

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Brandt

Funktionelle Expression von Parkin, Siah-1 und Dörfin
unter definierten, mit Morbus Parkinson assoziierten,
Zellstressbedingungen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Lehmann-Horn

aus München

Jahr

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Herms
Priv. Doz. Dr. D. Rujescu

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christoph Lücking

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.6.2007

Meinen Eltern

Inhalt

Liste der Abkürzungen	7
1. Einleitung	9
1.1 Historischer Überblick	9
1.2 Epidemiologie, Klinik und Pathologie	10
1.3 Ätiologie	12
1.4 Genetik	12
1.5 Mögliche Pathomechanismen des Morbus Parkinson	14
1.6 Die untersuchten Gene	17
1.7 Grundlagen dieser Arbeit	20
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	21
2. Material	22
2.1 Allgemeine Ausrüstung	22
2.2 Zellkultur-Ausrüstung	23
2.3 Kommerzielle Kits	23
2.4 Gele, Puffer, Lösungen	24
2.4.1 Zellkultur	24
2.4.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese: Puffer und Gele	24
2.4.3 Durchflusszytometrie	25
2.4.4 RNA-Isolation und RT-PCR	25
2.5 Antikörper	26
2.6 Chemikalien und sonstige Materialien	26
2.7 Zellen	28
3. Methoden	29
3.1 Bereits etablierte Methoden	29
3.1.1 Zellkultur	29
3.1.2 Zelltodquantifizierung	30
3.1.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Western-Blot und Proteindetektion	32
3.2 Eigenständig etablierte Methoden	34
3.2.1 RNA-Extraktion	34

3.2.2	RT-PCR	38
3.2.3	Relative Quantifizierung und statistische Verfahren	48
3.2.4	Versuchsanordnung	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Zelldichte und Zellanzahl	52
4.2	Die Etablierung der Stressorenkonzentrationen	52
4.3	Zellzustand und Zelltod	54
4.4	mRNA Regulation bei MG132	56
4.4.1	Parkin	60
4.4.2	Siah-1	62
4.4.3	Dorfin	63
4.5	Proteinregulation Parkins bei MG132	64
4.6	mRNA Regulation bei Tunicamycin	65
4.6.1	Parkin	66
4.6.2	Siah-1	67
4.6.3	Dorfin	68
4.7	Proteinregulation von Parkin bei Tunicamycin	69
4.8	mRNA Regulation bei Rotenon	69
4.8.1	Parkin	70
4.8.2	Siah-1	70
4.8.3	Dorfin	70
4.9	mRNA Regulation bei H ₂ O ₂	71
5	Diskussion	72
5.1	Bewertung des Zellmodells und der Zelltodexperimente	72
5.2	Bewertung der Nachweismethoden	74
5.3	Bewertung der statistischen Nachweisgrenzen und der biologischen Relevanz	75
5.4	Parkin ist unter proteasomaler Inhibition spezifisch herabreguliert – Mögliche Ursachen und Folgen	77
5.5	Stress durch fehlgefaltete Proteine führt zu keiner veränderten Expression von Parkin, Siah-1 und Dorfin	81
5.6	Rotenon und H ₂ O ₂ führen zu keiner veränderten Expression von Parkin, Siah-1 und Dorfin	81
6	Zusammenfassung	83

Literaturverzeichnis	84-91
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	
A Abbildungen	92
B Tabellen	93
Veröffentlichungen	94
Danksagung	95
Lebenslauf	96

Abkürzungen

A	Ampere
AD	autosomal dominant
ALS	amyotrophische Lateralsklerose
AMV	avian myeloblastosis virus
AR	autosomal rezessiv
ARJP	autosomal recessive juvenile parkinsonism
BP	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
CDCrel	cell-division-control-protein
cDNA	complementary DNA
CP	crossing point
C-Terminus	Carboxy-Terminus der Aminosäuresequenz
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
E	Effizienz der PCR
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
FA	Formaldehyd
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FW	forward
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	horseradish-peroxidase
HSP	heat shock protein
IBR	in-between-RING
kD	Kilodalton
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
mA	Milliampere
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure

MP	Morbus Parkinson
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenyl-pyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	Anzahl der Kopien
NGF	nerve growth factor
N-Terminus	Amino-Terminus der Aminosäuresequenz
Pael-R	parkin-associated endothelin receptor-like receptor
PBS	phosphate buffered saline
PC	pheochromocytoma
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PI	Propidiumiodid
PINK1	pten-induced-putative kinase 1
RING	really-interesting-new-gene
RNA	ribonucleic acid
RT	1. real time 2. reverse Transkription
RW	reverse (primer)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SGD	saccharomyces genome database
SIAH-1	seven in absentia homolog 1
SN	Substantia nigra
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBS	Tris-buffered saline solution
TBST	Tris-buffered saline solution with Tween
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNT	Tris sodium(Na) Tween 20
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UbcH7/8	human ubiquitin-conjugating enzyme 7/8
UCH-L1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1
U/min	Umdrehungen pro Minute
UBL	ubiquitin-like(-domain)
UPS	ubiquitin-proteasome-system
WB	Western Blot

1 Einleitung

Morbus Parkinson (auch Parkinsonsche Erkrankung oder idiopathisches Parkinson Syndrom genannt) stellt eine häufige, progressive und bisher unheilbare Bewegungsstörung dar. Die irreversible Degeneration dopaminerger Neurone insbesondere in der Substantia nigra des Mittelhirns und im Locus coeruleus beeinträchtigt die Funktion der motorischen Basalganglienschleifen. Diese äußert sich in einer extrapyramidalen Bewegungsstörung mit der klassischen Symptomen-Trias Rigor, Bradykinesie und Ruhetremor sowie posturaler Instabilität (Huang et al. 2004). Das Zusammentreffen dieses Symptomenkomplexes, sowohl beim idiopathischen Parkinson Syndrom als auch in Kombination mit weiteren Symptomen bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, nennt man auch Parkinsonismus. Mit Beginn der Beschwerden, der zumeist im höheren Lebensalter eintritt, sind bereits ein großer Teil der dopaminergen Neurone (50%) sowie ein noch größerer Teil (75-80%) des Dopamingehalts des Striatums verloren (von Bohlen und Halbach et al. 2004).

Den Ärzten stehen heute eine Vielzahl von Medikamenten und auch operative Verfahren zur Verfügung, die die Symptome der Parkinsonschen Erkrankung mildern können, aber dennoch ist das Aufhalten des Untergangs der betroffenen Neurone oder gar eine Heilung der Erkrankung bisher nicht möglich.

Auch die ursächlichen Mechanismen, die zur Entstehung des Morbus Parkinson führen, konnten bislang nicht endgültig aufgeklärt werden. Die intensive molekularbiologische und genetische Forschung der letzten Jahre führte zur Identifizierung einer Reihe von Genen, die familiäre Formen des Morbus Parkinson auslösen können. Diese Gene sowie eine Vielzahl damit verbundener, möglicher Pathomechanismen stehen im Mittelpunkt der gegenwärtigen Forschung und sind zum Teil auch Thema dieser Arbeit. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die Hintergründe der Erkrankung geben und kurz die untersuchten Gene und Pathomechanismen vorstellen, um dem Leser die Einordnung der vorliegenden Arbeit in den Kontext der Parkinsonschen Erkrankung zu erleichtern.

1.1 Historischer Überblick

Das Syndrom, das heute eng mit dem Namen Parkinsons verknüpft ist, ist schon seit dem Altertum bekannt und beschrieben worden (Hippokrates, später Sylvius de la Bøe 1663). Dennoch war es die von James Parkinson im Jahre 1817 veröffentlichte Schrift „An Essay on the Shaking Palsy“, die die erste klare Beschreibung dieser Erkrankung gab (Parkinson 1817). Zu bemerken ist, dass Parkinsons Beschreibung Ruhetremor und posturale Instabilität enthält, Bradykinesie und

Rigor aber keine Erwähnung finden (Ropper und Brown 2005). Das Gleiche gilt für den Begriff „paralysis agitans“, den Marshall Hall prägte (Diseases and Derangements of the Nervous System, 1841). Charcot schlug den bis heute gebräuchlichen Namen „Morbus Parkinson“ (engl. Parkinson's Disease) vor. Mitte und Ende des 19. Jahrhunderts durchgeführte Studien versuchten nachzuweisen, dass Kortex und Rückenmark Entstehungsregion der Krankheit waren. Doch Brissaud zeigte in seinen pathologischen Studien 1895 die Beteiligung des Mittelhirns auf (Brissaud 1899). Lewy beschrieb 1913 erstmals die nach ihm benannten Lewy-Körperchen, die seither als bedeutendes histologisches Merkmal der Erkrankung gelten (Lewy 1913). Eine genauere Beschreibung der Läsionen und der Pathologie des Morbus Parkinson stammt von Greenfield und Bosanquet vom National Hospital Queen Square, London (Greenfield und Bosanquet 1953). Ein wichtiges Experiment für das funktionelle Verständnis des Morbus Parkinson gelang Bergmann et al. im Jahre 1990 (Bergman et al. 1990). Hier konnte gezeigt werden, dass durch MPTP induzierter Parkinsonismus in einem Versuchsaffen durch Läsion des Nucleus subthalamicus revidiert werden kann. Hierauf beruhen heutige Therapieverfahren, die durch Elektrostimulation mit einem implantierbaren Stimulator diese Hirnregion auszuschalten versuchen (Limousin et al. 1998).

Bereits im 19. Jahrhundert wurden anticholinerge Medikamente empirisch zur Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt. Das biochemische Verständnis der Erkrankung hinkte aber den pathologischen Entdeckungen hinterher und kam erst 1961 durch Ehringer und Hornykiewicz zum Durchbruch. Sie beschrieben den Verlust an Dopamin im Striatum von Parkinson Patienten (Ehringer 1961). Seither wurden zur symptomatischen Behandlung zahlreiche Pharmaka entwickelt, die die Dopaminwirkung verstärken sollen: Levodopa und Dopa-Decarboxylaseinhibitoren, Dopaminagonisten sowie Enzyminhibitoren, die den Abbau von Dopamin hemmen, z.B. MAO- (Monoaminoxidase) oder COMT- (Catechol-O-Methyltransferase) Inhibitoren.

Dennoch ist es bisher nicht gelungen, die Progredienz der Erkrankung aufzuhalten oder sie zu heilen.

1.2 Epidemiologie, Klinik und Pathologie

Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer und betrifft bis zu 1% der Bevölkerung über 50 Jahre (Polymeropoulos et al. 1996). Der Krankheitsbeginn ist in der Regel zwischen dem 40. und dem 70. Lebensjahr, mit einem Häufigkeitsgipfel in der sechsten Lebensdekade. Ein Beginn der Symptome vor dem 30. Lebensjahr ist sehr selten. In den meisten epidemiologischen Studien erweisen sich Männer als

etwas häufiger betroffen als Frauen. Der Morbus Parkinson kommt in allen Ländern, ethnischen Gruppen und sozioökonomischen Schichten vor (Ropper und Brown 2005).

Der klinische Beginn der Erkrankung ist in der Regel langsam und schleichend und wird von Angehörigen zunächst oft als normale Entwicklung des Alterns gedeutet. Die klassischen Symptome des Parkinson Syndroms sind Rigor, Bradykinesie und Ruhetremor. Typisch sind verlangsamte und abgeschwächte Bewegungen, erhöhter Muskeltonus mit sog. Zahnradphänomen, verminderte Mimik bis hin zum "Maskengesicht". Auch Gangveränderungen und posturale Instabilität bis zur Fallneigung können auftreten. Die Initiation von Bewegungen kann gestört sein, was sich zum Beispiel beim Losgehen aus dem Stand zeigen kann. Oft fällt eine Reduktion der Schwingbewegungen der Arme beim Gehen auf. Die Stimme wird weich und monoton klingend. Der asymmetrische Beginn der Symptome, insbesondere des Tremors, ist charakteristisch für die Parkinsonsche Erkrankung.

Demenz ist ein häufiger aber nicht notwendiger Befund bei Parkinson Patienten. Etwa 10-15% dieser Patienten haben zusätzlich Demenz. Diese Zahl ist als Mittelwert zu verstehen und nimmt mit zunehmendem Alter stark zu. So liegt der Anteil der Demenzen bei den über achtzigjährigen Parkinson Patienten schon bei 65% (Mayeux et al. 1990).

Morbus Parkinson ist eine progrediente Erkrankung, die, trotz der modernen symptomatischen Therapien, viele Patienten im Laufe von wenigen Jahren bis Jahrzehnten durch motorische Behinderung ans Bett bzw. an einen Rollstuhl bindet.

Insbesondere zwei pathologische Befunde charakterisieren das Gehirn von, zu Lebzeiten an Morbus Parkinson erkrankten, Patienten: Das Auftreten von Lewy-Körperchen und der Verlust pigmentierter Zellen in Mittelhirn und Hirnstamm. Lewy-Körperchen sind eosinophile, konzentrische, neuronale Einschlusskörperchen, in denen immunologisch Ablagerungen von α -Synuclein, Ubiquitin und anderen Proteinen nachgewiesen werden können (Spillantini et al. 1997; Baba et al. 1998). Bereits makroskopisch imponiert eine Depigmentierung und Verminderung der Substantia nigra des Mittelhirns. Pakkenberg et al. konnten zeigen, dass die durchschnittliche Anzahl pigmentierter Neurone der Substantia nigra von 550.000 in Gesunden bei Parkinson Patienten um 66% reduziert war (Pakkenberg et al. 1991). Daneben gehen auch dopaminerge Neurone in anderen Hirnregionen, wie z.B. dem Locus coeruleus und motorischen Vagus-kernen zugrunde. In diesem Zusammenhang seien die Arbeiten Braaks erwähnt, die pathologisch einen stadienhaften Verlauf beschreiben (Stadium 1 und 2: Medulla oblongata und Bulbus olfactorius; Stadium 3 und 4: Mittelhirn, insbesondere Substantia nigra, und basales Frontalhirn; Stadium 5 und 6: Kortex) (Braak et al. 2002).

1.3 Ätiologie

Ein klarer Pathomechanismus für die Entstehung des idiopathischen Parkinson Syndroms ist trotz der weltweiten intensiven Grundlagenforschung nicht bekannt. Die gängigen Entstehungshypothesen der letzten Jahre gehen von einem Zusammenwirken von Umweltfaktoren und einem ungünstigen genetischen Muster der betroffenen Individuen aus (Tsang und Soong 2003).

Die Beobachtung, dass das Toxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), respektive dessen aktiver Metabolit MPP⁺ (1-Methyl-4-phenyl-pyridinium), wie es z.B. in verunreinigtem Heroin vorkommt, sowohl in Tieren wie auch in Menschen irreversiblen Parkinsonismus auslösen kann, wird als Argument für eine Beteiligung von Toxinen an der Krankheitsentstehung gesehen. Des Weiteren gibt es Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Pestiziden, wie z.B. Rotenon und Paraquat, und der Entstehung von Parkinsonismus (Di Monte 2003).

Alle drei Toxine wirken als Inhibitoren der Atmungskette und zwei davon, MPTP und Paraquat, reichern sich selektiv in dopaminergen Neuronen an (Sherer et al. 2002). Von Rotenon ist keine gesteigerte Anreicherung in mit Morbus Parkinson assoziierten Zellen bekannt, es konnte aber in Tierversuchen MP-ähnliche Krankheitsmerkmale erzeugen (Perier et al. 2003).

Einen Überblick über die Gene, für die bis heute ein Zusammenhang zur Parkinsonschen Erkrankung nachgewiesen werden konnte, gibt das folgende Kapitel.

1.4 Genetik

Der Morbus Parkinson wurde in der Vergangenheit als ausschließlich sporadisch auftretende Erkrankung betrachtet. Familiäre Häufung wurde dem Zufall bzw. ähnlichen Umwelteinflüssen, denen Familienmitglieder ausgesetzt waren, zugeschrieben. Zunehmend wurden jedoch Familien mit mehreren an Morbus Parkinson erkrankten Mitgliedern entdeckt, denen unterschiedliche Mendelsche Vererbungsmuster zugrunde zu liegen schienen. Genetische Analysen identifizierten bis heute 13 Genloci, die zu monogenetisch, meist autosomal dominant oder autosomal rezessiv, vererbten Formen des Morbus Parkinson führen (Tabelle 1). Die betroffenen Familienmitglieder sind in ihrem klinischen Erscheinungsbild meist kaum von idiopathischen Formen der Erkrankung zu unterscheiden. Zum Teil gibt es aber zusätzliche atypische Symptome, die jeweils für einen Genlocus charakteristisch sind. Für einige der Genloci ist ein außergewöhnlich früher Krankheitsbeginn beschrieben. Diese insgesamt sehr seltenen Formen sollen im Folgenden

genetisch bedingter Morbus Parkinson genannt werden und so von der häufigeren, idiopathischen Form der Parkinsonschen Erkrankung abgegrenzt werden.

Locus	Protein	Chromosom	Vererbung	Lewy-Körperchen	atypische Symptome
Park1	α -Synuclein	4q21	AD	ja	früher Krankheitsbeginn, Tremor selten
Park2	Parkin	6q25.2-q27	AR	meist nicht	früher Krankheitsbeginn, häufiger Dystonie und L-Dopa-induzierte Dyskinesien
Park3	unbekannt	2p13	AD	ja	rasche Progredienz, z.T. Demenz
Park4	α -Synuclein	4p15	AD	ja	früher Krankheitsbeginn, rasche Progredienz, Demenz, posturaler Tremor, autonome Dysfunktion
Park5	UCH-L1	4p14	AD	unbekannt	keine
Park6	PINK-1	1p36	AR	unbekannt	früher Krankheitsbeginn
Park7	DJ-1	1p36	AR	unbekannt	früher Krankheitsbeginn, psychiatrische Symptome
Park8	LRRK2	12p11.2-13.1	AD	ja	Demenz, Amyotrophie
Park9	ATP13A2	1p36	AR	unbekannt	früher Krankheitsbeginn, Spastik, supranukleäre Blickparese, Demenz
Park10	unbekannt	1p32	AD	teilweise	
Park11	unbekannt	2q36-37	AD	unbekannt	
Park12	unbekannt	Xq21-q25	?	unbekannt	
Park13	HTRA2	2q12	AD	unbekannt	keine

Tabelle 1: Parkinson-assoziierte Genloci (nach Vila und Przedborski 2004; Paisan-Ruiz et al. 2004; Zimprich et al. 2004; Savitt et al. 2006; OMIM)
AD = autosomal dominant AR = autosomal rezessiv

Wie Tabelle 1 entnommen werden kann, wurde ein Teil der Gene, die an bestimmten Loci stehen, noch nicht identifiziert. Andere wiederum konnten bereits erfolgreich näher charakterisiert werden: Park1 und Park4 stehen für das Protein α -Synuclein, welches mit neuronalen Synapsen assoziiert ist (Sidhu et al. 2004). Obwohl es Hinweise auf eine Bedeutung im Rahmen der neuronalen Plastizität gibt (Clayton und George 1998), bleibt seine genaue Funktion weiter

ungeklärt. α -Synuclein, insbesondere die bekannten krankheitsauslösenden Mutanten, neigt zu Akkumulation und ist als Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen bekannt (von Bohlen und Halbach 2004). Für den zahlenmäßig größten Anteil (50%) an genetisch bedingtem Morbus Parkinson mit frühem Krankheitsbeginn ist der Park2-Locus mit dem Parkin-Gen und dem gleichnamigen Protein, einer Ubiquitin-E3-Ligase, verantwortlich (Lücking et al. 2000; Shimura et al. 2000). Dieses Gen wird im folgenden Kapitel näher beschrieben. „Ubiquitin-carboxyterminal-hydrolase L1“ (UCH-L1) heißt das Gen, für welches der Park5-Locus kodiert. Dieses Protein hat ebenfalls Ubiquitin-E3-Ligase Aktivität, spaltet aber vor allem Ubiquitin-Reste von polyubiquitilierten Proteinen ab (Liu et al. 2002). Das mitochondriale Protein „pten-induced-putative kinase1“ (PINK-1) entspricht dem Park6 Genort. Seine genaue Funktion ist bislang nicht bekannt. Valente et al. konnten nachweisen, dass gewisse Mutationen des Gens im Zellkulturexperiment unter Stressbedingungen zu einer erhöhten Zelltodrate führen (Valente et al. 2004). DJ-1 (Park7) hat, als mit Mitochondrien assoziiertes Protein, möglicherweise eine protektive Aufgabe bei oxidativem Stress und könnte so in Zusammenhang mit dem Zelluntergang bei Morbus Parkinson stehen (Bonifati et al. 2003). Schließlich ist LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), das Gen am Ort Park8, das letzte bislang identifizierte Parkinson-Gen mit unklarer Funktion (Zimprich et al. 2004).

Alle Gene können, wie beschrieben, durch Mutation zu monogenetisch-bedingten Parkinson Syndromen führen. Inwieweit sie, alleine oder in Kombination mit anderen Genen, eine Rolle bei der Entstehung des idiopathischen Parkinson Syndroms spielen, ist bis heute nicht hinreichend bekannt, wird aber diskutiert und untersucht (Klein et al. 2006; Savitt et al. 2006).

1.5 Mögliche Pathomechanismen des Morbus Parkinson

Die bis heute am intensivsten diskutierten pathophysiologischen Mechanismen für die Entstehung des Morbus Parkinson sind die mitochondriale Dysfunktion im Zusammenhang mit oxidativem Stress und die Akkumulation fehlgefalteter Proteine als Ursache oder Folge einer Einschränkung des „ubiquitin-proteasome-system“ (UPS). Betrachtet man die Liste der heute bekannten Parkinson-Gene, so zeigt sich, dass viele der Genprodukte in Bezug zu diesen Hypothesen zu bringen sind und somit deren Bedeutung unterstreichen.

Die Rolle des UPS und fehlgefalteter Proteine

α -Synuclein ist ein Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen, auch im sporadisch auftretenden Morbus Parkinson (Spillantini et al. 1997). Mutiertes α -Synuclein oder überexprimiertes Wildtyp-Protein kann aggregieren und möglicherweise das Proteasom bzw. den proteasomalen Abbau anderer Proteine behindern (Singleton et al. 2003; Chartier-Harlin et al. 2004). Es sei allerdings

darauf hingewiesen, dass auch ein alternativer Abbauweg für α -Synuclein über Lysosomen bekannt ist (Cuervo et al. 2004).

Ein anderes Park-Gen, UCH-L1, ist ein wichtiger Bestandteil des UPS. Mit seiner Ubiquitin-E3-Ligase Aktivität markiert es Proteine zum Abbau und hat damit eine ähnliche Teilfunktion wie Parkin, Siah-1 und Dofin. Seine Hauptfunktion, die Deubiquitinierung, stellt nicht nur Ubiquitin für die Ligasen bereit, sondern nimmt auch eine Kontrollfunktion bei der Degradation polyubiquitinerter Proteine dar, eine Art „proof-reading“ des UPS (Guterman und Glickman 2004). Mutierte UCH-L1 Varianten, die zu genetisch bedingtem Morbus Parkinson führen, zeigen eine verminderte Ligasefunktion und bedingen die Akkumulation von α -Synuclein in Zellkulturversuchen (Liu et al. 2002).

Wichtige Hinweise auf eine Beteiligung der Proteasomen und des UPS an der Pathogenese des Morbus Parkinson lieferten McNaught et al. in ihren Arbeiten (McNaught et al. 2003; McNaught et al. 2004).

Parkin ist als Ubiquitin-E3-Ligase integraler Bestandteil des UPS. Auf seine Bedeutung soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

Oxidativer Stress als möglicher Pathomechanismus

Die Park-Gene PINK-1 und DJ-1 weisen aufgrund ihrer Lokalisation auf eine Beteiligung der Mitochondrien bei der Entstehung der Parkinsonschen Erkrankung hin. Da es bisher nicht gelang, ihre Funktion näher zu charakterisieren, bleibt dieser Zusammenhang spekulativ und unscharf. Dass auch Parkin mit den Mitochondrien in Verbindung steht, zeigten Darios et al. (Darios et al. 2003). In ihren Versuchen, bei denen Apoptose in Zellen mittels Ceramid induziert wurde, wirkte Parkin zytoprotektiv, indem es die Freisetzung von proapoptischen Stoffen aus dem Intermembranraum sowie das Anschwellen der Mitochondrien vermindern konnte. Die Assoziation der weiter oben erwähnten Toxine bzw. Pestizide MPTP, Rotenon und Paraquat stellt ein weiteres Bindeglied zwischen der Pathophysiologie des Morbus Parkinson und den Mitochondrien dar. Alle drei hemmen selektiv den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, setzen Radikale frei und führen somit zu oxidativem Stress mit Zelltod als möglicher Folge (Przedborski et al. 2004). Oxidativer Stress durch freie Radikale und Energiemangel durch Hemmung der Atmungskette beeinträchtigen alle energieabhängigen Prozesse der Zelle und somit auch das UPS (Hartmann-Petersen et al. 2001).

Ein weiteres Zusammenspiel der Pathomechanismen oxidativer Stress und der Anhäufung fehlgefalteter Proteine stellt die Toxizität α -Synucleins dar. Die Aggregation von α -Synuclein gilt als pathologisches Merkmal des Morbus Parkinson (Baba et al. 1998). Die Toxizität der Aggregate wird dabei angenommen, ist aber nicht vollständig verstanden. Zur Aggregation des α -Synucleins kommt es, wenn das im nativen Zustand überwiegend ungefaltete Protein durch

Ligandeninteraktion oder veränderte Umgebungsparameter wie z.B. pH-Wert (durch oxidativen Stress) oder Temperatur seine Sekundärstruktur ändert (Eliezer et al. 2001; Li et al. 2001). Dies zu verhindern bzw. rückgängig zu machen ist die Aufgabe von Chaperonen. Überschüssiges oder fehlerhaftes Protein wird durch das UPS degradiert.

Somit nimmt man für den idiopathischen Morbus Parkinson an, dass, ähnlich der Amyloid-Hypothese bei Morbus Alzheimer, erhöhte Mengen an α -Synuclein, oxidativer Stress, das Einwirken von Toxinen und andere bislang unbekannte Mechanismen die Neigung zur Fehlfaltung des Proteins erhöhen. Ist zudem die Funktion der schützenden Chaperone oder die Degradation durch das UPS gestört, bilden sich toxische Protofibrillen und daraus Lewy-Körperchen (Abbildung 1).

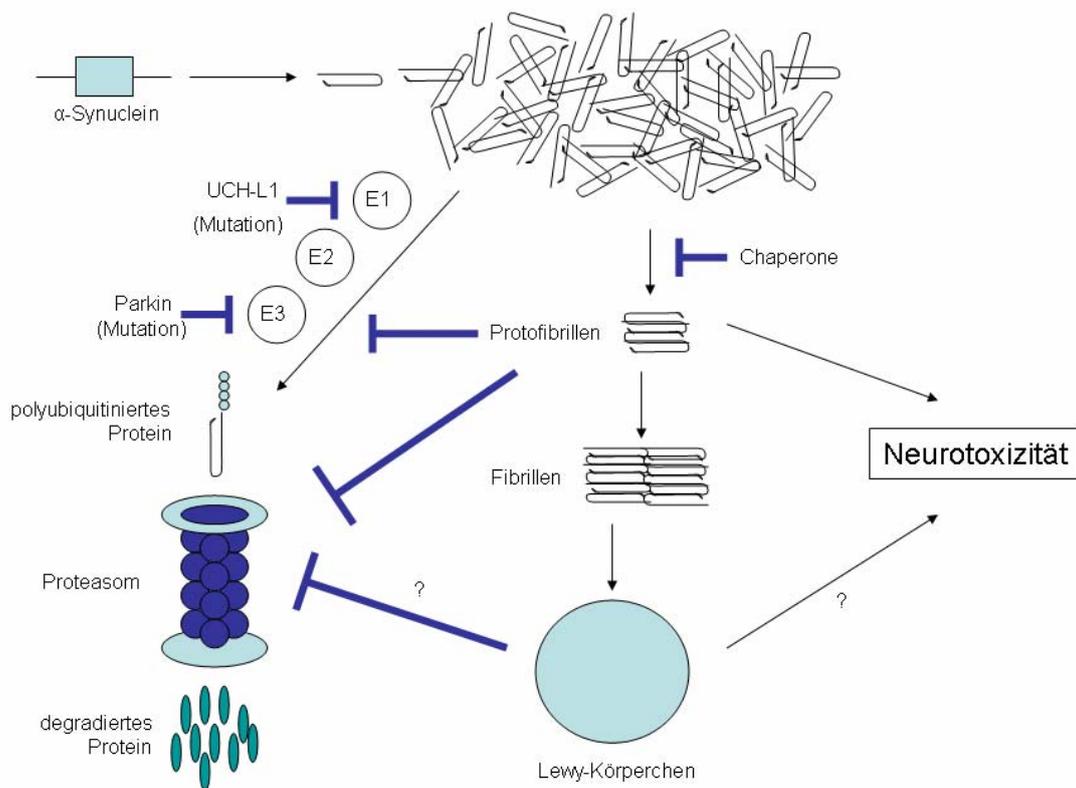


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines möglichen Pathomechanismus des Morbus Parkinson mit fehlgefalteten Proteinen und dem UPS. Stress durch fehlgefaltete Proteine, hier am Beispiel α -Synucleins, führt zum Zelltod. Ein Überangebot α -Synucleins und dessen erhöhte Neigung zur Fehlfaltung (z.B. durch α -Synuclein-Mutationen bei familiärem MP; weitere Ursachen siehe Text) lässt die Moleküle zu Protofibrillen polymerisieren. Dieser Prozess wird durch Dysfunktion von Chaperonen verstärkt. Das „molecular crowding“ der fehlgefalteten Proteine wird durch ein funktionstüchtiges UPS antagonisiert, denn die ubiquitinierenden Enzyme E1-E3 und das Proteasom degradieren diese. Mögliche Ursachen proteasomaler Dysfunktion, neben krankheitsauslösenden Mutationen im Parkin- bzw. UCH-L1-Gen, wie hier dargestellt,

werden im Text diskutiert. Protofibrillen formen letztendlich Lewy-Körperchen. Es gibt Hinweise, dass Protofibrillen, mehr noch als Lewy-Körperchen selbst, die neurotoxischen Substanzen darstellen (frei nach Ropper und Brown S. 920).

Die Grundlage dieser Hypothese bildet das Verständnis für die molekularen Stoffwechselwege α -Synucleins und die Funktion der anderen Park-Gene, das durch die Erforschung der genetisch bedingten Formen der Parkinsonschen Erkrankungen erlangt wurde. So verursachen beispielsweise Mutationen im α -Synuclein-Gen unmittelbar dessen Aggregation oder Mutationen von Parkin schränken seine zytoprotektive Funktion ein.

Dieses Konzept der Anreicherung toxischer Proteinablagerungen bildet möglicherweise eine gemeinsame pathomechanistische Basis von Krankheiten wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und ALS (amyotrophische Lateralsklerose). Wie es jedoch im Fall des MP zur selektiven Schädigung dopaminerger Neurone kommt, bleibt weiterhin Gegenstand der Grundlagenforschung.

1.6 Die untersuchten Gene

Drei Gene sind Gegenstand dieser Arbeit: Parkin, Siah-1 und Dornin. Sie sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden. Alle drei gehören zur Familie der Ubiquitin-E3-Ligasen und sind Bestandteil des UPS. Im Zuge des „human genome mapping project“ wurden hunderte von Genen identifiziert, die potentiell zur Gruppe der Ubiquitin-E3-Ligasen zählen. Ob, außer Parkin, andere Gene dieser Familie zur Entstehung des Morbus Parkinson oder anderer neurodegenerativer Erkrankungen beitragen, ist Gegenstand der Forschung (Ardley und Robinson 2004).

Parkin und ARJP („autosomal recessive juvenile parkinsonism“)

Das Park2-Gen Parkin verdeutlicht am besten die Rolle des UPS an der Pathogenese des Morbus Parkinson. Auch unter den mit Parkinson assoziierten Genen (Park 1-13) spielt es eine bedeutende Rolle, da es, wie oben erwähnt, für einen großen Teil der monogenetisch bedingten Formen verantwortlich ist. Es ist seit seiner Entdeckung (Kitada et al. 1998) Ziel intensiver Forschung.

Die mit Parkin-Mutationen assoziierten Varianten der Parkinsonschen Erkrankung fasst man unter dem Terminus ARJP („autosomal recessive juvenile parkinsonism“) zusammen. Ihre Merkmale sind ein monogenetischer, autosomal rezessiver Erbgang, ein häufig frühes Erkrankungsalter und typischer Parkinsonismus, bei dem zusätzliche Symptome wie Dystonie und Levodopa-induzierte Dyskinesien häufiger auftreten (Lücking et al. 2000). Wichtigster Befund pathologischer Studien ist die Abwesenheit von Lewy-Körperchen in post-mortem Gehirnen von ARJP-Patienten (Hayashi et al. 2000) bzw. deren äußerst seltener Nachweis (Farrer et al. 2001; Pramstaller et al.

2005). Dies wirft die Frage auf, welche Rolle normales Parkin bei der Entstehung von Lewy-Körperchen spielt.

Parkin setzt sich aus sechs charakteristischen Domänen zusammen: Die N-terminale „ubiquitin-like-domain“ vermittelt die Bindung an das 19S-Proteasom. Sie kommt auch in anderen Proteinen, die mit dem Proteasom interagieren, vor (Townsend et al. 2003). Weiter C-terminal folgt die „unique-parkin-domain“ oder „central domain“. RING-IBR-RING heißt der dreiteilige Domänenkomplex, der sich anschließt. Zwei RING-Domänen („really-interesting-new-gene“) werden durch die IBR-Domäne („in-between-RING“) getrennt. Der gesamte Komplex steht im Zentrum der katalytischen Aktivität Parkins. Den Abschluss am C-Terminus bildet eine so genannte PDZ Domäne. Sie ist verantwortlich für die Bindung mit anderen Proteinen.

Obwohl Mutationen des Parkin-Gens, die zu ARJP führen, in allen Domänen nachgewiesen wurden, gibt es eine leichte Häufung in der RING-IBR-RING Region, insbesondere im ersten RING Abschnitt (Abbildung 2). Dies weist auf die besondere Bedeutung dieser Region für die Funktion Parkins hin (von Coelln et al. 2004).

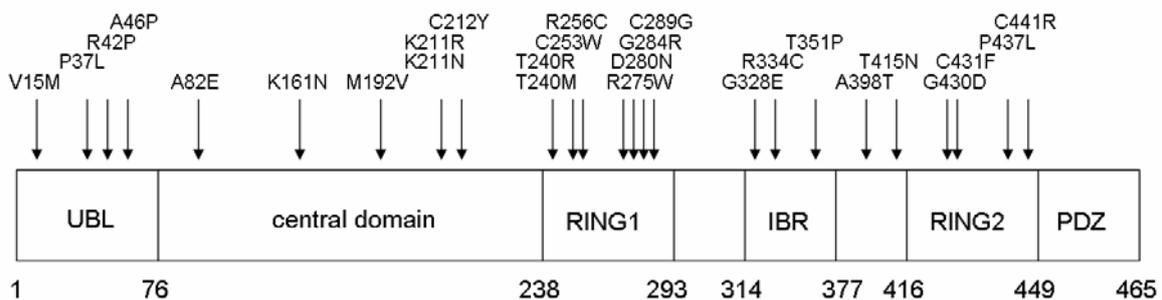


Abbildung 2: Schema der Struktur Parkins sowie ARJP-Mutationen mit Austausch von Aminosäuren (nach von Coelln et al. 2004).

UBL = „ubiquitin-like-domain“; RING = „really-interesting-new-gene“; IBR = „in-between-RING“; PDZ = PDZ-Domäne

Als Protein aus der Gruppe der Ringfinger Ubiquitin-E3-Ligasen besteht die Hauptaufgabe Parkins in der Polyubiquitinierung (mindestens vier Ubiquitin-Reste) von Substraten, um diese für die Degradation durch das 26S Proteasom zu markieren (Thrower et al. 2000). Dadurch werden essenzielle Prozesse der Zellen kontrolliert, wie z.B. die Transkription (Salghetti et al. 2001), die Zelldifferenzierung (Liao et al. 2004) oder der Zellzyklus (Yamasaki und Pagano 2004). Die Ubiquitin-E3-Ligase Aktivität wurde in vitro wiederholt nachgewiesen (Imai et al. 2000; Shimura et al. 2000; Zhang et al. 2000). Es ist eine stetig wachsende Anzahl von

Interaktoren mit dem Parkin-Protein bekannt. Einige wirken zusammen mit Parkin an der Regulation oder Funktion des UPS und seiner proteindegradierenden Aufgabe mit, wie z.B. E2-Ubiquitin-conjugating Enzyme wie UbcH7 oder UbcH8 (Tanaka et al. 2001), die $\alpha 4$ Untereinheit des 20S Komplexes des Proteasoms (Dächsel et al. 2005), oder HSP70 und Chip, von denen eine Steigerung der enzymatischen Aktivität Parkins bekannt ist (Imai et al. 2002). Die Mehrzahl aber sind Substrate Parkins. Deren Funktion und Lokalisation ist oft nicht oder nur teilweise bekannt. Soweit bekannt, lässt sich in dieser Gruppe kein Muster oder funktionelle Zusammengehörigkeit erkennen. Dazu gehören unter anderem CDCrel-1 (Zhang et al. 2000), der Rezeptor Pael-R (Imai et al. 2001), das Zellzyklus-Regulationsprotein Cyclin E (Staropoli et al. 2003), die Zytoskelett-Bestandteile α -Tubulin (Ren et al. 2003) und β -Tubulin (Cappelletti et al. 1999) und die mit Synapsen assoziierten Proteine Synphilin-1 (Chung et al. 2001) und eine glycosilierte Variante α -Synucleins α Sp22 (Shimura et al. 2001).

Tatsächlich konnten Shimura et al. zeigen, dass bei Parkin-Mutationsträgern (ARJP) die glycosilierte Form α -Synucleins akkumuliert. Da es hierbei nicht oder nur sehr selten zur Ausbildung von Lewy-Körperchen kommt und zudem der besonders frühe Krankheitsbeginn imponiert, scheint funktionsfähiges Parkin bei der Entstehung von Lewy-Körperchen im idiopathischen Morbus Parkinson beteiligt zu sein und möglicherweise einen zytoprotektiven Effekt zu haben. Wie weiter oben erwähnt, zeigen Darios et al. eben diesen Effekt im Zellmodell (Darios et al. 2003). Weitere Hinweise darauf geben z.B. auch Staropoli oder Vercammen (Staropoli et al. 2003; Vercammen et al. 2006). Auch der rezessive Erbgang des ARJP spricht für eine loss-of-function Mutation eines schützenden Gens. Wie jedoch Parkin im Detail an der Entstehung von Lewy-Körperchen beim idiopathischen Parkinson Syndrom beteiligt ist, bleibt weiterhin ungeklärt.

Ein denkbarer, sehr einfacher, Pathomechanismus beim ARJP wäre die primäre Akkumulation von Parkin-Substraten, die dadurch toxisch werden und zum Zelltod führen. In Parkin-knock-out-Mäusen konnte bisher jedoch keine Anhäufung von Substraten gefunden werden (Goldberg et al. 2003).

Es gibt Hinweise, dass eine Dysfunktion Parkins durch oxidative Stressbedingungen, der, wie erläutert, als Pathomechanismus für MP diskutiert wird, verursacht werden kann. Das Parkin-Protein neigt unter oxidativem Stress zur Fehlfaltung und Aggregation (Winklhofer et al. 2003). Außerdem wird Parkin bei Inhibition des Komplexes I der Atmungskette S-nitrosyliert und dadurch in seiner katalytischen Aktivität eingeschränkt (Yao et al. 2004).

Ob und in welchem Sinne die Expression Parkins, auf RNA- oder Protein-Ebene, unter Zellstressbedingungen reguliert ist, liegen nur wenige und widersprüchliche Erkenntnisse vor (West et al. 2003; Imai et al. 2000; Biasini et al. 2004; vergleiche dazu auch Diskussion).

Zwei weitere Ubiquitin-E3-Ligasen: Siah-1 und Dorfin

Siah-1 und Dorfin sind, wie Parkin, Mitglieder der Genfamilie der Ubiquitin-E3-Ligasen und stehen möglicherweise im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Ardley und Robinson 2004). Alle drei untersuchten Ligasen haben ein gemeinsames Substrat, Synphilin-1 (Chung et al. 2001; Liani et al. 2004; Ito et al. 2003). Da gezeigt werden konnte, dass proteasomale Dysfunktion zur Bildung von polyubiquitinierten Synphilin-1-Einschlusskörperchen führt, kommt ihnen möglicherweise eine Bedeutung bei der Pathogenese des Morbus Parkinson zu (Avraham et al. 2005).

Siah-1 ubiquitiniert darüber hinaus auch α -Synuclein und ist in Lewy-Körperchen nachweisbar. Es konnten jedoch bislang keine krankheitsauslösenden Mutationen gefunden werden (Franck et al. 2006).

Dorfin ist eine RING-finger Ubiquitin-E3-Ligase und ebenfalls Bestandteil von Lewy-Körperchen (Ito et al. 2003). Niwa et al. beobachteten eine Akkumulation von ubiquitiniertem Dorfin nach proteasomaler Inhibition mit MG132 in Zellkulturexperimenten (Niwa et al. 2001).

Ansonsten lagen keine Daten über die differentielle Expression von Siah-1 und Dorfin unter Zellstressbedingungen vor.

1.7 Grundlagen dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersuchte die funktionelle Regulation von drei Ubiquitin-E3-Ligasen unter mit Morbus Parkinson assoziierten Zellstressbedingungen in einem Zellkulturmodell. Dabei wurde sowohl die Expression auf mRNA-Ebene untersucht, als auch die Proteinebene, welche möglicherweise mit einer höheren physiologischen Relevanz versehen ist.

Um diese zu messen, wurden gängige molekularbiologische Methoden verwandt, namentlich RT-PCR und Western Blot. Die Validität des Zellmodells ist für die Relevanz der Versuche essentiell. In dieser Arbeit werden PC12 Zellen eingesetzt. Es handelt sich um eine Zelllinie, die einem Tumor (Phäochromozytom) des Nebennierenmarks der Ratte entstammt (Greene und Tischler 1976). Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie, insbesondere nach Zugabe von „nerve growth factor“ (NGF), einen neuronalen, dopaminergen Phänotyp ausbildet (Greene et al. 1998). Auf diese Differenzierung durch NGF wurde hier aus versuchstechnischen Gründen verzichtet. Die PC12 Zelllinie ist ein anerkanntes und, neben der humanen SH-SY5Y-Zellreihe, das wichtigste Zellmodell für die Erforschung der Parkinsonschen Erkrankung (Greene 1998; siehe z.B. auch Darios et al. 2003; Biasini et al. 2004).

Des Weiteren wurden chemische Substanzen eingesetzt, um einige der weiter oben diskutierten möglichen Pathomechanismen zu imitieren. Die Zellen wurden in Kultur, durch Zugabe von Toxinen zum Nährmedium, in Stressbedingungen versetzt, die den physiologischen

Gegebenheiten in vivo möglichst ähnlich sein sollten. Hierzu wurden gängige, in der aktuellen Literatur häufig eingesetzte Substanzen, verwandt. Diese sind im Einzelnen: MG132 für proteasomale Inhibition (McNaught et al. 2004; Tan et al. 2005; Setsuie et al. 2005), Rotenon für mitochondriale Inhibition (Wang et al. 2005; Casarejos et al. 2006), Tunicamycin für Stress durch fehlgefaltete Proteine (West et al. 2003; Imai et al. 2000) und H₂O₂ für oxidativen Stress (Tan et al. 2005; Wersinger et al. 2003).

Eine weitere Grundlage dieser Arbeit war die Annahme, dass Parkin eine zytoprotektive Funktion hat (Darios et al. 2003; Staropoli et al. 2003; Vercammen et al. 2006). Somit wurde eine Hochregulation Parkins unter Stressbedingungen vermutet, die beispielsweise für Zellstress durch Tunicamycin bereits beschrieben wurde (Imai et al. 2000).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der endogenen Expression der Ubiquitin-E3-Ligasen Parkin, Siah-1 und Dornin unter definierten, mit Morbus Parkinson assoziierten, Zellstressbedingungen. Dadurch sollte ein Beitrag zum Verständnis der Rolle Parkins im Speziellen und der Ubiquitin-E3-Ligasen im Allgemeinen bei der Entstehung des idiopathischen Parkinson Syndroms erbracht werden. Insbesondere für Parkin wurde eine Heraufregulation aufgrund seiner potentiell zytoprotektiven Funktion erwartet. Die anderen Ubiquitin-E3-Ligasen, Siah-1 und Dornin, dienten hierbei unter anderem als Spezifitätskontrolle. Zum Erreichen der genannten Ziele waren notwendig:

1. Die Etablierung eines geeigneten Versuchsablaufs (Zellkultur, Inkubationszeiten, Zellzahl- und dichte, etc.) in einem anerkannten Zellmodell (PC12 Zellen).
2. Die Etablierung eines Zelltodassays: Die Auswahl geeigneter Stressoren, die Titrierung der einzusetzenden Konzentrationen, um vergleichbare, reproduzierbare Zellstressbedingungen (Zelltodanteil) zu erreichen, sowie das Erlernen und Modifizieren von Methoden zur Zelltodquantifizierung, wie FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie.
3. Die Etablierung der RT-PCR und geeigneter Methoden zur Qualitätssicherung zur Untersuchung der mRNA-Expression.
4. Untersuchung der Proteinveränderungen im Westernblot zur Charakterisierung der physiologischen Relevanz einer möglichen mRNA-Regulation.

2 Material

2.1 Allgemeine Ausrüstung

96-well-plate	MicroWell™-Platten aus Polystyrol, U-Boden, Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Germany
Blot-Kammer	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad Laboratories, München, Germany
Blot-Papier	extra thick Blot Paper, Protean xi size, BioRad Laboratories, München, Germany
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Einmalröhrchen	V _{max} [ml]: 14ml, Polystyrol-Nunc-Einmalröhrchen, NUNC™, Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Germany
Entwicklungsmaschine	Agfa Scopix LR5200, Agfa Gevaert N.V., Mortsel, Belgium
Eppendorf tubes	V _{max} [ml]: Safe-Lock 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml, Safe-Lock 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml Biopur, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
FACS-Röhrchen	Alpha 1,2 ml Microtubes Loose NS, Josef Peske oHG, Aindling-Pichl, Germany
Film	BioMax MR Film MR-1, Kodak Industries, Chalon-sur-Saone, France
Filtrationssystem	Stericup, Milipore Corporation, Eschborn, Germany
Kanülen	BD Microlance™ 3, Heidelberg, Germany
Küvetten	Quartz spectrophotometer cell micro, BioRad Laboratories, München, Germany
Eppendorf Uvette	Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
Light-Cycler	Light-Cycler 2.0 instrument, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany
Light-Cycler Kapillaren	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany
Mikroplattenleser	Multiskan RC, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland
Mikroskope	Zeiss Axiovert 25, Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany
PCR tubes	Thermo-Fast® 96 PCR Plates, PEQLAB, Erlangen, Deutschland 8er Domed Cap StripesPEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany
Pipetus	Pipetus® Akku, Hirschmann®Laborgeräte, Eberstadt, Germany
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P100, P200, P1.000, Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France
Pipettenspitzen	Safeseal Tips Premium 10µl, 200µl, 1.000µl, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany epT.I.P.S. 10µl, 200µl, 1.000µl, Biopur, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany
RNase Away	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Sterilpipetten	Costar®Stripette, 5, 10, 25 ml, serological pipets, Myriad Industries, San Diego, USA
pH-Meter	pH-Digi 520, Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten GmbH & Co KG (WTW), Weilheim, Germany
Photometer	Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg im Br., Germany
Power Supply	Power Pac HC, BioRad Laboratories, München, Germany
kon. Rundbodengefäße	Falcon® BLUE MAX™ 50ml Polypropylen Conical Tube, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Schüttler	KM-2, Edmund Bühler GmbH & Co., Bodelshausen, Germany

Software	Ascent Software for Multiscan RC, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland CellQuest™pro 4.0, BD Bioscience, San Jose, USA Light Cycler Software Version 3.5, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany
Sonifizierer	Bandelin Sonoplus HD2200, Bandelin electronic GmbH & Co, KG, Berlin, Germany
Spinning-Wheel Spritzen	NeoLab Rotator 2-1175, Heidelberg, Germany V _{max} [ml]: 1, 2, 5ml, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany
Thermoblock	Block Heater, Stuart Scientific, Redhill in Surrey
Thermo-Cycler	PTC 200 Peltier Thermo Cycler, MJ Research, Waltham, USA
Waage	GX-400, AND A&D Weighing, Bradford, USA
Wippe	Mini Rocker MR1, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Germany
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415R, Eppendorf GmbH, Hamburg, Germany Megafuge 2.0R, Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany

2.2 Zellkultur-Ausrüstung

6-well/24-well-plates	BD Falcon™ Multiwell Cell Culture Plates, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Cryotubes	Nunc Cryoröhrchen, Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Germany
Cover-slips	mikroskop. Deckgläser rund Ø13mm, Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Germany
Filter	Stericup GV, Millipore, Schwalbach, Germany
Haemocytometer	Neubauer improved, LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Germany
Inkubator	HERAcell®150, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, Germany
Sterilbank	HERAsafe HS18, Heraeus Instruments GmbH, Fellbach, Germany
Zellkulturflaschen	Zellkulturflaschen 25cm ² und 75 cm ² , PS, gammasterilisiert, Corning B.V., Schiphol-Rijk, Netherlands
Zellkulturschalen	Ø [cm]: 10, BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Zellschaber	BD Zellschaber 25mm, BD Biosciences, Heidelberg, Germany

2.3 Kommerzielle Kits

1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden, Germany
RNeasy®Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Germany
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford, USA

2.4 Gele, Puffer, Lösungen

2.4.1 Zellkultur

PC12 Medium:

DMEM (+4500mg/l Glucose+L-Glutamin+Pyruvat)		Invitrogen-Gibco
Horse Serum	10%	Invitrogen-Gibco
Foetal Calf Serum (tet approved)	5%	PAA Laboratories GmbH
G 418	100mg/l	Invitrogen-Gibco
L-Glutamine	10mM	Invitrogen-Gibco
Penicillin/Streptomycin	100mg/l	Invitrogen-Gibco

Einfriermedium:

Vollmedium s.o.	70%	
Fetal Calf Serum (tet. approved)	20%	Invitrogen-Gibco/PAA
DMSO	10%	SIGMA

2.4.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese: Puffer und Gele

TNT-Lyse-Puffer:	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	200 mM
	Nonidet 40	0,5 %
	bei pH = 8	

Complete Mini (Proteinase- Inhibitor)	1 :100
---------------------------------------	--------

Laemmli-Puffer (3fach) :	Glycerin	20%
	SDS	3%
	EDTA pH 8,0	10mM
	Bromphenolblau	0,05%
	β-Mercaptoethanol 10% (vor Verwendung zuzusetzen)	
	Aqua purificata ad Volumen	

“4 x Lower Tris”:	Tris-Base	181,7 g
	SDS 10%-Lsg.	40 ml
	Aqua purificata	ad 1.000 ml
	pH = 8,8	

“4 x Upper Tris“:	Tris-Base	60,6 g
	SDS 10%-Lsg.	40 ml
	Aqua purificata	ad 1.000 ml
	pH = 6,8	

Trenngel:	4 x Lower Tris	3,75 ml
	H ₂ O	6,08 ml
	30% Acrylamid/Bis 29:1	5.0 ml
	APS (10%)	125µl
	TEMED	12,5µl

Sammelgel:	4 x Upper Tris	1,7 ml
	H ₂ O	4,9 ml
	30% Acrylamid/Bis 29:1	925µl
	APS (10%)	75µl
	TEMED	7,5µl

“10 x Laufpuffer“:	Tris-Base	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	Aqua purificata	ad 1.000 ml

Blotpuffer:	Tris-Base	3,03 g
	Glycin	14,4 g
	Methanol	200 ml
	Aqua purificata	ad 1.000 ml

Fixierpuffer:	Essigsäure	10 %
	Methanol	50 %
	Aqua purificata	ad Volumen

PBS(10X):	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	14,8 g
	KH ₂ PO ₄	2,3 g
	NaCl	90,0 g
	Aqua purificata	ad 1.000 ml

TBST:	Tris/HCl- 1M Lsg.	100 ml
	NaCl- 5M Lsg.	300 ml
	Tween 20	10 ml
	Aqua purificata	ad 1.000 ml
	pH = 7,5	

TBS: s.o. ohne Tween 20-Zusatz

2.4.3 Durchflusszytometrie

FACS TM -Puffer:	PBS	49,0 ml
	FBS	1,0 ml

HEPES-Binding-Buffer:	Hepes	0,01 M
	NaCl	0,14 M
	CaCl ₂	2,50 mM
	pH = 7,4	

2.4.4 RNA-Isolation und RT-PCR

TBE-Puffer(10X):	Tris-HCl	109,9 g
	Borsäure	55,0 g
	EDTA	9,3 g
	pH = 8,3-8,5	

FA-Puffer (10x):	MOPS	200 mM
	Natriumazetat	50 mM
	EDTA	10 mM
	Aqua purificata	ad 1.000 ml
	pH = 7,0	
FA-Puffer (1x):	10x FA-Puffer	100 ml
	Formaldehyd (37%)	20 ml
	Aqua purificata	ad 1.000 ml
RNA-loading-buffer (5x):	gesättigte Bromophenol Blau Lösung	16 µl
	500 mM EDTA (pH = 8,0)	80 µl
	Formaldehyd (37%)	720 µl
	Glyzerin	2 ml
	Formamid	3,084 ml
	FA-Puffer (10x)	4 ml
Blaufärbepuffer:	Glycerin	20 ml
	EDTA 0,5 M	8 ml
	SDS	4 ml
	Bromphenolblau	20 mg
	Xylencyanol	20 mg
	Aqua purificata	8 ml
	pH = 8	

2.5 Antikörper

Spezifität	Name	Verdünnung	Spezies	Typ	Hersteller
α -Actin primär AK	Anti-Actin antibody produced in rabbit/ affinity isolated	1:200	Kaninchen	gereinigtes anti-Actin Antiserum	Sigma A2066
α -Parkin primär AK	Parkin Antibody	1:1000	Kaninchen	polyklonal	Cell Signalling 2132
α -rabbit sekundär AK	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/ HRP	12000	Ziege	polyklonal	DakoCytoma- tion P0448

Tabelle 2: Antikörper im Western Blot.

2.6 Chemikalien und sonstige Materialien

N-Acetyl-D-Sphingosin/Ceramid	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Albumin	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Ammoniumperoxodisulfat	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Bisbenzimid H33342 (Höchst)	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Borsäure	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Bromphenolblau	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Calciumchlorid Dihydrat	SIGMA, Deisenhofen, Germany

Chloroform	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Cycloheximid Ready Made	SIGMA, Deisenhofer, Germany
DMSO	SIGMA, Deisenhofen, Germany
DNA Größenmarker „SmartLadder“	Eurogentec, Seraing, Belgium
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Essigsäure (Eisessig)	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Ethanol (absolut)	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Ethidiumbromid	SIGMA, Deisenhofen, Germany
FACSFlow™ Sheath Fluid	BD Biosciences, San Jose, USA
Formaldehyd 37%	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Formamid	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Frischhaltefolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Glycerol BioChemikaUltra	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Glycin	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
HEPES SigmaUltra	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Immersol™	Carl Zeiss AG, Göttingen, Germany
Isopropanol	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Kaliumacetat	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Kaliumchlorid	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Kaliumhydroxyd	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Lactacystin	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
LE Agarose Sea Kem®	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostic, Mannheim, Germany
Magermilchpulver „Naturaflo“	Töpfer GmbH, Dietmannsried, Germany
Magic Mark™ Western Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
β-Mercaptoethanol	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Methanol	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
MG132	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
MOPS	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Natriumacetat	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Natriumchlorid	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Natriumdeoxycholat	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Natriumhydroxyd	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Paraformaldehyd	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
pBR322 molekularer Marker	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Plus Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Poly-D-Lysinhydrobromid	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Precision Plus Protein All Blue Standards	BioRad Laboratories, München, Germany
Primer (sämtliche)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Propidiumiodid	SIGMA, Deisenhofen, Germany

Proteaseinhibitor „Complete, Mini“	Roche Diagnostic, Mannheim, Germany
Rotenon	SIGMA, Deisenhofen, Germany
SDS	SIGMA, Deisenhofen, Germany
TEMED	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Trizma Base	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Triton-X-100 SigmaUltra	SIGMA, Deisenhofen, Germany
Tunicamycin	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Tween 20	Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Germany
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Xylencyanol	Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Germany

2.7 Zellen

Tet-off PC12 Zellen:

Organismus: *rattus norvegicus*

Gewebe: Nebennierenmark

Morphologie: nach NGF Zugabe und Differenzierung, Ähnlichkeit zu sympathomimetischen Neuronen

PC12 Zellen wurden 1976 aus einem Phäochromozytom einer Labormaus geklont (Greene und Tischler 1976). PC12 Zellen zeichnen sich, ähnlich ihren physiologischen Vorläuferzellen, den adrenergen chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes, durch die Produktion von Katecholaminen aus. Bei dem verwendeten Zelltyp handelt es sich um stabil transfizierte Zellen, die ein tet-off Regulatorprotein überexprimieren, ansonst aber sekundär genetisch unverändert sind (# C3006-1, Clontech, Palo Alto, USA).

3 Methoden

3.1 Bereits etablierte Methoden

Die hier beschriebenen Methoden waren im Labor bereits etabliert und wurden für die hier beschriebenen Versuche erlernt und modifiziert angewandt.

3.1.1 Zellkultur

Zellzählung

Beim Ausplattieren der Zellen wurden, um für die Versuche reproduzierbare Zellzahlen einzusetzen, die Zellen zunächst nach standardisierter Methode gezählt. Die abgeschabten und zentrifugierten (1.000 U/min, 4°C) Zellen wurden in 1 ml Nährmedium resuspendiert, hiervon wurden 10 µl abgenommen und 1:10 verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden wiederum 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Alle Zellen in den vier Quadranten wurden gezählt und dabei darauf geachtet, Zellen auf Begrenzungslinien nicht doppelt zu zählen. Der Mittelwert der Zellen in den vier Quadranten multipliziert mit 10^5 ergibt die Zellkonzentration (Zellzahl pro ml).

Kultur, „splitting“ und Ausplattieren

Die PC12 Zellen wurden in Brutschränken gehalten, welche eine klimastabile, von Licht abgeschirmte Atmosphäre boten. Die Brutschrankluft war wasserdampfgesättigt, auf 37°C temperiert und mit 5% CO₂ angereichert. Als Adhäsionsfläche kamen große (75 cm² Bodenfläche mit 15 ml Medium) und kleine (25 cm² Bodenfläche mit 5 ml Medium) Kulturflaschen zum Einsatz.

Bei normalem Wachstum verdoppelten sich die Zellen alle 2-4 Tage und wurden dann in der Regel auf zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt (halbiert). Mit diesem Vorgang, der „splitting“ genannt wird, erhöht sich definitionsgemäß die Passage der Zellreihe um 1. Die ersten Versuche wurden mit PC12 Zellen der Passage 12 gestartet; nie wurden Passagen größer als 36 eingesetzt. Die Dokumentation der Passagezahl war wichtig, um Veränderungen des Zellmodells, die durch vererbliche Merkmalsänderungen mit steigender Passagezahl auftreten können, zu kontrollieren.

Durch mechanische Ablösung mittels eines Plastikschabers konnten adhäsive Zellen problemlos abgelöst werden. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (1.000 U/min, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet in Medium resuspendiert und dann entweder halbiert oder die Zellzahl bestimmt (siehe oben) und die Zellen für Versuche in der gewünschten Konzentration ausplattiert.

Um in allen Kulturflaschen die identische Zellkonzentration zu erhalten, wurde ein so genannter „master mix“ erzeugt, der dann auf die Flaschen aufgeteilt wurde.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Konzentration der Zellen im Einfriermedium betrug zwischen 2×10^6 und 5×10^6 Zellen pro ml Medium. Die pelletierten Zellen wurden zunächst in 70% Vollmedium des geplanten Gesamtvolumen an Einfriermedium resuspendiert und dann dem bereits in ein Cryovial (Einfrierbehältnis) vorgelegten FCS (fetal calf serum; 20%) und DMSO (Dimethylsulfoxid; 10%) beigemischt. Dies erfolgte bei 4°C. Die Zellsuspension wurde sofort im Gefrierschrank bei -80°C über Nacht eingefroren. Danach wurde das Cryovial zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

Zum Auftauen wurden die Cryovials mit der Zellsuspension im Wasserbad bei 37°C schnell erwärmt, und mit 10 ml Medium in ein neues Falcon-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation (1.000 U/min, 4°C) und Resuspension in 1 ml Medium wurde das Zellpellet ausplattiert, wie oben beschrieben.

3.1.2 Zelltodquantifizierung

Durchflusszytometrie

Das eingesetzte Durchflusszytometer (FACS-Gerät) war vom Typ FACSCalibur™ (FACS steht für „fluorescence activated cell sorter“). In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um den Zelltodanteil einer Zellkultur-Versuchseinheit zu bestimmen, d.h. den Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen an der Gesamtpopulation nach Behandlung mit verschiedenen Stressoren. Nach der Zellernte in Pufferlösung suspendierte Zellen wurden im FACS-Gerät durch eine enge Kapillare so an einem Laserstrahl vorbeigelenkt, dass zu jedem Zeitpunkt nur eine einzige Zelle vom Lichtstrahl erfasst wurde.

Die dabei gemessene Brechung und Beugung des Laserstrahls erlaubte die Berechnung der Größe und Granularität der passierenden Zelle. Außerdem konnten gesondert die Emissionen fluoreszierender Reagenzien (hier Propidiumiodid), welche zuvor in die Zellen aufgenommen worden waren, quantifiziert werden.

Ein besonderer Vorteil der Apparatur bestand in der Möglichkeit, bestimmte Zellpopulationen, die in die Zählung mit eingehen sollen, herauszufiltern. So ließen sich beispielsweise Zelltrümmer (Debris) durch den Einsatz geeigneter „gates“ von vollständigen Zellen abgrenzen und aus der Analyse ausschließen. Unter „gates“ versteht man vom Anwender definierte Bereiche innerhalb der „dot-plots“ (Diagramme, in denen ein Punkt eine Zelle repräsentiert), die in die Analyse ein- oder auszuschließen sind. Eine beispielhafte Darstellung zeigt Abbildung 6.

Zur Durchführung des Experimentes wurden die verwendeten PC12 Zellen ohne vorherigen Mediumwechsel (dieser hätte die toten Zellen entfernt) vorsichtig durch Abschaben abgelöst und in ein 50 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation (1.000 U/min, 5 min, 4°C) erfolgte die Resuspension in FACS-Puffer (2% FCS in PBS) mit einer ungefähren Endkonzentration von 200.000 Zellen/ml und der Transfer in Probenröhrchen. Vor der Messung erfolgte die Zugabe von Propidiumiodid (1 mg/ml Stammlösung, wird 1:2000 verdünnt eingesetzt) und Homogenisierung durch kurzes Vortexen. Auf die schnelle Verarbeitung (< 5 min) wurde wegen der Lichtempfindlichkeit des Propidiumiodids geachtet.

In die Messung wurden dann jeweils 10.000 Zellen pro Probe mit einbezogen, d.h. das FACS-Gerät misst die o.g. Eigenschaften von 10.000 zufällig ausgewählten Zellen der Probe und wertet diese statistisch aus. Diese Anzahl wurde als groß genug erachtet, um Rückschlüsse auf die gesamte Population zu erlauben. Numerisch und in Diagrammen konnte so der Zelltodanteil ermittelt werden.

Zusätzlich zur FACS-Analyse wurden sämtliche Proben im Mikroskop begutachtet, um einen ungefähren Eindruck über den Zellzustand der Zellen und den Anteil schwimmender Zellkörper zu erlangen.

Höchst- und Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv Doppelstrang-DNA bindet (Interkalation) und damit DNA-Quantifizierung ermöglicht (Krishan 1975). Plasmamembranen vitaler Zellen können von PI nicht überschritten werden, stattdessen kann es sich aber in den Nuklei toter und sterbender Zellen anreichern. Einzelstrang-DNA wird von PI nicht gebunden. Interkaliertes PI fluoresziert wesentlich stärker als lösliches. Diese Tatsache macht man sich im Fluoreszenzmikroskop zunutze, wo sich tote bzw. sterbende Zellen mit einem rot gefärbten Nukleus zeigen. Das Erregungsmaximum liegt bei 493 nm, das Emissionsmaximum bei 632 nm. Das Propidiumiodidpulver wurde in PBS gelöst. Die Stammlösung (Lagerung bei 4°C) hat die Konzentration 1 mg/ml, die Arbeitslösung 50 µg/ml und die Endkonzentration in der Zellsuspension (FACS-Röhrchen und Kulturschale) beträgt 0,5 µg/ml (1:2.000 der Stammlösung). Nach Propidiumiodidzugabe wurde die Zellsuspension auf Eis gehalten und schnell (< 5 Minuten) mittels Durchflusszytometrie bzw. Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Höchst (Bisbenzimid H 33258) ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der AT-reiche DNA-Bereiche bindet und sich somit zur Darstellung und Quantifizierung von DNA und insbesondere Chromosomen eignet. Der Farbstoff ist nicht toxisch und leicht membrangängig. Im Gegensatz zu Propidiumiodid, welches apoptotische Zellen erst in einem relativ späten Stadium anfärbt und zusätzlich auch nekrotische Zellen detektiert, können mit dem Höchst-Farbstoff bereits

frühapoptotische Zellen identifiziert werden. Diese zeichnen sich durch eine Kondensation des Chromatins aus (Details siehe Kapitel 4.3), was mit einer deutlich erhöhten und verdichteten Signalintensität des DNA-Farbstoffes Höchst einhergeht. Aus diesem Grund sollen im Folgenden signalintensive, apoptotische Zellen als Höchst-positiv und vitale, nur schwach gefärbte Zellen als Höchst-negativ bezeichnet werden. Der Höchst-DNA-Komplex hat ein Erregungsmaximum bei 356 nm und ein Emissionsmaximum bei 465 nm. Der Höchstfarbstoff lag in einer Stammlösung mit 1 mg/ml in PBS vor und wurde in 1:2.000 Verdünnung in der Kulturschale/-flasche eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Auszählen der vitalen (Höchst-negativ) und avitalen (Höchst-positiv) Zellen und Bildung des Mittelwerts in vier willkürlich ausgewählten Gesichtsfeldern in jeder Probe. Gleichzeitig konnten mittels PI schwer beschädigte bzw. nekrotische Zellen abgegrenzt werden.

3.1.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, Western-Blot und Proteindetektion

Zelllyse und Homogenisierung

Die tief gefrorenen Zellpellets aus etwa $1,0 \times 10^6$ Zellen wurden mit 200 μ l TNT-Lysepuffer lysiert. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren durch eine enge Kanüle sowie durch 10 Ultraschallstöße mit dem Sonifizierer wurde das Lysat homogenisiert. Die Zugabe von Proteinase-Inhibitor im Verhältnis 1:100 (2 μ l) schützte die Proteine nach Aufbruch der Zellmembranen durch die Lyse vor Degradation. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Kit BCA Protein Assay von Pierce wurde für die Proteinbestimmung verwendet. Dieser ermöglicht eine kolorimetrische Bestimmung, wobei die Probe mit einer Standardreihe bekannter Konzentration verglichen wurde. Die Farbreaktion beruhte einerseits auf der Ausbildung eines Chelatkomplexes zwischen zwei Molekülen Bicinchoninsäure und einem Cu^+ -Ion und andererseits auf der Biuret Reaktion (Cu^{2+} wird in alkalischem Medium zu Cu^+ reduziert). Gemessen wurde die Lichtabsorption bei 562 nm, die sich annähernd direkt proportional zur Proteinkonzentration verhält.

Zur computergestützten Erstellung einer Standardkurve wurden BSA-Lösungen (bovines Serumalbumin in TNT-Lysepuffer) mit den Konzentrationen 2.000 μ g/ml, 1.500 μ g/ml, 1.000 μ g/ml, 750 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 25 μ g/ml und 0 μ g/ml verwendet.

Das folgende Protokoll fand zur Proteinbestimmung Anwendung:

- Vorlage von je 10 μ l der zu bestimmenden Lösung (Lysat) und der Proteinstandards, jeweils in Doppelbestimmung, in einer 96-well Mikrotiterplatte

- Herstellung eines 50:1 Gemisches von Reagenz A mit Reagenz B
- Zugabe von je 80 µl des Gemisches zu den vorgelegten Proteinproben
- 30 Minuten lichtgeschützte Inkubation bei 37°C
- Messung mit Photometer bei 562 nm
- Computersoftware errechnete Proteinkonzentration der Lysate anhand der Standardkurve

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Anhand der gewonnenen Proteinkonzentrationen wurden unterschiedliche, zuvor errechnete, Volumen der Lysate nach nochmaliger Zentrifugation (13.000 U/min, 4°C, 5 min) in Eppendorf-Gefäße abpipettiert, mit dem Ziel gleiche Proteinmengen in den Proben zu erhalten. Die Proben wurden dann mit Lyse-Puffer auf einheitliche Volumen gebracht.

Zur Auftrennung und Detektion der jeweiligen Zielproteine wurde ein System, bestehend aus SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit anschließendem Western Blot, angewandt.

SDS (sodium dodecylsulfate) ist ein negativ geladenes Lösungsmittel. Es umschließt Proteine vollständig und bedingt dadurch, unabhängig von deren ursprünglicher Ladung, eine negativ geladene Oberfläche und so die Ausbildung von Mizellen. Zunächst wurden die Proben mit dreifach-Laemmli-Puffer versetzt und kurz aufgekocht. Dieser enthielt neben SDS unter anderem β-Mercaptoethanol. Letzteres ermöglichte eine zusätzliche Aufspaltung der Schwefelbrücken zwischen Cysteinresten und bewirkte damit eine vollständige Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Nach fünfminütigem Aufkochen bei 95°C erfolgte erneut Zentrifugation (13.000 U/min, 4°C, kurzes Herunterzentrifugieren mittels Handzentrifuge) und Ladung in die vorher mit Laemmli-Puffer gespülten Geltaschen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte vor allem durch den Molekularsiebeffekt des Trägergels. Hier wurden ausschließlich 10% Polyacrylamidgele verwendet.

Als Größenstandards und zur Kontrolle des Blot-Vorgangs wurden jeweils zwei Größenmarker eingesetzt. Einer war mit bloßem Auge im Gel sichtbar, der zweite erst auf der entwickelten Filmaufnahme.

Die eigentliche Elektrophorese erfolgte bei 80 V bzw. nach Durchlaufen des Sammelgels bei 150 V und wurde abgebrochen bevor die Lauffront das untere Ende des Gels verließ.

Western Blot und Proteindetektion

Beim Vorgang des „blotting“ wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch elektrische Kräfte auf eine benachbarte Membran übertragen. Bei der so genannten „semi-dry-methode“ wurde dabei eine PVDF-Membran, die zuvor 30 Sekunden in Methanol und anschließend etwa 10 Minuten in Blot-Puffer eingeweicht wurde, benutzt. Der Proteintransfer erfolgte über eine Stunde hinweg in der Blotkammer zwischen zwei Whatmannpapieren bei 25 V, 250 mA und 50 W.

Vor der Inkubation mit Primärantikörper über Nacht bei 4°C wurde die Membran in 4 % Milchpulver in TBST unter leichtem Schwenken für eine Stunde blockiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren.

Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgte in einer Suspension aus 4%igem Milchpulver in TBST über Nacht bei 4°C auf der Wippe.

Nach fünfmaligem Waschen in TBST für je 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem mit „horse-raddish-peroxidase“ konjugierten Sekundärantikörper im Kühlschrank (4°C) unter permanenter, leichter Schüttelbewegung für eine Stunde. Es schloss sich wieder ein intensiver Waschdurchgang, wie zuvor beschrieben, an.

Ein Chemilumineszenz diente zur optischen Darstellung der Proteinbanden auf der Membran. Nach fünfminütiger Inkubation mit Lumi-light Reagenz (1:1 Gemisch aus Reagenz 1, bestehend aus Luminol und einem besonderen Enhancer, und Reagenz 2, bestehend aus einer stabilen Peroxid-Lösung) entwickelte sich unter Einfluss der „horse-raddish-peroxidase“ eine Lichtemission, die im letzten Schritt auf einem Fotografiefilm für das Auge sichtbar gemacht werden konnte.

3.2 Eigenständig etablierte Methoden

Die hier beschriebenen Methoden sind aus der Literatur bekannt und werden in anderen Einrichtungen eingesetzt, wurden aber in diesem Versuchslabor in dieser Form zuvor nicht angewandt. Sie wurden zum Zwecke der Durchführung der Experimente eigenständig etabliert.

3.2.1 RNA-Extraktion

Umgang mit RNA

RNA im molekularbiologischen Versuch ist relativ labil. Zum einen die Degradation im Laufe der Zeit, begünstigt durch Temperaturschwankungen (Auf- und Abtauen, etc.) und mechanische Reize, und zum anderen der Abbau durch RNAsen gefährden korrekte Ergebnisse. Die ubiquitären RNAsen sind sehr stabile Enzyme und können bereits in kleinsten Mengen RNA ohne weitere Cofaktoren zerstören. Deshalb wurden in allen Versuchen gewisse Vorsichtsmaßnahmen berücksichtigt:

Alle Proben wurden, von der Zellyse an bis nach der Reversen Transkription, ausschließlich mit frischen und RNase-freien Gefäßen, Pipettenspitzen, Küvetten und Flüssigkeiten in Kontakt gebracht. Alle Arbeitsflächen wurden, über die üblichen Hygienemaßnahmen des Labors hinaus, äußerst sauber gehalten und vor den Experimenten mit RNase Away gereinigt. Das Sprechen und Atmen in das Versuchsfeld wurde vermieden und stets frische Handschuhe getragen. Die

Zellkultur, RNA-Isolation, Photometrie, Reverse Transkription und PCR wurden, wenn möglich, in unterschiedlichen Labors durchgeführt.

Um die Gefahr der Degradation zu vermindern, wurden stets kurze Verarbeitungszeiten angestrebt und häufiges Auf- und Abtauen nach Möglichkeit vermieden. Auf eine Degradation der RNA hin wurde wiederholt mit photometrischer RNA-Messung und RNA-Gelelektrophorese (siehe unten) getestet. Sie konnte auch nach mehrmaligem Auf- und Abtauen und mehrmonatiger Lagerung im Gefrierschrank nie nachgewiesen werden.

RNA-Extraktion

Aus den gewonnenen Proben wurde RNA mittels Aufreinigung durch Silica-Gel-Säulen isoliert. Diese Technik (Qiagen RNeasy Mini Kit) diente der Aufreinigung von RNA, die größer als 200 Nukleotide ist, und damit insbesondere der mRNA und Prä-mRNA. Viele rRNA- und insbesondere tRNA-Moleküle, die 15-20% der Gesamt-RNA ausmachen, wurden bereits durch ihre Größe ausgeschlossen.

Jedes Zellpellet, bestehend aus etwa 1,5 Millionen Zellen, wurde nach Entnahme aus dem Gefrierschrank (-80°C) auf Eis zum RNA-Arbeitsplatz gebracht und mit 350 µl Lysepuffer (RLT) versetzt, mehrfach auf- und abpipettiert und geschüttelt (Vortex). Alle weiteren Schritte gingen bei Raumtemperatur vonstatten. Der RLT-Lysepuffer des Qiagen Kits enthielt β-Mercaptoethanol und Guanidin-Isothiozyanat und wirkte dadurch lysierend und inhibierend auf RNAsen.

350 µl 70%iger Ethanol wurde zugegeben, dann das Gesamtvolumen auf die Silica-Gel-Säule gegeben. Kurzes Zentrifugieren der Säule (10.000 U/min, ca. 10 Sekunden, Zentrifugenradius ca. 5 cm, entspricht ca. 8.000 g) ließ die RNA bei Säulendurchtritt an das Gel binden und die Pufferlösung in den Auffangbehälter tropfen, welcher im Anschluss verworfen wurde. Drei Waschschrte mit jeweils anschließendem Zentrifugieren verminderten die Kontaminationsgefahr. Zwischen erstem und zweitem Waschschrte wurde der DNase-Verdau eingeschoben (siehe nächster Abschnitt).

In ein neues, verschließbares Röhrchen wurde nun die RNA eluiert. Durch Zugabe von 30 µl H₂O, 1 Minute Inkubation und Zentrifugation (10.000 U/min, 1 Minute) wurde RNA aus der Säule gelöst. Die RNA-Ausbeute-Konzentration konnte durch erneutes Auftragen und Eluieren der gleichen 30 µl H₂O erhöht werden. Jetzt wurden ggf. kleine Volumina der RNA-Lösung für photometrische Konzentrationsbestimmungen oder RNA-Gele abgenommen und sie dann umgehend bei -80°C eingefroren.

DNase Verdau

Der DNA-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Quiagen) wurde durchgeführt, um eine potentielle Kontamination der Probe mit DNA zu verhindern. Er wurde als zusätzlicher Zwischenschritt im Protokoll der RNA-Isolation eingeschoben, gemäß dem Handbuch RNeasy Mini Handbook (Qiagen, S. 99 ff.).

Nach dem ersten Waschschrift der RNA-Isolation wurde das DNase-Enzym in einem speziellen Puffer (RDD) direkt auf die Säule aufgetragen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Waschschrift der RNA-Isolation wusch anschließend gleichzeitig das Enzym aus. Nun wurde das RNA-Isolationsprotokoll fortgesetzt.

RNA-Qualitätskontrolle (RNA-Gel)

Die Qualität und Integrität der RNA konnte im RNA-Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft werden. Hierbei wurde die Lage, Begrenzung und die Größenverteilung der 18S und 28S Banden der ribosomalen RNA, die größer als 200 Nukleotide waren und nicht herausgefiltert wurden, beurteilt. Waren die Banden scharf begrenzt, an der richtigen Stelle (18S = 1,9 kb / 28S = 5,0 kb) sowie die 28S Bande etwa doppelt so stark gefärbt wie die 18S Bande, so konnte die RNA als intakt gelten. Waren die Banden unscharf begrenzt, zu kleineren Molekülgrößen hin verschmiert und die 28S Bande schwächer als die 18S Bande gefärbt, musste eine Degradation angenommen werden (Abbildung 3).

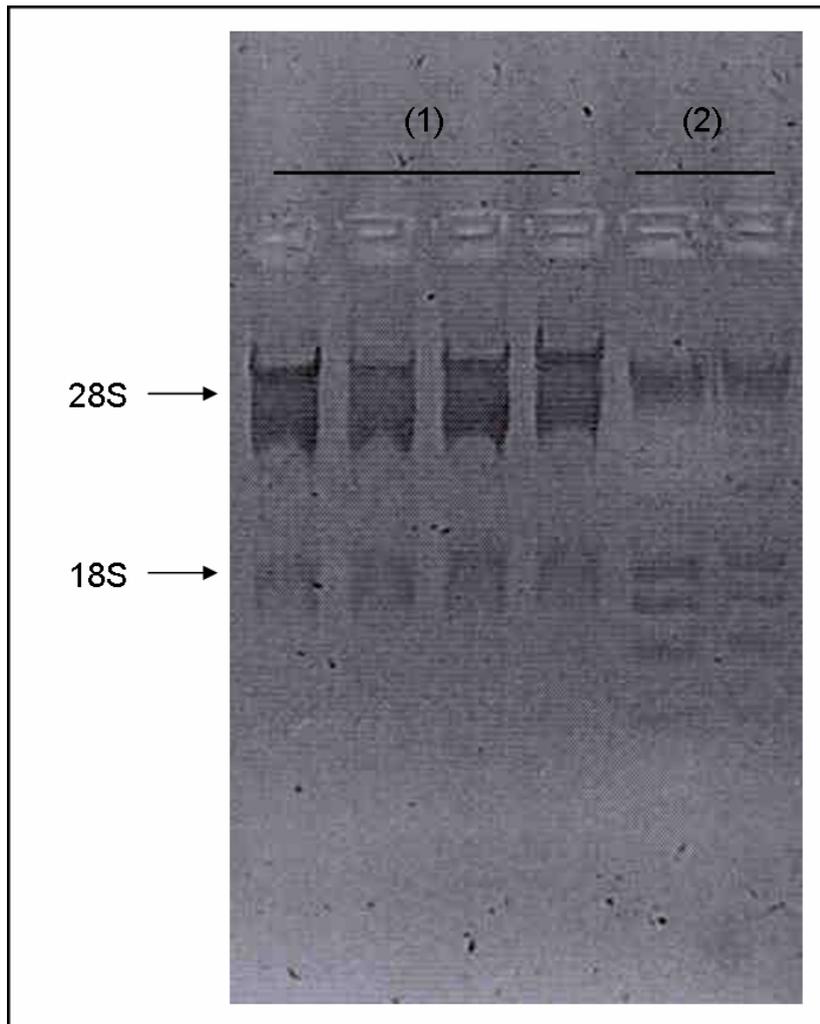


Abbildung 3: RNA-Gel: 4 RNA-Proben (1) und SMART-Ladder (2) als Größenmarker. Deutlich zu sehen sind die 28S und 18S-Banden, wobei die 28S-Band stärker ausgeprägt ist. Dies ist ein typischer Befund bei erfolgreicher RNA-Extraktion.

Das Gel wurde wie folgt hergestellt: 0,6 g Agarose (entspricht 1,2%), 5 ml FA-Puffer und 45 ml aqua purificata wurden vermischt und aufgekocht, dann auf 65°C abgekühlt, 0,9 ml 37%iges Formaldehyd sowie 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurden dazugegeben. Nach dem Erstarren in der Form wurde das Gel ca. 30 Minuten in 1x FA-Puffer eingelegt. Pro Bahn/Geltasche konnten 10 µl geladen werden, d.h. 8 µl RNA-Lösung und 2 µl 5x loading buffer.

Die Elektrophorese wurde bei 80 V Spannung für 20-25 Minuten durchgeführt. Als Größenstandard diente die SMART-Ladder (Abbildung 3).

RNA-Konzentrationsbestimmung

Um den Erfolg der RNA-Isolation zu überprüfen und jeweils gleiche RNA-Mengen in die nachfolgende Reverse Transkription einsetzen zu können, wurde die RNA-Lösung photometrisch

charakterisiert. In einer geeigneten Einmalküvette wurde ein Volumen von 60 µl vermessen. Um RNA zu sparen, wurde eine Verdünnung von 1:10 (6 µl RNA-Lösung, 54 µl H₂O) im gleichen H₂O, welches zur Eluation verwendet wurde, angefertigt. Das Photometer wurde auf RNA-Betrieb eingestellt (40 Filter). Gemessen wurde bei 260, 280 und 320 nm. Das Photometer errechnete automatisch die Konzentration der Stammlösung nach der Formel

$$C = A_{260} \times f \times 40 \text{ [}\mu\text{g/ml]} \quad A_{260} = \text{Absorption bei 260 nm; } f = \text{Verdünnungsfaktor}$$

sowie das Verhältnis der Messwerte bei 260 und 280 nm (Ratio 260/280). Letztere gab Aufschluss über die Reinheit der RNA bzw. Kontamination. Reine RNA in wässriger Lösung hatte typischerweise eine Ratio 260/280 von 1,9-2,3 bei pH 7,5. Werte über 2,3 bzw. unter 1,9 waren wahrscheinlich kontaminiert (Proteine) und wurden nicht verwendet. Dies war äußerst selten der Fall. Der Messwert bei 320 nm gab einen Hinweis auf die Kontamination mit Lipiden: Er sollte nahe bei 0 liegen; Abweichungen deuteten auf Lipidverunreinigung hin.

Obwohl die Absorption pH-abhängig ist, wurde sie aus technischen Gründen in Wasser durchgeführt.

3.2.2 RT-PCR

Grundlagen der RT-PCR

Die RT-PCR ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von „messenger-RNA“ (mRNA) in einer Gewebe- oder Zellkulturprobe. Zuvor auf chemischem Wege isolierte RNA, die immer als Einzelstrang vorliegt, wird zunächst mit einem spezifischen retroviralen Enzym (Reverse Transkriptase) in ebenfalls einzelsträngige komplementäre „complementary-DNA“ (cDNA) umgeschrieben. Diese ist sehr stabil und nicht mehr empfindlich gegen RNAsen. In einem weiteren Schritt, der „polymerase chain reaction“ (PCR) können nun mittels Gen-spezifischer Primer komplementäre mRNA-Fragmente, die sich in der ursprünglichen Probe befanden, nachgewiesen und quantifiziert werden.

Es besteht die Möglichkeit, die genannten zwei Schritte, Reverse Transkription und PCR, auch in einem Versuch zusammenzufassen („one-step-RT-PCR“). Dies erfordert ein spezielles Enzym, das beide Fähigkeiten besitzt (RNA-abhängige-DNA-Polymerase und DNA-abhängige-DNA-Polymerase) und dessen jeweilige Funktion durch unterschiedliche Temperaturen aktiviert werden kann. Dieses Verfahren beansprucht weniger Zeit, ist jedoch teurer und hat den Nachteil, dass die Ergebnisse größere Schwankungen aufweisen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden beide Verfahren parallel genutzt. Da sie geringere Abweichungen der Messwerte zeigte, wurde jedoch rasch der RT-PCR in zwei Schritten („two-

step-RT-PCR“) der Vorzug gegeben und in allen folgenden und hier beschriebenen Versuchen eingesetzt.

Reverse Transkription

Das retrovirale Enzym AMV Reverse Transkriptase (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), Roche) ist eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase des „avian myeloblastosis virus“. In Gegenwart einer RNA-Probe, geeigneter Primer, Mg^{2+} -Ionen, Desoxynucleotide und eines pH-Wertes von 8,3 synthetisierte es zur RNA komplementäre DNA-Einzelstränge.

Zur Wahl standen für die RT zwei Arten von Primern: Oligo-p(dT)₁₅-Primer und kurze Zufallsprimer („random primer“ p(dN)₆). Oligo-dT-Primer binden an den poly-A-Schwanz am 5'-Ende der mRNA und sind somit mRNA spezifisch. Da das Enzym in dieser Reaktion nur Sequenzen von bis zu etwa 500 Basenpaaren zuverlässig synthetisieren konnte, musste die spätere Gen-spezifische Zielsequenz innerhalb dieser 500 Basenpaaren Abstands zum 5'-Ende liegen. Dies war bei den hier verwandten Gen-spezifischen Primern für die PCR nicht der Fall. Die kurzen, zufälligen Sequenzen der „random primer“ banden an den verschiedensten Stellen der gesamten RNA und waren somit nicht mRNA spezifisch. Es wurde jedoch mit höchster Wahrscheinlichkeit die gesamte RNA, also auch die Zielsequenzen, in cDNA umgeschrieben.

Zum Schutz der RNA vor und zu Beginn der Reaktion wurde ein RNase-Inhibitor beigegeben.

Reaktionsansatz:

10x Reaktionspuffer (pH = 8,3)	2,0 µl
MgCl ₂ (25 mM; Endkonzentration: 5 mM)	4,0 µl
Desoxynucleotid-Gemisch (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, je 10 mM; Endkonzentration: je 1 mM)	2,0 µl
„random primer“ (2 µg/µl; Endkonzentration: 0,2 µg/µl)	2,0 µl
RNase-Inhibitor (50 units/µl)	1,0 µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl
RNA-Probe (1 bzw. 2 µg)	variabel (siehe Bsp. unten)
RNase freies H ₂ O	ad 20 µl

Von jeder Probe eines Versuchs wurde jeweils 1 bzw. 2 µg RNA eingesetzt, in Abhängigkeit von der niedrigsten RNA-Konzentration der gesamten Versuchsreihe. 1 µg wurde immer dann eingesetzt, wenn die RNA-Konzentration nicht ausreichte, um den Zielwert von 2 µg mit einem Volumen von 8,2 µl zu erreichen. War beispielsweise die gemessene RNA-Konzentration 0,21 µg/µl (wie in Probe 6, Tabelle 3) und wurde 1 µg RNA in die RT eingesetzt, so wurden 4,9 µl

RNA-Lösung und 3,3 μl H₂O als Differenz zum Gesamtreaktionsvolumen von 20 μl zugegeben. Da 2 μg 9,8 μl entsprachen, konnten diese größere Menge nicht eingesetzt werden. Die eingesetzte RNA wurde zuvor bei 55°C für 10 Minuten inkubiert.

Probe	Bedingung	RNA-Konz. [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	1 μg entsprechen [μl]	H ₂ O [μl]
1	3 h MG132	0,35	2,9	5,3
2	3 h MG132	0,33	3,0	5,2
3	3 h MG132	0,34	2,9	5,3
4	3 h DMSO	0,33	3,0	5,2
5	3 h DMSO	0,31	3,2	5,0
6	3 h DMSO	0,21	4,9	3,3

Tabelle 3: Errechnung des eingesetzten RNA-Volumens in Abhängigkeit von der gemessenen RNA-Konzentration am Beispiel von 6 Proben.

Die Reaktionsansätze wurden nach oben stehendem Schema in 96-Reaktions-PCR-Platten zusammengegeben, gemischt und verschlossen und in einem Thermoblockcycler inkubiert:

Reaktionsbedingungen:

Primeranlagerung	25°C	10 Minuten
Reverse Transkription	42°C	60 Minuten
Denaturierung	99°C	5 Minuten
Abkühlung	4°C	5 Minuten

Die nun vorliegende cDNA wurde umgehend bei -80°C tief gefroren. Es wird im Folgenden angenommen, dass bei gleichem Reaktionsansatz und -ablauf sowie gleicher Menge an eingesetzter RNA gleiche Mengen an cDNA produziert werden. Eine weitere cDNA-Konzentrationsbestimmung war nicht notwendig, da durch die Verwendung eines „housekeeping gene“ verbleibenden Mengenschwankungen Rechnung getragen wurde.

Grundlagen der Light-Cycler-PCR

Das Light-Cycler-Gerät ist eine Weiterentwicklung herkömmlicher Thermoblockcycler, welches die schnelle und zuverlässige Quantifizierung selbst kleinster DNA bzw. cDNA-Mengen zulässt. Durch den Einsatz eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes kann die Amplifizierung in „real-time“, also noch während derselben erfolgen. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I

bindet in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix. Der gelöste, ungebundene Farbstoff selbst sendet nur sehr wenig Licht aus. Der an DNA gebundene Farbstoff verstärkt seine Fluoreszenz um ein Vielfaches. SYBR Green I ist sehr stabil, nach 30 Zyklen Amplifizierung nahm die Fluoreszenz lediglich um 6% ab.

Zu Beginn eines Zyklus wird die DNA-Doppelhelix durch Hitze aufgebrochen (Denaturierung). Dann kann nur das Hintergrundrauschen des SYBR Green I detektiert werden. Beim Erreichen der Anlagerungstemperatur finden die Primer ihre Bindungsstelle an der nun einzelsträngigen DNA. Eine DNA-abhängige-DNA-Polymerase (modifizierte Taq-Polymerase) synthetisiert nun den komplementären Basenstrang. An den neu entstehenden Doppelstrang bindet SYBR Green I. Das Fluoreszenzsignal nimmt sowohl während eines Zyklus mit Länge der neu synthetisierten Stücke als auch von Zyklus zu Zyklus mit Zunahme (idealerweise Verdopplung) der Kopien zu. Zu Beginn eines jeden neuen Zyklus fällt, mit der Denaturierung, das Fluoreszenzsignal wieder auf das Niveau des Hintergrundrauschens zurück um dann erneut anzusteigen.

Die Fluoreszenz des SYBR Green I wird durch eine Leuchtdiode angeregt, das emittierte Licht durch einen Fotosensor gemessen. Jede der maximal 32 Proben befindet sich in einer Glaskapillare, die in ein Karussell eingespannt waren. Die Temperatur der Luft um die Kapillaren kann rasch variiert werden und bewirkt die Temperaturänderungen in den Kapillaren. Die Fluoreszenzmessung erfolgt an einer Stelle am Boden des Karussells, an welche die Proben nacheinander durch Drehung des Karussells gelangen.

Das Enzym, die DNA-Polymerase, ist eine modifizierte Form der hitzestabilen rekombinanten Taq-Polymerase. Durch einen Komplex, der bei Raumtemperatur an gewisse Epitope des Enzyms gebunden ist, und es auf diese Weise inaktiviert, wird die „hot-start-PCR“ möglich. Erst zehnmündige Hitzeeinwirkung von 95°C unmittelbar vor Beginn der PCR-Reaktion zerstört die inhibierenden Komplexe und gibt das Enzym frei. So wird die Elongation unspezifischer Produkte während des Zeitraumes bevor die spezifische Primerbindung möglich wird, verhindert.

Primer

Zur Etablierung spezifischer Primerpaare für die Light-Cycler-PCR wurde auf öffentlich zugängliche Genomdatenbanken zurückgegriffen (z.B. UCSC Genome Bioinformatics; <http://www.genome.ucsc.edu>). Über mindestens zwei unabhängige Suchanfragen wurden die kodierenden mRNA/cDNA Sequenzen der betreffenden Gene ermittelt und abgeglichen. Dann wurden Stücke von etwa 250-600 Basenpaaren (BP) Länge (Zielsequenzen), die sich über mindestens eine Grenze benachbarter Exons erstreckten, gewählt und mit der öffentlichen Primersoftware der SGD („saccharomyces genome database“; <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) auf geeignete Sequenzen untersucht. Für Parkin, Siah-1, Dorfin und HPRT

wurden je bis zu fünf verschiedene Paare bestellt und getestet und dann jeweils das beste Paar ausgewählt.

Durch die Auswahl der Sequenzen (Tabelle 4) und die Vorgaben an das Primer-Programm waren einheitliche Eigenschaften der Primer gewährleistet: Länge der Primer 18-25 BP, Schmelzpunkt 54-58°C, Länge des Amplifikationsproduktes 250-600 BP, GC-Gehalt 30-60%, niedrige Tendenz zur Selbstanlagerung. Der ähnliche Schmelzpunkt erlaubte die Benutzung gleicher Mg^{2+} -Konzentrationen bei der PCR und den Einsatz mehrerer Primer in einem PCR-Lauf. Die Produktlänge von 250-600 BP war lang genug, um einen spezifischen Peak in der „melting curve“ bzw. eine beurteilbare Bande in der Gelelektrophorese zu erzeugen, und kurz genug, um während der Elongationsphase vom Enzym synthetisiert zu werden. Der Grenzwert hierfür lag bei etwa 1.000 BP. Da die Primerpaare auf unterschiedlichen Exons lagen, also mindestens ein Intron zwischen ihnen lag, konnte DNA-Kontamination weitgehend ausgeschlossen werden. Genomische DNA enthielt Introns und es hätten sich, amplifiziert mit den gewählten Primern, keine oder eine höhermolekulare spezifische Bande in der Gelelektrophorese sowie keine oder ein Peak bei höherer Schmelztemperatur in der „melting curve“ Analyse dargestellt.

Die Primer wurden gefriergetrocknet geliefert. Durch Zugabe der entsprechenden Menge sterilen Wassers wurde eine Stammlösung mit 1 mM hergestellt. In einem zweiten Schritt wurde eine Arbeitslösung der Konzentration 10 μ M gemischt.

Mit einer unbehandelten cDNA-Probe wurde eine Konzentrationsreihe angefertigt, d.h. die Probe im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 verdünnt. Jetzt wurden mit jedem Primerpaar PCRs aller Verdünnungen durchgeführt und überprüft, ob der Anstieg der „crossing points“ im selben Verhältnis wie die Verdünnung der cDNA-Konzentration erfolgte. Dies belegte, dass die Primer quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge zulassen und die PCR-Effizienz annähernd $E = 2$ betrug (siehe Abbildung 5).

Gen	Fragmentlänge	Sequenz
Parkin	332 BP	FW: TCC AGC AGC TAA ACC CAC CTA RW: GGT TCC TGA CAT CCG TGC A
Siah-1	274 BP	FW: TTG GCG AGT CTT TTC GAG TGT RW: AAG GCC TGA ACT CAC AGA GCT
Dorfin	358 BP	FW: TGG GAC TAA CAC AGC CAT AGA RW: ATT CAG AAT GGA CCC TGC CAT
HPRT	330 BP	FW: CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT G RW: GTC AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAA C

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer.

Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Für eine erfolgreiche PCR, die eine spezifische Zielsequenz der Probe vervielfältigt und ausreichend Kopien produziert, um eine Quantifizierung der Ausgangsmenge zu ermöglichen, konnten mehrere Reaktionsparameter variiert werden: Mg^{2+} -Konzentration und Temperatur bei der Anlagerung der Primer an die Matrize modifizierten in ähnlicher Weise die Spezifität dieser Bindung. Die Anlagerungstemperatur wurde mit $55^{\circ}C$ so gewählt, dass sie in der Mitte der Werte aller Primer lag. Verschiedene Mg^{2+} -Konzentrationen wurden in einem Vorversuch verglichen; 3,25 mM stellte sich als am besten geeignet heraus. Dieser Wert deckte sich mit den Empfehlungen des Herstellers.

Auch die Primerkonzentration spielte eine Rolle. Hohe Konzentrationen förderten die Aneinanderlagerung zweier Primer, so genannte „primer-dimer“, niedrige konnten die Effizienz der PCR limitieren. Die Erhöhung der Primerkonzentration von den empfohlenen $0,3 \mu M$ auf $0,5 \mu M$ bei schlechtem PCR-Ergebnis ergab keinen Vorteil, sondern verstärkte lediglich die „primer-dimer“.

Nicht zuletzt die Anzahl der Amplifikationszyklen war maßgeblich für den Erfolg der PCR: Der Anstieg der Kopienzahl sollte am Ende ein Plateau erreichen bzw. den exponentiellen Anstieg beendet haben, damit die für die Quantifizierung notwendige Tangente an die Exponentialkurve angelegt werden konnte. 45 Zyklen waren selbst für gering exprimierte Gene ausreichend. Jeder weitere Zyklus trug zur Abnutzung des SYBR Green I bei und wurde in Hinblick auf die Schmelzpunktanalyse vermieden.

Pipettierschema der PCR:

H ₂ O	12,2 μl
MgCl ₂ (25 mM; Endkonzentration: 3,25 mM)	2,6 μl
FW-Primer (10 μM ; Endkonzentration: 0,3 μM)	0,6 μl
RW-Primer (10 μM ; Endkonzentration: 0,3 μM)	0,6 μl
Enzym inkl. Reaktionspuffer und Nukleotide, 10x konzentriert	2,0 μl
cDNA-Probe	2,0 μl
Gesamtvolumen	20,0 μl

PCR-Reaktionsbedingungen:

Allgemein:	Temperaturänderungsrate:	20°C pro Sekunde
	Fluoreszenz	Kanal 1
Teil 1:	Denaturierung und Enzymaktivierung	
	95°C	10 Minuten
Teil 2:	Amplifizierung: 45 Zyklen mit je 3 Segmenten	
Denaturierung	95°C	1 Sekunde
Anlagerung	55°C	10 Sekunden
Elongation	72°C	15 Sekunden
acquisition mode: single		
Teil 3:	Schmelzkurvenanalyse mit 3 Segmenten	
A:	95°C	5 Sekunden
B:	65°C	15 Sekunden
C:	Anstieg auf 95°C mit 0,1°C pro Sekunde	
acquisition mode: continuous		
Teil 4:	Abkühlung	
	40°C	30 Sekunden

Qualitätskontrolle (DNA-Gel, Schmelzkurvenanalyse)

Um die Sequenzspezifität eines Primerpaares und den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden zwei Versuchsschritte durchgeführt: Erstens bei jedem Light Cycler Lauf eine Schmelzkurvenanalyse und zweitens zur Etablierung der Primer eine Gelelektrophorese im Agarosegel.

Um eine zweite, andersartige Methode zur Darstellung der PCR-Produkte zu verwenden und damit deren Spezifität und Erfolg zu validieren, wurde der Kapillareninhalt nach der Light Cycler Reaktion auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen, welches wie folgt angefertigt wurde: 1 g Agarose wurde in 50 ml TBE gelöst und kurz aufgeköcht. Unter stetigem Rühren mit einem Stabmagnetrührer kühlte die Lösung auf etwa 50°C ab, sodann wurde 2 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel nun in die Form gegossen. Ein Platzhalter für die Geltaschen wurde eingesetzt. Nach etwa 30 Minuten Aushärten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit TBE getränkt. Jeweils 10 µl der DNA-Probe wurden mit 3 µl des

Blaufärbepuffers gemischt und in eine Geltasche geladen. Als Größenstandard diente der Molekulargewichtsmarker pBR322. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V für 30-45 Minuten. Als erfolgreiche PCR mit spezifischen Primern galten diejenigen Proben, die im Gel eine singuläre, kräftige Bande in Laufhöhe des zu erwartenden molekularen Gewichts hinterließen (Abbildung 4).

Die Schmelzkurvenanalyse war integraler Bestandteil des Light Cycler Laufes und wurde im Anschluss an die Amplifizierung durchgeführt. Zunächst wurde 5 Sekunden lang bei 95°C das Amplifikationsprodukt denaturiert, dann abgekühlt auf 65°C für 15 Sekunden um eine Wiederanlagerung der komplementären Stränge zu ermöglichen, und schließlich wurde die Temperatur langsam um 0,1°C pro Sekunde wieder auf 95°C angehoben. Jetzt wurde die Fluoreszenz in den einzelnen Kapillaren nacheinander im raschen Wechsel gemessen. Die Fluoreszenz, die proportional zur Menge der vorliegenden Doppelstrang-DNA ist, nahm nun langsam und kontinuierlich ab, in dem Maße, in dem sich die Bindungen abschwächten. Ein drastischer Fluoreszenzabfall, beinahe bis zum Hintergrundrauschen (Abfall der Fluoreszenz um ca. 75% binnen 5°C Temperaturanstiegs), erfolgte, wenn der spezifische Schmelzpunkt (Auflösung der Doppelhelix) eines Produktes erreicht war. Die von der Light Cycler Software durchgeführte Berechnung der ersten Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur ermöglichte die Darstellung dieses Abfalls als Spitze (Peak). Die Lage des Peaks auf der Temperaturachse war abhängig vom Schmelzpunkt und somit von der Produktlänge. Kurze Produkte lagen links, bei niedrigen Temperaturen, lange Produkte rechts, bei hohen Temperaturen. Eine besondere Form kurzer Produkte waren „primer-dimer“. Diese waren etwa 20 BP lang und ihr Schmelzpunkt-Peak lag unterhalb von 80°C. Lagen zwei oder mehr Produkte unterschiedlicher Längen vor, so waren zwei oder mehr Peaks zu sehen, bzw. es konnten sich auch zwei Peaks überlappen und Einer als Schulter des Anderen gesehen werden. Dies waren sichere Hinweise auf unspezifische Primer (Abbildung 5).

Zum Ausschluss von Kontamination mit DNA in der PCR wurde in jedem Lauf und für jeden „master mix“ eine Negativkontrolle mit H₂O (ohne cDNA) durchgeführt.

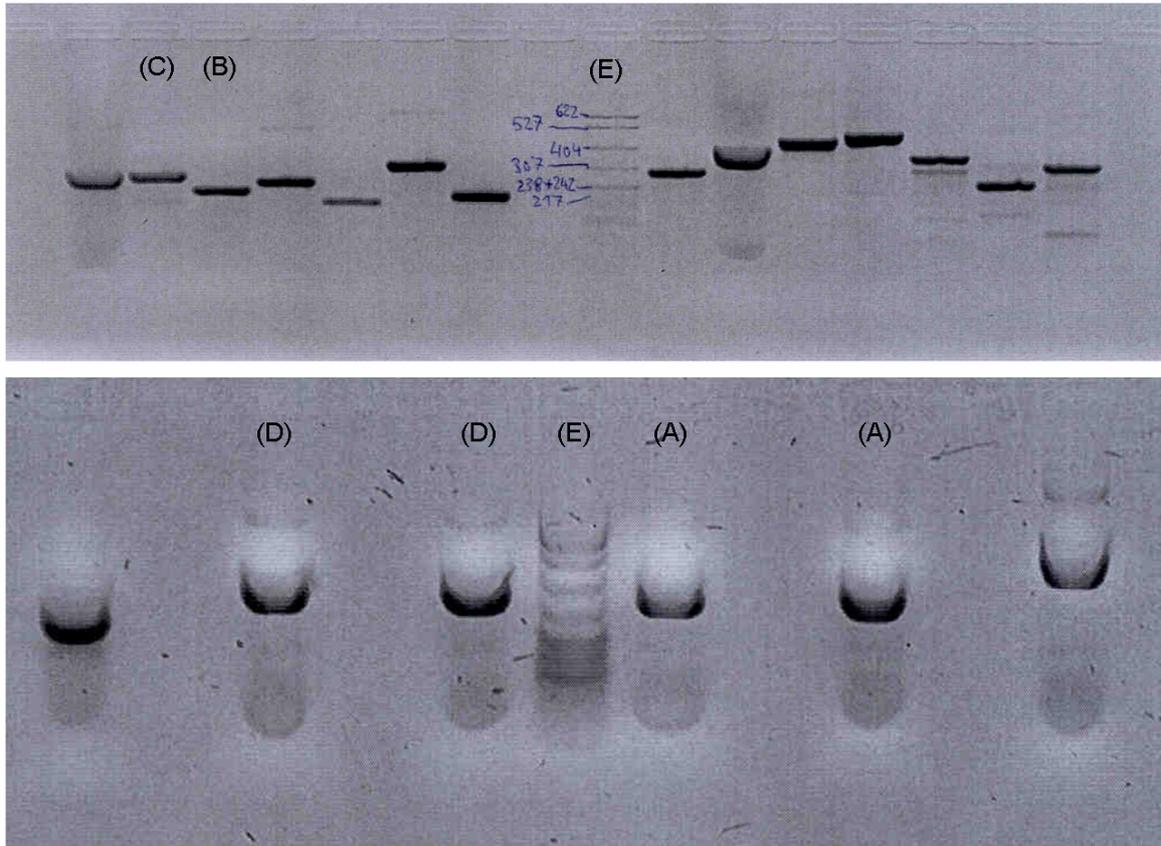


Abbildung 4: 2%-Agarosegel mit PCR-Produkten: Nach Elektrophorese verschiedener Light Cycler PCR-Endprodukte und des molekularen Größenmarkers pBR322 (E). Dargestellt sind Zielsequenz-spezifische Produkte mit den verwendeten Primern aus Tabelle 3 für Parkin (A), Siah-1 (B), Dorfin (C) und HPRT (D). Außerdem sichtbar sind einige weitere getestete Primerpaare, die in späteren Versuchen nicht eingesetzt wurden.

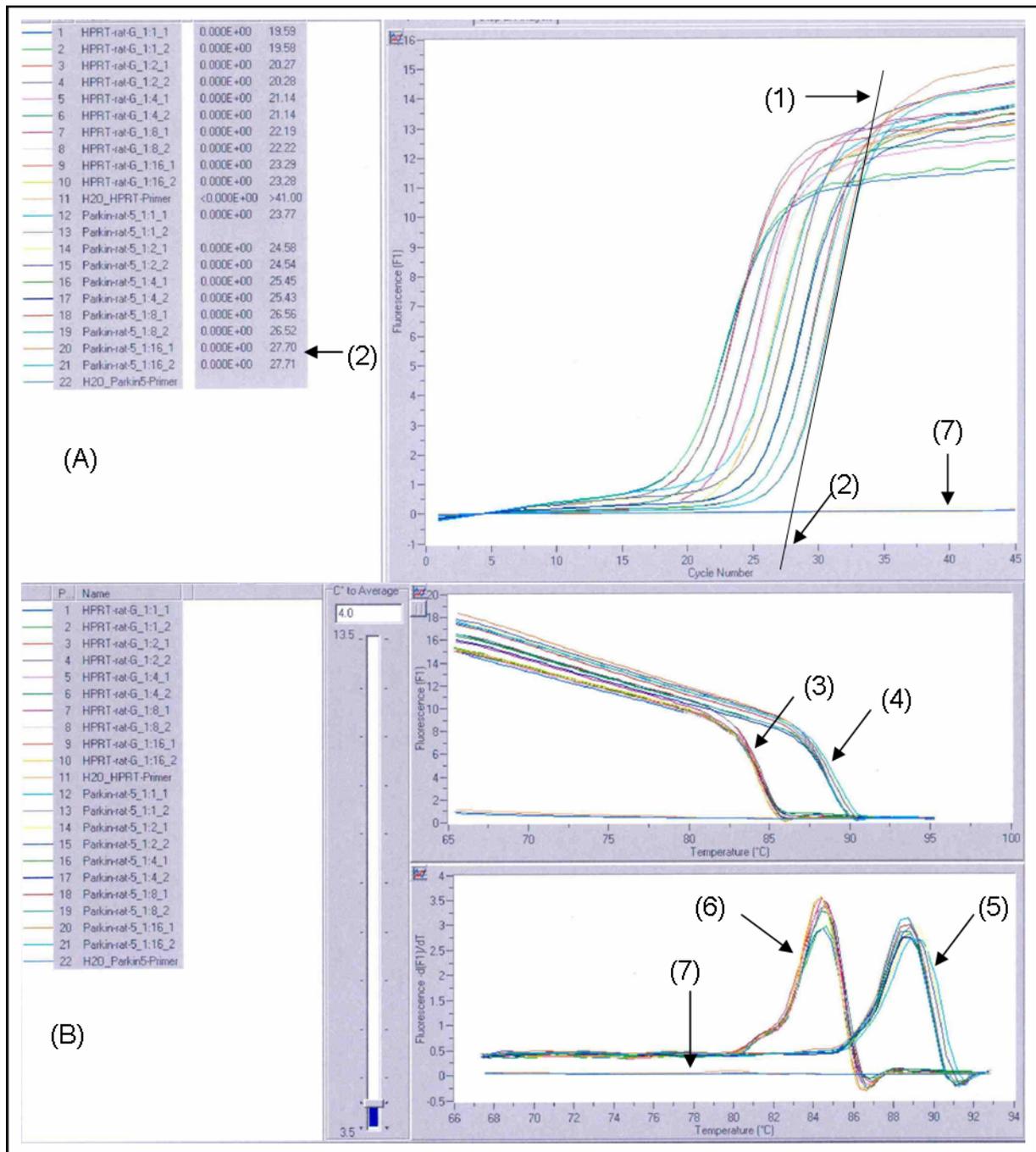


Abbildung 5: Light Cycler PCR Auswertung

(A) Amplifizierungskurven: Die graphische Herleitung des „crossing points“ (CP) erfolgte durch Anlegen der Tangente (1) an die „log-linear-Phase“ der Amplifizierungskurve und der Ermittlung des Schnittpunkts mit der Abszisse (2). Die Abbildung zeigt für Parkin und HPRT Amplifizierungskurven von cDNA-Proben unterschiedlicher Ausgangsmengen (Verdünnungsreihe 1:1 bis 1:16) jeweils im Duplikat. So wie die „log-linear-Phasen“ in konstantem Abstand parallel zueinander lagen, nahmen die CPs konstant mit absteigender Verdünnung zu: Die Primer erlaubten quantitative Aussagen.

(B) „melting curve“: Die „melting curve“ zeigte zwei spezifische Produkte, (3) und (4), und entsprechend je einen Peak für Parkin (5) und HPRT (6) in der 1. Ableitung (vgl. Text). Zwei Negativkontrollen ohne cDNA blieben in (A) und (B) ohne Amplifikation (7).

3.2.3 Relative Quantifizierung und statistische Verfahren

Grundlagen der Quantifizierung mit dem Light Cycler

Die RT-PCR mit dem Light Cycler ermöglicht die Quantifizierung der mRNA-Ausgangsmenge, unabhängig vom Endpunkt der PCR. Dadurch wurde eine genaue Bestimmung möglich, da Gene mit geringerer Ausgangsmenge wegen unterschiedlicher PCR-Effizienz den gleichen PCR-Endpunkt erreichen konnten wie Gene mit höherer Ausgangsmenge. Im Gegensatz zu der nicht-quantitativen RT-PCR, wird bei der Light Cycler RT-PCR der Beginn der rein logarithmischen Phase der Amplifikation („log-linear-Phase“) zur Berechnung der Ausgangsmenge verwandt. Dieser Punkt, der sog. „crossing point“ (CP), ist in Abbildung 5(A) der Schnittpunkt der Tangente an die „log-linear-Phase“ mit der Abszisse. Der CP ist dimensionslos und stellt die Anzahl an vergangenen PCR-Zyklen bis zum Beginn der „log-linear-Phase“ dar.

Vom „crossing point“ zum Linearen Wert

Der CP kann als Exponent der allgemeinen PCR-Gleichung gesehen werden:

$$N = N_0 \times E^{CP}$$

- N: Anzahl der Kopien zum Zyklus CP
- N_0 : Molekülzahl zu Beginn der Reaktion
- E: Effizienz der PCR
- CP: „crossing point“

Die Anzahl der Moleküle in einer Probe zu Beginn der Reaktion oder nach einem gewissen PCR-Zyklus ist für die hier angewandte Art der Quantifizierung, die relative Quantifizierung, nicht relevant. Die Kenntnis darüber ist nur für die absolute Quantifizierung von Bedeutung. Zur relativen Quantifizierung genügt die Umrechnung des CPs, der ja einen Exponenten darstellt, in einen linearen Wert nach folgender Formel:

$$\text{Linearer Wert} = E^{-CP}$$

Wird für $E = 2$ angenommen und entsprechend umgerechnet, ergibt sich:

$$\text{Linearer Wert} = 1/2^{CP}$$

Die Berechnung des Kehrwertes (negativer Exponent) trägt der Tatsache Rechnung, dass bei höherem CP, also späterem Erreichen der „log-linear-Phase“, eine geringere Ausgangsmenge an mRNA vorgelegen haben muss. Der CP verhält sich antiproportional zur Ausgangsmenge an mRNA. Der lineare Wert hingegen ist proportional zur Ausgangsmenge und wird somit kleiner je größer der CP ist, d.h. je später die „log-linear-Phase“ beginnt:

$$\text{Linearer Wert} \sim \text{Ausgangsmenge}$$

Für die Effizienz der PCR wurde der idealisierte Wert 2 angenommen, d.h. bei jedem Zyklus wurde die Zielsequenz verdoppelt. Dies war in der Praxis selten zu erreichen, vielmehr lag er etwas darunter (in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Enzym, Nukleotiden und Primern und der Anwesenheit von Faktoren, welche die PCR inhibieren konnten). Für die relative Quantifizierung, die hier angewandt wurde, ist dies, wie im Folgenden dargelegt, aber nicht von Bedeutung.

Das „housekeeping gene“

In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung mit externer Kontrolle angewandt: Hierzu wurde die Veränderung der Ausgangsmenge eines zu untersuchenden Genes unter einer bestimmten Bedingung relativ zu einem nicht regulierten Gen untersucht (relative Quantifizierung). Als nicht reguliertes Vergleichs-gen diente ein sog. „housekeeping gene“, als externe Kontrolle. Die Expression dieses Gens wurde aus derselben Probe wie das Zielgen bestimmt, aber in einer eigenen PCR-Kapillare.

Durch die Normalisierung an einem unregulierten Referenzgen konnten folgende Fehler ausgeglichen werden: geringe mRNA-Degradation, die zuvor nicht detektiert wurde, unterschiedliche Ausbeute und Qualität bei der cDNA-Synthese, Pipettierfehler vor der PCR sowie ungleiche Mengen eingesetzten Probenmaterials.

„Housekeeping genes“ sind in der Regel Gene, welche für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion von großer Bedeutung sind und somit in allen Zellen auf konstantem Niveau exprimiert werden. Als „housekeeping gene“ wurde für diese Arbeit das Gen HPRT gewählt (Steen 1990). Die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase ist ein wichtiges Enzym des Purin-Wiederverwertungsstoffwechsels („salvage pathway“) und damit des Nukleotid- und Nukleinsäurestoffwechsels. Es erfüllte folgende Voraussetzungen eines „housekeeping gene“: Seine Expressionslevel in der untersuchten Zelllinie waren denen der meisten untersuchten Gene ähnlich (siehe Abbildung 5 und 7) und wurden durch die verschiedenen Noxen nicht modifiziert (Ausnahme: durch H₂O₂; siehe Ergebnisse). Vom HPRT-Gen liegt nur eine Kopie im Genom vor.

Pseudogene sind zwar bekannt, konnten aber durch die Wahl der Primer von der Amplifizierung ausgeschlossen werden.

Mit Linearem Wert und „housekeeping gene“ zur relativen Quantifizierung

Nachdem die konstante Expression des „housekeeping gene“ unter der Stressbedingung geprüft und sein Linearer Wert errechnet war, wurde dieser in Verhältnis zu dem des Zielgens gesetzt:

$$\text{Verhältnis} = \text{Linearer Wert des Zielgens} / \text{Linearer Wert des „housekeeping gene“}$$

Die somit zum „housekeeping gene“ in ein Verhältnis gesetzten Werte, der mit einem Stressor behandelten und der unbehandelten Proben, konnten wiederum in Verhältnis gesetzt werden. Dieses drückte die Regulation des Zielgens relativ zum „housekeeping gene“ unter der Stressbedingung aus:

$$\text{Regulation} = \text{Verhältnis mit Stressbedingung} / \text{Verhältnis ohne Stressbedingung}$$

Ein Wert größer 1 entspricht einer Heraufregulation, ein Wert kleiner 1 einer Herabregulation.

Statistik und Nachweisgrenze der Regulation

HPRT galt als nicht reguliert, wenn die Mittelwerte der „crossing points“ der behandelten und der unbehandelten Gruppe (Triplikate) nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander abwichen. Das entsprach, unabhängig von der Höhe des CPs, einer Veränderung von 41% (Faktor $1,4142 = 2^{0,5}$). Bei dieser Grenze handelte es sich um einen empirisch festgelegten Wert, der auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet wird. Ein statistischer Test auf Gleichheit bzw. Ungleichheit der Mittelwerte wie z.B. der student-t-Test war hier nicht geeignet, weil bei der geringen Fallzahl und der dem Experiment eigenen Schwankungsbreite der Einzelergebnisse oft eine Mittelwertungleichheit rechnerisch nachzuweisen wäre, wo beispielsweise nur leicht unterschiedliche Ausgangsmengen eingesetzt wurden, was ja an dieser Stelle noch nicht ausgeglichen werden konnte.

Ein Zielgen galt als reguliert, wenn die Regulation, basierend auf den Mittelwerten der Regulationsfaktoren jeweils dreier Proben, um den Faktor 2 oder mehr verändert war, die Regulation also größer als 2 (Heraufregulation) oder kleiner als 0,5 (Herabregulation) war. Um die statistische Signifikanz zu verdeutlichen, wurden als optisches Maß in alle Schaubilder, die die Regulation darstellten, die 95%-Konfidenzintervalle eingetragen. Überlappten sich diese Fehlerbalken bei zu vergleichenden Mittelwerten nicht, so konnte mit einem Signifikanzniveau

von 0,05 davon ausgegangen werden, dass die Mittelwerte ungleich sind. Bei Faktoren größer als 2 konnte eine Ungleichheit der Mittelwerte im Sinne des student-t-Tests immer errechnet werden.

3.2.4 Versuchsanordnung

Die Anordnung und Durchführung der eigentlichen Versuche resultierte aus den Ergebnissen und Erfahrungen zahlreicher Vorversuche. Es seien hier der Ansatz und der Ablauf eines Versuches bis zur Gewinnung der Zellpellets geschildert:

Am ersten Tag jedes Experiments wurden um 13:00 Uhr in 30 kleine (25 cm²) Kulturflaschen je 1,5 Millionen Zellen in je 6 ml Medium ausplattiert. Ein großer „master mix“ für alle 30 Flaschen gewährleistete eine gleichmäßige Verteilung der Zellen. Am zweiten Tag wurde um 13:00 Uhr die Noxe in neuem Medium zugegeben. Zwei „master mixes“ für je 15 Kulturflaschen (15 mit Medium, Noxe und ggf. DMSO als Lösungsmittel der Noxe sowie 15 mit Medium und ggf. DMSO) wurden dafür angefertigt. Nun wurden nach jeweils 3, 6, 9 und 18 Stunden, also um 16:00, 19:00 und 22:00 Uhr, sowie um 7:00 Uhr des dritten Versuchstages je 6 Flaschen geerntet. Hierbei wurde zunächst das Medium mit den Zelltrümmern der toten Zellen abgesaugt, die Zellen nach Zugabe einiger ml frischen Mediums vom Flaschenboden abgeschabt, in ein 10 ml Gefäß überführt, abzentrifugiert, der Überstand verworfen, in 600 µl Medium resuspendiert, die Suspension zu 200 und 400 µl (entspricht 0,5x10⁶ bzw. 1,0x10⁶ Zellen) in separate Eppendorf-Gefäße überführt, erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und schließlich die Pellets bei -80°C tief gefroren. 24 Stunden nach Zugabe der Noxe, also um 13:00 des dritten Versuchstages erfolgte die FACS-Analyse zur Kontrolle des Zelltodanteils. Die verbleibenden 6 Kulturflaschen wurden jetzt geerntet und in 500 µl FACS-Puffer in einem FACS-Röhrchen auf Eis zur Analyse gebracht. Wichtig für die Zelltodquantifizierung war, dass alle zellulären Bestandteile des Überstandes erhalten blieben, handelte es sich doch um die toten und apoptotischen Zellen. Die Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung bei Tunicamycin und Rotenon erfolgte in der Kulturflasche nach Zugabe von Höchst und Propidiumiodid.

Die Festlegung der Erntezeitpunkte auf 3, 6, 9 und 18 Stunden nach Noxenzugabe geschah willkürlich und sollte einen möglichst breiten Zeitraum abdecken. Als Anhaltspunkte bei der Versuchsplanung dienten diverse Veröffentlichungen zur Genexpression, die überwiegend Zeitpunkte zwischen wenigen Stunden und 24 Stunden nach Eintritt der zu untersuchenden Bedingung wählten (so z.B. West et al. 2003; Imai et al. 2000; Biasini et al. 2004).

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander zweifach (jeweils im Triplikat), unter gleichen Bedingungen, durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Zelldichte und Zellanzahl

Das Wachstumsverhalten der Zellen und ihre Widerstandsfähigkeit gegen schädliche Einwirkungen hingen von der Dichte (Zellen pro Fläche) der Kolonie ab. Je höher die Zahl der Zellen pro Flächeneinheit war, umso schneller teilten sie sich und umso besser widerstanden sie schädlichen Noxen. Ein möglicher Grund für diese Beobachtung könnte das vermehrte Vorhandensein von Wachstumsfaktoren darstellen.

Um mRNA in der Light Cycler PCR zuverlässig quantitativ bestimmen zu können, war eine ausreichend große Menge an Ausgangsmaterial notwendig. Auch für den Nachweis spezifischer Proteine im Western Blot gab es eine Nachweisgrenze. Quantitative Bestimmungen wurden durch hohe Proteinmengen in der Probe erleichtert.

Hieraus folgt, dass für die angestrebten Untersuchungen eine geeignete (niedrige) Zelldichte mit ausreichender großer Gesamtzellanzahl, bei dennoch handlichem Umfang des Versuchsaufbaus, gewählt werden musste. Somit dienten die ersten Experimente der Ermittlung der geeigneten Zelldichte und Zellzahl pro Kulturflasche. Sie wurden mit dem Apoptose-auslösenden Agens Ceramid durchgeführt.

In kleinen, 25 cm²-großen Kulturschälchen wurden in je 2 ml Nährmedium 1×10^4 Zellen/Kulturschälchen (entspricht 4×10^2 Zellen/cm²), 5×10^4 (2×10^3 Zellen/cm²), 1×10^5 (4×10^3 Zellen/cm²), 2×10^5 (8×10^3 Zellen/cm²), 3×10^5 (12×10^3 Zellen/cm²) ausplattiert und am nächsten Tag Ceramid in folgenden Konzentrationen zugegeben: 10, 25, 50, 100, 200 µM und als Negativkontrolle DMSO. Die mikroskopische Auswertung dieses Versuchs 24 Stunden nach Ceramidzugabe, gab einen ersten Hinweis darauf, dass eine Zelldichte von mindestens 8×10^3 Zellen pro cm² geeignet war. Maßgeblich für die Beurteilung war der morphologische Eindruck, den die Zellen machten, insbesondere ihre Größe und Granularität, ihr Adhäsionsverhalten, Veränderungen im Medium und die Teilungsgeschwindigkeit. Weitere Experimente mit ähnlichem Aufbau, auch mit größeren Kulturflaschen und mit anderen Noxen, legten letztendlich 2×10^4 Zellen/cm² als Idealdichte beim Ausplattieren nahe. Dies entspricht $1,5 \times 10^6$ Zellen in einer großen Kulturflasche zu 75 cm². Mit dieser Zelldichte wurde im Folgenden durchwegs gearbeitet.

4.2 Die Etablierung der Stressorenkonzentrationen

Ziel war es, die einzelnen Stressbedingungen in ihrer Wirkung auf die Zellen vergleichbar zu machen. Dazu sollte die gemessene und anzulegende Größe der Anteil toter Zellen an der

Gesamtzellzahl 24 Stunden nach Zugabe der Noxe sein (zur Zelltodquantifizierung siehe 3.1.2 sowie 4.3). Er sollte bei 20-30% liegen. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche Konzentrationsreihen mit jeder einzelnen Noxe durchgeführt. Dies sei anhand eines Beispiels erläutert: Mit einem H₂O₂-Medium-Gemisch wurde zur genauen Bestimmung der richtigen Konzentration eine Konzentrationsreihe in aufsteigenden Stufen durchgeführt: 300, 700, 1.100, 1.500, 1.900, 2.300 und 5.000 µM. Der mikroskopische Eindruck sowie die FACS-Analyse nach 24 Stunden ließ die gewünschte Konzentration zwischen 700 und 1.100 µM vermuten. Dass die Zielkonzentration 700 µM betragen musste, konnte in einem weiteren Vorversuch ermittelt werden, der in kleineren Schritten diese Spanne näher charakterisierte (700, 800, 900, 1.000 und 1.100 µM). Nach 24 Stunden wurde wiederum der Zelltodanteil mittels FACS bestimmt. Er lag nur bei 700 µM im gewünschten Bereich (etwa 25%). Als Negativkontrolle liefen immer 1-4 Kulturflaschen mit Zellen mit, die nur frisches Medium (bei H₂O₂) bzw. die jeweils maximale Menge an DMSO (entsprechend der höchsten Einzelmenge in der Konzentrationsreihe) enthielten.

Auf diese Weise konnten in über 20 Einzelversuchen die genauen Endkonzentrationen für jede Noxe bestimmt werden (Tabelle 5). Bei den sich anschließenden eigentlichen Versuchen zur Genexpression, bei denen immer eine FACS-Analyse nach 24 Stunden erfolgte, lag der Zelltodanteil immer im gewünschten Bereich.

Rotenon und Tunicamycin vermochten die Zellen nicht binnen 24 Stunden im Sinne einer Propidiumiodid Anfärbung vollständig abzutöten (siehe 4.3), was weitergehende Versuche veranlasste. Dabei fanden hohe Dosen, die weit über den von anderen Arbeitsgruppen publizierten Konzentrationen lagen, Anwendung. Es konnte keine bzw. nur eine sehr geringe Zunahme der Rate der Propidiumiodid-positiven Zellen festgestellt werden, obwohl die Zellen mikroskopisch eindeutig tot und nach Höchst-Färbung positiv waren. Es handelte sich somit am wahrscheinlichsten um ein, dem Zellmodell eigenes, Artefakt fehlender Propidiumiodid-Anfärbbarkeit nach Rotenon- und Tunicamycineinwirkung.

Das Lösungsmittel der meisten eingesetzten Noxen (Rotenon, Tunicamycin und MG132) war DMSO, welches selbst toxisch auf Zellen wirkt. Es findet z.B. Einsatz als Bestandteil von Einfriermedien (in der Regel 5%). Nach dem Auftauen der Zellen sollte es schnellstmöglich entfernt werden. Es galt deshalb zu klären, ob das eingesetzte DMSO zusätzlich zu, aber unabhängig von, der eigentlichen Noxe einen Effekt hat, der sich anhand der Zelltodrate oder in der Genexpression äußerte. Entsprechende Tests konnten dies ausschließen. Selbst hohe DMSO-Anteile im Medium von maximal 2,1%, wie in einem Teilversuch, hatten keinen Effekt auf den Zelltod im Vergleich zu gänzlich unbehandelten Zellen. Für 0,3% DMSO (MG132) konnte keine veränderte Genexpression gegenüber unbehandelten Zellen nachgewiesen werden.

Stressor	Endkonz. μmol/l	Endkonz. μg/ml	DMSO-Anteil in %	Minimale Testkonz.	Maximale Testkonz.
MG132	125,6	60	0,3	5 μg/ml	100 μg/ml
Tunicamycin	4,7	4	0,4	0,5 μg/ml	1000 μM
Rotenon	50,7	-	0,4	0,01 μM	200 μM
H ₂ O ₂	700,0	-	(H ₂ O)	5 μM	5000 μM

Tabelle 5: Überblick über die Stressoren und deren Konzentrationen: Stoffmenge- und Massekonzentrationen im Medium, wie sie in den späteren Versuchen vorlagen. Zudem sind der zugehörige DMSO-Anteil im Medium, sowie die Spanne der jeweils höchsten und niedrigsten, in Vorversuchen eingesetzten, Konzentrationen, angegeben.

4.3 Zellzustand und Zelltod

Der Zustand der Zellen konnte zuverlässig und reproduzierbar mikroskopisch beurteilt werden: Adhäsion, klares Nährmedium, ein großes Soma und hohe Teilungsgeschwindigkeit waren Indizien für gutes Befinden der Zellen, schwimmende, kleine Zellen in trübem oder verfärbtem Medium und geringe Wachstumsraten zeugten von schlechtem Zustand.

Die zelllinienspezifischen Einstellungen des FACS-Geräts ermöglichten eine eindeutige Abgrenzung der PC12-Zellen von anderen Strukturen im „dot-plot“ (Abbildung 6), wie Zelldebris, ausgefallenen Mediumbestandteilen, Kontamination (Zellen, Bakterien) und sonstigen Partikeln. Jedes detektierte Ereignis wurde durch einen Punkt repräsentiert, aber nur die Punkte im umrandeten Bereich („gate“) wurden anhand der Eigenschaften Größe und Granularität definitionsgemäß als Zellen erkannt. Jede erkannte Zelle im „gate“ wurde wiederum in einem zweiten „dot-plot“ nach Stärke des PI-Fluoreszenzsignals (Abszisse) und Größe der Zelle (Ordinate) aufgetragen. Vitale Zellen bildeten eine große Wolke im PI-negativen (= schwach positiven) Bereich und tote Zellen eine Wolke im PI-positiven (= stark positiven) Bereich. Der im Mikroskop gewonnene Eindruck, dass tote Zellen kleiner waren als lebende, wurde durch die Verschiebung der Wolke der toten Zellen nach unten (geringere Größe) bestätigt. Ein Histogramm, welches alle Ereignisse mit gleich starkem Fluoreszenzsignal ordnet, zeigte einen Peak für vitale (M1) und einen Peak für tote Zellen (M2). Sowohl die Begrenzung des Zellbereichs im ersten „dot-plot“, als auch die Grenze zwischen M1 und M2 waren empirische, bei den Versuchen ermittelte, zelllinienspezifische Werte. Die Software errechnete den Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl.

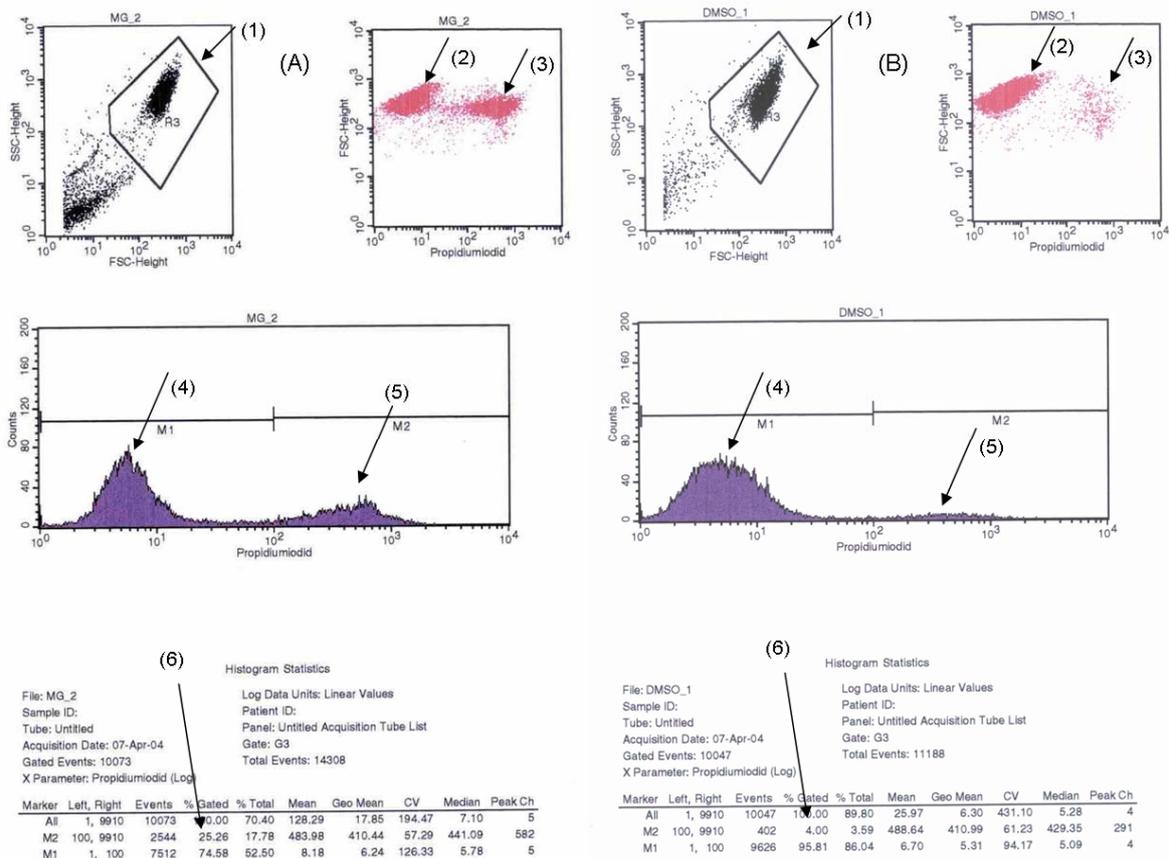


Abbildung 6: FACS-Diagramm eines Versuches mit MG132: Es ist jeweils 1 von 3 Proben stellvertretend abgebildet: MG132-Probe (A) und DMSO-Kontrolle (B). (1) bezeichnet das „gate“. Im „dot-plot“ Diagramm jeweils oben rechts weist Pfeil (2) auf die vitalen, Propidiumiodid-negativen, und Pfeil (3) auf die avitalen, Propidiumiodid-positiven Zellen hin. Dass avitale Zellen zugleich kleiner werden, zeigt sich in einer dezenten Verschiebung der Wolke (3) nach unten, hin zu geringeren Zelldurchmessern. Das Histogramm darunter kumuliert die „dots“ nach Stärke des PI-Signals. Wiederum trennen sich zwei Populationen auf: die PI-negativen (4) und die PI-positiven (5). Es wird deutlich, dass 24 Stunden nach MG132-Zugabe in den behandelten Zellen der Anteil der Toten größer ist, als in den Kontrollen. Quantifiziert wird dies in der Tabelle unter (6): 25,26% tote Zellen nach MG132 und 4,00% in den DMSO-Kontrollen.

Für die Noxen MG132 und H₂O₂ war diese Art der Darstellung jederzeit praktikabel und reproduzierbar und zudem gut mit dem mikroskopischen Befund vereinbar. Die oben stehenden FACS-Daten eines Versuches sollen hier stellvertretend für alle anderen gezeigt werden. Die unterschiedlichen Versuche wichen bezüglich der FACS-Analyse kaum voneinander ab.

Anders verhielt es sich bei Tunicamycin und Rotenon: Hier konnte selbst durch Einsatz sehr hoher Dosen (siehe Tabelle 4) der Noxen nach 24 Stunden sowohl im FACS als auch im Fluoreszenzmikroskop nach PI-Färbung gegenüber der Kontrolle kein signifikant erhöhter Zelltodanteil festgestellt werden. Dieser Befund stand im Gegensatz zu erheblichen

morphologischen Veränderungen der betroffenen Zellen im Durchlichtmikroskop: Sehr viele Zellen lösten sich vom Boden der Kulturflasche, ihre Größe nahm ab, ihre Granularität zu. Diese Zellen waren offensichtlich massiv geschädigt. Wartete man weitere 24 Stunden (gesamt 48 Stunden), so nahm der Anteil der PI-positiven Zellen zwar etwas zu, die Gesamtzellzahl aber deutlich ab. Es trat erheblich Debris auf, FACS-Analysen wurden ungenau und nicht reproduzierbar.

Die Lösung des Problems brachte die Färbung mit Höchst-Farbstoff nach 24 Stunden.

Der blaue Fluoreszenzfarbstoff Höchst (Bisbenzimid) bindet DNA und eignet sich somit zur Darstellung von Chromosomen. Für die Fragestellung nach Zellstress war die veränderte optische Präsentation von apoptotischen Zellen durch Kondensation der Chromosomen wichtig. In einem relativ frühen Stadium der Apoptose kondensierten die Chromosomen, bevor sie anschließend fragmentiert und in kleinen Vesikeln abgestoßen wurden. Diese Verdichtung des Chromatins ging fluoreszenzmikroskopisch einher mit einer deutlichen Signalintensivierung des Nukleus, die ihn erst voll sichtbar machte. Somit konnten in diesem Sinne apoptotische Zellen eindeutig von normalen Zellen unterschieden werden. Durch die gleichzeitige Färbung mit Propidiumiodid konnten Zellen in einem späteren Stadium der Apoptose sowie nekrotische Zellen abgegrenzt werden. Deren Anteil lag aber, wie oben beschrieben, nicht signifikant höher als in der unbehandelten Kontrolle. Im Fluoreszenzmikroskop wurden, nach Zugabe von PI und Höchst, in vier willkürlich ausgewählten Gesichtsfeldern der Zellkulturflasche die Gesamtzellzahl und die Anzahl der PI- und Höchst-positiven Zellen gezählt. Dann wurde mit den errechneten Mittelwerten der Anteil an frühapoptotischen Zellen bestimmt.

Die Konzentrationen von Tunicamycin bzw. Rotenon wurden so gewählt, dass dieser Anteil, analog zu den anderen Noxen, zwischen 20% und 30% lag. Somit ist eine Vergleichbarkeit der Experimente gegeben.

4.4 mRNA Regulation bei MG132

Im Versuch und der Replikation konnte die Zunahme des Zelltodanteils mit 60 µg/ml MG132 mit sehr geringen Schwankungen reproduzierbar auf etwas über 20% eingestellt werden. Die mit MG132 behandelten Zellen wirkten im Mikroskop deutlich gestresst, dennoch blieb der überwiegende Anteil adhäsiv und vital. HPRT blieb in Probe und Kontrolle und im Zeitverlauf stabil exprimiert (Abbildung 8).

Die „melting curve“ zeigte singuläre Peaks für alle Gene und minimale „primer-dimer“. Alle Proben in der Light-Cycler-PCR stiegen linear und parallel an und erreichten das Endplateau, die Kontrollen ohne cDNA blieben negativ (Abbildung 7).

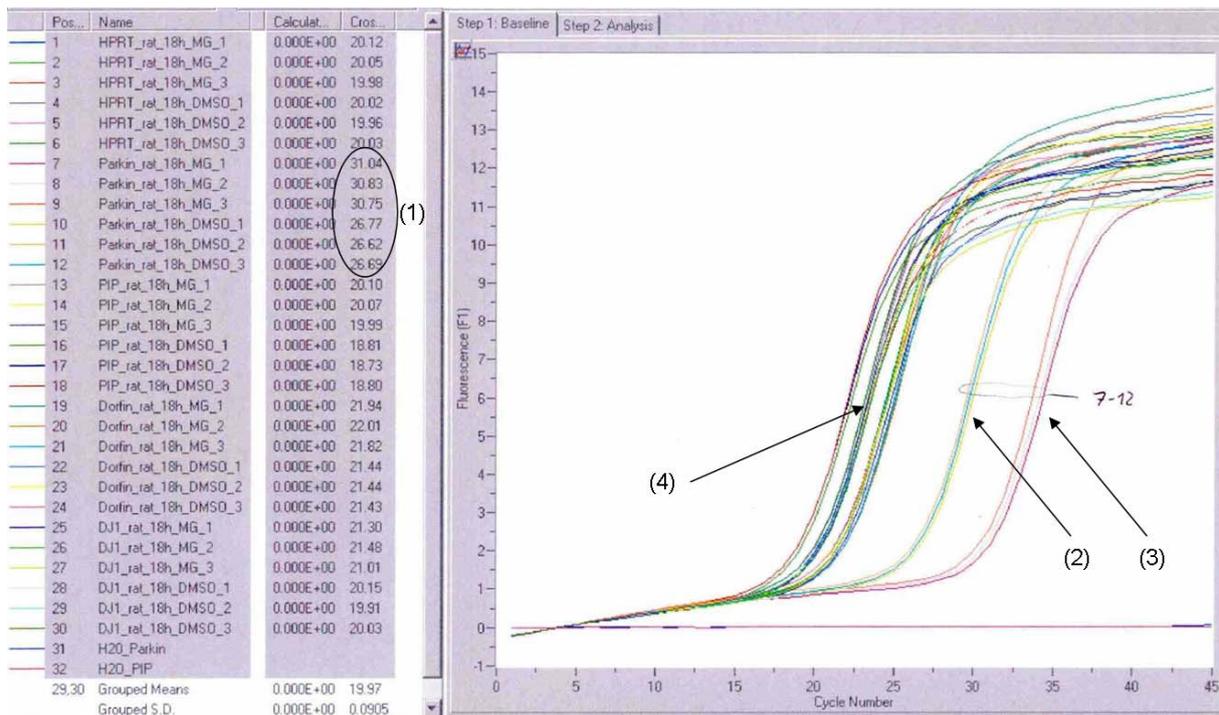


Abbildung 7: Light Cycler Amplifikationskurve bei MG132 nach 18 Stunden: Light-Cycler-Kurven und CPs der MG132-Proben und DMSO-Kontrollen für HPRT, Parkin und Dorfin (sowie weiterer, nicht berücksichtigter Gene) jeweils im Triplikat. Gesondert hervorgehoben sind die CPs (1) und Kurven Parkins, die für MG132 (3) im Vergleich zu den Kontrollen (2) deutlich nach rechts verschoben sind, d.h. größere CPs haben und somit herabreguliert sind. HPRT (4) ist nicht reguliert.

Gen	Bedingung	CP	Linearer Wert	MW der CPs	Stabw. der CPs	95% Konf. Int.	Differenz CP-MW	
HPRT	MG132 - 9h	19,96	9,80486E-07	20,03	0,070	0,07948		
HPRT	MG132 - 9h	20,04	9,27596E-07					
HPRT	MG132 - 9h	20,10	8,8981E-07					
HPRT	DMSO - 9h	19,94	9,94173E-07	19,81	0,115	0,13066		
HPRT	DMSO - 9h	19,74	1,142E-06					
HPRT	DMSO - 9h	19,74	1,142E-06					
							0,23	Zyklen

Gen	Bedingung	CP	Linearer Wert	MW der CPs	Stabw. der CPs	95% Konf. Int.	Differenz CP-MW	
HPRT	MG132 - 18h	20,12	8,77559E-07	20,05	0,070	0,07921		
HPRT	MG132 - 18h	20,05	9,21189E-07					
HPRT	MG132 - 18h	19,98	9,66987E-07					
HPRT	DMSO - 18h	20,02	9,40545E-07	20,00	0,038	0,04284		
HPRT	DMSO - 18h	19,96	9,80486E-07					
HPRT	DMSO - 18h	20,03	9,34048E-07					
							0,05	Zyklen

		Relativ zu HPRT	MW rel. Werte	Stabw.	95% Konf. Int.	Regulation		
Parkin	MG132 - 9h	0,00170	1,66711E-09	0,00014	0,00016			
Parkin	MG132 - 9h	0,00143	1,32626E-09					
Parkin	MG132 - 9h	0,00148	1,31709E-09					
Parkin	DMSO - 9h	0,00354	3,52434E-09	0,00024	0,00027	0,414		
Parkin	DMSO - 9h	0,00359	4,10492E-09					
Parkin	DMSO - 9h	0,00399	4,55469E-09					
							1/x =	2,414

		Relativ zu HPRT	MW rel. Werte	Stabw.	95% Konf. Int.	Regulation		
Parkin	MG132 - 18h	0,00052	4,52928E-10	0,00055	0,00003	0,00004		
Parkin	MG132 - 18h	0,00057	5,23896E-10					
Parkin	MG132 - 18h	0,00057	5,53768E-10					
Parkin	DMSO - 18h	0,00929	8,7383E-09	0,00969	0,00035	0,00039		
Parkin	DMSO - 18h	0,00989	9,69575E-09					
Parkin	DMSO - 18h	0,00989	9,23654E-09					
							1/x =	17,537

		Relativ zu HPRT	MW rel. Werte	Stabw.	95% Konf. Int.	Regulation		
Dorfin	MG132 - 9h	0,23816	2,33512E-07	0,00541	0,00612			
Dorfin	MG132 - 9h	0,24656	2,28706E-07					
Dorfin	MG132 - 9h	0,24827	2,20916E-07					
Dorfin	DMSO - 9h	0,39229	3,90006E-07	0,01056	0,01195	0,611		
Dorfin	DMSO - 9h	0,41180	4,70272E-07					
Dorfin	DMSO - 9h	0,39502	4,51116E-07					
							1/x =	1,636

		Relativ zu HPRT	MW rel. Werte	Stabw.	95% Konf. Int.	Regulation		
Dorfin	MG132 - 18h	0,28322	2,48543E-07	0,27319	0,01413	0,01599		
Dorfin	MG132 - 18h	0,25703	2,36772E-07					
Dorfin	MG132 - 18h	0,27932	2,70101E-07					
Dorfin	DMSO - 18h	0,37371	3,51493E-07	0,37038	0,01062	0,01202		
Dorfin	DMSO - 18h	0,35849	3,51493E-07					
Dorfin	DMSO - 18h	0,37893	3,53938E-07					
							1/x =	0,738
							1/x =	1,356

		Relativ zu HPRT	MW rel. Werte	Stabw.	95% Konf. Int.	Regulation		
Slah-1	MG132 - 9h	0,45063	4,41832E-07	0,02086	0,02360			
Slah-1	MG132 - 9h	0,41180	3,8198E-07					
Slah-1	MG132 - 9h	0,44442	3,9545E-07					
Slah-1	DMSO - 9h	0,84675	8,41811E-07	0,03836	0,04341	0,513		
Slah-1	DMSO - 9h	0,88884	1,01506E-06					
Slah-1	DMSO - 9h	0,81225	9,27596E-07					
							1/x =	1,950

		Relativ zu HPRT	MW rel. Werte	Stabw.	95% Konf. Int.	Regulation		
Slah-1	MG132 - 18h	0,26609	2,33512E-07	0,26733	0,00107	0,00121		
Slah-1	MG132 - 18h	0,26794	2,46826E-07					
Slah-1	MG132 - 18h	0,26794	2,59098E-07					
Slah-1	DMSO - 18h	0,95264	8,95999E-07	0,94827	0,00757	0,00857		
Slah-1	DMSO - 18h	0,93952	9,21189E-07					
Slah-1	DMSO - 18h	0,95264	8,8981E-07					
							1/x =	0,282
							1/x =	3,547

Tabelle 6: „crossing points“ und relative Regulation eines Versuchs mit MG132: Die Tabellen beinhalten die von der Light Cycler Software gewonnenen Daten (CPs) und die daraus berechneten Linearen Werte und statistischen Größen, sowie die Regulation für 3 Stunden (A), 6 Stunden (B), 9 Stunden (C) und 18 Stunden (D). Der jeweils erste Datenblock bei jedem Zeitpunkt zeigt HPRT, die CPs und Linearen Werte, die aus den CPs gebildeten Mittelwerte, Standardabweichungen und 95%-Konfidenzintervalle, sowie die Regulation HPRTs auf CP-Basis. Für Parkin, Dorfin und Slah-1 beziehen sich die Mittelwerte, Standardabweichungen und 95%-Konfidenzintervalle auf das Verhältnis ihrer Linearen Werte zu HPRT. Die relative Regulation wird als Faktor angegeben und zum besseren Verständnis der Herunterregulation als Kehrwert (1/x) umgerechnet.

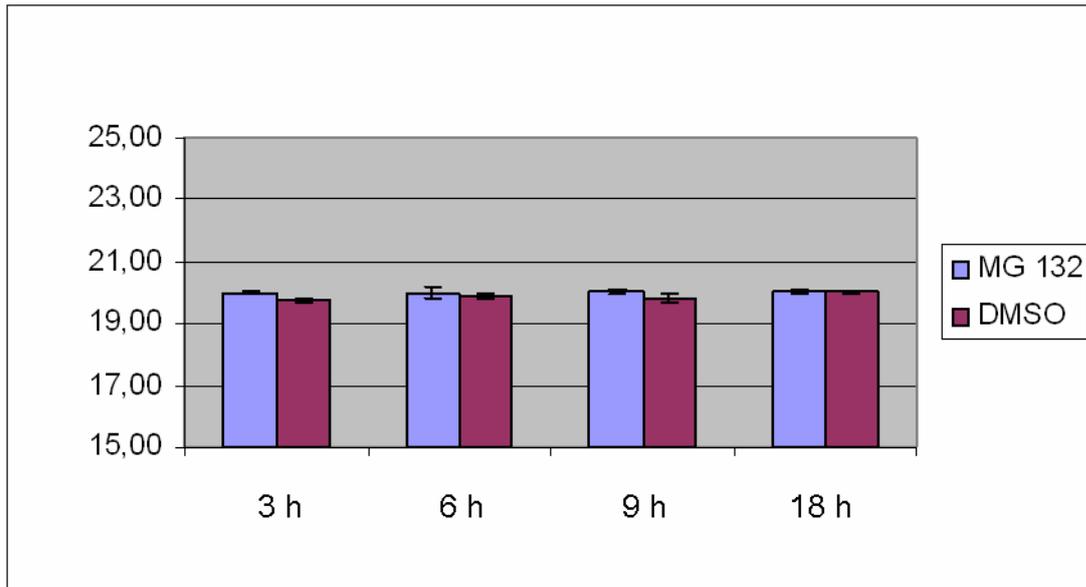


Abbildung 8: Balkendiagramm für HPRT bei einem MG132 Versuch: Jeder Balken stellt für HPRT die Mittelwerte aus drei „crossing points“ gleicher Bedingungen dar. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall. Je zwei benachbarte Balken vergleichen MG132-behandelte Proben mit DMSO-Kontrollen zu einem Zeitpunkt. Die Unterschiede liegen immer deutlich unter den maximal akzeptierten 0,5 Zyklen.

4.4.1 Parkin

Parkin erfuhr unter proteasomaler Inhibition mit MG132 eine sehr starke Herunterregulation auf mRNA-Niveau. Zunächst, 3 Stunden nach MG132-Zugabe, war noch keine Regulation bemerkbar. Im weiteren Verlauf, nach 6, 9 und 18 Stunden, sank das Expressionsniveau von Parkin kontinuierlich, während es in den unbehandelten Kontrollen weitgehend konstant blieb (dort maximale Schwankungen um den Faktor 2,5). In zwei unabhängigen Versuchen wurde Parkin nach 18 Stunden 31,8- bzw. 17,5-fach (Tabelle 6 und Abbildung 9 und 10) herunterreguliert.

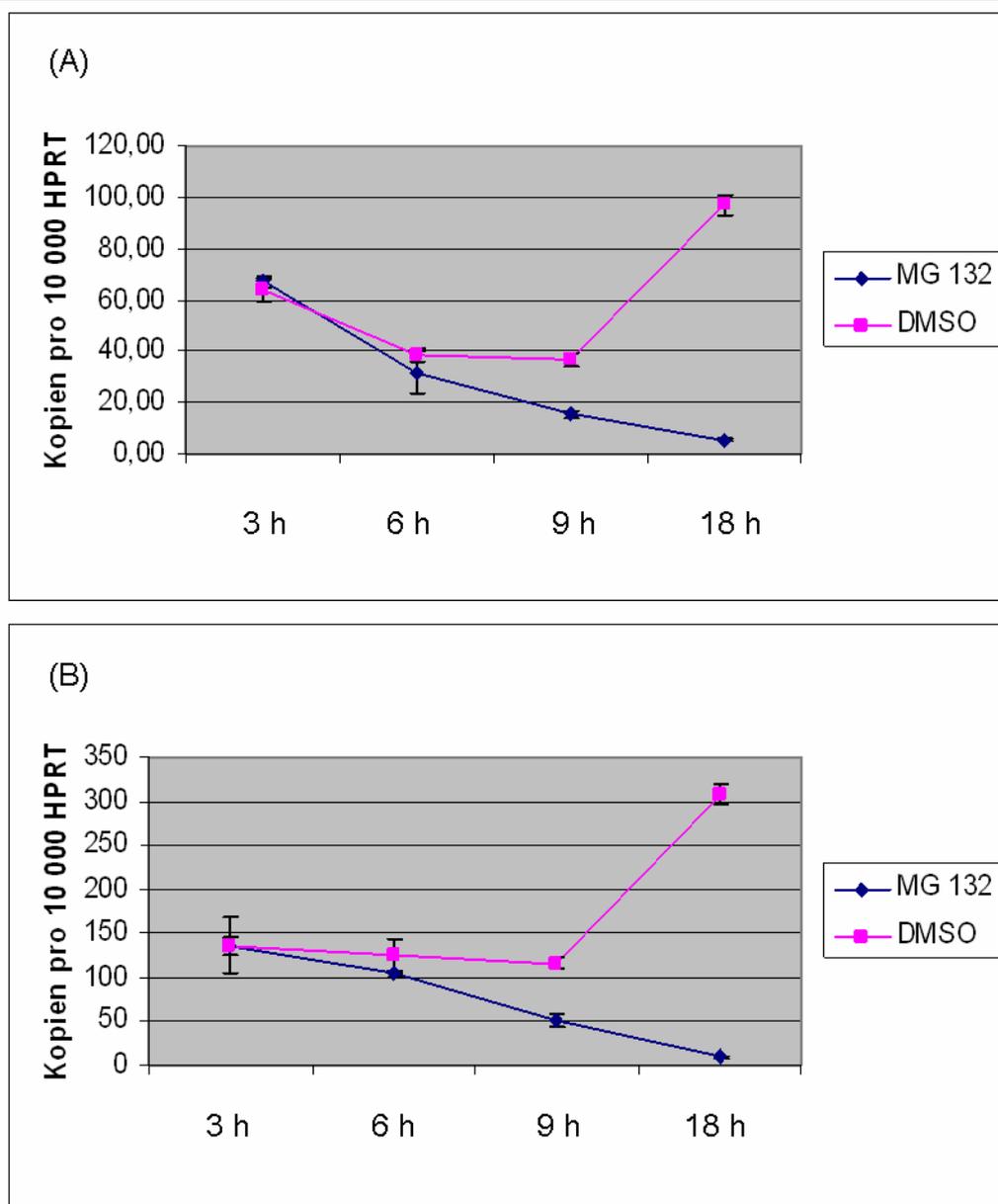


Abbildung 9: Diagramme der relativen Regulation Parkins nach MG132 in 2 unabhängigen Versuchen: (A) und (B): Es zeigt sich eine deutliche Herabregulation im Zeitverlauf, insbesondere nach 18 Stunden. Auffällig war die geringfügige Regulation in den DMSO-Kontrollen („Wannenform“), insbesondere sichtbar in (A) (vergleiche 5.4). Die Fehlerbalken stellen das 95%-Konfidenzintervall dar.

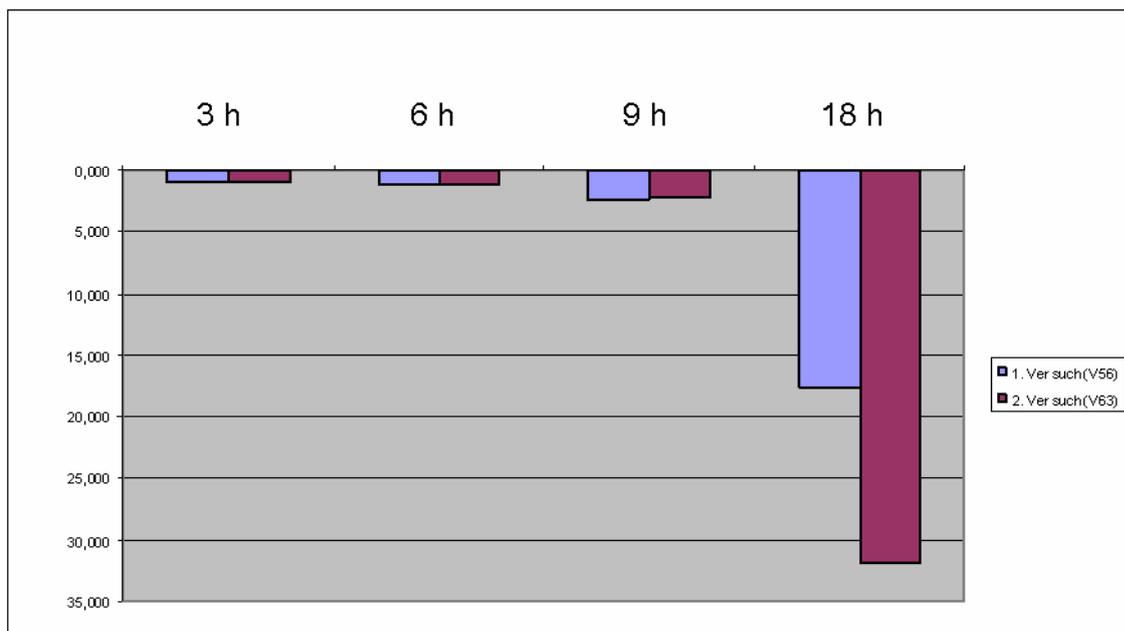


Abbildung 10: Balkendiagramm der Regulation Parkins im Zeitverlauf und Gegenüberstellung der beiden unabhängigen Versuche: Die Regulation von Parkin unter MG132 nahm im Zeitverlauf zu. Eine zunächst mäßige aber zunehmende Herunterregulation nach 3, 6 und 9 Stunden erreichte zum spätesten untersuchten Zeitpunkt, nach 18 Stunden, ihren größten Wert. Die beiden analogen Versuche führten zu vergleichbaren Ergebnissen (vergleiche Abbildung 9).

4.4.2 Siah-1

Wie Parkin wird auch Siah-1 bei Inhibition der Proteasomen mäßig herabreguliert, wenn auch bei weitem nicht so ausgeprägt wie Parkin. Wie bei Parkin sind die relativen mRNA-Level nach 3 Stunden in behandelten und unbehandelten Proben noch annähernd gleich. Beginnend nach 6 Stunden und weiter zunehmend nach 9 Stunden bis zu einem Maximum der Regulation nach 18 Stunden, nimmt das relative Expressionsniveau von Siah-1 ab. In zwei unabhängigen Versuchen wurde eine Herunterregulation um bis zu Faktor 4,51 bzw. 3,55 festgestellt. Die Veränderungen der DMSO-Kontrollen sind sehr gering. In den untenstehenden Diagrammen werden sie in der dezenten „Wannenform“ der DMSO-Kurve sichtbar (Abbildung 11).

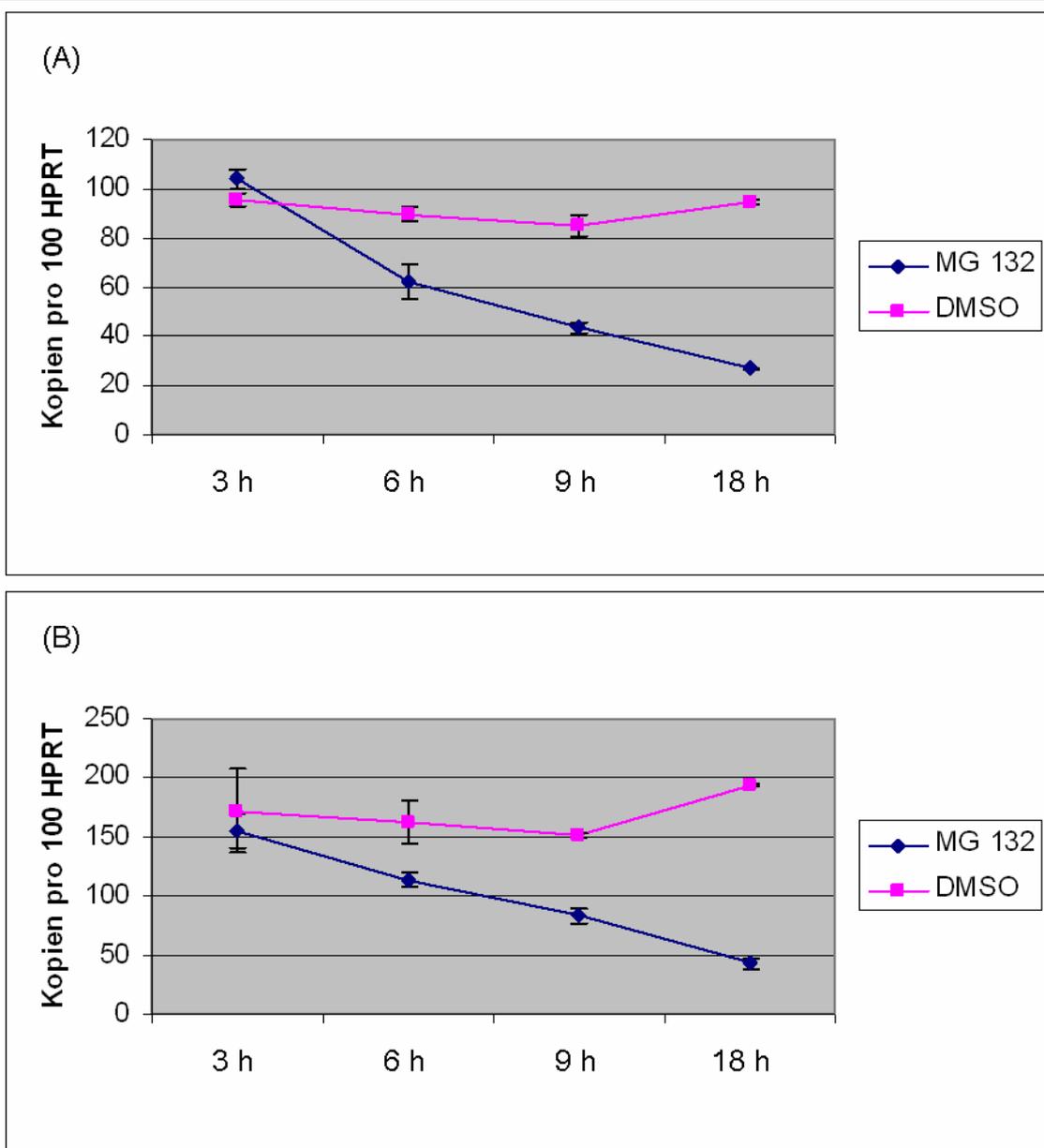


Abbildung 11: Diagramme der relativen Regulation von Siah-1 nach MG132 in 2 unabhängigen Versuchen: (A) und (B): Die Punkt-Liniendiagramme zeigen die Reproduzierbarkeit der Experimente. Hier wird der nahezu identische Zeitverlauf der Herunterregulation von Siah-1 deutlich. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

4.4.3 Dorfin

Die dritte E3-Ubiquitin-Ligase, Dorfin, unterlag keiner nennenswerten Regulation (maximal 1,64-fache Herabregulation; nach den von uns definierten statistischen Kriterien nicht signifikant) unter Einwirkung von MG132 auf die Zellen. Da keine Regulation beobachtet werden konnte, wurde auf eine Wiederholung des Versuchs verzichtet (Abbildung 12).

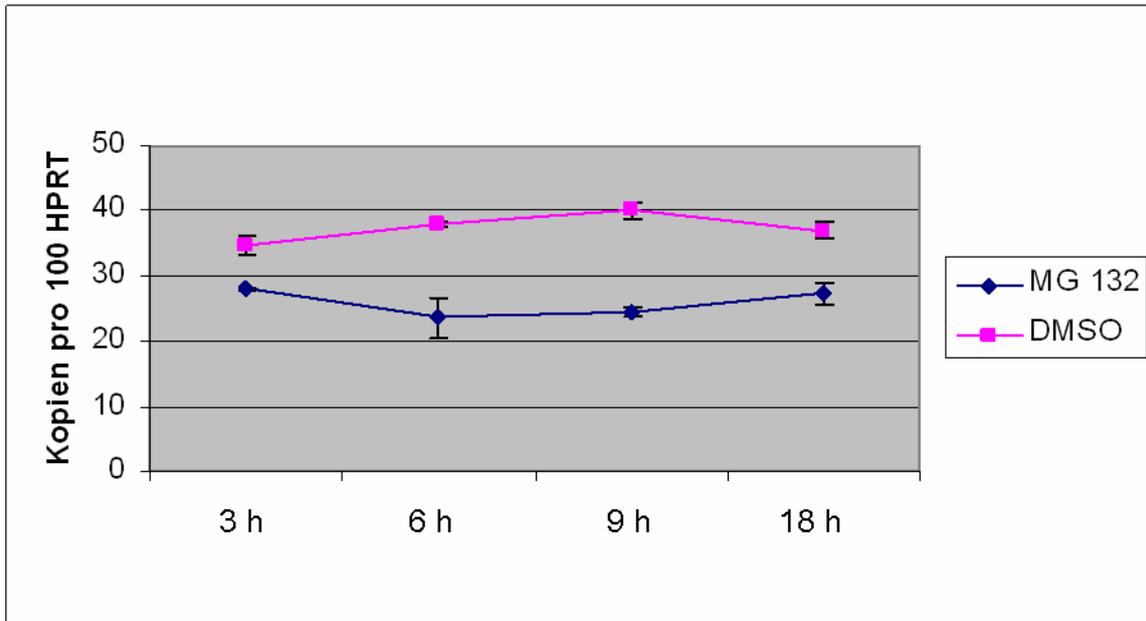


Abbildung 12: Diagramm der relativen Regulation Dorfins nach MG132: Dorfin war unter MG132 Einwirkung nicht signifikant reguliert. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

4.5 Proteinregulation Parkins bei MG132

Um die deutliche Herabregulation Parkins unter proteasomaler Inhibition mit MG132, die auf mRNA-Ebene gezeigt werden konnte, auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Western Blots durchgeführt. Die Pellets aus jeweils drei Triplikaten wurden vereint und gemeinsam auf ein Gel geladen (bereits die Proteinbestimmung erfolgte gemeinsam). Hier konnte keine signifikante Regulation von Parkin, im Vergleich zu dem gleichmäßig exprimierten Protein Actin, beobachtet werden (Abbildung 13).

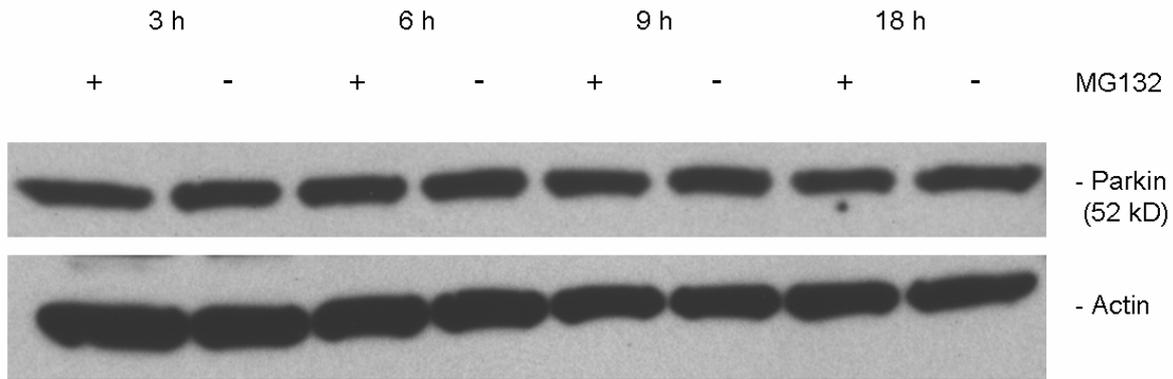


Abbildung 13: Western Blot für Parkin und Actin nach 3, 6, 9 und 18 Stunden MG132 Einwirkung: Parkin wird in den behandelten Proben und den Kontrollen unverändert dargestellt.

Actin diene, ähnlich dem „housekeeping gene“ HPRT in der RT-PCR, als interne Kontrolle. Es handelt sich um ein Protein des Zytoskellets, das gleichmäßig exprimiert wird und in vielen Publikationen als Kontrollprotein diene (z.B. Biasini et al. 2004).

Für Siah-1 und Dorfin waren keine kommerziellen Antikörper für den Western Blot erhältlich, somit konnte die Proteinebene leider nicht untersucht werden.

4.6 mRNA Regulation bei Tunicamycin

Tunicamycin war, neben Rotenon, eine Noxe, bei der Zellstress innerhalb von 24 Stunden mit Höchst-Färbung sichtbar gemacht wurde. Die Erhöhung des Anteils frühapoptotischer Zellen auf ca. 20-30% gelang mit 4,7 $\mu\text{mol/l}$ Tunicamycin gut und war reproduzierbar. HPRT blieb im Vergleich zur Kontrolle und im Zeitverlauf stabil. Lediglich nach drei Stunden im ersten und nach 18 Stunden im zweiten Versuch war HPRT grenzwertig reguliert (-0,52 bzw. +0,51 Zyklen bei Grenzwert 0,5 Zyklen) (Abbildung 14). Einige Zellen lösten sich vom Kulturflaschenboden ab und veränderten ihre Morphologie. Diese Zellen waren überwiegend Höchst-positiv. Der Anteil der Propidiumiodid-positiven Zellen stieg, wie oben erwähnt, nicht an, jedoch waren alle PI-positiven Zellen gleichzeitig Höchst-positiv. Dies spricht für die Spezifität der verwendeten Färbemethoden.

Die „melting curve“ zeigt singuläre Peaks für alle Gene und minimale „primer-dimer“. Alle Proben in der Light-Cycler-PCR stiegen linear und parallel an und erreichten das Endplateau, die Kontrollen ohne cDNA blieben negativ.

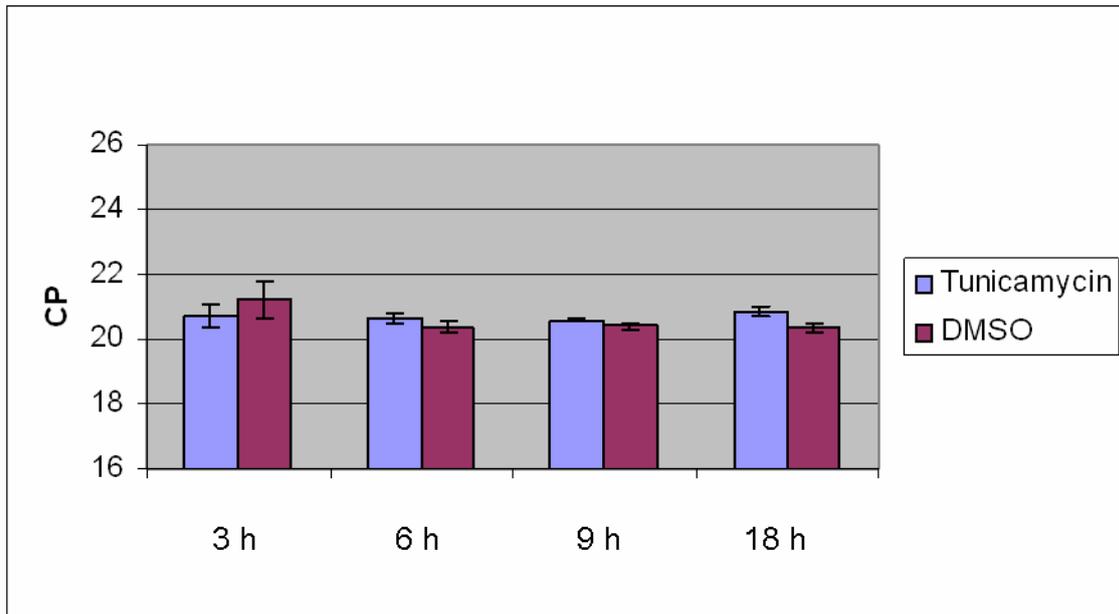


Abbildung 14: Balkendiagramm für HPRT bei einem Tunicamycin Versuch: Zeigt die grenzwertige Regulation HPRTs um -0,52 Zyklen nach 3 Stunden. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

4.6.1 Parkin

In zwei unabhängigen Versuchen ergab sich nach 3, 6, 9 und 18 Stunden keine Regulation, die den Faktor 2 übertraf. Unterhalb dieses bestimmten Grenzwertes ließ sich lediglich mit zunehmender Zeit eine sehr leichte Tendenz zur Heraufregulation erkennen. Diese überschritt in diesen Versuchen nie den Faktor 1,77. Deshalb gilt Parkin unter Tunicamycin als nicht signifikant reguliert (Abbildung 15).

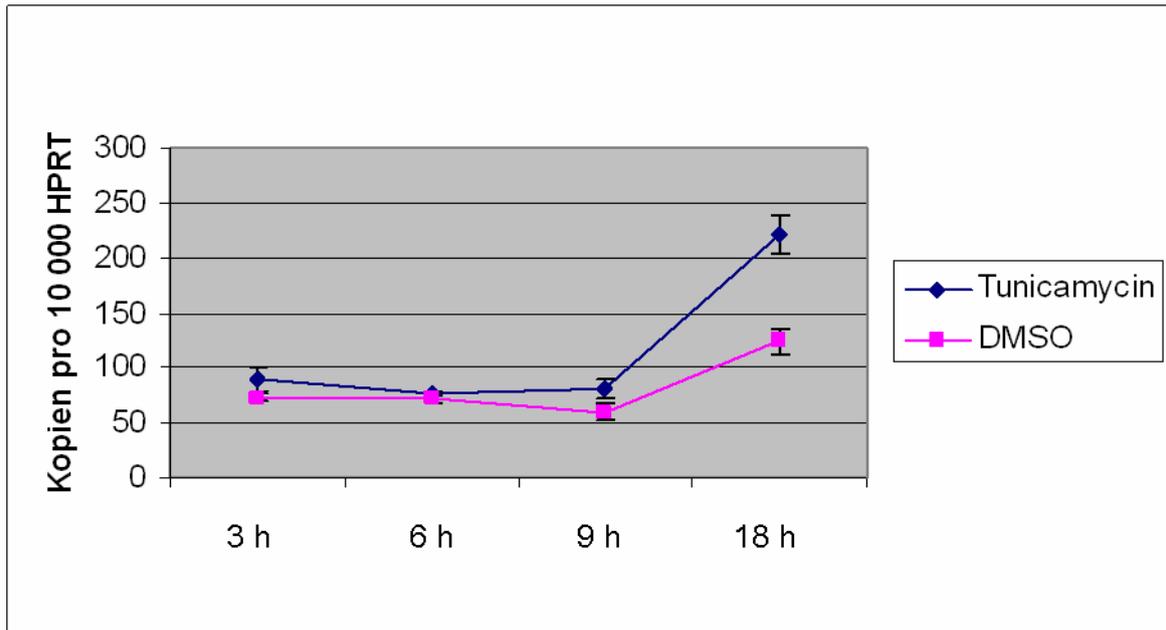


Abbildung 15: Diagramm der relativen Regulation Parkins nach Tunicamycin: Es zeigte sich keine signifikante Regulation (maximal 1,77-fach; dies entspricht dem Verhältnis 220/124 zum Zeitpunkt 18 Stunden). Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

4.6.2 Siah-1

Für Siah-1 zeigte sich ein ganz ähnlicher Verlauf, nur wird hier die für diese Versuche definierte Grenze überschritten. Siah-1 wurde, bei zunächst annähernd gleichen Werten nach 3 Stunden, im weiteren Verlauf unter Tunicamycin zunehmend mehr exprimiert als in den mit DMSO behandelten Kontrollen. Die größte Differenz ergab sich nach 18 Stunden mit 2,35- bzw. 2,45-facher relativer Regulation. Dies ist eine knapp überschwellige Heraufregulation auf mRNA-Niveau, mit fraglicher biologischer Relevanz (Abbildung 16).

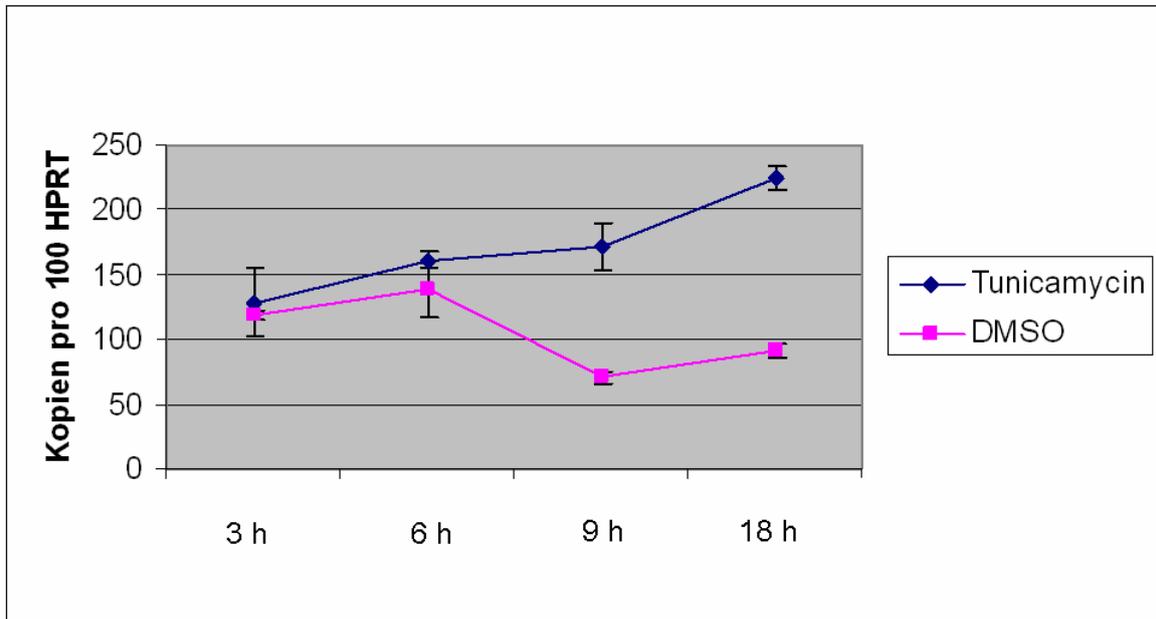


Abbildung 16: Diagramm der relativen Regulation von Siah-1 nach Tunicamycin: Siah-1 war nach 18 Stunden 2,45-fach heraufreguliert. Dies entspricht dem Verhältnis 225/92 zum Zeitpunkt 18 Stunden. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

4.6.3 Dorfin

Dorfin zeigte bei Tunicamycin-Exposition und dadurch vermitteltem Stress durch ungefaltete Proteine keine relative Regulation auf mRNA-Niveau. Deshalb wurde auf eine Wiederholung des Experiments verzichtet. Die großen 95%-Konfidenzintervalle bei 3 Stunden sind auf die grenzwertige Regulation von HPRT (-0,52 Zyklen) in diesem Fall zurückzuführen. Dafür sind letztendlich durch einzelne „Ausreißer“ bedingte Schwankungen bei den „crossing points“ von HPRT verantwortlich (Abbildung 17).

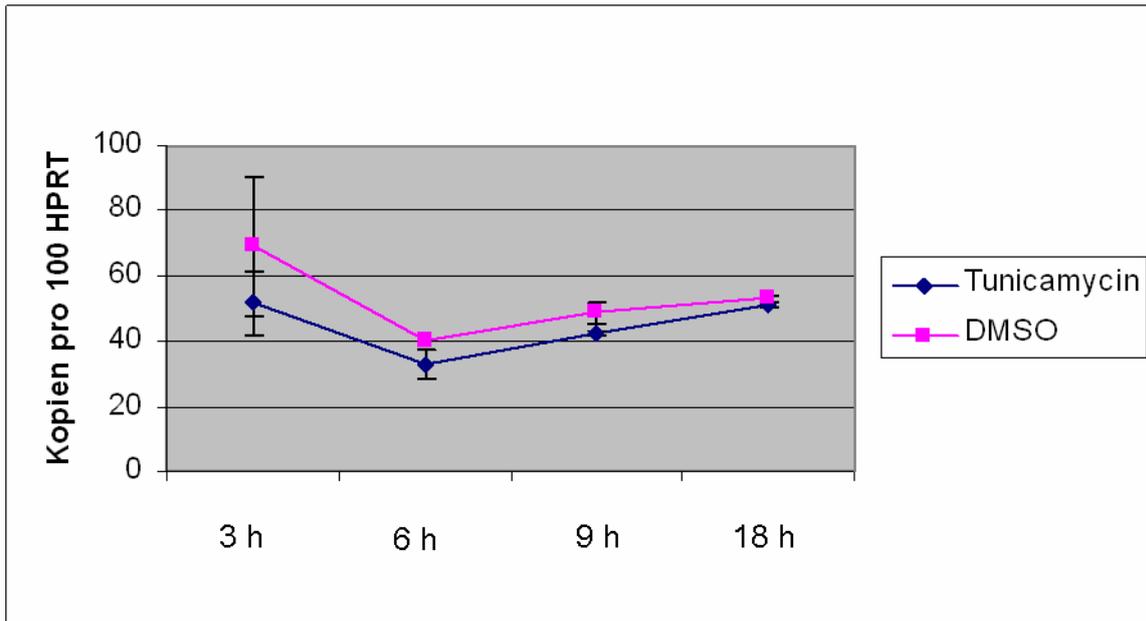


Abbildung 17: Diagramm der relativen Regulation Dorfins nach Tunicamycin: Dorfins zeigte keine Regulation unter 4,7 μ M Tunicamycin. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

4.7 Proteinregulation von Parkin bei Tunicamycin

Im Western Blot nach 3, 6, 9 und 18 Stunden konnte keine Regulation Parkins entdeckt werden. Versuche für Siah-1 und Dorfins konnten mangels Antikörper nicht durchgeführt werden.

4.8 mRNA Regulation bei Rotenon

Wie bei Tunicamycin wurde bei Rotenon der Zelltodanteil mit Höchst-Färbung quantifiziert. 50,7 μ mol/l waren die geeignete Konzentration, um in beiden Versuchen 20-30% Zelltodanteil zu erhalten. Die Stabilität des Expressionsniveaus von HPRT war bei Rotenon sehr ausgeprägt (Tabelle 7). Die Morphologie, das Adhäsionsverhalten und die Färbereigenschaften mit Höchst und Propidiumiodid erwiesen sich als vergleichbar mit Tunicamycin.

Die „melting curve“ zeigte singuläre Peaks für alle Gene und minimale „primer-dimer“. Alle Proben in der Light-Cycler-PCR stiegen linear und parallel an und erreichten das Endplateau, die Kontrollen ohne cDNA blieben negativ.

4.8.1 Parkin

Bei Rotenon zeigten sich Schwankungen des relativen Parkin-mRNA-Niveaus ohne klar erkennbaren Trend. So konnte sowohl die Herauf- als auch die Herunterregulation errechnet werden. Dabei wurde der Faktor 2 beinahe erreicht bzw. einmal knapp überschritten. Diese Schwankungen waren klein, inkonstant und wurden im Folgenden nicht als Regulation betrachtet (Tabelle 7). Die Proteinebene wurde nicht untersucht.

4.8.2 Siah-1

Siah-1 blieb bei mitochondrialer Komplex-I-Inhibition durch Rotenon weitgehend unreguliert (Tabelle 7).

4.8.3 Dorfin

Für Dorfin gilt das gleiche wie für Siah-1. Eine Regulation konnte nicht nachgewiesen werden, vielmehr war Dorfin äußerst stabil (Tabelle 7).

Da keine Regulation gezeigt werden konnte, wurde Dorfin nicht zweimal bestimmt.

Gen		3 h	6 h	9 h	18 h
HPRT (1. Versuch)	Zyklen	0,13	0,30	0,01	-0,06
HPRT (2. Versuch)	Zyklen	0,11	-0,01	0,36	0,10
Parkin (1. Versuch)	Regulationsfaktor	1,229	2,228	1,555	0,531
Parkin (2. Versuch)	Regulationsfaktor	1,334	1,278	0,865	0,562
Siah-1 (1. Versuch)	Regulationsfaktor	1,013	1,566	1,356	1,571
Siah-1 (2. Versuch)	Regulationsfaktor	0,763	1,491	1,348	1,532
Dorfin	Regulationsfaktor	0,806	1,173	0,918	0,933

Tabelle 7: Relative Regulation von HPRT, Parkin, Siah-1 und Dorfin unter Rotenon: Die zweite und dritte Zeile zeigt die Regulation von HPRT in 2 Versuchen im Zeitverlauf unter Rotenon. Angegeben sind die Differenzen der Mittelwerte von jeweils 3 CPs von behandelten und unbehandelten Proben.

Der untere Tabellenabschnitt enthält die relativen Regulationsfaktoren der Gene unter Rotenon. Sie wurden ebenfalls aus den Mittelwerten von je drei gleichen Proben errechnet. Werte größer 1,0 stellen eine Herauf-, Werte kleiner 1,0 eine Herunterregulation dar, aber erst Werte größer 2,0 bzw. kleiner 0,5 galten nach den Versuchsanforderungen als signifikant reguliert.

4.9 mRNA Regulation bei H₂O₂

Trotz des exakten Angleichens der Zelltodanteile zu 20-30%, wie bei den anderen Stressoren, und der guten Handhabbarkeit der mit H₂O₂ behandelten Zellen in Kultur, gelang es nicht, valide Daten zur Genexpression zu erlangen. Dies lag vermutlich an der chemischen Eigenschaft des H₂O₂, RNA zu zerstören. In allen Versuchen war die RNA-Ausbeute nach Extraktion gering und die Qualität schlecht. Da durchwegs eine Verminderung der RNA-Menge in behandelten Zellen gesehen wurde, liegt eine Degradation durch H₂O₂ nahe. Die Daten der Light Cycler PCR zeigten eine ausgeprägte Regulation des „housekeeping gene“ HPRT, die alle anderen Daten nicht auswertbar machte (Abbildung 18). Es war darüber hinaus kein eindeutiger Trend der Regulation in einem der untersuchten Gene festzustellen. Dennoch waren die H₂O₂-Versuche wichtig, denn sie machten es möglich, den Effekt, der durch DMSO eintrat, abzuschätzen: Im versuchsübergreifenden Vergleich aller durchgeführten Experimente waren die Zelltodanteile in FACS-Analyse und Mikroskopie in DMSO-Kontrollen der anderen Stressoren und Medium- bzw. Wasser-Kontrollen der H₂O₂-Versuche identisch. Darüber hinaus lagen die Expressionslevel der entsprechenden Gene in Kontrollproben in allen Versuchen gleich, unabhängig davon, ob DMSO oder lediglich Wasser als Lösungsmittel diente. Eine Modifikation des Zelltodanteils oder der Genexpression der untersuchten Gene durch DMSO konnte folglich ausgeschlossen werden. Western Blots wurden für H₂O₂ nicht durchgeführt.

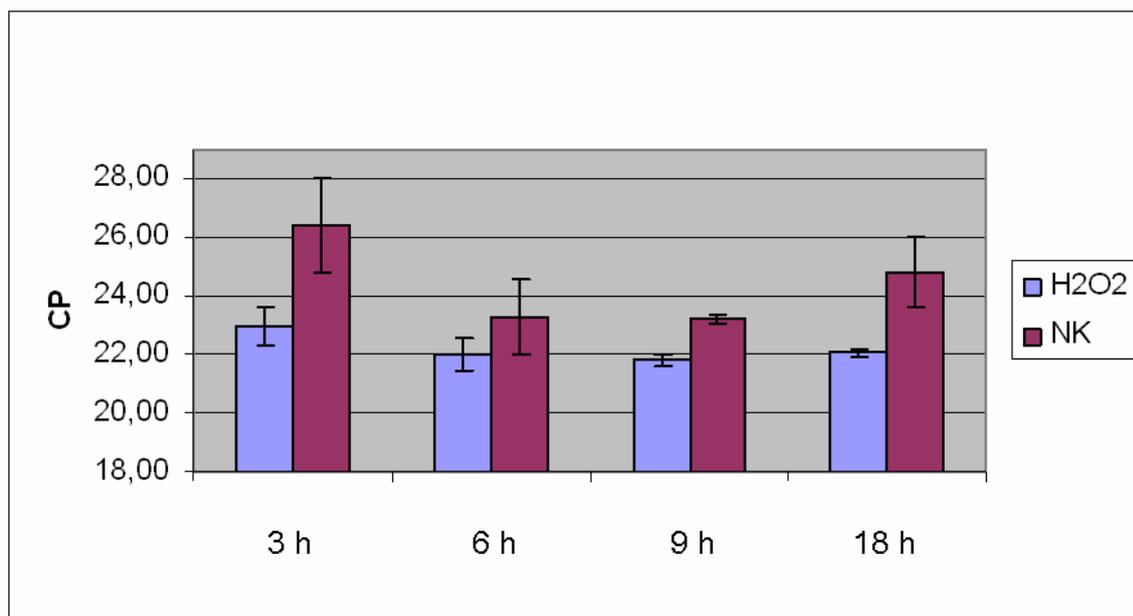


Abbildung 18: Balkendiagramm für HPRT bei einem H₂O₂ Versuch: HPRT war signifikant (>0,5 Zyklen) reguliert. Die Fehlerbalken zeigen das 95%-Konfidenzintervall.

5 Diskussion

5.1 Bewertung des Zellmodells und der Zelltodexperimente

In dieser Arbeit wurden erstmals systematisch verschiedene Parkinson-assoziierte Stressoren bezüglich ihrer Auswirkung auf die endogene Expression von Ubiquitin-E3-Ligasen (Parkin, Siah-1 und Dörfin) untersucht. Es konnte hierbei insbesondere die starke und spezifische Herabregulation Parkins unter proteasomaler Inhibition gezeigt werden. Dies geschah in einem Zelltodmodell mit PC12 Zellen. Als Inhibitor diente dabei die Substanz MG132. Zur Gewichtung der potentiellen physiologischen Relevanz dieser Befunde für die Pathogenese des Morbus Parkinson ist die Validität dieses Zellmodells entscheidend. Zellkulturversuche sind gängige und weit verbreitete experimentelle Ansätze, um pathophysiologische Gegebenheiten in vivo zu simulieren. Zur Erforschung des Morbus Parkinson sind in den letzten Jahren vor allem zwei Zellmodelle in der Literatur zum Einsatz gekommen: die PC12 Zelllinie aus dem Phäochromozytom der Ratte und die humane SH-SY5Y Zellreihe, die einem Neuroblastom entstammt. Beide sind anerkannte Modelle für dopaminerge Neurone. Für die PC12-Zelllinie gilt dies insbesondere nach Ausdifferenzierung eines neuronalen Phänotyps durch NGF. Dies setzt voraus, dass die Zellen in einer gewissen Dichte für mehrere Tage unter NGF-Einfluss wachsen können. Sie bilden dann dendritenartige Fortsätze aus. Diese Vorgehensweise war aus mehreren Gründen für die hier beschriebenen Versuche ungeeignet: Die für die Ausdifferenzierung notwendige Zelldichte war zu gering, um ausreichend Zellmaterial für die mRNA-Extraktion zu gewinnen. Außerdem dauerte die Ausdifferenzierung zu lange, um in allen Kulturflaschen gleiche Wachstumsraten und Zelldichten zu gewährleisten, und somit gleiche Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Stressoren zu erzeugen. Die Resistenz gegenüber toxischen Stimuli variierte nach den Erfahrungen aus Vorversuchen stark mit der Zelldichte. Um nach dem Ausplattieren eine kurze und gleichmäßige Wachstumsphase für alle Zellen zu gewährleisten, wurde somit auf die Ausdifferenzierung verzichtet und die Behandlung 24 Stunden nach Ausplattierung undifferenzierter Zellen begonnen. Dass dieses Modell dennoch geeignet war, die dopaminergen Neurone der Substantia nigra zu repräsentieren, wird mit der Herkunft der Zelllinie aus dem Nebennierenmark begründet. Die dort vorkommenden Zellen sind postsynaptische sympathische Neurone und produzieren Katecholamine, u.a. Dopamin (wie auch das Phäochromozytom). Da sie diese physiologischerweise direkt in die Blutbahn ausschütten, benötigen sie keine Fortsätze, wie z.B. Dendriten.

Die zweite gängige Zelllinie, SH-SY5Y, wurde in den hier beschriebenen Versuchen nicht eingesetzt. Dennoch konnte die Herabregulation Parkins unter proteasomaler Inhibition auch in diesen Zellen gezeigt werden (bislang unveröffentlichte Daten von Andreas Koch).

Um den Zellstress, der durch unterschiedliche Substanzen erzeugt wurde, vergleichbar zu machen, wurde ein Zelltodassay entworfen, bei dem nach 24 Stunden ein Anteil von 20-30% der Zellen tot sein sollten. Ein ähnlicher Zelltodassay wurde von Darios et al. beschrieben, allerdings wurden hier 50% Zelltod als geeignet erachtet (Darios et al. 2003). In der Hoffnung die Aussagekraft der RNA-Analysen zu erhöhen, ließen wir weniger Zellen sterben und hatten somit mehr intakte RNA zur Verfügung stehen. Der Zeitraum von 24 Stunden erwies sich bei dieser Arbeit als ausreichend lang, um bei geeigneter Stressorenkonzentration die gewählte Zelltodrate zu erreichen. Nach kürzeren Inkubationszeiten waren bei einigen Stressoren, selbst bei sehr hohen Konzentrationen, noch keine morphologischen Veränderungen der Zellen zu sehen. Wie hier gezeigt werden konnte, benötigen die Zellen zudem einige Zeit, um auf den Stress mit expressionellen Veränderungen zu reagieren. Diese auf Proteinebene wiederzuspiegeln, dauerte, wie Andreas Koch nach Abschluss dieser Arbeit zeigen konnte (vergleiche 5.4), nochmals länger. Andererseits waren 24 Stunden ausreichend kurz, so dass eine vollständige Erholung und Normalisierung der überlebenden Zellen noch nicht eintreten konnte.

In diesem Zusammenhang konnte die interessante Beobachtung gemacht werden, dass Zellstress durch Rotenon und Tunicamycin selbst in sehr hohen Dosen nach 24 und bis zu 48 Stunden nur in geringem Maße zur Propidiumiodid-Aufnahme in Zellen führte. Wie an anderer Stelle beschrieben, wurde für diese Stressoren aus diesem Grund die Zelltodquantifizierung mittels Fluoreszenzmikroskopie anstatt mit FACS-Analyse durchgeführt. Im Lichtmikroskop und mittels Höchst-Färbung ließen sich nach 24 Stunden mit den gewählten Stressorenkonzentrationen alle charakteristischen Merkmale apoptotischer Zellen identifizieren: kondensierte und fragmentierte Höchst-positive Chromosomen in kleinen, granulären Zellen und viele vom Boden abgelöste kleine Zellen und Zelltrümmer in trübem Medium. Es fehlte lediglich die Färbung mit Propidiumiodid. Da Energiemangel die Ursache für PI-Aufnahme ist, bleibt es spekulativ, warum selbst bei Komplex-I-Inhibition der Atmungskette durch Rotenon diese nicht eintrat.

Die in der Einleitung beschriebenen Pathomechanismen, die im Verdacht stehen, bei der Entstehung des Morbus Parkinson beteiligt zu sein, stellen Prozesse dar, die über viele Monate oder Jahre auf die menschlichen Neurone einwirken. Das Modell Zellkultur erlaubte nur die Betrachtung über wenige Tage und musste somit in „Zeitraffer“ bewirken, was sonst lange Zeit in Anspruch nimmt. Zudem sind die diskutierten Pathomechanismen komplex interagierende, auf unterschiedlichen Stoffwechselwegen wirkende Effekte, die noch nicht abschließend verstanden sind. Die Simulation durch simple Inhibition eines enzymatischen Komplexes oder schlichte Zugabe eines Agens, das (patho)physiologisch nicht vorliegt, stellt eine stark vereinfachte

Methode dar. Dennoch sind die verwandten Stressoren gängige, in der Literatur beschriebene Substanzen und im Zusammenhang mit der Grundlagenforschung des Morbus Parkinson anerkannt.

Aus den genannten Gründen ist das hier gewählte Modell mit einigen Unzulänglichkeiten versehen und bedarf der Überprüfung durch andere Methoden, die den Gegebenheiten im menschlichen Körper näher kommen. Nach Abschluss dieser Arbeit konnte Andreas Koch die Parkineffekte auch in SH-SY5Y-Zellen und mit einem anderen Proteasomeninhibitor replizieren, was die Relevanz der Ergebnisse erhöht.

Da sich Versuche an lebenden Menschen zur Untersuchung von zellulären Stressbedingungen aus ethischen Gründen ausschließen, bleiben Versuche an Tieren als nächstbeste Möglichkeit, um Modelle zur Entstehung von Krankheiten zu untersuchen. Post-mortem Untersuchungen an Gehirnen von an M. Parkinson erkrankten Menschen wären auch denkbar, allerdings mit Einschränkungen durch die geringe verbleibende Zellzahl und die unterschiedlichen Verzögerungen bis zur Gewebegewinnung nach dem Eintreten des Todes. Die genannten Methoden stellen für die Zukunft interessante Möglichkeiten dar, die gewonnenen Daten in einem, den physiologischen Gegebenheiten näheren, Modell zu bestätigen.

5.2 Bewertung der Nachweismethoden

Nicht nur das Zellmodell, sondern auch die technischen Verfahrensweisen und Methoden, mit denen die RNA- und Proteinveränderungen gemessen wurden, mussten geeignet sein, um diese möglichst exakt und reproduzierbar zu bestimmen.

In den Zellkulturflaschen, die zur Bestimmung der RNA bzw. Proteine verwandt wurden, ist zunächst das Medium, das auch die toten und somit schwimmenden Zellen enthielt, abgesaugt worden. Mögliche Veränderungen, die in ihnen vor oder nach dem Zelltod erfolgten, konnten so ausgeschlossen werden. Sie sollten ganz bewusst nicht berücksichtigt werden, da nur Veränderungen in überlebenden Zellen untersucht werden sollten.

Die RT-PCR ist eine weit verbreitete und moderne Technik zur Quantifizierung von mRNA. Sie besteht aus mehreren Einzelschritten, die alle optimiert wurden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. So wurden zunächst für die RNA-Extraktion aus den Zellen zwei unterschiedliche Protokolle getestet: Ein kommerzieller Kit (RNeasy®Mini Kit, QUIAGEN) und ein Protokoll auf Phenol-Basis. Der Vergleich der gewonnenen RNA im Gel und durch Photometrie fiel eindeutig besser für den kommerziellen Kit aus. Er wurde im weiteren Verlauf benutzt und die gewonnene RNA laufend kontrolliert. Obwohl vom Hersteller nicht zwingend empfohlen, wurde als zusätzliche Sicherheit gegen DNA-Kontamination ein DNase-Verdau durchgeführt. Zwei

unterschiedliche Kits (RNase-Free DNase Set von Qiagen und RNase-free recombinant DNase I von Roche) wurden getestet und der praktikablere schließlich eingesetzt (Qiagen).

Der nächste Arbeitsschritt, die RNA-Konzentrationsmessung, hatte große Bedeutung für die Qualitätssicherung und die weiteren Schritte. Das Photometer und die Messung mussten folglich zuverlässig sein. Um dies zu gewährleisten, wurden zu Beginn der Arbeit Konzentrationsserienmessungen in absteigender Verdünnung durchgeführt und die Funktionstüchtigkeit des Photometers bestätigt. Die nach der Konzentrationsbestimmung errechnete, in die Reverse Transkription einzusetzende, Menge an RNA-Lösung musste exakt sein und die RT immer im gleichen Verhältnis erfolgen (idealerweise 1:1; d.h. für jedes Molekül mRNA entsteht ein Molekül cDNA). Ab hier wurde keine weitere Konzentrationsmessung mehr durchgeführt und die eingesetzten Mengen lediglich hochgerechnet. An dieser Stelle sei erwähnt, dass durch den Einsatz des „housekeeping gene“, als interne Kontrolle, eventuell eingesetzte ungleiche cDNA-Mengen ausgeglichen wurden.

Für die Light Cycler PCR selbst wurden ebenfalls zwei Protokolle getestet: Zunächst eines im so genannten „one-step“-Verfahren, d.h. RT und PCR zusammen durch ein Enzym in einem Ansatz. Aufgrund der Tatsache, dass die Ergebnisse im „two-step“-Verfahren reproduzierbarer waren, wurde dieses vorgezogen. Alle Primer wurden so gestaltet, dass sie Sequenz- und mRNA-spezifisch waren. Dies wurde laufend durch die „melting curve“ kontrolliert.

Insgesamt kann die Light Cycler RT-PCR, wie sie hier eingesetzt wurde, als spezifische, genaue und reproduzierbare Methode zur relativen Quantifizierung von Genexpression auf mRNA-Ebene bezeichnet werden.

Gleiches gilt für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit Western Blot auf Proteinebene. Es stand ein Antikörper für Parkin zur Verfügung, der sensitiv genug war, um die geringen Mengen an endogenem Parkin in den Lysaten zu detektieren. Mit Actin wurde eine interne Kontrolle eingesetzt. Leider gelang es trotz intensiver Nachforschung nicht, einen kommerziellen Antikörper für Siah-1 und Dorfin zu finden, der sensitiv genug war, nicht überexprimiertes, endogenes, Protein nachzuweisen.

5.3 Bewertung der statistischen Nachweisgrenzen und der biologischen Relevanz

Grenzwerte

Die Auswahl der Grenzen, ab denen Gene als signifikant reguliert galten bzw. das „housekeeping gene“ als nicht signifikant reguliert galt, gehörte zu den am schwersten zu begründenden Entscheidungen dieser Arbeit. Es lagen hierzu fast keine etablierten Regeln vor. Eine Regulation der mRNA wurde als signifikant gewertet, wenn der Regulationsfaktor größer als 2 bzw. kleiner als 0,5 war. Dieser Wert wurde empirisch festgelegt, da hierzu nur wenige Referenzwerte aus der

Literatur bekannt waren. In anderen Expressionsstudien wurde 1,5-fache Regulation als Grenzwert gewählt (z.B. Unschuld et al. 2006). Hier aber wurde er relativ hoch gewählt, um kleine Schwankungen, die zwar nach gängigen statistischen Tests, wie z.B. dem student-t-Test, als signifikant zu erachten wären, wegen deren fraglicher physiologischer Relevanz nicht über zu bewerten. Für das „housekeeping gene“ HPRT wurde eine stabile Expression angenommen, wenn die Mittelwerte der „crossing points“ der behandelten und unbehandelten Proben um weniger als 0,5 Zyklen abwichen (entspricht +/- 41% Abweichung). Dies war Voraussetzung, um die relative Quantifizierung möglich zu machen und um von einem stabilen Zellmodell ausgehen zu können. Auch dieser Wert war, nach Diskussionen mit anderen Arbeitsgruppen, empirisch gewählt. Die Kriterien für die Stabilität der Expression von HPRT waren bewusst deutlich strenger als für die Regulation eines zu untersuchenden Genes. Dies war von großer Wichtigkeit, da bei der Errechnung der relativen Regulation Schwankungen des „housekeeping gene“ gleichsinnige Regulationen eines Genes potenzieren und somit „übertreiben“ konnten.

Biologische Relevanz

Noch schwerer zu bestimmen und mit den Mitteln, die dieser Arbeit zugrunde lagen, nicht zu beurteilen, war die biologische Relevanz einer Herab- oder Heraufregulation. Sicher kann man sagen, dass Änderungen der Proteinmengen eine größere Bedeutung zukommen als Änderungen der mRNA alleine. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass transkriptionale Modifizierungen nicht immer eins zu eins in translationale Veränderungen übersetzt werden und somit mRNA-Regulation gelegentlich weit stärker ausgeprägt sein kann als die daraus resultierende Proteinänderung (Valencia-Sanchez et al. 2006). Des Weiteren kann es hierbei durch die komplexen Prozesse des mRNA-Transports, der posttranskriptionalen Regulation, der Translation und der posttranslationalen Proteinmodifikation zu einer Verzögerung der Wirksamkeit kommen.

Die in der RT-PCR und im Western Blot gemessenen mRNA- bzw. Proteinmengen spiegelten die absoluten, in den Lysaten in Lösung befindlichen Mengen wieder. Hierbei war es nicht möglich, funktionstüchtiges von nicht funktionstüchtigem Protein bzw. mRNA zu unterscheiden. Somit konnten modifizierte, gebundene, inaktivierte oder sich in abgegrenzten Kompartimenten befindliche Formen, die dadurch möglicherweise funktionell beeinträchtigt waren, nicht abgegrenzt werden. Andererseits konnten eventuell vorhandene, sich in aggregiertem Zustand befindende Proteine wahrscheinlich nicht entdeckt werden, da sie nicht in der löslichen Phase des Lysats vorlagen (vergleiche 5.4).

5.4 Parkin ist unter proteasomaler Inhibition spezifisch herabreguliert

– Mögliche Ursachen und Folgen

Unter proteasomaler Inhibition mit MG132 in PC12 Zellen wurde Parkin selektiv und in zeitabhängiger Weise transkriptionell herabreguliert. Dieser Befund war spezifisch, da Dorfin unter denselben Bedingungen nicht reguliert war und Siah-1 nur sehr geringfügig. Er war stark ausgeprägt und reproduzierbar. Zunächst war diese Herabregulation nicht erwartet worden. Vielmehr wurde eine kompensatorische Heraufregulation von Parkin, anderer Ubiquitin-E3-Ligasen und evtl. weiteren Proteinen des UPS in Betracht gezogen. Durch die chemische Hemmung der Proteasomen und die Anhäufung von Substraten hätte ein Signal entstehen können, welches die Expression von Bestandteilen des UPS verstärkt, mit dem Ziel die blockierten Proteine dieses Stoffwechselweges zu erneuern. Dieser Effekt trat, zumindest für die Ubiquitin-E3-Ligasen, nicht auf.

Die Herabregulation Parkins trat relativ spät ein: Auf mRNA-Ebene konnte eine starke Supprimierung erst 18 Stunden nach Zugabe des Agens gemessen werden. Wäre sie als primäre, unmittelbare Antwort der Zelle auf die Stressbedingung zu verstehen, so erschiene ein rascherer Wirkungseintritt wahrscheinlich. Dies würde zudem der diskutierten zytoprotektiven Funktion Parkins (Darios et al. 2003; Staropoli et al. 2003; Vercammen et al. 2006) widersprechen. Nach dieser Theorie müsste eine Überexpression Parkins der Zelle bei der Bewältigung des Stresses helfen.

Somit ist eine sekundäre Antwort wahrscheinlicher. Sie könnte beispielsweise als Reaktion auf einen relativen Parkin-Überschuss bei Dysfunktion des Proteasoms verstanden werden. Ist das Proteasom gehemmt, so ist der UPS-Stoffwechselweg blockiert und Parkin wird zur Polyubiquitinierung weniger stark benötigt. Es könnte auch sekundär ein Mangel an Ubiquitin vorliegen, das unter normalen Umständen vom Proteasom nach Degradation der Zielproteine freigesetzt wird. Allerdings sollte dieser Effekt die anderen Ubiquitin-E3-Ligasen gleichermaßen betreffen. Somit bleibt ein selektiver Effekt auf Parkin, der als negativer Rückkopplungskreislauf verstanden werden kann. Parkin-Protein, modifizierte Formen davon, angehäufte Substrate, vom inhibierten Proteasom ausgehende Signalstrukturen oder MG132 selbst könnten die Parkin-Expression gehemmt haben (Abbildung 19).

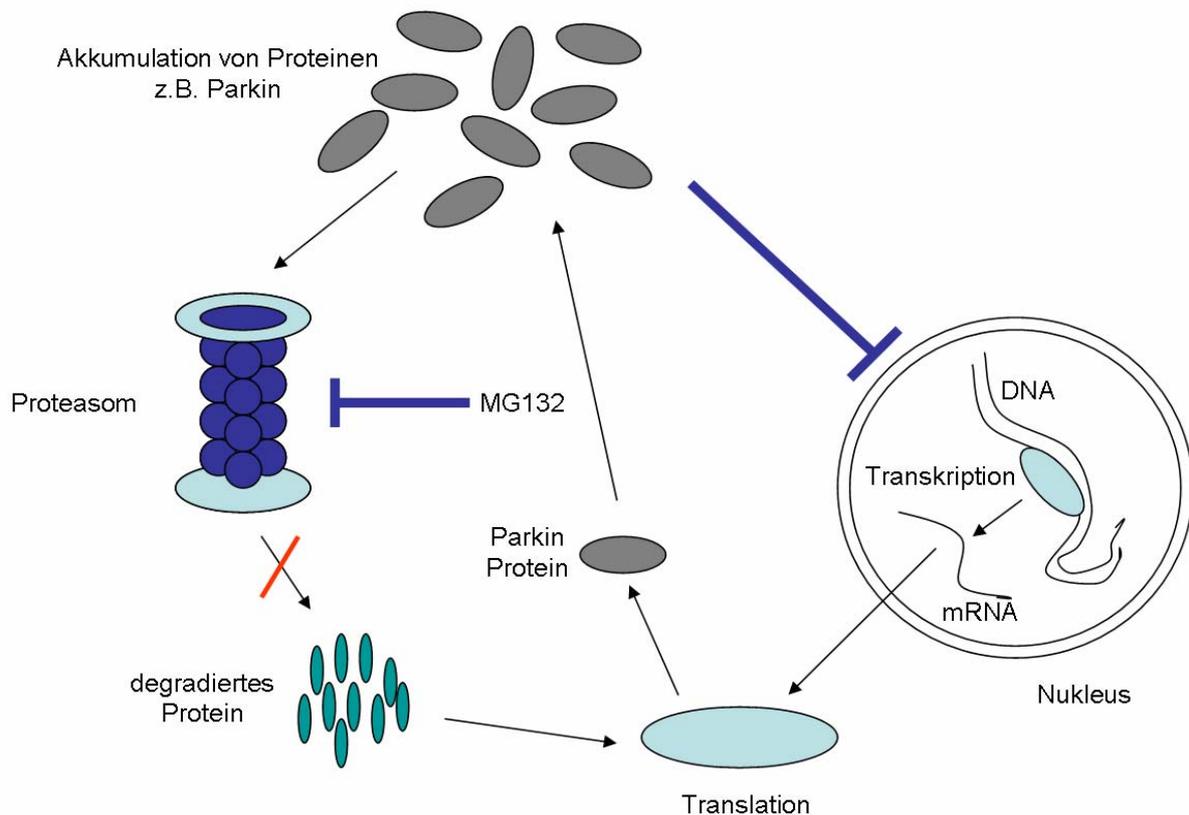


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines möglichen hemmenden Regelkreises der Expression von Parkin bei proteasomaler Inhibition (am Beispiel von MG132): Zu degradierendes Protein akkumuliert durch die Inhibition bzw. Dysfunktion des UPS. Darunter befindet sich auch Parkin-Protein. Diese Proteinanhäufung selbst oder die Minderauslastung des UPS könnte auf bislang unbekanntem Wege die Transkription von Parkin-mRNA im Zellkern hemmen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass in diesen „Aggreasomen“ auch Transkriptionsfaktoren gefangen werden könnten und somit unwirksam wären. Dadurch wären auch die Translation und der Proteinnachschub vermindert. Über einen längeren Zeitraum gesehen könnten so die Parkin-Spiegel der Zelle sinken.

In dieser Arbeit konnte keine Veränderung Parkins auf Proteinebene nachgewiesen werden. Es war aus Zeitgründen im Rahmen der Arbeit leider nicht möglich, erstens, einen längeren Zeitraum als 18 Stunden zu untersuchen, und zweitens, eine mögliche verminderte Löslichkeit Parkins und dessen Übergang in Aggregate zu überprüfen. Letzteres wurde kürzlich für bestimmte Zellstressbedingungen *in vivo* (Wang et al. 2005) und für Parkin-Mutanten (Jensen et al. 2006) gezeigt. Aggregate wären möglicherweise, trotz des starken Lysepuffers TNT, als Restpellet im Lysat übrig geblieben und nicht in die Protein-Elektrophorese mit einbezogen worden. Restpellets wurden zwar nicht beobachtet, könnten aber aufgrund geringer Größe mit dem bloßen Auge nicht nachweisbar sein. Neue Ergebnisse von Andreas Koch, die nach Abschluss dieser Arbeit entstanden, bestätigen diese Vermutung: Sie zeigen in PC12 und SH-SY5Y Zellen, in

zunehmendem Maße, 14, 24, 38 und 48 Stunden nach Intoxikation mit MG132 oder Epoxomicin eine Reduktion des löslichen Parkins, sowie gleichzeitig eine Zunahme des unlöslichen, aggregierten Proteins. Es ist denkbar, dass diese Aggregation, z.B. über Einbeziehung von Transkriptionsfaktoren oder andere Feedback-Mechanismen, zur Herabregulation der Parkin-mRNA beiträgt (Abbildung 19).

Die Herabregulation von Parkin wurde nach Wissen des Autors noch nie beschrieben, weder unter proteasomaler Inhibition noch unter anderen Zellstressbedingungen und auch nicht in den Gehirnen von Patienten mit sporadischem Morbus Parkinson. Es konnten aber in den Arbeiten von Biasini et al. und Shimura et al. Hinweise darauf gefunden werden: Biasini et al. konnten keine Akkumulation von endogenem Parkin-Protein oder mRNA in PC12 Zellen nach proteasomaler Inhibition mit MG132 feststellen (Beobachtungszeitraum 0-24 Stunden). Man kann aber in ihrer Abbildung 4a und 4b nach 24 Stunden eine Reduktion von Protein und mRNA bei konstanter Expression der Kontrollen (Actin) vermuten (Biasini et al. 2004). In einer Studie, in der Parkin-Protein in Gehirnen von Patienten mit ARJP, sporadischen Morbus Parkinson und gesunden Kontrollen bestimmt wurde, konnte keine reduzierte Menge in den Frontallappen von drei sporadischen Fällen nachgewiesen werden. Aber in der Substantia nigra zweier sporadischer Fälle konnten verminderte Parkin-Mengen im Vergleich zu zwei gesunden Kontrollen vermutet werden (Shimura et al. 1999). Da PC12 Zellen ein anerkanntes Modell für dopaminerge Neurone der Substantia nigra sind, kann dies ebenfalls als Hinweis gewertet werden. Natürlich war dies eine absolute und nicht relative Reduktion, die in von der Neurodegeneration besonders betroffenen Gebieten wie der SN zu erwarten war.

Ein Phänomen, das bei der Herabregulation von Parkin unter MG132-Einfluss auffiel, soll erwähnt und diskutiert werden: Die „Wannenform“ der DMSO-Kurve. So wurde die geringe, graphisch sichtbare Heraufregulation der DMSO-Kontrollen über die Zeit bezeichnet (siehe Abbildung 9). Eine Hochregulation der DMSO-Kontrollen schien optisch für einen großen Teil der rechnerischen Herabregulation Parkins in den behandelten Proben verantwortlich zu sein (insbesondere Abbildung 9A). Betrachtete man die eigentlichen Werte, konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden: Die behandelten Proben fielen im ersten Versuch (Abbildung 9A) von 67,1 nach 3 Stunden auf 5,5 nach 18 Stunden (entspricht 12,2-fache Herabregulation), wohingegen die Kontrollen im gleichen Zeitraum von 64,0 auf 96,9 anstiegen (entspricht 1,5-fache Heraufregulation). Im zweiten Versuch (Abbildung 9B) war die Heraufregulation der Kontrollen noch weniger an der rechnerischen Herabregulation Parkins beteiligt. Diese geringe und nicht signifikante Heraufregulation der Kontrollen 18 Stunden nach Mediumwechsel wurde für Parkin, wenn auch noch schwächer, auch in anderen Versuchen beobachtet und ist möglicherweise mit einer Änderung der Expression Parkins nach Wechsel zu frischem Medium zu erklären. So wäre denkbar, dass die Zellen zu einer gewissen Zeit nach Mediumwechsel in eine andere Phase ihres

Metabolismus übergehen, der, z.B. wegen vermehrtem Degradationsbedarf, mit einer geringfügig gesteigerten Parkinexpression verbunden ist.

Die dargestellten Daten ließen den Schluss zu, dass proteasomale Dysfunktion, wie für die Substantia nigra von Parkinson Patienten beschrieben (McNaught et al. 2003), zu einer Einschränkung der Funktion Parkins und seiner kumulativen enzymatischen Aktivität auf Zellebene führen könnte. Dazu könnten beitragen: Erstens die transkriptionelle Suppression Parkins (reduzierte Produktion), zweitens der Übergang in die unlösliche Phase (Funktionsverlust), und drittens die proteasomale Dysfunktion mit Anhäufung alter Proteine (relativer Parkin-Mangel). Es kann somit vermutet werden, dass es in menschlichen Neuronen möglicherweise zu chronisch reduzierten Spiegeln wirksamen Parkins kommen könnte. Weiterhin scheint es deshalb möglich, dass längerfristige proteasomale Schädigung und daraus resultierende chronische Parkin-Unterepression einem „loss-of-function“ nahe kommen könnte und somit einen ähnlichen Effekt wie krankheitsauslösende Parkin-Mutationen haben könnte. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, in der Zukunft für die Pathogenese des Morbus Parkinson nicht nur Genmutationen sondern zunehmend Befunde der funktionellen Genexpression zu berücksichtigen. Der proteasomalen Dysfunktion als möglichem Pathomechanismus des Morbus Parkinson käme so mindestens eine doppelte Bedeutung zu: durch Akkumulation alter und funktionsuntüchtiger Proteine und durch den Mangel an funktionellem, zytoprotektivem Parkin.

Es wäre wichtig, die Ergebnisse dieser Arbeit in einem anderen, den physiologischen Gegebenheiten möglichst ähnlichen, Modell nachzuprüfen und Daten über die enzymatische Aktivität Parkins zu gewinnen. In diesem Zusammenhang ist z.B. ein Ratten-Modell des Morbus Parkinson mit chronischer proteasomaler Inhibition, das kürzlich beschrieben wurde, besonders interessant (McNaught et al. 2004). Auch die post-mortem Analyse menschlicher Substantia nigra-Neurone wäre, mit unvermeidbaren methodischen Einschränkungen, viel versprechend.

Die Relevanz der geringfügigen Herabregulation von Siah-1 konnte nicht geklärt werden

Siah-1 war um maximal 4,5-fach herabreguliert. Eine Betrachtung auf Proteinebene war wegen unzulänglichen Antikörpern nicht möglich. Da die differentielle Regulation, verglichen mit Parkin, verhältnismäßig schwach war, ist ihre biologische Relevanz unklar. Es wären aber ähnliche pathogenetische Überlegungen, wie für Parkin gemacht, zu diskutieren. Eine weitere Klärung der Bedeutung war in dieser Studie leider nicht möglich.

5.5 Stress durch fehlgefaltete Proteine führt zu keiner veränderten Expression von Parkin, Siah-1 und Dorfin

Parkin war in diesen Versuchen unter Einfluss von Tunicamycin weder auf mRNA- noch auf Proteinebene differentiell reguliert. Dies stand im Gegensatz zu den Daten Imais, der eine signifikante Heraufregulation von Parkin-mRNA in humanen SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit 10 µg/ml Tunicamycin beobachtete (Imai et al. 2000). Sie begann nach fünf Stunden und erreichte ihr Maximum von etwa 12-facher Heraufregulation nach 24 Stunden. Imais Versuche erfolgten in einem anderen Zellmodell und bei höherer Stressoren-Konzentration (hier 4 µg/ml). West et al. sahen hingegen keine Heraufregulation von Parkin nach 12 und 18 Stunden Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit 10 µg/ml Tunicamycin, weder durch RT-PCR noch im Western Blot (West et al. 2003). Somit konnten West et al. bestätigt und daraus geschlossen werden, dass die Hochregulation von Parkin unter vermehrt anfallenden fehlgefalteten Proteinen keine typische Reaktion der zellulären Stressabwehr ist.

Dies belegt die Notwendigkeit unabhängiger Replikate in der Wissenschaft. Stattdessen beobachteten wir eine Tendenz von Siah-1 zur Hochregulation. Sie war nur knapp signifikant und aus den oben genannten Gründen von zweifelhafter physiologischer Relevanz. Da alle drei untersuchten Ubiquitin-E3-Ligasen unter Stress durch fehlgefaltete Proteine nicht in ihrer Expression variiert wurden, war offensichtlich ihre enzymatische Kapazität, die bereits im Normalzustand in den Zellen vorliegt, ausreichend um den Zellstress zu bewältigen. Oder aber die speziell unter Tunicamycin anfallenden Proteine waren nicht Substrate der drei Ligasen.

5.6 Rotenon und H₂O₂ führen zu keiner veränderten Expression von Parkin, Siah-1 und Dorfin

Rotenon

Obwohl Rotenon als Pestizid in Verbindung mit der Entstehung von Parkinsonismus gebracht wurde (Di Monte 2003) und als Komplex-I-Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette auch pathomechanistisch im Verdacht steht (siehe Einleitung), konnte in den vorliegenden Versuchen keine signifikante differentielle Regulation der untersuchten Gene gemessen werden. Die Proteinebene wurde nicht untersucht, da zuvor keine mRNA-Veränderungen entdeckt wurden. Die diskutierten Pathomechanismen mitochondriale Dysfunktion und Toxizität durch Rotenon schienen unabhängig von den Ubiquitin-E3-Ligasen Parkin, Siah-1 und Dorfin bzw. deren endogenen Expression zu sein. Hierzu sind dem Autor keine Ergebnisse aus der Literatur bekannt.

Auf Proteinebene konnten Wang et al. zeigen, dass überexprimiertes Parkin durch Stress mit Rotenon vermehrt in die unlösliche Phase übergeht (Wang et al. 2005).

Die Versuche mit Rotenon liefen experimentell sehr erfolgreich und reproduzierbar ab. Insofern konnten diese negativen Befunde als Beleg für die Spezifität der gefundenen Regulation unter proteasomaler Inhibition gelten.

H₂O₂

Dieser Stressor erwies sich bei der Etablierung des Zelltodassays als gut titrierbar. Auch schien es, als freies Radikal, ein gutes pathophysiologisches Modell zu sein. Da oxidativer Stress eine wichtige und oft diskutierte Hypothese zur Pathogenese des Morbus Parkinson darstellt (Przedborski et al. 2004) und z.B. Parkin die Zelle vor oxidativem Stress schützt (Jiang et al. 2004), wurde hier eine veränderte Expression Parkins erwartet. Leider erwies sich aber die gewonnene RNA als beschädigt und, sekundär, das „housekeeping gene“ selbst als reguliert. Die Versuche konnten somit nicht gewertet werden. Es gelang auch nicht anhand der vorhandenen Daten, einen Trend der differentiellen Regulation auszumachen. Da ein potentieller Effekt des Lösungsmittels DMSO, das bei allen anderen Stressoren eingesetzt wurde, auf die Genexpression ausgeschlossen werden konnte, waren die H₂O₂-Versuche trotzdem wichtig. Auf eine Untersuchung der Proteinebene wurde bei H₂O₂ und Rotenon mangels positiver mRNA-Befunde verzichtet.

6 Zusammenfassung

Diverse Pathomechanismen werden für die Entstehung des Morbus Parkinson diskutiert. Dazu gehören proteasomale Dysfunktion, Stress durch fehlgefaltete Proteine, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress. Darüber hinaus hat die Entdeckung und Charakterisierung verschiedener monogenetisch erblicher Formen der Parkinsonschen Erkrankung zum Verständnis der Pathogenese beigetragen. Eines dieser Gene ist Parkin, eine Ubiquitin-E3-Liagse, dessen differentielle Genexpression in dieser Arbeit zusammen mit zwei weiteren Ubiquitin-E3-Ligasen, Siah-1 und Dornin, unter oben genannten Zellstressbedingungen untersucht wurde.

Mit RT-PCR und, sofern möglich, mit Western Blot wurden in PC12 Zellkulturen mRNA und Protein der genannten Gene über 18 Stunden analysiert. Standardisierte Zellstressbedingungen mit MG132, Tunicamycin, Rotenon und H₂O₂ gewährleisteten vergleichbare Bedingungen.

Unter proteasomaler Inhibition mit MG132 konnte die signifikante, spezifische und starke Herabregulation von Parkin nach 18 Stunden auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Dornin war hierbei nicht, und Siah-1 nur geringfügig reguliert. Unter den anderen Zellstressbedingungen ergab sich keine bedeutende Regulation für die drei Ubiquitin-E3-Ligasen.

Deshalb ist die Herabregulation Parkins ein spezifischer Befund. Es handelt sich wahrscheinlich nicht um eine primäre, der Abwehr des Zellstress dienende Reaktion, sondern eher um eine sekundäre Herabregulation aufgrund eines, die Genexpression hemmenden, Regelkreises. Dies ist ein Hinweis darauf, dass chronisch verminderte Parkin-Spiegel unter proteasomaler Dysfunktion, wie sie für den Morbus Parkinson beschrieben wurde, bei der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnten, sowohl durch transkriptionelle Suppression (wie hier gezeigt), als auch durch den Übergang des Proteins in die unlösliche Phase (wie in der Literatur beschrieben) und die dadurch bedingte kumulativ reduzierte, zytoprotektive Aktivität Parkins.

Literaturverzeichnis

- Ardley, H. C. and P. A. Robinson. The role of ubiquitin-protein ligases in neurodegenerative disease. *Neurodegener Dis* 2004, 1(2-3): 71-87.
- Avraham, E., R. Szargel, A. Eyal, R. Rott and S. Engelender. Glycogen synthase kinase 3beta modulates synphilin-1 ubiquitylation and cellular inclusion formation by SIAH: implications for proteasomal function and Lewy body formation. *J Biol Chem* 2005, 280(52): 42877-86.
- Baba, M., S. Nakajo, P. H. Tu, T. Tomita, K. Nakaya, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski and T. Iwatsubo. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 1998, 152(4): 879-84.
- Bergman, H., T. Wichmann, M. R. DeLong. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 1990, 249(4975): 1436-8.
- Biasini, E., L. Fioriti, I. Ceglia, R. Invernizzi, A. Bertoli, R. Chiesa and G. Forloni. Proteasome inhibition and aggregation in Parkinson's disease: a comparative study in untransfected and transfected cells. *J Neurochem* 2004, 88(3): 545-53.
- Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, O. Schaap, G. J. Breedveld, E. Krieger, M. C. Dekker, F. Squitieri, P. Ibanez, M. Joesse, J. W. van Dongen, N. Vanacore, J. C. van Swieten, A. Brice, G. Meco, C. M. van Duijn, B. A. Oostra and P. Heutink. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset Parkinsonism. *Science* 2003, 299(5604): 256-9.
- Braak, H., K. Del Tredici, H. Bratzke, J. Hamm-Clement, D. Sandmann-Keil and U. Rub. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 2002, 249 Suppl 3: III/1-5.
- Brissaud, E. *Leçons sur les maladies nerveuses*. Paris 1899.
- Cappelletti, G., M. G. Maggioni and R. Maci. Influence of MPP+ on the state of tubulin polymerisation in NGF-differentiated PC12 cells. *J Neurosci Res* 1999, 56(1): 28-35.
- Casarejos, M. J., J. Menendez, R. M. Solano, J. A. Rodriguez-Navarro, J. Garcia de Yébenes and M. A. Mena. Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *J Neurochem* 2006, 97(4): 934-46.
- Chartier-Harlin, M. C., J. Kachergus, C. Roumier, V. Mouroux, X. Douay, S. Lincoln, C. Leveque, L. Larvor, J. Andrieux, M. Hulihan, N. Waucquier, L. Defebvre, P. Amouyel, M. Farrer and A. Destee. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004, 364(9440): 1167-9.

- Chung, K. K., Y. Zhang, K. L. Lim, Y. Tanaka, H. Huang, J. Gao, C. A. Ross, V. L. Dawson, T. M. Dawson. Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 2001, 7(10): 1144-50.
- Clayton, D. F. and J. M. George. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 1998, 21(6): 249-54.
- Cuervo, A. M., L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury and D Sulzer. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004, 305(5688): 1292-5.
- Dächsel, J. C., C. B. Lücking, S. Deeg, E. Schultz, M. Lalowski, E. Casademunt, O. Corti, C. Hampe, N. Patenge, K. Vaupel, A. Yamamoto, M. Dichgans, A. Brice, E. E. Wanker, P. J. Kahle, T. Gasser. Parkin interacts with the proteasome subunit alpha4. *FEBS Lett* 2005, 579(18): 3913-9.
- Darios, F., O. Corti, C. B. Lücking, C. Hampe, M. P. Muriel, N. Abbas, W. J. Gu, E. C. Hirsch, T. Rooney, M. Ruberg and A. Brice. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 2003, 12(5): 517-26.
- Di Monte, D. A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2003, 2(9): 531-8.
- Ehringer, H., O. Hornykiewicz and K. Lechner. The effect of methylene blue on monoamine oxidase and the catechol amine and 5-hydroxytryptamine metabolism of the brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1961, 241: 568-82.
- Eliezer, D., E. Kutluay, R. Bussell, Jr. and G. Browne. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol* 2001, 307(4): 1061-73.
- Farrer, M., P. Chan, R. Chen, L. Tan, S. Lincoln, D. Hernandez, L. Forno, K. Gwinn-Hardy, L. Petrucelli, J. Hussey, A. Singleton, C. Tanner, J. Hardy and J. W. Langston. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001, 50(3): 293-300.
- Franck, T., R. Krueger, D. Voitalla, T. Muller, S. Engelender and O. Riess. Mutation analysis of the seven in absentia homolog 1 (SIAH1) gene in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2006, 113(12): 1903-8.
- Goldberg, M. S., S. M. Fleming, J. J. Palacino, C. Cepeda, H. A. Lam, A. Bhatnagar, E. G. Meloni, N. Wu, L. C. Ackerson, G. J. Klapstein, M. Gajendiran, B. L. Roth, M. F. Chesselet, N. T. Maidment, M. S. Levine and S. Shen. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003, 278(44): 43628-35.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1976, 73(7): 2424-8

- Greene, L. A. et al. Culture and Experimental Use of the PC12 Rat Pheochromocytoma Cell Line. *Culturing Nerve Cells* 2nd edition, Chapter 6, Cambridge, MA 1998.
- Greenfield, J. G. and F. D. Bosanquet. The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1953, 16(4): 213-26.
- Guterman, A. and M. H. Glickman. Deubiquitinating enzymes are intrinsic to proteasome function. *Curr Protein Pept Sci* 2004, 5(3): 201-11.
- Hartmann-Petersen, R., K. Tanaka and K. B. Hendil. Quaternary structure of the ATPase complex of human 26S proteasomes determined by chemical cross-linking. *Arch Biochem Biophys* 2001, 386(1): 89-94.
- Hayashi, S., K. Wakabayashi, A. Ishikawa, H. Nagai, M. Saito, M. Maruyama, T. Takahashi, T. Ozawa, S. Tsuji and H. Takahashi. An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov Disord* 2000, 15(5): 884-8.
- Huang, Y., L. Cheung, D. Rowe and G. Halliday. Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 2004, 46(1): 44-70.
- Imai, Y., M. Soda, H. Inoue, N. Hattori, Y. Mizuno, R. Takahashi. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001, 105(7): 891-902.
- Imai, Y., M. Soda, S. Hatakeyama, T. Akagi, T. Hashikawa, K.I. Nakayama and R. Takahashi. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 2002, 10(1): 55-67.
- Imai, Y., M. Soda and R. Takahashi. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-ligase activity. *J Biol Chem* 2000, 275(46): 35661-4.
- Ito, T., J. Niwa, N. Hishikawa, S. Ishigaki, M. Doyu and G. Sobue. Dornin localizes to Lewy bodies and ubiquitylates synphilin-1. *J Biol Chem* 2003, 278(31): 29106-14.
- Jensen, L. D., T. Vinther-Jensen, S. Kahns, S. Sundbye, P. H. Jensen. Cellular parkin mutants are soluble under non-stress conditions. *Neuroreport* 2006, 17(11): 1205-8.
- Jiang, H., Y. Ren, J. Zhao and J. Feng. Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 2004, 13(16): 1745-54.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno and N. Shimizu. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998, 392(6676): 605-8.
- Klein, C. and M. G. Schlossmacher. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol* 2006, 2(3): 136-46.
- Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975, 66(1): 188-93.

- Lewy, F. M. Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Dtsch Z Nervenheilk* 1913, 50: 50-55
- Li, J., V. N. Uversky and A. L. Fink. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry* 2001, 40(38): 11604-13.
- Liani, E., A. Eyal, E. Avraham, R. Shemer, R. Szargel, D. Berg, A. Bornemann, O. Riess, C. A. Ross, R. Rott and S. Engelender. Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(15): 5500-5.
- Liao, E. H., W. Hung, B. Abrams and M Zhen. An SCF-like ubiquitin ligase complex that controls presynaptic differentiation. *Nature* 2004, 430(6997): 345-50.
- Limousin, P., P. Krack, P. Pollack, A. Benazzouz, C. Ardouin, D. Hoffmann and A. L. Benabid. Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1998, 339(16): 1105-11.
- Liu, Y., L. Fallon, H. A. Lashuel, Z. Liu and P. T. Lansbury. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002, 111(2): 209-18.
- Lücking, C. B., A. Dürr, V. Bonifati, J. Vaughan, G. De Michele, T. Gasser, B. S. Harhangi, G. Meco, P. Deneffe, N. W. Wood, Y. Agid and A. Brice. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 2000, 342(21): 1560-7.
- Marsden, C. D. Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994, 57(6): 672-81
- Mayeux, R., J. Chen, E. Mirabello, K. Marder, K. Bell, G. Dooneief, L. Cote and Y. Stern. An estimate of the incidence of dementia in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology* 1990, 40(10): 1513-7.
- McNaught, K. S., R. Belizaire, O. Isacson, P. Jenner and C. W. Olanow. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2003, 179(1): 38-46.
- McNaught, K. S., D. P. Perl, A.L. Brownell and C.W. Olanow. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004, 56(1): 149-62.
- Niwa, J., S. Ishigaki, M. Doyu, T. Suzuki, K. Tanaka and G. Sobue. A novel centrosomal ring-finger protein, dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 281(3): 706-13.
- Paisan-Ruiz, C., S. Jain, E. W Evans, W. P. Gilks, J. Simon, M. van der Brug, A. L. de Munain, S. Aparicio, A. M. Gil, N. Khan, J. Johnson, J. R. Martinez, D. Nicholl, I. M. Carrera, A. S. Pena, R. de Silva, A. Lees, J. F. Marti-Masso, J. Perez-Tur, N. W. Wood and A. B.

- Singleton. Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004, 44(4): 595-600.
- Pakkenberg, B., A. Moller, H. J. Gundersen, A. Mouritzen Dam and H. Pakkenberg. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991, 54(1): 30-3.
- Parkinson, J. An essay on shaking palsy. London 1817.
- Perier, C., J. Bove, M. Vila and S. Przedborski. The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2003, 26(7): 345-6.
- Polymeropoulos, M. H., J. J. Higgins, L. I. Golbe, W. G. Johnson, S. E. Ide, G. Di Iorio, G. Sanges, E. S. Stenroos, L. T. Pho, A. A. Schaffer, A. M. Lazzarini, R. L. Nussbaum and R. C. Duvoisin. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996, 274(5290): 1197-9.
- Pramstaller, P.P., M. G. Schlossmacher, T. S. Jacques, F. Scaravilli, C. Eskelson, I. Pepivani, K. Hedrich, S. Adel, M. Gonzales-McNeal, R. Hilker, P. L. Kramer and C. Klein. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol* 2005, 58(3): 411-22.
- Przedborski, S., K. Tieu, C. Perier and M. Vila. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 2004, 36(4): 375-9.
- Ren, Y., J. Zhao, J. Feng. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci* 2003, 23(8): 3316-24.
- Ropper, A .H. and R. H. Brown. Principles of Neurology 8th edition, Chapter 39, New York 2005.
- Salghetti, S. E., A. A. Caudy, J. G. Chenoweth and W. P. Tansey. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 2001, 293(5535): 1651-3.
- Savitt, J. M., V. L. Dawson and T. M. Dawson. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 2006, 116(7): 1744-54.
- Setsuie, R., T. Kabuta and K. Wada. Does proteasome [corrected] inhibition decrease or accelerate toxin-induced dopaminergic neurodegeneration? *J Pharmacol Sci* 2005, 97(3): 457-60.
- Sherer, T. B., R. Betarbet and J. T. Greenamyre. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist* 2002, 8(3): 192-7.
- Shimura, H., M. G. Schlossmacher, N. Hattori, M. P. Frosch, A. Trockenbacher, R. Schneider, Y. Mizuno, K. S. Kosik and D. J. Selkoe. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 2001, 293(5528): 263-9.

- Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, M. Yoshikawa, T. Kitada, H. Matsumine, S. Asakawa, S. Minoshima, Y. Yamamura, N. Shimizu, Y. Mizuno. Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile Parkinsonism patients. *Ann Neurol* 1999, 45(5): 668-72.
- Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka and T. Suzuki. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000, 25(3): 302-5.
- Sidhu, A., C. Wersinger and P. Vernier. Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *Faseb J* 2004, 18(6): 637-47.
- Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M. R. Cookson, M. Muentert, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy and K. Gwinn-Hardy. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003, 302(5646): 841.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997, 388(6645): 839-40.
- Staropoli, J. F., C. McDermott, C. Martinat, B. Schulman, E. Demireva and A. Abeliovich. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 2003, 37(5): 735-49.
- Steen, A. M., H. Luthman, D. Hellgren and B. Lambert. Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. *Exp. Cell Res* 1990. 186(2): 236-244.
- Tan, E. K., K. Y. Puong, D. K. Chan, K. Yew, S. Fook-Chong, H. Shen, P. W. Ng, J. Woo, Y. Yuen, R. Pavanni, M. C. Wong, K. Puvan and Y. Zhao. Impaired transcriptional upregulation of Parkin promoter variant under oxidative stress and proteasomal inhibition: clinical association. *Hum Genet* 2005, 118(3-4): 484-8.
- Tanaka, K., T. Suzuki, T. Chiba, H. Shimura, N. Hattori and Y. Mizuno. Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J Mol Med* 2001, 79(9): 482-94.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner and C. M. Pickart. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 2000, 19(1): 94-102.
- Townsend, P. A., R. I. Cutress, A. Sharp, M. Brimmell and G. Packham. BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochem Biophys Acta* 2003, 1603(2): 83-98.
- Tsang, F. and T. W. Soong. Interactions between environmental and genetic factors in the pathophysiology of Parkinson's disease. *IUBMB Life* 2003, 55(6):323-7.

- Unschuld, P. G., J. Dächsel, F. Darios, A. Kohlmann, E. Casademunt, K. Lehmann-Horn, M. Dichgans, M. Ruberg, A. Brice, T. Gasser and C. B. Lücking. Parkin modulates gene expression in control and ceramide-treated PC12 cells. *Mol Biol Rep* 2006, 33(1): 13-32.
- Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, H. J. Hannon and R. Parker. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006, 20(5): 515-24.
- Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger and N. W. Wood. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004, 304(5674): 1158-60.
- Vercammen, L., A. Van der Perren, E. Vaudano, R. Gijssbers, Z. Debyser, C. Van den Haute and V. Baekelandt. Parkin Protects against Neurotoxicity in the 6-Hydroxydopamine Rat Model for Parkinson's Disease. *Mol Ther* 2006, 14(5): 716-23.
- Vila, M. and S. Przedborski. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 2004, 10 Suppl: S58-62.
- von Bohlen und Halbach, O. Synucleins and their relationship to Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004, 318(1): 163-74.
- von Bohlen Und Halbach, O., A. Schober and K. Kriegstein. Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2004, 73(3): 151-77.
- von Coelln, R., V. L. Dawson and T. M. Dawson. Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004, 318(1): 175-84.
- Wang, C., H. S. Ko, B. Thomas, F. Tsang, K. C. Chew, S. P. Tay, M. W. Ho, T. M. Lim, T. W. Soong, O. Pletnikova, J. Troncoso, V. L. Dawson, T. M. Dawson, K. L. Lim. Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet* 2005, 14(24): 3885-97.
- Wersinger, C. and A. Sidhu. Differential cytotoxicity of dopamine and H₂O₂ in a human neuroblastoma divided cell line transfected with alpha-synuclein and its familial Parkinson's disease-linked mutants. *Neurosci Lett* 2003, 342(1-2): 124-8.
- West, A. B., F. Gonzalez-de-Chavez, K. Wilkes, C. O'Farrell and M. J. Farrer. Parkin is not regulated by the unfolded protein response in human neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters* 2003, 341: 139-42
- Winklhofer, K. F., I. H. Henn, P. C. Kay-Jackson, U. Heller and J. Tatzelt. Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones. *J Biol Chem* 2003, 278(47): 47199-208.
- Yamasaki, L. and M. Pagano. Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2004, 16(6): 623-8.

- Yao, D., Z. Gu, T. Nakamura, Z. Q. Shi, Y. Ma, B. Gaston, L. A. Palmer, E. M. Rockenstein, Z. Zhang, E. Masliah, T. Uehara and S. A. Lipton. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(29): 10810-4.
- Zhang, Y., J. Gao, K. K. Chung, H. Huang, V. L. Dawson and T. M. Dawson. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(24): 13354-9.
- Zimprich, A., S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, J. Kachergus, M. Hulihan, R. J. Uitti, D. B. Calne, A. J. Stoessl, R. F. Pfeiffer, N. Patenge, I. C. Carbajal, P. Vieregge, F. Asmus, B. Muller-Myhsok, D. W. Dickson, T. Meitinger, T. M. Strom, Z. K. Wszolek and T. Gasser. Mutations in LRRK2 cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* 2004, 44(4): 601-7.

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

A	Abbildungen
Abb. 1: (S. 16)	Schematische Darstellung eines möglichen Pathomechanismus des Morbus Parkinson mit fehlgefalteten Proteinen und dem UPS
Abb. 2: (S. 18)	Schema der Struktur Parkins sowie ARJP-Mutationen mit Austausch von Aminosäuren
Abb. 3: (S. 37)	RNA-Gel
Abb. 4: (S. 46)	2%-Agarosegel mit PCR-Produkten
Abb. 5: (S. 47)	Light Cycler PCR Auswertung A) Amplifizierungskurven B) „melting curve“
Abb. 6: (S. 55)	FACS-Diagramm eines Versuches mit MG132
Abb. 7: (S. 57)	Light Cycler Amplifikationskurve bei MG132 nach 18 Stunden
Abb. 8: (S. 60)	Balkendiagramm für HPRT bei einem MG132 Versuch
Abb. 9: (S. 61)	Diagramme der relativen Regulation Parkins nach MG132 in 2 unabhängigen Versuchen: (A) und (B)
Abb. 10: (S. 62)	Balkendiagramm der Regulation Parkins im Zeitverlauf und Gegenüberstellung der beiden identischen Versuche
Abb. 11: (S. 63)	Diagramme der relativen Regulation von Siah-1 nach MG132 in 2 unabhängigen Versuchen: (A) und (B)
Abb. 12: (S. 64)	Diagramm der relativen Regulation Dorfins nach MG132
Abb. 13: (S. 65)	Western Blot für Parkin und Actin nach 3, 6, 9 und 18 Stunden MG132 Einwirkung
Abb. 14: (S. 66)	Balkendiagramm für HPRT bei einem Tunicamycin Versuch
Abb. 15: (S. 67)	Diagramm der relativen Regulation Parkins nach Tunicamycin
Abb. 16: (S. 68)	Diagramm der relativen Regulation von Siah-1 nach Tunicamycin
Abb. 17: (S. 69)	Diagramm der relativen Regulation Dorfins nach Tunicamycin
Abb. 18: (S. 71)	Balkendiagramm für HPRT bei einem H ₂ O ₂ Versuch
Abb. 19: (S. 78)	Schematische Darstellung eines möglichen hemmenden Regelkreises der Expression von Parkin bei proteasomaler Inhibition

B

Tabellen

Tab. 1: (S. 13)	Parkinson-assoziierte Genloci
Tab. 2: (S. 26)	Antikörper im Western Blot
Tab. 3: (S. 40)	Errechnung des eingesetzten RNA-Volumens in Abhängigkeit von der gemessenen RNA-Konzentration am Beispiel von 6 Proben.
Tab. 4: (S. 42)	Übersicht über die verwendeten Primer
Tab. 5: (S. 54)	Überblick über die Stressoren und deren Konzentrationen
Tab. 6: (S. 58-59)	„crossing points“ und relative Regulation eines Versuchs mit MG132
Tab. 7: (S. 70)	Relative Regulation von HPRT, Parkin, Siah-1 und Dorfin unter Rotenon

Veröffentlichungen

Aus den im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Arbeiten sind Anteile an folgenden Publikationen entstanden:

Unschuld, P. G., J. Dächsel, F. Darios, A. Kohlmann, E. Casademunt, K. Lehmann-Horn, M. Dichgans, M. Ruberg, A. Brice, T. Gasser and C. B. Lücking
Parkin modulates gene expression in control and ceramide-treated PC12 cells.
Mol Biol Rep 2006, 33(1): 13-32.

Lehmann-Horn¹, K., J. Dächsel¹, A. Koch¹, M. Dichgans, T. Gasser, P. Kahle and C. B. Lücking
Parkin is specifically downregulated under proteasomal inhibition.

¹Diese Autoren haben in gleichem Maße an dieser Arbeit mitgewirkt.

(Zur Wiedereinreichung vorgesehen)

Danksagung

Mein Dank gilt dem Betreuer dieser Arbeit, Prof. Dr. Martin Dichgans, der am Gelingen dieses Projekts großen Anteil hat: Als Leiter des Labors durch Bereitstellung von Gerätschaften und Reagenzien, als Korrektor und Berichterstatter, als Ratgeber, als „Mahner“ zur zügigen Fertigstellung und in vielerlei anderer Hinsicht hat Prof. Dichgans meine Arbeit unterstützt. Dr. Christoph Lücking danke ich dafür, dass er mich als Doktoranden angenommen hat und mich Teil seiner Arbeitsgruppe werden ließ, ebenso für die Hilfe bei der Erstellung und Ausformulierung der Fragestellung. Als primärer Betreuer der Arbeit, für die Bereitstellung der nötigen Gelder, für die hilfreichen Korrekturen und die Bereitschaft mit seinem Fachwissen das Projekt zu fördern, gilt ihm mein Dank.

Mein besonderer Dank für die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit gilt Dr. Justus Dächsel, dessen gewissenhafte, begeisterte und engagierte Art zu Forschen mir Vorbild war. Da wir in einigen Teilen des Projekts eng zusammenarbeiteten, ich viele Techniken von ihm lernte und von seinem fundierten Wissen profitieren durfte, ist sein Anteil an der Begleitung dieser Arbeit sehr wichtig.

Andreas Koch danke ich für die Weiterführung des zunächst von mir, dann auch von Dr. Dächsel begonnenen Projekts, mit dem Ziel, die offengebliebenen Fragen zu klären und zu publizieren. In den ersten Wochen meiner Doktorarbeit hat mich Dr. Sebastian Deeg in die Laborarbeit eingeführt und mir ermöglicht, erste Bekanntschaft mit dem Forschungsgebiet zu machen. Meinen Eltern danke ich für die stete Anteilnahme an meinem Projekt sowie den abschließenden Korrekturen, meinem Vater insbesondere auch dafür, immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme gehabt zu haben und für die wertvollen Ratschläge eines erfahrenen Wissenschaftlers.

Saskia Knörr danke ich für Anregungen bei der Erstellung des endgültigen Manuskripts sowie für ihre Anteilnahme hierbei.

Für die freundliche Genehmigung zur Nutzung des Light Cycler- sowie des FACS-Gerätes danke ich dem Labor für Tumorummunologie der LMU München, stellvertretend Frau Dr. Heike Pohla.

Allen Kollegen im Labor danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die Bereitschaft jederzeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, wovon auch meine Arbeit profitiert hat.

Stellvertretend für alle Anderen seien Dr. Christian Opherk, Dr. Nils Peters und Dr. Andreas Gschwendtner erwähnt.

Prof. Dr. Detlef Michel danke ich für seine Beratung in Fragen der quantitativen RT-PCR.

Lebenslauf

Name	Klaus Volker Lehmann-Horn
Anschrift	Endlhauserstr. 2 82064 Straßlach-Dingharting
Sohn der Eheleute	Christa Lehmann-Horn, geb. Kreiß (Apothekerin) Prof. Dr. med. Dr. h.c. Frank Lehmann-Horn (Physiologe)
geboren am	07.10.1979
geboren in	München
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1986 - 1990	Grundschule Straßlach
1990 - 1992	Gymnasium Oberhaching
1992 - 1999	Schubart Gymnasium Ulm
Januar 1997 - Juli 1997	West Salem High School, Wisconsin USA

Zivildienst

September 1999 – Juli 2000	Deutsches Rotes Kreuz, KV Ulm
----------------------------	-------------------------------

Studium der Humanmedizin

Oktober 2000 - September 2002	Ludwig-Maximilians-Universität München
Oktober 2002 - November 2006	Technische Universität München (Klinikum rechts der Isar)
Oktober 2005 - Januar 2006	PJ Innere Medizin: Weill Medical College, New York USA
Februar 2006 - März 2006	PJ Neurologie: UT Southwestern Medical Center, Dallas USA
April 2006 - Mai 2006	PJ Neurologie: Harvard Medical School, Boston USA
Juni 2006 - September 2006	PJ Chirurgie: KH Bogenhausen