

**Genexpressionsanalyse an humanen Neuroblastomzellen
nach 6-Hydroxydopamin-Behandlung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von
Michael Schwake
aus Warendorf

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Richard Dodel
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian E. Elger, FRCP

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.05.2009

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Klockgether

Meiner Familie und Marcella

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Einleitung	9
Epidemiologie.....	12
Ätiologie und Pathogenese.....	12
Anatomie der Basalganglien.....	18
Der Neurotransmitter Dopamin.....	19
Physiologie des nigrostriatalen Systems.....	20
Pathophysiologie des M. Parkinson.....	22
Therapieansätze des M. Parkinson	23
Fragestellung	24
Material und Methoden.....	26
Zellkultur.....	26
Schädigung mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)	26
RNA-Isolierung	26
RAP-PCR	27
Analyse der PCR-Produkte.....	32
RT-PCR.....	32
Real-time PCR	34
Western Blot.....	40
Ergebnisse	46
Nachweis in der RAP-PCR.....	46

Ergebnisse der RT- und Real-time PCR	46
Nachweis auf Proteinebene	47
Diskussion.....	56
Zusammenfassung.....	63
Abbildungsverzeichnis.....	64
Tabellenverzeichnis.....	66
Literaturverzeichnis	67
Danksagung	76
Lebenslauf.....	77

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikro-Molar
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CASK	Calcium/Calmodulin-dependent Serine Protein Kinase
cDNA	Copy DNA
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
CRMP1	Collapsin Response Mediator Protein 1
DA	Dopamin
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Abbauenzym der DNA
dNTP	Desoxynucleintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EPMS	Extrapyramidalmotorisches System
ER	Endoplasmatische Retikulum
Fc	Crystallizable Fragment
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GART	Phosphoribosylaminoimidazolsynthetase
GDB	Gene Data Base
kDa	Kilo-Dalton
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
M.	Morbus
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylatkinase
MAO-B	Monoaminoxidase B
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Milli-Molar
M-MLV	Moloney-Murine-Leukemia Virus

MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6- Tetrahydropyridin
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ncl.	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRXN1	Neurexin 1
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pe	Pars externa des Pallidums
Pi	Pars interna des Pallidums
PKC	Proteinkinase C
pmol	Pico-Mol
RAP-PCR	Arbitrarily Primed-PCR
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Abbauenzym der RNA
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	Rounds per minute (Drehgeschwindigkeit)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RU	Relativer Unterschied
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfyte
Sek.	Sekunde
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticulata
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TMEFF1	TM Protein with EGF-like and 2 follistatin-like domains 1
U	Unit
UCH-L1	Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1
UPR	Unfolded Protein Responce
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
V	Volt
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung

Der Morbus Parkinson ist eine weit verbreitete neurodegenerative Erkrankung des extrapyramidal-motorischen Systems (EPMS), die durch einen irreversiblen Untergang dopaminerger Neurone im nigrostriatalen System des Gehirns gekennzeichnet ist (Holtz und O'Malley 2003, Lansbury und Brice 2002). Dies führt zu den typischen klinischen Zeichen Rigor, Ruhetremor, Hypokinese, welche bis zu Akinese führen kann, sowie zur posturalen Instabilität (Störung der Halte- und Stellreflexe).

Die aktuelle Definition des Parkinson-Syndroms fordert das Kernsymptom der *Akinese* in Kombination mit wenigstens einem der Kardinalsymptome *Rigor*, *Ruhetremor* und *postoraler Instabilität* (Oertel und Reichmann 2008). Die Symptomatik tritt dabei initial meist unilateral auf und ist im weiteren Verlauf progredient. Weitere typische Symptome sind Hypomimie und ein kleinschrittiges Gangbild, sowie die Schwierigkeit, Bewegungen zu initiieren oder abubrechen.

Darüber hinaus können auch nicht-motorische Symptome auftreten. Mehr als die Hälfte der Parkinsonpatienten leiden an psychiatrischen Störungen, vor allem an Depressionen und Schlafstörungen. Die ebenso häufig berichteten Psychosen treten hingegen meist nur als Nebenwirkung der medikamentösen Therapie (DeLong und Juncos 2005) auf.

Histopathologisch ist eine selektive Degeneration der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra pars compacta und das Auftreten von Lewy-Körpern nachweisbar (siehe Abbildung 1).

Lewy-Körper sind runde eosinophile zytoplasmatische Proteinaggregationen, bestehend aus alpha-Synuclein (Spillantini et al. 1997), Ubiquitin (McNaught et al. 2002b) und Neurofilamenten (Spillantini et al. 1998), die ein Kennzeichen für die Neurodegeneration darstellen.

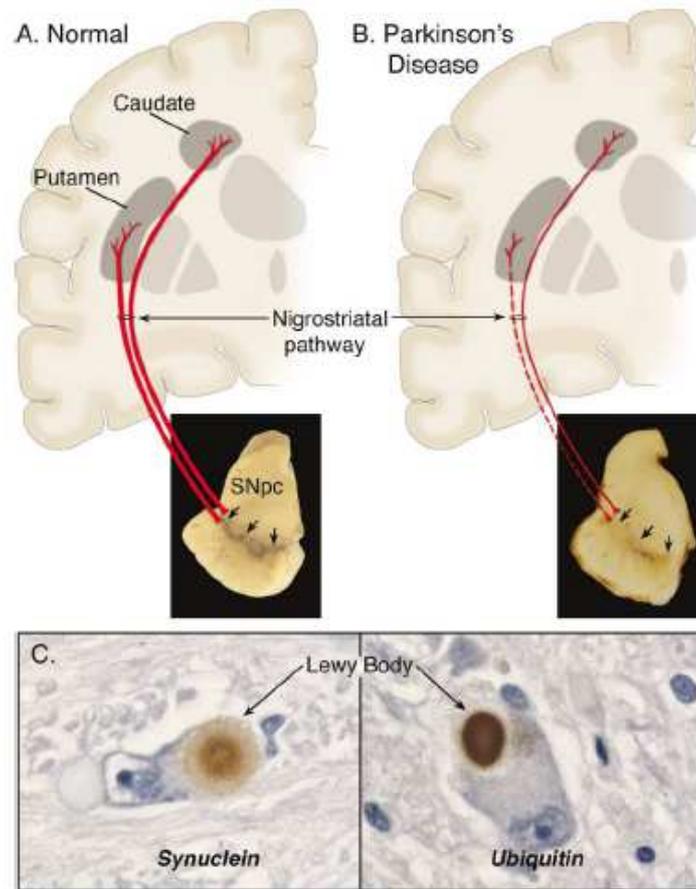


Abbildung 1: Anatomische Strukturen und Histopathologie bei M. Parkinson (nach Dauer und Przedborski 2003). In Abschnitt A. sieht man den Normalbefund der Substantia nigra pars compacta (SNpc). In Abschnitt B. ist die Substantia nigra atrophisch, bedingt durch den Untergang der dopaminergen Neuronen. In Abschnitt C. sind Lewy-Körper (Lewy Body) dargestellt.

In 75% der Erkrankungsfälle handelt es sich um einen sogenannten idiopathischen Morbus Parkinson. In den restlichen Fällen handelt es sich um genetisch bedingte oder sekundäre Parkinson-Syndrome, wobei das Parkinson-Syndrom im Rahmen anderer systemischer Erkrankungen, wie z.B. bei der Multisystematrophie vorkommt (weitere Formen siehe Tabelle 1). Die hier aufgeführte Arbeit bezieht sich auf den idiopathischen Morbus Parkinson und dessen neuropathologische Veränderungen.

Tabelle 1: Ursachen für das Parkinson-Syndrom, nach DeLong und Juncos (2005)

Primäre Parkinson-Syndrome	Sekundäre Parkinson-Syndrome
<ol style="list-style-type: none"> 1. Familiäre Parkinson-Syndrome (genetisch vererbt, selten) 2. Idiopathischer M. Parkinson (am häufigsten) 3. Sonstige Neurodegenerative Erkrankungen <ol style="list-style-type: none"> 1. Alpha-Synuclein-Pathologie <ol style="list-style-type: none"> i. Multisystematrophie ii. Lewy-Körper-Demenz 2. Tauopathien <ol style="list-style-type: none"> i. Progressive supranukleäre Blickparese ii. Kortikobasale Degeneration iii. Frontotemporale Demenz 3. Assoziiert mit Amyloid-Pathologie <ol style="list-style-type: none"> i. Im Rahmen des M. Alzheimer 4. Im Rahmen anderer genetischer Syndrome <ol style="list-style-type: none"> 1. M. Wilson 2. Chédiak-Higashi-Syndrom 3. Hallervorden-Spatz-Syndrom 4. SCA-3 Spinozerebelläre Ataxie 5. X-chromosomale Dystonie 6. Fragile X-Syndrom 7. Chorea Huntington (Westphal Variante) 8. Prion Erkrankungen 5. Sonstige Ursachen <ol style="list-style-type: none"> 1. Vaskulär (M. Binswanger) 2. Normal-Druck Hydrozephalus 3. Katatonie 4. Zerebrale Lähmungen 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Posttraumatisch (z.B. Boxer) 2. Infektiös <ol style="list-style-type: none"> a. Post-Enzephalitis b. Neurosyphilis 3. Metabolisch <ol style="list-style-type: none"> a. Hypoparathyroidismus b. Non-Wilson hepato-lentikuläre Degeneration 4. Medikamenten-induziert <ol style="list-style-type: none"> a. Neuroleptika b. Antiemetika (z.B. Metoclopramid) c. Alpha-Methyldopa d. Lithium e. Valporinsäure f. Flouxetin 5. Toxin-induziert <ol style="list-style-type: none"> a. MPTP b. Zyanid c. Methanol d. Paraquat e. Retenon f. N-Hexan g. Schwefelkohlenstoff h. Kohlenmonoxid

Epidemiologie

Die Erkrankung beginnt meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, wobei Männer statistisch gesehen etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Die Prävalenz der Erkrankung steigt von 20/100.000 in der Gesamtbevölkerung auf 120/100.000 bei Menschen mit einem Lebensalter von über 70 Jahren (Dauer und Przedborski 2003) an. Die Manifestationsrate der Erkrankung steigt somit mit zunehmendem Alter bis ca. zum 75. Lebensjahr, dann nimmt sie wieder ab.

Ein Parkinson-Syndrom kann allerdings auch extrem selten bereits vor dem 40. Lebensjahr auftreten, wobei in der Altersgruppe der 40-44-Jährigen einer von 100.000 Menschen betroffen ist.

Insgesamt wird in Deutschland derzeit von 300.000-400.000 Betroffenen ausgegangen (von Campenhausen et al. 2005).

Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie des idiopathischen M. Parkinson ist trotz intensiver weltweiter Forschungstätigkeit bisher noch weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch familiäre und Toxin-induzierte Formen des Parkinson-Syndroms, bei denen eine Mutation oder ein Giftstoff den selektiven Untergang der dopaminergen Neurone auslösen. Eine Auflistung der bisher bekannten genetischen Ursachen zur Entwicklung eines Parkinson-Syndroms ist in Tabelle 2 aufgeführt. Man vermutet daher, dass diese Ursachen alle zusammen ebenfalls eine Rolle in der Entstehung des idiopathischen M. Parkinson spielen könnten (Gandhi und Wood 2005). Darüberhinaus werden in diesem Abschnitt die verschiedenen Hypothesen, die Einfluss auf die Entstehung des idiopathischen M. Parkinson haben könnten, kurz beleuchtet.

Tabelle 2: Genetische Ursachen für das Parkinson Symptom. Nach Li et al. (2002), Pankratz et al. (2003a, 2003b), Strauss et al. (2005) und Vila und Przedborski (2004)

Lokus	Chromosom	Gen	Vererbung	Besondere Merkmale
PARK1	4q21	alpha-Synuclein	AD	Junges Alter, weniger Tremor
PARK2	6q25.2-q27	Parkin	AR	Junges Alter, langsame Progredienz, häufiger Dystonien und Dyskinesie. Meist keine Lewy-Körper ^a
PARK3	2p13	Unbekannt	AD	Häufiger Demenz, schnelle Progredienz
PARK4 ^b	4p15	Unbekannt	AD	Junges Alter, Demenz, Schnelle Progredienz, autonome Dysfunktionen, Halte-Tremor
PARK5	4p14	UCH-L1	AD	-
PARK6	1p36	PINK1	AR	Junges Alter, langsame Progredienz
PARK7	1p36	DJ-1	AR	Junges Alter, psychiatrische Symptome, langsame Progredienz
PARK8	12p11.2-q13.1	LRRK-2	AD	Meist keine Lewy-Körper
PARK9	1p36	Unbekannt	AR	Juveniles Alter, Spastik, Demenz, supranukleäre Blickparese
PARK10	1p	Unbekannt		Hohes Alter
PARK11	2q36-37	Unbekannt		-
PARK12	Xq21-25	Unbekannt		-
PARK13	2p12	HtrA Serin Peptidase 2		-

AD: autosomal dominant; AR: autosomal rezessiv. ^a: nur in einem Fall gefunden. ^b: Lokus nicht bestätigt, wahrscheinlich handelt es sich um eine alpha-Synuclein (PARK1) Triplikation.

1. Oxydativer Stress und mitochondriale Dysfunktion:

Die ersten Hypothesen zur Pathogenese des idiopathischen M. Parkinson basierten auf der Tatsache, dass die Stoffe 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) (Langston et al. 1984), Rotenon (Betarbet et al. 2000) und Paraquat (Liou et al. 1997) den Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien hemmen und dadurch Parkinson-Symptome mit selektivem Untergang dopaminerger Neurone *in vitro* (Seniuk et al. 1990, Manning-Bog et al. 2002) und *in vivo* (Forno et al. 1986) Modellen verursachen.

Die Hemmung des mitochondrialen Komplex I führt dabei zu zweierlei Konsequenzen: Die Behinderung aller ATP-abhängigen Reaktionen und die Entstehung freier Radikale (ROS), die einen oxidativen Stress auslösen. Diese Radikale reagieren mit Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren und führen letztendlich zum Zelltod (Cohen 2000). In post mortem Gehirnanalysen von Parkinson-Patienten gibt es deutliche Beweise für diesen oxidativen Stress: Lipid-Peroxidation Marker (4-Hydroxynonenal und Malondialdehyd) sowie Nitratbindung an Proteinen wurden in der Substantia nigra und in den Lewy-Körpern nachgewiesen (Andersen 2004). Darüber hinaus wurde eine Reduktion der Aktivität des Komplex I um 30% in Gehirn, Muskeln und Thrombozyten bei Patienten mit idiopathischem M. Parkinson beschrieben (Schapira et al. 1990, Parker et al. 1989).

Eine weitere Unterstützung für die Hypothese, dass oxidativer Stress eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des M. Parkinson spielen könnte, war der Nachweis von Mutationen im DJ-1 Gen (Bonifati et al. 2002), die zu einer Parkinson-Symptomatik führen. Die genaue Funktion des DJ-1-Genproduktes ist allerdings weiterhin unbekannt, es scheint jedoch, dass dieser eine protektive Funktion gegen die Hemmung des mitochondrialen Komplex I und den oxidativen Stress zu haben scheint (Canet-Aviles et al. 2004 und Taira et al. 2004).

Eine weitere Ursache für den oxidativen Stress sind endogene Faktoren, wobei vor allem der Metabolismus des in der Substantia nigra vorkommenden Neurotransmitters Dopamin (näheres s.u.) selbst zur Produktion von ROS (Cohen 1984) führen kann. Dopamin wird dabei durch drei verschiedene enzymatische Wege zum hochtoxischen Chinon umgewandelt (Stokes et al. 1999). Darüber hinaus kann Dopamin durch das Vorhandensein von Schwermetallen und Wasserstoffperoxyd in 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) umgewandelt werden (Blum et al. 2001).

6-OHDA erhöht wiederum die ROS-Konzentration, hemmt den Komplex I in den Mitochondrien (Beal 2001), führt zu falsch gefalteten Proteinen (UPR) (Holtz und O'Malley 2003) und verursacht den Zelltod durch apoptotische (Bilsland et al. 2002, Dodel et al. 1999) und nicht-apoptotische Mechanismen (Sauer und Oertel 1994). *In vivo* verursacht 6-OHDA eine selektive Neurodegeneration dopaminerger Neurone und stellt ein etabliertes Modell des M. Parkinson *in vivo* und *in vitro* dar (Dauer und Przedborski 2003, Sauer und Oertel 1994, Ungerstedt 1968). Zusätzlich konnten 6-OHDA und andere Dopamin- und Chininderivate post mortem in Gehirnen von Parkinson-Erkrankten nachgewiesen werden (Fornstedt et al. 1986, Spencer et al. 1998).

2. Proteinakkumulation und das Ubiquitin-Proteasom-System:

Der Nachweis, dass eine Mutation im alpha-Synuclein Gen ein familiäres Parkinson-Syndrom auslöst (Polymeropoulos et al. 1997) führte zu der wichtigen Entdeckung, dass dieses Protein ein wichtiger Bestandteil der Lewy-Körper darstellt (Spillantini et al. 1998). Verschiedene Mutationen in diesem Gen führen zu einer Aggregation des Genprodukts und dadurch zu einem autosomal dominanten Parkinson-Syndrom. Hingegen verleiht ein alpha-Synuclein-Knockout Mäusen einen Schutz gegenüber den toxischen Effekten von MPTP (Dauer et al. 2002). Dies könnte einen weiteren Hinweis geben, dass die Akkumulation von alpha-Synuclein ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese ist.

Das Proteasom ist ein Proteinkomplex, der im Zytoplasma und im Zellkern Proteine zu kleinen Fragmenten abbaut. Proteine, welche abgebaut werden sollen, werden in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess mit einer Poly-Ubiquitin-Kette markiert. Dieser Proteinabbau ist für die Zelle lebensnotwendig. So werden metabolische Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklus regulierende Proteine und fehlerhafte Proteine abgebaut (Baumeister et al. 1998).

Die ersten Beweise, dass das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eine Rolle in der Neurodegeneration spielen könnte, lieferte die Entdeckung des Parkin-Gens. Mutationen in diesem Gen verursachen ein autosomal rezessives Parkinson-Syndrom, welches bereits im frühen Lebensalter auftritt (Kitada et al. 1998).

Diese Mutationen sind mit einem Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra und im Locus coeruleus assoziiert. Allerdings fehlten in den wenigen durchge-

fürten Gehirnautopsien von Patienten mit Parkin-assoziiertem Parkinson-Syndrom die Lewy-Körper bei einer homozygoten Deletion dieses Gens. Hingegen konnten sie bei heterozygoten Genträgern gefunden werden. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass Parkin eine signifikante Rolle in der Lewy-Körper Formation spielen könnte (Gandhi und Wood 2005).

Parkin selbst kodiert eine E3-Ubiquitin-Ligase, ein Enzym, das die Ubiquitin-Markierung katalysiert. Ein Funktionsverlust von Parkin könnte also zu einer Akkumulation von Proteinen, die nicht abgebaut werden können, in den Zellen führen und somit letzten Endes den Zelltod hervorrufen.

Eine weitere Mutation im Ubiquitin-Carboxy-Terminal-Hydrolase L1-Gen (UCHL-1), die ein autosomal dominantes Parkinson-Syndrom verursacht (Leroy et al. 1998), lieferte weitere Beweise, dass das UPS eine Rolle in der Pathogenese des idiopathischen M. Parkinson spielen könnte. Dieses Enzym fördert die Wiederverwendung von Ubiquitin. Ebenso führt die pharmakologische Inhibition des Proteasoms zu einer selektiven Degeneration dopaminerger Neurone *in vitro* und *in vivo* (McNaught et al. 2002a, 2002b).

3. Kinasen:

Andere Mutationen, welche eine Parkinsonsymptomatik verursachen, sind Mutationen in den Genen der Kinasen PINK-1 und LRRK-2. Kinasen sind bekannt für ihre Funktion im Zellzyklus und haben wahrscheinlich eine neuroprotektive Funktion (Gandhi und Wood 2005).

Zusätzlich dazu nehmen die obengenannten Hypothesen und Pathomechanismen untereinander Einfluss: so führt eine Hemmung des Komplex I im Mitochondrium auch zur Hemmung des Proteasoms (Shen 2004) und eine Hemmung des Proteasoms führt wiederum zur Generierung von ROS durch Hemmung des Komplex I (Sullivan et al. 2004). Ebenso bedingt ein genetischer Parkin-Knockout im *Drosophila-Modell* eine Apoptose der Flugmuskelzellen aufgrund mitochondrialer Pathologien (Palacino et al. 2004). Weitere Interaktionen sind in Abbildung 2 dargestellt.

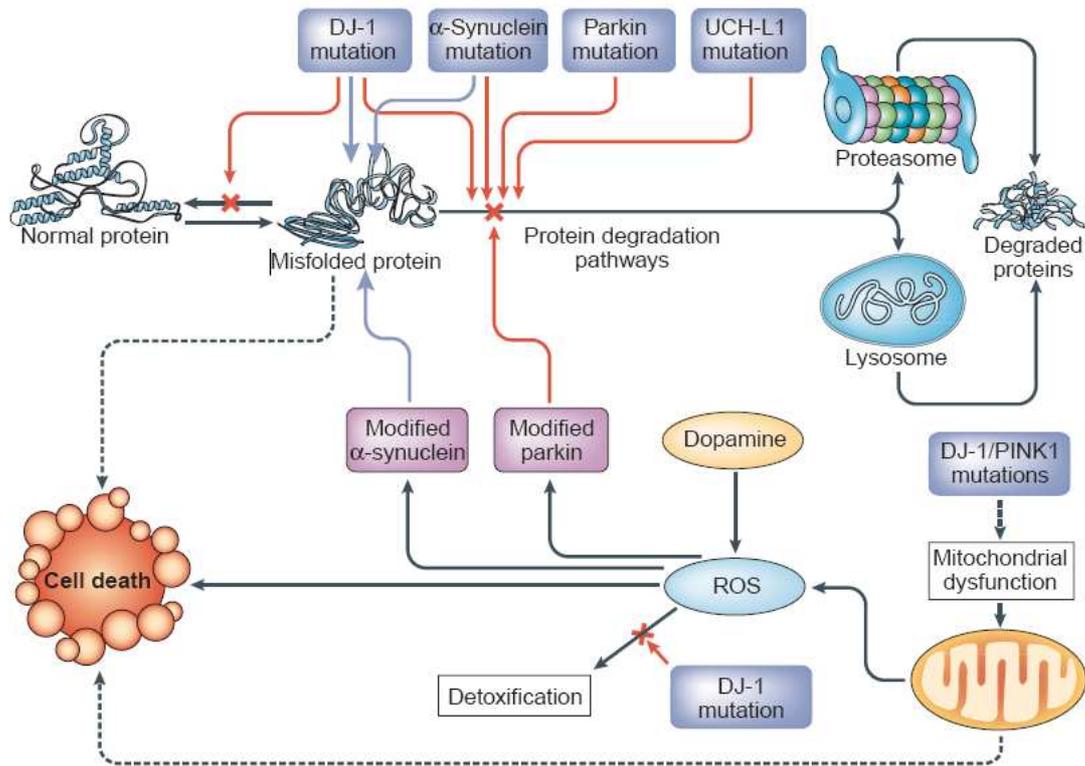


Abbildung 2: Genetische Mutationen und Pathogenese des M. Parkinson, vereinfachte Darstellung nach Villa und Przedborski (2000). Falsch aggregierte Proteine können eine Neurodegeneration verursachen. Mutationen im alpha-Synuclein- und DJ-1-Gen können falsch aggregierte Proteine induzieren (blaue Pfeile) und so das System des Proteinabbaus behindern/überlasten. Andere mutierte Gene, wie z.B. Parkin und UCH-L-1, die zum Ubiquitin-Proteasom System gehören, beeinträchtigen den Proteinabbau (rote Pfeile). DJ-1 Mutationen können auch die Aktivität von Chaperonen stören, die neu synthetisierten Proteinen helfen, die Sekundär- oder Tertiärstruktur einzunehmen, und führen so zu falsch aggregierten Proteinen (rote Pfeile). Diese Ereignisse verursachen eine Akkumulation von Proteinen in den Zellen und können somit letztendlich zum Zelltod führen (gestrichelte Pfeile).

Mitochondriale Dysfunktionen und der Metabolismus von Dopamin können einen oxidativen Stress verursachen, der auch zu einer Proteinakkumulation, v.a. von alpha-Synuclein und DJ-1, führen kann. Der oxidative Stress kann ebenso durch Defekte in der DJ-1-Funktion hervorgerufen werden und Mutationen in DJ-1 und Pink-1 Genen verursachen eine mitochondriale Dysfunktion. Falschgefaltete Proteine, oxydativer Stress und mitochondriale Dysfunktion sind in dieser hypothetischen Kaskade eng miteinander verknüpft und bedingen sich teilweise gegenseitig.

Anatomie der Basalganglien

Die Basalganglien sind subkortikale Kerngebiete im Großhirn, die für funktionelle Aspekte motorischer, kognitiver und limbischer Regelungen von großer Bedeutung sind (Zenker 1994). Die Basalganglien bilden einen wesentlichen Bestandteil des extrapyramidalmotorischen Systems (EPMS) und haben dabei auch Einfluss auf die Pyramidenbahnen.

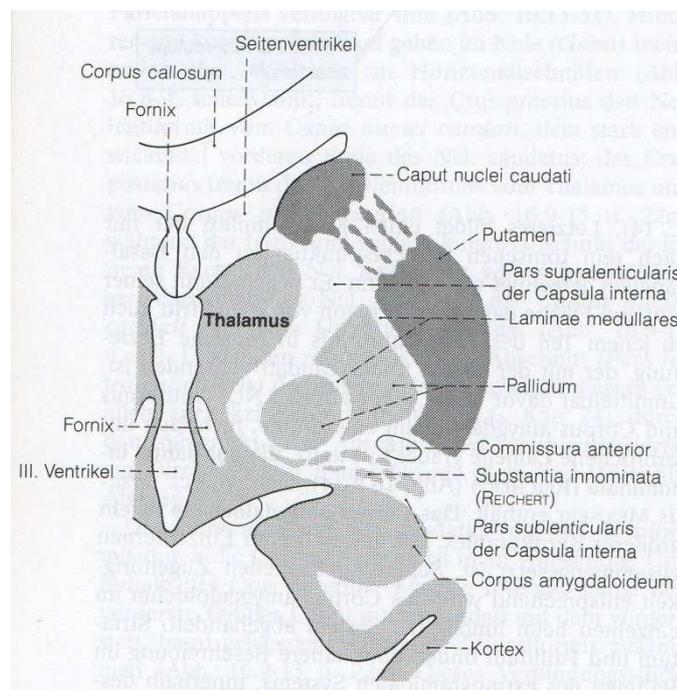


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Basalganglien (Zenker 1994)

Anatomisch und funktionell gehören folgende Marklager des Großhirns zu den Basalganglien:

1. Nucleus caudatus
2. Nucleus lentiformis, bestehend aus:
 - a. Putamen
 - b. Pallidum, mit pars interna (Pi) und pars externa (Pe)
3. Substantia nigra, mit pars compacta (SNpc) und pars reticularis (SNpr)
4. Nucleus subthalamicus

Putamen und Ncl. caudatus bilden zusammen das Striatum. Diese Struktur ist als eine zentrale Schaltstelle motorischer Impulse zu betrachten und ihre Hauptaufgabe ist in der integrierenden, vor allem inhibitorischen, Beeinflussung dieser Impulse zu sehen (Trepel 2004, Zenker 1994).

Der Neurotransmitter Dopamin

1. Biosynthese und Abbau:

Dopamin gehört zu den Katecholaminen und wird wie alle anderen Katecholamine aus der Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert. Ebenso stellt es eine Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin dar. Zuerst wird L-Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) hydriert und dieses wird dann zu Dopamin decarboxyliert. Dopamin wird dann innerhalb der Zelle in Vesikeln gespeichert, bevor es in die Synapse als Neurotransmitter ausgeschieden wird. Anschließend wird Dopamin wieder in die Präsynapse aufgenommen und durch die Catechol-O-Methyl Transferase (COMT) und Monoamin Oxidase-B (MAO-B) zu Vanillinmandelsäure abgebaut.

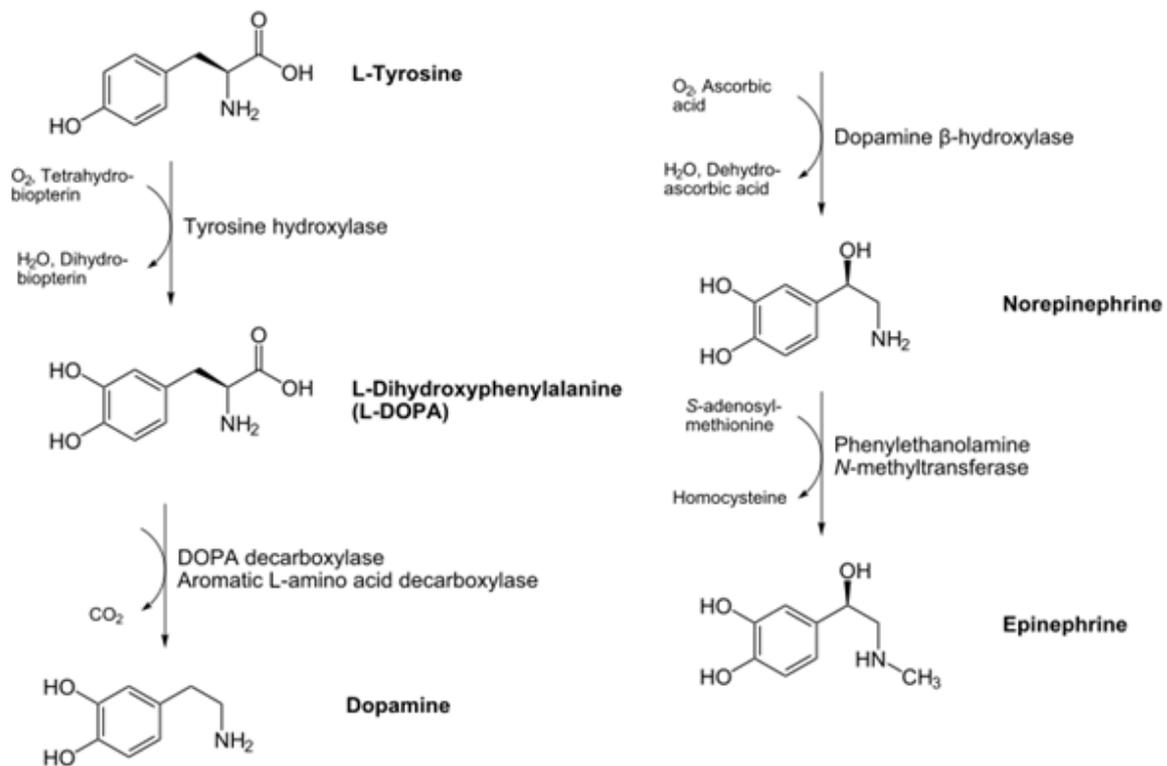


Abbildung 4: Biosynthese der Katecholamine

2. Dopamin-Rezeptoren:

Dopamin-Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Proteine und werden in zwei Gruppen geteilt (Girault und Greengard 2004):

- a. *Die D1-Dopamin-Rezeptor Gruppe:* Zu dieser Gruppe gehört neben dem D1-Rezeptor auch der D5-Rezeptor. Sie gehören zur G_s -Rezeptor Gruppe, bei der das G-Protein die Adenylatzyklase, die aus ATP cAMP synthetisiert. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle.
- b. *Die D2-Dopamin-Rezeptor Gruppe:* Zu dieser Gruppe gehören die D2-, D3- und D4-Rezeptoren. Der Rezeptor ist ein G_i -Protein, das die Adenylat-zyklase hemmt und so die cAMP-Konzentration erniedrigt.

Dopamin-Rezeptoren sind vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS) lokalisiert, können aber auch in anderen Organen wie Herz und Niere nachgewiesen werden.

Physiologie des nigrostriatalen Systems

Die Eingangsstation der Basalganglien ist das Striatum, dessen Neurone von Bahnen aus dem gesamten Kortex glutamaterg erregt werden. Daraufhin setzen die aktivierten striatalen Neurone den hemmenden Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) zusammen mit Enkephalin oder Substanz P frei. Über die GABA-/Enkephalin-Neurone hemmen die striatalen Neurone die Pars externa des Pallidums (Pe). Die Pe-Neurone ihrerseits hemmen gabaerg den Ncl. subthalamicus, dessen Neurone wiederum aktivierend glutamaterg auf die Neurone in Pi und SNpr einwirken. Zusätzlich erhält das Striatum Afferenzen aus der Pars compacta der Substantia nigra (SNpc).

Die Ausgangstationen der Basalganglien sind Neurone in der Pars reticulata der Substantia nigra (SNpr) sowie in der Pars interna des Pallidums (Pi). Sowohl SNpr als auch Pi hemmen mit dem Transmitter GABA den ventrolateralen Thalamus. Da der Thalamus wiederum zum Kortex projiziert, entsteht eine kortiko-thalamo-kortikale Schleife, die modulierend in die Motorik eingreift (siehe Abbildung 5).

Es lassen sich zwei Wege unterscheiden: Durch die striatale Hemmung von SNpr und Pi kommt es, über zwei hemmende Neurone hintereinander, zu einer Enthemmung des Thalamus auf dem sogenannten *direkten Weg*. Parallel dazu läuft eine indirekte Verbindung über Pe und den Ncl. subthalamicus. Auch hier führen zwei sukzessiv-hemmende Neurone zur Enthemmung, in diesem Fall der Neurone des Ncl. subthalamicus. Infolgedessen

erregen die Neurone des Ncl. subthalamicus die Neurone von Pi und SNpr und führen auf dem *indirekten Weg* zu einer vertieften Thalamus-Hemmung. Wie zwei Zügel können die alternativen Wege die Erregbarkeit der thalamokortikalen Neurone steuern.

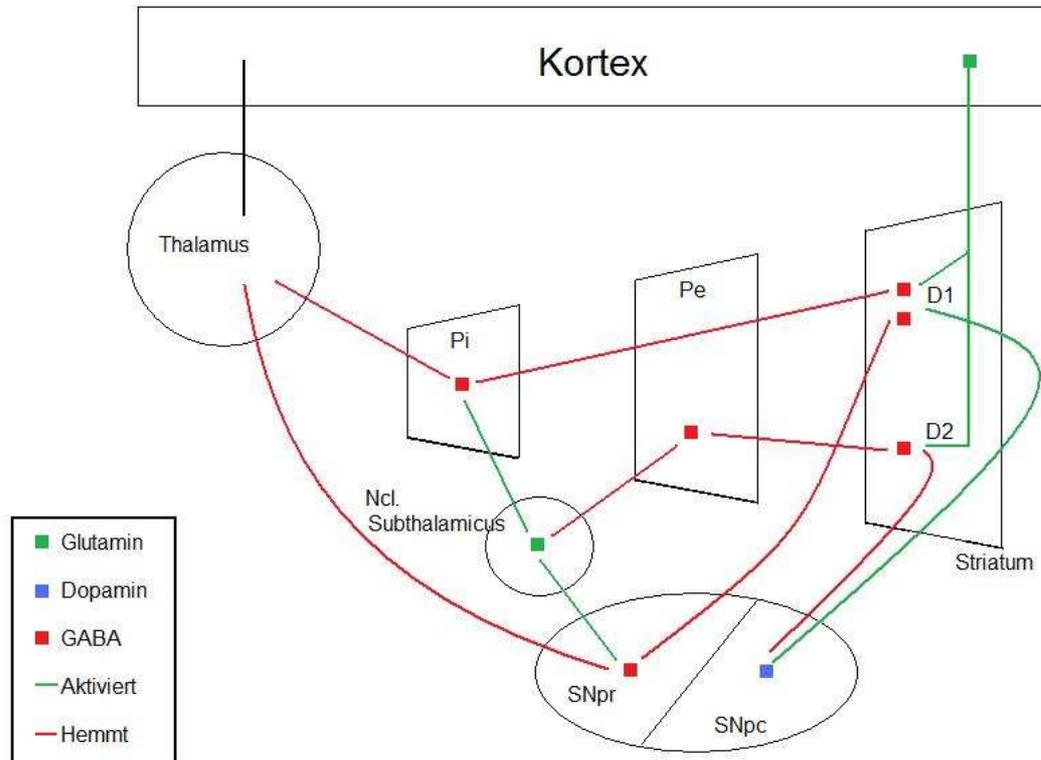


Abbildung 5: Bahnen zwischen den Basalganglien (vereinfacht), nach Silbernagl und Lang (1998)

Die Substantia nigra pars compacta (SNpc) kontrolliert das Striatum über die dopaminergen Neurone. Über D1-Rezeptoren werden die GABA-/Substanz P-Neurone (d.h. der direkte Weg) aktiviert und über D2-Rezeptoren die GABA-/Enkephalin- Neurone (d.h. der indirekte Weg) gehemmt (Klinke und Silbernagl 2001).

Über efferente Faserverbindungen mit der Formatio reticularis nimmt die Substantia nigra indirekt Einfluss auf die extrapyramidale Motorik und damit auch auf den generellen Muskeltonus. Fasern zum Thalamus sollen indirekt die pyramidale Motorik beeinflussen (Trepel 2004).

wahrscheinlich durch den Ausfall der dopaminergen Hemmung retikulospinaler Efferenzneurone in motorischen Zentren der *Formatio reticularis* (Trepel 2004) bedingt.

Therapieansätze des M. Parkinson

Es gibt bis heute noch keine Möglichkeit einer ursächlichen Behandlung des Parkinson-Syndroms, die in einem Verhindern oder zumindest einem Aufhalten der fortschreitenden Degeneration der Neurone des nigrostriatalen Systems bestünde. Derzeit zielen alle Behandlungsansätze auf eine symptomatische Behandlung. Dies geschieht hauptsächlich durch die Gabe von L-Dopa (Levodopa), einer Vorstufe des Dopamins. L-Dopa kann, im Gegensatz zum Dopamin, die Blut-Hirn-Schranke überwinden und anschließend intrazerebral in Dopamin umgewandelt werden.

Die L-Dopa-Gabe wird meistens zusammen mit einem Decarboxylase-Hemmer, wie z.B. Carbidopa, kombiniert. Dadurch wird die Decarboxylierung von L-DOPA zu Dopamin in der Peripherie reduziert und somit die peripheren Nebenwirkungen von Dopamin abgeschwächt. Aufgrund einer Toleranzentwicklung im Verlauf der Behandlung muss allerdings oft die L-Dopa-Dosis mit der Zeit gesteigert werden. Ebenso können nach mehrjähriger Einnahme von L-Dopa unwillkürliche Bewegungen, sogenannte motorische Komplikationen (Dyskinesien und motorische Fluktuationen), auftreten. Diese erklärt man durch eine *pulsatile* Rezeptorenstimulation, da L-Dopa nur eine Wirkzeit von wenigen Stunden hat.

Weitere therapeutische Optionen sind direkte Dopamin-Agonisten (z.B. Bromocriptin und Pergolid), MAO-B Hemmer (Selegilin und Rasagilin), COMT Hemmer und Amantadin. In den letzten Jahren hat sich auch eine operative Behandlung durchgesetzt, die sogenannte tiefe Hirnstimulation (DBS: Deep Brain Stimulation). Eine weitere operative Möglichkeit stellt die Pallidotomie dar. Diese Verfahren sind jedoch sehr aufwendig und nur für ausgewählte Parkinson-Patienten sinnvoll (DeLong und Juncos 2005).

Fragestellung

Um die Auswirkungen des oxidativen Stresses, als eine Hypothese der Ätiologie des idiopathischen Morbus Parkinson, *in vitro* weiter zu charakterisieren, haben wir die dopaminerge humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y (Tanaka et al. 1995) mit 6-OHDA behandelt und anschließend das Profil der Genexpression mittels RAP-PCR ermittelt.

Die Behandlung von dopaminergen Neuronen mit 6-OHDA führt zum Zelltod und ist ein etabliertes Modell für den M. Parkinson, das seit etwa 40 Jahren durchgeführt wird (Dauer und Przedborski 2003, Ungerstedt 1968).

6-OHDA wird über den Dopamin Transporter in die Neurone aufgenommen (Luthman et al 1989), dort akkumuliert es im Zytosol, verursacht einen oxidativen Stress, hemmt den Komplex I der Mitochondrien (Beal 2001), führt zu falsch gefalteten Proteinen (UPR) (Holtz und O'Malley 2003) und verursacht den Zelltod durch apoptotische (Bilsland et al. 2002, Dodel et al. 1999) und nicht-apoptotische Mechanismen (Sauer und Oertel 1994).

Stereotaktische Injektionen dieses Toxins in das Striatum führen im Tiermodell zu einer verzögerten und progredienten retrograden Degeneration von nigrostriatalen dopaminergen Neuronen (Sauer und Oertel 1994), während die Injektion in die Substantia nigra einen raschen direkten Nervenzellverlust hervorruft (Jeon et al. 1995). Lewy-Körper wurden jedoch noch nicht beschrieben.

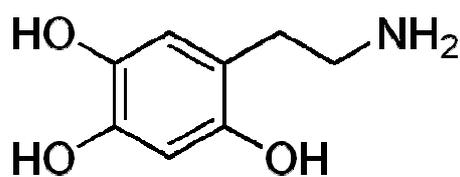


Abbildung 7: 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

Die RAP-PCR wird hauptsächlich zur Analyse der Reaktion von Tumorzellen auf verschiedene Stimuli benutzt (Ralph et al. 1993), ist aber auch geeignet, die mRNA-Expression in Zelllinien oder Geweben unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu vergleichen (Feuerstein und Wang 1997). Durch dieses Verfahren können wir das mRNA-Expressions-Profil gewinnen und so die Genexpression der Zellen in den verschiedenen Behandlungsabfolgen vergleichen (McClelland et al. 1995).

Das Ziel dieser Arbeit ist, neue Gene aufzuzeigen, die eine Rolle im Zelltod nach Exposition von 6-OHDA spielen und so weitere Ursachen und Mechanismen für den Untergang der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) nachzuweisen. Die Methode der RAP-PCR wurde für diese Arbeit ausgewählt, um im Gegensatz zur Anwendung von Microarrays noch unentdeckte und in diesem Zusammenhang noch nicht bedachte Veränderung der Genexpression zu analysieren. Zur Bestätigung der mittels der RAP-PCR aufgedeckten veränderten Genexpression wurden weiterführende RT-PCR- sowie Real-time PCR-Versuche durchgeführt.

Die dort bestätigten Ergebnisse wurden daraufhin mittels Western Blot-Analysen auch auf Proteinebene verifiziert.

Material und Methoden

Zellkultur

Die Experimente wurden mit humanen dopaminergen Neuroblastomzellen der Reihe SH-SY5Y durchgeführt. Die adhäsiv wachsenden Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA, Pasching, Österreich), zusammen mit 15% fetalem Kälberserum (FCS, PAA), 1mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg Streptomycin-Sulfat; alle Sigma, St. Louis, MO, USA) in Kulturflaschen in einem Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert.

Schädigung mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

Die Behandlung von 6-OHDA (Sigma) wurde in den jeweiligen Konzentrationen von 50µM bzw. 100µM über einen Zeitraum von 24 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Kulturen durchgeführt. Anschließend erfolgte die weitere Aufbereitung der Zellen zur RNA- oder Protein-Isolierung.

RNA-Isolierung

Zunächst wurden die Zellen nach einem Waschschrift mittels 1x PBS mit einem RLT-Puffer plus β-Mercaptoethanol (Sigma) lysiert. Die weitere Isolierung der RNA wurde nach Protokoll des Herstellers (RNeasy Kit; Qiagen, Heidelberg) durchgeführt.

Die Proben mit einem Gesamtvolumen von 350µl wurden dabei zuerst „geneedelt“, um die noch vorhandene DNA zu zerstören. Danach wurden sie in eine Säule (RNeasy Mini spin Columns, Qiagen) mit zusätzlich 350µl 70% Ethanol (Sigma) pipettiert und anschließend für 15 Sek. bei 10.000 RPM zentrifugiert, das Filtrat wurde anschließend verworfen. Im nächsten Schritt wurden 350µl RW-1 (Qiagen) auf die Säule gegeben und dann für 30 Sek. mit 10.000 RPM zentrifugiert; das Filtrat wurde wieder verworfen. Danach wurden die Proben mit 10µl DNase im RDD-Puffer (70µl, Qiagen) für 15 Min. behandelt. Der Schritt mit RW-1 wurde zwei Mal wiederholt und schließlich wurden die Proben in eine neue Säule mit 200µl RPE (Qiagen) und 800µl 100% Ethanol (Sigma) überführt und für 15 Sek. mit 10.000 RPM zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal

wiederholt. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 15.000 RPM. Zur Gewinnung der eigentlichen Gesamt-RNA wurde die Säule auf ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und mit 40µl RNase freiem Wasser (Qiagen) inkubiert und anschließend 10 Min. bei 10.000 RPM zentrifugiert.

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA wurde die Konzentration der RNA mittels optischer Dichte überprüft. Darüber hinaus wurde die Gesamt-RNA mittels einer Gelelektrophorese nachgewiesen. 2µg Gesamt-RNA wurden bei einer Temperatur von 70°C für 10 Min. denaturiert und dann auf ein 1%-Agarose/37%-Formaldehyd/TAE Gel mit SYBR-Gold (Invitrogen) aufgetragen.

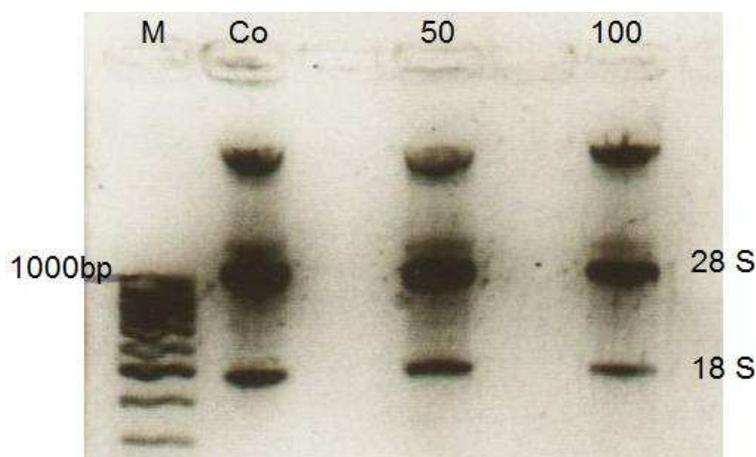


Abbildung 8: Gesamt-RNA auf 1%-Agarose/37%-Formaldehyd/TAE Gel mit SYBR-Gold, M=Marker, Co=Gesamt-RNA der Kontrollgruppe, 50=Gesamt-RNA aus den Zellen, die mit 50µM 6-OHDA behandelt wurden und 100=Gesamt-RNA aus den Zellen, die mit 100µM 6-OHDA behandelt wurden. 28 S und 18 S stehen für die entsprechenden Fraktionen der RNA.

RAP-PCR

Die Basis aller PCR-(Polymerasenkettenreaktion, englisch: Polymerase Chain Reaction) Verfahren ist die traditionelle PCR, eine Methode, mit der DNA *in vitro* vervielfältigt werden kann. Die PCR wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Dieser Teil wird durch das verwendete Primer-Paar definiert. Der Prozess besteht aus einer Anzahl von 25 bis 50 Zyklen, und jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung: Zunächst wird die doppelsträngige DNA erhitzt, um die Stränge voneinander zu trennen.

2. Primerhybridisierung (primer annealing): Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die benötigte Temperatur während dieser Phase hängt von verschiedenen Parametern der Primer (Länge, Häufigkeit der einzelnen DNA-Basen, etc.) ab.
3. Elongation (Polymerisation, Verlängerung): Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet (Mühlhardt 2003).

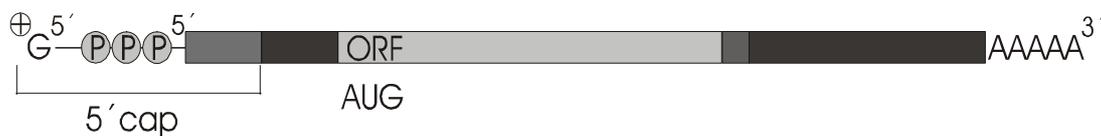


Abbildung 9: Schema der mRNA. An die 5'cap-Region, die aus einem 7-Methylguanosin-Rest, einem Triphosphat und einer ribosomalen Bindungsregion besteht, grenzt eine kurze nicht codierende Sequenz. Nach einer AUG-Sequenz folgt der "open reading frame" (ORF), der die codierende Sequenz für ein Protein enthält. Das Stoppcodon, eine weitere nicht codierende Sequenz und der mRNA typische Poly-A-Schwanz begrenzen den ORF zum 3'-Ende hin.

Die der RNA-AP-PCR zugrunde liegende Methode der „arbitrarily primed PCR“ wurde ursprünglich entwickelt, um, ähnlich wie bei Restriktionsfragmentlängen-polymorphismen (RFLP), in der Taxonomie, Phylogenie, bei Mutationsanalysen und in anderen Bereichen Verwendung zu finden (Welsh und al 1992), Die Weiterentwicklung dieses Verfahrens, die sogenannte RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR), dient dazu, die von den untersuchten Zellen exprimierte mRNA als repräsentativen Querschnitt zu erhalten, wobei der Vergleich mit Kontrollgruppen, in diesem Fall die nicht mit 6-OHDA behandelten Zellen, durchgeführt wird und so die Identifizierung zellspezifischer hoch- oder runterregulierter Gene ermöglicht.

Nur ein Teil der mRNA beinhaltet die für das Protein codierende Sequenz, den sogenannten „Open reading frame“ (ORF), die die Informationen zur Protein-biosynthese enthält. Der Zugriff auf diesen mRNA-Abschnitt erlaubt eine spezifische Beurteilung der mRNA Funktion. Die arbiträren Primer der RAP-PCR binden zumeist im ORF-Bereich.

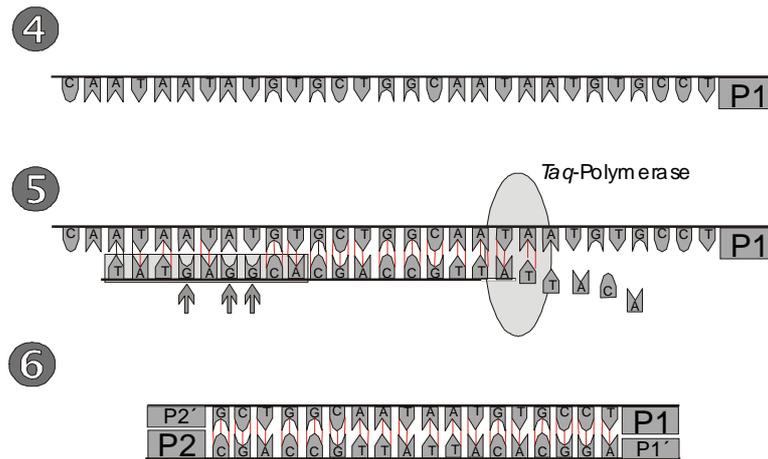


Abbildung 11: Schema der RAP-PCR Teil 2. Nach Denaturierung bindet sich an den cDNA-Teilstrang⁴ wiederum arbiträr ein Primer⁵. Mit der Taq-Polymerase wird der Primer spezifisch verlängert⁵. Nach Denaturierung und spezifischer Anlagerung der komplementären Primer (P1' / P2') erhält man ein cDNA-Fragment, dessen Enden durch die bekannten Primersequenzen flankiert werden⁶.

Das inaugurierte Verfahren der PCR ermöglicht in n Zyklen die Anfertigung eines theoretischen Maximums von 2^n Kopien eines mRNA-Fragmentes.

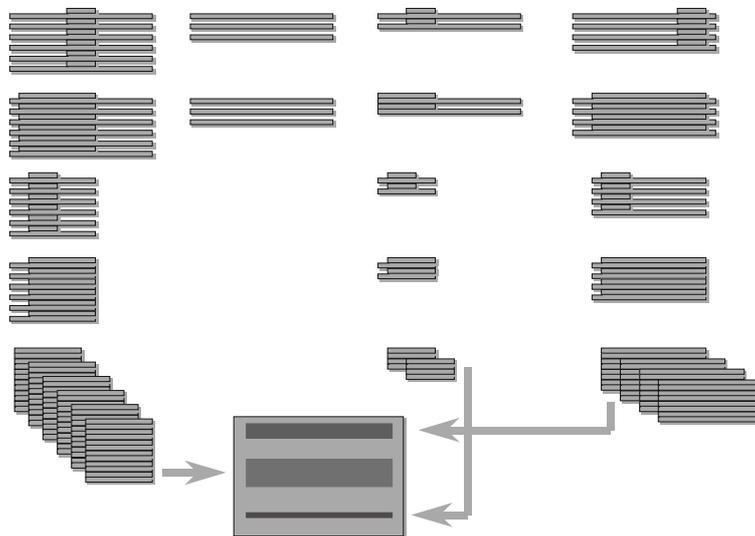


Abbildung 12: Schema der RAP-PCR. Vier verschiedene mRNA-Moleküle (obere Reihe) in unterschiedlichen Quantitäten werden untersucht. Arbiträr gepriert kommt es zur Anlagerung des Primers an die mRNA in den Spalten 1, 3 und 4. Der Primer hybridisiert nicht an die 2. mRNA. Im zweiten Schritt erfolgt die Verlängerung der Primer durch reverse Transkription. In den folgenden Schritten wird das an beiden Seiten von der bekannten Primersequenz flankierte Transkript erzeugt. Nach Vervielfältigung zeigen sich bereits deutliche Mengenunterschiede abhängig von der Ausgangsmenge. In der Gelelektrophorese spiegeln sich diese Unterschiede wieder.

Neben qualitativen sind auch quantitative Beurteilungen möglich, wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist (Tortola et al. 1998, Welsh et al. 1992). Von Bedeutung ist hier zum einen, dass die so erzeugten PCR-Produkte unter den gleichen Bedingungen wieder erzeugt werden können, der Fingerprint also reproduzierbar ist. Ein weiterhin entscheidender Vorteil der Methode ist die Tendenz zur bevorzugten Vervielfältigung seltener mRNAs (Mathieu-Daude et al. 1996, McClelland et al. 1995), was das Auffinden noch nicht erkannter Unterschiede ermöglicht.

Die RAP-PCR wurde, wie von Alfke et al. (1999) und Schlegel et al. (1996) beschrieben, durchgeführt. Zusammengefasst bedeutet das, dass der Erststrang mit 200ng und 250ng Gesamt-RNA synthetisiert wurde. Die Reagenzmischung mit einem Gesamtvolumen von 25µl bestand aus 3.75µM Primer, 0.0625mM dNTPs, 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT und 200U M-MLV reverse Transkriptase (Life Technologies GmbH, Eggerstein). Die Reaktion wurde über 2 Stunden bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt und anschließend für 2 Minuten auf 95°C erwärmt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Folgende Primer wurden benutzt:

1. ONP21: 5'-ACCAGGGGCA-3',
2. OPN24: 5'-AGGGGCACCA-3',
3. OPN25: 5'-GGGGCACCAG-3',
4. JUC1A: 5'-ACGAAGAAGAG-3'

Der Reaktionsansatz von 25µl-Volumen für die Synthese des Zweitstranges enthielt 3.75µM von jedem Primer, 0.065mM dNTPs, 0.75mM MgCl₂, 1x Taq- Reaktionspuffer, DMSO 5% sowie 2.5U Taq-Polymerase (Enzym und Puffer von Qiagen, Heidelberg). Die PCR lief nach dem folgenden Schema: 94°C-5 Min., 24°C-5 Min., 72° C-5 Min., 8x[94°C-1 Min., 38°C-1 Min., 72°C-2 Min.], 72°C-5 Min. Die Produkte wurden weiter in einer Lösung von 20µl mit 3.75µM Primer, 0.25mM dNTPs, 1x Taq-Reaktionspuffer, 1.875µM MgCl₂, DMSO 5%, 1U Taq-Polymerase und 10µM Zweitstrang amplifiziert.

Das Zyklusschema war:

94°C-2 Min., 31x [94°C-1 Min., 38°C-1 Min., 72°C-2 Min.], 72°C-5 Min.

Alle Schritte wurden in einem Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) ausgeführt.

Analyse der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden auf Polyacrylamid Gelen (5% Polyacrylamid:bis-acrylamid (19:1), 7M Harnstoff) separiert. Anschließend wurden die Gele, wie bei Schlegel et al. (1996) beschrieben, behandelt: für 5 Minuten wurden die Gele in einer 10% Ethanol-Lösung fixiert, dann für 3 Minuten in 1% Salpetersäure oxydiert, danach für 30 Minuten in einer 12mM Silbernitratlösung inkubiert und schließlich in einer Lösung von 0.28M Natriumkarbonat und 0.019% Formalin reduziert, bis die Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit 10% Eisessigsäure gestoppt (2 Min.). Zuletzt wurden die Gele auf Whatman-Papier getrocknet.

Die PCR-Produkte wurden, wie bei Alfke et al. (1999) beschrieben, isoliert. Zusammenfassend wurden die Fragmente durch „Kratzen“ mit einer sterilen 21- Gauge-Kanüle von getrockneten Gelen separiert. Die Kanülen wurden dann mit den entsprechenden Primern und Fragmenten in einen 1x PCR-Puffer getaucht und dann unter Standard-PCR-Bedingungen reamplifiziert. Die Reamplifizierung der jeweiligen Bande wurde mittels einer Elektrophorese auf einem Agarose-Gel (1% Agarose/TAE) bestätigt. Anschließend wurden die Fragmente in die EcoRV Stelle des pBluescript KS+ Plasmide subkloniert und sequenziert (MWG-Biotech, Ebersbach). Die Sequenzen wurden mit der Datenbank des GDB (NCBI, NLM, Bethesda, MD, USA) mittels des BLAST-Algorithmus verglichen.

RT-PCR

Um die unterschiedliche Expression der klonierten Fragmente zu bestätigen, haben wir anschließend eine semiquantitative RT-PCR mit der Gesamt-RNA der SH-SY5Y-Zellen durchgeführt.

Für die RT-PCR wurden die folgenden Primer benutzt (MWG-Biotech):

1. **TMEFF-1**: forward: 5'-AGGGGCAGAAGTTCACAGAA-3', reverse: 5'-AGGAACTCCCATCAGAAGCA-3'.
2. **CRMP-1**: forward: 5'-GGGTACCAGCTACACCCAAA -3', reverse: 5'-GGGCACCAGATAAGCTGAAG -3'.
3. **Tumor rejection antigen (gp 96)**: forward: 5'- ACATTCCCTCTCCACACAGG-3', reverse: 5'- TGGATGTGGGAACAGATGAA-3'.
4. **KIAA0185**: forward: 5'- GCATCGGCATAGCAGGTAAT-3', reverse: 5'-CCTGATGAAGAATCCGGAGA-3'.
5. **KIAA1724**: forward: 5'- CCTGACTGGGTTTGGATTGT-3', reverse: 5'-ATCCAGGCCATGATCAAAAA-3'.

6. **Neurexin-1**: forward: 5'-AGAGTGTCCCAGCGATGATGA-3', reverse: 5'-AGCCTGGATACGGCTCTCTG-3'.
7. **RBBP7**: forward: 5'- TACGGTCTTATCCGCAGAGC-3', reverse: 5'-CCGAGTCACTTGGTGGATG-3'.
8. **Nuclear phosphoprotein 32 (hyp. Protein MGC5350)**: forward: 5'-TCACTCTATTGCACACCCAGA-3', reverse: 5'- AGGGGAGAAGAGGAAACGAG-3'.
9. **Sim DIPB protein (LOC116020)**: forward: 5'- TAATCCCTCAATGGCTGCTT-3', reverse: 5'- AGGCAGGGAGAAAACCTCTGA-3'.
10. **AD-012 protein (LOC55833)**: forward: 5'- GGTTC AAGGCTGTTTGGGTA-3', reverse: 5'- GGGCACCATGACAGATGAC-3'.

Die reverse Transkription wurde wie folgt durchgeführt: 250ng mRNA, 0.03mM Random-hexamers (Roche Diagnostics, Mannheim), 0.0625mM dNTPs, 10mM DTT, 50mM Tris-HCL (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂ und 200U M-MLV reverse Transkriptase (Qiagen) in einem totalen Volumen von 20µl. Die folgende PCR, mit einer Reagenzmischung von 50µl Volumen, beinhaltete 0.3µM Primer, 0.2mM dNTPs, 1x PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 1U Taq-Polymerase und 2µl Erststrang.

Das PCR-Programm wurde nach dem Schema durchgeführt:

94°C-4 Min., 28x[94°C-1 Min., 50°C-1 Min., 72°C-1 M in.], 72°C-5 Min.

Alle Schritte wurden in einem Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt und die PCR-Produkte mit einer Elektrophorese auf einem Polyacrylamid-Gel analysiert.

Real-time PCR

In der Real-time PCR können PCR Amplikons früh und „live“ während der Reaktion nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Kinetik der Reaktion in den frühen Phasen hat man einen Vorteil gegenüber den traditionellen PCR Methoden, bei denen man nur am Ende die Amplikons nachweisen kann und die deswegen auch End-point PCR genannt werden.

Um zu verstehen, warum die traditionelle PCR bzw. End-point PCR begrenzt ist, muss man wissen, dass die PCR in 3 kinetische Phasen unterteilt ist:

1. Exponentiell: Hier sind die Konzentrationen aller PCR-Komponenten optimal. Die Amplikon-Konzentration in jedem Zyklus beträgt 2^n (n = Zyklus-zahl).
2. Linear: Es sind immer weniger Primer und Nukleotide vorhanden.
3. Plateau: Es kommt zu einem Stillstand.

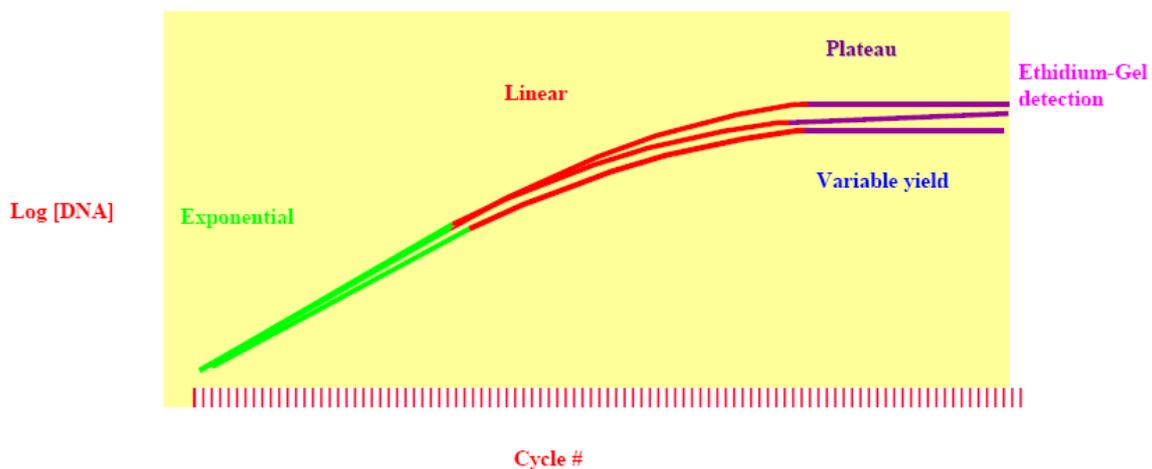


Abbildung 13: Die kinetischen Phasen der traditionellen PCR.

In der Real-time PCR werden die Konzentrationen der Amplikons in jedem Zyklus bestimmt, also auch in der exponentiellen Phase. Wenn wir die Konzentration in der exponentiellen Phase bestimmen, können wir auf die Konzentration der DNA am Anfang der Reaktion zurückschließen.

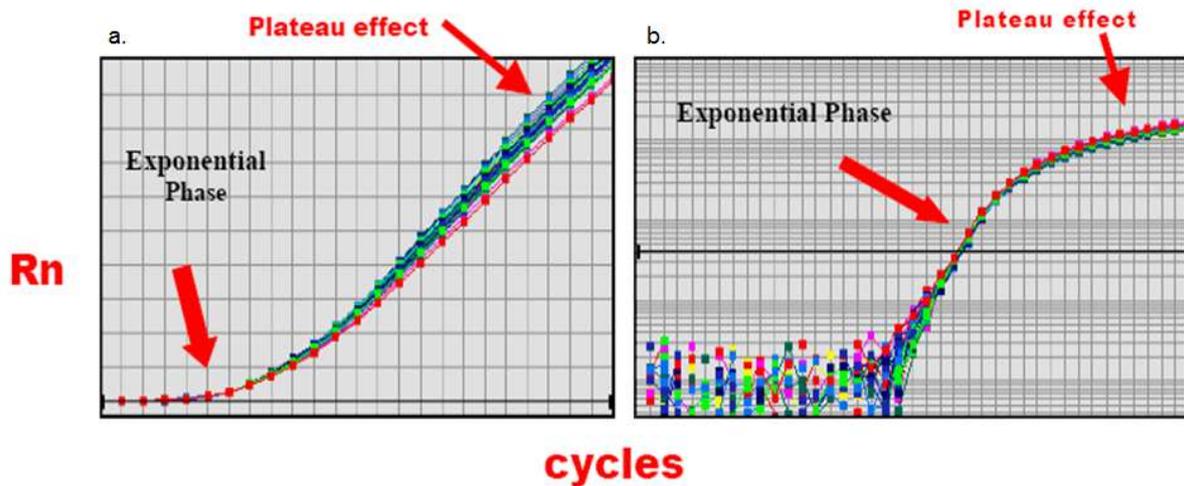


Abbildung 14: Diagramme mit linearer (a.) und logarithmischer Ordinate (b.) zeigen die gleiche PCR. Am Anfang war die DNA-Konzentration in allen Proben gleich. Es ist zu sehen, dass in der Plateau-Phase (die Phase, in der die Amplikons auf einem Gel analysiert werden) die Amplikons unterschiedliche Konzentrationen haben, die Linien im Diagramm (a.) gehen weit auseinander. In der exponentiellen Phase jedoch sind alle Amplikons in der gleichen Konzentration, die Linien sind in der exponentiellen Phase sehr nah beieinander. (Applied biosystems)

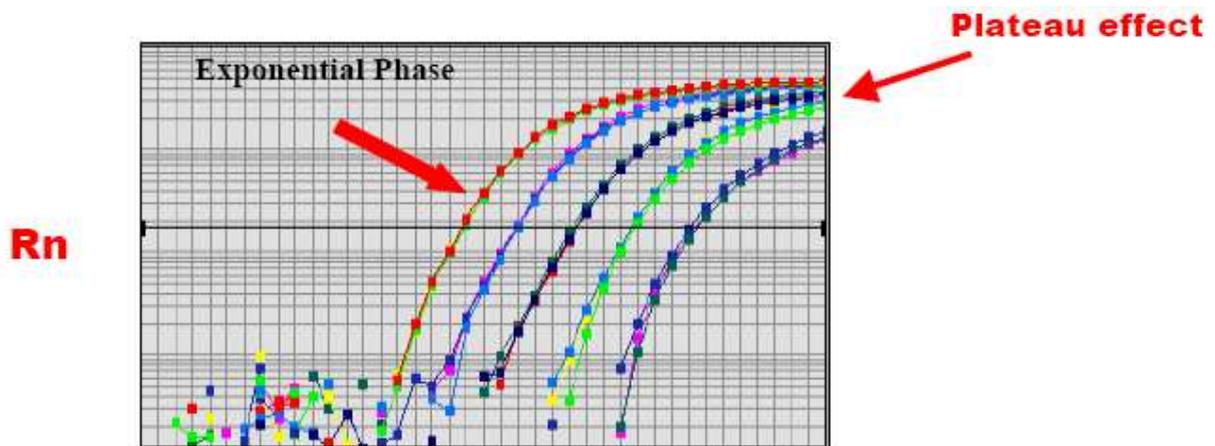


Abbildung 15: Hier waren am Anfang die DNA Mengen unterschiedlich. Zu sehen ist, dass in der Plateau-Phase die Unterschiede nicht deutlich sind, in der exponentiellen Phase unterscheiden sich die Konzentrationen um das Fünffache. (Applied biosystems)

In dieser Arbeit wollten wir die Unterschiede zwischen den mRNA-Konzentrationen bestimmter Gene in den Zellen, die mit 6-OHDA geschädigt wurden, im Vergleich zu den Konzentrationen in den Zellen der Kontrollgruppe aufzeigen. Dafür wird eine reverse Transkriptase benötigt, die im ersten Schritt die mRNA in DNA (cDNA) umschreibt (wie in der RT-PCR).

Es gibt verschiedene Methoden, die Konzentration der Amplikons im jeden Zyklus zu bestimmen. In unseren Versuchsansätzen haben wir die SYBR Green Farbstoff-Methode benutzt. Dieser Farbstoff bindet sich an die kleine Furche des DNA-Doppelstrangs. Durch diese Bindung strahlt er dann ein fluoreszierendes Licht aus, dessen Intensität proportional zu Amplikon-Konzentration ist. Man nimmt dann als Richtschnur die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt sog. Ct-Wert (steht für Threshold cycle), weil zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung noch exponentiell ist. Mit Hilfe der Ct-Werte kann man die relativen Unterschiede zwischen den mRNA-Konzentrationen am Anfang der PCR bestimmen (Mühlhardt 2003).

Tabelle 3: Die benutzen Primer in der Real-time PCR (MWG-Biotech):

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
1. Coatomer prot complex	5`- GATCCCCAGCAGGTGGT ACA-3`	5`- ATCTGTTCTTTGGCTGA CTGCA-3`
2. Hypothetical protein FLJ23033	5`- CCGTGCTTCCTCCTACAT GAG-3`	5`- TTTCAGTTGCCGCAAAG ACTC-3`
3. Topoisomerase (DNA) II alpha	5`- GGCTACATGGTGGCAAG GAT-3`	5`- CAGGCTCAACACGCTG GTT-3`
4. Neurexin 1 (NRXN1)	5`- AGAGTGTCCCAGCGATG ATGA-3`	5`- AGCCTGGATACGGCTCT CTG-3`
5. HSPC035 Protein	5`- CCCACCGTTACCAGAGAT TCA-3`	5`- AGAAGTTGCACCATGGC CAG-3`
6. KIAA1724 Protein	5`- GTGCCTGACTGGGTTTG GA-3`	5`- TTGGTTCTGCGAGCTTG CT-3`
7. Retinoblastoma-binding protein 7 (RBBP7)	5`- GCTGTTGTAGAGGATGTG GCC-3`	5`- AGTGACTIONGGCTTGGAG GTG-3`
8. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	5`- ACCCACCAATGGAAGCA GC-3`	5`- CGTGTGGCAATCCAATA CAGG-3`
9. Collapsin response mediator protein 1 (CRMP1)	5`- CCAAATATGCAACTCCCG CT-3`	5`- TTGTTGTCATCTATCTG GGCACC-3`
10. Hypothetical protein MGC5350 /leucin rich /phosphoprotein 32	5`- AACTAAGTTCGCTGGCCC G-3`	5`- AGGACTTCCAAGCCTCC AGAA-3`
11. CDC 42	5`- CTGGCCCGTGACCTGAA G-3`	5`- TCCAGGGCAGCCAATAT TG-3`
12. Sim. RAB35	5`- TGGCTTCACGAAATCAAC CA-3`	5`- GCATCTTCCGTCTCCAC CAC-3`
13. Hom. Drebrin 1 (DBN1)	5`- GAGCAGTCTATCTTTGGT GACCATC-3`	5`- ACTCCCTTGGGTTGTCA GGC-3`
14. Phosphoribosyl- aminoimidazole Synthetase (GART)	5`- TGCACGAGCTGAAGGTT CC-3`	5`- AAATGATTTGTCAGGGA GCCA-3`
15. Tumor rejection antigen (gp96) 1 (TRA1)	5`- CAGACGACTTCCATGATA TGATGC-3`	5`- CTGAAGAGTCTCGCGG GAAA-3`
16. Cip1-interacting zinc finger protein (CIZ1)	5`- AGCACGTGAAGTCCCAG GG-3`	5`- CCCTCGAAGCAACCCAC A-3`
17. (TMEFF1) = TM prot with EGF-like and 2 follistatin- like domains 1	5`- GCATCTTGGTCATTGCAC AGA-3`	5`- ATTGAGGTTTTCAGGGC AAGG-3`

18. PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor(GEF)1 (PDZ-GEF1)	5`- TGCAGCCCAAGTCTCAAG C-3`	5`- CAGGATAAGCCTTGCCC CA-3`
19. Atypical PKC isotype-specific interacting protein; PAR3 (partitioning defective hom.)	5`- CAGAAATGCTGCCCTCAG TAGG-3`	5`- GAGATGTGGAGGAAGC ACTGG-3`
20. Edg-2=maternal transcript G10 homolog	5`- ATTCAGACACGGGACAC CAAC-3`	5`- GTGTGCACTCGATGATG CG-3`

Hier wurden nur die Unterschiede zwischen den untersuchten Genen und einem Gen, dessen Konzentrationen sich nicht ändern, berechnet. Dieses sogenannte „House keeping gene“ war diesem Falle das Gen für das GAPDH-Protein (Prime et al. 2000).

Die Real-time PCR wurde mit den identischen Templates wie in der oben beschriebenen RT-PCR durchgeführt.

Die Reagenzmischung enthielt: 6.25µl SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen, Karlsruhe), 0.375µl forward- und reverse-Primer (10pmol/ml), 3.0µl DEPC-H₂O und 12.5µl Templatevolumen. Für jedes Gen wurde eine Duplikatreaktion durchgeführt.

Die Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

10 Min. Präinkubation bei 95°C und danach 50 Zyklen [94°C-20 Sek., 59°C-30 Sek., 72°C-40 Sek.].

Das Fluoreszenzsignal des SYBR Green wurde in jedem Zyklus gemessen. Alle Schritte der Real-time PCR wurden im ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Als Maßnahme zur Qualitätssicherung wurde in jedem Anlauf auch eine negative Reagenzkontrolle (non template control), mit Wasser statt DNA, durchgeführt.

Die Quantifizierung der Erststrang-Menge wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta Ct$ -Methode bestimmt (Fink et al. 1998), in dieser Methode errechnet man den relativen Unterschied zwischen Konzentrationen mittels der Gleichung $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Die Zahl der Erststrangkopien eines Gens in einer Zellkultur wurde erst auf die Menge der Erststrangkopien von GAPDH in derselben Zellkultur normalisiert:

$$\Delta Ct(\text{Gen X}) = Ct(\text{Gen X}) - Ct(\text{GAPDH})$$

$\Delta Ct(Gen X)$: Der ΔCt -Wert eines Genes in einer Zellkultur. $Ct(Gen X)$: In der Real-time PCR bestimmte Ct-Wert eines Genes. $Ct(GAPDH)$: In der Real-time PCR bestimmte Ct-Wert von GAPDH als endogene Kontrolle.

Die Unterschiede zwischen den gleichen Genen in den behandelten und unbehandelten Zellen betragen:

$$\Delta\Delta Ct(Gen X) = \Delta Ct (Gen X[Co;50;100]) - \Delta Ct (Gen X[Co])$$

$\Delta Ct (Gen X[Co;50;100])$: der berechnete ΔCt -Wert eines Genes in den Zellkulturen, die entweder mit 50 μ M, 100 μ M 6-OHDA behandelt wurden oder unbehandelt blieben. $\Delta Ct (Gen X [Co])$: Der ΔCt -Wert eines Genes in der Kontroll-Zellkultur.

$$\text{Der relative Unterschied (RU)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

In der Kontrollgruppe beträgt $\Delta\Delta Ct$ also 0 und somit ist der relative Unterschied (RU) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ stets 1. Bei den Genen in den behandelten Zellkulturen ist der relative Unterschied größer als 1 bei einer Hochregulierung, kleiner als 1 bei einer Herunterregulierung und 1 wenn die Expression gleich bleibt.

Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werten in der Kontrolle (Co) und den behandelten Zellen (50,100) gibt. D.h. es findet keine Regulierung der Genexpression in den behandelten Zellen statt. Die Alternativ-hypothese (H_1) besagt, dass es doch einen Unterschied zwischen den Proben gibt. D.h. eine Regulierung der Genexpression in den behandelten Zellen findet statt.

Die Real-time PCR-Analyse mit verschiedenen Zellkulturen mehrfach wiederholt (die Wiederholungen sind bei den jeweiligen Versuchsergebnissen aufgeführt). Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen t -test für gepaarte Proben ermittelt (Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation). Bei einem p -Wert kleiner als 0.05 ($p < 0.05$) wird die Nullhypothese verworfen und der Unterschied wurde als statistisch signifikant angenommen. Bei einem p -Wert kleiner als 0.001 ($p < 0.001$) wurde der Unterschied als hochsignifikant angenommen.

Western Blot

Western Blot, auch Immunoblot benannt, bezeichnet die Übertragung (engl. *Blotting*) von Proteinen auf eine Trägermembran, die anschließend mit unterschiedlichen Reaktionen entwickelt werden kann. Vor dem eigentlichen Western-Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix entsprechend ihrer Größe, Ladung bzw. weiterer Eigenschaften aufgetrennt. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine zuerst mit einem Gel in Proteinbanden aufgetrennt.

Beim Western-Blot wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten - die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich (z.B. Antikörper-Bindung). Nach diesem Vorgang kann das an den Proteinen angelagerte SDS (Sodium dodecyl sulfate) ausgewaschen werden. Die Proteine können renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur.

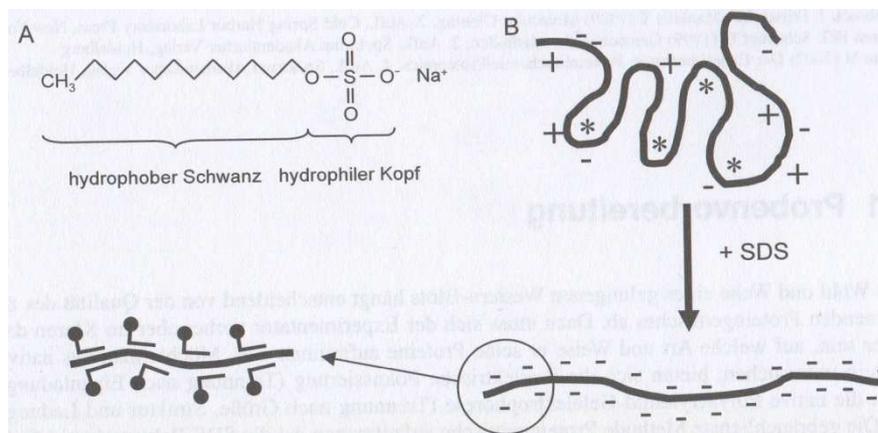


Abbildung 16: Wirkung des von SDS (Sodium dodecyl sulfate) auf Proteine. A: Strukturformel von SDS. Das Molekül lässt sich in einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich unterteilen. B: Die formgebenden hydrophoben Bereiche (*) innerhalb des Proteins werden aufgelöst, sodass dieses nur noch in gestreckter linearer Form vorliegt. Das stark negativ geladene SDS überdeckt zudem die Eigenladung der Proteine (Luttmann et al. 2004)

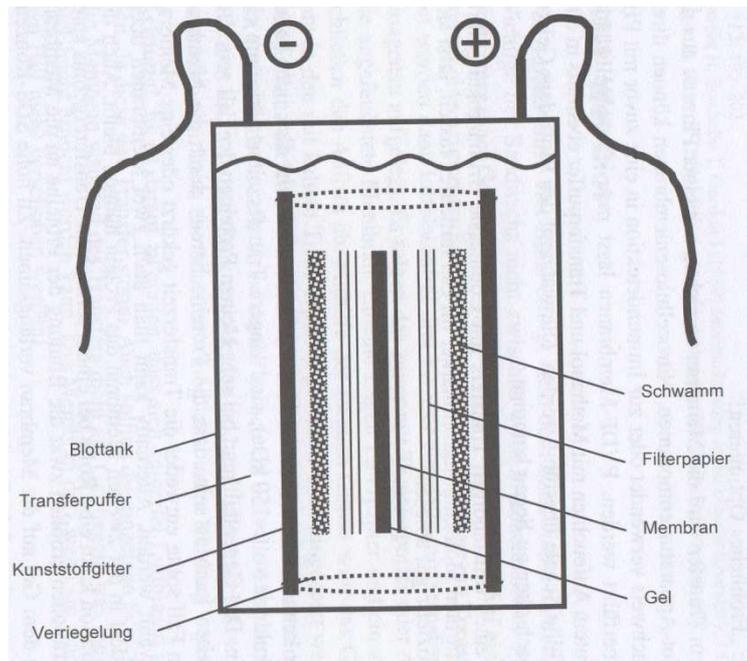


Abbildung 17: Blotting-Verfahren: schematische Darstellung für den elektrophoretischen Proteintransfer der Proteinbanden vom Gel auf die Membran (Luttmann et al. 2004).

Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Spezifische Antikörper (monoklonal oder polyklonal) binden sich an die passenden Proteinbanden auf der Membran. Unspezifisch gebundene Antikörper werden aufgrund von Waschschrritten mit Puffern, die Detergentien enthalten, wieder entfernt.

Dabei macht man sich das Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip zunutze: Ein antigenspezifischer Primärantikörper bindet an „sein“ Epitop auf dem Antigen (hier: einer aufgetrennten Proteinmischung). An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet sich wiederum ein sekundärer Markierungsantikörper, über den dann die Detektion erfolgt (Luttmann et al. 2004).

Aufbereitung der Proteinproben:

Zur Isolierung der intrazellulären Proteine wurde das Kulturmedium vorsichtig von den Zellen (SH-SY5Y) entfernt und die Zellen einmal in 1x PBS gewaschen. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 100-500µl M-PER (Pierce, Perbio, Bonn) je nach Größe der Kulturschalen und anschließender Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur unter Schütteln. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 Min. bei 13.000 RPM und 4°C) in einer Biofuge 17 RS (Heraeus), um die Zelltrümmer zu entfernen. Die Überstände konnten dann zur weiteren Analyse eingesetzt werden.

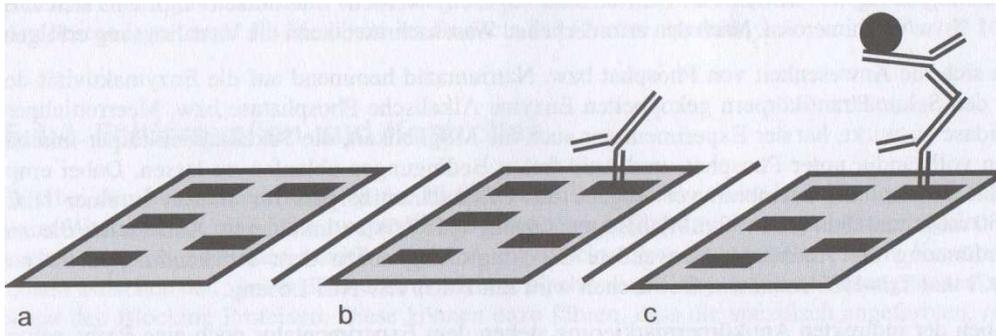


Abbildung 18: Nachweis von Proteinen mit Hilfe der indirekten Antikörper-Markierung. a: Die Proteinbanden auf der Membran, b: der spezifische Antikörper bindet an das Protein, c: der Sekundärantikörper bindet an Fc-Teil des Primärantikörpers (Luttmann et al. 2004).

Bestimmung der Proteinkonzentration:

Zur Messung von Proteinkonzentrationen wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die verwendeten Proteinproben wurden hierfür 1:10 verdünnt. Als Standard diente BSA (Pierce) verdünnt in M-PER (Pierce). Nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion entsteht nach Zugabe der im Kit enthaltenen Reaktionslösungen zu den Proteinproben ein violettes Produkt, das eine hohe Absorption bei 570nm aufweist. Durch eine photometrische Messung bei 570nm kann so die Proteinkonzentration im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe des Albuminstandards bestimmt werden. Hierzu wurde ein Mikroplatten-Photometer (MR7000; Dynatech, Denkendorf) mit geräteinternem Auswertungsprogramm (Advanced Programm, Version 3.1) verwendet.

Elektrophoretische Auftrennung der Proteine:

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde das NuPAGE Electrophoresis System (Novex, Frankfurt) mit den dazu gehörigen Puffern verwendet. Die Proteinproben wurden so eingestellt, dass einheitliche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen werden konnten (hier 20µg Gesamtprotein pro Spur je nach Menge der lysierten Zellen). Die Proben wurden mit 4x Probenpuffer (Novex) und 10x Reducing Agent (Novex) versetzt und für 10 Min. auf 70°C erhitzt. Das im Probenpuffer enthaltene SDS denaturierte bei Erwärmung die Proteine und neutralisierte ihre Eigenladung, so dass die elektrophoretische Auftrennung nur nach der Proteingröße und nicht nach der Ladung oder der Tertiärstruktur des Proteins

erfolgte. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel umgekehrt proportional zu ihrer molekularen Masse. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit Bis-Tris-Gradientengelen (4-12%ige Bis-Tris-Gele; Novex) durchgeführt, die eine gute Auflösung sowohl für kleine als auch für große Proteine ermöglichen. Der Gellauf erfolgte in Novex-Gelkammern mit 1x MES-SDS-Laufpuffer (Novex) bei konstant 200V in 35 Min..

Blotting:

Der Transfer der Proteine auf eine Optitran BA-S83 Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Berlin) erfolgte in Blot-Modulen der Firma Novex nach Angaben des Herstellers. Die relative Position der aufgetrennten Proteine blieb dabei erhalten (Schagger und von Jagow 1987). Das Blotting auf die Membran erfolgte bei 18V für eine Stunde. Anschließend wurden durch Trocknen der Membran die Proteine fest gebunden.

Antikörperinkubation:

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran mit den gebundenen Proteinen über Nacht bei 4°C in 1xRoti-Block (Carl Roth, Karlsruhe) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 Min. unter Schwenken in Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran viermal für 5 Min. in Waschpuffer gewaschen. Es folgte für eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Zweitantikörper und wiederum viermaliges Waschen für je 5 Min.

Detektion der gebundenen Antikörper:

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde das SuperSignal ULTRA Chemoluminescent Substrate (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Substrat Luminol wird durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase umgesetzt und zur Lichtemission angeregt. Nach Inkubation der Membran für 5 Min. in der Substratlösung wurde die feuchte Membran in Plastik eingeschweißt und anschließend einem autoradiografischen Film ausgesetzt (Mat Plus DG Film, Kodak, Frankreich). Zur Entwicklung des Films wurden Fotochemikalien (Entwickler G 152, Fixierer G 354) der Agfa-Gaefert AG benutzt.

Ladekontrolle für Western Blots:

Um sicherzustellen, dass auf allen Spuren die gleiche Menge an Gesamtprotein vorhanden ist (interne Ladekontrolle), wurde die Membran vor der Inkubation in Blockierungspuffer nach dem MEM Code[®] (Perbio) Protokoll behandelt. Dabei färben sich die Protein-Banden unspezifisch an. Anschließend wurde die überschüssige Färbelösung mit Aqua dest. entfernt und die Membran fotografiert. Der Färbevorgang ist reversibel und stört die spätere Antikörperbindung nicht.

Folgende Primärantikörper wurden für die Western-Blot-Analyse benutzt:

1. Monoklonaler anti-humanen TMEFF-1/Tumoregulin-1 Antikörper (1:2000; R&D Systems, Japan).
2. Anti-humanen-anti-CRMP-1 Maus-Aszites, IgMk (1:1000; Upstate, Lake Placid, NY, USA).
3. Anti-humanen-anti-Neurexin-1 polyklonaler Mausantikörper (1:2000; Abnova, Heidelberg).
4. Anti-human-anti-GART monoklonaler Mausantikörper (1:2000; Abnova).
5. Anti-GAPDH-Antikörper (1:2500; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA).

Folgender Zweitantikörper wurde benutzt:

1. HRP-konjugierten Zweitantikörper (Goat-anti-mouse, 1:500,000; Perbio, Bonn)

Die Quantifizierung der Banden erfolgte mittels Scion Image Software (Scion Corporation), dabei wurde jeweils eine Bande der intern semiquantitativen Ladekontrolle (GAPDH) als 100% gesetzt und der Hintergrund substrahiert. Insgesamt wurde die Western Blot Analyse 3-malig semiquantitativ durchgeführt.

Die Nullhypothese (H_0) besagt, dass die Banden eines Proteins in den 3 Gruppen (Kontrollgruppe ohne 6-OHDA und mit 50 μ M oder 100 μ M 6-OHDA behandelten Zellen) die gleiche Dichte haben. Die Alternativ-Hypothese (H_1) besagt, dass die Banden unterschiedlich dicht sind. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen t -test für gepaarte Proben ermittelt (Microsoft Office Excel 2007). Bei einem p -Wert kleiner als 0.05 ($p < 0.05$)

wurde die Nullhypothese verworfen und der Unterschied als statistisch signifikant angenommen. Bei einem p -Wert kleiner als 0.001 ($p < 0.001$) wurde der Unterschied als hochsignifikant angenommen.

Ergebnisse

Nachweis in der RAP-PCR

In der RAP-PCR sind reproduzierbare genetische Fingerabdrücke mittels vier verschiedener Primer und Primer-Kombinationen erzeugt worden. Typische „Fingerabdrücke“ werden in Abbildung 19 gezeigt. Insgesamt sind 136 Banden entdeckt worden, die eine zur Kontrolle unterschiedliche Expression zeigten, je nachdem ob die Zellkultur mit 50µM bzw. 100µM 6-OHDA über 24h behandelt worden war. Anschließend wurden die unterschiedlich exprimierten Produkte der RAP-PCR reamplifiziert und die daraus resultierenden Fragmente kloniert und sequestriert. In 62 Klonen wurde eine Sequenz gefunden, jedoch hatten nur 23 davon eine relevante Homologie zu bekannten humanen kodierenden Sequenzen.

Ergebnisse der RT- und Real-time PCR

Um die Ergebnisse der RAP-PCR zu verifizieren, wurde die Expression dieser Gene weiter mittels RT-PCR (Abbildung 20) und Real-time PCR mit spezifischen Primern untersucht. Insgesamt wurden in der Real-time PCR 20 unterschiedliche Gene untersucht. In 12 Fällen wurde eine statistisch signifikante Regulierung in den Zellen, die mit 50µM 6-OHDA behandelt worden waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, festgestellt: TMEFF-1 [RU=0,458; $p=0,002$], CRMP-1 [RU=0,408; $p<0,001$], Neurexin-1 [RU=0,321; $p<0,001$], GART [RU=0,603; $p<0,001$], Coatamer complex [RU=0,723; $p=0,003$], Topoisomerase II [RU=0,440; $p=0,002$], Retinoblastoma-binding protein [RU=0,627; $p=0,005$], eTEF1α1 [RU=0,625; $p=0,005$], nuc. Phosphoprotein 32 [RU=0,612; $p=0,03$], Drebrin 1 [RU=0,650; $p=0,02$], CIZ 1 [RU=0,460; $p=0,001$] und PAR 3 [RU=0,473; $p<0,001$].

In den Zellen, die mit 100µM 6-OHDA behandelt worden waren, wurden 14 solche Veränderungen nachgewiesen: TMEFF-1 [RU=0,451; $p<0,001$], CRMP-1 [RU=0,423; $p=0,003$], Neurexin-1 [RU=0,406; $p<0,001$], GART [RU=0,540; $p<0,001$], Coatamer complex [RU=0,715; $p=0,01$], Topoisomerase II [RU=0,272; $p<0,001$], Retinoblastoma-binding protein [RU=0,481; $p=0,007$], eTEF1α1 [RU=0,497; $p<0,001$], nuc. Phosphoprotein 32 [RU=0,703; $p<0,05$], Drebrin 1 [RU=0,673; $p<0,001$], CIZ 1 [RU=0,655; $p<0,018$], PAR 3 [RU=0,493; $p<0,001$], Tumor rejection antigen [RU=1,396; $p=0,002$] und CDC 42 [RU=0,656; $p=0,011$].

Wie im Statistikteil oben bereits erwähnt ist, haben wir für die Auswertung der Real-time PCR die $\Delta\Delta C_t$ -Methode benutzt und dann den relativen Unterschied (RU) zwischen den verschiedenen Zellreihen berechnet. Bei einer Hochregulierung ist der relative Unterschied (RU) größer als 1 und bei einer Runterregulierung kleiner als 1. Wenn der relative Unterschied gleich 1 ist, ist eine Regulierung unwahrscheinlich (Tabelle 4).

Nachweis auf Proteinebene

Von den 12 bzw. 14 regulierten Genen in der Real-time PCR haben wir uns entschieden vier (TMEFF-1, CRMP-1, Neurexin-1 und GART) Genprodukte auch auf Proteinebene zu untersuchen, um eine funktionelle Regulierung nachzuweisen.

Die Auswahl der vier aufgeführten Proteine erfolgte aufgrund der ausgeprägten Veränderungen dieser Genprodukte in dem von uns durchgeführten oxidativen Schädigungsmodell, sodass dadurch möglicherweise neue Aspekte der zellulären Ereignisse aufgezeigt werden können. Ein Teil dieser Gene und Genprodukte wurden bereits in der neuronalen Entwicklung beschrieben (z.B. CRMP-1, welches ubiquitär im ZNS exprimiert wird und die Dynamik der Neurite und Wachstumszapfen reguliert), allerdings hat ein anderer Teil dieser Gene eine noch weitgehend unbekannt Funktion (wie z.B. TMEFF-1).

Dazu haben wir den 6-OHDA Schädigungsversuch erneut für 24 Stunden durchgeführt, anschließend die Proteine isoliert und mittels Western Blot untersucht. Die Proteine wurden mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern detektiert. Als endogene Kontrolle diente das „Housekeeping Protein“ GAPDH.

In allen vier Fällen wurde eine Runterregulierung auch auf Proteinebene festgestellt (Abbildung 22). Die Quantifizierung der Blots ist in Tabelle 5 aufgeführt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen in den RT-PCR- und Real-time PCR-Verfahren überein und belegen, dass die Regulation nicht nur auf der Transkriptionsebene, sondern auch auf der korrespondierenden Proteinebene stattfand.

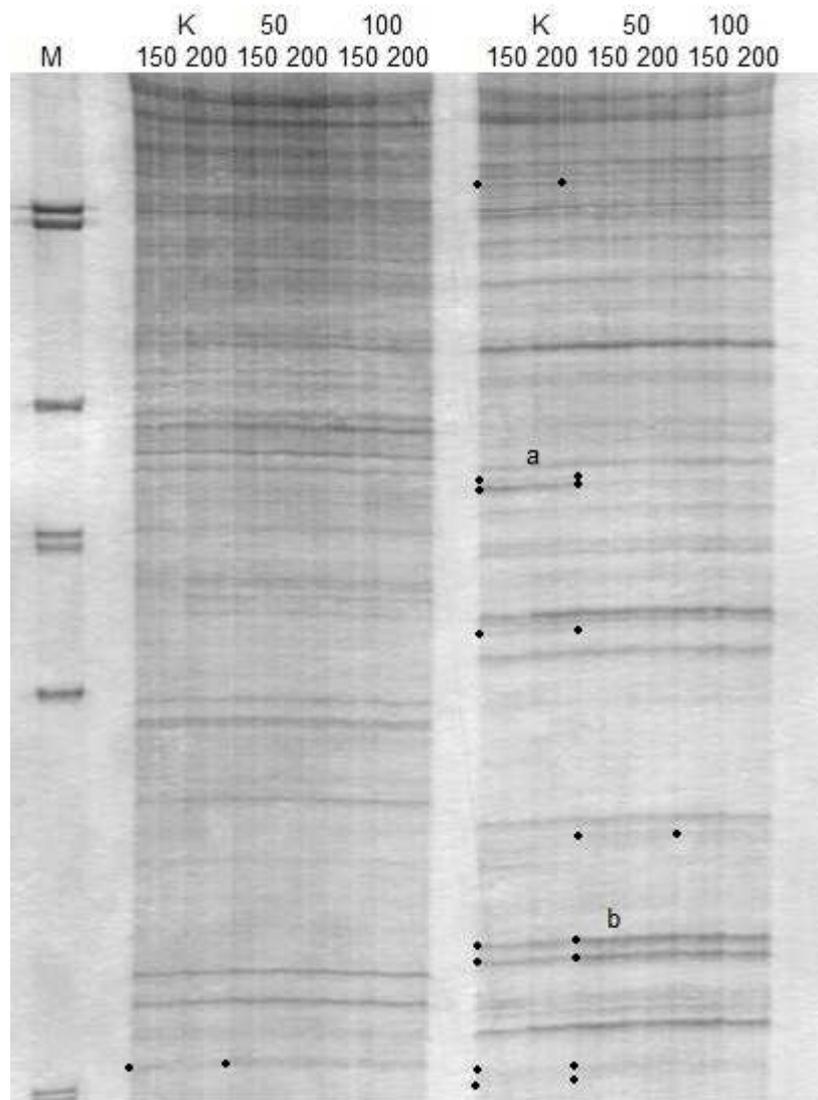


Abbildung 19: RNA „Fingerabdrücke“ der SH-SY5Y Zellen, die mit 6-Hydroxydopamin behandelt wurden. „50“ mit 50µM, „100“ mit 100µM im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe („K“). RAP-PCR wurde mit 150ng („150“) und 200ng („200“) Gesamt-RNA durchgeführt (siehe Text). In (a) ist z.B. ein Fragment nur in der Kontrollgruppe nachweisbar, jedoch nicht in den mit 6-OHDA behandelten Zellen. Dies zeigt eine Herunterregulierung an. Im Vergleich dazu ist bei (b) eine Hochregulierung nach 6-OHDA Behandlung zu sehen.

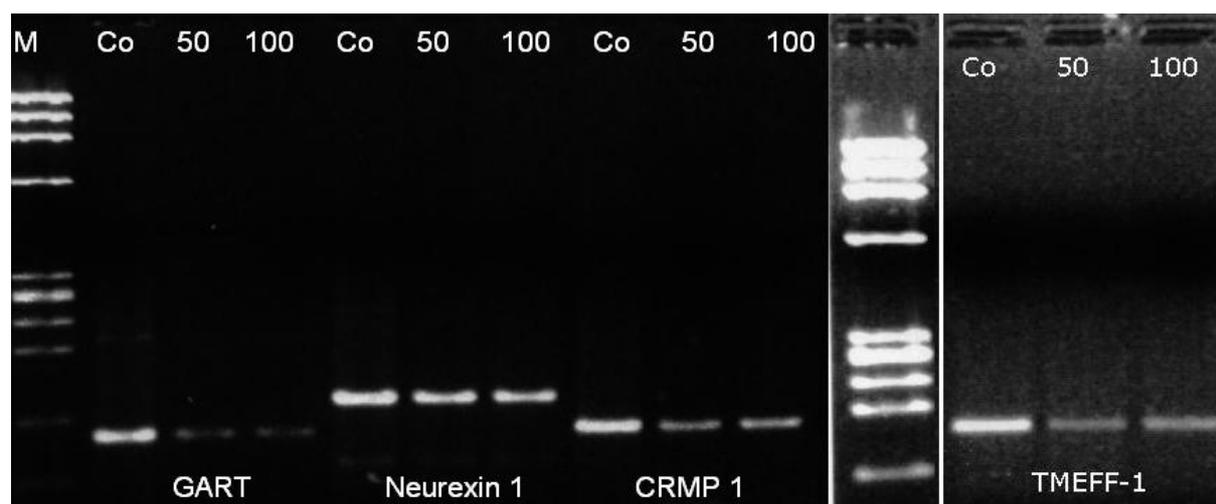


Abbildung 20: RT-PCR: Mit spezifischen Primerpaaren für GART, Neurexin-1, CRMP-1 und TMEFF-1 Gene. Gesamt-RNA von unbehandelten Zellen (Kontrollgruppe ohne 6-OHDA) („Co“), von Zellen, die mit 50μM 6-OHDA behandelt waren („50“) und von Zellen, die mit 100μM 6-OHDA behandelt wurden („100“). Eine Herunterregulierung konnte in allen vier Genen in behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Real-time-PCR. Der relative Unterschied wurde mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet (siehe Text), ein Wert kleiner als 1 bedeutet, dass das Gen runterreguliert wurde und ein Wert größer als 1 bedeutet, dass das Gen hochreguliert wurde. Der p-Wert wurde in einem t -Test für gepaarte Proben ermittelt.

1. Coatomer prot complex

	50 μ M zur Kontrolle	100 μ M zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,723	0,715
Standard Abweichung	0143	0,191
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,003	0,010

2. Hypothetical protein FLJ23033

	50 μ M zur Kontrolle	100 μ M zur Kontrolle
Relativer Unterschied	2,796	1,854
Standard Abweichung	2,069	0,929
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,088	0,074

3. Topoisomerase (DNA) II alpha

	50 μ M zur Kontrolle	100 μ M zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,440	0,272
Standard Abweichung	0,273	0,270
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,002	<0,001

4. Neurexin 1 (NRXN1)

	50 μ M zur Kontrolle	100 μ M zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,321	0,406
Standard Abweichung	0,233	0,255
Wiederholungen	5	5
p-Wert	<0,001	<0,001

5. HSPC035 protein

	50 μ M zur Kontrolle	100 μ M zur Kontrolle
Relativer Unterschied	1,083	0,925
Standard Abweichung	0,393	0,380
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,650	0,672

6. KIAA1724 Protein

	50 μ M zur Kontrolle	100 μ M zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,784	0,842
Standard Abweichung	0,432	0,553
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,296	0,540

7. Retinoblastoma-binding protein 7 (RBBP7)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,627	0,481
Standard Abweichung	0,213	0,323
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,005	0,007

8. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,625	0,497
Standard Abweichung	0,221	0,221
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,005	<0,001

9. Collapsin response mediator protein 1 (CRMP1)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,408	0,423
Standard Abweichung	0,087	0,152
Wiederholungen	3	3
p-Wert	<0,001	<0,001

10. Hypothetical protein MGC5350/Leucin rich /Phosphoprotein32

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,612	0,703
Standard Abweichung	0,326	0,284
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,029	0,048

11. CDC 42

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,805	0,656
Standard Abweichung	0,319	0,189
Wiederholungen	4	4
p-Wert	0,268	0,011

12. Sim. RAB35

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	1,257	1,187
Standard Abweichung	0,578	0,683
Wiederholungen	4	4
p-Wert	0,409	0,603

13. Hom. Drebrin 1 (DBN1)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,650	0,673
Standard Abweichung	0,256	0,119
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,016	<0,001

14. Phosphoribosylaminoimidazole Synthetase (GART)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,603	0,540
Standard Abweichung	0,124	0,141
Wiederholungen	5	5
p-Wert	<0,001	<0,001

15. Tumor rejection antigen (gp96) 1 (TRA1)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	1,980	1,396
Standard Abweichung	1,399	0,195
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,156	0,002

16. Cip1-interacting zinc finger protein (CIZ1)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,460	0,655
Standard Abweichung	0,246	0,259
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,001	0,018

17. (TMEFF1) = TM prot with EGF-like and 2 follistatin-like domains 1

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,458	0,451
Standard Abweichung	0,268	0,205
Wiederholungen	5	5
p-Wert	0,002	<0,001

18. PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1 (PDZ-GEF1)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,706	0,451
Standard Abweichung	0,348	0,321
Wiederholungen	4	4
p-Wert	0,142	0,242

19. Atypical PKC isotype-specific interacting protein; PAR3 (partitioning defective hom.)

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,474	0,493
Standard Abweichung	0,218	9,128
Wiederholungen	5	5
p-Wert	<0,001	<0,001

20. Edg-2=maternal transcript G10 homolog

	50µM zur Kontrolle	100µM zur Kontrolle
Relativer Unterschied	0,842	0,878
Standard Abweichung	0,260	0,335
Wiederholungen	4	4
p-Wert	0,268	0,492

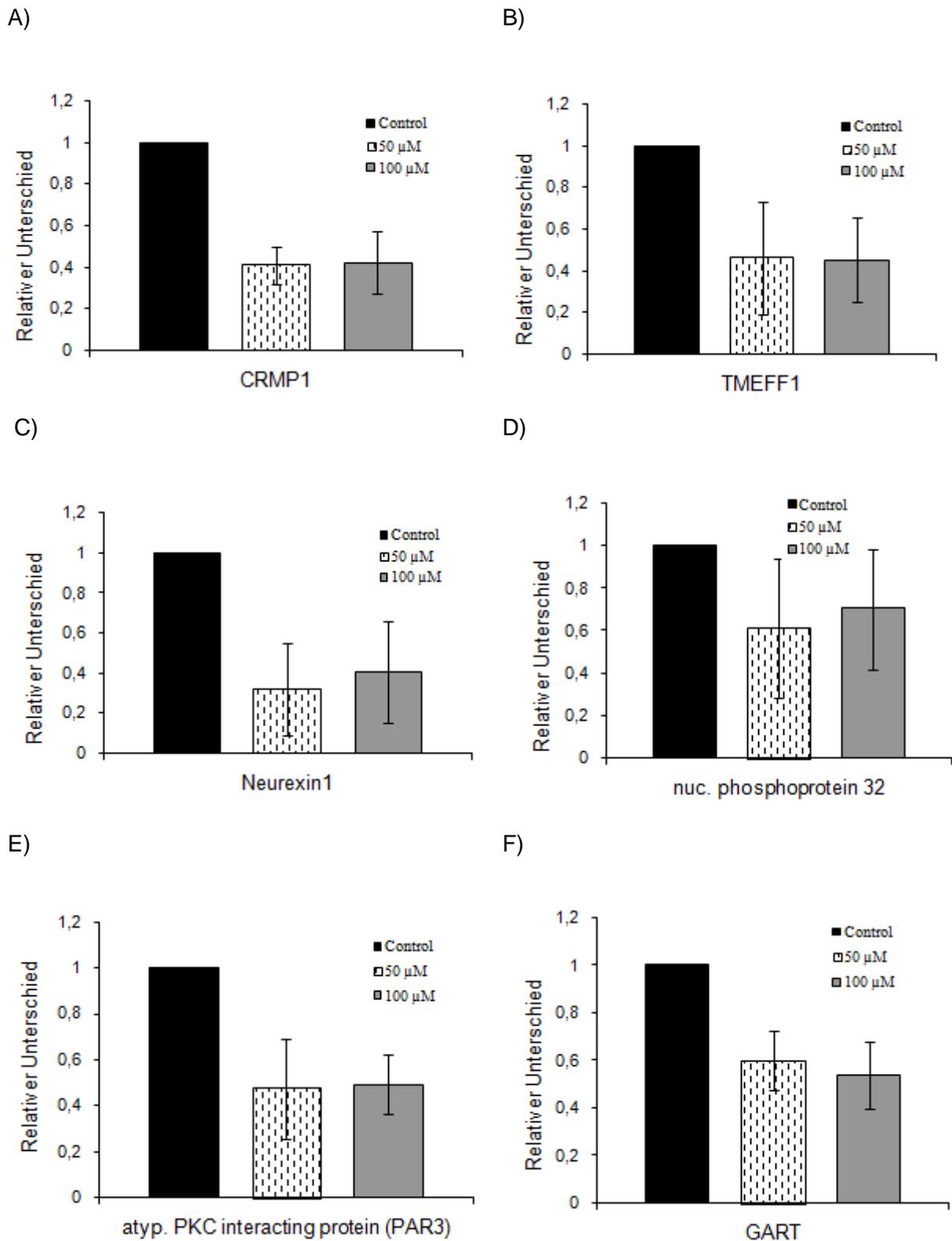


Abbildung 21: Eine graphische Darstellung ausgewählter Real-time PCR-Ergebnisse: Genexpression von CRMP-1 (A), TMEFF-1 (B), Neurexin-1 (C), Nuclear phosphoprotein 32 (D), atypical PKC binding protein (PAR3) (E) und GART (F) in SH-SY5Y Zellen nach Gabe von 6-OHDA. Die schwarzen Balken (Control) zeigen die Expression in der unbehandelten Kontrollgruppe. Die anderen Balken zeigen die Expression in den Zellen, die entweder mit 50μM (schraffiert) oder 100μM (grau) 6-

Hydroxydopamin behandelt waren. Die Expression (der relative Unterschied, RU) wurde mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelt. Bei einer Hochregulierung ist der RU größer als 1, bei einer Runterregulierung kleiner als 1 und bei fehlender Regulierung gleich 1 (Siehe Text). Eine Runterregulierung im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich in allen aufgeführten Genen (n=5/Gen, CRMP-1 n=3; p<0.05).

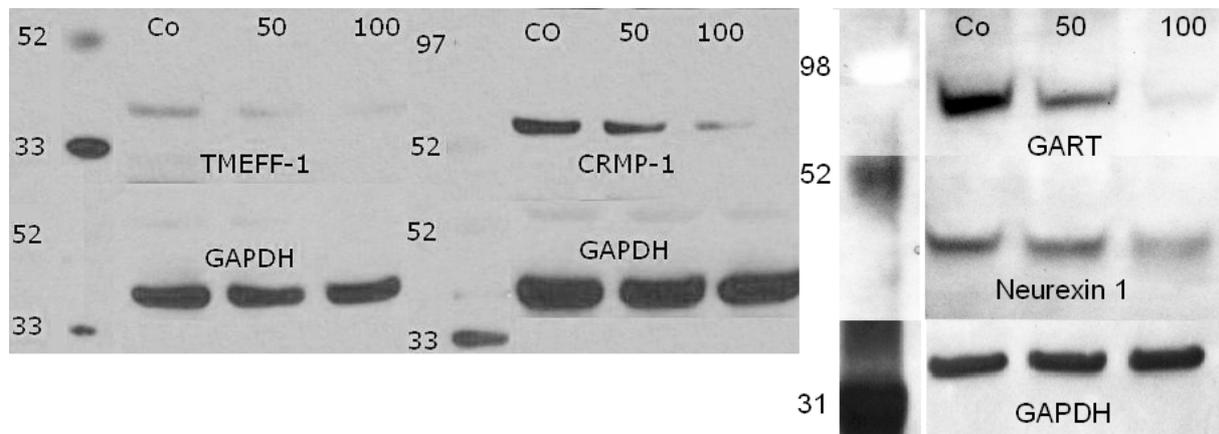


Abbildung 22: Western Blot Analyse der Neuroblastomzellen (SH-SY5Y), die unbehandelt („Co“) oder mit 50 μM 6-OHDA („50“) bzw. 100 μM 6-OHDA („100“) behandelt wurden. Die Proben wurden auf einem 12% NuPAGE Gel separiert, dann auf eine Nitrozellulosemembran geblotet und schließlich mit spezifischen Antikörper gegen TMEFF-1 (40.9 kDa), CRMP-1 (60-65 kDa), Neurexin 1 (37.11 kDa) und GART (73.74 kDa) inkubiert. Zusätzlich wurde eine endogene Kontrolle mit GAPDH (36-40.2 kDa) durchgeführt (siehe Text). Seitlich sind Molekulargewichte von MultiMark® in NuPAGE® MES Puffer in kDa Einheiten gezeigt. Alle vier untersuchten Proteine (TMEFF 1, CRMP 1, Neurexin 1 und GART) wurden runterreguliert. Der Western Blot wurde nach dem Protokoll des Super Signal Ultra Western Blot kit durchgeführt (Pierce, Perbio, Deutschland).

Tabelle 5: Quantifizierung der Western Blot-Banden. Die Quantifizierung der Pixeldichte der Banden erfolgte mittels Scion Image Software (Scion Corporation). GAPDH diente als innere Kontrolle. In allen vier untersuchten Proteinen (TMEFF 1, CRMP 1, Neurexin 1 und GART) fand eine Runterregulierung statt ($n=3$; $p<0.05$). Ko = Kontrolle; 50 = 50 μ M 6-OHDA; 100 = 100 μ M 6-OHDA. Der p -Wert wurde mittels t -test für gepaarte Proben ermittelt.

	Ko; MW	SD	50; MW	SD	N	P (Ko zu 50)	100; MW	SD	N	P (Ko zu 100)
GART	26,03	1,06	62,30	1,81	3	<0,001	17,90	1,13	3	0,001
GAPDH	100,70	0,00	84,41	8,59	3	0,046	97,47	4,26	3	0,749

	Ko; MW	SD	50; MW	SD	N	P (Ko zu 50)	100; MW	SD	N	P (Ko zu 100)
NRX 1	83,42	3,01	65,93	1,84	3	0,001	56,00	1,00	3	<0,001
GAPDH	100,70	0,00	84,41	8,59	3	0,046	97,47	4,26	3	0,749

	Ko; MW	SD	50; MW	SD	N	P (Ko zu 50)	100; MW	SD	N	P (Ko zu 100)
TMEFF 1	62,45	4,50	52,42	1,59	3	0,018	49,60	2,55	3	0,015
GAPDH	1,08	7,64	99,68	6,00	3	0,314	100,00	0,00	3	0,224

	Ko; MW	SD	50; MW	SD	N	P (Ko zu 50)	100; MW	SD	N	P (Ko zu 100)
CRMP 1	58,87	2,00	50,32	4,00	3	0,027	39,96	3,00	3	0,001
GAPDH	104,15	4,00	100,00	0,00	3	0,154	99,40	4,01	3	0,207

Diskussion

Trotz intensiver weltweiter Forschung ist die Ursache des idiopathischen Morbus Parkinson weiterhin unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es Faktoren zu identifizieren, welche eine Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung spielen könnten. Die Behandlung von Neuronen mit 6-OHDA stellt *in vivo* sowie *in vitro* ein etabliertes Modell dar, um die spezifischen Auswirkungen des oxidativen Stresses bei der Parkinson-Erkrankung zu untersuchen (Dodel et al. 1999, Jeon et al. 1995, Sauer und Oertel 1994). Wir haben die Folgen der 6-OHDA-Behandlung an humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) untersucht. Mittels RAP-PCR, die eine Aufdeckung von differentiell exprimierten Genen erlaubt, haben wir mehrere in Frage kommende Gene identifiziert. Im Gegensatz zu anderen PCR-basierten Methoden können die Primer der RAP-PCR an mehrere mRNAs binden und so die Analyse von unterschiedlichen mRNAs in einem Versuchsansatz ermöglichen.

Die Ergebnisse in der RAP-PCR konnten mittels RT- und Real-time PCR in den meisten Fällen bestätigt werden. Die anschließend durchgeführte Western Blot-Analyse der mit 6-OHDA behandelten Zellen zeigte, dass die Runterregulierung nicht nur auf der mRNA-, sondern auch auf der Protein-Ebene der von uns weiteruntersuchten Proteine stattfindet.

Aus der Vielfalt der mittels der RAP- und Real-time PCR aufgedeckten Genexpressionen haben wir exemplarisch vier der uns interessant erscheinenden Gene selektiert, um deren Regulation auch auf zellulär funktioneller, also Proteinebene, zu untersuchen. Die Entscheidung für diese vier Gene beruhte darauf, daß sie vorwiegend im ZNS exprimiert werden. Da auch eine Regulation auf der Proteinebene nachzuweisen war, soll nun im Folgenden einzeln auf die eventuelle Funktion dieser Regulation im Rahmen des oxidativen Stresses und damit einer der vermuteten Pathogenesen des Morbus Parkinson Bezug genommen werden.

TMEFF-1 ist ein transmembranäres Protein, welches erstmals in *Xenopus laevis* als X7365 identifiziert wurde (Eib und Martens 1996). Es enthält zwei Follistatin-Domänen und eine Epidermal growth factor-like-Region (EGF) und wird hauptsächlich im ZNS exprimiert (Kanemoto et al. 2001). Seine Funktion ist bisher noch weitgehend unbekannt, allerdings wurden die Follistatin-Domänen als Inhibitoren von verschiedenen Wachstumsfaktoren identifiziert (Patel 1998, Patthy und Nikolics 1993, Kupprion et al. 1998). Dies lässt vermuten, dass TMEFF-1 bei der Signalkaskade von Wachstumsfaktoren eine Rolle spielt. Desgleichen wird durch den Austausch von Arginin durch Histidin in der EGF-Domäne die Affinität des EGF zu seinem Rezeptor herabgesetzt (Engler et al. 1990).

In Gehirntumoren, insbesondere im malignen Glioblastoma multiforme (GBM), wurde insgesamt eine niedrige Expression von TMEFF-1 im Vergleich zu normalen Gehirnzellen festgestellt. Eine rekombinante Expression von TMEFF-1 in Gehirntumoren hat sogar die Proliferationsrate gesenkt (Grey et al. 2003). Dies lässt vermuten, dass TMEFF-1 im ZNS ein Tumorsuppressorgen darstellen könnte. Im Gegensatz dazu wurde allerdings eine Überexpression von TMEFF-1 in Tumorzellen von Pankreas, Lunge und Niere nachgewiesen (Gery et al. 2003, Ge et al. 2006), so dass eine nicht einheitliche Funktion in cancerogenen Geweben anzunehmen ist.

Die Tatsache, dass TMEFF-1 eine hohe Expression im Gehirn besitzt, lässt auf eine wichtige Funktion im ZNS schließen. Im zentralen Nervensystem der Maus sind detaillierte Expressionsstudien von TMEFF-1 durchgeführt worden. Im Bezug auf den M. Parkinson ist die Expression von TMEFF-1 einerseits in der Substantia nigra pars compacta sowie markant im Locus coeruleus nachweisbar (Kanemoto 2001). Beides stellen Regionen dar, die in der Pathogenese des M. Parkinson eine ausschlaggebende Rolle spielen. Weiterhin findet sich eine sehr hohe Expression in verschiedenen Regionen, wie im enthorhinalen Cortex, der Capsula interna/externa sowie weiteren Strukturen, die direkt oder indirekt auf die nigrostriatocorticalen Schleifen einwirken.

Interessanterweise ist TMEFF-2 (Uchida et al. 1999), das eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit TMEFF-1 aufweist, als „survival und trophischer factor“ speziell für hippocampale und mesencephale Neurone identifiziert worden; auf kortikale Neurone konnten in diesem Modell keine neuroprotektiven Effekte nachgewiesen werden (Horie et al. 2000).

Die Runterregulierung im oxidativen Schädigungsmodell lässt in Anlehnung an die Ergebnisse von Horie et al. (2000) vermuten, dass auch hier TMEFF-1 in der Funktion als trophischer Faktor beeinträchtigt und somit der Zelluntergang der geschädigten Neurone begünstigt wird. Um weitere Einblicke in die genaue Funktion von TMEFF1 in experimentellen Modellen des M. Parkinson zu erlangen, sollten weiterführende Untersuchungen, und dort vor allem die Überexprimierung von TMEFF1, durchgeführt werden. Um diese physiologische Funktion von TMEFF-1 in gesunden Zellen und seine potentielle Rolle beim M. Parkinson zu klären, werden derzeit Versuche in unserem Labor durchgeführt, die die downstream events in der Signalkaskade untersuchen.

β-Neurexin-1 ist ein Protein aus der „Neurexin-Familie“. Neurexine sind wichtige Scaffolds-Proteine, die für die Zelladhäsion in den Synapsen sorgen. Darüber hinaus spielen sie wahrscheinlich eine Rolle bei der „Erkennung“ der Neurone während der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Sie induzieren die Rekrutierung und Formation der

postynaptischen Terminale und sind notwendig für die Bildung der Synapsen, dienen aber auch als Rezeptoren für die Neuroligine der Präsynapse (Dean und Dresbach 2006). β -Neurexin-1 wird überwiegend im Gehirn und wie in in-situ Hybridisierungsexperimenten nachgewiesen werden konnte, vornehmlich in exzitatorischen postsynaptischen Neuronen exprimiert (Song et al. 1999, Ichtchenko et al. 1996, Ushkaryov et al. 1992, Ushkaryov und Südhof 1993, Ullrich et al. 1995). β -Neurexin-1 wird ebenfalls in Neuronen des Globus pallidum, des Nucleus subthalamicus und der Substantia nigra exprimiert (Kelai et al. 2008). Eine Hemmung der Neurexine führt zu einer reduzierten Ausbildung präsynaptischer Terminale, wohingegen die Expression von rekombinantem Neurexin-1 zu einer präsynaptischen Differenzierung von hippocampalen Neuronen führt (Scheiffele et al. 2000, Chubykin et al. 2005). Beide, Neurexine und Neuroligine, interagieren und signalisieren als eine beidseitige Formation der Synapse und sorgen dafür, dass synaptische Interaktionen auch in Zellkulturen stabil bleiben (Dean und Dresbach 2006). Neurexine sind ebenso wichtig für die Lokalisation und Funktion der Ca^{+2} Kanäle sowie der NMDA-Rezeptoren (Missler et al. 2003, Kattenstroth 2004).

Zwei pathophysiologische Modelle bieten sich als Erklärung der im Schädigungsmodell beobachteten Veränderungen des β -Neurexin-1 an. 1. Die in unserem Experiment beobachtete Runterregulierung von Neurexin-1 nach der 6-OHDA-Behandlung könnte im Rahmen des programmierten Zelltodes auftreten. In der Apoptose werden die Zellkontakte zu benachbarten Zellen aufgelöst, dies könnte ein Grund für die Runterregulierung der Expression von β -Neurexin-1 sein. 2. Da Neurexine in der Substantia nigra hoch exprimiert sind und für den normalen Erhalt der prä- und auch postsynaptischen Integrität notwendig sind, könnte durch eine Absenkung der β -Neurexin-1 mRNA eine Kaskade eingeleitet werden, die schließlich zum Zelltod in den Neuronen führt. Im ersten Modell führt der primäre Zelluntergang und Reduktion der synaptischen Vielfalt zur Abnahme der mRNA, im zweiten Modell ist die Abnahme Ursache für die Reduktion der Synapsen und den Zelluntergang. Unterstützend dazu konnte eine Studie zeigen, dass β -Neurexin-1 ebenso im experimentellen Modell von Schädel-Hirn-Traumata runterreguliert wird und somit auch am neuronalen Zelltod bzw. neuronaler Dysfunktion in diesem Schädigungsmodell involviert zu sein scheint (Rao et al. 2003). Somit ist zu vermuten, dass β -Neurexin-1 eine übergreifende Funktion bei verschiedenen Schädigungsmodellen im ZNS und daraus resultierenden neuronalen Zellverlusten ausübt.

Ebenso wie Parkin, dessen Mutation eine familiäre Parkinsonvariante verursacht (siehe oben), ist auch β -Neurexin-1 ein CASK-Protein. CASK (Calcium/ Calmodulin-Depended Serine Protein Kinase), gehören zur Gruppe der membran-assoziierten Guanylatkinasen (MAGUK-Proteine). Diese sind multi-Domäne Scaffold-Proteine und sind im ZNS von

Säugetern hoch exprimiert nachweisbar. CASK sind allerdings nicht spezifisch für die synaptische Ausbildung, sondern sind auch für die neuronale Entwicklung und Genexpression wichtig (Hsueh 2006). Eine Mutation im CASK-Gen bzw. die Deletion des Gens in der Knock-out-Maus ist bereits 1-2 Tage postnatal letal (Lavery et al. 1998).

Da eine Mutation im Parkin-Gen (auch CASK-Protein) eine Parkinson Erkrankung auslösen kann, ist zu vermuten, dass eine Mutation bzw. ein Funktionsverlust in einem Gen, welches zur selben Gruppe gehört, auch in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung involviert sein könnte. Derzeit werden immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von β -Neurexin-1 an post-mortem Material von Parkinson-Patienten durchgeführt. Ein besonderer Schwerpunkt liegt hierbei in der Untersuchung von Neuronen, die nahe an Lewy-Körpern liegen. Hier soll ein Vergleich der Expression von β -Neurexin-1 bei Neuronen analysiert werden, die histomorphologisch noch keine Zeichen eines neuronalen Unterganges im Vergleich zu Neuronen, die bereits einen apoptotischen Zelluntergang zeigen. Endgültige Ergebnisse liegen gegenwärtig noch nicht vor.

Das **CRMP-1** gehört zu einer Familie von fünf verschiedenen, im Zytosol gelösten Eiweißen, die erstmalig 1995 als intrazelluläre Komponente des Transduktionspathways von Semaphorin 3A identifiziert wurden (Goshima et al. 1995). Die CRMPs regulieren die Dynamik der Neurite und Wachstumszapfen (Cole et al. 2006), die Reifung der Zellen und die Migration der Nervenzellen in der embryonalen Phase (Yamashita et al. 2006). Sie werden entwicklungs- und altersabhängig ubiquitär im ZNS exprimiert (Bretin et al. 2005, Wang et al. 1996). Bei Mäusen konnte postnatal eine hohe Expression im Corpus striatum nachgewiesen werden (weitere Basalganglienkerne wurden in der Arbeit von Wang et al. (1996) nicht beschrieben. Im adulten Gehirn wird CRMP-1 vor allem im Kortex, Hippokampus und Kleinhirn exprimiert und CRMP-1 Knockout-Mäuse weisen Lern- und Gedächtnisschwierigkeiten (Su et al. 2007) auf.

In anderen Geweben kann CRMP-1 die Invasion und Metastasierung maligner Tumoren hemmen. Eine reduzierte Expression dieses Proteins ist mit fortgeschrittenem Stadium III des Lungenkrebses assoziiert (Shih et al. 2001).

Eine Runterregulierung von CRMP konnte in Toxizitätsassays auch von Zhang et al. (2007) nachgewiesen werden. Zhang untersuchte den Effekt von mit Maitotoxin und NMDA behandelten primären kortikalen Neuronen auf CRMP-1, CRMP-2 und CRMP-4. Ähnlich wie bei unseren Ergebnissen konnte eine deutliche Reduktion von diesen Proteinen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten in-vivo in einem traumatischen Hirnschädigungsmodell reproduziert werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von

Barzilai et al. (2000), die die toxische Wirkung auf regulierte Gene im Dopamin-induzierten Toxizitätsmodell an sympathischen Neuronen untersuchten. Sie fanden im differential display approach eine Hochregulierung von CRMP-1 nach Gabe von toxischen Dopaminkonzentrationen. Antikörper, die gegen Collapsin-1 gerichtet waren, waren in der Lage eine ausgeprägte Protektion gegen die Dopamin-induzierte Toxizität zu induzieren. Aufgrund dieser Ergebnisse nehmen die Autoren eine funktionelle Rolle von CRMP-1 im Dopamin-induzierten Zelltod und somit auch bei der Parkinson-Krankheit an. In einer weiteren Arbeit von Stauber et al. (2008) konnte im 6-OHDA behandelten Tiermodell eine Hochregulierung von CRMP-2 gefunden werden. Über weitere CRMPs, insbesondere CRMP-1, wurde in dieser Arbeit nicht berichtet. Weshalb ein gegenläufiger Effekt in unseren und den Experimenten von Zhang et al. auftrat, kann aufgrund der Angaben in dem Artikel von Barzilai et al. nur vermutet werden. Einschränkend muss zu den Ergebnissen von Barzilai et al. erwähnt werden, dass auf Proteinebene kein Nachweis geführt wurde. In unseren Experimenten konnten wir auch eine Regulierung auf Proteinebene nachweisen. Weitere Versuche sind aber notwendig, um den genauen Mechanismus von CRMP-1 im Ablauf des apoptotischen Zelltodes zu klären. In welchen pathophysiologischen Mechanismus CRMP-1 beim apoptotischen Zelltod direkt eingreift, bleibt in der Arbeit von Barzilai et al. unbeantwortet.

Die zitierten Arbeiten sowie unsere Ergebnisse zeigen, dass CRMP-1 eine Rolle in Toxizitätsmodellen der Parkinson-Krankheit einnimmt, inwiefern jedoch CRMPs auch eine Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Krankheit spielen, ist bisher noch nicht weitergehend erforscht worden.

GART: Purine sind wichtige Elemente für den Energiehaushalt (Adenin in ATP und Guanin in GPT) sowie für die Signalübermittlung und stellen Bausteine des Erbguts (Adenin und Guanin in DNA und RNA) dar. Die „de novo“ Biosynthese der Purine wird durch die enzymatische Aktivität mit Glyzinamidribonukleotidsynthase (GARS), Aminoimidazolribonukleotidsynthase (AIRS) und Glyzinamidribonukleotid-formyltransferase (GART) katalysiert (Brodsky et al. 1997). Das Gen für dieses Protein ist auf Chromosom 21 lokalisiert (Chadefaux et al. 1984). Obwohl die Purinbiosynthese einen sehr wichtiger Stoffwechselweg darstellt, ist bisher nur sehr wenig über die Gewebe-spezifische oder wachstumsbedingte Regulation dieses Weges bekannt.

Eine Abnahme der RNA Menge in Substantia nigra Neuronen wurde berichtet und wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen als ein möglicher basaler Defekt bei der Parkinson-Krankheit postuliert (Ohye et al. 1995, Tandan und Bradley 1985). Verschiedene Mechanismen können u.a. zu einer reduzierten RNA-Menge führen: 1. Heterochromati-

sierung der DNA, 2. Pathologische Transkription durch eine Akkumulation von inadäquat reparierter DNA; 3. Mangel an RNA-Polymerasen oder Vorläufer-Nukleotiden. Diese Mechanismen können zu einer reduzierten Proteinsynthese führen, mit einem konsekutivem vorzeitigen Zelltod. Eine Runterregulierung von GART, wie wir sie in unseren Versuchen beobachten konnten, und eine dadurch bedingte Störung der GARS-AIRS-GART-Aktivität, kann zu einer defekten Produktion von Purin-Nucleotiden führen mit einer reduzierten RNA-Synthese. Dies wäre ein potentiell letales Ereignis in metabolisch aktiven Neuronen, wie den Neuronen der Substantia nigra. In-vivo Versuche am 6-OHDA- oder MPTP-Modell unter besonderer Berücksichtigung der GARS-AIRS-GART-Aktivität sollten hierzu eine weitergehende Klärung des Einflusses von GART ermöglichen. Ob diese Mechanismen letztendlich in der Substantia nigra vornehmlich für den vorzeitigen pathologischen Untergang verantwortlich sind, ist bisher nicht bekannt.

Weitere Studien sind notwendig, um die physiologischen Funktionen dieser Proteine und ihren Einfluss auf die Signalbahnen zur Neurodegeneration im M. Parkinson aufzuklären. Wenn wir davon ausgehen, dass die von uns aufgedeckten Gene eine wichtige Rolle im Überleben der Zellen darstellen, z.B. GART für den Energiehaushalt der Zellen, könnte eine Genexpressionsveränderung, die zu einer Runterregulierung oder Dysfunktion eines dieser Gene führt, auch den Untergang der Zellen verursachen. Studien *in vitro*, und hier vor allem an primären mesencephalen Neuronenkulturen, sowie *in vivo* Experimente sind geplant bzw. werden gegenwärtig im Labor durchgeführt. Insbesondere die Hemmung bzw. Runterregulierung der obengenannten Proteine ist zu untersuchen, um die einzelnen Funktionen im oxidativen Schädigungsmodell aufzudecken. Zur Bestätigung der Ergebnisse sind Untersuchungen an post mortem Gewebe von M. Parkinson Patienten sinnvoll. Diese sollen sich an die oben erwähnten weiterführenden *in vitro* und *in vivo* Experimente anschließen und werden gegenwärtig im Labor durchgeführt.

In den von uns durchgeführten Experimenten müssen einige Einschränkungen im Detail erwähnt werden. Die Experimente wurden erstens *in vitro* an Zellen und nicht *in vivo* bzw. im Zellverbund durchgeführt. Insbesondere der Einfluss von nicht neuronalen Zellen kann in diesem System nicht einwirken. Weiter wurden die Versuche an einer Zelllinie, den Neuroblastom-Zellen, also einer Tumorzell-Linie durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass die Regulierung der Zellvermehrung/Apoptose nicht wie in physiologisch aktiven dopaminergen Zellen der Substantia nigra im zentralen Nervensystem verläuft und auch andere Pathways angesteuert werden als in Substantia nigra Neuronen. Allerdings kann nur eine geringe Menge von Substantia nigra Neuronen gewonnen werden, die eine Untersuchung, wie sie hier durchgeführt wurden, annähernd unmöglich macht. Nichtsdestotrotz liefert dieses System mit den im Versuch eingesetzten Zelllinien zunächst valide Einblicke in das

funktionelle Verständnis des oxidativen Zellstresses und die Ergebnisse können dazu dienen, diese an primären Zellkulturen oder *in vivo* zu überprüfen.

Zusammenfassung

Morbus Parkinson ist eine chronische neurodegenerative Erkrankung, die durch einen Verlust der dopaminergen (DA) Neurone in der Substantia nigra pars compacta, gekennzeichnet ist. Die Ätiologie ist bisher weitgehend unbekannt. Die Behandlung von Nervenzellen mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist ein etabliertes *in vivo* und *in vitro* Modell, um die Auswirkungen des oxidativen Stresses in M. Parkinson Gehirnen nachzuahmen. Um die nachgeschalteten Ereignisse in Zellen nach Exposition mit 6-OHDA zu charakterisieren, haben wir die dopaminerge humane Neuroblastomzell-Linie (SH-SY5Y Zellen) mit 6-OHDA behandelt und anschließend das Profil der Genexpression mittels der reversen arbiträren gepimten Polymerasen-Kettenreaktion (RAP-PCR) ermittelt. Mit der RAP-PCR können die Unterschiede in der Genexpression zwischen zwei oder mehreren Proben ermittelt werden. Reproduzierbare Unterschiede in der Genexpression der mit 6-OHDA behandelten Zellen (die Behandlung erfolgte mit 50µM bzw. 100µM 6-OHDA über 24h) zeigten sich im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Von diesen wiesen 23 Sequenzen eine hochsignifikante Homologie zu bekannten humanen Kodierungssequenzen auf. Die Ergebnisse wurden mittels RT-PCR, Real-time PCR und Western-Blot Analyse bestätigt. In vier Fällen [Tumoregulin-1 (TMEFF-1), Collapsin response mediator protein 1 (CRMP-1), Neurexin-1 und Phosphoribosylaminoimidazolsynthetase (GART)] wurde eine suppressive Regulation auf mRNA- sowie auf Proteinebene festgestellt. Dies bestätigte, dass die Regulierung, die sich in der RAP-PCR zeigte, nicht nur auf die Transkriptionsebene beschränkt ist, sondern sich auch auf die entsprechende Proteinebene erstreckt. Es bestätigt sich somit, dass die von uns angewandte RAP-PCR als Methode zur Analyse der differentiellen Genexpression von SH-SY5Y im 6-OHDA-Schädigungsmodell *in vitro* geeignet ist.

Diese vier Proteine, die z.T. erstmalig in Bezug in dem Toxizitätsmodell identifiziert wurden, konnten als Proteine charakterisiert werden, die auch physiologisch eine Rolle im Zelluntergang Substantia nigra Neuronen spielen könnten. Weitere Studien für die physiologische Rolle der identifizierten Gene und ihren Einfluss auf die Neurodegeneration im M. Parkinson sind allerdings nötig.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Strukturen und Histopathologie bei M. Parkinson.....	10
Abbildung 2: Genetische Mutationen und Pathogenese des M. Parkinson, vereinfachte Darstellung.....	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Basalganglien... ..	18
Abbildung 4: Biosynthese der Katecholamine.....	19
Abbildung 5: Bahnen zwischen den Basalganglien (vereinfacht).....	21
Abbildung 6: Bahnen zwischen den Basalganglien beim M. Parkinson.....	22
Abbildung 7: 6-Hydroxydopamin (6-OHDA).....	24
Abbildung 8: Gesamt-RNA auf 1%-Aragose/37%-Formaldehyd/TAE Gel mit SYBR-Gold..	27
Abbildung 9: Schema der mRNA.. ..	28
Abbildung 10: Schema der RAP-PCR Teil 1.	29
Abbildung 11: Schema der RAP-PCR Teil 2.. ..	30
Abbildung 12: Schema der RAP-PCR Teil 3.	30
Abbildung 13: Die kinetischen Phasen der traditionellen PCR	34
Abbildung 14: Real-time PCR Teil 1: Diagramme mit linearer (a.) und logarithmischer Ordinate (b.) zeigen die gleiche PCR	35
Abbildung 15: Real-time PCR Teil 2	35
Abbildung 16: Wirkung des von SDS (Sodium dodecyl sulfate) auf Proteine.	40
Abbildung 17: Blotting-Verfahren: schematische Darstellung.. ..	41
Abbildung 18: Nachweis von Proteinen mit Hilfe der indirekten Antikörper-Markierung	42
Abbildung 19: Ergebnis der RAP-PCR: „Fingerabdrücke“ der SH-SY5Y Zellen	48

Abbildung 20: Ergebnis der RT-PCR: Mit spezifischen Primerpaaren für GART, Neurexin-1, CRMP-1 und TMEFF-1 Gene... ..	49
Abbildung 21: Ergebnisse der Real-time PCR: Genexpression von CRMP-1, TMEFF-1, Neurexin-1, Nuclear phosphoprotein 32, Atypical PKC binding protein (PAR3) und GART in SH-SY5Y Zellen nach Gabe von 6-OHDA... ..	53
Abbildung 22: Ergebnisse der Western Blot Analyse der Neuroblastomzellen.	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen für das Parkinson-Syndrom.....	11
Tabelle 2: Genetische Ursachen für das Parkinson Symptom.....	13
Tabelle 3: Die Primer in der Real-time PCR.....	37
Tabelle 4: Ergebnisse der Real-time-PCR.	50
Tabelle 5: Quantifizierung der Western Blot-Banden... ..	55

Literaturverzeichnis

- Alfke H, Stumm G, Schnieder I, Klose KJ, Schlegel J. Differential gene expression of vascular smooth muscle cells. Detection by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Vasa* 1999; 28: 164-168.
- Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause of consequence? *Nat. Med* 2004; 10: 18-25.
- Barzilai A, Zilkha-Falb R, Daily D, Stern N, Offen D, Ziv I, Melamed E, Shirvan A. The molecular mechanism of dopamine-induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediate dopamine toxicity. *J Neural Transm Suppl* 2000; 60: 59-76.
- Baumeister W, Welz J, Zühl F, Seemüller E. The Proteasome: Paradigm of Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* 1998; 92: 367-380.
- Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 325-334.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1301-1306.
- Bilsland J, Roy S, Xanthoudakis S, Nicholson DW, Han Y, Grimm E, Heft F, Harper SJ. Caspase inhibitors attenuate 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 2637-2649.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 135-172.
- Bonifati V, Rizzu P, Van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joose M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2002; 299: 256-259. Brete S, Reibel S, Charrier E, Maus-Moatti M, Auvergnon N, Thevenoux A, Glowinski J, Rogemond V, Prémont J, Honnorat J, Gauchy C.. Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2005; 486: 1-17.
- Brodsky G, Barnes T, Bleskan J, Becker L, Cox M, Patterson D. The human GARS-AIRS-GART gene encodes two proteins which are differentially expressed during human brain development and temporally overexpressed in cerebellum of individuals with Down syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2043-2050.
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLeendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. The Parkinson's disease protein DJ-1 is

- neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 9103-9108.
- Chadefaux B, Allard D, Rethore MO, Raoul O, Poissonnier M, Gilgenkrantz S, Cheruy C, Jerome H. Assignment of human phosphoribosylglycinamide synthetase locus to region 21q221. *Hum Genet* 1984; 66: 190-192.
- Chubykin AA, Liu X, Comoletti D, Tsigelny I, Taylor P, Südhof TC. Dissection of synapse induction by neuroligins: effect of a neuroligin mutation associated with autism. *J Biol Chem* 2005; 280: 22365-22374.
- Cohen G. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 112-120.
- Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 1984; 5: 77-82.
- Cole AR, Causeret F, Yadirgi G, Hastie CJ, McLauchlan H, McManus EJ, Hernandez F, Eickholt BJ, Nikolic M, Sutherland C. Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *J Biol Chem* 2006; 281: 16591-16598.
- Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, Staal R, Tieu K, Schmitz Y, Yuan CA, Rocha M, Jackson-Lewis V, Hersch S, Sulzer D, Przedborski S, Burke R, Hen R. Resistance of alpha-synuclein null mice to parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14524-14529.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39: 889-909.
- Dean C, Dresbach T. Neuroligins and neuroligins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci* 2006; 29: 21-29.
- DeLong MR, Juncos JL. *Parkinson's disease and other movement disorders*. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jamson JL, HRSG. *Harrison's Principles of Internal Medicines* Bd. II. New York-Chicago-San Francisco-Lisbon-London-Madrid-Mexico City-Milan-New Delhi-San Juan-Singapore-Sydney-Toronto: McGraw Hill, 2005: 2406-2418.
- Dodel RC, Du Y, Bales KR, Ling Z, Carvey PM, Paul SM. Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 64: 141-148.
- Eib DW, Martens GJ. A novel transmembrane protein with epidermal growth factor and follistatin domains expressed in the hypothalamo-hypophysial axis of *Xenopus laevis*. *J Neurochem*. 1996; 67: 1047-1055.

- Engler DA, Montelione GT, Niyogi SK. Human epidermal growth factor. Distinct roles of tyrosine 37 and arginine 41 in receptor binding as determined by site-directed mutagenesis and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett* 1990; 271: 47-50.
- Feuerstein GZ, Wang X. Use of differential display reverse transcription--polymerase chain reaction for discovery of induced adrenomedullin gene expression in focal stroke. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 731-734.
- Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 1998; 4: 1329-1333.
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, Ricaurte GA. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol* 1986; 20: 449-455.
- Fornstedt B, Rosengren E, Carlsson A. Occurrence and distribution of 5-S-cysteinyl derivatives of dopamine, dopa and dopac in the brains of eight mammalian species. *Neuropharmacology* 1986; 25: 451-454.
- Ge W, Hu H, Ding K, Sun L, Zheng S. Protein interaction analysis of ST14 domains and their point and deletion mutants. *J Biol Chem* 2006; 281: 7406-7412.
- Gery S, Yin D, Xie D, Black KL, Koeffler HP. TMEFF1 and brain tumors. *Oncogene* 2003; 22: 2723-2727.
- Girault J, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* 2004; 61: 641-644.
- Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 1995; 376: 509-514.
- Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 2006; 60: 389-398.
- Horie M, Mitsumoto Y, Kyushiki H, Kanemoto N, Watanabe A, Taniguchi Y, Nishino N, Okamoto T, Kondo M, Mori T, Noguchi K, Nakamura Y, Takahashi E, Tanigami A. Identification and characterization of TMEFF2, a novel survival factor for hippocampal and mesencephalic neurons. *Genomics* 2000; 67: 146-152.
- Holtz WA, O'Malley KL. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003; 278: 19367-19377.
- Hsueh YP. The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1915-1927.
- Ichtchenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, Südhof TC. Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 1995; 81: 435-443.

- Ichtchenko K, Nguyen T, and Südhof TC. Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *J Biol Chem*. 1996; 271: 2676-2682.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001; 105: 891-902.
- Javoy F, Sotelo C, Herbert A, Agid Y. Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intra cerebral injection of 6-hydroxydopamine in nigrostrial dopamine system. *Brain Res* 1976; 102: 210-215.
- Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 1995; 4: 131-137.
- Kanemoto N, Horie M, Omori K, Nishino N, Kondo M, Noguchi K, Tanigami A. Expression of TMEFF1 mRNA in the mouse central nervous system: precise examination and comparative studies of TMEFF1 and TMEFF2. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 86: 48-55.
- Kattenstroth G, Tantalaki E, Südhof TC, Gottmann K, Missler M. Postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function requires alpha-neurexins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(8):2607-12.
- Kelai S, Maussion G, Noble F, Boni C, Ramoz N, Moalic JM, Peuchmaur M, Gorwood P, Simonneau M. Nrnx3 upregulation in the globus pallidus of mice developing cocaine addiction. *Neuroreport*. 2008;19(7):751-755.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605-608.
- Klinke R, Silbernagl S. Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 2001
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18: 106-108.
- Kupprion C, Motamed K, Sage EH. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 29635-29640.
- Langston JW, Langston EB, Irwin I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl* 1984; 100: 49-54.
- Lansbury PT Jr., Brice A. Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 299-306.

- Laverty HG, Wilson JB. Murine CASK is disrupted in a sex-linked cleft palate mouse mutant. *Genomics*. 1998; 53(1):29-41.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey , Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395: 451-452.
- Li YJ, Scott WK, Hedges DJ, Zhang F, Gaskell PC, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Allen FA Jr, Goetz CG, Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 1997; 48: 1583-1588.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. München: Elsevier- Spektrum akademischer Verlag, 2004.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277: 1641-1644.
- Mathieu-Daudé F, Cheng R, Welsh J, McClelland M. Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism gels. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1504-1507.
- Mastaglia F, Stajich JM, Gibson RA, Middleton LT, Saunders AM, Scott BL, Small GW, Nicodemus KK, Reed AD, Schmechel DE, Welsh-Bohmer KA, Conneally PM, Roses AD, Gilbert JR, Vance JM, Haines JL, Pericak-Vance MA. Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am J Hum Genet*, 2002; 70: 985-993.
- McClelland M, Mathieu-Daudé F, Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet* 1995; 11: 242-246.
- McNaught KS, Bjorklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport* 2002a; 13: 1437-1441.
- McNaught KS, Shashidharan P, Perl DP, Jenner P, Olanow CW. Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci* 2002b; 16: 2136-2148.
- Missler M, Zhang W, Rohlmann A, Kattenstroth G, Hammer RE, Gottmann K, Südhof TC. Alpha-neurexins couple Ca²⁺ channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 2003; 423(6943):939-948.
- Mühlhardt, Cornel. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 4. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2003.

- Oertel WH, Reichmann H. *Parkinson-Syndrome: Diagnostik und Therapie*. In: Diener HC, Putzki N, HRSG. *Leitlinien für die Diagnostik und Therapie in der Neurologie*, Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 2008.
- Ohye T, Ichinose H, Ogawa M, Yoshida M, Nagatsu T. Alterations in multiple tyrosine hydroxylase mRNAs in the substantia nigra, locus coeruleus and adrenal gland of MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Neurodegeneration*. 1995;4(1):81-85.
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J. Biol. Chem* 2004; 279: 18614-18622.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group. Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet* 2003b; 72: 1053-1057.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Molec Genet* 2003a; 12: 2599-2608.
- Park SW, Kang Yle, Sypula JG, Choi J, Oh H, Park Y. An evolutionarily conserved domain of roX2 RNA is sufficient for induction of H4-Lys16 acetylation on the Drosophila X chromosome. *Genetics*.2007; 177(3):1429-1437.
- Parker Jr. WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol* 1989; 26: 719-723.
- Parkinson, J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; 14: 223-236.
- Patel K. Follistatin. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998; 30: 1087-1093.
- Patthy L, Nikolics K. Functions of agrin and agrin-related proteins. *Trends Neurosci* 1993; 16: 76-81.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.
- Prime G, Horn G, Sutor B. Time-related changes in connexin mRNA abundance in the rat neocortex during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 119: 111-125.
- Raghavendra Rao VL, Dhodda VK, Song G, Bowen KK, Dempsey RJ. Dempsey. Traumatic Brain Injury-Induced Acute Gene Expression Changes in Rat Cerebral Cortex Identified by GeneChip Analysis. *J Neurosci Res*. 2003;71(2):208-219.

- Ralph D, McClelland M, Welsh J. RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR identifies differentially regulated RNAs in mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 10: 10710-10714.
- Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 1994; 59: 401-415.
- Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; 166: 368-379.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem* 1990; 54: 823-827.
- Scheiffele P, Fan J, Choih J, Fetter R, Serafini T. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 2000; 101: 657-669.
- Schlegel J, Vogt T, Munkel K, Ruschoff J. DNA fingerprinting of mammalian cell lines using nonradioactive arbitrarily primed PCR (AP-PCR). *Biotechniques* 1996; 20: 178-180.
- Seniuk NA, Tatton WG, Greenwood CE. Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res* 1990; 527: 7-20.
- Shen J. Protein kinases linked to pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44: 575-575.
- Shih JY, Yang SC, Hong TM, Yuan A, Chen JJ, Yu CJ, Chang YL, Lee YC, Peck K, Wu CW, Yang PC. Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1392-1400.
- Silbernagl S, Despopoulos A. *Taschenatlas der Physiologie*. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 2001.
- Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag, 1998.
- Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N. Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1100-1105.
- Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem* 1998; 71: 2112-2122.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388: 839-840.

- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6469-6473.
- Stauber J, Lemaire R, Franck J, Bonnel D, Croix D, Day R, Wisztorski M, Fournier I, Salzet M. MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J Proteome Res* 2008; 7: 969-978.
- Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* 1999; 55: 659-665.
- Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Müller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Krüger R. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum. Molec. Genet* 2005; 14: 2099-2111.
- Su KY, Chien WL, Fu WM, Yu IS, Huang HP, Huang PH, Lin SR, Shih JY, Lin YL, Hsueh YP, Yang PC, Lin SW. Mice deficient in collapsin response mediator protein-1 exhibit impaired long-term potentiation and impaired spatial learning and memory. *J Neurosci* 2007; 27: 2513-24.
- Sullivan PG, Dragicevic NB, Deng JH, Bai Y, Dimayuga E, Ding Q, Chen Q, Bruce-Keller AJ, Keller JN. Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. *J Biol Chem* 2004; 279: 20699-20707.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H. DJ-1 has a role in antioxidant stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 2004; 5: 213-218.
- Tanaka T, Iqbal K, Trenkner E, Liu DJ, Grundke-Iqbal I. Abnormally phosphorylated tau in SY5Y human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 1995; 360: 5-9.
- Tandan R, Bradley WG. Amyotrophic lateral sclerosis: Part 2. Etiopathogenesis. *Ann Neurol* 1985; 18: 419-431.
- Tórtola S, Capellà G, Marcuello E, Günther K, Aiza G, Masramon L, Reymond MA, Peinado MA. Analysis of differential gene expression in human colorectal tumor tissues by RNA arbitrarily primed-PCR: a technical assessment. *Lab Invest* 1998; 78: 309-317.
- Trepel M. *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. München: Elsevier GmbH, 2004.
- Uchida T, Wada K, Akamatsu T, Yonezawa M, Noguchi H, Mizoguchi A, Kasuga M, Sakamoto C. A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 266: 593-602.
- Ullrich B, Ushkaryov YA, and Südhof TC. Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* 1995; 14: 497-507.

- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968; 5: 107-110.
- Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M, Südhof TC. Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 1992; 257: 50-56.
- Ushkaryov YA, Südhof TC. Neurexin III alpha: extensive alternative splicing generates membrane-bound and soluble forms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6410-6414.
- Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 2004; 10: 58-62.
- Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005; 15: 473-490.
- Wang LH, Strittmatter SM. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci* 1996; 16: 6197-6207.
- Welsh J, Pretzman C, Postic D, Saint Girons I, Baranton G. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 370-377.
- Yamashita N, Uchida Y, Ohshima T, Hirai S, Nakamura F, Taniguchi M, Mikoshiba K, Honnorat J, Kolattukudy P, Thomasset N, Takei K, Takahashi T, Goshima Y. Collapsin response mediator protein 1 mediates reelin signaling in cortical neuronal migration. *J Neurosci* 2006; 26: 13357-13362.
- Zenker W. *Makroskopische Anatomie des Endhirns*. In: Drenkhahn D, Zenker W, HRSG. Benninghoff, *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschens*. München-Wien-Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994: 327-330
- Zhang Z, Ottens AK, Sadasivan S, Kobeissy FH, Fang T, Hayes RL, Wang KK. Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24:460-472.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir während meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen und somit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Carmen Nölker bedanken, nicht nur weil sie die Tür in die Neurowissenschaften für mich aufgemacht hat, sondern auch für die hervorragende Hilfe im praktischen und im theoretischen Teil meiner Dissertation.

Selbstverständlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Richard Dodel für die Überlassung des interessanten Themas bedanken. Eine besondere Anerkennung gilt auch allen Mitarbeitern im Labor, vor allem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Bacher, Frau Susanne Schnell und Frau Anne Kreuz. Ich danke auch meinen Freunden Frau Dr. med. Angela Frintrup und Herrn cand. Dr. med. Florian Fronhoffs für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern, Geschwistern und meiner Freundin, die mich stets unterstützt haben.