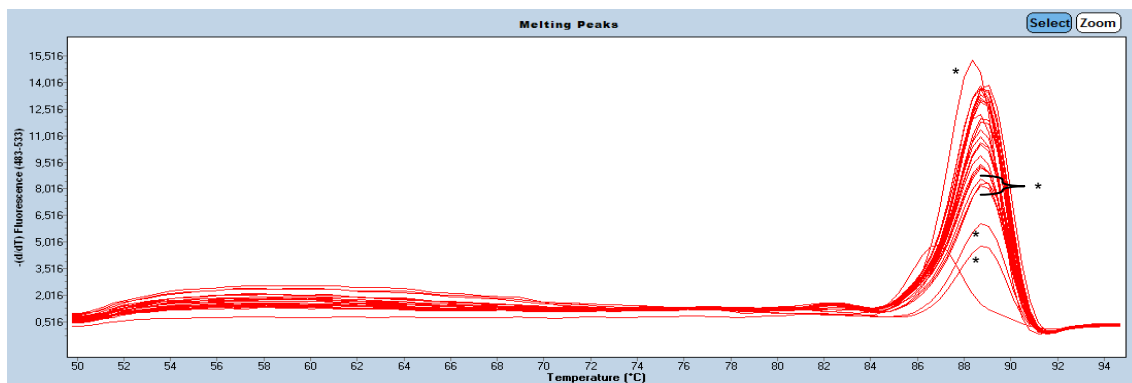
C



D

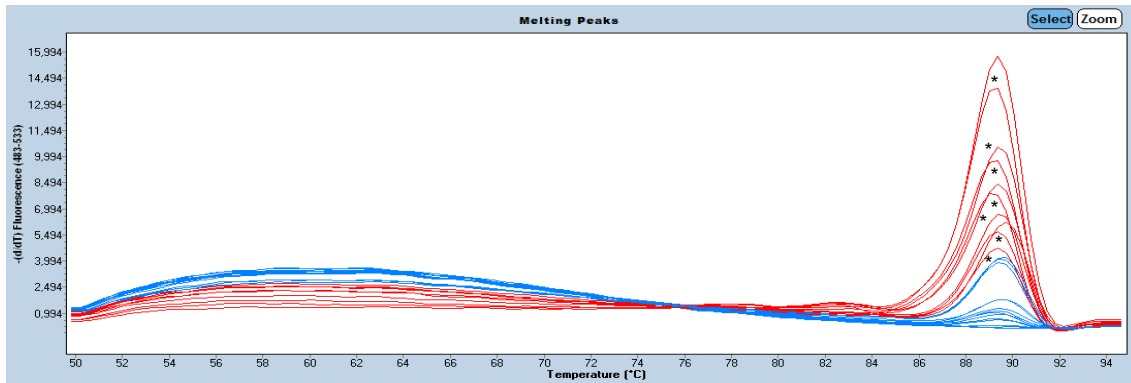


E

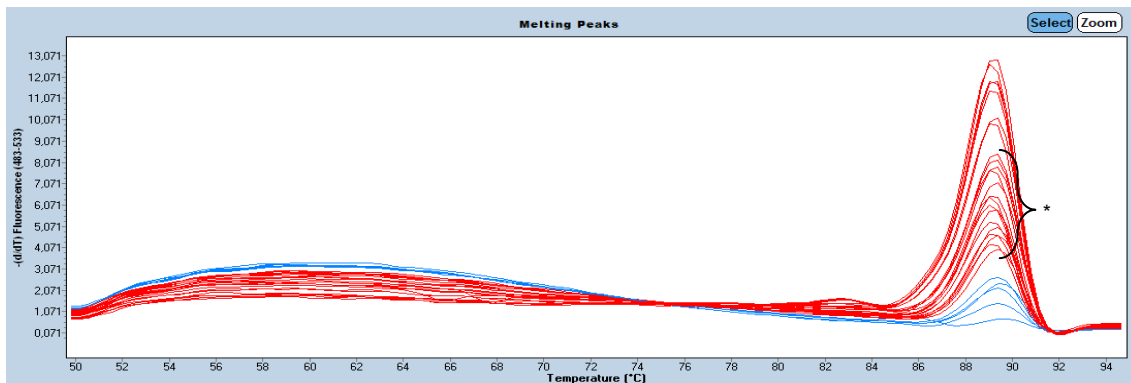


F

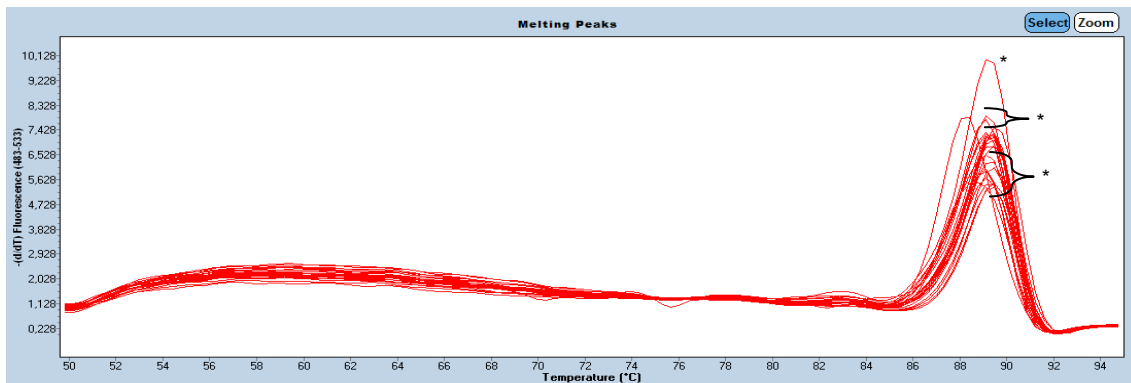
Abb. 12 C-F: Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die ZSCAN21-Bindungsstelle (Fortsetzung s. nächste Seite)



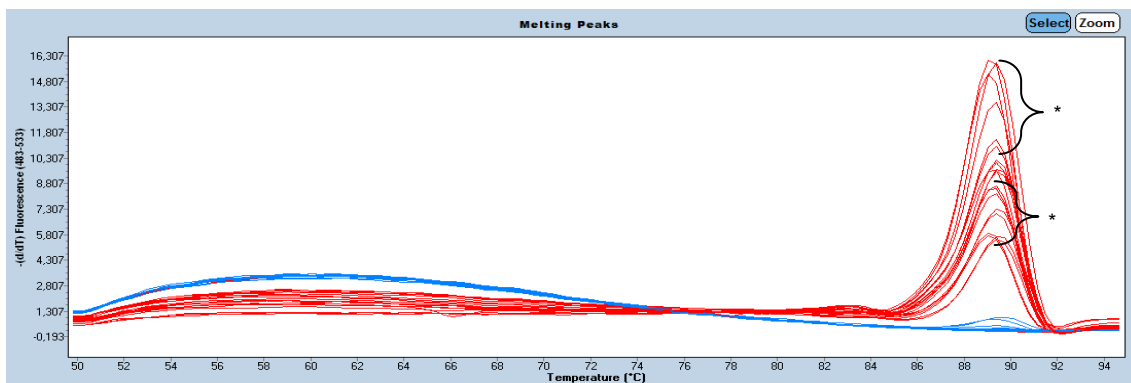
G



H

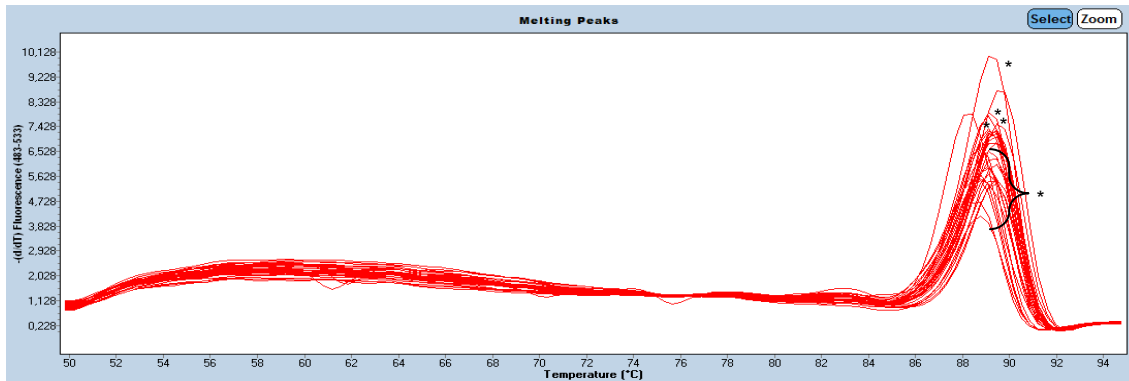


I



J

Abb. 12 G-J: Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die ZSCAN21-Bindungsstelle (Fortsetzung s. nächste Seite)



K

Abb. 12: Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die ZSCAN21-Bindungsstelle: Dargestellt sind die „Melting Peaks“ (erste negative Ableitung der eigentlichen Schmelzkurven) der Proben, die mit der LightCycler[®]3-Software generiert wurden. Pro Messung wurden jeweils 30 Proben untersucht und die „Melting Peaks“ in einem gemeinsamen Schaubild aufgetragen (A-J). Einige PCR-Reaktionen schienen nicht richtig abgelaufen zu sein (G, H, J; blaue Kurven). Diese wurden wiederholt und in einem gemeinsamen Schaubild aufgetragen (K). Schmelzkurven, die von der Mehrheit der Kurven abwichen, wurden als „auffällig“ betrachtet (*). Außerdem wurden jeweils die Schmelzkurven mit der höchsten und der niedrigsten Schmelztemperatur als „auffällig“ erachtet (in den Schaubildern A-K Peak bei der höchsten bzw. niedrigsten Temperatur).

x-Achse: Temperatur in °C; y-Achse: erste negative Ableitung des Fluoreszenzmusters der Proben im Bereich 483-533 nm in relativen Einheiten.

3.4.2 Ergebnisse Sequenzierungsanalysen

Auffälligkeiten in den Schmelzkurvenanalysen können zwar durch Polymorphismen in der DNA-Sequenz verursacht werden, entstehen aber beispielsweise auch bei einer geringen DNA-Qualität, bei Problemen im Ablauf der PCR-Reaktionen oder durch Pipettierfehler. Deshalb wurden alle DNA-Proben mit „auffälligen“ Schmelzkurven mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert. Es wurde verfahren wie unter Abschnitt 2.2.13 beschrieben.

Abbildung 13 B gibt einen schematischen Überblick über das sequenzierte DNA-Fragment für die GATA2-Bindungsstelle inklusive der Anlagerungsstellen der Primer und der Sequenz, an die GATA2 bindet.

Als erstes wurden die gewonnen Sequenzen mit dem sog. „Contig Editor“ des Programms Gap4 mit der Referenzsequenz, die über die Internetseite Nucleotide (siehe Abschnitt 2.2.13) bezogen wurde, abgeglichen. Abbildung 13

C zeigt einen solchen Abgleich der Referenzsequenz mit sequenzierten Proben. Die Bindungsstelle für GATA2 ist dabei rot umrandet. Eine definitive Aussage darüber, ob SNPs in den untersuchten DNA-Sequenzen vorhanden sind, lässt sich aber erst nach einer zusätzlichen visuellen Auswertung der Sequenzen treffen, da von dem Programm hin und wieder falsche Basen zugewiesen werden. Abbildung 13 D zeigt exemplarisch eine visuelle Auswertung der Sequenz im Bereich der GATA2-Bindungsstelle. Bei der Auswertung der 42 sequenzierten DNA-Proben konnten keine SNPs im Bereich der Bindungsstelle für GATA2 gefunden werden.

Abbildung 14 B gibt einen schematischen Überblick über das sequenzierte DNA-Fragment für die ZSCAN21-Bindungsstelle inklusive der Anlagerungsstellen der Primer und der Sequenz, an die ZSCAN21 bindet.

Auch die für diese Proben gewonnenen Sequenzen wurden als erstes mit dem „Contig Editor“ des Programms Gap4 mit der Referenzsequenz, die über die Internetseite Nucleotide (siehe Abschnitt 2.2.13) bezogen wurde, abgeglichen. Abbildung 14 C zeigt einen solchen Abgleich der Referenzsequenz mit sequenzierten Proben. Auch hier ist die Bindungsstelle für ZSCAN21 rot umrandet. Es folgte erneut die visuelle Auswertung der Sequenzen, die von Abbildung 14 D exemplarisch im Bereich der ZSCAN21-Bindungsstelle dargestellt wird. Bei der Auswertung aller 97 sequenzierten DNA-Proben konnten keine SNPs im Bereich der Bindungsstelle für ZSCAN21 gefunden werden.

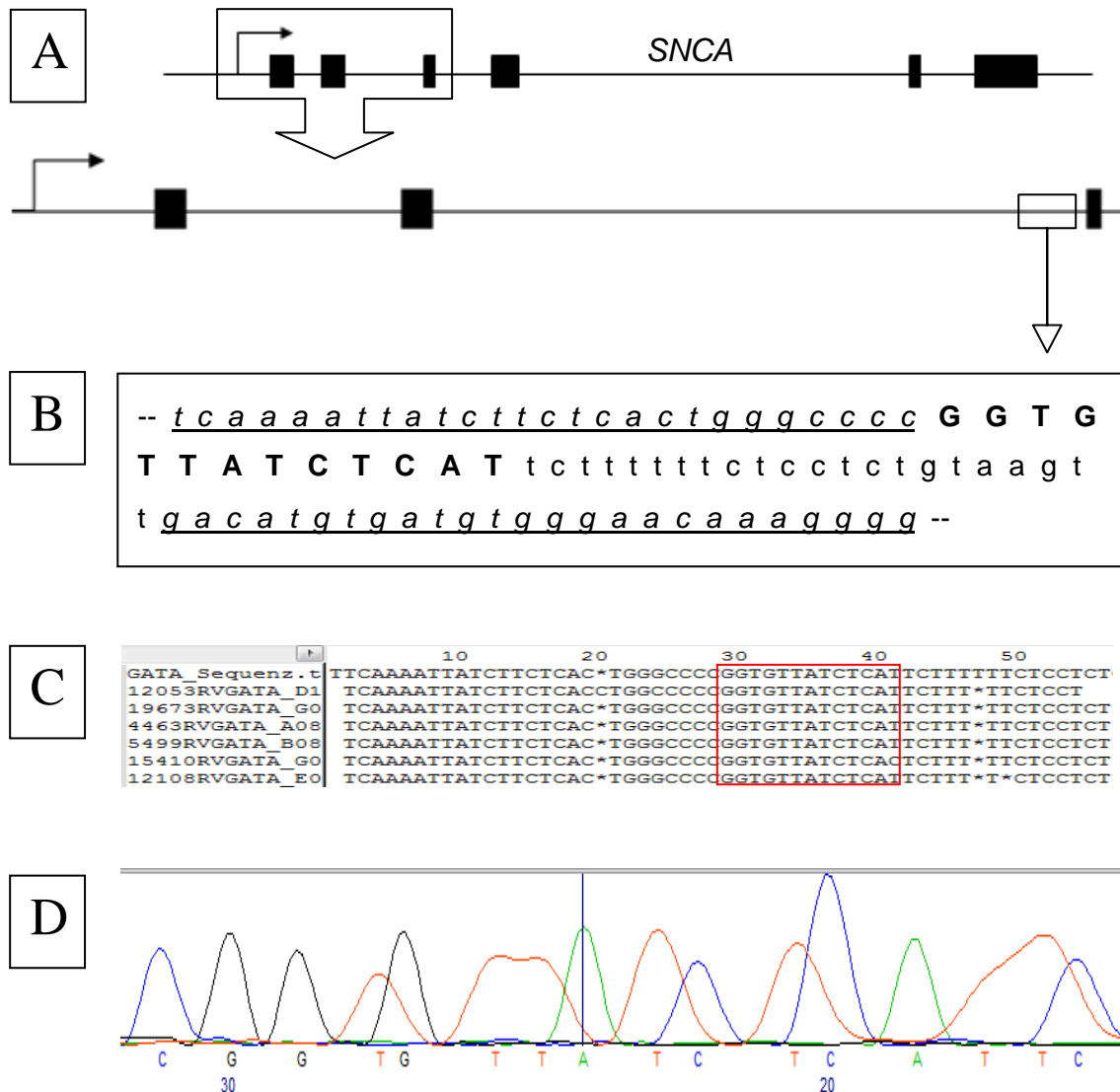


Abb. 13: Ergebnisse Sequenzierungen der GATA2-Bindungsstelle:

(A) Dargestellt ist das SNCA-Gen mit seinen sechs Exons (schwarze Boxen), darunter eine Vergrößerung der 5'-Promotorregion des SNCA-Gens mit den ersten drei Exons. Der Bereich, in dem sich die identifizierte GATA2-Bindungsstelle befindet, ist mit einer offenen Box dargestellt. (B) gibt die Basensequenz der DNA in diesem Bereich wieder. Diese entspricht auch dem DNA-Fragment, das durch die verwendeten Primer für die Sequenzierungsanalysen entstand. Hervorgehoben sind dabei die Anlagerungsstellen der Primer (kursiv und unterstrichen) und die Bindungsstelle für GATA2 (Großbuchstaben, fett gedruckt). Die gewonnenen Sequenzen wurden zunächst mithilfe des Programms Gap4 mit der Referenzsequenz abgeglichen. (C) zeigt dies exemplarisch. Die GATA2-Bindungsstelle ist rot umrandet. Anschließend wurden die Sequenzen auch visuell ausgewertet. (D) zeigt exemplarisch eine visuelle Auswertung der Sequenz im Bereich der GATA2-Bindungsstelle.

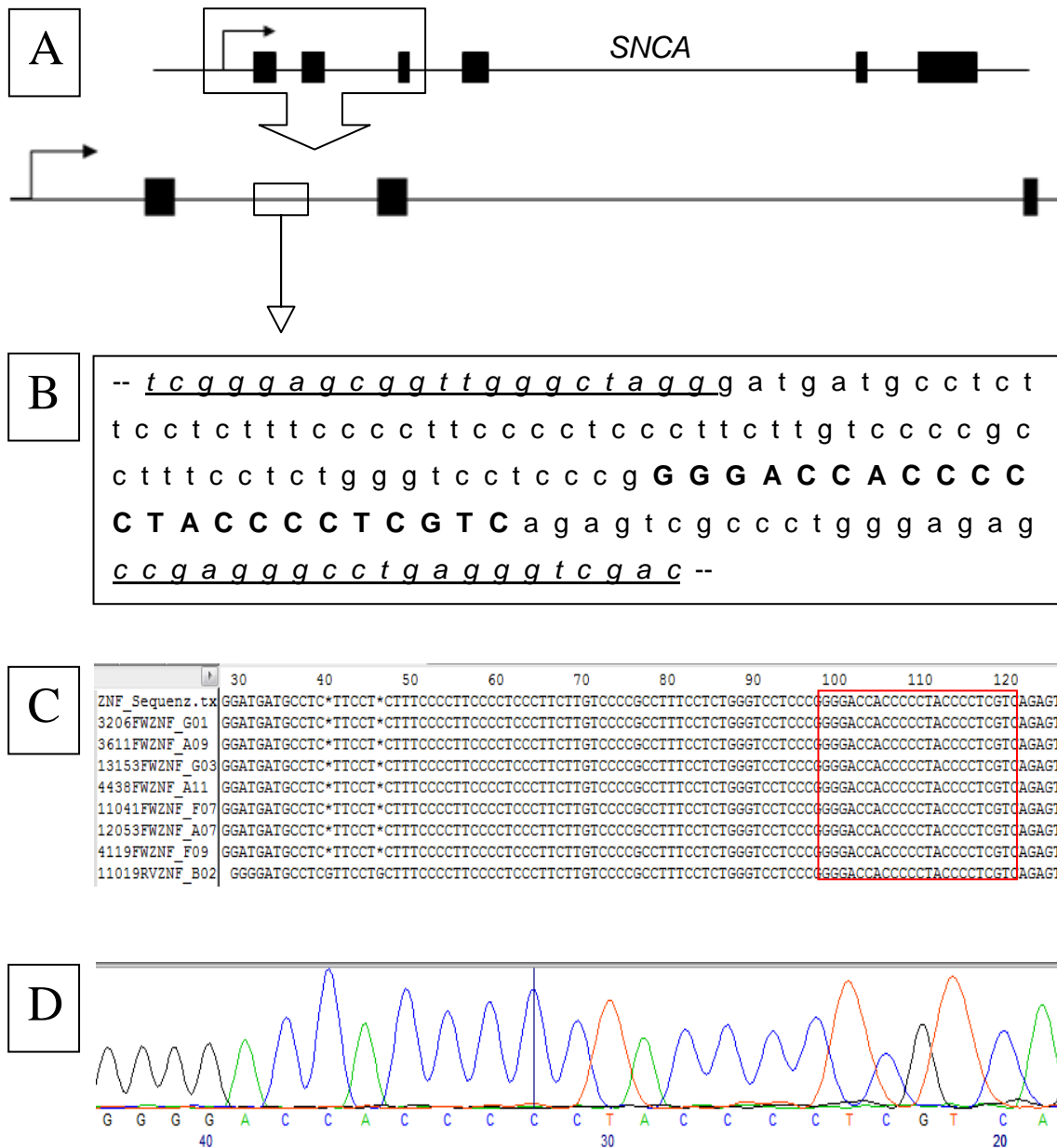


Abb. 14: Ergebnisse Sequenzierungen der ZSCAN21-Bindungsstelle: (A) Dargestellt ist das SNCA-Gen mit seinen sechs Exons (schwarze Boxen), darunter eine Vergrößerung der 5'-Promotorregion des SNCA-Gens mit den ersten drei Exons. Der Bereich, in dem sich die identifizierte ZSCAN21-Bindungsstelle befindet, ist mit einer offenen Box dargestellt. (B) gibt die Basensequenz der DNA in diesem Bereich wieder. Diese entspricht auch dem DNA-Fragment, das durch die verwendeten Primer für die Sequenzierungsanalysen entstand. Hervorgehoben sind dabei die Anlagerungsstellen der Primer (kursiv und unterstrichen) und die Bindungsstelle für ZSCAN21 (Großbuchstaben, fett gedruckt). Die gewonnen Sequenzen wurden zunächst mithilfe des Programms Gap4 mit der Referenzsequenz abgeglichen. (C) zeigt dies exemplarisch. Die ZSCAN21-Bindungsstelle ist rot umrandet. Anschließend wurden die Sequenzen auch visuell ausgewertet. (D) zeigt exemplarisch eine visuelle Auswertung der Sequenz im Bereich der ZSCAN21-Bindungsstelle.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Patientendaten der untersuchten DNA-Proben und fasst noch einmal die Ergebnisse aus den Schmelzkurven- und Sequenzierungsanalysen zusammen.

Tabelle 15: Überblick über die untersuchten DNA-Proben sowie über die Ergebnisse der Schmelzkurven- und Sequenzierungsexperimente: Obwohl einige auffällige Schmelzkurven identifiziert wurden, konnten keine SNPs innerhalb der Bindungsstellen gefunden werden. (N = Anzahl der untersuchten DNA-Proben)

Parameter	Bindungsstelle GATA2	Bindungsstelle ZSCAN21
N_{gesamt}	300	300
N_{Frauen}	150	150
$N_{\text{Männer}}$	150	150
Mittleres Alter in Jahren	64	64
Altersspanne in Jahren	25 – 87	25 – 87
Auffällige Schmelzkurven	42	97
Identifizierte SNPs	0	0

3.4.3 Identifikation bereits bekannter SNPs

Da durch die Schmelzkurven- und Sequenzierungsanalysen keine SNPs im Bereich der Bindungsstellen für GATA2 und ZSCAN21 entdeckt wurden, wurde die Datenbank dbSNP (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) durchsucht, um mögliche annotierte SNPs in diesen Bereichen zu identifizieren. Tabelle 16 listet annotierte SNPs im Bereich der GATA2-Bindungsstelle auf. Tabelle 17 gibt einen Überblick über annotierte SNPs im Bereich der Bindungsstelle für ZSCAN21. Aufgelistet wurden alle SNPs, die sich bis zu 300 bp upstream und downstream der TF-Bindungsstellen befinden und zum Zeitpunkt der Abfrage (24.10.2014) auf dbSNP annotiert waren. Zusätzlich wurden die Daten einer großen Metaanalyse [211] mit einbezogen, um mögliche weitere SNPs zu identifizieren. Hierbei konnten jedoch keine weiteren SNPs gefunden werden.

Tabelle 16: Annotierte SNPs im Bereich der identifizierten GATA2-Bindungsstelle. Die GATA2-Bindungsstelle befindet sich bei Position 89828489 – 89828501. (MAF = minor allele frequency, meta_p = Signifikanzwert der Korrelation des jeweiligen Markers mit der Parkinsonerkrankung aus der Metaanalyse von Nalls *et al.* [211], die Marker und ihre Position beziehen sich auf dbSNP Build 38 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=SNCA>], ? = unbekannt)

Marker	Allel 1	Allel 2	MAF	meta_p	Position
rs372651800	A	G	?	?	89828206
rs112784542	A	T	0,005	?	89828211
rs23204288	C	T	0,0074	?	89828217
rs367729653	C	G	?	?	89828253
rs551188601	C	T	0,0002	?	89828256
rs562919408	C	T	0,0002	?	89828260
rs181820888	A	G	0,0006	?	89828273
rs34183114	A	C	0,0066	?	89828284
rs149886412	-	AAAA	0,0843	?	89828312
rs536424684	A	T	?	?	89828318
rs370822693	-	AATAT	?	?	89828318
rs144098619	-	AT	?	?	89828319
rs554831708	A	T	0,0459	?	89828320
rs3831458	-	CT	0,231	?	89828357
rs185132665	C	G	0,0002	?	89828445
rs368026041	A	G	0,0006	?	89828486
(rs1372514	A	A	?	?	89828499)
rs567587107	C	T	0,0002	?	89828501
rs2737006	A	G	0,1076	4,479*10⁻⁷	89828535
rs536808259	C	T	?	?	89828580
rs34991691	-	A	0,3295	?	89828645
rs79045650	A	C	?	?	89828652
rs35510249	-	AC	0,1074	1,46*10 ⁻⁵	89828652
rs146395512	A	C	?	?	89828653
rs35932998	-	A	?	?	89828654
rs556372320	A	T	0,0002	?	89828695

Tabelle 17: Annotierte SNPs im Bereich der identifizierten ZSCAN21-Bindungsstelle. Die ZSCAN21-Bindungsstelle befindet sich bei Position 89837514 – 89837537. (MAF = minor allele frequency, meta_p = Signifikanzwert der Korrelation des jeweiligen Markers mit der Parkinsonerkrankung aus der Metaanalyse von Nalls *et al.* [211], die Marker und ihre Position beziehen sich auf dbSNP Build 38 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=SNCA>], ? = unbekannt)

Marker	Allel 1	Allel 2	MAF	meta_p	Position
rs578214974	A	C	0,0006	?	89837231
rs2301135	C	G	0,3433	?	89837238
rs552248626	C	G	0,0002	?	89837240
rs570452939	C	T	0,0018	?	89837278
rs3216775	-	A/AA	0,3437	0,0002918	89837286
rs397709427	-	T	0,46	?	89837287
rs528037170	C	T	0,0002	?	89837345
rs34956990	G	T	0,02	?	89837357
rs566215221	G	T	0,0002	?	89837358
rs536870304	A	G	0,0004	?	89837370
rs34739410	-	G	?	?	89837377
rs548477668	C	T	0,0004	?	89837410
rs569841903	C	G	0,0002	?	89837430
rs537141425	A	G	0,0016	?	89837452
rs35587492	A	G	?	?	89837465
rs34912789	-	TC	?	?	89837467
rs189032094	A	G	0,0008	?	89837504
rs35347270	-	C	?	?	89837520
rs531716596	A	C	?	?	89837671
rs181310445	C	T	0,0002	?	89837711
rs534663880	A	C	0,0002	?	89837735
rs553253414	C	G	0,0002	?	89837748
rs2301134	C	T	0,3526	?	89837794

Es wurde ein annotierter SNP, rs1372514, innerhalb der GATA2-Bindungsstelle identifiziert (in Tab. 16 fett hervorgehoben). Allerdings zeigte sich, dass die beiden Allele in allen untersuchten Populationen des HapMap-Projects dieselben waren. Somit ist eher davon auszugehen, dass dieser SNP nicht existiert. In einem zweiten Schritt wurden die SNPs, die sich in der Nähe der GATA2-Bindungsstelle befinden, auf ihre Bedeutung für ein erhöhtes Risiko, an einem IPS zu erkranken, untersucht. Die Datenbank dbSNP lieferte hierzu keine Angaben. Allerdings zeigte die Metaanalyse von Nalls *et al.* [211], dass SNP rs2737006 mit einem erhöhten Risiko einhergeht, an Parkinson zu erkranken. rs2737006 befindet sich 34 bp upstream der GATA2-Bindungsstelle (in Tab. 16 ebenfalls fett hervorgehoben). Ein weiterer identifizierter Marker, der mit einem erhöhten Risiko einhergeht, an einem IPS zu erkranken, rs35510249, befindet sich 151 bp upstream der GATA2-Bindungsstelle.

Innerhalb der ZSCAN21-Bindungsstelle wurde ein annotierter SNP, rs35347270, identifiziert (in Tab. 17 fett hervorgehoben). Es handelt sich hierbei um eine Insertion der Base Cytosin. Über die Frequenz des SNP ist nichts bekannt. Ebenso gibt es keine Daten darüber, ob der Polymorphismus eine Assoziation mit der Parkinsonerkrankung aufweist. Der am nächsten an der ZSCAN21-Bindungsstelle gelegene SNP, der mit einem erhöhten Risiko einhergeht, an einem IPS zu erkranken, ist rs3216775 (in Tab. 17 ebenfalls fett hervorgehoben). Dieser Polymorphismus liegt 228 bp downstream der ZSCAN21-Bindungsstelle.

4. Diskussion

4.1 Einordnung und Stellenwert dieser Arbeit

Wie bereits in der Einleitung ersichtlich wird, bestehen mehrere Verbindungen zwischen *aSYN* und der Parkinsonerkrankung. Von großer Bedeutung war hierbei zunächst die Beobachtung, dass Mutationen innerhalb des Gens zu selten familiären Formen der Parkinsonerkrankung führen [81, 122, 123]. Dies kann auf eine veränderte Aminosäureabfolge im *aSYN*-Protein und die sich hieraus ergebenden veränderten biochemischen Eigenschaften zurückgeführt werden. Später zeigte sich jedoch, dass für die Krankheitsentwicklung auch die Gendosis entscheidend zu sein scheint. Dies wurde zunächst anhand von Gen-Multiplikationen, die ebenfalls zu seltenen erblichen Parkinsonerkrankungen führen, ersichtlich [86, 87]. Allerdings lassen bereits neuropathologische Erkenntnisse darauf schließen, dass diese Effekte auch beim nicht-erblichen IPS und den anderen Synukleinopathien entscheidend sein können [18, 42, 44, 121]. Bei der häufigste Erkrankung unter den Synukleinopathien, dem sporadisch auftretenden IPS, wird diese Hypothese durch mehrere Erkenntnisse gestützt: Zum einen zeigte sich, dass ein Dinukleotid-Repeat-Polymorphismus (NACP-Rep1) im 5'-Promotor abhängig von seiner Länge die Genexpression von *SNCA* erhöht und damit ein erhöhtes Risiko besteht, an einem IPS zu erkranken [151]. Zum anderen wurden SNPs im *SNCA*-Lokus identifiziert, die das Risiko erhöhen, an einem IPS zu erkranken, und die mit erhöhten *aSYN*-Level im Blut und Hirn einhergehen [160, 200, 201].

Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass der Genexpression von *SNCA* eine große Bedeutung zukommt. Ein wichtiger Schritt bei der Genexpression ist die Transkription. Zum Verständnis der Transkription sind Kenntnisse über den Promotorbereich sowie zu den TF entscheidend. Doch genau hierzu ist die Datenlage bisher gering. Bislang wurden nur wenige TF identifiziert, die die Transkription initiieren könnten, und der Promotorbereich wurde nur wenig charakterisiert. Zudem beruhen alle diese Erkenntnisse auf Untersuchungen an speziellen Zellmodellen.

Diese Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der Transkription des *SNCA*-Gens. Es werden sowohl TF und ihre Interaktionen mit dem Promotorbereich untersucht als auch der Promotorbereich selbst näher charakterisiert. Ein Alleinstellungsmerkmal dieser Arbeit ist, dass sämtliche Untersuchungen an menschlichem Hirngewebe durchgeführt wurden und so erstmals bisherige Erkenntnisse aus Zellmodellen auf ihre Gültigkeit beim Menschen untersucht wurden. Dabei konnten manche Ergebnisse bestätigt, aber auch Grenzen dieser Übertragbarkeit aufgezeigt werden.

Durch die Sequenzierungen der identifizierten TF-Bindungsstellen liefert diese Arbeit zudem wichtige Erkenntnisse über die zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen von SNPs, die die Genexpression von *SNCA* und hierüber wohl auch das Risiko, an einem IPS zu erkranken, erhöhen. Es ist bisher nämlich völlig unklar, über welche Mechanismen solche SNPs in der Lage sind, die Genexpression zu beeinflussen. In Frage kommen vor allem Auswirkungen auf die mRNA und auf die Translation sowie Veränderungen von TF-Bindungsstellen, was durch die Sequenzierungen untersucht werden konnte.

Der Stellenwert dieser und ähnlicher Arbeiten wird ersichtlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass trotz intensiver Forschung die Ätiologie der Parkinson-Syndrome nach wie vor nicht endgültig aufgeklärt ist [212, 213]. Welche molekularbiologischen Mechanismen zum häufig selektiven Untergang von Neuronenpopulationen führen, bleibt letztlich ebenso ungeklärt wie der Einfluss von Umweltfaktoren. Zudem bestehen Defizite auf diagnostischer und therapeutischer Ebene: Diagnostisch ist es häufig schwierig, atypische Parkinson-Syndrome von einem IPS abzugrenzen [213]. Therapeutisch lassen sich alle Parkinson-Syndrome nur symptomatisch und nicht kausal behandeln. Genetische Untersuchungen wie die der vorliegenden Arbeit können helfen, die Ätiologie besser zu verstehen und ermöglichen zukünftig vielleicht, genetische Screening-Untersuchungen durchzuführen. Besonders wichtig scheint diese Arbeit jedoch im Hinblick auf eine zukünftige kausale Therapie der Parkinson-Syndrome: TF bieten einen pharmakologischen Ansatzpunkt, um die Genexpression von *SNCA* zu erniedrigen. Unter der Annahme, dass eine

erhöhte Expression zur Neurodegeneration führt, könnten Parkinson-Syndrome auf diese Weise sogar verhindert werden bevor sie entstehen.

Limitationen dieser Arbeit werden in Abschnitt 4.2 diskutiert.

4.2 Diskussion der Patientenproben und der Methodik

4.2.1 Hirngewebeproben und Spender

Bei der Auswahl der Hirngewebeproben wurde darauf geachtet, dass die Spender an keiner neurologischen oder psychiatrischen Erkrankung litten. So sollte sichergestellt werden, dass physiologische Prozesse untersucht werden können und nicht krankheitsspezifische Interaktionen detektiert werden. Dies scheint besonders unter dem Aspekt der beschriebenen SNPs, die die Genexpression von *SNCA* beeinflussen [160, 200, 201], wichtig, da diese Beeinflussung über eine veränderte Bindung von TF oder anderen regulatorischen Proteinen an die DNA vermittelt werden könnte [191]. Da nicht nur retrospektiv die Krankenakten der Spender durchgesehen wurden, um neurologische und psychiatrische Erkrankungen auszuschließen, sondern auch eine histologische Beurteilung der Gewebe durchgeführt wurde, kann relativ sicher davon ausgegangen werden, dass die Spender tatsächlich neurologisch und psychiatrisch gesund waren. Limitationen ergeben sich natürlich bzgl. psychiatrischer Erkrankungen. Darüber hinaus wurden sowohl Proben von einem männlichen und einem weiblichen Spender untersucht. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gibt. Limitationen der Ergebnisse ergeben sich aus der geringen Anzahl an Spenderindividuen und daraus, dass keine jungen Spender eingeschlossen wurden, sondern alle Spender älter als 67 Jahre waren. Außerdem wurden nur Proben aus den Bereichen Medulla oblongata, Gyrus cinguli und frontaler Kortex untersucht. Proben aus anderen Hirnregionen waren nicht verfügbar. So konnte auch die besonders für das IPS wichtige SN nicht untersucht werden. Da jedoch die Ergebnisse in allen drei untersuchten Regionen übereinstimmten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um weit verbreitete Mechanismen in Hirngewebe handelt, die sich prinzipiell auf andere Regionen, auch auf die SN, übertragen lassen. Eine letzte Limitation ergibt sich daraus,

dass bei der Untersuchung der Gewebeproben nicht zwischen neuronalen und glialen Zellen unterschieden werden konnte. Zwar belegen neuere Untersuchungen, dass beispielsweise bei der MSA α SYN nicht nur in glialen, sondern auch in neuronalen Zellen akkumuliert [44], was eine gemeinsame Untersuchung dieser Zellen rechtfertigt. Allerdings treten LK beim IPS und der DLB nur in Neuronen auf [18], weshalb letztlich eine getrennte Untersuchung sinnvoller wäre. Somit besteht hier eine gewisse Unschärfe.

4.2.2 Patientenauswahl für das Screening nach SNPs

Die DNA für das Screening nach SNPs stammte ausschließlich von Patienten, die an einem idiopathischem Parkinson-Syndrom erkrankt waren. Die Diagnosestellung erfolgte anhand der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Kriterien ([27] und Abschnitt 1.2.1) und wurde von Spezialisten für Bewegungsstörungen getroffen. Wie sicher die Diagnose bei Anwendung dieser Kriterien ist, wurde in einigen Studien untersucht. Dabei zeigte sich je nach Studie, dass die Diagnose zu 82-99% korrekt war (positiver prädiktiver Wert). Tabelle 18 gibt einen Überblick über diese Studien.

Tabelle 18: Positiver prädiktiver Wert für die Diagnose eines IPS unter Anwendung der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Kriterien [27] in verschiedenen Studien

Studie	Positiver prädiktiver Wert
Hughes <i>et al.</i> 1992 [27]	82%
Ansorge <i>et al.</i> 1997 [214]	84%
Hughes <i>et al.</i> 2001 [215]	90%
Hughes <i>et al.</i> 2002 [216]	99%

Wie aus der Tabelle ersichtlich, kann trotz relativ hoher Diagnosesicherheit nicht ausgeschlossen werden, dass auch Patienten, die nicht an einem IPS leiden, in die Untersuchungen mit eingeschlossen wurden. Dennoch kann aufgrund dieser Zahlen und der Expertise der betreuenden Ärzte davon ausgegangen werden, dass die Anzahl an fälschlicherweise eingeschlossenen Patienten gering ist.

Das Alter der Patienten lag zwischen 25 und 87 Jahren. Es wurde somit eine sehr weite Altersspanne abgedeckt. Das mittlere Alter betrug 64 Jahre und lag damit etwas über dem durchschnittlichen mittleren Manifestationsalter von 60 Jahren [11]. Damit geschlechtsspezifische Unterschiede ausgeschlossen werden konnten, stammten die DNA-Proben zu gleichen Anteilen von Männern und Frauen. Insgesamt wurden 300 Proben auf SNPs gescreent. Somit ließen sich theoretisch SNPs mit einer MAF von 0,0033 nachweisen, was für ein solches Screening ausreichend erscheint. Dennoch kann mit diesem Umfang nicht ausgeschlossen werden, dass evtl. vorhandene sehr seltene SNPs nicht detektiert wurden. Eine letzte Limitation ergibt sich daraus, dass die DNA-Proben von der Biobank des Hertie Instituts für klinische Hirnforschung in Tübingen hauptsächlich von europäischen Parkinsonpatienten stammten. Es wurde folglich eine europäische Kohorte untersucht. Da SNPs jedoch bei Menschen unterschiedlicher Ethnie unterschiedlich häufig vorkommen [187], ist nicht ausgeschlossen, dass Studien, die eine andere Kohorte untersuchen, zu einem anderen Ergebnis kommen.

4.2.3 Western Blotting und Immunopräzipitationen

Western Blots boten sich als einfache und schnelle Methode an, C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21 in den Proteinlysaten aus den Zellkernen unterschiedlicher Hirngewebe nachzuweisen. Dennoch gelingt der Nachweis von Proteinen nicht immer mit dieser Methode. Neben einer zu geringen Menge an nachzuweisendem Protein gibt es gleich mehrere weitere Ursachen: Es können Probleme mit den verwendeten Antikörpern und Puffern auftreten. Außerdem gelingt der Nachweis nicht, wenn zu intensiv gewaschen wird oder das Antigen von der eingesetzten Blocking-Lösung maskiert wird. Letztlich kann die Expositionszeit der Membranen gegenüber den Filmen zu kurz gewählt sein. Es wurde versucht, alle diese Ursachen zu beseitigen, sodass ein Protein, das nicht nachgewiesen werden konnte, wahrscheinlich nicht oder in einer zu geringen Menge vorhanden war. Dennoch kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass solche Ursachen verhinderten, dass ein Protein nicht nachgewiesen werden konnte.

IP ermöglichen es, Proteine aus einer Lösung zu isolieren und auf diese Weise zu konzentrieren [217]. Sie eignen sich also auch bei einer geringen Ausgangsmenge zum Proteinnachweis [218]. Wenn es daher, wie im Falle von ZSCAN21, nicht gelang, ein Protein mittels Western Blotting nachzuweisen, wurde eine IP durchgeführt, um die Annahme, dass das Protein nicht oder in einer geringen Konzentration vorliegt, zu bekräftigen. So konnten durch die Kombination von Western Blotting und IP Proteine relativ sicher nachgewiesen werden. Außerdem ermöglichte diese Kombination die grobe Abschätzung in welcher Menge ein Protein vorliegt.

4.2.4 Der Einsatz bioinformatischer Programme

Zur Vorhersage potentieller Promotorbereiche und Bindungsstellen für TF wurde in dieser Arbeit das Programm MatInspector von Genomatix verwendet. Der Einsatz eines solchen Programms erschien sinnvoll, da mehrere vorausgegangene Studien zeigten, dass der Promotorbereich von SNCA eine sehr komplexe Struktur besitzt [147, 151-153] und über diese Region sowie über mögliche TF nur sehr wenig bekannt ist. Bioinformatische Programme können hierbei durch die Einbeziehung von Kenntnissen aus der Genregulation anderer Gene und die Anwendung „allgemein gültiger Regeln“ für die Transkription helfen, solche komplexe Regionen besser zu verstehen. Nur so ließen sich Promotorbereiche in der 5'-Region von SNCA definieren und darin nach möglichen TF-Bindungsstellen suchen. Allerdings besteht durch dieses Vorgehen die Gefahr, dass genspezifische Aspekte außer Acht gelassen und so beispielsweise wichtige TF-Bindungsstellen außerhalb der definierten Promotorbereiche nicht untersucht wurden. Für die Vorhersage der TF-Bindungsstellen benutzte das Programm sogenannte positionsgewichtete Matrizen. Diese ermöglichen zwar eine genauere Vorhersagbarkeit als Konsensussequenzen [207], bieten aber dennoch keine endgültige Sicherheit und Vollständigkeit über TF-Bindungsstellen. Die nachfolgenden *in vitro*-Untersuchungen sind folglich höchstens so valide wie die Vorhersagen des verwendeten bioinformatischen Programms.

Bei allen mittels MatInspector identifizierten TF-Bindungsstellen handelt es sich um *in silico*-Vorhersagen. Dabei ist zu beachten, dass diese *in silico*-TF-Bindungsstellen nicht mit *in vitro*- oder gar *in vivo*-Bedingungen gleichzusetzen sind, da multiple Parameter wie die Chromatinumgebung, der Abstand zum nächsten *cis*-Element oder intrinsische Eigenschaften des Bindungsmotivs entscheidend sind [219]. Darüber hinaus werden durch bioinformatische Programme zelltypspezifische Unterschiede, die ebenfalls Einfluss auf diese Parameter haben, vernachlässigt. Somit war es unerlässlich, die mittels MatInspector identifizierten potentiellen TF-Bindungsstellen durch *in vitro*- und *in vivo*-Methoden auf ihre funktionelle Relevanz zu überprüfen.

4.2.5 ChIP Assays und EMSAs

Die mittels MatInspector identifizierten potentiellen TF-Bindungsstellen wurden zunächst durch ChIP Assays auf ihre funktionelle Relevanz überprüft. Es wurden bewusst ChIP Assays zur Untersuchung dieser TF-DNA-Interaktionen durchgeführt, da diese anderen Methoden gegenüber überlegen sind [220]. Außerdem ermöglichen sie es, spezifisch Proteine an ihrer DNA-Bindungsstelle nachzuweisen. Zwar ist diese Spezifität zunächst durch die Spezifität der verwendeten Antikörper begrenzt. Durch den Einsatz spezifischer Primer passend zu der potentiellen Bindungsstelle wird diese Einschränkung jedoch wieder beseitigt. Limitationen der ChIP Assays ergeben sich im Wesentlichen durch ineffiziente Cross-links und Antikörper-Antigen-Bindungen. In beiden Fällen ließe sich das gesuchte DNA-Fragment in der PCR nicht oder nur in geringen Mengen nachweisen. Da jedoch signifikante Signale in den ChIP Assays auftraten, kann von effizienten Cross-links und Antikörper-Antigen-Bindungen ausgegangen werden.

Nach der Identifikation der TF-Bindungsstellen durch die ChIP Assays stellte sich die Frage, wie diese Interaktionen weiter charakterisiert werden können. Dabei boten sich EMSAs an, da diese eine schnelle und extrem sensitive Methode darstellen, um TF-DNA-Interaktionen zu untersuchen, und auch eine Aussage über die Bindungseigenschaften ermöglichen [221]. Die Schwierigkeit dieser Assays bestand darin, geeignete Bedingungen für die TF-DNA-

Bindungen zu finden. Als diese Bedingungen gefunden worden waren, waren die Assays kaum störungsanfällig. Letztlich sollten noch Supershift-Assays durchgeführt werden, bei denen neben der DNA und dem Lysat der Zellkernproteine spezifische Antikörper gegen die TF, deren Bindung untersucht werden soll, hinzugegeben werden. Durch die Bindung der Antikörper an die TF entstehen Banden in der Elektrophorese, die noch langsamer migrieren als die Banden, die nur aus TF und DNA bestehen. Dies dient dem Nachweis, dass die Shifts der Banden in den EMSAs tatsächlich durch die TF, die untersucht werden sollen, hervorgerufen werden. Die Supershift-Assays gelangen nicht. Am wahrscheinlichsten ist dies darauf zurückzuführen, dass die Bedingungen, die für die TF-DNA-Interaktionen günstig waren, keine Bindung der Antikörper an die Proteine zuließen. Somit ist letztlich nicht auszuschließen, dass die Shifts der Banden auch von anderen Protein-DNA-Interaktionen als den angenommenen ausgelöst wurden. Da jedoch das Design der EMSAs auf spezifische Protein-DNA-Interaktionen schließen lässt (Einsatz von spezifischen und unspezifischen Kompetitoren), die jeweiligen Interaktionen vorher mittels ChIP Assays identifiziert und die TF durch Western Blotting und IP in den Proteinlysaten der Zellkerne nachgewiesen werden konnten, ist dies äußerst unwahrscheinlich.

4.2.6 Schmelzkurvenanalysen und Sequenzierungen

Die für das Screening nach SNPs eingesetzte Kombination aus Schmelzkurvenanalysen und Sequenzierungen erschien sinnvoll, da sie gegenüber alleiniger Sequenzierungen den Vorteil bietet, dass eine große Probenanzahl schnell und kostengünstig gescreent werden kann. Darüber hinaus gewährleisten Schmelzkurvenanalysen als Screening-Methode für SNPs eine gute Sensitivität und Spezifität [222].

Proben, deren Schmelzkurve von der Mehrzahl der Kurven abwich, wurden sequenziert. Die Sequenzierungen erlauben dabei den Nachweis von SNPs mit hoher Sicherheit, besonders wenn, wie hier geschehen, der forward- und reverse-DNA-Strang getrennt voneinander sequenziert und untersucht werden. Außerdem kann nur durch Sequenzierungen nachgewiesen werden, um welche

Basensubstitution es sich handelt bzw. ob eine Insertion oder eine Deletion vorliegt.

Trotzdem ist eine endgültige Sicherheit, dass alle Polymorphismen detektiert wurden, nicht gegeben. Eine Grenze der eingesetzten Assays scheint beispielsweise durch eine Heterozygotie gegeben, da es hierbei zu „allelic dropouts“ bzw. zu „null alleles“ kommen kann [223]. Dabei werden während der PCR die zwei Allele nicht gleich stark amplifiziert, was zu einer falschen Homozygotie führen kann. Auf diese Weise könnten Polymorphismen in den unterrepräsentierten Allelen übersehen worden sein. Da diese Effekte auch durch SNPs in den Bindungsstellen der eingesetzten Primer entstehen und sowohl für die Schmelzkurvenanalysen als auch für die Sequenzierungen die gleichen Primer eingesetzt wurden, ist es durchaus möglich, dass es in beiden Assays zu diesen Fehlern während der PCR kam [223].

4.2.7 Bewertung der verwendeten Proben und der eingesetzten Methodik

Sowohl mit der Auswahl der Proben als auch der eingesetzten Methoden sollte versucht werden, möglichst valide Ergebnisse zu generieren. Trotz aller Sorgfalt lässt sich eine kleine Anzahl an Einschränkungen nicht vermeiden. Diese müssen aber unbedingt berücksichtigt werden. Für die Proben gilt dies insbesondere für die begrenzte Anzahl an Hirngewebe und die gemeinsame Untersuchung von glialen und neuronalen Zellen sowie dafür, dass beim SNP-Screening nur eine europäische Kohorte untersucht wurde. Die größte Limitation für den Bereich der verwendeten Methodik ist sicherlich durch den Einsatz des bioinformatischen Programms MatInspector gegeben.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Vorhandensein der C/EBP β -, GATA2- und ZSCAN21-Transkriptionsfaktoren in humanem Hirngewebe

Wie bereits aus Abschnitt 1.5 hervorgeht, wurden die untersuchten TF durch vorausgegangene Studien mit neuronalen Strukturen, insbesondere bei Entwicklungsprozessen, in Verbindung gebracht [163, 174, 181]. Dennoch war die bisherige Datenlage zum Vorhandensein der drei TF auf Proteinebene in

menschlichem Hirngewebe gering. Für ZSCAN21 fehlte bislang sogar jeglicher Nachweis. In dieser Arbeit konnten die drei TF in allen untersuchten Hirnregionen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Somit konnte erstmals direkt bestätigt werden, dass ZSCAN21 in Zellen von menschlichem Hirngewebe exprimiert wird und damit dort an der Genregulation beteiligt sein könnte. Die Tatsache, dass ZSCAN21 nicht durch Western Blotting, sondern nur durch die IP nachgewiesen werden konnte, wurde dadurch erklärt, dass das Protein wahrscheinlich nur schwach exprimiert wird (vgl. Abschnitt 4.2.3). Dies befände sich auch im Einklang mit vorausgegangenen Studien, bei denen gezeigt wurde, dass ZSCAN21 und andere Mitglieder dieser TF-Familie zwar in vielen Geweben vorkommen, meistens jedoch nur relativ schwach exprimiert werden [176, 182].

Für GATA2 konnte bereits gezeigt werden, dass es im frontalen Kortex und in der SN stark exprimiert wird [153]. Ähnliche Beobachtungen machte eine andere Studie für C/EBP β im frontalen Kortex [167]. In dieser Arbeit konnten beide TF im Bereich der Medulla oblongata, des Gyrus cinguli und des frontalen Kortex' auf Proteinebene nachgewiesen werden. Das Bandenmuster der Western Blots lässt darauf schließen, dass sowohl C/EBP β als auch GATA2 in allen Bereich kräftig exprimiert werden. Somit scheinen diese Beobachtungen ebenfalls im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen zu stehen.

Durch den Nachweis aller drei TF in allen untersuchten Hirnregionen und der Tatsache, dass GATA2 durch eine andere Studie in einer weiteren Hirnregion nachgewiesen wurde [153], kann angenommen werden, dass diese drei TF in Zellen vieler Hirnregionen exprimiert werden. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die TF in den Zellkernen der untersuchten Hirnregionen vorkommen, da für die Western Blots und IP Lysate der Zellkernproteine eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die drei TF in weiten Teilen des Hirns an der Regulation der Genexpression beteiligt sein könnten.

4.3.2 Potentielle Promotorbereiche und Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren innerhalb des SNCA-Gens

Auf die Komplexität der Promotorregion von SNCA und die Schwierigkeiten, diese zu entschlüsseln, wurde bereits mehrfach hingewiesen (vgl. Abschnitt

1.4.4 und 4.2.4). Neben der 5'-UTR [197] wurde in neueren Studien besonders Intron 1 als wichtige regulatorische Region identifiziert [152, 153]. Darüber hinaus ist seit längerem bekannt, dass die klassische Vorstellung über die Genregulation, initiiert durch eine spezifische TF-DNA-Interaktion, nicht ausreichend ist. Vielmehr zeigte sich, dass an der Regulation eines Gens oftmals viele Faktoren beteiligt sind. Unter diesen Faktoren befinden sich nicht nur die „eigentlichen TF“, sondern auch Co-Aktivatoren und Suppressoren. Alle diese Elemente können zudem an upstream-, downstream- und intronische DNA-Sequenzen eines Gens binden [219]. Zwischen ihnen liegen oft weite Distanzen, die jedoch durch spezielle Mechanismen überwunden werden können: Zum einen können sich DNA-Schleifen höherer Ordnung bilden, sog. „chromatin loops“, über die weit entfernt an die DNA gebundene Elemente zusammengebracht werden [224]. Zum anderen kennt man das Phänomen des „linkings“, bei dem sich Proteinketten entlang der DNA bilden und auf diese Weise eine Art „Brücke“ zwischen entfernten DNA-Stellen hergestellt wird [225, 226].

Unter Berücksichtigung dessen war es nicht überraschend, dass sich die identifizierten potentiellen Promotorbereiche über eine große genomische Distanz erstrecken (von GXP_1498580 bis GXP_1498583 insgesamt 10721 bp) und sowohl in der 5'-UTR als auch in Intron 1, Intron 2 und Intron 3 lokalisiert sind. Die Tatsache, dass die meisten Promotorbereiche in Intron 1 liegen, kann so interpretiert werden, dass sich hierdurch die Wichtigkeit dieser Region für die Genregulation von *SNCA* widerspiegelt. Allerdings ist es auch möglich, dass diese Region überrepräsentiert ist, da vorausgegangene Studien Intron 1 als wichtige regulatorische Region identifiziert hatten [152, 153] und dies Eingang in den Algorithmus des Programms MatInspector fand. Trotzdem wurden Promotorbereiche auch außerhalb Intron 1 identifiziert, was verdeutlicht, dass durchaus weitere Regionen für die Genregulation von *SNCA* infrage kommen.

Die identifizierten TF-Bindungsstellen verteilen sich über diese Promotorbereiche. Am meisten potentielle Bindungsstellen wurden für GATA2 gefunden. Diese kommen in allen Promotorbereichen vor und überwiegen deutlich gegenüber den C/EBP β - und ZSCAN21-Bindungsstellen (12 für

GATA2, vier für C/EBP β und zwei für ZSCAN21), die nur in wenigen Promotorbereichen vorkommen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass GATA-Bindungsmotive, nicht zuletzt wegen ihrer Simplizität, sehr häufig im ganzen Genom vorkommen [219]. Natürlich sagt das alleinige Vorhandensein von Bindungsmotiven noch nichts über deren funktionelle Relevanz aus. Somit verdeutlicht die Vielzahl an GATA2-Motiven noch einmal, wie wichtig es ist, solche *in silico*-Motive auf ihr funktionelle Relevanz zu überprüfen (vgl. Abschnitt 4.2.4).

Obwohl in dieser Arbeit primär nur nach Bindungsstellen für C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21 gesucht wurde, wurde während der Benutzung des Programms MatInspector deutlich, dass sich in den identifizierten Promotorbereichen viele weitere potentielle Bindungsstellen anderer TF befinden. Dies zeigt, dass viele weitere Faktoren an der Genregulation von *SNCA* beteiligt sein könnten und verdeutlicht noch einmal die Komplexität dieses Vorgangs. Wie bereits in Abschnitt 1.4.4 erwähnt, wurden zwischenzeitlich weitere Faktoren identifiziert, die an Promotorbereiche von *SNCA* binden können [152, 156, 157]. Unter diesen Faktoren befinden zwei (ZNF219 und Pax6), bei denen es zunächst zu klären gilt, ob diese in menschlichen Hirnzellen eher als Enhancer oder als Suppressor fungieren, da sich in den bisherigen Studien je nach Zelltyp und dem Vorhandensein bzw. Fehlen weiterer Faktoren unterschiedliche Ergebnisse zeigten [152, 156]. Dagegen zeigte sich, dass ein dritter Faktor, 27-Hydroxycholesterol (27-OHC), über LXR an den *SNCA*-Promotor bindet und dadurch die Expression von *SNCA* erhöht [157]. Als mit den Experimenten dieser Arbeit begonnen wurde, waren die Studien, die die Faktoren Pax6 und 27-OHC als mögliche TF für *SNCA* identifizierten, noch nicht publiziert worden und wurden daher nicht in die Untersuchungen mit eingeschlossen. ZNF219 wurde aufgrund der erwähnten Unsicherheiten nicht untersucht.

4.3.3 Identifizierte Bindungsstellen der GATA2- und ZSCAN21-Transkriptionsfaktoren

Sowohl für GATA2 als auch für ZSCAN21 existierten bereits viele Belege, dass sie als TF für *SNCA* die Expression des Gens regulieren [152, 153]. Für beide konnte jeweils eine spezifische Bindungsstelle innerhalb des Promotors in

Intron 1 identifiziert werde. Darüber hinaus zeigte sich in knock-down-Experimenten mit siRNA gegen GATA2 bzw. ZSCAN21 ein signifikanter Abfall der *SNCA*-Expression.

Gegenstand dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich diese Erkenntnisse, die auf Untersuchungen an speziellen Zellmodellen beruhen, auf Zellen menschlichen Hirngewebes übertragen lassen. Mittels ChIP Assays und EMSAs konnte dabei die bereits durch Clough *et al.* [152] beschriebene Interaktion von ZSCAN21 mit einer speziellen Bindungsstelle in Intron 1 von *SNCA* bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der eingangs erwähnten Erkenntnisse kann somit angenommen werden, dass dieser Interaktion tatsächlich eine Schlüsselrolle in der Genregulation von *SNCA* in der menschlichen *in vivo*-Situation zukommt.

Des Weiteren konnte durch die ChIP Assays und die EMSAs eine Interaktion für GATA2 mit dem Promotorbereich von *SNCA* nachgewiesen werden. Folglich kann ebenfalls unter Berücksichtigung der eingangs erwähnten Erkenntnisse angenommen werden, dass GATA2 an der Genregulation von *SNCA* in vielen Zellsystemen des Menschen unter *in vivo*-Bedingungen beteiligt ist. Überraschend war jedoch, dass sich die nachgewiesene Bindungsstelle nicht in Intron 1 befand, wie aufgrund der vorausgegangenen Studie von Scherzer *et al.* [153] zu erwarten war, sondern in Intron 2. Somit scheint in diesem Fall eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Experimenten mit Zellmodellen auf Zellen menschlichen Hirngewebes nicht gegeben. Diese Tatsache wird verständlicher, wenn man sich bewusst macht, dass es sich bei dem Zellmodell, an dem die Interaktion von GATA2 mit dem Promotorbereich von *SNCA* untersucht wurde, um erythrozytäre Vorläuferzellen von Mäusen handelt. Während das Zellsystem, an dem die TF-DNA-Interaktion von ZSCAN21 studiert wurde, neuronale Zellen von Ratten verwendete, stimmte bei diesem Modell weder der Zelltyp noch die Spezies mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten überein. Dabei wird häufig versucht, Unterschiede, die aufgrund verschiedener Spezies gegeben sind, durch den Abgleich von DNA-Sequenzen zu überwinden. Tatsächlich ist die von Scherzer und Kollegen identifizierte TF-Bindungsstelle ein evolutionär konserviertes

Bindungsmotiv, das es sehr wahrscheinlich machte, dass dieses Motiv in menschlichen Zellen dieselbe funktionelle Relevanz besitzt. Trotzdem kann nicht pauschal angenommen werden, dass evolutionär konservierte Bindungsmotive in allen Spezies dieselbe Funktion innehaben. Es gibt sogar Studien, die zeigen, dass der Abgleich von DNA-Sequenzen mehrere Spezies keine zuverlässige Vorhersage über das Bindungsverhalten von TF an die DNA erlaubt [219]. Die *SNCA*-Gene bei der Maus und beim Menschen haben zwar einige Ähnlichkeiten, vor allem in den kodierenden Exons und in Intron 4, zeigen jedoch auch Bereiche geringer Übereinstimmung, z.B. in der 5'-UTR und in Exon 1. Auch die Genumgebung auf Chromosom 6 bei der Maus stimmt nicht mit der auf Chromosom 4 beim Menschen überein [147].

Wie bereits erwähnt kommen GATA2-Bindungsmotive sehr häufig im ganzen Genom vor, ohne dass das bloße Vorhandensein des Motivs eine funktionelle Relevanz darstellt, da weitere Faktoren, wie z.B. die Chromatinumgebung, entscheidend sind [219]. Neben den Unterschieden aufgrund verschiedener Spezies sollten daher unter diesem Gesichtspunkt keinesfalls zelltypspezifische Unterschiede außer Acht gelassen werden. In verschiedenen Zelltypen kann die Chromatinumgebung beispielsweise durch DNA-Methylierung oder Histon-Modifikationen verändert sein [227]. Außerdem können je nach Zelltyp die TF selbst modifiziert werden, z.B. durch Phosphorylierung, was zu einer Veränderung der Bindungseigenschaften führt [228].

Einige Studien haben bereits Interaktionen von GATA-TF mit intronischen Sequenzen beschrieben. Darunter ist nicht nur das erste Intron bei *SNCA* [153], sondern auch Intron 3 [229], Intron 7 [230] und Intron 8 [231] anderer Gene. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GATA2 an eine spezifische Bindungsstelle des *SNCA*-Promotors in Intron 2 bindet. In Bezug auf die Genregulation von *SNCA* wird dadurch deutlich, dass es neben dem Intron 1, das als sehr wichtige regulatorische Kontrollregion für die Transkription beschrieben wurde [152], weitere wichtige regulatorische Regionen gibt. Dies wird noch offensichtlicher, wenn man die kürzlich identifizierten regulatorischen Faktoren Pax6 und 27-OHC mit einbezieht, deren Bindungsstellen sich in der 5'-UTR befinden [156, 157]. Letztlich machen diese Ergebnisse noch einmal

klar, dass die Genregulation komplex ist, dass viele Faktoren daran beteiligt sind und dass diese teilweise sehr weit voneinander entfernt an die DNA binden.

Abschließend ist noch anzumerken, dass die identifizierten TF-DNA-Interaktionen von GATA2 und ZSCAN21 in allen untersuchten Hirnregionen gefunden werden konnten. Unter der Annahme, die unter Abschnitt 4.3.1 gemacht wurde, nämlich dass die TF an der Genregulation in weiten Teilen des Hirns beteiligt sein könnten, kann so schlussgefolgert werden, dass es sich hierbei um weit verbreitete Mechanismen in menschlichem Hirngewebe handelt. Dies wäre zum einen wichtig, um die spezielle SN-Pathologie beim IPS zu erklären, da Zellen aus dieser Region in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Zum anderen ist diese Erkenntnis interessant, weil sich sowohl beim IPS als auch bei den anderen Synukleinopathien α SYN-Ablagerungen in mehreren verschiedenen Hirnregionen zeigen [232].

4.3.4 Die Rolle der C/EBP β -Transkriptionsfaktoren

Die Rolle von C/EBP β in der Genregulation von *SNCA* war weniger gut untersucht als die von GATA2 und ZSCAN21. Es wurden bisher keine Bindungsstellen beschrieben, an die der TF im Promotorbereich von *SNCA* bindet. Auch in dieser Arbeit konnte keine Interaktion mit dem Promotorbereich von *SNCA* nachgewiesen werden, obwohl sich potentielle Bindungsstellen in den identifizierten Promotorbereichen befanden. Natürlich könnte dies erneut an zelltypspezifischen Unterschieden zwischen der Studie von Gómez-Santos *et al.* [155] und dieser Arbeit liegen, wie bereits im vorausgegangenen Abschnitt diskutiert. Allerdings benutzten Gómez-Santos und Kollegen SH-SY5Y-Zellen, humane Neuroblastom-Zellen, die als Zellmodell menschliche Hirnzellen wesentlich besser abbilden als beispielsweise die erythrozytären Vorläuferzellen, die Scherzer *et al.* [153] verwendeten. Denn zum einen sind diese Zellen menschlichen Ursprungs, es bestehen also keine Unterschiede durch eine andere Spezies, zum anderen besitzen diese Zellen viele Charakteristika von dopaminergen Neuronen, weshalb sie auch häufig als Parkinson-Modellsystem eingesetzt werden [233].

Da in den CHIP Assays keine Interaktion von C/EBP β mit dem *SNCA*-Locus nachgewiesen werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass C/EBP β unter physiologischen Bedingungen die Genexpression von *SNCA* direkt reguliert. Als Gómez-Santos *et al.* beobachteten, dass sich die Expression von *SNCA* mit geringem zeitlichen Abstand in einem ähnlichen Muster wie die C/EBP β -Level erhöhte, stressten sie die Zellen mit Dopamin. Durch diesen Zellstress könnte es zur Aktivierung zusätzlicher zellulärer Mechanismen, wie beispielsweise die Aktivierung von Kinasen, gekommen sein [234], die über eine Phosphorylierung von C/EBP β möglicherweise dessen Bindungseigenschaften veränderten. Auf diese Weise könnten die identifizierten potentiellen Bindungsstellen doch funktionell relevant werden.

Allerdings konnten Gómez-Santos und Kollegen auch zeigen, dass die alleinige Überexpression von C/EBP β in SH-SY5Y-Zellen zu einer Erhöhung der *SNCA*-Expression führte. Somit besteht die Möglichkeit, dass tatsächlich ein Zusammenhang zwischen C/EBP β und der Genexpression von *SNCA* existiert, der nicht auf Zellstress oder Veränderung der TF zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung liefert dabei GATA2, das als TF für *SNCA* identifiziert wurde: Es existieren mehrere Studien, die zeigen konnten, dass C/EBP β als Enhancer für GATA-TF fungieren kann [235, 236]. Dabei beschreiben diese Studien zwei unterschiedliche Mechanismen, wie es zu dieser Enhancer-Funktion kommen kann. Zum einen konnte eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen C/EBP β und GATA-TF nachgewiesen werden, die eine deutliche Erhöhung der GATA-vermittelten Genexpression nach sich zog [235]. Dass sowohl GATA2 als auch C/EBP β häufig Interaktionen mit anderen Faktoren eingehen, wurde bereits in Abschnitt 1.5 beschrieben. Zum anderen wurde beobachtet, dass sowohl GATA-TF als auch C/EBP β individuell an die DNA binden und die Expression stimulieren können, dass jedoch eine Kooperation der TF zu einer wesentlich stärkeren Erhöhung der Genexpression führt [236]. Dabei könnten die individuell an den Promotorbereich gebundenen TF über ein weiteres Protein „überbrückt“ werden, was zu dieser besonders starken Genexpression führt [236]. Da in dieser Arbeit keine Interaktion von C/EBP β mit dem *SNCA*-Locus nachgewiesen werden konnte, kann die

Hypothese aufgestellt werden, dass C/EBP β die Genexpression von *SNCA* über eine Protein-Protein-Interaktion stimuliert.

4.3.5 SNPs in den identifizierten GATA2- und ZSCAN21-Bindungsstellen

Wie bereits in Abschnitt 1.6 erwähnt konnten SNPs identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einem IPS zu erkranken [159, 197-199]. Die gleiche Beobachtung konnte auch für die MSA [192, 203, 204] und für die DLB gemacht werden [202]. Für das IPS konnte zudem gezeigt werden, dass SNPs, die das Erkrankungsrisiko erhöhen, mit erhöhten α SYN-Level in Blut und Hirn einhergehen [160, 200, 201]. Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass SNPs das Erkrankungsrisiko über eine Fehl-/Überexpression von *SNCA* beeinflussen. Alle bisher identifizierten SNPs, denen eine Erhöhung des Risikos, an einem IPS zu erkranken, zugeschrieben wird, liegen in nicht-kodierenden Bereichen des *SNCA*-Gens [124]. Über welche Mechanismen solche SNPs in der Lage sind, die Genexpression zu beeinflussen, wurde ebenfalls bereits in Abschnitt 1.6 erläutert. In Frage kommen vor allem die Veränderung von TF-Bindungsstellen sowie Auswirkungen auf die mRNA und auf die Translation. Zum aktuellen Stand der Forschung ist der Mechanismus jedoch völlig unklar. Es ist noch nicht einmal geklärt, ob die bisher identifizierten „Risiko-SNPs“ selbst Ursache dieser Mechanismen sind oder ob andere Polymorphismen, die mit diesen SNPs zusammen vererbt werden, die relevanten Effekte hervorrufen. Zwar liegen die meisten dieser „Risiko-SNPs“ im 3'-Bereich [159, 237] und nicht im 5'-Bereich, in dem die TF i.d.R. binden. Trotzdem ist es durchaus wahrscheinlich, dass durch SNPs TF-Bindungsstellen verändert werden können, zumal auch SNPs im 5'-Bereich existieren, die das Erkrankungsrisiko für ein IPS erhöhen. Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass der TF YY1 an das protektive Allel des SNPs rs356219 in der 3'-Region von *SNCA* bindet und auf diese Weise die Genexpression von *SNCA* beeinflusst wird [238]. Damit wird die Annahme, dass SNPs über die Beeinflussung von TF-Bindungsstellen die Genexpression regulieren, weiter bekräftigt.

In dieser Arbeit konnten die beiden TF GATA2 und ZSCAN21 als TF für *SNCA* in menschlichen Hirnzellen bestätigt und deren Bindungsstelle im Promotorbereich identifiziert werden. Hieraus ergab sich erstmals die Möglichkeit, TF-Bindungsstellen bei Patienten, die an einem IPS erkrankt waren, gezielt auf SNPs zu untersuchen. In bisherigen Studien wurde stets der umgekehrte Weg versucht: DNA-Abschnitte, die SNPs enthalten, wurden aufwendig auf mögliche Bindungselemente untersucht und diese anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert.

Zu diesem Zweck wurden die Bindungsstellen zunächst mittels Schmelzkurvenanalysen auf mögliche SNPs gescreent, um eine große Anzahl an Patientenproben rasch zu untersuchen. Durch dieses Vorgehen wurden einige „auffällige“ Schmelzkurven identifiziert. Auffälligkeiten in den Schmelzkurvenanalysen entstehen jedoch nicht zwingend nur durch Polymorphismen in den DNA-Sequenzen, sondern treten beispielsweise auch bei einer geringen DNA-Qualität, bei Problemen im Ablauf der PCR-Reaktionen oder durch Pipettierfehler auf. Da die Schmelzkurven der ZSCAN21-Bindungsstelle sehr inhomogen waren, muss besonders bei diesen Ergebnissen von solchen Ursachen ausgegangen werden. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass einige PCR-Reaktionen nicht auf Anhieb funktionierten, sondern wiederholt werden mussten. Letztlich bestand dadurch der Nachteil, dass kleinere Abweichungen in den Schmelzkurven toleriert werden mussten und nur solche als „auffällig“ betrachtet wurden, die deutlich von der Mehrheit der Kurven abwichen. Das Screening-Verfahren für die ZSCAN21-Bindungsstelle ist damit wahrscheinlich ungenauer als das für die GATA2-Bindungsstelle und birgt die Gefahr, dass Polymorphismen übersehen wurden.

Anschließend wurden DNA-Proben mit „auffälligen“ Schmelzkurven sequenziert. Dabei konnten nach Abgleich mit der Referenzsequenz keine Polymorphismen identifiziert werden. Da die Schmelzkurven der Proben für die GATA2-Bindungsstelle im Allgemeinen sehr homogen waren und die Schmelzkurven der sequenzierten DNA-Proben lediglich gering von der Mehrzahl der Schmelzkurven abwichen, war dieses Ergebnis für die GATA2-

Bindungsstelle nicht überraschend. Im Falle der inhomogenen Schmelzkurven für die ZSCAN21-Bindungsstelle muss bei diesem Ergebnis hingegen von Problemen im Ablauf der PCR-Reaktionen ausgegangen werden. Da jedoch fast ein Drittel der gescreenten DNA-Proben (97 von 300) sequenziert wurden, kann trotz des ungenaueren Screening-Verfahrens einigermaßen verlässlich davon ausgegangen werden, dass in diesen DNA-Bereichen keine SNPs vorhanden sind. Es ist somit relativ unwahrscheinlich, dass die Bindungsstellen von GATA2 und ZSCAN21 bei europäischen Patienten, die an einem IPS leiden, Polymorphismen aufweisen.

Um dieses Ergebnis zu bekräftigen, wurden anschließend die Datenbank dbSNP (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) und die Daten einer großen Metaanalyse [211] nach möglichen annotierten SNPs in diesen Bindungsstellen durchsucht. Dabei konnte zwar zunächst sowohl für die GATA2- als auch für die ZSCAN21-Bindungsstelle jeweils ein annotierter SNP identifiziert werden. Für den annotierten SNP innerhalb der GATA2-Bindungsstelle (rs1372514) zeigte sich jedoch, dass die beiden Allele in allen untersuchten Populationen des HapMap-Projects identisch waren. Somit ist davon auszugehen, dass dieser SNP nicht existiert und beispielsweise lediglich aufgrund initialer Sequenzierungsfehler annotiert wurde. Der annotierte SNP innerhalb der ZSCAN21-Bindungsstelle (rs35347270) wurde nur in der Datenbank dbSNP gefunden. rs35347270 ist jedoch äußerst schlecht validiert und bestand nicht die Qualitätskontrolle der Metaanalyse des International Parkinson Disease Genomics Consortiums [211]. Somit muss dieser Polymorphismus entweder extrem selten sein, nur in bestimmten Bevölkerungsgruppen vorkommen oder es handelt sich ebenfalls um einen Sequenzierungsfehler. Darüber hinaus existieren keine Angaben zur Allelfrequenz oder ob es einen Zusammenhang zum IPS gibt.

In einem zweiten Schritt wurden die SNPs, die sich in der Nähe der GATA2- und der ZSCAN21-Bindungsstelle befinden, auf ihre Bedeutung für ein erhöhtes Risiko, an einem IPS zu erkranken, untersucht. Bezüglich dessen konnte für die GATA2-Bindungsstelle der SNP rs2737006 und für die ZSCAN21-Bindungsstelle der SNP rs3216775 identifiziert werden. rs2737006 befindet sich

34 bp upstream der GATA2-Bindungsstelle, rs3216775 liegt 228 bp downstream der ZSCAN21-Bindungsstelle. Während rs3216775 definitiv zu weit von der ZSCAN21-Bindungsstelle entfernt liegt, um einen direkten Einfluss auf die TF-Bindung zu haben, darf man darüber spekulieren, ob rs2737006 noch in der Lage ist, die Bindung von GATA2 zu beeinflussen. Wie bereits in Abschnitt 4.3.3 diskutiert, sind GATA-Bindungsmotive sehr häufig und für ihre Bindung sind neben dem Kern-Bindungsmotiv (T/A)GATA(A/G) vor allem auch die intrinsischen Eigenschaften des Bindungsmotivs sowie die Chromatinumgebung entscheidend [219]. Was jedoch durch den SNP rs2737006 nicht beeinflusst wird, sind die intrinsischen Eigenschaften. Dies legen die Erkenntnisse aus der bioinformatischen Analyse nahe: Durch das Programm MatInspector wurde das erweiterte Bindungsmotiv der GATA2-Bindungsstelle als 13 bp langes Sequenzmotiv definiert (ATGAG**GATA**ACACC). Die Angabe, dass sich rs2737006 34 bp upstream der GATA2-Bindungsstelle befindet, bezieht sich ebenfalls auf dieses erweiterte Motiv. Somit liegt der SNP zu weit entfernt, um die intrinsischen Eigenschaften zu beeinflussen und könnte nur durch eine Veränderung der Chromatinumgebung um die Bindungsstelle herum direkt Einfluss auf die Bindung von GATA2 haben.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass SNPs, die das Risiko erhöhen, an einem IPS zu erkranken, keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von GATA2 und ZSCAN21 haben, die als TF für *SNCA* in menschlichen Hirnzellen identifiziert wurden. Dass durch SNPs die Bindungsstellen von anderen TF für *SNCA* beeinflusst werden, kann dennoch nicht endgültig ausgeschlossen werden. Dies gilt insbesondere unter der Annahme, dass zukünftig evtl. weitere TF identifiziert werden. Zum aktuellen Zeitpunkt deutet jedoch vieles darauf hin, dass SNPs, die das Risiko erhöhen, an einem IPS zu erkranken, über andere Mechanismen die Genexpression von *SNCA* beeinflussen. Welche das sind, bleibt nach wie vor unklar. Infrage kommen die bereits erwähnten Veränderungen der mRNA, wie alternatives Spleißen [195], sowie Einflussnahme auf deren Stabilität und Sekundärstruktur [196]. Außerdem könnte die Geschwindigkeit und die Genauigkeit der Translation beeinflusst werden, beispielsweise dadurch, dass der Pool an tRNA

passend zu den alternativen Codons begrenzt ist [191]. Darüber hinaus könnten neben den eigentlichen TF weitere regulatorische Elemente eine Rolle spielen, wie für den TF YY1 beschrieben [238]. Als weiterer Mechanismus speziell für die zahlreichen „Risiko-SNPs“ im 3'-Bereich von *SNCA* kommt zudem eine Veränderung der Bindungseigenschaften von microRNA infrage. microRNA regulieren die Translation durch Bindung an die 3'-UTR der mRNA [239]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass microRNA-7, die hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird, α SYN-Level erniedrigt und so Zellen gegen oxidativen Stress schützt [240]. Außerdem zeigte sich, dass microRNA-7 zusammen mit microRNA-153 spezifisch an die 3'-UTR von *SNCA* bindet und damit sowohl die mRNA- als auch die Protein-Level erniedrigt werden [241]. Folglich könnte es sich hierbei um einen wichtigen Mechanismus handeln, über den SNPs Einfluss auf α SYN-Level und das Erkrankungsrisiko nehmen.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Diese Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse, um die Genexpression von *SNCA* besser zu verstehen und zeigt auf, inwieweit sich bisherige Ergebnisse aus Zellmodellen auf menschliche Hirnzellen übertragen lassen. Erstmals wurde durch diese Arbeit gezeigt, dass ZSCAN21 in menschlichen Hirnzellen auf Proteinebene exprimiert wird. Wie C/EBP β und GATA2 konnte dieser TF in allen untersuchten Hirnarealen in den Proteinlysaten der Zellkerne nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass diese drei TF an der Genregulation in weiten Teilen des menschlichen Hirns beteiligt sind.

Des Weiteren konnten GATA2 und ZSCAN21 als TF für *SNCA* bestätigt werden, auch wenn für GATA2 eine andere Bindungsstelle als bisher angenommen identifiziert wurde [153]. Da diese Beobachtungen ebenfalls in allen untersuchten Hirnregionen gemacht wurden, lässt sich annehmen, dass es sich hierbei um Mechanismen handelt, die für verschiedene menschliche Hirnzellen in vielen Hirnregionen gelten. Um diese Annahme zu bekräftigen, sollten künftige Studien weitere Hirnareale von zusätzlichen Spendern daraufhin untersuchen. Außerdem sollte versucht werden, neuronale und gliale Zellen getrennt voneinander zu betrachten. Darüber hinaus gilt es weitere

regulatorische Elemente zu identifizieren und die Rolle bereits bekannter Elemente besser zu definieren [152, 156]. Nur so lässt sich die komplexe Genregulation von *SNCA* besser verstehen. Wie in dieser Arbeit werden dabei auch zukünftig bioinformatische Programme behilflich sein. Durch die stetige Fortentwicklung dieser Programme ist damit zu rechnen, dass sich TF-DNA-Interaktionen und Promotorbereiche künftig noch besser vorhersagen lassen. Trotz dieser Entwicklungen werden stets *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen nötig sein, um diese Vorhersagen zu bestätigen. Dabei zeigt diese Arbeit am Beispiel von GATA2, dass dem Einsatz von Modellsystemen Grenzen gesetzt sind. Diese eignen sich zwar, um Grundprinzipien zu studieren, letztlich müssen diese Ergebnisse aber immer auch in den relevanten Zellen verifiziert werden. Im Hinblick auf die Genregulation von *SNCA* leitet sich aus dieser Arbeit zusätzlich ab, dass es neben dem Intron 1, das als wichtige regulatorische Kontrollregion für die Transkription beschrieben wurde [152], weitere wichtige regulatorische Regionen gibt. Zukünftige Studien werden dies ebenfalls berücksichtigen müssen.

Ein weiterer Rückschluss, den diese Arbeit zulässt, ist, dass C/EBP β nicht als direkter TF für *SNCA* fungiert. Trotzdem scheint dieser TF einen Einfluss auf die Genregulation zu haben. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann dabei die Hypothese aufgestellt werden, dass C/EBP β über eine Protein-Protein-Interaktion mit GATA2 eine Enhancer-Funktion für die Genregulation inne hat. Weitere Studien werden nötig sein, um diese mögliche Interaktion nachzuweisen. Dafür sollten am besten *in vivo* Co-Immunopräzipitationen eingesetzt werden.

Eine letzte Schlussfolgerung, die aus dieser Arbeit möglich ist, betrifft den Mechanismus, über den bestimmte SNPs das Erkrankungsrisiko für ein IPS modulieren. Dabei legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass SNPs nicht die TF-Bindungsstellen verändern. Zumindest gilt dies für die untersuchte europäische Kohorte. Diese Polymorphismen scheinen somit die Genregulation auf eine andere Weise zu beeinflussen. Zukünftig muss geklärt werden, ob dies auch für andere Populationen zutrifft und es werden weitere Untersuchungen notwendig sein, um die genauen Mechanismen zu entschlüsseln. Speziell für

SNPs im 3'-Bereich des Gens bietet die Möglichkeit der Veränderung der Bindungseigenschaften von microRNA einen ersten Ansatzpunkt.

Die Synukleinopathien zeichnen sich alle durch Ablagerungen von aggregiertem aSYN aus [232]. In Abschnitt 1.4.3 wurden bereits einige Hypothesen aufgezeigt, wie es zu diesen Ablagerungen kommen könnte. Besonders die Hypothese, dass eine Fehl-/Überexpression von *SNCA* zu dieser Pathologie führt, wird durch viele Studien gestützt [86, 87, 151, 160]. Die Genexpression von *SNCA* ist, wie die anderer Gene, ein vielschichtiger Prozess, der durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden kann. Zu Beginn dieses Prozesses steht die Transkription, initiiert durch TF, die in dieser Arbeit untersucht wurde. Durch Manipulation der Transkription lässt sich folglich die Genexpression regulieren. TF bieten hierbei einen hervorragenden pharmakologischen Ansatzpunkt. Unter der Annahme, dass eine Überexpression zur aSYN-Pathologie führt, könnten also Medikamente entwickelt werden, die gegen die identifizierten TF gerichtet sind und die auf diese Weise die aSYN-Level reduzieren [152]. Durch ein einziges Medikament wäre so eine kausale Therapie sowohl für das IPS als auch für die MSA und für die DLB gegeben. Wenn darüber hinaus Früherkennungsverfahren für diese Erkrankungen entwickelt werden können, könnten diese Erkrankungen zukünftig sogar bereits vor ihrer klinischen Manifestation behandelt werden. Damit dies gelingen kann, muss zukünftig neben der Genexpression auch die physiologische Funktion von aSYN besser verstanden werden. Sollten sich diese Hypothesen jedoch bestätigen, so wäre dies ein großer therapeutischer Durchbruch, nicht nur für das IPS, sondern auch für die bisher schwer zu behandelnden atypischen Parkinsonsyndrome MSA und DLB [49, 68].

5. Zusammenfassung

Das *SNCA*-Gen bzw. sein Genprodukt α SYN wurden auf mehreren verschiedenen Ebenen mit dem IPS, der MSA und der DLB in Verbindung gebracht. Sie definieren die Erkrankungsgruppe der Synukleinopathien. Für die Pathogenese dieser Erkrankungen scheint besonders die Gendosis entscheidend zu sein. Dies gilt insbesondere für die häufigste Erkrankung unter den Synukleinopathien, dem sporadisch auftretenden IPS. Folglich erscheint die Untersuchung der Genexpression wichtig, um die Ursache dieser Erkrankungen besser zu verstehen und daraus zukünftig kausale Therapien ableiten zu können.

Ein wesentlicher Vorgang der Genexpression ist die Transkription, die durch die Bindung von TF an den Promotorbereich initiiert wird. Doch gerade zu diesem Vorgang existieren bislang nur wenige Studien, die zudem alle an speziellen Zellsystemen und nicht an menschlichen Hirnzellen durchgeführt wurden. Diese Arbeit sollte daher die Transkription genauer charakterisieren und untersuchen, inwieweit sich die bisherigen Erkenntnisse auf menschliche Hirnzellen übertragen lassen.

Dabei wurden in einem ersten Schritt durch den Einsatz von Western Blots und IP die potentiellen TF C/EBP β , GATA2 und ZSCAN21 durch klassische Proteinnachweisverfahren in menschlichen Hirnzellen verschiedener Regionen nachgewiesen. Daraus leitete sich ab, dass diese TF tatsächlich an der Genregulation in vielen verschiedenen Hirnzellen beteiligt sein dürften. In einem zweiten Schritt war es dann nötig, den komplexen Promotorbereich von *SNCA* besser zu charakterisieren. Dies gelang durch den Einsatz eines bioinformatischen Programms, mit dessen Hilfe auch potentielle Bindungsstellen für die drei untersuchten TF identifiziert werden konnten. Anschließend konnten diese potentiellen Bindungsstellen durch den Einsatz von ChIP Assays auf ihre funktionelle Relevanz untersucht werden. Die für GATA2 und ZSCAN21 identifizierten Bindungsstellen wurden dann mittels EMSAs genauer charakterisiert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass GATA2 und ZSCAN21 tatsächlich die Genexpression von *SNCA* in menschlichen Hirnzellen verschiedenster Areale regulieren, auch wenn für

GATA2 eine andere Bindungsstelle als bisher angenommen identifiziert wurde. Außerdem kann aus den Ergebnissen der ChIP Assays geschlossen werden, dass C/EBP β nicht als direkter TF für *SNCA* fungiert. C/EBP β könnte über eine Protein-Protein-Interaktion mit GATA2 eine Enhancer-Funktion inne haben und auf diese Weise auf die Genexpression einwirken.

Durch die Identifikation von GATA2 und ZSCAN21 als TF für *SNCA* sowie deren Bindungsstellen im Promotorbereich konnte durch diese Arbeit weiteres geleistet werden: Das Screening nach SNPs in den identifizierten TF-Bindungsstellen bei Patienten, die an einem IPS leiden, lieferte wichtige Erkenntnisse für die Beantwortung der Frage, über welchen Mechanismus SNPs, die mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einem IPS zu erkranken, das Erkrankungsrisiko modulieren. Es wird angenommen, dass diese SNPs die Genexpression erhöhen. Da durch den Einsatz von Schmelzkurvenanalysen und der anschließenden Sequenzierung von DNA-Proben mit auffälligen Schmelzkurven keine SNPs in diesen Bereichen nachgewiesen werden konnten und auch die Suche nach annotierten SNPs für diese Bereiche keine hinreichenden Erkenntnisse lieferte, muss davon ausgegangen werden, dass diese SNPs die Genexpression nicht über eine Veränderung der TF-Bindungsstellen regulieren. Vielmehr kommen weitere Mechanismen in Betracht.

Zukünftig muss die Genexpression von *SNCA* noch besser verstanden werden. Es gilt, weitere regulatorische Elemente zu identifizieren und bisher bekannte besser zu charakterisieren. Wie aus dieser Arbeit ersichtlich wurde, müssen alle künftigen Ergebnisse auch in menschlichen Hirnzellen verifiziert werden. Gelingt dies und wird zusätzlich die physiologische Rolle von aSYN besser verstanden, so bestünde erstmals die Möglichkeit, über Medikamente, die gegen die identifizierten TF von *SNCA* gerichtet sind, die Genexpression zu verringern und eine kausale Therapie für die Synukleinopathien zu etablieren.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	SNCA-Gen und mRNA-Varianten.....	21
Abbildung 2:	Schemazeichnung Elektrolotting.....	45
Abbildung 3:	qRT-PCR-Kurve und Bestimmung des Ct-Wertes.....	51
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Sequenzierung nach Sanger.....	56
Abbildung 5:	Ergebnisse Western Blotting.....	59
Abbildung 6:	Ergebnisse Immunopräzipitationen.....	60
Abbildung 7:	Ergebnisse MatInspector-Analyse.....	62
Abbildung 8:	Ergebnisse Chromatinimmunopräzipitationen (ChIP).....	66
Abbildung 9:	Ergebnisse EMSAs für die identifizierte GATA2-Bindungsstelle...	69
Abbildung 10:	Ergebnisse EMSAs für die identifizierte ZSCAN21- Bindungsstelle.....	70
Abbildung 11:	Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die GATA2- Bindungsstelle.....	72
Abbildung 12:	Ergebnisse Schmelzkurvenanalysen für die ZSCAN21- Bindungsstelle.....	75
Abbildung 13:	Ergebnisse Sequenzierungen der GATA2-Bindungsstelle.....	80
Abbildung 14:	Ergebnisse Sequenzierungen der ZSCAN21-Bindungsstelle.....	81

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifikation der Parkinson-Syndrome.....	3
Tabelle 2:	Klinische Diagnosekriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank (nach [27]).....	6
Tabelle 3:	Diagnosekriterien nach Gilman [49] (modifiziert nach [8]).....	10
Tabelle 4:	Diagnosekriterien des DLB-Konsortiums [68] (modifiziert nach [8])...	13
Tabelle 5:	Überblick über alle bisher identifizierten PARK-Loci.....	16
Tabelle 6:	Primer für potentielle GATA2-Bindungsstellen.....	38
Tabelle 7:	Primer für potentielle C/EBP β -Bindungsstellen.....	38
Tabelle 8:	Primer für potentielle ZSCAN21-Bindungsstellen.....	39
Tabelle 9:	Primer für Amyloid Precursor Protein.....	39
Tabelle 10:	Primer für die Schmelzkurvenanalysen und Sequenzierungen.....	39
Tabelle 11:	Primäre Antikörper.....	39
Tabelle 12:	Sekundäre Antikörper.....	40
Tabelle 13:	Identifizierte Promotorbereiche und darin enthaltene mögliche Bindungsstellen der TF.....	63
Tabelle 14:	C _t -Werte zu den Chromatin-Immunopräzipitationen.....	67
Tabelle 15:	Überblick über die untersuchten DNA-Proben sowie über die Ergebnisse der Schmelzkurven- und Sequenzierungsexperimente....	82
Tabelle 16:	Annotierte SNPs im Bereich der identifizierten GATA2- Bindungsstelle.....	83
Tabelle 17:	Annotierte SNPs im Bereich der identifizierten ZSCAN21- Bindungsstelle.....	84
Tabelle 18:	Positiver prädiktiver Wert für die Diagnose eines IPS unter Anwendung der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Kriterien [27] in verschiedenen Studien.....	89

6.3 Literaturverzeichnis

- [1] J. Parkinson, An essay on the shaking palsy. 1817, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14 (2002) 223-236; discussion 222.
- [2] J.P. Bach, R. Dodel, W.H. Oertel, Parkinsonsyndrome. In: R. Dodel, T. Klockgether (Hrsg.), *Roter Faden Neurologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2010, S. 350-368.
- [3] J. Hardy, H. Cai, M.R. Cookson, K. Gwinn-Hardy, A. Singleton, Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism, *Ann Neurol* 60 (2006) 389-398.
- [4] F.H. Lewy, Paralysis agitans. In: M. Lewandowsky (Hrsg.), *Handbuch der Neurologie*, Vol. III, Springer, Berlin, 1912, S. 920-933.
- [5] T. Gasser, Update on the genetics of Parkinson's disease, *Mov Disord* 22 Suppl 17 (2007) S343-350.
- [6] J.B. Schulz, T. Gasser, Parkinson-Syndrome. In: T. Brandt, H.C. Diener, C. Gerlhoff (Hrsg.), *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*, Kohlhammer, Stuttgart, 2012, S. 943-988.
- [7] J. Schwarz, A. Storch, Klassifikation der Parkinson-Syndrome. In: T. Brandt, R. Hohlfeld, J. Noth, H. Reichmann (Hrsg.), *Parkinson-Syndrome: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Kohlhammer, Stuttgart, 2007, S. 16-18.
- [8] A. Münchau, G.K. Wenning, Atypische Parkinson-Syndrome. In: T. Brandt, H.C. Diener, C. Gerlhoff (Hrsg.), *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*, Kohlhammer, Stuttgart, 2012, S. 989-1005.
- [9] E.R. Dorsey, R. Constantinescu, J.P. Thompson, K.M. Biglan, R.G. Holloway, K. Kieburtz, F.J. Marshall, B.M. Ravina, G. Schifitto, A. Siderowf, C.M. Tanner, Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030, *Neurology* 68 (2007) 384-386.
- [10] S. Thobois, E. Broussolle, Circumstances of Parkinson's disease diagnosis, *Rev Prat* 55 (2005) 717-722.
- [11] R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, Parkinson Disease Overview [Online] - National Center for Biotechnology Information, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1223/> [Zugriff 06-08-2014]
- [12] J.H. Bower, D.M. Maraganore, S.K. McDonnell, W.A. Rocca, Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990, *Neurology* 52 (1999) 1214-1220.
- [13] K. Wirdefeldt, H.O. Adami, P. Cole, D. Trichopoulos, J. Mandel, Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence, *Eur J Epidemiol* 26 Suppl 1 (2011) S1-58.
- [14] L.M. de Lau, P.C. Giesbergen, M.C. de Rijk, A. Hofman, P.J. Koudstaal, M.M. Breteler, Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study, *Neurology* 63 (2004) 1240-1244.
- [15] M.C. de Rijk, M.M. Breteler, G.A. Graveland, A. Ott, D.E. Grobbee, F.G. van der Meche, A. Hofman, Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study, *Neurology* 45 (1995) 2143-2146.

- [16] J.M. Fearnley, A.J. Lees, Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity, *Brain* 114 (Pt 5) (1991) 2283-2301.
- [17] W.R. Gibb, A.J. Lees, The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51 (1988) 745-752.
- [18] M.G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature* 388 (1997) 839-840.
- [19] O. Hornykiewicz, S.J. Kish, Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. In: M. Yahr, K.J. Bergmann (Hrsg.), *Parkinson's disease*, Raven Press, New York, 1987, S. 19-34.
- [20] G.M. Halliday, Y.W. Li, P.C. Blumbergs, T.H. Joh, R.G. Cotton, P.R. Howe, W.W. Blessing, L.B. Geffen, Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease, *Ann Neurol* 27 (1990) 373-385.
- [21] K.A. Jellinger, Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway, *Mol Chem Neuropathol* 14 (1991) 153-197.
- [22] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rub, R.A. de Vos, E.N. Jansen Steur, E. Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol Aging* 24 (2003) 197-211.
- [23] G. Deuschl, J. Raethjen, R. Baron, M. Lindemann, H. Wilms, P. Krack, The pathophysiology of parkinsonian tremor: a review, *J Neurol* 247 Suppl 5 (2000) V33-48.
- [24] J. Schwarz, A. Storch, Behandlung der posturalen Instabilität. In: T. Brandt, R. Hohlfeld, J. Noth, H. Reichmann (Hrsg.), *Parkinson-Syndrome: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Kohlhammer, Stuttgart, 2007, S. 241-242.
- [25] J. Schwarz, A. Storch, Klinische Symptomatik. In: T. Brandt, R. Hohlfeld, J. Noth, H. Reichmann (Hrsg.), *Parkinson-Syndrome: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Kohlhammer, Stuttgart, 2007, S. 48-63.
- [26] O. Riedel, J. Klotsche, A. Spottke, G. Deuschl, H. Forstl, F. Henn, I. Heuser, W. Oertel, H. Reichmann, P. Riederer, C. Trenkwalder, R. Dodel, H.U. Wittchen, Cognitive impairment in 873 patients with idiopathic Parkinson's disease. Results from the German Study on Epidemiology of Parkinson's Disease with Dementia (GEPAD), *J Neurol* 255 (2008) 255-264.
- [27] A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford, A.J. Lees, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55 (1992) 181-184.
- [28] N. Singh, V. Pillay, Y.E. Choonara, Advances in the treatment of Parkinson's disease, *Prog Neurobiol* 81 (2007) 29-44.
- [29] J. Schwarz, A. Storch, Medikamente zur Therapie von Parkinson-Syndromen. In: T. Brandt, R. Hohlfeld, J. Noth, H. Reichmann (Hrsg.), *Parkinson-Syndrome: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Kohlhammer, Stuttgart, 2007, S. 201-224.
- [30] K. Kalinderi, L. Fidani, Z. Katsarou, S. Bostantjopoulou, Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease, *Int J Clin Pract* 65 (2011) 1289-1294.

- [31] P.T. Mannisto, S. Kaakkola, Rationale for selective COMT inhibitors as adjuncts in the drug treatment of Parkinson's disease, *Pharmacol Toxicol* 66 (1990) 317-323.
- [32] T. Ellis, C.J. de Goede, R.G. Feldman, E.C. Wolters, G. Kwakkel, R.C. Wagenaar, Efficacy of a physical therapy program in patients with Parkinson's disease: a randomized controlled trial, *Arch Phys Med Rehabil* 86 (2005) 626-632.
- [33] G. Deuschl, C. Schade-Brittinger, P. Krack, J. Volkmann, H. Schafer, K. Botzel, C. Daniels, A. Deutschlander, U. Dillmann, W. Eisner, D. Gruber, W. Hamel, J. Herzog, R. Hilker, S. Klebe, M. Kloss, J. Koy, M. Krause, A. Kupsch, D. Lorenz, S. Lorenzl, H.M. Mehdorn, J.R. Moringlane, W. Oertel, M.O. Pinsker, H. Reichmann, A. Reuss, G.H. Schneider, A. Schnitzler, U. Steude, V. Sturm, L. Timmermann, V. Tronnier, T. Trottenberg, L. Wojtecki, E. Wolf, W. Poewe, J. Voges, A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease, *N Engl J Med* 355 (2006) 896-908.
- [34] J.G. Graham, D.R. Oppenheimer, Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 32 (1969) 28-34.
- [35] M.I. Papp, J.E. Kahn, P.L. Lantos, Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome), *J Neurol Sci* 94 (1989) 79-100.
- [36] G.K. Wenning, Y. Ben Shlomo, M. Magalhaes, S.E. Daniel, N.P. Quinn, Clinical features and natural history of multiple system atrophy. An analysis of 100 cases, *Brain* 117 (Pt 4) (1994) 835-845.
- [37] U. Wullner, T. Schmitz-Hubsch, M. Abele, G. Antony, P. Bauer, K. Eggert, Features of probable multiple system atrophy patients identified among 4770 patients with parkinsonism enrolled in the multicentre registry of the German Competence Network on Parkinson's disease, *J Neural Transm* 114 (2007) 1161-1165.
- [38] G.K. Wenning, C. Colosimo, F. Geser, W. Poewe, Multiple system atrophy, *Lancet Neurol* 3 (2004) 93-103.
- [39] J.H. Bower, D.M. Maraganore, S.K. McDonnell, W.A. Rocca, Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990, *Neurology* 49 (1997) 1284-1288.
- [40] A. Schrag, G.K. Wenning, N. Quinn, Y. Ben-Shlomo, Survival in multiple system atrophy, *Mov Disord* 23 (2008) 294-296.
- [41] N. Stefanova, P. Bucke, S. Duerr, G.K. Wenning, Multiple system atrophy: an update, *Lancet Neurol* 8 (2009) 1172-1178.
- [42] K. Wakabayashi, M. Yoshimoto, S. Tsuji, H. Takahashi, Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy, *Neurosci Lett* 249 (1998) 180-182.
- [43] M.G. Spillantini, R.A. Crowther, R. Jakes, N.J. Cairns, P.L. Lantos, M. Goedert, Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Neurosci Lett* 251 (1998) 205-208.

- [44] M. Yoshida, Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration, *Neuropathology* 27 (2007) 484-493.
- [45] M. Kollensperger, F. Geser, J.P. Ndayisaba, S. Boesch, K. Seppi, K. Ostergaard, E. Dupont, A. Cardozo, E. Tolosa, M. Abele, T. Klockgether, F. Yekhlef, F. Tison, C. Daniels, G. Deuschl, M. Coelho, C. Sampaio, M. Bozi, N. Quinn, A. Schrag, C.J. Mathias, C. Fowler, C.F. Nilsson, H. Widner, N. Schimke, W. Oertel, F. Del Sorbo, A. Albanese, M.T. Pellecchia, P. Barone, R. Djaldetti, C. Colosimo, G. Meco, A. Gonzalez-Mandly, J. Berciano, T. Gurevich, N. Giladi, M. Galitzky, O. Rascol, C. Kamm, T. Gasser, U. Siebert, W. Poewe, G.K. Wenning, Presentation, diagnosis, and management of multiple system atrophy in Europe: final analysis of the European multiple system atrophy registry, *Mov Disord* 25 (2010) 2604-2612.
- [46] S. May, S. Gilman, B.B. Sowell, R.G. Thomas, M.B. Stern, A. Colcher, C.M. Tanner, N. Huang, P. Novak, S.G. Reich, J. Jankovic, W.G. Ondo, P.A. Low, P. Sandroni, A. Lipp, F.J. Marshall, F. Wooten, C.W. Shults, Potential outcome measures and trial design issues for multiple system atrophy, *Mov Disord* 22 (2007) 2371-2377.
- [47] I. Yabe, H. Soma, A. Takei, N. Fujiki, T. Yanagihara, H. Sasaki, MSA-C is the predominant clinical phenotype of MSA in Japan: analysis of 142 patients with probable MSA, *J Neurol Sci* 249 (2006) 115-121.
- [48] S. Gilman, P.A. Low, N. Quinn, A. Albanese, Y. Ben-Shlomo, C.J. Fowler, H. Kaufmann, T. Klockgether, A.E. Lang, P.L. Lantos, I. Litvan, C.J. Mathias, E. Oliver, D. Robertson, I. Schatz, G.K. Wenning, Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy, *J Neurol Sci* 163 (1999) 94-98.
- [49] S. Gilman, G.K. Wenning, P.A. Low, D.J. Brooks, C.J. Mathias, J.Q. Trojanowski, N.W. Wood, C. Colosimo, A. Durr, C.J. Fowler, H. Kaufmann, T. Klockgether, A. Lees, W. Poewe, N. Quinn, T. Revesz, D. Robertson, P. Sandroni, K. Seppi, M. Vidailhet, Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy, *Neurology* 71 (2008) 670-676.
- [50] I.F. Hussain, C.M. Brady, M.J. Swinn, C.J. Mathias, C.J. Fowler, Treatment of erectile dysfunction with sildenafil citrate (Viagra) in parkinsonism due to Parkinson's disease or multiple system atrophy with observations on orthostatic hypotension, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71 (2001) 371-374.
- [51] J. Schwarz, A. Storch, Therapie der atypischen Parkinson-Syndrome. In: T. Brandt, R. Hohlfeld, J. Noth, H. Reichmann (Hrsg.), *Parkinson-Syndrome: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Kohlhammer, Stuttgart, 2007, S. 287-294.
- [52] K. Winge, C.J. Fowler, Bladder dysfunction in Parkinsonism: mechanisms, prevalence, symptoms, and management, *Mov Disord* 21 (2006) 737-745.
- [53] K. Deguchi, K. Ikeda, I. Sasaki, M. Shimamura, Y. Urai, M. Tsukaguchi, T. Touge, H. Takeuchi, S. Kuriyama, Effects of daily water drinking on orthostatic and postprandial hypotension in patients with multiple system atrophy, *J Neurol* 254 (2007) 735-740.

- [54] P.A. Low, J.L. Gilden, R. Freeman, K.N. Sheng, M.A. McElligott, Efficacy of midodrine vs placebo in neurogenic orthostatic hypotension. A randomized, double-blind multicenter study. Midodrine Study Group, *JAMA* 277 (1997) 1046-1051.
- [55] N. Quinn, Multiple system atrophy. In: C.D. Marsden, S. Fahn (Hrsg.), *Movement disorders*, Butterworth-Heinemann, London, 1994, S. 262-281.
- [56] S. Gilman, P. Low, N. Quinn, A. Albanese, Y. Ben-Shlomo, C. Fowler, H. Kaufmann, T. Klockgether, A. Lang, P. Lantos, I. Litvan, C. Mathias, E. Oliver, D. Robertson, I. Schatz, G. Wenning, Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *American Autonomic Society and American Academy of Neurology, Clin Auton Res* 8 (1998) 359-362.
- [57] I. McKeith, Dementia with Lewy bodies, *Dialogues Clin Neurosci* 6 (2004) 333-341.
- [58] J.P. Bach, R. Dodel, Demenz vom Lewy-Körper-Typ. In: R. Dodel, T. Klockgether (Hrsg.), *Roter Faden Neurologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2010, S. 418-423.
- [59] I.G. McKeith, D. Galasko, K. Kosaka, E.K. Perry, D.W. Dickson, L.A. Hansen, D.P. Salmon, J. Lowe, S.S. Mirra, E.J. Byrne, G. Lennox, N.P. Quinn, J.A. Edwardson, P.G. Ince, C. Bergeron, A. Burns, B.L. Miller, S. Lovestone, D. Collerton, E.N. Jansen, C. Ballard, R.A. de Vos, G.K. Wilcock, K.A. Jellinger, R.H. Perry, Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop, *Neurology* 47 (1996) 1113-1124.
- [60] J. Zaccai, C. McCracken, C. Brayne, A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies, *Age Ageing* 34 (2005) 561-566.
- [61] D. Aarsland, K. Andersen, J.P. Larsen, A. Lolk, P. Kragh-Sorensen, Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study, *Arch Neurol* 60 (2003) 387-392.
- [62] M. Emre, Dementia associated with Parkinson's disease, *Lancet Neurol* 2 (2003) 229-237.
- [63] P.J. Nestor, Dementia in Lewy body syndromes: a battle between hearts and minds, *Neurology* 74 (2010) 872-873.
- [64] C.F. Lippa, J.E. Duda, M. Grossman, H.I. Hurtig, D. Aarsland, B.F. Boeve, D.J. Brooks, D.W. Dickson, B. Dubois, M. Emre, S. Fahn, J.M. Farmer, D. Galasko, J.E. Galvin, C.G. Goetz, J.H. Growdon, K.A. Gwinn-Hardy, J. Hardy, P. Heutink, T. Iwatsubo, K. Kosaka, V.M. Lee, J.B. Leverenz, E. Masliah, I.G. McKeith, R.L. Nussbaum, C.W. Olanow, B.M. Ravina, A.B. Singleton, C.M. Tanner, J.Q. Trojanowski, Z.K. Wszolek, DLB and PDD boundary issues: diagnosis, treatment, molecular pathology, and biomarkers, *Neurology* 68 (2007) 812-819.
- [65] T. Rahkonen, U. Eloniemi-Sulkava, S. Rissanen, A. Vatanen, P. Viramo, R. Sulkava, Dementia with Lewy bodies according to the consensus criteria in a general population aged 75 years or older, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74 (2003) 720-724.

- [66] R.A. Miech, J.C. Breitner, P.P. Zandi, A.S. Khachaturian, J.C. Anthony, L. Mayer, Incidence of AD may decline in the early 90s for men, later for women: The Cache County study, *Neurology* 58 (2002) 209-218.
- [67] R. Dodel, I. Csoti, G. Ebersbach, G. Fuchs, M. Hahne, W. Kuhn, M. Oechsner, W. Jost, H. Reichmann, J.B. Schulz, Lewy body dementia and Parkinson's disease with dementia, *J Neurol* 255 Suppl 5 (2008) 39-47.
- [68] I.G. McKeith, D.W. Dickson, J. Lowe, M. Emre, J.T. O'Brien, H. Feldman, J. Cummings, J.E. Duda, C. Lippa, E.K. Perry, D. Aarsland, H. Arai, C.G. Ballard, B. Boeve, D.J. Burn, D. Costa, T. Del Ser, B. Dubois, D. Galasko, S. Gauthier, C.G. Goetz, E. Gomez-Tortosa, G. Halliday, L.A. Hansen, J. Hardy, T. Iwatsubo, R.N. Kalaria, D. Kaufer, R.A. Kenny, A. Korczyn, K. Kosaka, V.M. Lee, A. Lees, I. Litvan, E. Londos, O.L. Lopez, S. Minoshima, Y. Mizuno, J.A. Molina, E.B. Mukaetova-Ladinska, F. Pasquier, R.H. Perry, J.B. Schulz, J.Q. Trojanowski, M. Yamada, Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium, *Neurology* 65 (2005) 1863-1872.
- [69] J.L. Cummings, Fluctuations in cognitive function in dementia with Lewy bodies, *Lancet Neurol* 3 (2004) 266.
- [70] D.J. Burn, E.N. Rowan, T. Minett, J. Sanders, P. Myint, J. Richardson, A. Thomas, J. Newby, J. Reid, J.T. O'Brien, I.G. McKeith, Extrapyrmidal features in Parkinson's disease with and without dementia and dementia with Lewy bodies: A cross-sectional comparative study, *Mov Disord* 18 (2003) 884-889.
- [71] J.C. Klein, C. Eggers, E. Kalbe, S. Weisenbach, C. Hohmann, S. Vollmar, S. Baudrexel, N.J. Diederich, W.D. Heiss, R. Hilker, Neurotransmitter changes in dementia with Lewy bodies and Parkinson disease dementia in vivo, *Neurology* 74 (2010) 885-892.
- [72] P. Liberini, A. Valerio, M. Memo, P.F. Spano, Lewy-body dementia and responsiveness to cholinesterase inhibitors: a paradigm for heterogeneity of Alzheimer's disease?, *Trends Pharmacol Sci* 17 (1996) 155-160.
- [73] I. McKeith, T. Del Ser, P. Spano, M. Emre, K. Wesnes, R. Anand, A. Cicin-Sain, R. Ferrara, R. Spiegel, Efficacy of rivastigmine in dementia with Lewy bodies: a randomised, double-blind, placebo-controlled international study, *Lancet* 356 (2000) 2031-2036.
- [74] I. McKeith, A. Fairbairn, R. Perry, P. Thompson, E. Perry, Neuroleptic sensitivity in patients with senile dementia of Lewy body type, *BMJ* 305 (1992) 673-678.
- [75] S.B. Bonelli, G. Ransmayr, M. Steffelbauer, T. Lukas, C. Lampl, M. Deibl, L-dopa responsiveness in dementia with Lewy bodies, Parkinson disease with and without dementia, *Neurology* 63 (2004) 376-378.
- [76] S. Molloy, I.G. McKeith, J.T. O'Brien, D.J. Burn, The role of levodopa in the management of dementia with Lewy bodies, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76 (2005) 1200-1203.
- [77] v. Economo, *Encephalitis lethargica: Its sequelae and treatment*, Vol. 1931, Oxford University Press, London, 1931.
- [78] J.W. Langston, P. Ballard, J.W. Tetrad, I. Irwin, Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis, *Science* 219 (1983) 979-980.

- [79] C.M. Tanner, R. Ottman, S.M. Goldman, J. Ellenberg, P. Chan, R. Mayeux, J.W. Langston, Parkinson disease in twins: an etiologic study, *JAMA* 281 (1999) 341-346.
- [80] P. Piccini, D.J. Brooks, Etiology of Parkinson's disease: contributions from 18F-DOPA positron emission tomography, *Adv Neurol* 80 (1999) 227-231.
- [81] M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* 276 (1997) 2045-2047.
- [82] T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature* 392 (1998) 605-608.
- [83] T. Gasser, B. Muller-Myhsok, Z.K. Wszolek, R. Oehlmann, D.B. Calne, V. Bonifati, B. Bereznoi, E. Fabrizio, P. Vieregge, R.D. Horstmann, A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13, *Nat Genet* 18 (1998) 262-265.
- [84] A.L. DeStefano, M.F. Lew, L.I. Golbe, M.H. Mark, A.M. Lazzarini, M. Guttman, E. Montgomery, C.H. Waters, C. Singer, R.L. Watts, L.J. Currie, G.F. Wooten, N.E. Maher, J.B. Wilk, K.M. Sullivan, K.M. Slater, M.H. Saint-Hilaire, R.G. Feldman, O. Suchowersky, A.L. Lafontaine, N. Labelle, J.H. Growdon, P. Vieregge, P.P. Pramstaller, C. Klein, J.P. Hubble, C.R. Reider, M. Stacy, M.E. MacDonald, J.F. Gusella, R.H. Myers, PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study, *Am J Hum Genet* 70 (2002) 1089-1095.
- [85] M. Sharma, J.C. Mueller, A. Zimprich, P. Lichtner, A. Hofer, P. Leitner, S. Maass, D. Berg, A. Durr, V. Bonifati, G. De Michele, B. Oostra, A. Brice, N.W. Wood, B. Muller-Myhsok, T. Gasser, The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations, *J Med Genet* 43 (2006) 557-562.
- [86] A.B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M.R. Cookson, M. Muentner, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy, K. Gwinn-Hardy, alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science* 302 (2003) 841.
- [87] M.C. Chartier-Harlin, J. Kachergus, C. Roumier, V. Mouroux, X. Douay, S. Lincoln, C. Levecque, L. Larvor, J. Andrieux, M. Hulihan, N. Waucquier, L. Defebvre, P. Amouyel, M. Farrer, A. Destee, Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *Lancet* 364 (2004) 1167-1169.
- [88] E. Leroy, R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M.J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan,

- T. Gasser, P.J. Steinbach, K.D. Wilkinson, M.H. Polymeropoulos, The ubiquitin pathway in Parkinson's disease, *Nature* 395 (1998) 451-452.
- [89] E.M. Valente, P.M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M.M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A.R. Bentivoglio, D.G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W.P. Gilks, D.S. Latchman, R.J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger, N.W. Wood, Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1, *Science* 304 (2004) 1158-1160.
- [90] V. Bonifati, P. Rizzu, M.J. van Baren, O. Schaap, G.J. Breedveld, E. Krieger, M.C. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joesse, J.W. van Dongen, N. Vanacore, J.C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C.M. van Duijn, B.A. Oostra, P. Heutink, Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism, *Science* 299 (2003) 256-259.
- [91] A. Zimprich, S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergus, M. Hulihan, R.J. Uitti, D.B. Calne, A.J. Stoessl, R.F. Pfeiffer, N. Patenge, I.C. Carbajal, P. Vieregge, F. Asmus, B. Muller-Myhsok, D.W. Dickson, T. Meitinger, T.M. Strom, Z.K. Wszolek, T. Gasser, Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology, *Neuron* 44 (2004) 601-607.
- [92] C. Paisan-Ruiz, R. Guevara, M. Federoff, H. Hanagasi, F. Sina, E. Elahi, S.A. Schneider, P. Schwingenschuh, N. Bajaj, M. Emre, A.B. Singleton, J. Hardy, K.P. Bhatia, S. Brandner, A.J. Lees, H. Houlden, Early-onset L-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal signs due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and spatacsin mutations, *Mov Disord* 25 (2010) 1791-1800.
- [93] A. Ramirez, A. Heimbach, J. Grundemann, B. Stiller, D. Hampshire, L.P. Cid, I. Goebel, A.F. Mubaidin, A.L. Wriekat, J. Roeper, A. Al-Din, A.M. Hillmer, M. Karsak, B. Liss, C.G. Woods, M.I. Behrens, C. Kubisch, Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase, *Nat Genet* 38 (2006) 1184-1191.
- [94] A.A. Hicks, H. Petursson, T. Jonsson, H. Stefansson, H.S. Johannsdottir, J. Sainz, M.L. Frigge, A. Kong, J.R. Gulcher, K. Stefansson, S. Sveinbjornsdottir, A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease, *Ann Neurol* 52 (2002) 549-555.
- [95] S.A. Oliveira, Y.J. Li, M.A. Noureddine, S. Zuchner, X. Qin, M.A. Pericak-Vance, J.M. Vance, Identification of risk and age-at-onset genes on chromosome 1p in Parkinson disease, *Am J Hum Genet* 77 (2005) 252-264.
- [96] Y.J. Li, J. Deng, G.M. Mayhew, J.W. Grimsley, X. Huo, J.M. Vance, Investigation of the PARK10 gene in Parkinson disease, *Ann Hum Genet* 71 (2007) 639-647.
- [97] K. Haugarvoll, M. Toft, L. Skipper, M.G. Heckman, J.E. Crook, A. Soto, O.A. Ross, M.M. Hulihan, J.M. Kachergus, S.B. Sando, L.R. White, T. Lynch, J.M. Gibson, R.J. Uitti, Z.K. Wszolek, J.O. Aasly, M.J. Farrer, Fine-mapping and candidate gene investigation within the PARK10 locus, *Eur J Hum Genet* 17 (2009) 336-343.

- [98] N. Pankratz, W.C. Nichols, S.K. Uniacke, C. Halter, A. Rudolph, C. Shults, P.M. Conneally, T. Foroud, Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37, *Am J Hum Genet* 72 (2003) 1053-1057.
- [99] C. Lautier, S. Goldwurm, A. Durr, B. Giovannone, W.G. Tsiaras, G. Pezzoli, A. Brice, R.J. Smith, Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease, *Am J Hum Genet* 82 (2008) 822-833.
- [100] E.K. Tan, A.H. Schapira, Summary of GIGYF2 studies in Parkinson's disease: the burden of proof, *Eur J Neurol* 17 (2010) 175-176.
- [101] N. Pankratz, W.C. Nichols, S.K. Uniacke, C. Halter, J. Murrell, A. Rudolph, C.W. Shults, P.M. Conneally, T. Foroud, Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families, *Hum Mol Genet* 12 (2003) 2599-2608.
- [102] B.E. Morrison, M.C. Marcondes, D.K. Nomura, M. Sanchez-Alavez, A. Sanchez-Gonzalez, I. Saar, K.S. Kim, T. Bartfai, P. Maher, S. Sugama, B. Conti, Cutting edge: IL-13R α 1 expression in dopaminergic neurons contributes to their oxidative stress-mediated loss following chronic peripheral treatment with lipopolysaccharide, *J Immunol* 189 (2012) 5498-5502.
- [103] K.M. Strauss, L.M. Martins, H. Plun-Favreau, F.P. Marx, S. Kautzmann, D. Berg, T. Gasser, Z. Wszolek, T. Muller, A. Bornemann, H. Wolburg, J. Downward, O. Riess, J.B. Schulz, R. Kruger, Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease, *Hum Mol Genet* 14 (2005) 2099-2111.
- [104] A. Gregory, S.K. Westaway, I.E. Holm, P.T. Kotzbauer, P. Hogarth, S. Sonek, J.C. Coryell, T.M. Nguyen, N. Nardocci, G. Zorzi, D. Rodriguez, I. Desguerre, E. Bertini, A. Simonati, B. Levinson, C. Dias, C. Barbot, I. Carrilho, M. Santos, I. Malik, J. Gitschier, S.J. Hayflick, Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2), *Neurology* 71 (2008) 1402-1409.
- [105] C. Paisan-Ruiz, K.P. Bhatia, A. Li, D. Hernandez, M. Davis, N.W. Wood, J. Hardy, H. Houlden, A. Singleton, S.A. Schneider, Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism, *Ann Neurol* 65 (2009) 19-23.
- [106] C. Paisan-Ruiz, A. Li, S.A. Schneider, J.L. Holton, R. Johnson, D. Kidd, J. Chataway, K.P. Bhatia, A.J. Lees, J. Hardy, T. Revesz, H. Houlden, Widespread Lewy body and tau accumulation in childhood and adult onset dystonia-parkinsonism cases with PLA2G6 mutations, *Neurobiol Aging* 33 (2012) 814-823.
- [107] A. Di Fonzo, M.C. Dekker, P. Montagna, A. Baruzzi, E.H. Yonova, L. Correia Guedes, A. Szczerbinska, T. Zhao, L.O. Dubbel-Hulsman, C.H. Wouters, E. de Graaff, W.J. Oyen, E.J. Simons, G.J. Breedveld, B.A. Oostra, M.W. Horstink, V. Bonifati, FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome, *Neurology* 72 (2009) 240-245.

- [108] T. Zhao, L.A. Severijnen, M. van der Weiden, P.P. Zheng, B.A. Oostra, R.K. Hukema, R. Willemsen, J.M. Kros, V. Bonifati, FBXO7 immunoreactivity in alpha-synuclein-containing inclusions in Parkinson disease and multiple system atrophy, *J Neuropathol Exp Neurol* 72 (2013) 482-488.
- [109] W. Satake, Y. Nakabayashi, I. Mizuta, Y. Hirota, C. Ito, M. Kubo, T. Kawaguchi, T. Tsunoda, M. Watanabe, A. Takeda, H. Tomiyama, K. Nakashima, K. Hasegawa, F. Obata, T. Yoshikawa, H. Kawakami, S. Sakoda, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, Y. Nakamura, T. Toda, Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease, *Nat Genet* 41 (2009) 1303-1307.
- [110] J. Simon-Sanchez, C. Schulte, J.M. Bras, M. Sharma, J.R. Gibbs, D. Berg, C. Paisan-Ruiz, P. Lichtner, S.W. Scholz, D.G. Hernandez, R. Kruger, M. Federoff, C. Klein, A. Goate, J. Perlmutter, M. Bonin, M.A. Nalls, T. Illig, C. Gieger, H. Houlden, M. Steffens, M.S. Okun, B.A. Racette, M.R. Cookson, K.D. Foote, H.H. Fernandez, B.J. Traynor, S. Schreiber, S. Arepalli, R. Zonozi, K. Gwinn, M. van der Brug, G. Lopez, S.J. Chanock, A. Schatzkin, Y. Park, A. Hollenbeck, J. Gao, X. Huang, N.W. Wood, D. Lorenz, G. Deuschl, H. Chen, O. Riess, J.A. Hardy, A.B. Singleton, T. Gasser, Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease, *Nat Genet* 41 (2009) 1308-1312.
- [111] C. Vilarino-Guell, C. Wider, O.A. Ross, J.C. Dachsel, J.M. Kachergus, S.J. Lincoln, A.I. Soto-Ortolaza, S.A. Cobb, G.J. Wilhoite, J.A. Bacon, B. Behrouz, H.L. Melrose, E. Hentati, A. Puschmann, D.M. Evans, E. Conibear, W.W. Wasserman, J.O. Aasly, P.R. Burkhard, R. Djaldetti, J. Ghika, F. Hentati, A. Krygowska-Wajs, T. Lynch, E. Melamed, A. Rajput, A.H. Rajput, A. Solida, R.M. Wu, R.J. Uitti, Z.K. Wszolek, F. Vingerhoets, M.J. Farrer, VPS35 mutations in Parkinson disease, *Am J Hum Genet* 89 (2011) 162-167.
- [112] A. Zimprich, A. Benet-Pages, W. Struhal, E. Graf, S.H. Eck, M.N. Offman, D. Haubenberger, S. Spielberger, E.C. Schulte, P. Lichtner, S.C. Rossle, N. Klopp, E. Wolf, K. Seppi, W. Pirker, S. Presslauer, B. Mollenhauer, R. Katzenschlager, T. Foki, C. Hotzy, E. Reinthaler, A. Harutyunyan, R. Kralovics, A. Peters, F. Zimprich, T. Brucke, W. Poewe, E. Auff, C. Trenkwalder, B. Rost, G. Ransmayr, J. Winkelmann, T. Meitinger, T.M. Strom, A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease, *Am J Hum Genet* 89 (2011) 168-175.
- [113] M.C. Chartier-Harlin, J.C. Dachsel, C. Vilarino-Guell, S.J. Lincoln, F. Lepretre, M.M. Hulihan, J. Kachergus, A.J. Milnerwood, L. Tapia, M.S. Song, E. Le Rhun, E. Mutez, L. Larvor, A. Dufflot, C. Vanbesien-Mailliot, A. Kreisler, O.A. Ross, K. Nishioka, A.I. Soto-Ortolaza, S.A. Cobb, H.L. Melrose, B. Behrouz, B.H. Keeling, J.A. Bacon, E. Hentati, L. Williams, A. Yanagiya, N. Sonenberg, P.J. Lockhart, A.C. Zubair, R.J. Uitti, J.O. Aasly, A. Krygowska-Wajs, G. Opala, Z.K. Wszolek, R. Frigerio, D.M. Maraganore, D. Gosal, T. Lynch, M. Hutchinson, A.R. Bentivoglio, E.M. Valente, W.C. Nichols, N. Pankratz, T. Foroud, R.A. Gibson, F. Hentati,

- D.W. Dickson, A. Destee, M.J. Farrer, Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease, *Am J Hum Genet* 89 (2011) 398-406.
- [114] S. Fujioka, C. Sundal, A.J. Strongosky, M.C. Castanedes, R. Rademakers, O.A. Ross, C. Vilarino-Guell, M.J. Farrer, Z.K. Wszolek, D.W. Dickson, Sequence variants in eukaryotic translation initiation factor 4-gamma (eIF4G1) are associated with Lewy body dementia, *Acta Neuropathol* 125 (2013) 425-438.
- [115] S. Edvardson, Y. Cinnamon, A. Ta-Shma, A. Shaag, Y.I. Yim, S. Zenvirt, C. Jalas, S. Lesage, A. Brice, A. Taraboulos, K.H. Kaestner, L.E. Greene, O. Elpeleg, A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism, *PLoS One* 7 (2012) e36458.
- [116] C. Koroglu, L. Baysal, M. Cetinkaya, H. Karasoy, A. Tolun, DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability, *Parkinsonism Relat Disord* 19 (2013) 320-324.
- [117] C.E. Krebs, S. Karkheiran, J.C. Powell, M. Cao, V. Makarov, H. Darvish, G. Di Paolo, R.H. Walker, G.A. Shahidi, J.D. Buxbaum, P. De Camilli, Z. Yue, C. Paisan-Ruiz, The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures, *Hum Mutat* 34 (2013) 1200-1207.
- [118] M. Quadri, M. Fang, M. Picillo, S. Olgiati, G.J. Breedveld, J. Graafland, B. Wu, F. Xu, R. Erro, M. Amboni, S. Pappata, M. Quarantelli, G. Annesi, A. Quattrone, H.F. Chien, E.R. Barbosa, B.A. Oostra, P. Barone, J. Wang, V. Bonifati, Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism, *Hum Mutat* 34 (2013) 1208-1215.
- [119] E. Sidransky, M.A. Nalls, J.O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E.R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C.M. Chen, L.N. Clark, C. Condroyer, E.V. De Marco, A. Durr, M.J. Eblan, S. Fahn, M.J. Farrer, H.C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Kropp, A.E. Lang, G.J. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I.F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L.V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogaeva, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samaddar, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E.K. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A.R. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T.G. Wolfsberg, Y.R. Wu, C.P. Zabetian, Y. Zhao, S.G. Ziegler, Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease, *N Engl J Med* 361 (2009) 1651-1661.
- [120] L. Maroteaux, J.T. Campanelli, R.H. Scheller, Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal, *J Neurosci* 8 (1988) 2804-2815.
- [121] A. Surguchov, Molecular and cellular biology of synucleins, *Int Rev Cell Mol Biol* 270 (2008) 225-317.
- [122] R. Kruger, W. Kuhn, T. Muller, D. Voitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J.T. Epplen, L. Schols, O. Riess, Ala30Pro mutation in the

- gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease, *Nat Genet* 18 (1998) 106-108.
- [123] J.J. Zarranz, J. Alegre, J.C. Gomez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, L. Vidal, J. Hoenicka, O. Rodriguez, B. Atares, V. Llorens, E. Gomez Tortosa, T. del Ser, D.G. Munoz, J.G. de Yebenes, The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, *Ann Neurol* 55 (2004) 164-173.
- [124] T.L. Edwards, W.K. Scott, C. Almonte, A. Burt, E.H. Powell, G.W. Beecham, L. Wang, S. Zuchner, I. Konidari, G. Wang, C. Singer, F. Nahab, B. Scott, J.M. Stajich, M. Pericak-Vance, J. Haines, J.M. Vance, E.R. Martin, Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease, *Ann Hum Genet* 74 (2010) 97-109.
- [125] J. Grundemann, F. Schlaudraff, O. Haeckel, B. Liss, Elevated alpha-synuclein mRNA levels in individual UV-laser-microdissected dopaminergic substantia nigra neurons in idiopathic Parkinson's disease, *Nucleic Acids Res* 36 (2008) e38.
- [126] D.E. Cabin, K. Shimazu, D. Murphy, N.B. Cole, W. Gottschalk, K.L. McIlwain, B. Orrison, A. Chen, C.E. Ellis, R. Paylor, B. Lu, R.L. Nussbaum, Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein, *J Neurosci* 22 (2002) 8797-8807.
- [127] S. Chandra, F. Fornai, H.B. Kwon, U. Yazdani, D. Atasoy, X. Liu, R.E. Hammer, G. Battaglia, D.C. German, P.E. Castillo, T.C. Sudhof, Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 14966-14971.
- [128] A. Abeliovich, Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W.H. Ho, P.E. Castillo, N. Shinsky, J.M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, A. Rosenthal, Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system, *Neuron* 25 (2000) 239-252.
- [129] R.G. Perez, J.C. Waymire, E. Lin, J.J. Liu, F. Guo, M.J. Zigmond, A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis, *J Neurosci* 22 (2002) 3090-3099.
- [130] D. Albani, E. Peverelli, R. Rametta, S. Batelli, L. Veschini, A. Negro, G. Forloni, Protective effect of TAT-delivered alpha-synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70, *FASEB J* 18 (2004) 1713-1715.
- [131] H.S. Choi, S.H. Lee, S.Y. Kim, J.J. An, S.I. Hwang, D.W. Kim, K.Y. Yoo, M.H. Won, T.C. Kang, H.J. Kwon, J.H. Kang, S.W. Cho, O.S. Kwon, J.H. Choi, J. Park, W.S. Eum, S.Y. Choi, Transduced Tat-alpha-synuclein protects against oxidative stress in vitro and in vivo, *J Biochem Mol Biol* 39 (2006) 253-262.
- [132] T.D. Kim, E. Choi, H. Rhim, S.R. Paik, C.H. Yang, Alpha-synuclein has structural and functional similarities to small heat shock proteins, *Biochem Biophys Res Commun* 324 (2004) 1352-1359.

- [133] N. Ostrerova, L. Petrucelli, M. Farrer, N. Mehta, P. Choi, J. Hardy, B. Wolozin, alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins, *J Neurosci* 19 (1999) 5782-5791.
- [134] M. Ahn, S. Kim, M. Kang, Y. Ryu, T.D. Kim, Chaperone-like activities of alpha-synuclein: alpha-synuclein assists enzyme activities of esterases, *Biochem Biophys Res Commun* 346 (2006) 1142-1149.
- [135] S. Chandra, G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O.M. Schluter, T.C. Sudhof, Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration, *Cell* 123 (2005) 383-396.
- [136] Y. Tanaka, S. Engelender, S. Igarashi, R.K. Rao, T. Wanner, R.E. Tanzi, A. Sawa, L.D. V, T.M. Dawson, C.A. Ross, Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis, *Hum Mol Genet* 10 (2001) 919-926.
- [137] L. Petrucelli, C. O'Farrell, P.J. Lockhart, M. Baptista, K. Kehoe, L. Vink, P. Choi, B. Wolozin, M. Farrer, J. Hardy, M.R. Cookson, Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons, *Neuron* 36 (2002) 1007-1019.
- [138] D.W. Miller, S.M. Hague, J. Clarimon, M. Baptista, K. Gwinn-Hardy, M.R. Cookson, A.B. Singleton, Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication, *Neurology* 62 (2004) 1835-1838.
- [139] E. Junn, M.M. Mouradian, Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine, *Neurosci Lett* 320 (2002) 146-150.
- [140] P.L. McGeer, S. Itagaki, B.E. Boyes, E.G. McGeer, Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains, *Neurology* 38 (1988) 1285-1291.
- [141] E.C. Hirsch, T. Breidert, E. Rousset, S. Hunot, A. Hartmann, P.P. Michel, The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease, *Ann N Y Acad Sci* 991 (2003) 214-228.
- [142] Y.S. Kim, T.H. Joh, Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Exp Mol Med* 38 (2006) 333-347.
- [143] X. Su, K.A. Maguire-Zeiss, R. Giuliano, L. Prifti, K. Venkatesh, H.J. Federoff, Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease, *Neurobiol Aging* 29 (2008) 1690-1701.
- [144] N. Stefanova, M. Reindl, M. Neumann, P.J. Kahle, W. Poewe, G.K. Wenning, Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy, *Mov Disord* 22 (2007) 2196-2203.
- [145] B. Winner, R. Jappelli, S.K. Maji, P.A. Desplats, L. Boyer, S. Aigner, C. Hetzer, T. Loher, M. Vilar, S. Campioni, C. Tzitzilonis, A. Soragni, S. Jessberger, H. Mira, A. Consiglio, E. Pham, E. Masliah, F.H. Gage, R. Riek, In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 4194-4199.

- [146] Y. Shibasaki, D.A. Baillie, D. St Clair, A.J. Brookes, High-resolution mapping of SNCA encoding alpha-synuclein, the non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid precursor, to human chromosome 4q21.3-->q22 by fluorescence in situ hybridization, *Cytogenet Cell Genet* 71 (1995) 54-55.
- [147] J.W. Touchman, A. Dehejia, O. Chiba-Falek, D.E. Cabin, J.R. Schwartz, B.M. Orrison, M.H. Polymeropoulos, R.L. Nussbaum, Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element, *Genome Res* 11 (2001) 78-86.
- [148] D. Champion, C. Martin, R. Heilig, F. Charbonnier, V. Moreau, J.M. Flaman, J.L. Petit, D. Hannequin, A. Brice, T. Frebourg, The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease, *Genomics* 26 (1995) 254-257.
- [149] K. Beyer, Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol* 112 (2006) 237-251.
- [150] K. Beyer, M. Domingo-Sabat, J.I. Lao, C. Carrato, I. Ferrer, A. Ariza, Identification and characterization of a new alpha-synuclein isoform and its role in Lewy body diseases, *Neurogenetics* 9 (2008) 15-23.
- [151] O. Chiba-Falek, R.L. Nussbaum, Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat upstream of the alpha-synuclein gene (SNCA) on transcription in a cell culture luciferase reporter system, *Hum Mol Genet* 10 (2001) 3101-3109.
- [152] R.L. Clough, G. Dermentzaki, L. Stefanis, Functional dissection of the alpha-synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219, *J Neurochem* 110 (2009) 1479-1490.
- [153] C.R. Scherzer, J.A. Grass, Z. Liao, I. Pepivani, B. Zheng, A.C. Eklund, P.A. Ney, J. Ng, M. McGoldrick, B. Mollenhauer, E.H. Bresnick, M.G. Schlossmacher, GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene alpha-synuclein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 10907-10912.
- [154] R.L. Clough, L. Stefanis, A novel pathway for transcriptional regulation of alpha-synuclein, *FASEB J* 21 (2007) 596-607.
- [155] C. Gomez-Santos, M. Barrachina, P. Gimenez-Xavier, E. Dalfo, I. Ferrer, S. Ambrosio, Induction of C/EBP beta and GADD153 expression by dopamine in human neuroblastoma cells. Relationship with alpha-synuclein increase and cell damage, *Brain Res Bull* 65 (2005) 87-95.
- [156] Q. Xie, Y. Yang, J. Huang, J. Ninkovic, T. Walcher, L. Wolf, A. Vitenzon, D. Zheng, M. Gotz, D.C. Beebe, J. Zavadil, A. Cvekl, Pax6 interactions with chromatin and identification of its novel direct target genes in lens and forebrain, *PLoS One* 8 (2013) e54507.
- [157] G. Marwarha, T. Rhen, T. Schommer, O. Ghribi, The oxysterol 27-hydroxycholesterol regulates alpha-synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in human neuroblastoma cells through modulation of liver X receptors and estrogen receptors--relevance to Parkinson's disease, *J Neurochem* 119 (2011) 1119-1136.

- [158] D.M. Maraganore, M. de Andrade, A. Elbaz, M.J. Farrer, J.P. Ioannidis, R. Kruger, W.A. Rocca, N.K. Schneider, T.G. Lesnick, S.J. Lincoln, M.M. Hulihan, J.O. Aasly, T. Ashizawa, M.C. Chartier-Harlin, H. Checkoway, C. Ferrarese, G. Hadjigeorgiou, N. Hattori, H. Kawakami, J.C. Lambert, T. Lynch, G.D. Mellick, S. Papapetropoulos, A. Parsian, A. Quattrone, O. Riess, E.K. Tan, C. Van Broeckhoven, Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease, *JAMA* 296 (2006) 661-670.
- [159] J.C. Mueller, J. Fuchs, A. Hofer, A. Zimprich, P. Lichtner, T. Illig, D. Berg, U. Wullner, T. Meitinger, T. Gasser, Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease, *Ann Neurol* 57 (2005) 535-541.
- [160] J. Fuchs, A. Tichopad, Y. Golub, M. Munz, K.J. Schweitzer, B. Wolf, D. Berg, J.C. Mueller, T. Gasser, Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain, *FASEB J* 22 (2008) 1327-1334.
- [161] J. Lekstrom-Himes, K.G. Xanthopoulos, Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors, *J Biol Chem* 273 (1998) 28545-28548.
- [162] P. Descombes, U. Schibler, A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA, *Cell* 67 (1991) 569-579.
- [163] M. Cortes-Canteli, M. Pignatelli, A. Santos, A. Perez-Castillo, CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells, *J Biol Chem* 277 (2002) 5460-5467.
- [164] S.C. Williams, C.A. Cantwell, P.F. Johnson, A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro, *Genes Dev* 5 (1991) 1553-1567.
- [165] Gene-Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1051> [Zugriff 08-17-2014]
- [166] E. Sterneck, P.F. Johnson, CCAAT/enhancer binding protein beta is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling, *J Neurochem* 70 (1998) 2424-2433.
- [167] J. Fields, J. Gardner-Mercer, K. Borgmann, I. Clark, A. Ghorpade, CCAAT/enhancer binding protein beta expression is increased in the brain during HIV-1-infection and contributes to regulation of astrocyte tissue inhibitor of metalloproteinase-1, *J Neurochem* 118 (2011) 93-104.
- [168] T. Nakajima, S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto, S. Akira, Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 2207-2211.
- [169] C. Trautwein, C. Caelles, P. van der Geer, T. Hunter, M. Karin, M. Chojkier, Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain, *Nature* 364 (1993) 544-547.
- [170] D.F. Gordon, S.R. Lewis, B.R. Haugen, R.A. James, M.T. McDermott, W.M. Wood, E.C. Ridgway, Pit-1 and GATA-2 interact and functionally

- cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter, *J Biol Chem* 272 (1997) 24339-24347.
- [171] R.S. Viger, S.M. Guittot, M. Anttonen, D.B. Wilson, M. Heikinheimo, Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease, *Mol Endocrinol* 22 (2008) 781-798.
- [172] R.K. Patient, J.D. McGhee, The GATA family (vertebrates and invertebrates), *Curr Opin Genet Dev* 12 (2002) 416-422.
- [173] K.M. George, M.W. Leonard, M.E. Roth, K.H. Lieu, D. Kioussis, F. Grosveld, J.D. Engel, Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene, *Development* 120 (1994) 2673-2686.
- [174] J. Nardelli, D. Thiesson, Y. Fujiwara, F.Y. Tsai, S.H. Orkin, Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system, *Dev Biol* 210 (1999) 305-321.
- [175] T. Evans, M. Reitman, G. Felsenfeld, An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 5976-5980.
- [176] T.L. Sander, K.F. Stringer, J.L. Maki, P. Szauter, J.R. Stone, T. Collins, The SCAN domain defines a large family of zinc finger transcription factors, *Gene* 310 (2003) 29-38.
- [177] E.S. Lander, L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R.A. Gibbs, D.M. Muzny, S.E. Scherer, J.B. Bouck, E.J. Sodergren, K.C. Worley, C.M. Rives, J.H. Gorrell, M.L. Metzker, S.L. Naylor, R.S. Kucherlapati, D.L. Nelson, G.M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D.R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H.M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R.W. Davis, N.A. Federspiel, A.P. Abola, M.J. Proctor, R.M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood,

- D.R. Cox, M.V. Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G.A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B.A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W.R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J.A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D.G. Brown, C.B. Burge, L. Cerutti, H.C. Chen, D. Church, M. Clamp, R.R. Copley, T. Doerks, S.R. Eddy, E.E. Eichler, T.S. Furey, J. Galagan, J.G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L.S. Johnson, T.A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W.J. Kent, P. Kitts, E.V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T.M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J.V. Moran, N. Mulder, V.J. Pollara, C.P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A.F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y.I. Wolf, K.H. Wolfe, S.P. Yang, R.F. Yeh, F. Collins, M.S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K.A. Wetterstrand, A. Patrinos, M.J. Morgan, P. de Jong, J.J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y.J. Chen, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409 (2001) 860-921.
- [178] L.C. Edelstein, T. Collins, The SCAN domain family of zinc finger transcription factors, *Gene* 359 (2005) 1-17.
- [179] K. Chowdhury, M. Goulding, C. Walther, K. Imai, H. Fickenscher, The ubiquitous transactivator Zfp-38 is upregulated during spermatogenesis with differential transcription, *Mech Dev* 39 (1992) 129-142.
- [180] A.J. Williams, S.C. Blacklow, T. Collins, The zinc finger-associated SCAN box is a conserved oligomerization domain, *Mol Cell Biol* 19 (1999) 8526-8535.
- [181] X.W. Yang, C. Wynder, M.L. Doughty, N. Heintz, BAC-mediated gene-dosage analysis reveals a role for Zfp1 (Ru49/Zfp38) in progenitor cell proliferation in cerebellum and skin, *Nat Genet* 22 (1999) 327-335.
- [182] A.I. Su, T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K.A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman, M.P. Cooke, J.R. Walker, J.B. Hogenesch, A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 6062-6067.
- [183] Protein Knowledgebase UniProtKB:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y5A6> [Zugriff 08-22-2014]
- [184] A.J.F. Griffiths, S.R. Wessler, R.C. Lewontin, S.B. Carroll, Mapping with Molecular Markers. In: A.J.F. Griffith, S.R. Wessler, R.C. Lewontin, S.B. Carroll (Hrsg.), *Introduction to Genetic Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, S. 146-153.
- [185] R. Knippers, Biologische Gen-Karten bei Menschen. In: R. Knippers (Hrsg.), *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006, S. 502-514.
- [186] F.S. Collins, L.D. Brooks, A. Chakravarti, A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation, *Genome Res* 8 (1998) 1229-1231.
- [187] D.C. Crawford, D.A. Nickerson, Definition and clinical importance of haplotypes, *Annu Rev Med* 56 (2005) 303-320.

- [188] T.A. Brown, Genetische Kartierung. In: T.A. Brown (Hrsg.), *Genome und Gene*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007, S. 72-91.
- [189] L.H. Hartwell, L. Hood, M.L. Goldberg, A.E. Reynolds, L.M. Silver, SNPs and Small-Scale-Lenth Variations. In: L.H. Hartwell, L. Hood, M.L. Goldberg, A.E. Reynolds, L.M. Silver (Hrsg.), *Genetics: From Genes to Genomes*, McGraw Hill, New York, 2011, S. 371-379.
- [190] A.J. Brookes, The essence of SNPs, *Gene* 234 (1999) 177-186.
- [191] A.J.F. Griffiths, S.R. Wessler, R.C. Lewontin, S.B. Carroll, Variation and Its Modulation. In: A.J.F. Griffiths, S.R. Wessler, R.C. Lewontin, S.B. Carroll (Hrsg.), *Introduction to Genetic Analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, S. 604-612.
- [192] S.W. Scholz, H. Houlden, C. Schulte, M. Sharma, A. Li, D. Berg, A. Melchers, R. Paudel, J.R. Gibbs, J. Simon-Sanchez, C. Paisan-Ruiz, J. Bras, J. Ding, H. Chen, B.J. Traynor, S. Arepalli, R.R. Zonozi, T. Revesz, J. Holton, N. Wood, A. Lees, W. Oertel, U. Wullner, S. Goldwurm, M.T. Pellecchia, T. Illig, O. Riess, H.H. Fernandez, R.L. Rodriguez, M.S. Okun, W. Poewe, G.K. Wenning, J.A. Hardy, A.B. Singleton, F. Del Sorbo, S. Schneider, K.P. Bhatia, T. Gasser, SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy, *Ann Neurol* 65 (2009) 610-614.
- [193] K. Nishioka, C. Wider, C. Vilarino-Guell, A.I. Soto-Ortolaza, S.J. Lincoln, J.M. Kachergus, B. Jasinska-Myga, O.A. Ross, A. Rajput, C.A. Robinson, T.J. Ferman, Z.K. Wszolek, D.W. Dickson, M.J. Farrer, Association of alpha-, beta-, and gamma-Synuclein with diffuse lewy body disease, *Arch Neurol* 67 (2010) 970-975.
- [194] A.H. Klerkx, M.W. Tanck, J.J. Kastelein, H.O. Molhuizen, J.W. Jukema, A.H. Zwinderman, J.A. Kuivenhoven, Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C-->A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration, *Hum Mol Genet* 12 (2003) 111-123.
- [195] D.C. Betticher, N. Thatcher, H.J. Altermatt, P. Hoban, W.D. Ryder, J. Heighway, Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript, *Oncogene* 11 (1995) 1005-1011.
- [196] J. Duan, M.S. Wainwright, J.M. Comeron, N. Saitou, A.R. Sanders, J. Gelernter, P.V. Gejman, Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor, *Hum Mol Genet* 12 (2003) 205-216.
- [197] M. Farrer, D.M. Maraganore, P. Lockhart, A. Singleton, T.G. Lesnick, M. de Andrade, A. West, R. de Silva, J. Hardy, D. Hernandez, alpha-Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease, *Hum Mol Genet* 10 (2001) 1847-1851.
- [198] P. Pals, S. Lincoln, J. Manning, M. Heckman, L. Skipper, M. Hulihan, M. Van den Broeck, T. De Pooter, P. Cras, J. Crook, C. Van Broeckhoven, M.J. Farrer, alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease, *Ann Neurol* 56 (2004) 591-595.
- [199] I. Mizuta, W. Satake, Y. Nakabayashi, C. Ito, S. Suzuki, Y. Momose, Y. Nagai, A. Oka, H. Inoko, J. Fukae, Y. Saito, M. Sawabe, S. Murayama, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, T. Toda, Multiple candidate gene

- analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease, *Hum Mol Genet* 15 (2006) 1151-1158.
- [200] C. Linnertz, L. Saucier, D. Ge, K.D. Cronin, J.R. Burke, J.N. Browndyke, C.M. Hulette, K.A. Welsh-Bohmer, O. Chiba-Falek, Genetic regulation of alpha-synuclein mRNA expression in various human brain tissues, *PLoS One* 4 (2009) e7480.
- [201] I.F. Mata, M. Shi, P. Agarwal, K.A. Chung, K.L. Edwards, S.A. Factor, D.R. Galasko, C. Gingham, A. Griffith, D.S. Higgins, D.M. Kay, H. Kim, J.B. Leverenz, J.F. Quinn, J.W. Roberts, A. Samii, K.W. Snapinn, D.W. Tsuang, D. Yearout, J. Zhang, H. Payami, C.P. Zabetian, SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level, *Arch Neurol* 67 (2010) 1350-1356.
- [202] J. Bras, R. Guerreiro, L. Darwent, L. Parkkinen, O. Ansorge, V. Escott-Price, D.G. Hernandez, M.A. Nalls, L.N. Clark, L.S. Honig, K. Marder, W.M. Van Der Flier, A. Lemstra, P. Scheltens, E. Rogaeva, P. St George-Hyslop, E. Londos, H. Zetterberg, S. Ortega-Cubero, P. Pastor, T.J. Ferman, N.R. Graff-Radford, O.A. Ross, I. Barber, A. Braae, K. Brown, K. Morgan, W. Maetzler, D. Berg, C. Troakes, S. Al-Sarraj, T. Lashley, Y. Compta, T. Revesz, A. Lees, N. Cairns, G.M. Halliday, D. Mann, S. Pickering-Brown, D.W. Dickson, A. Singleton, J. Hardy, Genetic analysis implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction in the etiology of dementia with Lewy bodies, *Hum Mol Genet* 23 (2014) 6139-6146.
- [203] O.A. Ross, C. Vilarino-Guell, Z.K. Wszolek, M.J. Farrer, D.W. Dickson, Reply to: SNCA variants are associated with increased risk of multiple system atrophy, *Ann Neurol* 67 (2010) 414-415.
- [204] A. Al-Chalabi, A. Durr, N.W. Wood, M.H. Parkinson, A. Camuzat, J.S. Hulot, K.E. Morrison, A. Renton, S.D. Sussmuth, B.G. Landwehrmeyer, A. Ludolph, Y. Agid, A. Brice, P.N. Leigh, G. Bensimon, Genetic variants of the alpha-synuclein gene SNCA are associated with multiple system atrophy, *PLoS One* 4 (2009) e7114.
- [205] <http://en.wikipedia.org/wiki/Electroblotting> [Zugriff 10-27-2014]
- [206] K. Cartharius, K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein, T. Werner, MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites, *Bioinformatics* 21 (2005) 2933-2942.
- [207] G.D. Stormo, DNA binding sites: representation and discovery, *Bioinformatics* 16 (2000) 16-23.
- [208] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 5463-5467.
- [209] S. Kopp, Mutationsanalyse im *ITCH*-Gen bei Parkinson-Patienten [Online] - Universität Tübingen, 2010. <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:21-opus-48772> [Zugriff 10-27-2014]
- [210] S. Brenner, C. Wersinger, T. Gasser, Transcriptional regulation of the alpha-synuclein gene in human brain tissue, *Neurosci Lett* (2015).
- [211] M.A. Nalls, V. Plagnol, D.G. Hernandez, M. Sharma, U.M. Sheerin, M. Saad, J. Simon-Sanchez, C. Schulte, S. Lesage, S. Sveinbjornsdottir, K. Stefansson, M. Martinez, J. Hardy, P. Heutink, A. Brice, T. Gasser, A.B.

- Singleton, N.W. Wood, Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies, *Lancet* 377 (2011) 641-649.
- [212] P. Jenner, H.R. Morris, T.W. Robbins, M. Goedert, J. Hardy, Y. Ben-Shlomo, P. Bolam, D. Burn, J.V. Hindle, D. Brooks, Parkinson's disease--the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis, *J Parkinsons Dis* 3 (2013) 1-11.
- [213] M. Stamelou, G.U. Hoeglinger, Atypical parkinsonism: an update, *Curr Opin Neurol* 26 (2013) 401-405.
- [214] O. Ansorge, A.J. Lees, S.E. Daniel, Update on the accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease [abstract], *Mov Disord* 12 Suppl 1 (1997) 1-143.
- [215] A.J. Hughes, S.E. Daniel, A.J. Lees, Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease, *Neurology* 57 (2001) 1497-1499.
- [216] A.J. Hughes, S.E. Daniel, Y. Ben-Shlomo, A.J. Lees, The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service, *Brain* 125 (2002) 861-870.
- [217] B. Kaboord, M. Perr, Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation, *Methods Mol Biol* 424 (2008) 349-364.
- [218] C. Dickson, Protein techniques: immunoprecipitation, in vitro kinase assays, and Western blotting, *Methods Mol Biol* 461 (2008) 735-744.
- [219] E.H. Bresnick, K.D. Johnson, S.I. Kim, H. Im, Establishment and regulation of chromatin domains: mechanistic insights from studies of hemoglobin synthesis, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81 (2006) 435-471.
- [220] V. Orlando, Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation, *Trends Biochem Sci* 25 (2000) 99-104.
- [221] Y.H. Cai, H. Huang, Advances in the study of protein-DNA interaction, *Amino Acids* 43 (2012) 1141-1146.
- [222] R.H. Vossen, E. Aten, A. Roos, J.T. den Dunnen, High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening, *Hum Mutat* 30 (2009) 860-866.
- [223] F. Pompanon, A. Bonin, E. Bellemain, P. Taberlet, Genotyping errors: causes, consequences and solutions, *Nat Rev Genet* 6 (2005) 847-859.
- [224] R. Schleif, DNA looping, *Annu Rev Biochem* 61 (1992) 199-223.
- [225] M. Bulger, M. Groudine, Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation, *Genes Dev* 13 (1999) 2465-2477.
- [226] J.D. Engel, K. Tanimoto, Looping, linking, and chromatin activity: new insights into beta-globin locus regulation, *Cell* 100 (2000) 499-502.
- [227] B.E. Bernstein, A. Meissner, E.S. Lander, The mammalian epigenome, *Cell* 128 (2007) 669-681.
- [228] T. Maniatis, S. Goodbourn, J.A. Fischer, Regulation of inducible and tissue-specific gene expression, *Science* 236 (1987) 1237-1245.
- [229] X. Zhang, G. Xing, G.C. Fraizer, G.F. Saunders, Transactivation of an intronic hematopoietic-specific enhancer of the human Wilms' tumor 1 gene by GATA-1 and c-Myb, *J Biol Chem* 272 (1997) 29272-29280.

- [230] S. Pal, M.J. Nemeth, D. Bodine, J.L. Miller, J. Svaren, S.L. Thein, P.J. Lowry, E.H. Bresnick, Neurokinin-B transcription in erythroid cells: direct activation by the hematopoietic transcription factor GATA-1, *J Biol Chem* 279 (2004) 31348-31356.
- [231] S. Pal, A.B. Cantor, K.D. Johnson, T.B. Moran, M.E. Boyer, S.H. Orkin, E.H. Bresnick, Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 980-985.
- [232] G.M. Halliday, J.L. Holton, T. Revesz, D.W. Dickson, Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies, *Acta Neuropathol* 122 (2011) 187-204.
- [233] H.R. Xie, L.S. Hu, G.Y. Li, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, *Chin Med J (Engl)* 123 (2010) 1086-1092.
- [234] C. Gomez-Santos, I. Ferrer, A.F. Santidrian, M. Barrachina, J. Gil, S. Ambrosio, Dopamine induces autophagic cell death and alpha-synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *J Neurosci Res* 73 (2003) 341-350.
- [235] J.J. Tremblay, F. Hamel, R.S. Viger, Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity, *Endocrinology* 143 (2002) 3935-3945.
- [236] Y. Yamaguchi, H. Nishio, K. Kishi, S.J. Ackerman, T. Suda, C/EBPbeta and GATA-1 synergistically regulate activity of the eosinophil granule major basic protein promoter: implication for C/EBPbeta activity in eosinophil gene expression, *Blood* 94 (1999) 1429-1439.
- [237] S. Sotiriou, G. Gibney, A.D. Baxevanis, R.L. Nussbaum, A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease, *Neurosci Lett* 461 (2009) 196-201.
- [238] I. Mizuta, K. Takafuji, Y. Ando, W. Satake, M. Kanagawa, K. Kobayashi, S. Nagamori, T. Shinohara, C. Ito, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, Y. Kanai, S. Murayama, M. Nakagawa, T. Toda, YY1 binds to alpha-synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression, *J Hum Genet* 58 (2013) 711-719.
- [239] E. Wienholds, R.H. Plasterk, MicroRNA function in animal development, *FEBS Lett* 579 (2005) 5911-5922.
- [240] E. Junn, K.W. Lee, B.S. Jeong, T.W. Chan, J.Y. Im, M.M. Mouradian, Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 13052-13057.
- [241] E. Doxakis, Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153, *J Biol Chem* 285 (2010) 12726-12734.

6.4 Erklärungen zum Eigenanteil

Herr Prof. Dr. Gasser und Herr Dr. Wersinger waren an der Konzeption dieser Studie maßgeblich beteiligt. Sie haben diese Arbeit betreut und Herr Prof. Dr. Gasser hat das Manuskript korrigiert.

Die DNA-Extraktion aus Vollblut von Parkinson-Patienten wurde durch Mitarbeiter des Hertie Instituts für klinische Hirnforschung durchgeführt.

Die Daten zu „Risiko-SNPs“ aus der Metaanalyse von Nalls *et al.* [209] wurden von Dr. Sharma zur Verfügung gestellt.

Ich versichere, alle anderen Arbeiten, insbesondere die Durchführung und Auswertung der Versuche, die Daten- und Literaturrecherche sowie das Verfassen des Manuskripts, selbst und ohne fremde Hilfe durchgeführt zu haben.

Ort, Datum

Unterschrift

6.5 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

S. Brenner, C. Wersinger, T. Gasser, Transcriptional regulation of the α -synuclein gene in human brain tissue, *Neurosci Lett* 599 (2015) 140-145

6.6 Abschließende Bemerkung

Nach Artikel 3 Absatz 2 des Grundgesetzes sind Frauen und Männer gleich berechtigt. Alle Personenbezeichnungen in dieser Dissertationsschrift gelten daher für Männer und Frauen in gleicher Weise.

Danksagung

Ich möchte Prof. Gasser für die Konzeption und Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und der Publikation danken. Danke, dass Sie stets bei jedem meiner Anliegen Hilfe geleistet haben und auch nach Weggang meines Betreuers im Labor alle seine Aufgaben übernommen haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bedanken bei

Christophe Wersinger für die Einarbeitung und Einführung in das Labor

Oliver Rothfuss für die Unterstützung bei den ChIP Assays

Claudia Schulte und Manu Sharma für die Hilfe mit den SNP-Datenbanken

Ann-Kathrin Hauser für die Einarbeitung in die Sequenzierungsexperimente

Julia Sekler für die Unterstützung bei den qRT-PCRs

Susanna Hoffmann, Benjamin Schmid und David Schöndorf für die vielen Tipps und Tricks im Labor sowie die beste Bürobesezung, die man sich nur wünschen kann

allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neurodegeneration des Hertie Instituts für klinische Hirnforschung in Tübingen für das angenehme Arbeitsklima und die netten Treffen außerhalb des Labors, die eine echte Bereicherung waren

meinen Freunden und meiner Familie, die immer für mich da waren und mich bei allen Dingen stets unterstützt haben.

Lebenslauf