

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Funktionelle Analyse von Parkin im Zebrafisch



Mareike Fett

aus

Marburg

2010

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Frau PD Dr. Konstanze F. Winklhofer betreut.

Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den

.....
Mareike Fett

Dissertation eingereicht am 23.03.2010

1. Gutachterin: PD Dr. Konstanze F. Winklhofer

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tatzelt

Mündliche Prüfung am 31.05.2010

Experience is what you get when you didn't get what you wanted.

(Randy Pausch, 1960 – 2008)

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Parkinson-Erkrankung.....	3
1.1.1 Geschichte.....	3
1.1.2 Neuropathologische Charakteristika.....	4
1.1.3 Symptome.....	6
1.1.4 Diagnose.....	7
1.1.5 Behandlung.....	9
1.1.6 Ätiologie/Pathogenese.....	11
1.1.6.1 Proteinaggregation und proteasomale Dysfunktion.....	12
1.1.6.2 Mitochondriale Dysfunktion.....	14
1.1.6.3 Oxidativer Stress.....	20
1.1.6.4 Exzitotoxizität.....	22
1.1.7 Familiäre Formen.....	25
1.1.7.1 α -Synuclein (PARK1 und PARK4).....	25
1.1.7.2 LRRK2 (PARK8).....	25
1.1.7.3 Parkin (PARK2).....	26
1.1.7.4 PINK1 (PARK6).....	26
1.1.7.5 DJ-1 (PARK7).....	27
1.1.7.6 ATP13A2 (PARK9).....	27
1.2 Parkin-assoziierte autosomal-rezessive Parkinson Erkrankung.....	28
1.2.1 Molekulargenetik und Zellbiologie von Parkin.....	29
1.2.2 Pathogene Parkin-Mutationen.....	31
1.2.3 Physiologische Funktion.....	32
1.2.3.1 Parkin ist als E3-Ubiquitin-Ligase aktiv.....	32
1.2.4 Parkin besitzt neuroprotektives Potential.....	34

1.3 Tiermodelle	36
1.3.1 Toxin-basierte Modelle	36
1.3.2 Gen-basierte Modelle für Parkin.....	39
1.3.2.1 Maus (<i>Mus musculus</i>).....	39
1.3.2.2 Fruchtfliege (<i>Drosophila melanogaster</i>).....	40
1.3.2.3 Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>).....	41
1.3.2.3.1 Transgene Zebrafische.....	43
1.3.2.3.2 Knockdown/Knockout der Genfunktion in Zebrafischen	44
1.3.2.3.3 Das dopaminerge System im Zebrafisch.....	47
2 ERGEBNISSE.....	50
2.1 Teil 1: Biochemische Charakterisierung eines Parkin-Orthologs aus dem Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>).....	50
2.1.1 Identifizierung eines Parkin-Orthologs im Zebrafisch.....	51
2.1.2 Zebrafisch-Parkin ist anfällig für Fehlfaltung unter Stress.....	54
2.1.3 Die Transkription von Zebrafisch-Parkin ist durch Stress induzierbar.....	57
2.1.4 Zebrafisch-Parkin ist neuroprotektiv	58
2.1.6 Zusammenfassung Teil 1	59
2.2 Teil 2: Untersuchung der physiologischen Funktion von Parkin im Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>).....	61
2.2.1 Expression von Parkin im Zebrafisch.....	61
2.2.2 Inhibition der Genfunktion <i>in vivo</i> / Transienter Knockdown von Parkin im Zebrafisch	63
2.2.2.1 Auswahl der gripNAs	63
2.2.2.2 Verifizierung und Quantifizierung des Parkin-Knockdowns.....	64
2.2.2.2 Morphologie der Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen.....	66
2.2.2.3 Analyse dopaminerger Neurone	68
2.2.2.3.1 <i>In situ</i> -Hybridisierung gegen Tyrosinhydroxylase.....	68
2.2.2.3.2 Quantifizierung der Tyrosinhydroxylase-mRNA mittels semi-quantitativer <i>real time</i> PCR.....	69
2.2.2.4 Analyse der Mitochondrien.....	70
2.2.2.4.1 Analyse der mitochondrialen Morphologie.....	71

2.2.2.4.2 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials	73
2.2.2.5 Etablierung neurotoxischer Modelle.....	75
2.2.2.5.1 Untersuchung von chemischen Inhibitoren	75
2.2.2.5.2 Untersuchung von proteotoxischem Stress	77
2.2.3 Generierung und Untersuchung Parkin-transgener Zebrafische.....	81
2.2.3.1 Untersuchung Parkin-transgener Zebrafischembryonen in neurotoxischen Modellen.....	83
2.2.4 Zusammenfassung Teil 2	85
2.3 Teil 3: Untersuchung des Einflusses von Parkin auf Mitochondrien	87
2.3.1 Knockdown von Parkin in humanen Zellen.....	88
2.3.1.1 Knockdown von Parkin führt in humanen Zellen zu mitochondrialer Fragmentierung	88
2.3.1.2 Knockdown von Parkin führt zu Veränderungen der zellulären ATP-Produktion	90
2.3.1.3 Untersuchung der Apoptose in humanen Zellen mit Parkin-Knockdown....	91
2.3.2 Knockdown von Parkin in <i>Drosophila</i> -S2-Zellen	93
2.3.2.1 Knockdown von Parkin führt in <i>Drosophila</i> -S2-Zellen zu mitochondrialer Fragmentierung	94
2.3.2.2 Untersuchung der Apoptose in <i>Drosophila</i> -Zellen mit Parkin-Knockdown .	96
2.3.4 Zusammenfassung Teil 3	96
3 DISKUSSION.....	98
3.1. Spezifische biochemische und funktionelle Eigenschaften von Parkin sind zwischen Mensch und Zebrafisch konserviert.....	99
3.2. Der Zebrafisch eignet sich als Modell-Organismus zur Untersuchung der Funktion von Parkin	101
3.2.1 Über Inhibition des Spleißvorgangs kann im Zebrafisch ein Knockdown von Parkin erzielt werden.....	102
3.2.2 Die mitochondriale Morphologie und Funktionalität wird durch den Parkin-Knockdown nicht beeinträchtigt	103
3.2.3 Der Parkin-Knockdown führt nicht zum Verlust dopaminerger Neurone..	104

3.2.3	Ein Parkin-transgenes Zebrafisch-Modell dient der <i>in vivo</i> - Evaluierung des neuroprotektiven Potentials von Parkin	107
3.3	Der Verlust von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Zellen und in <i>Drosophila</i> -S2-Zellen zu verstärkter mitochondrialer Fragmentierung	109
4	MATERIAL.....	113
4.1	Biologisches Material.....	113
4.1.2	Zelllinien	113
4.1.3	Zebrafischlinien	113
4.1.4	Vektoren und Plasmide	113
4.1.5	Bakterienstämme	114
4.1.6	Antikörper	114
4.1.7	Enzyme und Proteine	114
4.1.8	Standardgrößenmarker für Proteine und DNA.....	115
4.1.9	Synthetische Oligonukleotide	116
4.2	Chemikalien.....	117
4.3	Lösungen und Puffer.....	119
4.4	Bakterien- und Zellkulturmedien.....	122
4.5	Kits.....	122
4.6	Geräte	123
4.7	Sonstiges	125
5	METHODEN	126
5.1	Molekularbiologische Methoden.....	126
5.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	126
5.1.2	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	126
5.1.3	Dephosphorylierung von DNA	127
5.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	127
5.1.5	TOPO-Klonierung.....	127
5.1.6	Gelelektrophorese.....	128
5.1.7	DNA-Sequenzierung	129

5.1.8 Herstellung transformationskompetenter Bakterien	129
5.1.9 Transformation kompetenter Bakterien.....	129
5.1.10 Bakterienkultivierung.....	130
5.1.11 Plasmid-Präparation.....	130
5.2 Zellbiologische Methoden	130
5.2.1 Zellkultur	130
5.2.1.1 Kultivierung von Zellen.....	130
5.2.1.2 Passagierung.....	131
5.2.1.3 Ausplattieren	131
5.2.1.4 Transfektion.....	131
5.2.1.5 RNAi-induzierter Knockdown	131
5.2.1.6 Zellernte.....	132
5.2.1.7 Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie von Mitochondrien	132
5.2.2 Protein- und Nukleinsäureanalytik	132
5.2.2.1 Gesamtzelllysat.....	132
5.2.2.2 Nachweis der Löslichkeit (Solubilitätsassay)	132
5.2.2.3 Proteinkonzentration nach Bradford	133
5.2.2.4 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	133
5.2.2.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran (Western Blot)	134
5.2.2.6 Ponceau S- Färbung.....	134
5.2.2.7 Immundetektion von Proteinen	134
5.2.2.8 Immunfluoreszenz zum Nachweis von Apoptose	135
5.2.2.8.1 Caspase-Assay.....	135
5.2.2.8.2 TUNEL-Assay	135
5.2.2.9 ATP-Assay	136
5.2.2.10 Isolierung von RNA	136
5.2.2.11 Synthese von cDNA	136
5.2.2.12 Semi-quantitative <i>real time</i> PCR (qRT-PCR)	137
5.2.2.13 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Stressoren	137
5.3 Arbeiten mit Zebrafischen	138
5.3.1 Haltung der Zebrafische und Behandlung der Embryonen	138

5.3.2 Homologievergleiche in Datenbanken.....	138
5.3.3 Gewinnung genomischer DNA	138
5.3.4 Mikroinjektion von Zebrafischeiern	139
5.3.5 Transienter Knockdown von Parkin in Zebrafischen.....	139
5.3.6 Hitzeschock-Behandlung von Zebrafischembryonen.....	139
5.3.7 Zelltodfärbung in lebenden Zebrafischembryonen	139
5.3.8 Synthese einer Digoxigenin-markierten Tyrosinhydroxylase-RNA-Sonde.....	140
5.3.9 <i>In situ</i> -Hybridisierung (ISH)	141
5.3.10 Färbung und Mikroskopie von Mitochondrien in lebenden Zebrafischen	142
5.3.10.1 Synthese und Mikroinjektion von mRNA	142
5.3.10.2 Inkubation in MitoTracker.....	142
5.3.10.3 Inkubation in Rotenon.....	143
5.3.10.4 Mikroskopie und Bilderstellung	143
5.3.11 Isolierung von Mitochondrien aus Zebrafisch.....	143
5.3.12 Messung des mitochondrialen Membranpotentials	144
5.3.13 Generierung Parkin-transgener Zebrafische.....	144
5.3.14 Gefrierschnitte und Immunhistochemie.....	145
5.3.15 Behandlung mit mitochondrialen und exzitatorischen Stressoren	146
5.3.16 Statistik.....	146
LITERATURVERZEICHNIS	147
GLOSSAR	173
DANKSAGUNG.....	175
LEBENS LAUF	177
VERÖFFENTLICHUNGEN	178

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Schematische Darstellung der nigrostriatalen Projektion.....	5
Abb. 2	Histologische Darstellung eines Lewy-Körperchens.....	6
Abb. 3	Typische Haltung und Beschwerden von Parkinson-Patienten.....	7
Abb. 4	[¹⁸ F]-Fluor-L-Dopa Positronenemissionstomographie (PET) Aufnahmen	8
Abb. 5	Stoffwechsel- und Transportwege von L-DOPA und Angriffspunkte von Enzyminhibitoren in der Parkinson-Therapie	10
Abb. 6	Ätiologie der Parkinson-Erkrankung.....	11
Abb. 7	Mitochondriale Atmungskette.....	15
Abb. 8	Mitochondriale Dynamik	17
Abb. 9	Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	22
Abb. 10	Klassifizierung der Aminosäurerezeptoren.....	23
Abb. 11	Sequenzvergleich von Parkin verschiedener Spezies	29
Abb. 12	Schematische Darstellung des Parkin-Proteins.....	30
Abb. 13	Das Ubiquitin-konjugierende System	32
Abb. 14	Generationszyklus des Zebrafisches.....	41
Abb. 15	Transienter Knockdown der Genfunktion im Zebrafisch.....	44
Abb. 16	Schematische laterale Ansicht eines adulten Zebrafischgehirns	47
Abb. 17	Schematische dorsale Ansicht Tyrosinhydroxylase-immunreaktiver Zellgruppen in zwei und fünf Tage alten Zebrafischen.....	48
Abb. 18	Das zu humanem Parkin orthologe Zebrafisch-Parkin ist hoch konserviert.	53
Abb. 19	Zebrafisch-Parkin ist unter hohem zellulären Stress anfällig für Missfaltung und Aggregation.....	56
Abb. 20	Endogenes Zebrafisch Parkin wird durch mitochondrialen Stress hochreguliert	57
Abb. 21	Zebrafisch-Parkin besitzt neuroprotektives Potential	59
Abb. 22	Frühe Stadien der Zebrafischentwicklung.	62
Abb. 23	Zebrafisch-Parkin wird in allen Stadien der frühen Entwicklung exprimiert	62
Abb. 24	Knockdown von Parkin im Zebrafisch durch Inhibierung des Spleißvorgangs.	64
Abb. 25	Verifizierung der Parkin-Knockdown-Effizienz	65
Abb. 26	Quantifizierung der Parkin-Knockdown-Effizienz	66
Abb. 27	Knockdown von Parkin führt im Zebrafisch zu keinen offensichtlichen Veränderungen der Morphologie.....	67
Abb. 28	Hohe Konzentrationen des Parkin-gt-grips führen zu einem toxischen Phänotyp	68
Abb. 29	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Tyrosinhydroxylase	69
Abb. 30	Quantifizierung von Tyrosinhydroxylase-mRNA in Zebrafischembryonen	70
Abb. 31	Rotenon führt in Zebrafischembryonen zu mitochondrialer Fragmentierung	72
Abb. 32	Knockdown von Parkin führt in Zebrafischembryonen nicht zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie in epidermalen Zellen.....	73

Abb. 33	Knockdown von Parkin führt in Zebrafischembryonen nicht zu Veränderungen des Membranpotentials	74
Abb. 34	Mitochondrien aus Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen sind im Vergleich zu Kontrollen nicht anfälliger gegenüber Komplex I-Inhibition.....	75
Abb. 35	Hitzeschock führt in Zebrafischembryonen zu Zelltod im Rückenmark.....	79
Abb. 36	Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen sind anfälliger für Hitzeschock-induzierten Zelltod.....	80
Abb. 37	Charakterisierung Parkin-transgener Zebrafische.....	82
Abb. 38	Einfluss von CCCP auf die Vitalität Parkin-transgener Zebrafischembryonen.....	83
Abb. 39	Parkin-transgene Zebrafische sind weniger anfällig für Hitzeschock-induzierten Zelltod	85
Abb. 40	Parkin-spezifische siRNA führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zur Reduktion von endogenem Parkin-Protein	88
Abb. 41	Knockdown von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie.	89
Abb. 42	Knockdown von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu verminderter Produktion von ATP.....	90
Abb. 43	Knockdown von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nicht zum Anstieg der Apoptose-Rate.....	92
Abb. 44	Effizienz des Knockdowns von Parkin in <i>Drosophila</i> -S2-Zellen.....	93
Abb. 45	Knockdown von Parkin führt in <i>Drosophila</i> -S2-Zellen zu einem frühen Phänotyp mitochondrialer Fragmentierung.	95
Abb. 46	Knockdown von Parkin führt in <i>Drosophila</i> -S2-Zellen nicht zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose-Rate.....	96
Abb. 47	pCR®-Blunt II-TOPO® Vektor (Invitrogen).....	128

ZUSAMMENFASSUNG

Die Parkinson-Erkrankung stellt nach der Alzheimer-Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar. Neben der am häufigsten auftretenden sporadischen Form handelt es sich bei 10-15% der Fälle um familiäre Formen. Bislang konnten sechs Gene identifiziert werden, die mit der Parkinson-Erkrankung assoziiert sind. Sporadische und familiäre Fälle teilen neuropathologische Charakteristika wie den weitgehend selektiven Verlust dopaminergener Neurone der *Substantia nigra*, so dass die Untersuchung Parkinson-assoziiierter Gene helfen kann, Einblicke in die Pathomechanismen der Erkrankung zu erhalten. Für die Mehrzahl der autosomal-rezessiv vererbaren Form der Erkrankung sind Mutationen im Parkin-Gen verantwortlich.

Vorhergehende Studien unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Parkin in der Lage ist, neuronale Zellen vor moderatem toxischem Stress zu schützen. Starker zellulärer Stress führte jedoch ebenso wie pathogene Mutationen zur Missfaltung, Aggregation und Inaktivierung von Parkin.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Parkin im Modell-Organismus Zebrafisch (*Danio rerio*) untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde im Zebrafisch ein Parkin-Ortholog identifiziert und in Zellkultur-Modellen charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Aminosäuresequenz auch spezifische biochemische und funktionelle Eigenschaften von Parkin zwischen Mensch und Zebrafisch hoch konserviert sind. Dazu zählen die Anfälligkeit für Missfaltung, die Stress-induzierte transkriptionelle Hochregulation sowie das protektive Potential gegenüber Stress-induziertem Zelltod. Im zweiten Teil wurde die Funktion von Parkin *in vivo* analysiert. Durch Injektion eines *Antisense*-Oligonukleotids wurde ein transienter Knockdown von Parkin im Zebrafisch erreicht, der zu keinen äußerlich erkennbaren morphologischen Veränderungen führte. Bei Untersuchung der mitochondrialen Dynamik und der dopaminergen Neurone war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontroll-Zebrafischembryonen feststellbar. Allerdings zeigten Parkin-Knockdown-Embryonen unter Hitzeschock-induziertem proteotoxischem Stress eine erhöhte Vulnerabilität in Form von vermehrtem Zelltod. Um das neuroprotektive Potential von Parkin *in vivo* zu evaluieren wurden Parkin-transgene Zebrafische generiert. Diese waren unter proteotoxischem Stress weniger anfällig für

Zelltod als ihre nicht-transgenen Geschwister und bestätigten damit die protektive Funktion von Parkin in einem bisher nicht untersuchten Vertebraten-Modell.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche Rolle Parkin in der mitochondrialen Dynamik humaner Zellen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass ein transienter siRNA-induzierter Knockdown von Parkin zur Fragmentierung des tubulären mitochondrialen Netzwerks führt. Dieser Prozess ging einher mit einem verminderten zellulären ATP-Gehalt. Ein ähnlicher mitochondrialer Phänotyp konnte in Parkin-defizienten *Drosophila*-Zellen beobachtet werden. Sowohl in humanen als auch in *Drosophila*-Zellen konnte eine Apoptose-bedingte Fragmentierung ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse geben Einblicke in die physiologische Funktion von Parkin und einen möglichen pathogenen Mechanismus, der durch Funktionsverlust von Parkin induziert wird.

1 EINLEITUNG

1.1 Parkinson-Erkrankung

Die Parkinson-Erkrankung stellt die häufigste motorische und zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Erkrankung dar. Nach Schätzungen gibt es weltweit circa fünf Millionen Betroffene, davon je eine Million in Europa und den USA. Aufgrund steigender Lebenserwartung wird in den kommenden Jahrzehnten mit einer zunehmenden Prävalenz der Parkinson-Erkrankung gerechnet. Pathophysiologisch ist die Erkrankung durch den progressiven Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) und den daraus resultierenden Dopaminmangel im *Striatum* gekennzeichnet. Die Kardinalsymptome können bislang lediglich kurzzeitig symptomatisch - nicht jedoch kurativ – behandelt werden. Für zukünftige Therapieansätze ist es von großer Bedeutung, tiefere Einblicke in die weitgehend ungeklärten Ursachen der Parkinson-Erkrankung zu erhalten. Dabei kann die Untersuchung monogener familiärer Formen helfen, pathologische Mechanismen aufzudecken und somit den Weg zum Verständnis der Erkrankung zu ebnen.

1.1.1 Geschichte

Die Erkrankung erhielt ihren Namen in Anlehnung an den englischen Arzt James Parkinson, der die klinischen Symptome 1817 erstmals beschrieb. In seiner „Abhandlung über die Schüttellähmung“ (An essay on the shaking palsy) bezeichnete er das Krankheitsbild, das sich durch Tremor, Akinese und Unsicherheit in der Haltung und beim Gehen äußerte, als *Paralysis Agitans*. Der französische Neurologe Jean-Martin Charcot schilderte 1884 weitere Symptome wie Rigor und Hypomimie und benannte das Leiden nach seinem Entdecker als Parkinson-Erkrankung. Erst 1919 wurden pathologische Veränderungen in der *Substantia nigra* durch den russischen Arzt Konstantin Tretiakoff beschrieben und mit der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht. Ende der fünfziger beziehungsweise Anfang der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurde der biochemische Hintergrund der Krankheit entschlüsselt. Nachdem der schwedische Pharmakologe Arvid Carlsson den Neurotransmitter Dopamin entdeckt hatte, konnten kurz darauf Ehringer und Hornykiewicz zeigen, dass bei Parkinson-Patienten der

Dopamingehalt in den Basalganglien vermindert ist. Diese Erkenntnisse eröffneten den Weg für die symptomatische Therapie. 1961 berichteten Birkmayer und Hornykiewicz erstmals von der Behandlung von Parkinson-Patienten mit intravenösem L-Dopa (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin), der Vorstufe des fehlenden Dopamins. 1973 wurde L-Dopa unter dem Handelsnamen Madopar® von Hoffman – La Roche auf den Markt gebracht. Bis heute ist die Dopamin-Substitution die wirksamste Therapie der motorischen Störungen. Obwohl Kombinationstherapien und weitere Antiparkinson-Medikamente die Lebenserwartung und –qualität der Betroffenen grundlegend positiv verändert haben, gibt es bislang keine Möglichkeit, die Degeneration dopaminerger Neurone aufzuhalten.

Ein weiterer Meilenstein in der Parkinson-Forschung war die Entdeckung von monogenen familiären Formen der Erkrankung. Mittlerweile wurden 13 Genloci identifiziert, die mit der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Für sechs Gene wurde bislang gezeigt, dass sie mit der Erkrankung assoziiert sind. Diese können dazu beitragen, die Pathomechanismen der sporadischen Parkinson-Erkrankung besser zu verstehen, da beide Formen gemeinsame neuropathologische und klinische Charakteristika aufweisen, wie etwa den Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra*.

1.1.2 Neuropathologische Charakteristika

Charakteristisch für die Parkinson-Erkrankung sind der weitgehend selektive Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* und der Verlust nigrostriataler Nervenbahnen, die zum *Striatum* führen (Abb. 1). Die Degeneration der Nervenendigungen führt zu den Symptomen der Erkrankung. Im Gegensatz dazu sind die dopaminergen Neurone des ventralen tegmental Areal (VTA), das sich in unmittelbarer Nähe der *Substantia nigra* befindet, weniger betroffen (Uhl et al., 1985). Degeneration findet man weiterhin in noradrenergen (*Locus coeruleus*), serotonergen (Raphe-Kerne) und cholinergen (*Nucleus basalis Meynert*, dorsaler Vagus Kern) Systemen sowie im zerebralen *Cortex*, im Riechkolben und im autonomen Nervensystem (Dauer und Przedborski, 2003). Die häufig beobachtete Demenz im Spätstadium der Erkrankung lässt sich auf degenerative Prozesse im *Hippocampus* zurückführen. Pathologisch-anatomisches Zeichen des Zelluntergangs ist die Depigmentierung der *Substantia nigra*, die *post mortem* in den Gehirnen von Parkinson-Patienten beobachtet werden kann: Mit

den dopaminergen Neuronen verschwindet das in ihnen enthaltene Pigment Neuromelanin, das aus oxidativen Abbauprodukten von Dopamin entsteht und dem die *Substantia nigra* ihren Namen verdankt (Marsden, 1983).

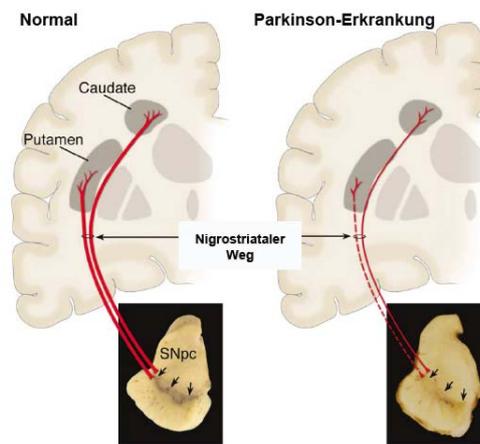


Abb. 1 Schematische Darstellung der nigrostriatalen Projektion

Kontroll-Hirn mit normaler nigrostriataler Projektion (durchgehende rote Linie) und Gehirn eines Parkinson-Patienten mit degenerierten nigrostriatalen Projektionen (gestrichelte rote Linie). Im rechten unteren Bild ist die Depigmentierung der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) durch den Verlust dopaminergener Neurone zu sehen. Abbildung modifiziert nach (Dauer und Przedborski, 2003).

Ein zweites pathologisches Merkmal stellen so genannte Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten dar. Letztere sind dystrophische Neurite, die in den zurückbleibenden intakten Neuronen der *Substantia nigra* gefunden wurden (Dickson et al., 1991). Bei den Lewy-Körperchen handelt es sich um eosinophile, zytoplasmatische, proteinhaltige Einschlüsse, die in degenerierenden Neuronen der *Substantia nigra*, des *Locus coeruleus*, des dorsalen Vaguskerne und anderen Kerngebieten zu finden sind (Abb. 2). Diese sphärischen Aggregate setzen sich aus zahlreichen Proteinen zusammen wie z.B. α -Synuclein, Ubiquitin, Hitzeschockproteinen und Parkin (Forno, 1996; Spillantini et al., 1998; Spillantini et al., 1997), besitzen einen Durchmesser von etwa 15 μm und einen dichten Kern, der von einer blassen Halo umgeben ist (Pappolla, 1986). Lewy-Körperchen sind nicht spezifisch für die Parkinson-Erkrankung und können auch in anderen Erkrankungen wie der Lewy-Körperchen-Demenz oder der Multisystematrophie auftreten. Diese Krankheitsformen werden unter dem Begriff Synucleinopathien zusammengefasst (Duda et al., 2000). Die Rolle von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung wird kontrovers diskutiert.

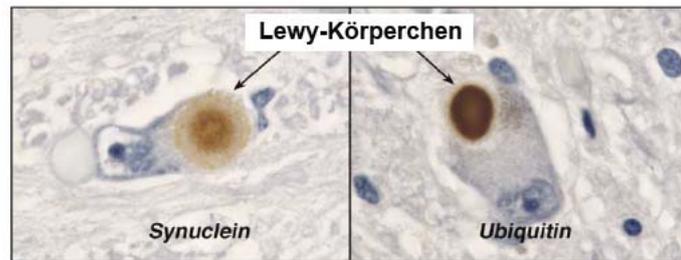


Abb. 2 Histologische Darstellung eines Lewy-Körperchens

Immunhistochemische Färbung eines Lewy-Körperchens in einem dopaminergen Neuron der *Substantia nigra pars compacta*. Links: Immunfärbung von α -Synuclein, rechts: Immunfärbung von Ubiquitin. Abbildung modifiziert nach (Dauer und Przedborski, 2003).

1.1.3 Symptome

Während die Parkinson-Erkrankung durchschnittlich in einem Alter von 55 Jahren auftritt, erhöht sich die Prävalenz mit zunehmendem Lebensalter. Bei den über 60-Jährigen sind 1-2% der Bevölkerung betroffen, bei den über 80-Jährigen steigt der Anteil auf circa 4% (de Lau und Breteler, 2006). Zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten Symptome sind bereits circa 60% der dopaminergen Neurone der *Substantia nigra pars compacta* degeneriert und der striatale Dopamingehalt ist um circa 80% reduziert (Hornykiewicz, 1982). Die ersten Symptome äußern sich meist als unilaterale, unspezifische Beschwerden wie Schulter- oder Nackenschmerzen, neuralgische Extremitätenschmerzen oder Schwächegefühl in Armen oder Beinen. Die zahlreichen Symptome lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Zu den motorischen Symptomen zählen die sogenannten Kardinalsymptome Rigor, Ruhetremor und Brady- beziehungsweise Akinese. Weiterhin treten Beeinträchtigung der Halte- und Stellreflexe sowie Hypomimie und Mikrographie auf (Lang und Lozano, 1998a, b) (Abb. 3). Überhöhte Talgproduktion (Salbengesicht), gestörte Wärme- und Schweißregulation, erniedrigter Blutdruck sowie Funktionsstörungen von Blase und Darm sind Ausdruck vegetativer Störungen. Psychische Störungen treten in Form depressiver Verstimmungen und verlangsamter Denkabläufe zu Tage. Letztere können sich im Spätstadium bis zur Demenz entwickeln. Typisch für Betroffene ist der kleinschrittige Gang, die vornübergebeugte Haltung, die fehlende Mitbewegung der Arme beim Gehen sowie die mimische Starre (Abb. 3). Alle Bewegungen werden verzögert gestartet und können nur schwer abgebremst werden (Aarsland et al., 1996; Cummings, 1992).

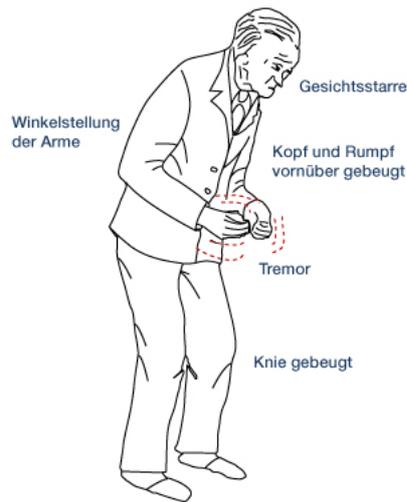


Abb. 3 Typische Haltung und Beschwerden von Parkinson-Patienten

<http://i.onmeda.de/parkinson.gif>

1.1.4 Diagnose

Da kein Parkinson-spezifischer biologischer Marker existiert, kommt es häufig und insbesondere im Frühstadium zu Fehldiagnosen. Die Bestätigung der Parkinson-Diagnose ist erst *post mortem* möglich. Die falsch-positive und falsch-negative Diagnosehäufigkeit ist sehr hoch (Litvan et al., 1996; Rajput et al., 1991), da sie basierend auf den typischen Symptomen erfolgt. Primär wird untersucht, ob eine Akinese und mindestens ein weiteres der anderen drei Hauptsymptome (Rigor, Tremor, posturale Instabilität) vorliegen. Ein Grund für die Schwierigkeiten bei der Parkinson-Diagnose ist die Variabilität und geringe Manifestation der Symptome im Frühstadium. Insbesondere die Tatsache, dass die Kardinalsymptome nicht unbedingt vorhanden sind und Symptome auch Ausdruck anderer Störungen des Bewegungsapparats sein können, erschweren den Befund. Zur differentialdiagnostischen Abklärung können verschiedene bildgebende Verfahren eingesetzt werden wie die Positronenemissionstomographie (PET) (Abb. 4) und die *Single-Photon-Emissionscomputertomographie* (SPECT). Dabei werden Radiodiagnostika injiziert. [^{18}F]-Fluor-L-Dopa wird gemeinsam mit endogenem L-Dopamin nach Decarboxylierung in präsynaptischen Vesikeln gespeichert und mit [^{123}I]- β -CIT (DaTSCAN™) wird die Dichte von Dopamintransporter-Proteinen im *Striatum* nachgewiesen. Mit sowohl PET als auch SPECT können für die Parkinson-Erkrankung charakteristische Veränderungen bereits im präklinischen Stadium erkannt werden. Die Ursachen des Dopaminmangels können mit diesen Techniken jedoch nicht geklärt

werden. Jede Läsion des nigralen Systems kann eine Abschwächung der PET-beziehungsweise SPECT-Signale verursachen.

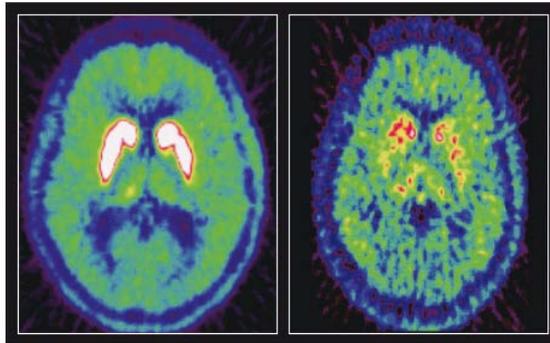


Abb. 4 [¹⁸F]-Fluor-L-Dopa Positronenemissionstomographie (PET) Aufnahmen

Links ist ein gesundes Kontrollhirn abgebildet, rechts die Aufnahme eines Parkinson-Patienten. Die krankheitsbedingte, reduzierte striatale Aufnahme von [¹⁸F]-Fluor-L-Dopa ist asymmetrisch und betrifft vor allem das posteriore Putamen. Abbildung aus (Olanow et al., 2009).

Als weitere Methode zur Bestätigung eines Parkinson-Verdachtsfalls wird in neuerer Zeit die transkranielle Ultraschalluntersuchung verwendet. Bei 90% der Parkinson-Patienten konnte als wesentlicher Befund eine leichte bis deutliche Hyperechogenität der *Substantia nigra* nachgewiesen werden (Becker et al., 1995; Hagenah et al., 2006). Allerdings wiesen auch 9% der gesunden Probanden dieses Merkmal auf. Als zusätzliches Instrument zur Früh- und Differentialdiagnose wird der Sniffin Stick-Test eingesetzt (Daum et al., 2000), da bei 80% bis 90% der Parkinson-Patienten Störungen des Riechvermögens vorliegen, die bereits vor Beginn der motorischen Beschwerden auftreten (Haehner et al., 2009). Trotz vieler neuer Ansätze sind ein asymmetrisches Parkinson-Syndrom (Tremor oder Rigor) und das Ansprechen auf Levodopa nach wie vor die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale, die auf eine Parkinson-Erkrankung hindeuten. Um das Ausmaß der krankheitsbedingten Einschränkungen festzustellen und den Verlauf der Erkrankung zu beurteilen, wird die *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) verwendet. Sie ist unterteilt in die Bereiche kognitive Funktionen, Verhalten und Stimmung, Aktivitäten des täglichen Lebens, motorische Leistungsfähigkeit und Komplikationen der Behandlung.

1.1.5 Behandlung

Die mittlere Überlebenszeit nach Krankheitsbeginn beträgt ohne adäquate Behandlung rund zehn Jahre. Da bis heute keine kurative Therapie zur Verfügung steht, erfolgt die Behandlung rein symptomatisch. Therapeutisch wird versucht, den Mangel an Dopamin und das entstehende Ungleichgewicht der Neurotransmitter auszugleichen. Die Dopamin-Vorstufe Levodopa, die als Aminosäure mit Hilfe eines aktiven Transporters durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird und in dopaminergen Neuronen durch das Enzym Dopa-Decarboxylase decarboxyliert wird, stellt das wirksamste und wichtigste Parkinson-Medikament dar. Da Levodopa zu 95% in der Körperperipherie zu Dopamin decarboxyliert wird, wird es zusammen mit Inhibitoren der aromatischen L-Aminosäure-Decarboxylase (Benserazid oder Carbidopa) verabreicht, die dieses Enzym außerhalb des Zentralnervensystems blockieren. Somit können Dosierung und Nebenwirkungen reduziert werden. Um die Verfügbarkeit von Levodopa im Gehirn weiter zu erhöhen, werden Hemmstoffe der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) eingesetzt. Diese verhindern, dass Levodopa in der Peripherie zu dem therapeutisch inaktiven Metaboliten 3-O-Methyldopa umgesetzt wird, der mit Levodopa um den Transport ins Gehirn konkurrieren würde. Die COMT-Inhibitoren Tolcapon und Entacapon werden in Kombination mit Levodopa eingesetzt (Abb. 5). Da die Wirksamkeit von Levodopa oft nach nur wenigen Jahren abnimmt und sich unter Langzeittherapie Dyskinesien entwickeln, werden stattdessen im Frühstadium vermehrt Dopamin-Agonisten eingesetzt, von denen derzeit neun verschiedene in Deutschland zur Parkinson-Therapie zugelassen sind. Zum Abbau von Neurotransmittern im Zentralnervensystem tragen maßgeblich die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Monoaminoxidasen (MAO) bei. Welche der beiden Isoformen (MAO-A oder MAO-B) primär für den Dopamin-Metabolismus verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert (Olanow et al., 2009). Die Isoform MAO-B kommt in den Basalganglien häufiger vor als MAO-A. Ihr Anteil an der Monoaminoxidase-Aktivität beträgt 80% (Youdim und Riederer, 2004). In den catecholaminergen Nervenendigungen findet man jedoch vornehmlich die Isoform MAO-A (Olanow et al., 2009). Selektive Inhibitoren der MAO-B bewirken eine erhöhte und längere Verfügbarkeit von Dopamin in den striatalen Neuronen, indem sie den Abbau von

Dopamin zu Dihydroxyphenylethylsäure verhindern. Zurzeit werden die Wirkstoffe Selegilin und Rasagilin eingesetzt.

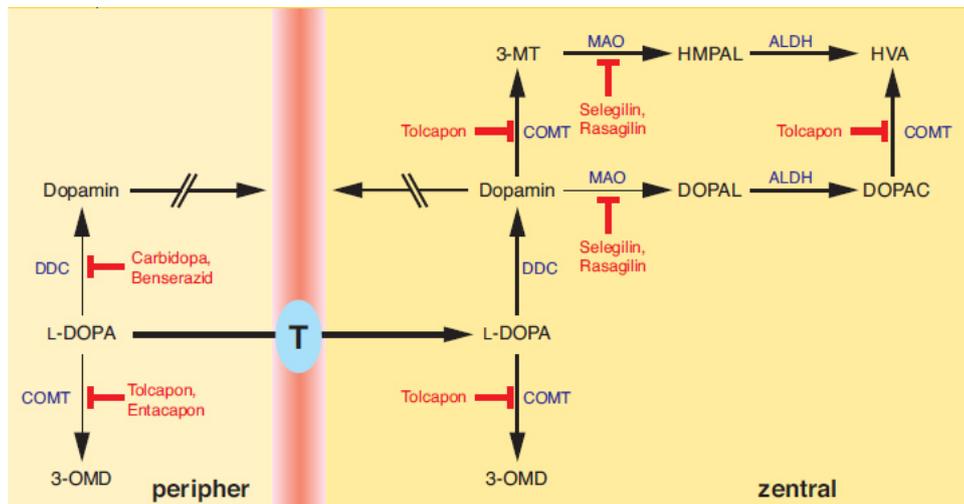


Abb. 5 Stoffwechsel- und Transportwege von L-DOPA und Angriffspunkte von Enzyminhibitoren in der Parkinson-Therapie

ALDH: Aldehyd-Dehydrogenase, COMT: Catechol-O-Methyltransferase, DDC: L-DOPA-Decarboxylase, DOPAC: 3, 4-Dihydroxyphenylacetaldehyd, HMPAL: 4-Hydroxy-3-methoxyphenylacetaldehyd, HVA: Homovanillinsäure, MAO: Monoaminoxidase, 3-MT: 3-Methoxytyramin, 3-OMD: 3-O-Methyl-L-DOPA, T: Aminosäuretransporter. Abbildung aus (Gutschow und Meusel, 2006).

Das Antiparkinson-Potential von Amantadin und Memantin beruht auf der milden, nicht-kompetitiven Blockierung des NMDA-Rezeptors. Dadurch wird das Ungleichgewicht zwischen dopaminerger Hemmung und glutamaterger Stimulation cholinergischer Neurone verbessert (Mutschler, 2001), was einen antiakinetischen und antidyskinetischen Effekt mit sich bringt. Anticholinergika wie Biperiden, Metixen und Benztropin werden aufgrund ihres ungünstigen Nebenwirkungsprofils und ihres mäßigen Effekts (Tremor spricht am ehesten auf diese Therapie an) seltener eingesetzt. Trotz zahlreicher Verbesserungen der pharmakologischen Therapien in den vergangenen Jahren kann ein signifikanter Prozentsatz der Parkinson-Patienten im Langzeitverlauf medikamentös nicht zufriedenstellend behandelt werden. Zu den wichtigsten Therapiekonzepten der nicht-medikamentösen Verfahren zählt die tiefe Hirnstimulation. Durch Implantation von Mikroelektroden wird eine Hochfrequenzstimulation möglich, die zur Hemmung der neuronalen Aktivität im Zielgebiet führt und bei ausgeprägter Akinese oder Dyskinesien und schwerem Ruhetremor indiziert sein kann.

1.1.6 Ätiologie/Pathogenese

Die Ursachen des Parkinson-Syndroms sind sehr unterschiedlich und werden in drei Kategorien eingeteilt. Am weitest häufigsten ist die idiopathische oder sporadische, die 80-90% der Erkrankungen darstellt und deren Ätiologie unbekannt ist. Bei 10-15% der Erkrankungen handelt es sich um familiäre Formen mit autosomal dominanter oder rezessiver Vererbung. Die übrigen Fälle werden als symptomatischer (sekundärer) Parkinsonismus bezeichnet, der sowohl medikamentös-induziert (als unerwünschte Arzneimittelwirkung) auftreten kann als auch als Folge von Arteriosklerose der Hirngefäße, Enzephalitiden, Traumen, Vergiftungen oder Tumoren. Parkinson-Syndrome kommen weiterhin im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen vor wie z.B. Multisystematrophie, progressive supranukleäre Blickparese oder Lewy-Körperchen-Erkrankung. Da die Ursachen der sporadischen Erkrankung noch immer unklar sind, werden verschiedene Pathomechanismen diskutiert.

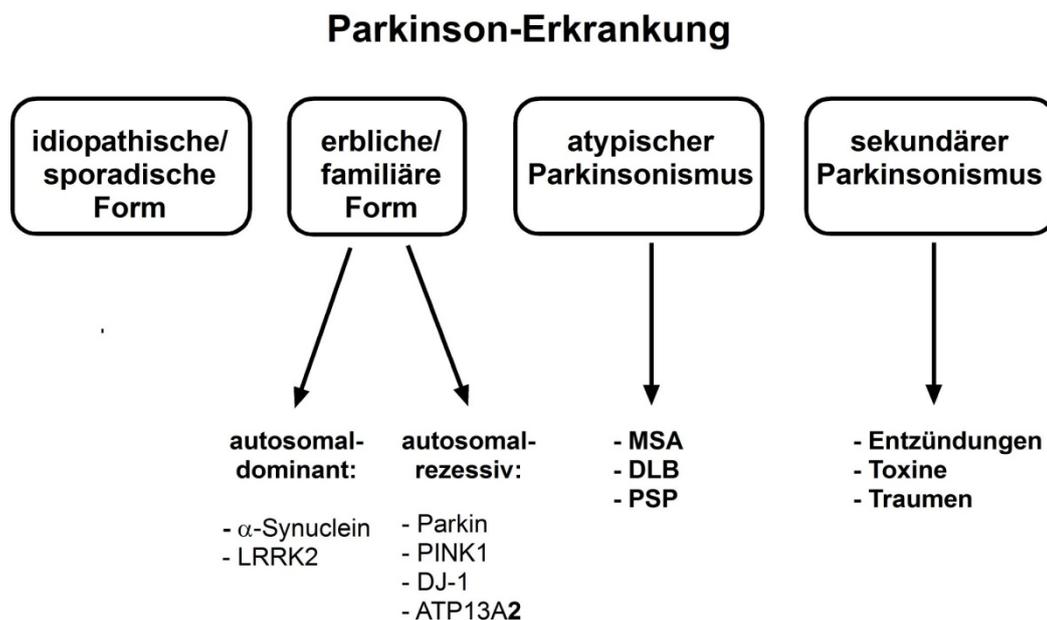


Abb. 6 Ätiologie der Parkinson-Erkrankung

MSA: Multiple Systematrophie, DLB: Demenz mit Lewy-Körperchen; PSP: progressive supranukleäre Blickparese

1.1.6.1 Proteinaggregation und proteasomale Dysfunktion

Obwohl die Ätiologie neurodegenerativer Erkrankungen unterschiedlich ist, teilen sie ein pathologisches Merkmal: die Ablagerungen von aberranten Protein-Konformeren. Vielerlei Ansätze haben die Rolle der Protein-Fehlfaltung in der Pathogenese bestätigt, doch es wird kontrovers diskutiert, ob Aggregate oder lösliche Oligomere, die Vorstufe von Aggregaten, die toxische Spezies darstellen (Haass und Selkoe, 2007). Nach neuerer Forschung wird vermutet, dass Aggregate als Teil eines protektiven Mechanismus entstehen, da toxische Oligomere inaktiviert werden (Ciechanover und Brundin, 2003). Nichtsdestotrotz stellen diese Ablagerungen auch ein dynamisches Reservoir dar, das die toxische Spezies freisetzen kann. Im Verlauf der Parkinson-Erkrankung treten Proteinaggregate in Form von zytosolischen Lewy-Körperchen auf.

Der gestörte Abbau von Proteinen ist eine mögliche Ursache für das Auftreten von Aggregaten. Kurzlebige, fehllokalisierte, fehlgefaltete, mutierte oder schadhafte Proteine werden normalerweise durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut (Sherman und Goldberg, 2001). Dabei handelt es sich um einen regulierten mehrstufigen Prozess, der von spezifischen Enzymen katalysiert wird (Ciechanover und Brundin, 2003). Ubiquitin wird vor seiner Verknüpfung mit dem Zielprotein zunächst an ein E1-Ubiquitin-aktivierendes Enzym gebunden und dann auf ein E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym übertragen. E3-Ubiquitin-Ligasen sind verantwortlich für die Substratspezifität der Ubiquitinierungsreaktion. Durch Poly-Ubiquitinierung, bei der die einzelnen Ubiquitin-Einheiten über Lysin-48 verknüpft sind, kann ein Substrat für den proteasomalen Abbau markiert werden (DeMartino und Slaughter, 1999; Hershko und Ciechanover, 1998; Hershko et al., 2000). Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, der aus zwei Subkomplexen besteht. Der 20S-Kernkomplex trägt im Inneren seiner Hohlzylinderstruktur die proteolytisch aktiven Zentren. An beiden Enden finden sich zusätzlich zwei regulatorische 19S-Komplexe. Diese sind verantwortlich für die Erkennung und Bindung von Substratproteinen, deren Entfaltung und den Transport der Polypeptidketten zu den proteolytischen Zentren des 20S-Kerns (Wolf und Hilt, 2004). Proteine werden zu Peptiden, die aus etwa vier bis neun Aminosäuren bestehen, abgebaut, anschließend von zytosolischen Peptidasen in einzelne Aminosäuren zerlegt und für Proteinsynthesen zur Verfügung gestellt (Baumeister et al., 1998) Die Ubiquitin-

Ketten werden durch Ubiquitin-Carboxy-terminale Hydrolasen in Monomere gespalten und stehen zur Wiederverwertung zu Verfügung (Healy et al., 2004). Ob Beeinträchtigungen des UPS eine pathogene Rolle bei der Parkinson-Erkrankung spielen, ist nicht vollständig geklärt. Ratten zeigten nach proteasomaler Inhibierung zwar einen Verlust dopaminerger Neurone und motorische Symptome (McNaught et al., 2004), aber diese Symptomatik konnte in nachfolgenden Studien nicht reproduziert werden (Kordower et al., 2006; Manning-Bog et al., 2006).

Die Protein-Homöostase ist ein hoch komplexes Netzwerk, das intrazellulär für das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, Faltung, Translokation und Abbau sorgt. Aggregation von Proteinen stellt für die Zelle einen proteotoxischen Stress dar, der die Protein-Homöostase gefährdet. Molekulare Chaperone und induzierbare Stressantwort-Kaskaden sind Modulatoren dieses Systems, die auf die Akkumulation missgefalteter Proteine reagieren. Seit Anfang der sechziger Jahre ist die Hitzeschock-Antwort als ubiquitärer und hoch konservierter protektiver Mechanismus bekannt, der die Zellen vor einer Vielfalt schädigender Einflüsse schützt. Allgemein wird die Hitzeschock-Antwort durch intrazelluläre Akkumulation nicht-nativ gefalteter Polypeptide ausgelöst. Die Aktivierung von Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSF) wurde erstmals nach temporärer Temperaturerhöhung beobachtet und war somit namensgebend. HSF binden nach Translokation in den Nukleus an Promotorregionen mit Hitzeschock-Elementen und induzieren die Transkription von Hitzeschock-Proteinen (Hsp) (Jolly und Morimoto, 2000). Hitzeschock-Proteine fungieren als molekulare Chaperone, die an ungefaltete Polypeptidsegmente binden und die Aggregation von Proteinen verhindern (Hartl, 1996). Im Falle von chronischem proteotoxischem Stress kann es zu einer Störung der Protein-Homöostase, dadurch bedingten Zelltod und zu neurodegenerativen Erkrankungen kommen (Morimoto, 2008).

1.1.6.2 Mitochondriale Dysfunktion

Mitochondrien, die jeher als „Kraftwerke“ der Zellen beschrieben werden, spielen nicht nur eine besondere Rolle im Energiemetabolismus sondern sind auch essentiell für die Calcium-Homöostase, Signaltransduktionswege und Apoptose. Mitochondriale Dysfunktion kann daher zu Zellschädigung führen und wird mit Alterungsprozessen und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht. In der inneren Mitochondrienmembran sind die Enzyme der Atmungskette lokalisiert und sorgen über die Synthese von ATP für die Deckung des zellulären Energiebedarfs. Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen und nutzt Reduktionsäquivalente, die aus dem Citratzyklus, der Glykolyse und dem Abbau von Fettsäuren stammen, um einen Protonengradienten aufzubauen, dessen Energie zur ATP-Synthese verwendet wird (Abb. 7). Die Reduktionsäquivalente werden in Form von NADH über Komplex I (NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase) oder in Form von FADH₂ über Komplex II (Succinat: Ubichinon-Oxidoreduktase) in die Atmungskette eingespeist, über Ubichinon (Coenzym Q) zum Komplex III (Ubihydrochinon: Cytochrom c – Oxidoreduktase) und weiter über Cytochrom c zum Komplex IV (Cytochrom c: O₂ – Oxidoreduktase) transportiert, wo sie Sauerstoff (O₂) zu Wasser reduzieren. Der Transport der Elektronen entlang der Atmungskette produziert Energie, die genutzt wird, um Protonen durch die Komplexe I, III und IV von der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien zu pumpen. Dieser elektrochemische Protonengradient wird von Komplex V (F₀F₁-ATPase) genutzt, um ATP zu synthetisieren.

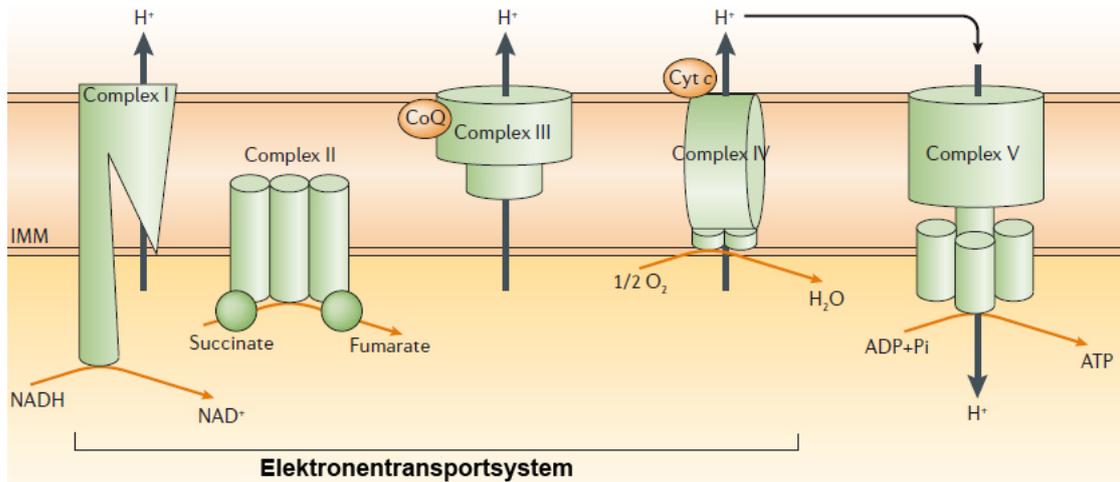


Abb. 7 Mitochondriale Atmungskette

Das Elektronentransportsystem der inneren Mitochondrienmembran (IMM) besteht aus vier Enzymkomplexen und transportiert Elektronen über hintereinander geschaltete Redox-Reaktionen, was an den Transfer von Protonen durch die IMM gekoppelt ist. Durch Rückfluss dieser Protonen durch den Protonenkanal von Komplex V wird in der Matrix aus ADP ATP generiert. Abbildung modifiziert nach (Abou-Sleiman et al., 2006).

Hinweise darauf, dass die Parkinson-Erkrankung mit einer mitochondrialen Dysfunktion in Zusammenhang steht und dabei dem mitochondrialen Komplex I eine besondere Bedeutung zukommt, erhielt man erstmals Ende der siebziger Jahre. Mit dem Neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) verunreinigte Drogen lösten bei den Anwendern eine Parkinson-ähnliche Symptomatik und den Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* aus (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983; Langston et al., 1999). Der Effekt auf dopaminerge Neurone konnte anschließend auch in Affen (Burns et al., 1983) und Mäusen (Heikkila et al., 1984) beobachtet werden. Auf der Suche nach dem Pathomechanismus fand man heraus, dass das lipophile MPTP die Blut-Hirn-Schranke überwindet und durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) in Gliazellen zum Pyrimidinium-Metaboliten MPDP⁺ oxidiert wird (Markey et al., 1984). Dieser wird vermutlich durch spontane Oxidation zu MPP⁺ (1-Methyl-4-Phenyl-Pyridin) umgesetzt und durch den Dopamin-Transporter in dopaminerge Neurone aufgenommen (Javitch et al., 1985). Innerhalb der Neurone wird MPP⁺ in die Mitochondrien aufgenommen und inhibiert Komplex I (Nicklas et al., 1985). Dies führt zu einer Abnahme der ATP-Produktion (Chan et al., 1991; Fabre et al., 1999). Für isolierte Mitochondrien, die mit den Komplex I-Inhibitoren MPTP beziehungsweise MPP⁺ oder Rotenon behandelt wurden, konnte gezeigt werden, dass proportional zur Komplex I-Inhibition die Produktion reaktiver

Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* ROS) ansteigt (Perier et al., 2005). Ebenso konnte beobachtet werden, dass der Komplex I der Elektronentransportkette in Parkinson-Patienten oxidativ geschädigt ist – bedingt durch die unmittelbare Nähe zum schädigenden Agens (Keeney et al., 2006), wodurch es wiederum zur Erhöhung der ROS-Produktion kommt. Diese positive Rückkopplung führt zu einem Teufelskreis. Dass dieser Mechanismus auch bei der sporadischen Parkinson-Erkrankung eine Rolle spielt, konnte vor 20 Jahren erstmals gezeigt werden, als von einer eingeschränkten Komplex I-Aktivität in der *Substantia nigra* von Patienten berichtet wurde (Schapira et al., 1989). Dieser Befund beschränkte sich jedoch nicht nur auf das Gehirn, so dass in der Folgezeit weitere betroffene Gewebe wie Blutplättchen (Krieger et al., 1992; Parker et al., 1989) und Lymphozyten (Barroso et al., 1993; Yoshino et al., 1992) beschrieben wurden. Nicht nur für sporadischen Formen der Parkinson-Erkrankung sondern auch für Patienten mit Parkin-Mutationen konnte eine eingeschränkte Komplex I-Aktivität gezeigt werden (Muftuoglu et al., 2004). Basierend auf diesen Tatsachen werden Komplex I-Inhibitoren wie MPP⁺ und das natürliche Insektizid Rotenon mittlerweile weitläufig im Zellkultur- und Tiermodell eingesetzt, um die Erkrankung zu simulieren. Damit bekräftigen sie epidemiologische Studien, die ein erhöhtes Erkrankungsrisiko mit Belastungen durch Pestizide assoziieren (Gorell et al., 1998).

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass mitochondriale Dysfunktion ein frühes Ereignis im Neurodegenerationsprozess darstellt. Das hohe Energiebedürfnis neuronaler Zellen erfordert funktionelle Mitochondrien, die sich durch dynamische Fusion und Teilung den zellulären Ansprüchen anpassen und bezüglich Größe und Form höchst variabel sind. Die Verteilung erfolgt über aktiven Transport entlang des Zytoskeletts und ist abhängig von Aktin und den Mikrotubuli (Hollenbeck und Saxton, 2005; Morris und Hollenbeck, 1995). Auf diese Weise werden Mitochondrien in Gegenden mit hohem Leistungsbedarf wie prä- und postsynaptische Regionen oder wachsende dendritische Fortsätze rekrutiert (Li et al., 2004).

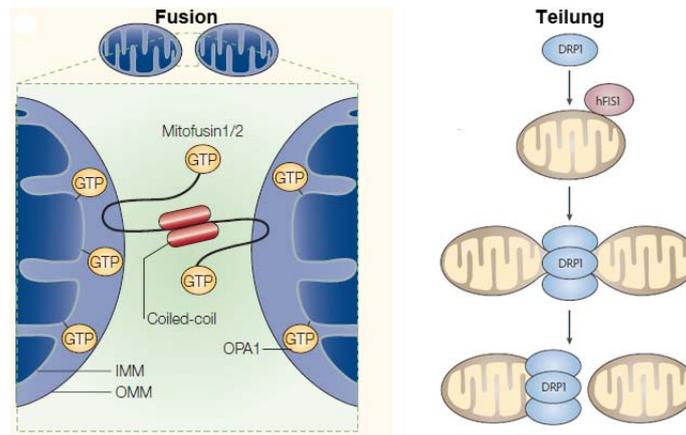


Abb. 8 Mitochondriale Dynamik

Fusionsprozess (links): zwei Mitochondrien werden durch die Interaktion der coiled-coil Domänen gegenüberliegender Mitofusine aufeinander zu bewegt. Die Mitofusine sind in der äußeren mitochondrialen Membran (OMM) verankert, ihre GTPase-Domänen ragen ins Zytosol. OPA1 ist in der inneren mitochondrialen Membran verankert (IMM) und spielt eine Rolle bei der Fusion der inneren Membranen. Teilungsprozesse (rechts): FIS1 ist in der äußeren Membran verankert. Drp1 lagert sich ringförmig an die äußere mitochondriale Membran an. Durch Einschnürung kommt es zur Teilung. Abbildung modifiziert nach (Knott et al., 2008; Youle und Karbowski, 2005).

Die Hauptkomponenten der mitochondrialen Fusions- und Teilungsmaschinerie sind evolutionär konserviert und weitreichend im Hefe-Modell untersucht. In Säugetieren sind die ubiquitär vorhandenen Mitofusine MFN1 und MFN2 für die Fusion der äußeren Membran zuständig. Dabei handelt es sich um Dynamin-verwandte GTPasen, die U-förmig in der äußeren Membran vorliegen. Aus dieser Membran ragen die N- und C-terminalen Domänen heraus ins Zytosol (Rojo et al., 2002). Mitofusine benachbarter Mitochondrien bilden mit ihren hydrophoben C-terminalen Regionen homo- oder heterooligomere Komplexe und leiten den Fusionsprozess ein (Chen et al., 2003; Detmer und Chan, 2007; Koshiba et al., 2004; Meeusen et al., 2004). An der Fusion der inneren Membran ist die GTPase OPA1 (*optic atrophy type 1*) beteiligt, die im Intermembranraum lokalisiert ist (Cipolat et al., 2004). Teilung der Mitochondrien erfordert die Rekrutierung des Dynamin-verwandten Proteins Drp1 (*dynamine-related protein 1*) aus dem Zytosol zu bereits an Mitochondrien vorliegendem Drp1, das teilweise Markierungen für spätere Teilungsprozesse darstellt (Smirnova et al., 2001). Die Zusammenlagerungen zu oligomeren Komplexen, die sich nach Modellvorstellung ringförmig anordnen, führen dann durch Einschnürung zur Teilung (Ingeman et al., 2005; Smirnova et al., 2001). Die Mechanismen, die der Aktivierung und Rekrutierung von zytosolischem Drp1 zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass FIS1 (*mitochondrial fission*

1 protein), ein integrales Protein der äußeren Mitochondrienmembran, benötigt wird (Lee et al., 2004). Weiterhin werden post-translationale Modifizierungen diskutiert, die die Funktion von Drp1 regulieren. Dazu gehören Ubiquitinierung (Karbowski et al., 2007; Yonashiro et al., 2006), Phosphorylierung (Taguchi et al., 2007) und Sumoylierung (Harder et al., 2004).

Unter basalen Bedingungen ist die Häufigkeit von Fusions- und Teilungsprozessen ausgeglichen. Dieses Gleichgewicht ist erforderlich, um in der Zelle eine Population funktioneller Mitochondrien zu gewährleisten. Wird das Gleichgewicht gestört, kann es zu dramatischen Veränderungen der mitochondrialen Morphologie kommen. Verstärkte Fusion führt zur Bildung eines ausgeprägten Netzwerks, während verstärkte Teilung die Organellen klein und sphärisch werden lässt. Die mitochondriale Fusion, bei der es zur Verschmelzung der Doppelmembran kommt, dient zur Vereinigung und Vermischung mitochondrialer Bestandteile. Da die mitochondriale DNA, die essentielle Untereinheiten der Komplexe I, III und IV der Atmungskette codiert, den produzierten radikalen Sauerstoffspezies (ROS) direkt ausgesetzt ist, treten verstärkt ROS-bedingte Mutationen auf, die während des Alterungsprozesses akkumulieren und möglicherweise zu pathologischen Zuständen führen (Balaban et al., 2005). Die Fusion von Mitochondrien wirkt einer Manifestation respiratorischer Defizite entgegen, indem mitochondriale DNA, die Mutationen enthält, komplementiert werden kann (Nakada et al., 2001; Sato et al., 2006a). Teilungsprozesse sind essentiell, da sich Mitochondrien durch Wachstum und Teilung verbreiten und über diesen Mechanismus bei der Zelldivision weitergegeben werden. Es konnte gezeigt werden, dass mitochondriale Teilung wichtig ist für Entwicklung und Zelldifferenzierung (Labrousse et al., 1999) und für die Bildung von Synapsen und dendritischen Dornen Neuronen (Li et al., 2004). Weiterhin kann mitochondriale Fragmentierung im Lauf des Apoptose-Prozesses beobachtet werden, wo sie der Freisetzung von Cytochrom c und der Caspase-Aktivierung vorausgeht. Weiterhin sind verstärkte Teilungsprozesse, die als Fragmentierung sichtbar werden, Bestandteil der Apoptose-Kaskade und gehen der Freisetzung von Cytochrom c und der Caspase-Aktivierung voraus (Youle und Karbowski, 2005).

Einschränkungen in der mitochondrialen Dynamik sind jüngst als mögliche Ursache neurodegenerativer Erkrankungen ins Blickfeld gerückt. Heterozygote Mutationen in OPA1 führen zu autosomal dominanter optischer Atrophie (Alexander et al., 2000;

Delettre et al., 2000), während sich homozygote Mutationen im Maus-Modell als intrauterin letal erwiesen haben; (Alavi et al., 2007; Davies et al., 2007). SiRNA-vermittelter Knockdown von OPA1 führt zu mitochondrialer Fragmentierung (Chen et al., 2005; Cipolat et al., 2004) und Veränderungen der Cristae-Struktur (Griparic, 2004; Olichon, 2003). Über 40 Mutationen in MFN2 konnten bisher mit der Erkrankung Charcot-Marie-Tooth 2A assoziiert werden, bei der die Axone langer sensorischer und motorischer Neurone degenerieren. Außerdem konnte mitochondriale Aggregation gefolgt von eingeschränktem Transport in Neuronen beobachtet werden (Baloh et al., 2007; Brockmann et al., 2008; Zuchner et al., 2004). Zellen, denen sowohl MFN1 als auch MFN2 fehlt, verlieren ihre tubulären Mitochondrien (Chen et al., 2005) und im Maus-Modell ist der Verlust von MFN1 oder MFN2 embryonal letal (Chen et al., 2005). Die Inhibierung von Drp1 führt zu erhöhter Länge und Konnektivität der tubulären Mitochondrien (Lee et al., 2004) und zu früher embryonaler Letalität in *Caenorhabditis elegans* (Labrousse et al., 1999). Evidenzen für einen Zusammenhang zwischen gestörter mitochondrialer Dynamik und der Parkinson-Erkrankung stammen nicht nur aus Toxin-basierten Tiermodellen (Barsoum et al., 2006; Benard et al., 2007) sondern auch aus RNA-Interferenz-Experimenten in humanen Zellen. Nach Knockdown von PINK1 zeigte sich eine veränderte mitochondriale Morphologie in Form von Fragmentierung und disorganisierten Cristae (Exner et al., 2007).

Essentiell für den Fusionsprozess ist das Membranpotential, das durch die Atmungskette aufrechterhalten wird. Ionophore, die dieses elektrochemische Potential zerstören, verhindern die Fusion und lösen dadurch Fragmentierung der Mitochondrien aus (Legros et al., 2002). Mitochondrien mit hohem Membranpotential wandern hauptsächlich in anterograder Richtung, was darauf hinweist, dass aktive Mitochondrien in distale Regionen mit hohem Energiebedürfnis rekrutiert werden (Miller und Sheetz, 2004). Im Gegensatz dazu werden Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential vornehmlich retrograd transportiert und kehren ins Soma zurück; vermutlich um dort abgebaut oder repariert zu werden. Für depolarisierte Mitochondrien ist es unwahrscheinlicher wieder Teil eines Fusionsprozesses zu werden (Twig et al., 2008). In Cybrid-Zellen, die Mitochondrien von sporadischen Parkinson-Patienten enthalten (Trimmer et al., 2000), sowie in Fibroblasten von Patienten mit Parkin-Mutation konnte ein verringertes Membranpotential nachgewiesen werden (Mortiboys et al., 2008).

1.1.6.3 Oxidativer Stress

Als oxidativen Stress bezeichnet man eine Stoffwechsellage, bei der reaktive Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS) in einer Menge gebildet werden, die das physiologische Ausmaß überschreitet. ROS sind für den Organismus schädliche Formen des Sauerstoffs, die bei verschiedenen Erkrankungen sowie beim Alterungsprozess eine wesentliche pathophysiologische Rolle spielen. Zu den ROS gehören zum einen freie Radikale wie das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$, das hochreaktive Hydroxyl-Radikal OH^{\cdot} , das Peroxylradikal ROO^{\cdot} und zum anderen stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). ROS können funktionelle Moleküle attackieren und dabei inaktivieren. Oxidativer Stress war der erste pathogene Faktor, der als Auslöser für den Untergang dopaminerger Neurone in Betracht gezogen und in der *Substantia nigra* von sporadischen Parkinson-Patienten anhand geschädigter Lipide, Proteine oder DNA nachgewiesen werden konnte (Jenner, 2003). Um die zelluläre Homöostase zu erhalten, stehen den ROS-produzierenden Vorgängen antioxidative Mechanismen gegenüber. Das Enzym Superoxiddismutase [hauptsächlich zytosolische Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (Cu/ZnSOD; SOD1) oder mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD; SOD2)] katalysiert die Umsetzung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid, das wiederum durch Katalase und Glutathion-Peroxidase zu Wasser umgewandelt wird. Radikalspezies können durch Glutathion nicht-enzymatisch reduziert werden. Das Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und antioxidativen Effekten bestimmt den Grad des oxidativen Stresses. Im Organismus entstehen reaktive Sauerstoffspezies hauptsächlich in den Mitochondrien als Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung. Circa 2% des umgesetzten Sauerstoffs werden durch Übertragung von entweichenden Elektronen zu Superoxid-Anionen (Beal, 2003); dieser Vorgang findet hauptsächlich an Komplex I und III statt. Das mitochondriale Matrixprotein Mangansuperoxid-Dismutase (MnSOD/SOD2) kann Superoxidanionen zu dem stabileren Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umsetzen, das aus Mitochondrien herausdiffundieren und durch Katalase weiter detoxifiziert werden kann (Lin und Beal, 2006). Eine Erklärung für die Tatsache, dass präferentiell dopaminerge Neurone degenerieren, könnte der Metabolismus von Dopamin sein, der oxidativen Stress erzeugt. Der Abbau von Dopamin geschieht über die Monoaminoxidase (MAO) zu 3, 4-Dihydroxyphenylethylsäure oder

über die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) zu 3-Methoxytyramin. Aus diesen Metaboliten entstehen im weiteren Verlauf Homovanillinsäure und das reaktive H_2O_2 (Maker et al., 1981). Darüber hinaus führt die Autooxidation von Dopamin zu toxischen Chinonen und Semichinonen, die mit Cystein-Gruppen reagieren können und dadurch Proteine schädigen (Stokes et al., 1999). Kovalent modifiziertes und somit inaktiviertes Parkin konnte in den Gehirnen von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (LaVoie et al., 2005). Ein weiterer wichtiger Faktor, der oxidativen Stress verursacht, ist das erhöhte Vorkommen von Eisen in der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten (Good et al., 1992; Hirsch und Faucheux, 1998; Sofic et al., 1988). Durch die Reaktion von H_2O_2 mit Fe^{2+} entstehen neben Fe^{3+} und Hydroxylionen auch Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion). Weiterhin kommt erschwerend hinzu, dass antioxidative Mechanismen beeinträchtigt sind. In der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten konnte ein Mangel an dem zellulären Antioxidans Glutathion festgestellt werden (Martin und Teismann, 2009; Sian et al., 1994) sowie reduzierte Aktivitäten der Katalase (Ambani et al., 1975) und Glutathion-Peroxidase (Kish et al., 1985).

Neben oxidativem Stress zeigen neuropathologische Untersuchungen von Parkinson-Patienten auch Hinweise auf nitrosativen Stress. Superoxid-Anionen können mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit (ONOO^-) reagieren (Lipton et al., 1993), das nicht nur Proteine an ihren Cystein-Resten nitrosyliert sondern auch direkt genotoxisch wirkt, indem es Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA verursacht (Martin und Liu, 2002). In vulnerablen Neuronen konnten erhöhte Mengen des S-nitrosylierten Chaperons Protein-Disulfid-Isomerase nachgewiesen werden, was mit einer verringerten neuroprotektiven Aktivität einherging (Uehara et al., 2006). Weiterhin wurde S-nitrosyliertes Parkin gefunden, das ebenfalls weniger protektiv war (Chung et al., 2004).

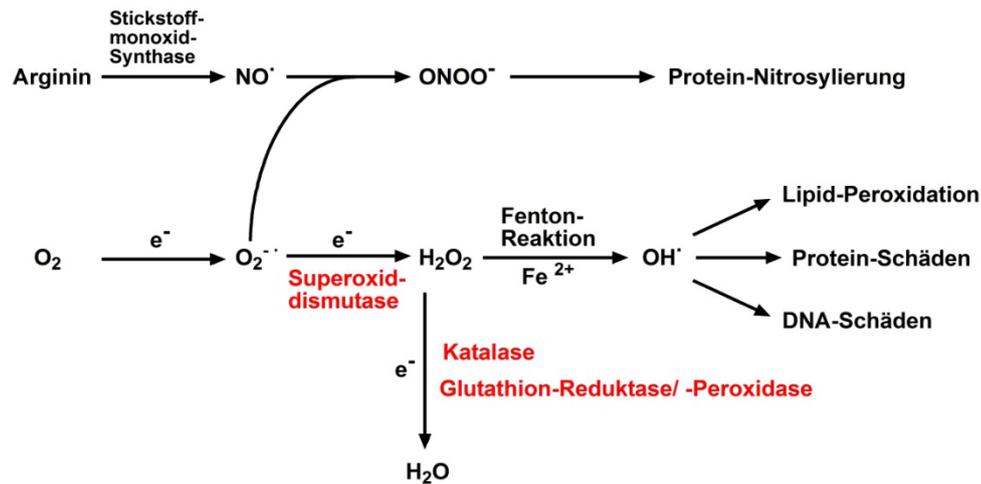


Abb. 9 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies umfassen freie Radikale mit hoch reaktivem ungepaarten Elektron (Superoxid $\text{O}_2^{\bullet-}$, Stickstoffmonoxid-Radikal NO^\bullet , Hydroxyl-Radikal OH^\bullet), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Peroxynitrit (ONOO). Enzyme, die die ROS detoxifizieren, sind in rot abgebildet. Abbildung modifiziert nach (Bogaerts et al., 2008).

1.1.6.4 Exzitotoxizität

Der Begriff Exzitotoxizität ist ein Kunstwort und setzt sich zusammen aus Exzitation (Erregung) und Toxizität und wurde vor knapp 25 Jahren erstmals verwendet. Er beschreibt die Fähigkeit von Glutamat und strukturell verwandten exzitatorischen Aminosäuren Neurone zu schädigen (Olney, 1986). Die Klasse der Glutamaterezeptoren kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe der metabotropen Rezeptoren ist G-Protein-gekoppelt, die Gruppe der ionotropen Rezeptoren besteht aus ligandengesteuerten Ionenkanälen. Zu letzteren gehören AMPA-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren (Abb. 10). Sie unterscheiden sich im Aufbau, der Sequenz ihrer Untereinheiten sowie ihren spezifischen Bindungs-, Aktivierungs- und Leitungseigenschaften. Alle drei sind hochaffin für Glutamat und haben unterschiedliche Präferenzen für andere Glutamat-Agonisten wie die namensgebenden Substanzen AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) und Kainat.

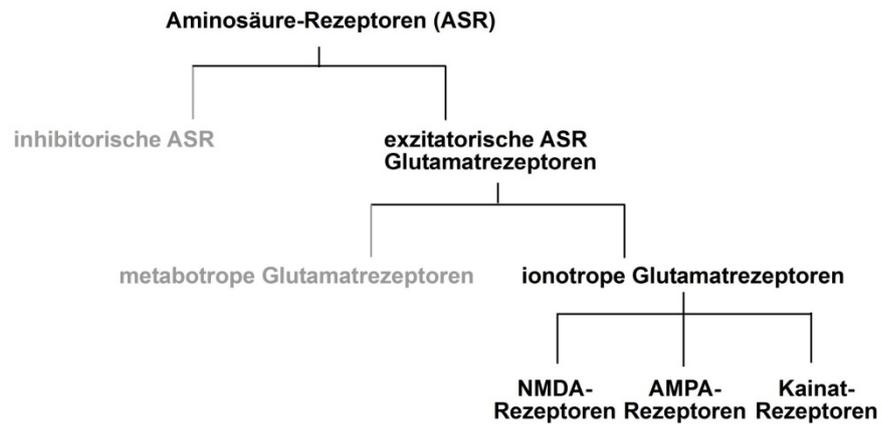


Abb. 10 Klassifizierung der Aminosäurerezeptoren

Dopaminerge Neurone der *Substantia nigra* zeichnen sich durch eine hohe Anzahl an Glutamatrezeptoren aus und werden innerviert vom *Nucleus subthalamicus* und dem *Cortex* (Yacoubian und Standaert, 2009). Unter physiologischen Bedingungen herrscht im *Striatum* ein Gleichgewicht zwischen aktivierenden (NMDA-Rezeptoren) und hemmenden (Dopamin-D2-Rezeptoren) Neurotransmittern. Im Verlauf der Parkinson-Erkrankung kommt es durch den Verlust von Dopamin zu einer verminderten Inhibierung und somit zu einer relativen glutamatergen Überreaktivität, die zu verstärktem Na^+ -Einstrom und zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle führt. Weiterhin kann Ca^{2+} direkt durch NMDA- und AMPA-Rezeptoren einfließen. Die dramatische Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden und somit zur Aktivierung verschiedener Proteasen, Lipasen und anderer zytotoxischer Enzyme. Gleichzeitig kommt es zu einem passiven Cl^- -Einstrom und damit zu einer Steigerung des osmotischen Drucks, der die Zellyse verursachen kann. Durch mitochondriale Schädigung sinkt der ATP-Spiegel und letztendlich tritt der Zelltod ein. Die Degeneration dopaminerger Neurone aufgrund von Exzitotoxizität konnte experimentell *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Kikuchi und Kim, 1993; Miranda et al., 1997). Mitochondrien scheinen beim exzitotoxischen Zelltod eine zentrale Rolle zu spielen (Stout et al., 1998). Die großen Mengen an freigesetztem Ca^{2+} werden von Mitochondrien aufgenommen, um die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration abzuf puffern. Dies führt zu mitochondrialer Dysfunktion und damit einhergehender gestörter ATP-Produktion.

Mitochondriale Dysfunktion kann Neurone derart sensibilisieren, dass Exzitotoxizität auch unter normalen Konzentrationen von Glutamat ausgelöst wird. Diesem als sekundäre

oder indirekte Exzitotoxizität bezeichneten Mechanismus liegt eine verminderte ATP-Produktion zugrunde. ATP wird in Neuronen benötigt, um das Ruhepotential der Zellmembran über Na^+/K^+ -ATPasen einzustellen. Ebenso wird die Ca^{2+} -Homöostase über Ca^{2+} -ATPasen aufrecht erhalten, indem diese intrazelluläres Ca^{2+} aus der Zelle heraus oder in zelluläre Speicher (ER) transportieren. Unter ATP-Mangel kann es zu einer unkontrollierten Membrandepolarisation kommen. Sofern diese ausreichend ist, um die spannungsabhängige Mg^{2+} -Blockierung der NMDA-Rezeptoren zu lösen, können bereits physiologische Glutamatkonzentrationen zur Überstimulation der NMDA-Rezeptoren führen (Novelli et al., 1988). Es konnte gezeigt werden, dass Neurodegeneration durch das mitochondriale Toxin MPTP unter anderem über Glutamatrezeptoren vermittelt wird. Der Einsatz eines selektiven NMDA-Antagonisten schützte Ratten vor dem Verlust neuronaler Zellen der *Substantia nigra* durch MPP^+ (Turski et al., 1991).

Zur Behandlung von Parkinson-Patienten wird der NMDA-Antagonist Amantadin, der die durch die Erkrankung gesteigerte Aktivität des *Nucleus subthalamicus* hemmt (Rodriguez et al., 1998) und damit zu einer besseren Beweglichkeit der Patienten führt. Die Inhibition von NMDA-Rezeptoren wird als neuroprotektiver Ansatz diskutiert (Hallett und Standaert, 2004). Zurzeit stehen selektive NMDA-Rezeptoren im Focus der Entwicklung. Deren Wirksamkeit ist jedoch umstritten (Nash et al., 2004; Wessell et al., 2004). Studien zur neuroprotektiven Wirkung von AMPA-Antagonisten lieferten bis jetzt ebenfalls keine Erfolgsmeldungen, aber die Bedeutung von Exzitotoxizität für die Pathogenese der Parkinson-Erkrankung wird verdeutlicht durch die Tatsache, dass ionotrope Glutamatrezeptoren als potentielle Zielstrukturen für zukünftige Therapien eingestuft werden (Schapira et al., 2006).

1.1.7 Familiäre Formen

Seit 1997 konnten sechs Gene identifiziert werden, bei denen Mutationen zu seltenen erblichen Formen der Parkinson-Erkrankung führen. Diese können einen wertvollen Beitrag zur Untersuchung der Pathomechanismen leisten, da sie die neuropathologischen und klinischen Charakteristika der sporadischen Erkrankung teilen und die Etablierung von Tier- und Zellkulturmodellen ermöglichen. Bei den familiären Formen der Parkinson-Erkrankung werden autosomal-dominante und autosomal-rezessive Erbgänge unterschieden. Mutationen in den Genen α -synuclein und LRRK2 unterliegen einem autosomal-dominanten Erbgang, Mutationen in Parkin, PINK1, DJ-1 und ATP13A2 einem autosomal-rezessiven.

1.1.7.1 α -Synuclein (PARK1 und PARK4)

α -Synuclein ist ein nativ ungefaltetes Protein, das aus 140 Aminosäuren besteht und im gesamten Gehirn exprimiert wird. Das entsprechende Gen war 1997 das erste, das einer familiären Form der Parkinson-Erkrankung zugeordnet werden konnte (Polymeropoulos et al., 1996). Mittlerweile wurden drei *Missense*-Mutationen in Familien mit autosomal-dominanter Parkinson-Erkrankung gefunden: A53T (Polymeropoulos et al., 1997), A30P (Kruger et al., 1998) und E46K (Zarranz et al., 2004). Weiterhin wurden genomische Duplikationen (Chartier-Harlin et al., 2004) und Triplikationen (Singleton et al., 2003) als ursächlich beschrieben. In Neuronen ist α -Synuclein im Zytoplasma zu finden, wo es hauptsächlich präsynaptisch in der Nachbarschaft von Vesikeln angereichert wird (Maroteaux et al., 1988). Aufgrund dieser Lokalisierung wird eine Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung oder synaptischen Plastizität vermutet (Abeliovich et al., 2000; Sidhu et al., 2004). α -Synuclein ist ein Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen (Spillantini et al., 1997) und für die pathogenen Mutationen konnte eine erhöhte Tendenz zur Fibrillenbildung gezeigt werden (Greenbaum et al., 2005).

1.1.7.2 LRRK2 (PARK8)

Die *Leucine-Rich Repeat kinase 2* (LRRK2), die auch Dardarin genannt wird, wurde 2002 als Parkinson-assoziiertes Gen identifiziert (Funayama et al., 2002; Paisan-Ruiz et al., 2004; Zimprich et al., 2004) und codiert ein 2527 Aminosäuren großes Protein. LRRK2

Mutationen sind die häufigste Ursache für dominante familiäre Formen der Parkinson-Erkrankungen (Klein und Schlossmacher, 2007; Mizuno et al., 2008), die sich erst im Alter von 50 bis 60 Jahren manifestieren. Es wurden circa 20 putativ pathogene Mutationen gefunden (Lu und Tan, 2008). Die am weitesten verbreitete Mutation G2019S löst durch Verstärkung der Kinaseaktivität einen toxischen Mechanismus aus (Brice, 2005; West et al., 2007). Während die klinischen Symptome der sporadischen Erkrankung ähneln, zeigten neuropathologische Untersuchungen eine große Bandbreite unterschiedlicher Merkmale (Santpere und Ferrer, 2009). Im menschlichen Gehirn ist LRRK2 in verschiedenen Regionen lokalisiert, die mit der Parkinson-Pathologie assoziiert sind (Higashi et al., 2007).

1.1.7.3 Parkin (PARK2)

Mutationen im Parkin-Gen wurden 1998 als Ursache für eine rezessive Form der Parkinson-Erkrankung identifiziert (Kitada et al., 1998). Bis heute wurden zahlreiche Mutationen beschrieben, die für den überwiegenden Teil der familiären Fälle mit sehr früher Manifestation verantwortlich sind.

1.1.7.4 PINK1 (PARK6)

Die 2004 identifizierte PTEN (*phosphatase and tensin*)-induced kinase 1 (PINK1) ist mit der zweithäufigsten rezessiv-vererbten familiären Form der Parkinson-Erkrankung assoziiert (Valente et al., 2004). Die Häufigkeit innerhalb der Fälle mit früher Manifestation wird auf 1-8% geschätzt (Klein und Schlossmacher, 2007). Bislang wurden circa 20 pathogene Mutationen beschrieben. Das ubiquitär exprimierte PINK1-Protein besteht aus 581 Aminosäuren und enthält eine mitochondriale Signalsequenz am N-Terminus (Beilina et al., 2005; Silvestri et al., 2005; Valente et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass PINK1 in der Lage ist, Neurone gegen zellulären Stress zu schützen (Valente et al., 2004). Krankheits-assoziierte Mutationen verhindern, dass PINK1 basale und induzierte neuronale Apoptose hemmen kann (Petit et al., 2005). Im Zellkultur- und im *Drosophila*-Modell wurde deutlich, dass PINK1 eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität und der dynamischen Prozesse hat (Clark et al., 2006; Exner et al., 2007; Park et al., 2006; Poole et al., 2008).

Der klinische Phänotyp ähnelt der sporadischen Erkrankung, es gibt jedoch auch Fälle mit atypischer Symptomatik.

1.1.7.5 DJ-1 (PARK7)

DJ-1 codiert ein 189 Aminosäuren großes, ubiquitär exprimiertes, zytosolisches Protein (Bandopadhyay et al., 2004). Bei den beiden wichtigsten pathologischen Mutationen handelt es sich um eine Deletion von Exon 1-5 (Dekker et al., 2003) und die Punktmutation L166P (Bonifati et al., 2003), die beide zum Funktionsverlust von DJ-1 führen. L166P blockiert die Dimerisierung von DJ-1, die für die Funktionalität notwendig ist, und führt zu schnellem proteasomalem Abbau (Miller et al., 2003; Moore et al., 2003). DJ-1 ist ein redox- sensitives Protein, das Zellen vor oxidativem Stress schützen kann, indem es selbst an Position C106 oxidiert wird (Canet-Aviles et al., 2004; Mitsumoto et al., 2001). DJ-1-Knockout-Mäuse zeigten zwar keine phänotypischen Veränderungen oder Auffälligkeiten, reagierten jedoch im Vergleich zu Kontroll-Mäusen mit einem größeren Verlust dopaminerger Neurone auf das Neurotoxin MPTP (Kim et al., 2005). Auch im *Drosophila*-Modell zeigte sich, dass der Verlust von DJ-1 zu vermehrter Degeneration dopaminerger Neurone unter Behandlung mit Komplex I-Inhibitoren oder Wasserstoffperoxid führt (Menzies et al., 2005; Meulener et al., 2005; Park et al., 2005). Patienten mit DJ-1- Mutationen ähneln phänotypisch Patienten mit Parkin- oder PINK1- Mutationen - einschließlich der frühen Manifestation im Alter zwischen 27 und 42 Jahren. Weiterhin konnte durch übermäßige Oxidation geschädigtes DJ-1 in den Gehirnen von Patienten mit sporadischer Parkinson-Erkrankung nachgewiesen werden (Choi et al., 2006).

1.1.7.6 ATP13A2 (PARK9)

ATP13A2 wurde als ursächliches Gen für die als Kufor-Rakeb-Erkrankung bekannte Form der Parkinson-Erkrankung identifiziert. ATP13A2 codiert eine ATPase, die in Lysosomen lokalisiert ist. Es wird angenommen, dass sie eine Rolle im Proteinabbau spielt, der über Autophagie und den lysosomalen Weg läuft (Lesage et al., 2009). Pathogenen Mutanten akkumulieren im endoplasmatischen Retikulum (Ramirez et al., 2006), was vermutlich zu lysosomaler Dysfunktion und nachfolgender Neurodegeneration führt. Betroffene zeigen nicht nur die typischen Symptome einer Parkinson-Erkrankung, sondern leiden zusätzlich noch an einer Blickparese und zunehmender eingeschränkter geistiger Leistungsfähigkeit (Di Fonzo et al., 2007).

1.2 Parkin-assoziierte autosomal-rezessive Parkinson Erkrankung

Mutationen im Parkin-Gen wurden erstmals in einer japanischen Familie entdeckt und sind verantwortlich für die Mehrzahl der autosomal-rezessiv vererbten Fälle der Parkinson-Erkrankung weltweit (Jain et al., 2005; Kitada et al., 1998). Bei Patienten wurden entweder homozygote oder *compound* heterozygote Mutationen im Parkin-Gen gefunden. Klinisch äußern sich die bekannten Parkinson-Symptome mit relativ langsamer Krankheits-Progression und früher Manifestation, die typischerweise vor dem 40. Lebensjahr liegt (Klein et al., 2000). Die Erkrankten sprechen gut auf Levodopa an und Demenzen entwickeln sich nur selten (Lohmann et al., 2003)). Es wird kontrovers diskutiert, ob heterozygote Mutationen die Erkrankung auslösen können oder einen Risikofaktor für eine späte Manifestation darstellen. Studien mit bildgebenden Verfahren konnten zeigen, dass die Aufnahme von Fluor-Dopa in die Basalganglien bei Trägern heterozygoter Mutationen vermindert ist (Hilker et al., 2001; Khan et al., 2002). Neuropathologische Untersuchungen von Patienten mit homozygoten Mutationen zeigten einen weitgehend selektiven Verlust dopaminergener Neurone der *Substantia nigra* und des *Locus coeruleus* (Hayashi et al., 2000; Ishikawa und Takahashi, 1998; Mori et al., 1998). Nachdem ursprünglich beschrieben wurde, dass keine Lewy-Körperchen vorliegen (Mori et al., 1998; Takahashi et al., 1994), zeigen neuere Untersuchungen Patienten mit Lewy-Pathologie (Farrer et al., 2001; Pramstaller et al., 2005) und neurofibrillären Bündeln (van de Warrenburg et al., 2001). Da bisher nur sehr wenige Gehirne autopsiert wurden, gilt es abzuwarten, was zukünftige Analysen zeigen. Weiterhin konnte Parkin in den Lewy-Körperchen von sporadischen Parkinson-Patienten nachgewiesen werden, was die Vermutung stützt, dass funktionelles Parkin Voraussetzung für die Bildung von Lewy-Körperchen ist (Schlossmacher et al., 2002). Die bisherigen Kenntnisse verdeutlichen, dass die neuropathologischen Veränderungen von zusätzlichen genetischen oder äußeren Einflüssen abhängig sind.

1.2.1 Molekulargenetik und Zellbiologie von Parkin

Das Parkin-Gen ist auf Chromosom 6q25.2-q27 lokalisiert und stellt mit einer Länge von 1,3 Mb eines der größten Gene des humanen Genoms dar. Es besteht aus 12 Exons, die ein Protein von 465 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 52 kDa codieren (Kitada et al., 1998). Der Promotor ist 204 Bp lang (Asakawa et al., 2001; West et al., 2001) und kontrolliert parallel die Genexpression des Parkin co-regulierten Gens (PACRG), das auf dem gegenüberliegenden Strang in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung lokalisiert ist (West et al., 2003). In einer Familie mit heterozygoter Exon 3-Deletion konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Deletion im Promotor zum kompletten Verlust der Parkin-Expression und zu einer frühen Manifestation der Erkrankung führen kann (Lesage et al., 2007).

Parkin liegt nicht nur im Menschen und Wirbeltieren wie Ratten und Mäusen vor, sondern auch in wirbellosen Tieren wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster*. Die Aminosäuresequenz – besonders im Bereich der funktionellen Domänen - ist stark konserviert, so dass die Parkin-Orthologe der genannten Nager über 80% Homologie zu humanem Parkin zeigen.

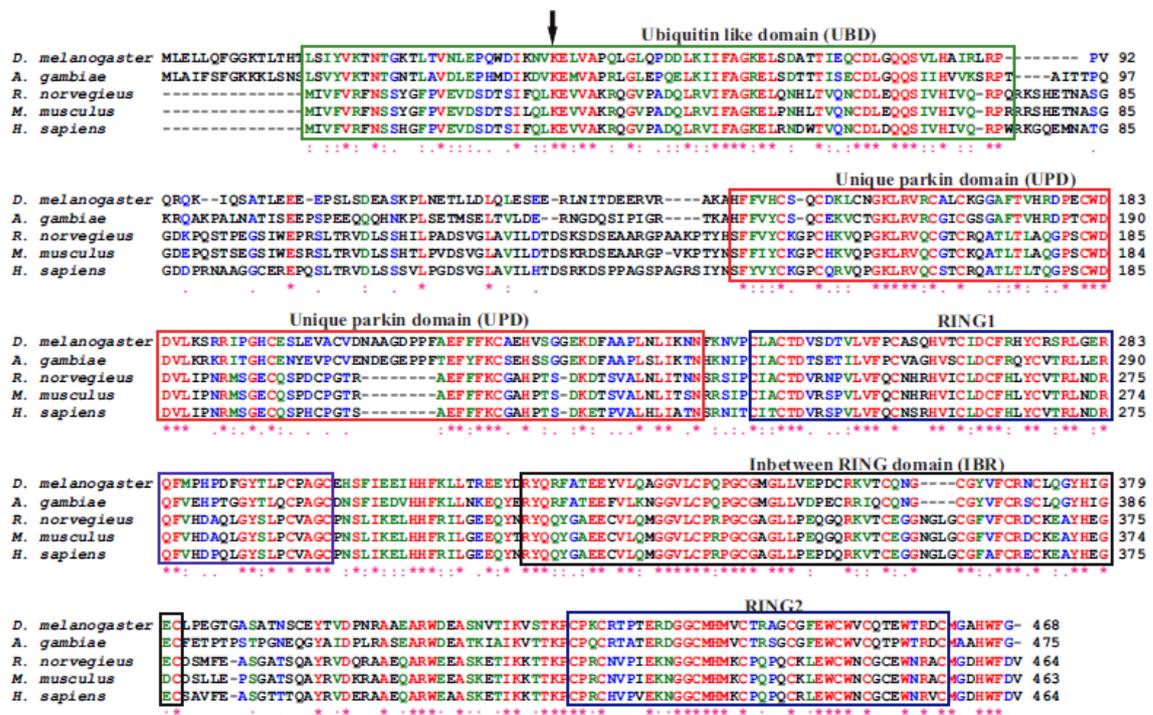


Abb. 11 Sequenzvergleich von Parkin verschiedener Spezies

Vergleich der Parkin-Sequenzen von *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* und *Homo sapiens*. Sternchen markieren konservierte Aminosäuren. RING: really interesting new gene. Abbildung aus (Haywood und Staveley, 2004).

Parkin wird im Menschen ubiquitär exprimiert und kann verstärkt in Gehirn, Herz, Skelettmuskeln und Testes nachgewiesen werden. Innerhalb des Gehirns schwankt der Expressionsgrad zwischen verschiedenen Regionen und ist in der *Substantia nigra pars compacta* bemerkenswerterweise relativ schwach (Kitada et al., 1998). Auf subzellulärer Ebene liegt Parkin hauptsächlich im Zytoplasma vor (Shimura et al., 1999). Es wurden jedoch auch Assoziationen mit dem Trans-Golgi-Netzwerk (Kubo et al., 2001), synaptischen Vesikeln (Fallon et al., 2002; Kubo et al., 2001), Aktin- und Tubulin-Filamenten (Fallon et al., 2002; Ren et al., 2003) und Mitochondrien (Darios et al., 2003b; Kuroda et al., 2006; Stichel et al., 2000) beschrieben.

Parkin ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut. Neben der *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne am N-Terminus findet man die *Really Interesting New Gene* (RING)-Box nahe am C-Terminus. Diese besteht aus zwei RING-Motiven, die eine Cystein-reiche *In-Between-RING* (IBR)-Domäne umschließen. Die N-terminalen Aminosäuren 1-76 sind zu 62% dem humanen Ubiquitin homolog (Kitada et al., 1998) und werden daher als UBL-Domäne bezeichnet. Die C-terminale RING-Box-Domäne weist auf eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität hin, die für diese Struktur typisch ist (Joazeiro und Weissman, 2000). Durch Interaktion mit Substraten und E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen wird somit der Übergang von Ubiquitin-Einheiten ermöglicht.



Abb. 12 Schematische Darstellung des Parkin-Proteins

Parkin besteht aus 465 Aminosäuren und weist eine Molekülmasse von 52 kDa auf. Innerhalb des Proteins findet man die N-terminale UBL-Domäne und die nahe dem C-Terminus liegende RING-Box, bestehend aus zwei RING-Motiven und der sich dazwischen befindenden IBR-Domäne. UBL: *ubiquitin-like*, RING: *really interesting new gene*, IBR: *in-between RING*.

1.2.2 Pathogene Parkin-Mutationen

Bis zum heutigen Tag wurden über 100 verschiedene Mutationen im Parkin-Gen beschrieben. Sie reichen von Deletionen über Insertionen und Multiplikationen bis zu Punktmutationen (Lucking et al., 2000; Mata et al., 2004). Letztere führen zu *Nonsense*-Mutationen mit vorzeitigem Stopp-Codon oder *Missense*-Mutationen mit Austausch von Aminosäuren. Obwohl die Mutationen über die gesamte codierende Region des Parkin-Gens verteilt vorliegen, ist ein vermehrtes Auftreten in den funktionellen Domänen feststellbar. Die Lokalisierung von Mutationen sowie die Identifizierung und Charakterisierung von Aminosäuren, die wesentliche Bedeutung für die Funktionalität von Parkin haben, tragen dazu bei, die Rolle von Parkin in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung zu analysieren. Mittlerweile konnte vielfach gezeigt werden, dass einige Mutationen zu Fehlfaltung und Aggregation führen, was einen Funktionsverlust von Parkin bedingt (Cookson et al., 2003; Gu et al., 2003; Hampe et al., 2006; Henn et al., 2005; Schlehe et al., 2008; Sriram et al., 2005; Wang et al., 2005; Winklhofer et al., 2003; Wong et al., 2007). Darüber hinaus haben Mutationen in der RING-Box einen Einfluss auf die Interaktion mit E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen und/oder die Substratbindung und können ferner die katalytische Aktivität von Parkin beeinträchtigen (Chung et al., 2001; Hershko et al., 2000; Imai et al., 2000; Shimura et al., 2001; Zhang et al., 2000).

1.2.3 Physiologische Funktion

1.2.3.1 Parkin ist als E3-Ubiquitin-Ligase aktiv

Wie viele andere RING-Finger-enthaltende Proteine kann Parkin als E3-Ubiquitin-Ligase fungieren (Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000). E3-Ligasen haben bedeutende Funktion zelluläre Funktionen, da sie spezifische Zielproteine kovalent mit Ubiquitin markieren (Glickman und Ciechanover, 2002). Das Schicksal der Substrate wird durch die Art der Ubiquitin-Verknüpfung und die Anzahl der angehängten Ubiquitin-Einheiten bestimmt. Sind bei einer Poly-Ubiquitinierung die Einheiten über Lysin-48 miteinander verknüpft, wird das Zielprotein hauptsächlich dem Abbau durch das Proteasom zugeführt (Hershko und Ciechanover, 1992). Dagegen ist die nicht-konventionelle Poly-Ubiquitinierung über Lysin-63 für verschiedene zelluläre Funktionen zuständig, unter anderem Endozytose, DNA-Reparatur und zelluläre Signaltransduktion. Mono-Ubiquitinierung, das Anhängen eines einzelnen Ubiquitins, spielt eine Rolle in der Endozytose, der Histonregulation und der DNA-Reparatur, während mehrfache Mono-Ubiquitinierungen ebenfalls bei endozytotischen Vorgängen beobachtet werden konnten (Hicke, 2001).

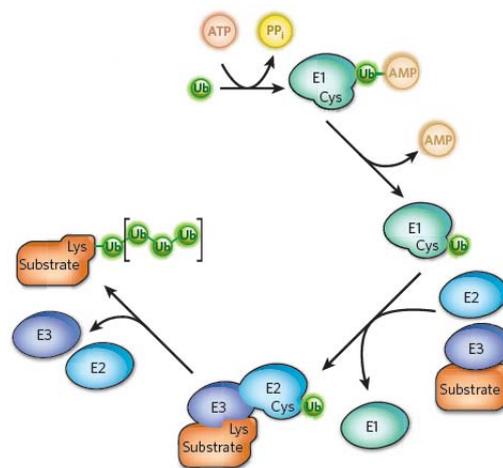


Abb. 13 Das Ubiquitin-konjugierende System

Das C-terminale Glyzin des Ubiquitins muss aktiviert werden, bevor eine kovalente Bindung mit einem Protein eingegangen werden kann. Cystein im Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 bindet unter Ausbildung einer Thioester-Bindung an den C-Terminus von Ubiquitin. Das aktivierte Ubiquitin wird an Cystein im Ubiquitin-konjugierenden Enzym E2 weitergegeben. Anschließend bildet sich eine Isopeptid-Bindung zwischen dem C-terminalen Glyzin des Ubiquitins und der ε-Amino-Gruppe eines Lysin-Rests innerhalb des Substrats. Abbildung modifiziert nach (Hochstrasser, 2009).

In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass Parkin mit den humanen E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen UbcH7 und UbcH8 (Imai et al., 2000; Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000) sowie Ubc6 und Ubc7 (Imai et al., 2001), die mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert sind, interagiert. Aufgrund dessen wurde postuliert, dass der E2/E3-Enzymkomplex die Ubiquitinierung über Lysin-48 katalysiert und somit Zielproteine für den proteasomalen Abbau markiert. Da pathogene Parkin-Mutanten zu einem Funktionsverlust führen, entwickelte sich die Hypothese, dass die Akkumulation von Parkin-Substraten zu Toxizität und Zelltod führt. Um diese Substrate zu identifizieren, wurden zahlreiche *Yeast-Two-Hybrid*- und Co-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt, bei denen putative Parkin-Substrate identifiziert wurden. Zu den beschriebenen Substraten gehören:

- Proteine mit vesikulärer oder synaptischer Funktion [CDCrel-1a (Zhang et al., 2000); CDCrel-2a (Choi et al., 2003; Huynh et al., 2000); Synaptotagmin XI (Huynh, 2003); O-glykosyliertes α -Synuclein (Shimura et al., 2001), synphilin-1 (Chung et al., 2001), Dopamintransporter (Jiang et al., 2004a)]
- Kontrollproteine des Zellzyklus [Cyclin E (Staropoli et al., 2003)]
- Proteine der Proteinbiosynthese [Aminoacyl-tRNA Synthetase-Untereinheit p38/JTV-1 (Corti et al., 2003; Ko et al., 2005)]
- Transkriptionsfaktoren [FBP1 (Ko et al., 2006)]
- Proteine des Zytoskeletts [α/β -Tubulin (Ren et al., 2003)]
- Proteine des nukleären Exports [RanBP2 (Um et al., 2009)]
- Proteine der zellulären Signaltransduktion [Pael-R (Imai et al., 2001)].

Die pathophysiologische Relevanz und Authentizität dieser Substrate bleibt vorerst ungeklärt. In neuropathologischen Untersuchungen der Gehirne von Patienten mit Parkin-assoziiertes Parkinson-Erkrankung waren zwar leichte Akkumulation von nicht-ubiquitiniertem O-glykosyliertem α -Synuclein, Pael-R, Cyclin-E, CDCrel-1a und CDCrel-2a zu beobachten, aber nur für FBP1 und p38/JTV-1 konnte auch bei Parkin-Knockout-Mäusen eine mögliche Akkumulation nachgewiesen werden (Choi et al., 2003; Imai et al., 2001; Ko et al., 2006; Ko et al., 2005; Staropoli et al., 2003). Neuere Ergebnisse konnten zeigen, dass Parkin nicht nur mit proteasomaler Degradation in Verbindung gebracht wird, sondern auch davon unabhängige Ubiquitinierung vermittelt. So ist von dem

heterodimeren E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym UbcH13/Uev1a, das *in vitro* als Parkin-Interaktionspartner identifiziert wurde (Doss-Pepe et al., 2005; Matsuda et al., 2006), aus früheren Studien bekannt, dass es die Anheftung von Ubiquitin über Lysin-63 katalysiert (McKenna et al., 2001). Ein direkter Hinweis auf die Parkin-katalysierte Ubiquitinierung über Lysin-63 ergab sich aus der Untersuchung von Synphilin-1 (Lim et al., 2005). Weiterhin wurden Parkin-vermittelte Monoubiquitinierungen beobachtet. Während für PICK1 ein Zusammenhang mit neuronaler Exzitotoxizität hergestellt wurde (Fallon et al., 2002), konnte im Falle von Eps-15 eine verzögerte Internalisierung des EGF-Rezeptors und verstärkte PI3K/Akt-Signaltransduktion gezeigt werden, die das Überleben der Zellen reguliert (Fallon et al., 2006). Mehrfache Mono-Ubiquitinierungen wurden bei p38/JTV-1 und Hsp70 beobachtet (Hampe et al., 2006; Moore et al., 2005). Unter experimentellen Bedingungen kann Parkin somit alle Arten von Ubiquitinierung katalysieren. Es bleibt die Frage, ob diese Aktivität physiologisch relevant ist und welche regulierenden Mechanismen ihr zugrunde liegen.

1.2.4 Parkin besitzt neuroprotektives Potential

Parkin hat sich in vielen experimentellen Ansätzen als multifunktionelles neuroprotektives Protein erwiesen, das Zellen vor den unterschiedlichsten Arten von toxischem Stress bewahren kann. Parkin ist in der Lage vor Apoptose zu schützen, die induziert wird durch mitochondriale Toxine [MPTP (Hyun, 2005; Paterna, 2007), 6-Hydroxydopamin (Manfredsson et al., 2007; Vercaemmen et al., 2006), Rotenon (Casarejos et al., 2006; Rosen et al., 2006)], Kainat (Staropoli et al., 2003), ER-Stress (Imai et al., 2000; Takahashi et al., 2003), proteasomale Inhibierung (Muqit et al., 2004; Petrucelli et al., 2002), Ceramid (Darios et al., 2003b), Dopamin (Jiang et al., 2004b), Wasserstoffperoxid (Hyun et al., 2005) oder Mangan (Higashi et al., 2004). Es kann weiterhin Zelltod verhindern, der als Folge von Überexpression putativer Parkinsubstrate und anderer Proteine auftritt: Pael-R (Imai et al., 2001; Yang et al., 2003), p38/JTV-1 (Corti et al., 2003; Ko et al., 2006), α -Synuclein (Lo Bianco et al., 2004; Petrucelli et al., 2002; Yang et al., 2003), LRRK2 G2019S-Mutante (Ng et al., 2009), Tau-Mutante (Menendez et al., 2006), β -Amyloid (Burns et al., 2009; Rosen et al., 2006), Ataxin-2 (Huynh et al., 2007), verlängertes Polyglutamin-Ataxin-3-Fragment (Tsai et al., 2003). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Parkin eine wesentliche Rolle für die neuronale Integrität unter Stressbedingungen spielt. Der

Mechanismus, der dem neuroprotektiven Potential zugrunde liegt, ist eine zentrale Frage auf diesem Forschungsgebiet. Zwei Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Neuroprotektion und nicht-degradativer/regulierender Ubiquitinierung herstellen. Der nukleäre Faktor kappa B (NF- κ B) ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor und von zentraler Bedeutung für die Immunantwort, die Zellproliferation und den Zelltod (Baeuerle und Henkel, 1994; Barnes, 1997; Ghosh und Karin, 2002). Die Aktivierung der NF- κ B-Signaltransduktion ist essentiell für die neuroprotektive Aktivität von Parkin und wird durch die Ubiquitinierung von IKK γ und TRAF2 erreicht (Henn et al., 2007). Dadurch kommt es zur Aktivierung des I κ B α -Kinase-Komplexes (IKK), der die Inhibitoren von NF- κ B (I κ B α -Proteine) phosphoryliert und damit deren Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom einleitet. NF- κ B-Moleküle werden somit von ihren Inhibitoren freigesetzt und können aufgrund ihrer nun zugänglichen nukleären Signalsequenz in den Zellkern gelangen, wo sie die Transkription von Zielgenen bewirken. Weiterhin kann Parkin den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg beeinflussen, der zahlreiche Auswirkungen auf die Homöostase der Zelle hat und Proliferation, Stoffwechsel sowie Zelltod reguliert. Durch Parkin-vermittelte Ubiquitinierung von Eps15 kommt es zu verzögerter Internalisierung und verlangsamtem Abbau des EGF-Rezeptors (Fallon et al., 2006). Das führt in Parkin-defizienten Zellen zu verminderter Phosphorylierung von Akt und somit zu eingeschränkter PI3K/Akt-Signaltransduktion, die für den Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* verantwortlich gemacht wird. Die Identifizierung weiterer neuroprotektiver Signaltransduktionswege, die durch den funktionellen Verlust von Parkin betroffen sind, ist eine weitere Voraussetzung, um die Rolle von Parkin in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung aufzuklären. Die zentrale Bedeutung von Parkin für die Überlebensfähigkeit der Neurone spiegelt sich auch in der Regulation der Genexpression von Parkin. Unter Einfluss verschiedener Stressoren wird die Transkription hochreguliert. Dies konnte für ER-Stress (Imai et al., 2000; Koch et al., 2009; Ledesma et al., 2002; Oda et al., 2008; Wang et al., 2007a), mitochondrialen Stress [Rotenon (Koch et al., 2009); MPP⁺ (Hyun et al., 2005; Yang et al., 2006b)], Exzitotoxizität [Kainat (Henn et al., 2007)], oxidativen Stress [Wasserstoffperoxid (Tan et al., 2005)] und Dopamin (Yang et al., 2006a) gezeigt werden. Die Folgen von hochgradigem Stress, der zum Funktionsverlust von Parkin führt, konnten sowohl in Zellkultur als auch in Parkinson-Patienten beobachtet werden. Zur Inaktivierung von Parkin kann es durch massiven

oxidativen Stress kommen, der zur Missfaltung von Parkin führt (Winklhofer et al., 2003), oder durch Dopamin, das Parkin kovalent modifiziert. Letztgenannte Spezies wurde in der *Substantia nigra* sporadischer Parkinson-Patienten gefunden (LaVoie et al., 2005), was darauf hindeutet, dass reduzierte Aktivität von Parkin auch eine generelle Rolle in der Pathogenese der sporadischen Parkinson-Erkrankung spielt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass S-nitrosyliertes Parkin in den Gehirnen sporadischer Parkinson-Patienten gefunden wurde (Chung et al., 2004; Yao et al., 2004). Auch dieser Inaktivierung liegt eine Fehlfaltung von Parkin zugrunde, die durch Modifizierung von Cysteinen in der RING1-Domäne durch NO-Radikale bedingt wird.

1.3 Tiermodelle

Obwohl viele Untersuchungen zur Pathogenese der Parkinson-Erkrankung im Zellkulturmodell durchgeführt werden können und zahlreiche Erkenntnisse aus der *post mortem* Analyse von Gehirnen gewonnen werden, liefern Tiermodelle einen unschätzbaren Beitrag zur Erforschung dieser Erkrankung. Einblicke in den Verlauf und die Stadien können wichtige Erkenntnisse für die symptomatische Behandlung und neuroprotektive Ansätze liefern.

Ein ideales Tiermodell sollte die folgenden Charakteristika mitbringen (Beal, 2001)

1. eine anatomische Struktur dopaminergener Neurone, die selektiv und mit zunehmendem Alter degeneriert
2. neuropathologische und biochemische Detektierbarkeit des neuronalen Verlusts
3. motorischer Phänotyp, der die Kardinalsymptome einschließt

Aus den bisher verwendeten Tiermodellen konnte bisher keines alle Charakteristika der Erkrankung rekapitulieren.

1.3.1 Toxin-basierte Modelle

Mit Toxin-basierten Modellen versucht man, den selektiven Verlust dopaminergener Neurone nachzuahmen und, basierend auf der Annahme, dass dem dopaminergen Zelltod eine stereotype Kaskade zugrunde liegt, Ursachen zu finden und modulierend auf diese Prozesse einzuwirken.

Die am weitesten verbreitete Substanz, die experimentell verwendet wird, ist MPTP. Bei diesem Komplex I Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette handelt es sich um das

einziges Toxin, das eindeutig als Auslöser für eine Parkinson-Symptomatik identifiziert wurde (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983; Langston et al., 1999) und im Menschen alle Kardinalsymptome der Erkrankung hervorruft. Die Symptomatik konnte sowohl bei Menschen als auch im Affenmodell durch die Gabe von Levodopa verbessert werden. Eine weitere Parallele zur sporadischen Parkinson-Erkrankung stellt die mit dem Alter ansteigende Anfälligkeit gegenüber MPTP dar, die in Mäusen (Irwin et al., 1993), Seidenaffen (Rose et al., 1993) und Rhesusaffen (Ovadia et al., 1995) beobachtet werden konnte. Die neuropathologischen Befunde in Affen (Sirinathsinghji et al., 1992; Varastet et al., 1994) und Mäusen (Muthane et al., 1994; Seniuk et al., 1990) stimmten ebenfalls mit den aus humanen Gehirnen gewonnenen Erkenntnissen überein: größerer Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* als im ventralen tegmentalen Areal und innerhalb der *Substantia nigra* vornehmlich im ventralen und lateralen Bereich. Bei systemischer Applikation über intraperitoneale oder subkutane Injektion erwies sich MPTP im Ratten-Modell jedoch als unwirksam und auch die Wirksamkeit im Mausmodell war von der verwendeten Linie abhängig (Sedelis et al., 2000). Die intraventrikuläre Injektion von MPP⁺ führte im Rattenmodell zum progressiven, Dosis-abhängigen Verlust striataler dopaminerger Neurone und zur Schädigung von Mitochondrien in der *Substantia nigra* und wird deshalb als Modell für die Testung neuroprotektiver Ansätze diskutiert (Yazdani et al., 2006). Für Studien neuer Behandlungsansätze und Wirkstoffe gilt das Affen-Modell als Goldstandard.

In verschiedenen Fischarten konnte gezeigt werden, dass MPTP einen Phänotyp hervorruft, der den neuropathologischen Veränderungen der Parkinson-Erkrankung entspricht und durch eingeschränkte motorische Aktivität gekennzeichnet ist [Goldfisch (*Carassius auratus*) (Pollard et al., 1996), Reisfisch (*Oryzias latipes*) (Matsui et al., 2009)]. Bei adulten Zebrafischen traten Verhaltensveränderungen wie verminderte lokomotorische Aktivität auf (Bretaud et al., 2004), während Larven zusätzlich in ihrer Entwicklung beeinflusst wurden und ihre dopaminergen Neurone eine höhere Anfälligkeit gegenüber dem Toxin zeigten (Bretaud et al., 2004; Lam et al., 2005; McKinley et al., 2005; Sallinen et al., 2009). Nach intramuskulärer Injektion in adulte Zebrafische zeigte sich eine Verminderung des Dopamingehalts im Gehirn, jedoch keine Veränderung Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone bezüglich Verteilung, Morphologie oder Tyrosinhydroxylase-Gehalt (Anichtchik et al., 2004).

Als weiterer Inhibitor der Atmungskette wird Rotenon verwendet. Dabei handelt es sich um ein natürliches Insektizid, das aus der Tubawurzel (*Derris elliptica*) gewonnen werden kann. Durch seine hohe Lipophilie kann es problemlos biologische Membranen passieren (Talpade et al., 2000), wird von allen Organen aufgenommen und führt zur systemischen Inhibition von Komplex I (Schuler und Casida, 2001), indem es an gleicher Stelle bindet wie MPP⁺ (Dauer und Przedborski, 2003). In Ratten löste Rotenon nach chronischer Applikation selektive Degeneration nigrostriataler dopaminergener Neurone, Hypokinese und Steifheit aus und somit krankheitstypische biochemische und pathologische Veränderungen (Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003). Allerdings ist nicht bekannt, ob die Symptome auf Behandlung mit Levodopa ansprechen. In anderen Studien trat jedoch auch nicht-selektiver neuronaler Zelltod auf (Hoglinger et al., 2003). Im Gegensatz zur chronischen Applikation, die besonders den progressiven Verlauf der Erkrankung nachahmen soll, wurde bei akuter Intoxikation ein selektiver Schaden im *Striatum* und im Globus pallidus, nicht jedoch in der *Substantia nigra* festgestellt (Ferrante et al., 1997). Die Schädigung anderer Regionen und die hohe Variabilität, bedingt durch die Instabilität und kurze Halbwertszeit, limitieren den Einsatz von Rotenon (Meredith et al., 2008). In Mäusen löste die systemische Applikation von Rotenon zwar Verhaltensveränderungen aber keine neuropathologischen Schäden aus (Richter et al., 2007), während im Drosophila-Modell beide Aspekte beeinträchtigt waren. Fruchtfliegen, die über das Futter chronisch subletale Mengen an Rotenon aufnahmen, zeigten sowohl lokomotorische Ausfälle als auch selektiven Verlust dopaminergener Neurone (Coulom und Birman, 2004). Rotenon kommt nicht nur als Insektizid zum Einsatz, sondern findet in vielen Ländern Anwendung als Fischgift. Bereits 1964 konnte gezeigt werden, dass Rotenon die Atmungskette isolierter Mitochondrien aus den Gehirnen von Dorschen (*Gadus callarias*) inhibiert (Oberg, 1964). Subletale Dosen führten zu Einschränkungen des Schwimmverhaltens in Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) (Cheng und Farrell, 2007). Im Zebrafischmodell (*Danio rerio*) konnte in Abhängigkeit von der Konzentration ein degenerativer Phänotyp und eine Tendenz zur Reduktion dopaminergener Neurone in Larven festgestellt werden (Bretaud et al., 2004).

1.3.2 Gen-basierte Modelle für Parkin

1.3.2.1 Maus (*Mus musculus*)

Säugetier-Modelle wie die Maus haben aufgrund ihrer weitreichenden Homologie zum menschlichen Genom und der Ähnlichkeit in Bezug auf Anatomie, Zellbiologie und Physiologie eine herausragende Stellung unter den Krankheits-Modellen.

Parkin-Knockout-Mäuse wurden durch Deletion verschiedener Exons des murinen Parkin-Gens generiert: Exon 2, das der UBL-Domäne entspricht (Perez und Palmiter, 2005; Sato et al., 2006b), Exon 3, die häufigste Deletion bei Parkin-assoziiierter Parkinson-Erkrankung (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003; Palacino et al., 2004)) oder Exon 7, das der RING1-Domäne entspricht (von Coelln et al., 2004a). Alle Deletionen führen zum Verlust des Parkin-Proteins.

Ähnlich wie andere Mausmodelle, die auf dem Knockout von Parkinson-assoziierten Genen beruhen, zeigten die Parkin-defizienten Mäuse keinen signifikanten Phänotyp. Insbesondere die neuropathologischen Charakteristika der Erkrankung, wie der Verlust dopaminerger Neurone, konnten in keinem der Modelle nachgewiesen werden. Während in den Exon 2-Deletions-Mutanten kein Phänotyp sichtbar war und sie nicht von Wildtyp-Mäusen unterscheidbar waren (Perez und Palmiter, 2005), zeigten die anderen verschiedene und wenig stark ausgeprägte Phänotypen. Leichte Abnormalitäten in der dopaminergen Neurotransmission und im Dopamin-Metabolismus konnten ebenso beobachtet werden wie Verhaltensänderungen. Vermindert exploratives Verhalten wurde dabei mit Beeinträchtigung der nigrostriatalen Region erklärt, wobei keine Degeneration in diesem Bereich sichtbar war (Fleming et al., 2005; Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003; Kitada et al., 2009). Proteomische Analyse des ventralen Mittelhirns von Parkin-Knockout-Mäusen zeigte eine leichte Abnahme von Proteinen, die entweder eine mitochondriale Funktion (Komplex I bis IV der Atmungskette) oder eine protektive Funktion gegenüber oxidativem Stress innehaben (Palacino et al., 2004). Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch die Beobachtung, dass Parkin-Knockout-Mäuse anfälliger sind gegenüber Rotenon-induziertem Stress (Casarejos et al., 2006).

Auch die Parkin-/DJ-1/PINK1-Dreifach-Knockout-Maus zeigte keine Degeneration in der *Substantia nigra* (Kitada et al., 2009).

1.3.2.2 Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*)

Neben dem Maus-Modell wird in vielen Fällen die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) als Modellsystem zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen verwendet (Muqit und Feany, 2002). Im Gegensatz zum Maus-Modell führt der Verlust von Parkin in *Drosophila* zu einem sehr ausgeprägten Phänotyp: kürzere Lebenserwartung, Unfruchtbarkeit der männlichen Fliegen, abnormale Flügelhaltung und lokomotorische Defekte als Folge apoptotischer Flugmuskel-Degeneration (Cha et al., 2005; Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004). Auf subzellulärer Ebene konnten geschwollene Mitochondrien mit unregelmäßiger und aufgelöster Cristae-Struktur sowie Vakuolenbildung nachgewiesen werden (Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004).

Auffällig an diesen phänotypischen Veränderungen war die Ähnlichkeit zu PINK1-defizienten Fliegen. In Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass der PINK1-Knockout-Phänotyp durch Überexpression von Parkin kompensiert werden kann, die umgekehrte Kompensation jedoch nicht möglich ist (Clark et al., 2006; Park et al., 2006; Yang et al., 2006b). Dies führte zu der Annahme, dass Parkin unterhalb von PINK1 eine Rolle im selben Signaltransduktionsweg spielt. Es folgten Studien zum Einfluss von Parkin und PINK1 auf die mitochondriale Morphologie und Dynamik. Da dabei Überexpression von Drp1, das zur verstärkten Teilung der Mitochondrien führt, den mitochondrialen Phänotyp Parkin-defizienter Fliegen ausgleichen konnte, wurde gefolgert, dass dieser Signaltransduktionsweg die mitochondriale Teilung vorantreibt (Deng et al., 2008; Park et al., 2009a; Poole et al., 2008).

Die Analysen dopaminergener Neurone in Parkin-defizienten Fliegen lieferten bisher kontroverse Resultate und zeigten entweder keinen neuronalen Verlust (Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004), eingeschränkte Immunreaktivität dopaminergener Marker (Cha et al., 2005) oder Degeneration in einem spezifischen Cluster (Whitworth et al., 2005).

1.3.2.3 Zebrafisch (*Danio rerio*)

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) hat sich in den vergangenen Jahren zum leistungsfähigen Modellorganismus für Vertebratengenetik entwickelt und wird für die Erforschung von Entwicklungs- und Krankheitsprozessen eingesetzt (Beis und Stainier, 2006; Dodd et al., 2000). Seit den ersten Arbeiten in den späten 60er Jahren konnten tausende Mutationen, die in grundlegende Entwicklungsprozesse eingreifen, beschrieben werden (Lieschke und Currie, 2007). Insbesondere die Möglichkeit, den Beginn und Verlauf pathologischer Prozesse *in vivo* und in Echtzeit beobachten zu können, begründet den zunehmenden Einsatz des Zebrafisches als Wirbeltiermodell in der Grundlagenforschung humaner Erkrankungen. Dabei schlägt dieser Organismus eine Brücke zwischen der Invertebraten-Genetik und Vertebraten-spezifischer Fragestellungen.

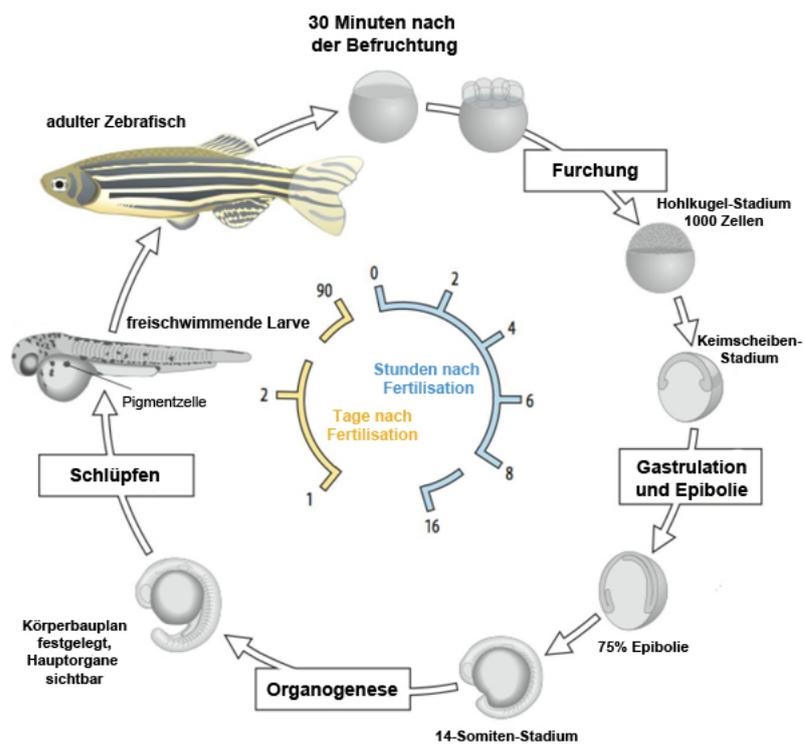


Abb. 14 Generationszyklus des Zebrafisches

Nach 24-stündiger Entwicklung sind alle wesentlichen Organe ausgebildet und nach wenigen Tagen zeichnen sich die Larven bereits durch komplexe Verhaltensweisen aus. Die Geschlechtsreife wird im Alter von circa drei Monaten erreicht. Abbildung modifiziert nach (Wolpert, 1999).

Adulte Zebrafische sind mit einer Größe von 3-4 cm auch in großer Anzahl problemlos in spezialisierten Anlagen zu halten und zeichnen sich durch einen geringen Platzbedarf und eine kurze Generationszeitzeit von circa drei Monaten aus. Ein Weibchen kann wöchentlich über 300 Nachkommen produzieren. Die geringe Körpergröße und die schnelle Entwicklung sowie die einfache genetische Manipulierbarkeit bieten viele Vorteile gegenüber anderen Modellorganismen. Die Gastrulation ist zehn Stunden nach Fertilisation abgeschlossen, der Herzschlag und die Blutzirkulation setzen bereits nach einem Tag ein. Nach 72 Stunden ist die Embryogenese abgeschlossen und die meisten inneren Organe wie Leber, Niere und Darm sind nach 96 Stunden voll entwickelt (Parg et al., 2002). Besonders die optische Transparenz der Embryonen und Larven und die außerhalb des Mutterkörpers stattfindende Befruchtung der Eier und Entwicklung der Embryonen ermöglichen Einblicke in frühe Entwicklungs- und Krankheitsprozesse sowie deren Visualisierung *in vivo*. Im Vergleich zu Invertebraten, zu denen die Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* zählen, sind Entwicklung und Morphologie der Organe dem Menschen ähnlicher und krankheitsrelevante Gene besser konserviert. Im Zebrafisch wird das Nervensystem innerhalb von 24 Stunden ausgebildet und kann bereits nach wenigen Tagen komplexe Verhaltensweisen wie Schwimmbewegungen, Flucht und Nahrungsaufnahme koordinieren. Weiterhin ermöglicht dieser Modellorganismus groß angelegte chemische *Screens*, bei denen unter Verbrauch kleiner Mengen Substanzen identifiziert und auf ihre potentielle Eignung als zukünftige Arzneimittel getestet werden können (Peterson et al., 2004; Stern et al., 2005). Ebenso werden vermehrt Zebrafische eingesetzt, um Vorhersagen zu toxischen Nebenwirkungen und Arzneimittelsicherheit zu machen (McGrath und Li, 2008). Die Aufnahme zu testender Substanzen erfolgt aus dem umgebenden Medium über die Haut und die Kiemen und ab 72 Stunden nach Fertilisation auch peroral. Da Zebrafischembryonen bis Tag 5 nach Fertilisation keine funktionelle Blut-Hirn-Schranke besitzen (Flinn et al., 2008) können wasserlösliche Substanzen problemlos bis ins zentrale Nervensystem gelangen. Dieser Umstand ermöglicht nicht nur die *in vivo* Suche nach neuroprotektiven Substanzen, sondern auch die Generierung neurotoxischer Modellsysteme.

1.3.2.3.1 Transgene Zebrafische

Die Entwicklung transgener Zebrafische, die menschliche Gene überexprimieren und somit als Krankheitsmodelle fungieren, wurde in den letzten Jahren vorangetrieben. Voraussetzung dafür ist eine gentechnische Methode, die eine einfache und effiziente Herstellung transgener Zebrafische gewährleistet, die ausreichende Mengen des krankheitsassoziierten Proteins exprimieren. Hierfür erwies sich das von Dominik Paquet entwickelte System, das auf Gal4/UAS-basierter bidirektionaler Expression beruht, als wegweisend für zukünftige transgene Modelle (Paquet et al., 2009). Das Gal4/UAS-System wird seit vielen Jahren zur Erzeugung transgener *Drosophila*-Modelle verwendet (Duffy, 2002; Muqit und Feany, 2002). Dabei macht man sich den aus der Hefe isolierten transkriptionellen Aktivator Gal4 zu Nutze, um die Effizienz der Proteinexpression zu steigern. Durch Fusion von Gal4 mit dem VP16-Transkriptionsaktivator des Herpes simplex Virus 1 (Sadowski et al., 1988) wird die Expression noch weiter verstärkt. Diese kann entweder ubiquitär oder gezielt Zelltyp-spezifisch sein und wird durch Verwendung des Promotors gesteuert, der vor die Gal4-VP16-Sequenz kloniert wird. Dieses sogenannte Treiber-Konstrukt führt demnach zur Gewebe-spezifischen Expression des Gal4-VP16-Fusionsproteins, das durch Bindung an die Expressionsaktivatorsequenz UAS (*upstream activating sequence*) des sogenannten Responder-Konstrukts die Expression von Genen, die neben der bidirektionalen UAS-Sequenz liegen, aktiviert (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Um die beiden Transgene effizient in das Zebrafischgenom einzubauen, werden sie mit Tol2-Sequenzen flankiert und mit Tol2-Transposase-mRNA in Zebrafischeier injiziert. Die Transposase erkennt die Tol2-Sequenzen und dies führt bei circa jedem dritten bis fünftem Ei zum Einbau der DNA an einer oder mehreren zufälligen Stellen im Genom (Kawakami, 2005). Da die injizierte Transposase mRNA in Fischeiern nach kurzer Zeit abgebaut wird und dieses mobile genetische Element (Transposon), das aus dem Medaka-Fisch stammt, in Wildtyp-Zebrafischen nicht vorkommt, wird eine stabile Integration des Transgens erreicht.

1.3.2.3.2 Knockdown/Knockout der Genfunktion in Zebrafischen

Um den Einfluss von einzelnen Genen im Zebrafisch zu untersuchen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Genfunktion zu regulieren.

Ein transienter Knockdown wird durch sogenannte *Antisense*-Methoden erzielt. *Antisense*-Oligonukleotide werden mit Hilfe einer dünnen Glaskapillare in Zebrafischeier injiziert. Da die Zellen zwischen dem 1- und 8-Zellstadium permeabel sind, können sich die *Antisense*-Konstrukte nach Injektion in den Dotter durch Diffusion ubiquitär verteilen (Bill et al., 2009).

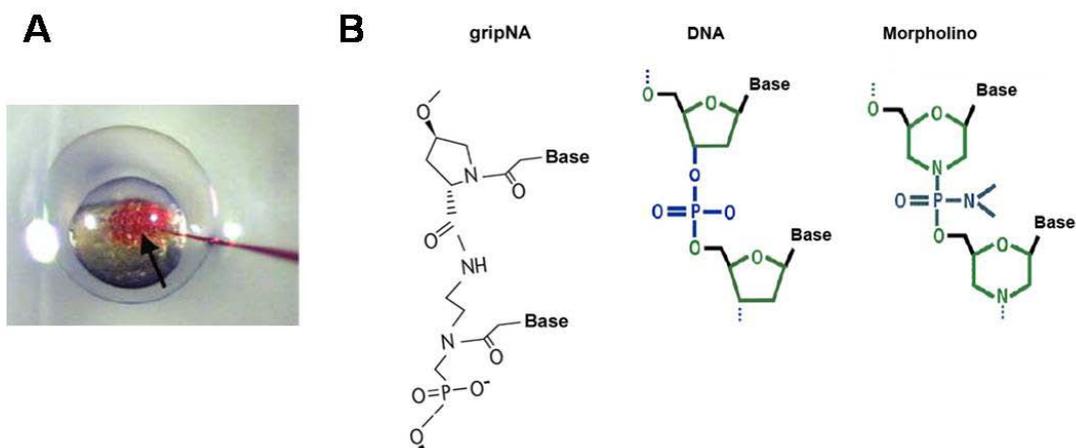


Abb. 15 Transienter Knockdown der Genfunktion im Zebrafisch

(A) Die von rechts kommende Injektionsnadel durchsticht das Chorion und gibt die Phenolrot-markierte Substanz in den Dotter ab. Abbildung aus (Bill et al., 2009). (B) Aufbau verschiedener *Antisense*-Oligonukleotide im Vergleich zu DNA. Modifiziert nach www.zebrafish.uni-konstanz.de/morpholino.pdf und www.activemotif.com/documents/34.pdf

Gemäß dem Prinzip der Watson-Crick-Basenpaarung können *Antisense*-Oligonukleotide stabile Duplexe mit komplementärer DNA oder prä-mRNA ausbilden, die die Translation beziehungsweise den Spleißvorgang inhibieren und somit die Synthese des Zielproteins verhindern.

Zu diesem Zweck kommen gripNAs™ (Active motif) und Morpholinos (Gene Tools) zum Einsatz. Bei gripNAs™ handelt es sich um synthetische Oligopeptid Nukleinsäuren (PNAs), die im Vergleich zu Oligonukleotiden nukleaseresistent sind. Bei PNAs ist das Nukleosid mit einem N-(2-Aminoethyl)-Glyzin-Rückgrat anstatt mit Ribose beziehungsweise Desoxyribose verbunden. Um die Wasserlöslichkeit und die Aufnahme in die Zelle zu

verbessern, wird ein Rückgrat aus N-(2-Aminoethyl)-Glyzin abwechselnd mit N-(2-Aminoethyl)-Phosphono-Glyzin verwendet (Efimov et al., 1999; Efimov et al., 1998). Die Spezifität dieser gripNAs™ ist derart hoch, dass bereits zwei nicht übereinstimmende Basen die Bildung eines stabilen gripNA™/RNA Duplexes verhindern.

Der Mechanismus von Morpholinos beruht auf dem gleichen Prinzip, wobei hier der Ribose- beziehungsweise Desoxyribose-Ring durch einen Morpholin-Ring ausgetauscht wird und Phosphorodiamidat-Verknüpfungen die anionische Phosphodiester-Verknüpfung ersetzen (Nasevicius und Ekker, 2000; Summerton und Weller, 1997).

Da sich die effektive Konzentration der injizierten Substanzen (gripNA™ beziehungsweise Morpholino) mit dem Wachstum des Embryonen nach jeder Zellteilung verdünnt und sich der inhibitorische Effekt nach einigen Tagen aufhebt, spricht man bei diesen Methoden von einem transienten Knockdown.

Um die zeitliche Begrenzung zu umgehen und einen stabilen Knockout zu erzielen, der bis zur adulten Phase Bestand hat, wurde in letzter Zeit die Forschung auf dem Gebiet der Zinkfinger-Nukleasen forciert. Eine Zinkfinger-Nuklease besteht aus dem inaktiven Monomer des DNA-schneidenden Enzyms Fok1, das an eine Kette von Zinkfinger-Motiven gebunden ist. Dabei handelt es sich um drei oder vier aneinander gekoppelte Proteindomänen, die jeweils an eine Erkennungssequenz von drei Nukleotiden der DNA binden und somit hochspezifisch sind. Durch den Einsatz von zwei Zinkfinger-Nukleasen wird die Spezifität derart erhöht, dass die Bindestelle beider Nukleasen im Genom einmalig ist. Dadurch können sich die beiden Fok1-Monomere zum aktiven Dimer verbinden und die DNA schneiden. Die durch den Doppelstrangbruch entstehenden, kurzen einzelsträngigen Überhänge werden durch nicht-homologes *Endjoining* repariert, was zur Mutagenese durch Verlust von Nukleotiden und anschließenden Fehlern im Leseraster führen kann und letztendlich die Inaktivierung des Zielgens bedingt (Bibikova et al., 2002; Doyon et al., 2008; Meng et al., 2008; Santiago et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass 30% bis 50% der injizierten Fische die induzierten Mutationen an ihre Nachkommen vererben (Doyon et al., 2008; Meng et al., 2008).

Eine weitere Möglichkeit, um im Zebrafisch einen stabilen Knockout zu erzeugen, bietet die TILLING-Methode (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) (McCallum et al., 2000). Dabei werden aus einer Anzahl mutagenisierter Fische solche gesucht, die Mutationen in einem gewünschten Gen besitzen. Punktmutationen werden erzeugt,

indem adulte männliche Fische mit Ethylnitrose-Harnstoff (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) behandelt werden. Nach Auskreuzung mit Wildtyp-Weibchen wird die genomische DNA der F1-Generation einer genspezifischen PCR unterzogen. Durch Aufschmelzung und Renaturierung der PCR-Fragmente kommt es im Falle einer heterozygoten Punktmutation zur Bildung eines Doppelstrangs, der sich aus dem Wildtyp- und dem mutierten Allel zusammensetzt. Der Verdau mit dem Restriktionsenzym Cel-1, das unspezifisch Fehlpaarungen erkennt, führt zu Spaltprodukten abweichender Größe, die auf eine vorliegende Mutation hinweisen. Die erzeugte Punktmutation kann anschließend durch Sequenzierung identifiziert werden (Wienholds et al., 2003). Bei diesem Verfahren werden zwar stabile Knockout-Zebrafische generiert, doch die Mutationen sind im Gegensatz zum Zinkfinger-Nuklease-Verfahren zufällig und somit nicht beeinflussbar. Weiterhin erfordert dieser Ansatz die Analyse großer ENU-mutagenisierter Fischbestände und übersteigt die Möglichkeiten eines normalen Routinelabors.

1.3.2.3.3 Das dopaminerge System im Zebrafisch

Das Zebrafisch-Gehirn ist anatomisch aufgeteilt in ein Vorder-, Mittel- und Hinterhirn und enthält das Diencephalon, das Telencephalon mit lediglich rudimentärem *Cortex* und das *Cerebellum* (Lieschke und Currie, 2007). Dopaminerge Zellen lassen sich über das Vorliegen von Tyrosinhydroxylase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Dopamin-Synthese, identifizieren und konnten im *Bulbus olfactorius*, im ventralen *Telencephalon* (*Subpallium*) sowie im *Diencephalon* nachgewiesen werden, während mesencephalische dopaminerge Neurone fehlen (Filippi et al., 2010; Rink und Wullimann, 2001). Versuche mit Neurotoxinen deuteten jedoch darauf hin, dass ein zum humanen nigrostriatalen System homologes und funktionelles dopaminerges System im Zebrafisch vorliegt. Dabei repräsentiert das *Subpallium* des *Telencephalons* das menschliche *Striatum*, das von aufsteigenden dopaminergen Neuronen des hinteren Tuberkulums des ventralen *Diencephalons* innerviert wird (Rink und Wullimann, 2001, 2002a).

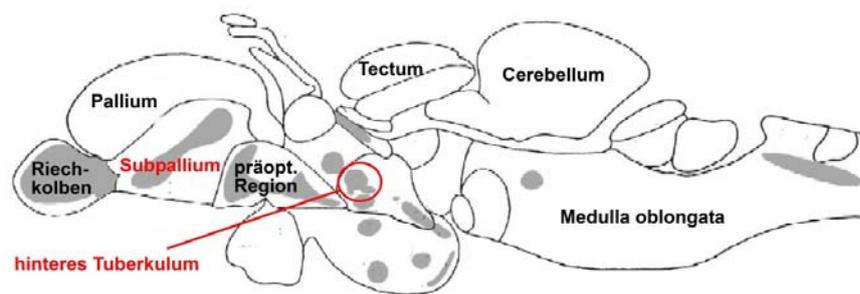


Abb. 16 Schematische laterale Ansicht eines adulten Zebrafischgehirns

Tyrosinhydroxylase-enthaltende Zellgruppen sind grau unterlegt abgebildet. Rot markiert ist das diencephalische dopaminerge System, das als Äquivalent des humanen mesencephalischen dopaminergen System diskutiert wird. Abbildung modifiziert nach (Rink und Wullimann, 2002b).

Die ersten 1-3 Neurone dieses Clusters können frühestens 18 bis 19 Stunden nach Fertilisation detektiert werden, während drei Tage nach Fertilisation (*days post fertilization*, dpf) 20-30 Zellen nachweisbar sind (Holzschuh et al., 2001) und die räumliche Verteilung abgeschlossen ist (Lam et al., 2005). Die Expression der Tyrosinhydroxylase beginnt in anderen Hirnbereichen wie folgt: im *Locus coeruleus* 24 Stunden nach Fertilisation (*hours post fertilization*, hpf), in der *Medulla oblongata* 36 hpf, im *Bulbus olfactorius* 48 hpf, im *Pretectum* 60 hpf, und in der *Retina* 60 hpf. Nach 5 dpf sind die meisten Cluster vorhanden, die später im adulten Gehirn vorliegen (McKinley et al.,

2005). Zwölf verschiedene Zellpopulationen wurden für das adulte Diencephalon beschrieben. Davon sind fünf bereits nach 2 dpf detektierbar und weitere drei nach 5 dpf (Rink und Wullimann, 2002b). Es gibt jedoch auch Publikationen, die bereits 3 dpf alle adulten Zellpopulationen zeigen (Sallinen et al., 2009). Jede Population besteht aus einer von drei möglichen Zelltypen: kleine runde Neurone, große birnenförmige Neurone mit verzweigten Neuriten oder bipolare Neurone, die mit Liquor in Kontakt stehen und zwei Neuriten ausbilden. Von den drei Populationen, die das hintere Tuberkulum bilden (das dopaminerge System, das zum Subpallium projiziert) und bereits nach 2 dpf nachweisbar sind, besteht ein Cluster aus kleinen runden Neuronen und eins aus großen birnenförmigen. Diese Zellen gehören zu den frühesten nachweisbaren dopaminergen Neuronen des Diencephalons (Rink und Wullimann, 2002b). Es gibt keinen Hinweis auf Migrationsprozesse Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone: die Position und Morphologie zum Zeitpunkt der frühesten Detektion stimmt mit den Ergebnissen im adulten Zebrafischgehirn überein (Sallinen et al., 2009).

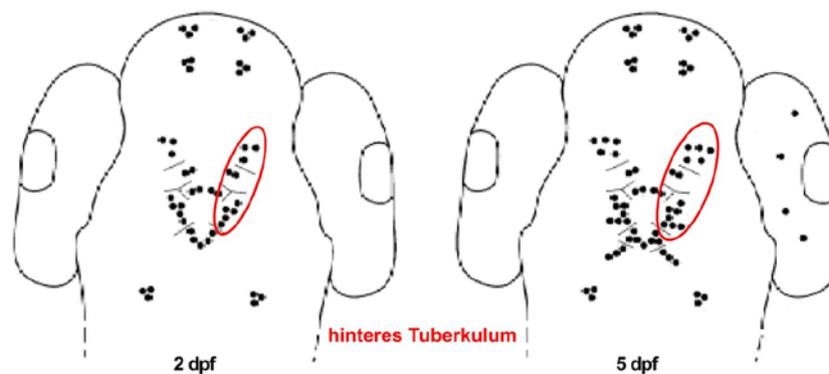


Abb. 17 Schematische dorsale Ansicht Tyrosinhydroxylase-immunreaktiver Zellgruppen in zwei und fünf Tage alten Zebrafischen

Verschiedene diencephalische Zellpopulationen sind mit Strichen voneinander abgegrenzt. Abbildung modifiziert nach (Rink und Wullimann, 2002b).

Die neuesten Entwicklungen aus den Jahren 2009 und 2010 konzentrieren sich auf das Vorliegen zweier paraloger Gene, die für Tyrosinhydroxylase codieren (Candy und Collet, 2005; Chen et al., 2009b; Filippi et al., 2010; Yamamoto et al., 2010). Im Kugelfisch (*Takifugu rubripes*) und Barramundi (*Lates calcarifer*) wurden zuvor ebenfalls zwei nicht-allelische Gene identifiziert, die für Tyrosinhydroxylase codieren (Candy und Collet, 2005). Sie resultieren vermutlich aus einer frühen entwicklungsgeschichtlichen Duplikation des

gesamten Genoms und anschließendem Verlust eines Gens in höheren Säugetieren (Yamamoto et al., 2010). Die Sequenzen des Tyrosinhydroxylase 1-Gens (*th1*) und Tyrosinhydroxylase 2-Gens (*th2*) sind zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert - ebenso wie die Ähnlichkeit zwischen *th1* und *th2* (Yamamoto et al., 2010). Expressionstudien in adulten Zebrafischen zeigten, dass in Gehirn und Augen *th1*-mRNA mengenmäßig *th2*-mRNA übersteigt, während *th2*-mRNA vermehrt peripher vorkommt und in Leber, Niere, Herz und Kiemen die *th1*-mRNA-Menge übertrifft. Beide Transkripte konnten bereits nach 12 h nachgewiesen werden, wobei ab 2 dpf mehr *th1*-mRNA als *th2*-mRNA vorliegt. Im Entwicklungsstadium konnte *th1*-mRNA 1 dpf im Gehirn detektiert werden, allerdings nur wenige *th2*-mRNA-exprimierende Zellen. Während *th1* im *Telencephalon*, *Diencephalon*, *Bulbus olfactorius*, *Locus coeruleus* und Kaudallappen vorkommt, ist *th2*-mRNA-Expression nur für die präoptische und hypothalamische Region belegt. Ein Teil der Zellen der präoptischen Region und des hinteren Teils des paraventriculären Bereichs deuten auf die Expression beider Transkripte (Chen et al., 2009b; Filippi et al., 2010). Interessanterweise wird im hinteren Tuberkulum des *Diencephalons* jedoch nur *th1*-mRNA exprimiert (Chen et al., 2009b; Filippi et al., 2010; Yamamoto et al., 2010).

2 ERGEBNISSE

2.1 Teil 1: Biochemische Charakterisierung eines Parkin-Orthologs aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*)

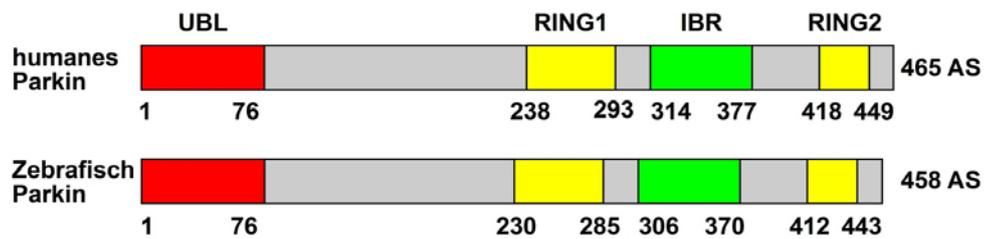
Mutationen im Parkin-Gen führen zu einem Funktionsverlust von Parkin und liegen einer autosomal-rezessiv vererbaren Form der Parkinson-Erkrankung zugrunde. Auf der Suche nach Ursachen für diesen Funktionsverlust fand man heraus, dass das Parkin-Protein anfällig ist für Aggregation. Missgefaltete Konformationen verbunden mit verminderter Löslichkeit wurden nicht nur für C-terminale Deletionsmutanten (Winklhofer et al., 2003) und Punktmutanten (Cookson et al., 2003; Gu et al., 2003) gezeigt, sondern auch für Wildtyp-Parkin, das massivem Stress ausgesetzt wurde (LaVoie et al., 2005; Wang et al., 2005; Winklhofer et al., 2003). Neben oxidativem Stress, dem eine Schlüsselfunktion bei der Degeneration dopaminergischer Neurone zugesprochen wird, wird vermutet, dass auch Dopamin selbst eine Rolle in der Entstehung der Parkinson-Erkrankung spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Parkin durch ein Oxidationsprodukt von Dopamin kovalent modifiziert und dadurch inaktiviert wird (LaVoie et al., 2005). Diese Spezies wurde sowohl in Dopamin-behandelten Parkin-überexprimierenden Zellen als auch in Gehirnen von Patienten nachgewiesen. Erste Hinweise auf die Funktion von Parkin lieferten Analysen zur transkriptionellen Regulation. So konnte gezeigt werden, dass die Transkription von endogenem Parkin durch Substanzen, die mitochondriale Dysfunktion, ER-Stress oder Exzitotoxizität auslösen, induziert werden kann (Henn et al., 2007; Wang et al., 2007b)(Bouman et al., *in revision*). Da zellulärer Stress eine Ursache für Zelltod ist, wurde Parkin hinsichtlich seines neuroprotektiven Potentials in verschiedenen Zellkultur-Systemen und Tiermodellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Überexpression von Parkin vor Apoptose schützte, die durch unterschiedliche Stressoren wie mitochondriale Toxine (Casarejos et al., 2006; Hyun et al., 2005; Manfredsson et al., 2007; Paterna et al., 2007; Rosen et al., 2006; Vercaemmen et al., 2006) oder Kainat-induzierte Exzitotoxizität (Staropoli et al., 2003) ausgelöst wurde. Ausgehend von diesen Fakten stellte sich die Frage, ob Parkin in anderen Spezies – in dieser Arbeit am Beispiel Zebrafisch untersucht - ähnliche biochemische und funktionelle Eigenschaften besitzt.

2.1.1 Identifizierung eines Parkin-Orthologs im Zebrafisch

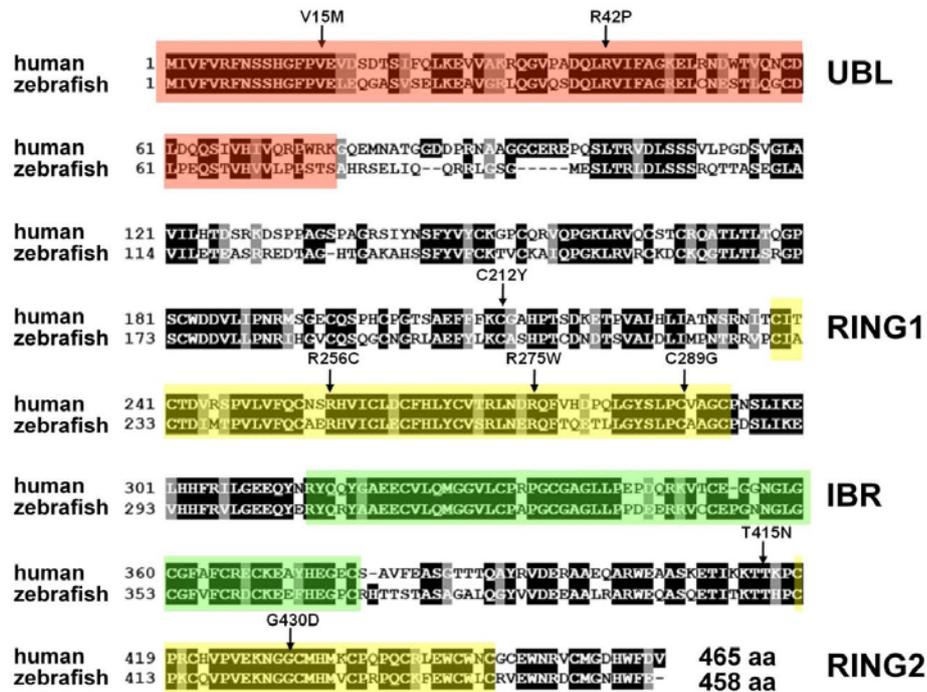
Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage, ob es im Zebrafisch ein oder eventuell mehrere Orthologe von humanem Parkin gibt. Die humane Proteinsequenz (NP_054642) wurde mit dem BLAST-Algorithmus gegen die Zebrafisch Genomdatenbank ENSEMBL abgeglichen. Dabei wurde ein Ortholog im Zebrafisch identifiziert (ENSDARG00000021555, zgc112390). Dieses ist auf Chromosom 13 lokalisiert und besteht ebenso wie humanes Parkin aus 12 Exons. Mit einer Länge von 458 Aminosäuren ist Zebrafisch-Parkin um sieben Aminosäuren kürzer als humanes Parkin (Abb. 18). Um den Grad der Konservierung zwischen humanem Parkin und dem Zebrafisch-Ortholog zu ermitteln, wurden die Proteinsequenzen mit Hilfe des Programms Boxshade verglichen, das gleiche und ähnliche Aminosäuren anzeigt. 61,7% der Aminosäuren von Parkin sind zwischen Fisch und Mensch konserviert, wobei sich dieser Prozentsatz auf 71,9% erhöht, wenn auch ähnliche Aminosäuren einbezogen werden. Bei gesonderter Betrachtung der funktionellen Domänen wird deutlich, dass hier die Konservierung höher ist im Vergleich zum Gesamtprotein. Im Falle der RING2-Domäne beträgt die Ähnlichkeit nahezu 90% (Abb. 18). Ebenfalls konserviert sind solche Aminosäuren, bei denen Punktmutationen in Parkinson-Patienten gefunden wurden. In humanem Parkin steht an Position 80 die Aminosäure Methionin, die als alternative Translationsstartseite zu einer verkürzten Parkin-Variante führt (Henn et al., 2005). Dieses trunkierte Protein, dem die Ubiquitin-ähnliche Domäne fehlt, konnte auch im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden (Schlossmacher et al., 2002). Im Zebrafisch ist diese Position nicht konserviert. Anstelle von Methionin findet man Serin. Aus dem cDNA Archiv des deutschen Zentrums für Genomforschung (RZPD) wurde ein Klon bezogen, der die codierende Sequenz von Zebrafisch-Parkin enthält. Nach Verifizierung der Sequenz wurde diese in den pCMV Tag 2B Vektor subkloniert. In diesem Vektor befindet sich die *multiple cloning site* C-terminal zu einer Sequenz, die für ein FLAG-Epitop codiert. Aufgrund dessen kann Zebrafisch-Parkin mit einer N-terminalen FLAG-Sequenz exprimiert werden (FLAG-zf-Parkin), die wiederum von anti-FLAG-Antikörpern erkannt wird und somit eine Detektion unabhängig von anti-Parkin-Antikörpern ermöglicht. Obwohl die Parkin-Sequenz wie erläutert hochkonserviert ist, steht zurzeit kein Antikörper zur Verfügung, der Zebrafisch-Parkin erkennt. Alle

getesteten humanen anti-Parkin-Antikörper zeigten bei Anwendung im Western Blot nur schwache oder keinerlei Kreuzreaktivität mit Zebrafisch-Parkin. Nach Überexpression in humanen HEK293 Zellen konnte lediglich mit einem getesteten Antikörper (Cell Signaling #4230) eine schwache Bande detektiert werden, während endogenes Parkin in Lysaten von Zebrafischembryonen auf Western Blot auch unter vorausgehender Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern nicht detektierbar war.

A



B



C

	funktionelle Domänen				
	gesamt	UBL	RING1	IBR	RING2
Ähnlichkeit [%]	71,9	73,7	85,5	84,1	87,1
Gleichheit [%]	61,7	61,8	74,5	76,2	80,6

Abb. 18 Das zu humanem Parkin orthologe Zebrafisch-Parkin ist hoch konserviert. **(A)** Modulare Struktur von humanem und Zebrafisch-Parkin (UBL: ubiquitin-like domain, RING: really interesting new gene, IBR: in-between RING, RBR: RING between RING fingers; AS: Aminosäuren). **(B)** Vergleich der Aminosäuresequenz von humanem und Zebrafisch-Parkin. Gleiche Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau unterlegt. Die Positionen humaner pathogener Punktmutationen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **(C)** Vergleich der Sequenz-Ähnlichkeit beziehungsweise –Gleichheit der funktionellen Domänen.

2.1.2 Zebrafisch-Parkin ist anfällig für Fehlfaltung unter Stress

Ausgehend von der Tatsache, dass humanes Parkin durch Missfaltung und Aggregation inaktiviert wird, stellte sich die Frage, ob sich Zebrafisch-Parkin unter Einfluss von oxidativem Stress oder Dopamin ähnlich verhält. Um das Löslichkeitsverhalten von Zebrafisch-Parkin zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastomzellen) transient mit FLAG-zf-Parkin transfiziert und 24 Stunden später für 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid behandelt. Die Zellen wurden in 0,1% Triton X-100 lysiert und durch Zentrifugation in eine Detergenz-lösliche (Überstand, Ü) und Detergenz-unlösliche (Pellet, P) Fraktion aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert. Während zf-Parkin, das aus unbehandelten Zellen stammte, ausschließlich in der Detergenz-löslichen Fraktion vorlag, fand man es bei den H₂O₂-gestressten Zellen in der Detergenz-unlöslichen Fraktion (Abb. 19 A). Es ist deutlich erkennbar, dass diese Verschiebung zur Unlöslichkeit konzentrationsabhängig ist: je höher der oxidative Stress, umso geringer die Menge an löslichem Parkin und umso größer die Menge an unlöslichem, aggregiertem Parkin.

Analog wurde der Einfluss von Dopamin auf die Konformation von zf-Parkin untersucht. Hierzu wurden SH-SY5Y-Zellen transient mit FLAG-zf-Parkin transfiziert und 24 Stunden später mit verschiedenen Konzentrationen von Dopamin über einen Zeitraum von fünf Stunden behandelt. Nach Ernte der Zellen schloss sich oben genannter Solubilitätsassay an. Die Western Blot Analyse zeigte, dass der Anteil von Parkin in der Detergenz-löslichen Fraktion mit steigenden Konzentrationen von Dopamin sinkt (Abb. 19 B). Bei der verwendeten Höchstkonzentration von 2 mM war kein lösliches Parkin mehr erkennbar. Gleichzeitig nahm der Anteil in der Detergenz-unlöslichen Fraktion zu. Besonders im oberen Bereich des SDS-Gels, in dem sich höhermolekulare Komplexe wiederfinden, trat eine Bande mit zunehmender Dopamin-Konzentration verstärkt hervor, die in der unbehandelten Probe nicht sichtbar war. Um die Aggregation von zf-Parkin unter Einfluss von Dopamin weiter zu veranschaulichen, wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. 24 Stunden nach transients Transfektion wurden SH-SY5Y-Zellen für fünf Stunden mit Dopamin (5 mM) behandelt. Nach Fixierung wurden die Zellen über Nacht mit monoklonalem anti-FLAG-Antikörper FLAG M2 (F3165) inkubiert. Durch Verwendung eines Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpers konnte die Lokalisierung und Verteilung

von FLAG-zf-Parkin anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Dabei wurde deutlich, dass sich zf-Parkin in unbehandelten Zellen relativ homogen über das gesamte Zytosol verteilte, während Dopamin-Behandlung zur Bildung zytosolischer Aggregate verschiedener Größe führte (Abb. 19 C).

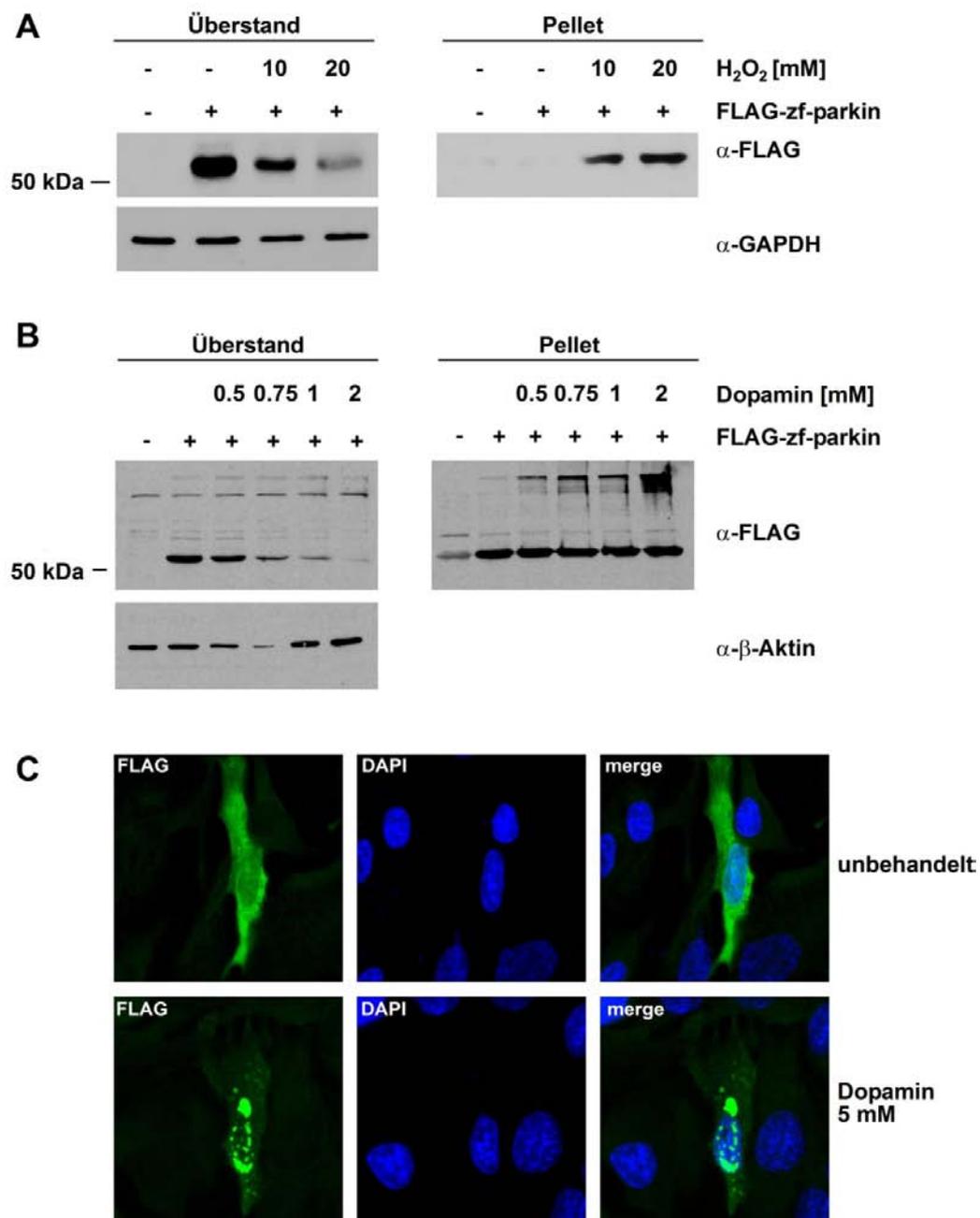


Abb. 19 Zebrafisch-Parkin ist unter hohem zellulären Stress anfällig für Missfaltung und Aggregation.

(A) SH-SY5Y Zellen wurden transient mit FLAG-zf-Parkin transfiziert, einen Tag nach Transfektion mit Wasserstoffperoxid (10 beziehungsweise 20 mM, 30 Minuten) behandelt und nach Zellernte einem Solubilitätsassay unterzogen. Nach Lyse in 0,1% Triton X-100 erfolgte die Auftrennung in eine Detergenzlösliche (Überstand) und -unlösliche (Pellet) Fraktion durch Zentrifugation und die anschließende Analyse mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers F3165. GAPDH, das nur in der löslichen Fraktion vorliegt, wurde als Ladekontrolle verwendet. (B) Behandlung der FLAG-zf-Parkin-transfizierten SH-SY5Y Zellen mit Dopamin (0,5; 0,75; 1 beziehungsweise 2 mM; 5 Stunden). Beim anschließenden Solubilitätsassay (siehe A) wurde β-Aktin als Ladekontrolle verwendet. (C) SH-SY5Y Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, transient mit FLAG-zf-Parkin transfiziert und wie beschrieben mit Dopamin (5 mM, 5 Stunden) behandelt. Die intrazelluläre Verteilung von Zebrafisch-Parkin wurde mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung des monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers F3165 analysiert (grün). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau).

2.1.3 Die Transkription von Zebrafisch-Parkin ist durch Stress induzierbar

Nachdem eine frühere Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt hatte, dass die Transkription von endogenem humanem Parkin durch verschiedene Stressoren induziert werden kann, stellte sich die Frage, ob die zelluläre Stressantwort im Zebrafisch ähnlich ist. Um einen möglichen Einfluss auf die Transkription von Zebrafisch-Parkin zu untersuchen, wurden Zebrafisch Pac2-Zellen mit Rotenon, einem Hemmstoff von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette, gestresst. Auf die einstündige Behandlung folgte eine sechsstündige Inkubation in Medium. Anschließend wurde der Anteil von zf-Parkin-spezifischer mRNA mittels semi-quantitativer *real time* PCR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Transkription von zf-Parkin durch Rotenon induziert werden kann, da sich die mRNA-Menge durch diese Behandlung mehr als verdoppelte (Abb. 20).

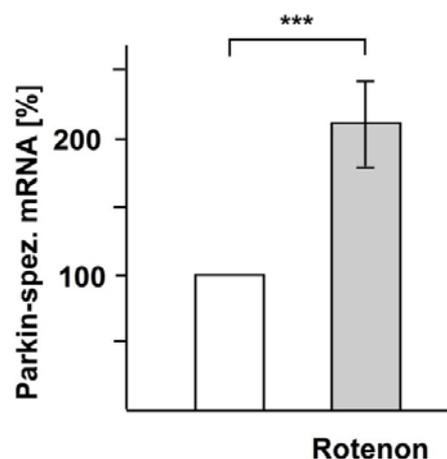


Abb. 20 Endogenes Zebrafisch Parkin wird durch mitochondrialen Stress hochreguliert

Pac2 Zellen wurden mit Rotenon inkubiert (10 nm, 1 Stunde) und sechs Stunden nach der Behandlung geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels semi-quantitativer *real time* PCR unter Verwendung Zebrafisch Parkin-spezifischer Primer analysiert. Die RNA-Mengen wurden mit Hilfe des endogenen Kontrollgens β -Aktin normalisiert. Abgebildet ist der prozentuale Anteil Parkin-spezifischer mRNA in Rotenon-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Quantifizierung beruht auf fünf unabhängigen Experimenten, ***, $p \leq 0,001$.

2.1.4 Zebrafisch-Parkin ist neuroprotektiv

Da das neuroprotektive Potential von humanem Parkin in Gegenwart unterschiedlicher Stressoren bislang in verschiedenen Zellkultur-Systemen und Tiermodellen gezeigt werden konnte, wurde die Funktion von Zebrafisch-Parkin beim Stress-induzierten Zelltod untersucht.

Ein Zelltod-Assay basierend auf indirekter Immunfluoreszenz wurde durchgeführt, indem SH-SY5Y-Zellen transient mit humanem FLAG-Parkin (FLAG-hu-Parkin), FLAG-zf-Parkin oder FLAG-Vektor transfiziert wurden. Um transfizierte Zellen von untransfizierten unterscheiden zu können, wurde EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) cotransfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde die Hälfte der Transfektionsansätze für drei Stunden mit dem Exzitotoxin Kainat (1 mM) behandelt, das durch Überstimulation ionotroper Glutamatrezeptoren Apoptose auslösen kann. Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurde ein spezifischer Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 verwendet. Die mikroskopische Auszählung der transfizierten (EYFP-positiven) Zellen zeigte, dass Zebrafisch-Parkin ebenso wie humanes Parkin neuroprotektiv wirkt. Der Anteil apoptotischer Zellen in der Vektor-transfizierten Kontrolle stieg unter Stressbehandlung deutlich von 15% auf 25% an. Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation in Kainat nahezu keinen Einfluss auf die Viabilität Parkin-exprimierender Zellen. Die Apoptoserate FLAG-hu-Parkin- und FLAG-zf-Parkin-transfizierter Zellen betrug im unbehandelten sowie im gestressten Zustand zwischen 13% und 15% (Abb. 21). Ein ähnliches Ergebnis wurde nach dreistündiger Behandlung der Zellen mit dem mitochondrialen Komplex I Inhibitor Rotenon (10 μ M) erzielt (Daten nicht gezeigt). Zur Expressionskontrolle wurden Zelllysate mittels Western Blot unter Verwendung des anti-FLAG-Antikörpers analysiert.

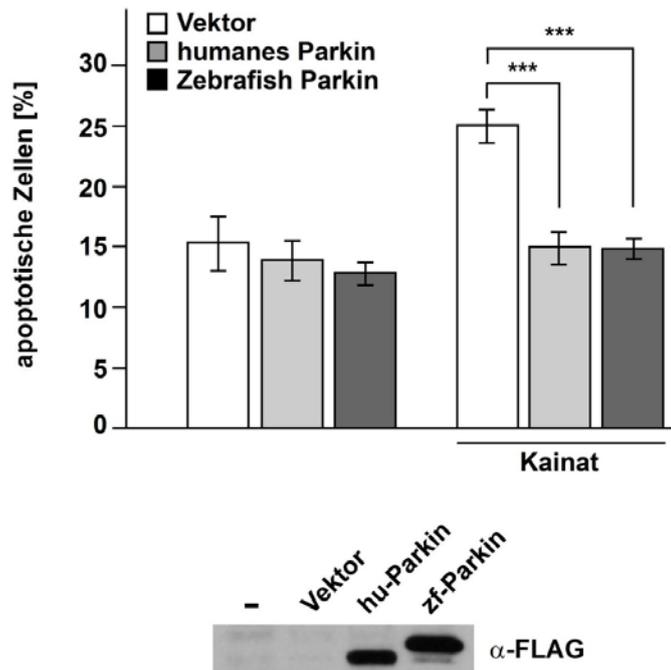


Abb. 21 Zebrafisch-Parkin besitzt neuroprotektives Potential

SH-SY5Y Zellen wurden mit EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und FLAG-hu-Parkin, FLAG-zf-Parkin oder FLAG-Vektor cotransfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit Kainat (1 mM, 3 Stunden) inkubiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 identifiziert und gezählt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen unter mindestens 300 transfizierten Zellen. Die Quantifizierung beruht auf Duplikaten von drei unabhängigen Experimenten, ***, $p \leq 0,001$. Zur Expressionskontrolle wurde ein Aliquot des Zelllysats mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers F3165 analysiert.

2.1.6 Zusammenfassung Teil 1

Auf der Suche nach Ursachen für die autosomal-rezessiv vererbare Form der Parkinson-Erkrankung, die durch Mutationen im Parkin-Gen bedingt ist, ist man in den letzten Jahren sowohl der Funktion als auch den Gründen für den Funktionsverlust von Parkin auf die Spur gekommen. Nachdem man bei der biochemischen Analyse von humanem Parkin weitreichende Einblicke in Inaktivierung, Regulation und Funktion gewonnen hatte, blieb fraglich, ob diese Ergebnisse einzig für die Spezies Mensch relevant sind oder ob die zugrunde liegenden Eigenschaften und Mechanismen zwischen verschiedenen Spezies konserviert sind. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Ortholog von humanem Parkin aus dem Zebrafisch identifiziert und biochemisch charakterisiert. In der zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Analyse konnte gezeigt werden, dass sich das hoch konservierte Zebrafisch-Parkin unter dem Einfluss zellulärer Stressoren analog zu humanem Parkin verhält. Das neuroprotektive Potential von Zebrafisch-Parkin zeigt

sich unter Stress – hier dargestellt am Beispiel von Exzitotoxizität durch Kainat. Bei Applikation moderater Dosen schützt Parkin die Zellen vor Apoptose. Um diesen Effekt zu nutzen, wird die Transkription von endogenem Zebrafisch-Parkin unter Stress hochreguliert. Unter hohem Stress – hier gezeigt am Beispiel von H₂O₂ und Dopamin – wird das Protein jedoch unlöslich und aggregiert und ist somit ebenso anfällig für Fehlfaltung und Inaktivierung wie humanes Parkin.

2.2 Teil 2: Untersuchung der physiologischen Funktion von Parkin im Zebrafisch (*Danio rerio*)

Nach der Analyse essentieller biochemischer und funktioneller Protein-Eigenschaften im Zellkultursystem, die zeigte, dass nicht nur die Sequenz von Parkin im Zebrafisch hoch konserviert ist, sondern auch das neuroprotektive Potential und die Sensitivität gegenüber zellulären Stressoren, schloss sich die *in vivo* Untersuchung im Zebrafisch an.

2.2.1 Expression von Parkin im Zebrafisch

Um herauszufinden, in welchen Entwicklungsstadien des Zebrafisches Parkin exprimiert wird, wurden Zebrafischembryonen und -larven zu verschiedenen Zeitpunkten im Alter zwischen 45 Minuten und vier Tagen gesammelt. Nach Isolierung von RNA und Synthese von cDNA wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt, die zeigte, dass Parkin-mRNA in allen untersuchten Stadien vorhanden war (Abb. 23). Da die zygotische Gentranskription im Zebrafisch erst nach der zehnten Zellteilung circa drei Stunden nach Fertilisation einsetzt, handelt es sich bei den frühen Stadien um maternale RNA, die bereits bei der Befruchtung in der Oozyte vorhanden ist (Kimmel, 1993; Kimmel et al., 1995). Zur genaueren Analyse der Parkin-Transkription innerhalb der ersten Tage der Entwicklung wurde eine semi-quantitative *real time* PCR durchgeführt. Hierbei wurde sichtbar, dass im Vergleich zu Tag 1 die Menge an Parkin-mRNA an Tag 2 und Tag 3 nur unwesentlich zunahm und sich erstmals an Tag 4 verdoppelte. Ab Tag 5 erfolgte ein deutlicher Anstieg und an Tag 7 hatte sich die Parkin mRNA im Vergleich zu Tag 1 50-fach erhöht (Abb. 23).

Stadium	2 Zellen	4 Zellen	1000 Zellen	hoch	Hohlkugel	Schild
Alter [h]	0,75	1	3	3,3	4	6
						
Stadium	Knospe	6 Somiten	Prim-6	langer Brutstmuskel	vorstehendes Maul	
Alter [h]	10	12	25	48	72	
						

Abb. 22 Frühe Stadien der Zebrafiscentwicklung.

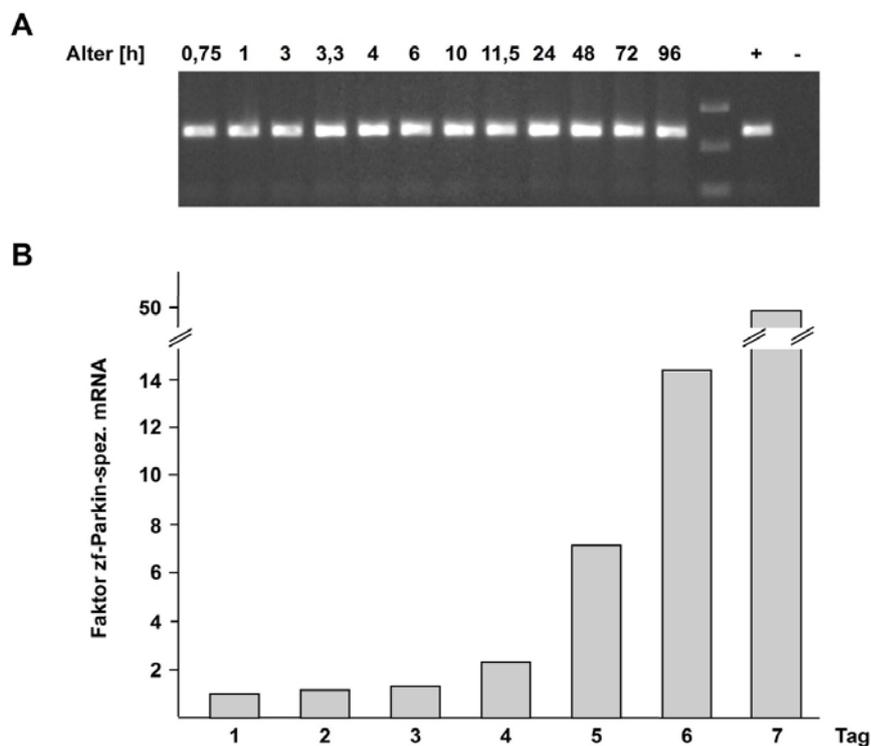


Abb. 23 Zebrafish-Parkin wird in allen Stadien der frühen Entwicklung exprimiert

(A, B) Gesamt-RNA wurde aus Zebrafischembryonen und -larven im Alter zwischen 45 Minuten und sieben Tagen isoliert und in cDNA umgeschrieben. (A) Qualitative Analyse mittels PCR unter Verwendung Parkin-spezifischer Primer. Abgebildet ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (+: Positivkontrolle mit Zebrafisch-Parkin-Plasmid-DNA als Matrize; - Negativkontrolle ohne Matrize). (B) Analyse mittels semi-quantitativer *real time* PCR unter Verwendung Parkin-spezifischer Primer. Abgebildet ist der relative Anteil Parkin-spezifischer mRNA verschieden alter Embryonen und Larven im Vergleich zu einen Tag alten Embryonen.

2.2.2 Inhibition der Genfunktion *in vivo* / Transienter Knockdown von Parkin im Zebrafisch

Der Zebrafisch wird als Modellorganismus gezielt eingesetzt, um die Funktion von Genen in der Entwicklung zu analysieren. Die Rolle von Parkin in frühen embryonalen und Larvenstadien wurde untersucht, indem ein transienter Knockdown durchgeführt wurde. Zur Verringerung der Parkin-Expression wurden *Antisense*-Oligonukleotide (gripNAs) im Einzellstadium in den Dotter von Wildtyp-Zebrafischeiern injiziert.

2.2.2.1 Auswahl der gripNAs

Bei der Auswahl der gripNAs stand eine spätere Verifizierbarkeit des angestrebten Knockdowns im Vordergrund. Da kein Antikörper zur Verfügung steht, der Parkin im Zebrafisch auf Proteinebene detektieren kann, war ein gripNA, der die Translation inhibiert, von untergeordnetem Interesse. Den Vorzug erhielt ein gripNA, der durch Bindung an einen Exon-Intron-Übergang in der prä-mRNA einen korrekten Spleißvorgang inhibiert (gt-grip) (Draper et al., 2001). Infolgedessen ergeben sich drei mögliche Szenarien für das Spleißprodukt: 1) das Exon wird heraus gespleißt und fehlt in der maturierten RNA, 2) das Intron wird nicht heraus gespleißt oder 3) durch Blockierung der Spleiß-Donor-Stelle wird eine alternative Spleißstelle in der näheren Umgebung genutzt (Abb. 24). Die gripNA-Sequenz wurde komplementär zur Donorspleißstelle von Exon 2 gewählt, da bei dessen Verlust eine Verschiebung im Leserahmen und infolgedessen ein vorzeitiges Stoppcodon gewährleistet wäre. Im Falle einer Retention von Intron 2 würde ebenfalls ein vorzeitiges Stoppcodon in der Sequenz erscheinen. Die Translation eines solchen Spleißproduktes würde dadurch zu einem Protein führen, das in seiner Sequenz maßgeblich verändert oder verkürzt wäre und seine ursprüngliche Funktion verlöre. Als Kontrolle wurde ein gripNA verwendet, der durch Austausch von drei Basen nicht an die Parkin-Sequenz bindet (gt-MM-grip). Die Sequenzverifizierung der ausgewählten Bindestellen erfolgte, indem genomische DNA aus Fischen isoliert und die Zielbereiche mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert wurden. Weiterhin erfolgte ein Abgleich der Sequenzen mit dem BLAST Algorithmus gegen die Genomdatenbank ENSEMBL, um sicher zu stellen, dass keine Übereinstimmungen mit weiteren Stellen im Zebrafischgenom vorliegen.

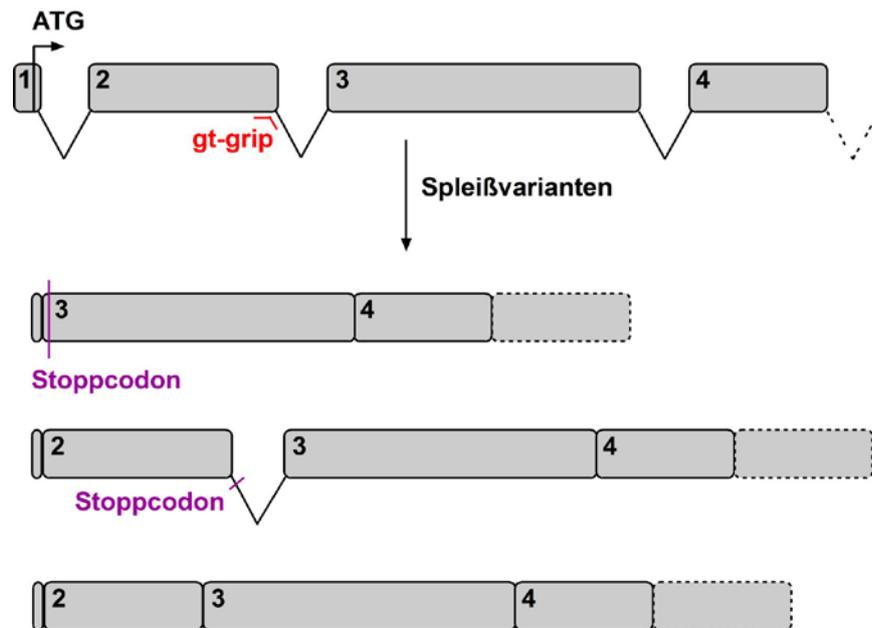


Abb. 24 Knockdown von Parkin im Zebrafisch durch Inhibierung des Spleißvorgangs.

Abbildung der ersten vier Exons (nummerierte Balken) und Introns (Striche) von Zebrafisch-Parkin. Der Translationsstart (ATG) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Das *Antisense*-Oligonukleotid (gt-grip) blockiert die Donorspleißstelle von Exon 2. Dadurch kann es beim Spleißen der prä-mRNA zu verschiedenen Varianten kommen: Entfernung von Exon 2, Retention von Intron 2 oder Nutzung einer alternativen Spleißstelle.

2.2.2.2 Verifizierung und Quantifizierung des Parkin-Knockdowns

Durch die Wahl eines gt-grips bestand die Möglichkeit, die Effizienz des Knockdowns zu überprüfen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion wurde RNA aus gt-grip-injizierten Embryonen und Kontroll-Embryonen isoliert und eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Während bei neun Stunden alten Embryonen nur sehr schwache Parkin-Banden zu sehen waren, zeigten sie sich ab Tag 1 deutlich. Es war auffällig, dass die Amplifikationsprodukte aus Knockdown-Embryonen deutlich schwächere Bande hervorriefen als die Amplifikationsprodukte aus Wildtyp-Embryonen (Abb. 25). Die Nutzung einer alternativen Spleißseite konnte nach Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen werden. Da Exon 1 lediglich aus 7 Basenpaaren besteht, musste zur Durchführung der PCR ein Primer benutzt werden, der an eine Sequenz in Exon 2 bindet. Bei Herausspleißen von Exon 2 - infolge der Inhibierung durch den gt-grip - schlägt demnach die Amplifikation fehl und wäre somit eine Erklärung für die schwächeren Banden der gt-grip-injizierten Embryonen. Die Frage, ob der gt-grip das Herausspleißen

von Intron 2 verhindert, konnte mit dieser Methode ebenfalls nicht beantwortet werden, da dieses Intron mit einer Länge von 67000 Basenpaaren eine Amplifikation mittels PCR verhindert und somit ebenfalls zu einer abgeschwächten Bande führen kann.

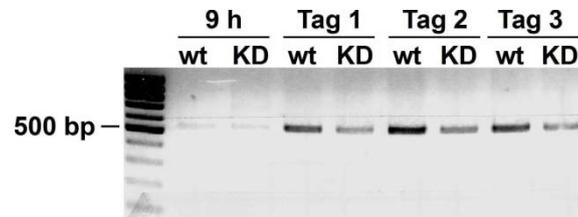


Abb. 25 Verifizierung der Parkin-Knockdown-Effizienz

Gesamt-RNA wurde aus Zebrafischembryonen und -larven nach einem Zeitraum zwischen neun Stunden und drei Tagen nach Injektion des Zf-Parkin-gt-grips beziehungsweise Kontroll-grips isoliert und in cDNA umgeschrieben. Qualitative Analyse mittels PCR unter Verwendung Parkin-spezifischer Primer. Abgebildet ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte.

Um die Frage zu beantworten, ob die schwächeren Banden tatsächlich mit dem inkorrekten Spleißen von Exon 2 beziehungsweise Intron 2 in Zusammenhang stehen und folglich einen Knockdown von Parkin bedeuten, wurde eine semi-quantitative *real time* PCR unter Verwendung der TaqMan™-Technologie durchgeführt. Dabei wurde die TaqMan™-Sonde komplementär zum Übergang zwischen Exon 2 und Exon 3 synthetisiert, so dass sie nur bei korrektem Spleißen an diese Sequenz binden kann (Abb. 26 A). In diesem Fall wird die TaqMan™-Sonde, die mit einem Quencher und einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, während der Amplifikation abgebaut, so dass die steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden kann. Im Gegensatz dazu kann die Sonde bei Verlust von Exon 2 oder der Retention von Intron 2 nicht binden und folglich ist im Laufe des Amplifikationsprozesses auch keine Reporter-Fluoreszenz detektierbar. Der Anteil Parkin-spezifischer mRNA wurde mittels dieser Methode in Embryonen an Tag 1, 2 und 3 nach Injektion des gt-grips im Vergleich zu gleichaltrigen Kontroll-injizierten Embryonen desselben Geleges ermittelt. Die Auswertung zeigte, dass einen Tag nach Injektion in den Parkin-gt-grip-injizierten Embryonen nur noch circa 48% korrekt gespleißter Parkin-mRNA vorhanden war. Ein Wert, der sich an den beiden Folgetagen noch auf bis zu circa 37% verringerte und demnach den angestrebten Knockdown bestätigte (Abb. 26 B). Wie bereits erläutert, führt das fehlerhafte Spleißen zu einem vorzeitigen Stoppcodon und infolgedessen zu einem stark verkürzten Protein und dessen Funktionsverlust. Durch die Retention von Intron 2 würde ein Protein mit einer Länge von

65 Aminosäuren entstehen (wobei acht Aminosäuren aus der Intronsequenz hervorgehen), das nicht einmal der Länge der N-terminalen Ubiquitin-ähnlichen Domäne entspricht. Eine noch weitreichendere Verkürzung ist für das Herausspleißen von Exon 2 zu erwarten. Die dadurch bedingte Verschiebung des Leserahmens würde zu einem Protein mit einer Länge von lediglich vier Aminosäuren führen.

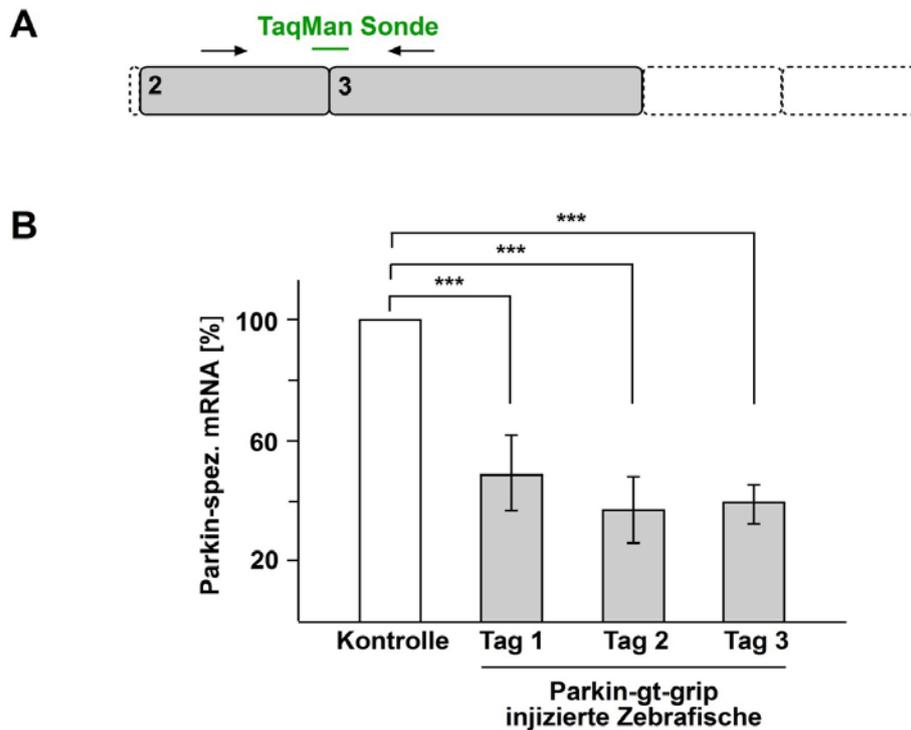


Abb. 26 Quantifizierung der Parkin-Knockdown-Effizienz

(A, B) Die Effizienz des Parkin-Knockdowns wurde mittels semi-quantitativer *real time* PCR basierend auf der TaqMan™ Technologie bestimmt. (A) Die Parkin-spezifische TaqMan-Sonde bindet an den Übergang zwischen Exon 2 und Exon 3, die Parkin-spezifischen Primer sind als Pfeile dargestellt. (B) Der Parkin-gt-grip wurde im Einzellstadium in Zebrafischeier injiziert. Aus den Embryonen wurde ein, zwei oder drei Tage nach Injektion Gesamt-RNA isoliert und mittels semi-quantitativer *real time* PCR analysiert. Die RNA-Mengen wurden auf das endogene Kontroll-Gen β -Aktin normalisiert. Abgebildet ist der Anteil Parkin-spezifischer mRNA im Vergleich zu Kontroll-injizierten Embryonen. Die Quantifizierung beruht auf vier unabhängigen Experimenten, ***, $p \leq 0,001$.

2.2.2.2 Morphologie der Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen

Nach Bestätigung des Parkin-Knockdowns wurden die Fische auf morphologische Auffälligkeiten untersucht. Innerhalb der ersten Tage konnten keine Veränderungen in den äußerlichen Merkmalen festgestellt werden. Zwei Tage alte Parkin-Knockdown-Embryonen waren morphologisch nicht von ihren Kontroll-injizierten Geschwistern unterscheidbar (Abb. 27). Darüber hinaus war weder in der Entwicklung noch im

Verhalten eine Abweichung sichtbar. Der Schlüpfvorgang erfolgte parallel zu dem der Kontroll-injizierten Embryonen und der Fluchtreflex bei Berührung war ebenfalls vergleichbar ausgeprägt.

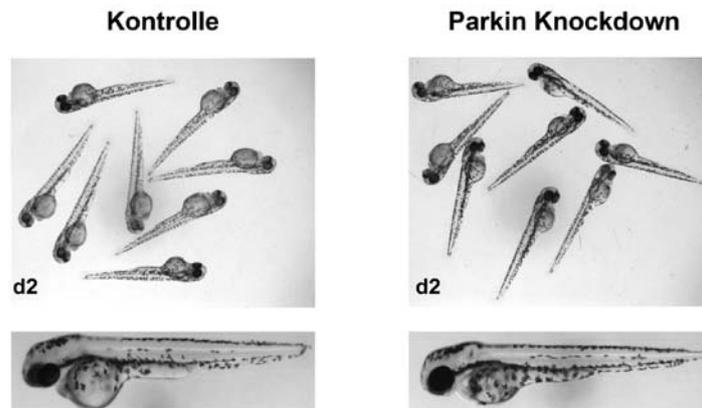


Abb. 27 Knockdown von Parkin führt im Zebrafisch zu keinen offensichtlichen Veränderungen der Morphologie

Lichtmikroskopische Aufnahme zwei Tage alter Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen und Kontroll-injizierter Geschwister.

Um herauszufinden, ob eine größere Menge des injizierten *gt-grips* eventuell die Knockdown-Effizienz erhöht und somit möglicherweise einen Phänotyp hervorrufen kann, wurde die injizierte Konzentration von 1 mM auf 3 mM erhöht. Mittels quantitativer *real time* PCR wurde ein Anteil von circa 28% korrekt gespleißter Parkin mRNA ermittelt (Abb. 28). Der Großteil des Geleges zeigte weiterhin keine phänotypischen Veränderungen.

Es fielen jedoch einzelne Embryonen auf, die in verschieden starker Ausprägung eine abknickende Körperachse mit stark verkürztem Schwanz sowie Unterentwicklung im Bereich Kopf und Augen mit massivem Zelltod im Gehirn zeigten (Abb. 28). Diese Veränderungen, die zuvor bereits nach Injektion anderer *grip*NAs beobachtet wurden, werden vermutlich durch toxische Effekte hervorgerufen und sind möglicherweise auf die hohe Konzentration des injizierten *gt-grips* zurückzuführen.

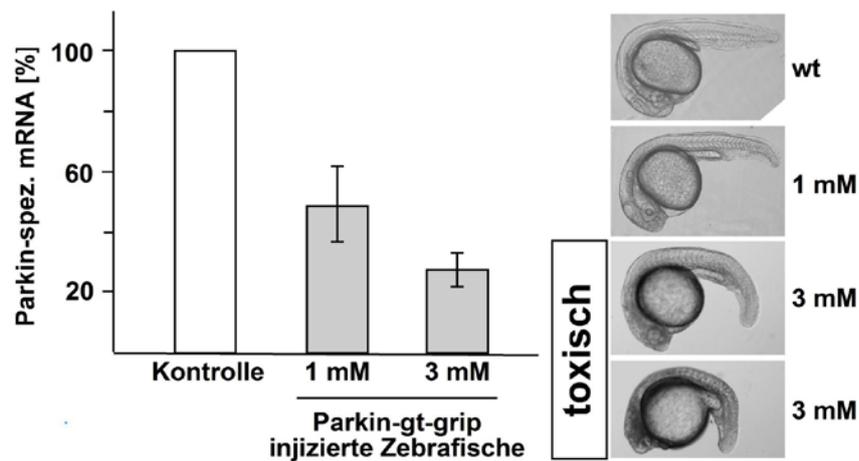


Abb. 28 Hohe Konzentrationen des Parkin-gt-grips führen zu einem toxischen Phänotyp

Unterschiedliche Konzentrationen des Parkin-gt-grips wurden im Einzellstadium in Zebrafischeier injiziert. Ein Tag nach Injektion wurde aus den Embryonen Gesamt-RNA isoliert und mittels semi-quantitativer *real time* PCR analysiert. Die RNA-Mengen wurden auf das endogene Kontrollgens β -Aktin normalisiert. Abgebildet ist der Anteil Parkin-spezifischer mRNA im Vergleich zu kontrollinjizierten Embryonen. Im rechten Teil sind lichtmikroskopische Aufnahmen ein Tag alter Embryonen zu sehen. Die Schwarzfärbung des Gehirns nach Injektion hoher Konzentrationen weist auf Zelltod hin. (Aufnahmen stammen von einem anderen Parkin-gt-grip mit ähnlichem toxischem Effekt).

2.2.2.3 Analyse dopaminerger Neurone

Nachdem keine äußerlich sichtbaren Veränderungen in der Morphologie erkennbar waren, erfolgte die Analyse auf zellulärer Ebene. Da ein Hauptmerkmal der Parkinson-Erkrankung der weitgehend selektive Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* ist und es im Zwischenhirn des Zebrafischs ein Homolog zu dieser menschlichen Mittelhirnregion gibt, galt es zu klären, ob der Knockdown von Parkin einen Einfluss auf die dopaminergeren Neurone im Zebrafisch hat. Aufgrund der Tatsache, dass die räumliche Verteilung dieser Neurone 72 Stunden nach Fertilisation abgeschlossen ist (Holzschuh et al., 2001; Lam et al., 2005; McKinley et al., 2005), wurden die folgenden Analysen mit drei Tage alten Zebrafischlarven durchgeführt.

2.2.2.3.1 *In situ*-Hybridisierung gegen Tyrosinhydroxylase

Um dopaminerge Neurone zu visualisieren, wurde Digoxigenin-markierte Gegenstrang-RNA der Tyrosinhydroxylase (*th1*) synthetisiert. Diese Sonde konnte während des Hybridisierungsprozesses an die Tyrosinhydroxylase-mRNA in den dopaminergeren Zellen der zuvor fixierten Embryonen binden. Nach Inkubation mit einem Digoxigenin-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert vorliegt, und anschließender

enzymatischer Farbreaktion, wurden die dopaminergen Neurone sichtbar. Die mikroskopische Analyse zeigte sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in der Parkin-Knockdown-Gruppe große interindividuelle Unterschiede (Abb. 29). Von Embryo zu Embryo waren Schwankungen im Tyrosinhydroxylase-Muster erkennbar, so dass eine Aussage über eine mögliche Beeinträchtigung dopaminergener Neurone anhand dieser Methode nicht möglich war.

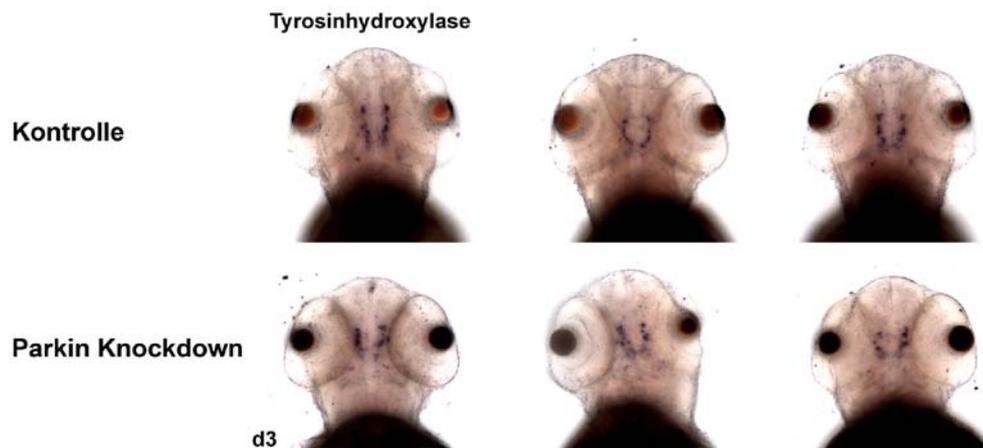


Abb. 29 *In situ*-Hybridisierung mit Tyrosinhydroxylase

Dorsale Ansicht drei Tage alter Zebrafischlarven, deren dopaminerge Neurone mit einer Gegenstrang-RNA-Sonde gegen Tyrosinhydroxylase angefärbt wurden.

2.2.2.3.2 Quantifizierung der Tyrosinhydroxylase-mRNA mittels semi-quantitativer *real time* PCR

Aufgrund der mangelnden Aussagekraft der *in situ*-Hybridisierung wurde die semi-quantitative *real time* PCR als weitere und zugleich sensitivere Methode zur Bestimmung von Tyrosinhydroxylase-mRNA angewendet. Obwohl endogenes Parkin in drei Tage alten Parkin-Knockdown-Embryonen um 60% reduziert war, blieb die durchschnittliche relative Menge an Tyrosinhydroxylase-mRNA gleich -bezogen auf die Kontroll-injizierten Embryonen (Abb. 30). Da der Durchschnittswert von einer hohen Standardabweichung geprägt war, stellte sich die Frage, ob der Knockdown in den einzelnen Versuchen unterschiedlich effizient war. Hierzu wurden die relativen Mengen von Parkin-mRNA mit den entsprechenden relativen Mengen von Tyrosinhydroxylase-mRNA in fünf unabhängigen Einzelversuchen verglichen (Abb. 30). Dabei wurde deutlich, dass ein

stärkerer Knockdown – charakterisiert durch geringere relative Mengen von Parkin-mRNA - nicht zwangsläufig eine Verminderung der relativen Mengen von Tyrosinhydroxylase-mRNA bedingten. Es gab keine Korrelation zwischen den mRNA-Mengen von Parkin und Tyrosinhydroxylase, so dass man angesichts dieses Ergebnisses davon ausgehen kann, dass der hier gezeigte Parkin-Knockdown im Zebrafisch nicht zum Verlust dopaminergener Neurone führt.

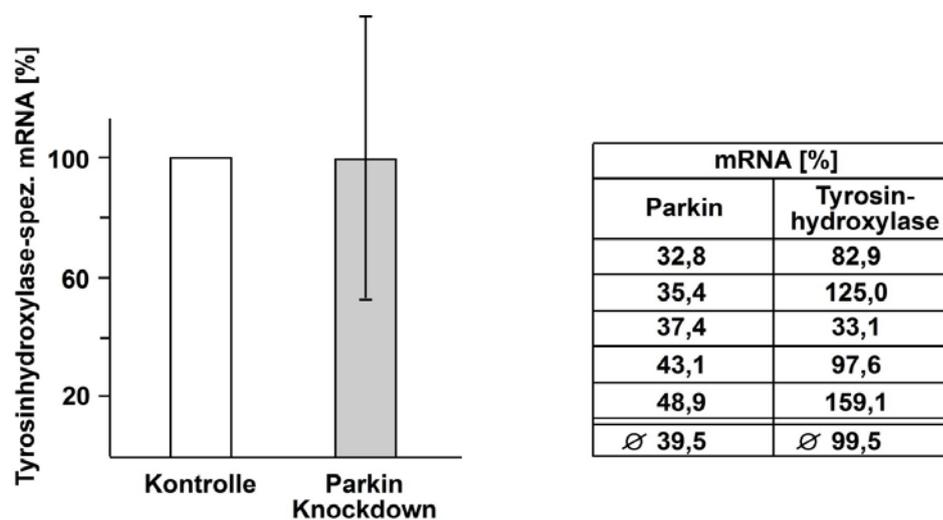


Abb. 30 Quantifizierung von Tyrosinhydroxylase-mRNA in Zebrafischembryonen

Aus Parkin-Knockdown-Larven und Kontroll-injizierten Geschwistern wurde drei Tage nach Injektion Gesamt-RNA isoliert und mittels semi-quantitativer *real time* PCR unter Verwendung Zebrafisch-Tyrosinhydroxylase-spezifischer Primer analysiert. Die RNA-Mengen wurde auf das endogene Kontrollgen β -Aktin normalisiert. Abgebildet ist der prozentuale Anteil Tyrosinhydroxylase-spezifischer mRNA in Parkin-Knockdown-Larven im Vergleich zu Kontrollen. Die Quantifizierung beruht auf fünf unabhängigen Experimenten. In der rechten Tabelle sind die Ergebnisse der einzelnen Experimente aufgeführt und die individuellen Tyrosinhydroxylase-mRNA-Mengen den Parkin-mRNA-Mengen gegenübergestellt.

2.2.2.4 Analyse der Mitochondrien

Da sich neuronale Zellen durch einen hohen Energiebedarf auszeichnen und zu dessen Deckung auf Mitochondrien angewiesen sind, wurde eine Dysfunktion dieser Organellen in den letzten Jahren als frühes Ereignis in Neurodegenerationsprozessen beschrieben. Voraussetzung für die Funktionalität von Mitochondrien sind unter anderem koordinierte Fusions- und Teilungsprozesse zur Erhaltung des dynamischen tubulären Netzwerks. Störungen dieser Prozesse sowie Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials deuten auf eine mitochondriale Dysfunktion.

2.2.2.4.1 Analyse der mitochondrialen Morphologie

Die Tatsache, dass der Verlust von Parkin infolge eines siRNA-induzierten Knockdowns die Morphologie und dynamischen Prozesse von Mitochondrien verändert (Lutz et al., 2009) siehe auch Teil 2.3), gab Anlass zu der Vermutung, dass ähnliche Abnormalitäten im Parkin-Knockdown-Zebrafisch-Modell vorliegen könnten. Zu Beginn wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, um Mitochondrien in lebenden Zebrafischen mikroskopisch sichtbar zu machen. Aus den Plasmiden pCS2+ mito-GFP und pCS2+ H2B-mRFP, die die codierenden Sequenzen des *green fluorescent protein* (GFP) gekoppelt an eine mitochondriale Signalsequenz beziehungsweise des Histonproteins H2B gekoppelt an das *monomeric red fluorescent protein* (mRFP) enthalten, wurde zunächst mRNA synthetisiert und anschließend im Einzellstadium in den Dotter von Wildtyp-Zebrafischeiern injiziert. Alternativ zu diesem Ansatz, der Mitochondrien durch Expression eines fluoreszierenden Proteins anfärbt, wurden Zebrafischeier in dem zellpermeablen Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CMXRos™ inkubiert, der nach potentialabhängiger Diffusion in aktiven Mitochondrien akkumuliert. 24 Stunden nach Fertilisation wurden die Embryonen mit einem konfokalen Mikroskop untersucht. Es stellte sich heraus, dass beide Methoden geeignet sind, um Mitochondrien zu visualisieren (Abb. 31), wobei im Fall der MitoTracker-Färbung eine lange Inkubationszeit und eine hohe Verdünnung erforderlich waren, um gute Ergebnisse ohne toxische Nebeneffekte zu erzielen. Um Fragmentierung der Mitochondrien zu induzieren und zu veranschaulichen, wurden die Embryonen in Rotenon inkubiert, da frühere Studien bereits einen entsprechenden Effekt auf humane Zellen und Rattenneurone gezeigt hatten (Barsoum et al., 2006; Benard et al., 2007). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte nach der Inkubation die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks in Hautzellen beobachtet werden. Anstelle von tubulären, lang gestreckten Mitochondrien lagen nach Behandlung mit Rotenon nur noch kugelförmige vor (Abb. 31). Dieser dramatische Effekt wurde durch lange Inkubationsdauer in subletalen Dosen herbeigeführt.

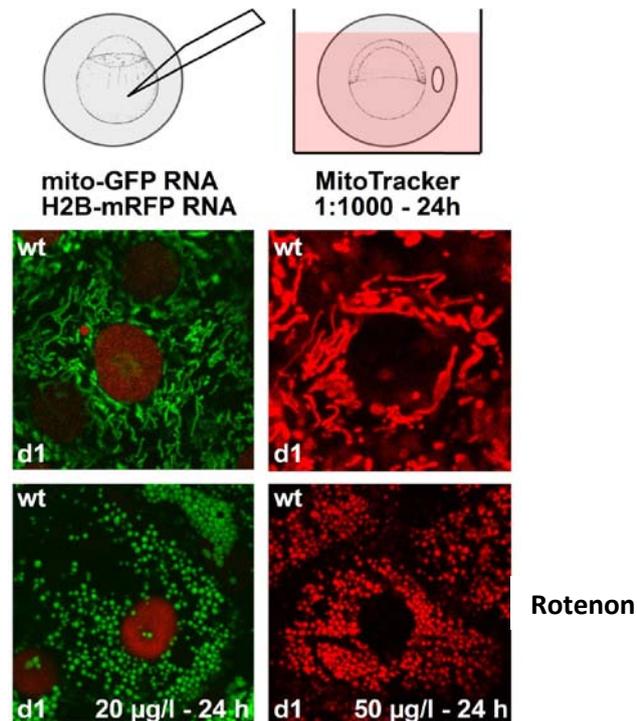


Abb. 31 Rotenon führt in Zebrafischembryonen zu mitochondrialer Fragmentierung

Mitochondrien können in lebenden Zebrafischen durch verschiedene Techniken sichtbar gemacht werden. Durch Injektion von GFP-RNA mit mitochondrialer Signalsequenz in den Dotter im Einzellstadium, kommt es zu mitochondrialer Expression von GFP. Gleichzeitige Injektion der mRFP-gekoppelten RNA des Histoneproteins H2B ermöglicht die Visualisierung des Zellkerns (linke Seite). Inkubation über 24 h in MitoTracker Red CMXRos führt zu Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs in Mitochondrien (rechte Seite). Lange Inkubation in niedrigen Konzentrationen von Rotenon führt zur Fragmentierung des tubulären mitochondrialen Netzwerks (unterer Teil). Abgebildet sind Zellen der äußeren Hautschicht.

Um den Einfluss von Parkin auf die mitochondriale Morphologie zu untersuchen, wurden mito-GFP-RNA und H2B-mRFP-RNA gemeinsam mit dem Parkin-gt- beziehungsweise Kontroll-grip injiziert. Die 24 Stunden nach Fertilisation stattfindende mikroskopische Analyse zeigte ein intaktes tubuläres Netzwerk – sowohl in den Kontroll-injizierten als auch in den Parkin-Knockdown-Embryonen (Abb. 32). Ein offensichtlicher Unterschied bezüglich Morphologie war nicht erkennbar. Um herauszufinden, ob Mitochondrien von Parkin-Knockdown-Embryonen durch eine höhere Vulnerabilität gekennzeichnet sind und unter einem mitochondrialen Toxin eine frühere und/oder stärkere Fragmentierung erkennen lassen, wurden die Embryonen über einen vergleichsweise kurzen Zeitraum mit einer erhöhten Konzentration von Rotenon behandelt. Es stellte sich heraus, dass sich die langen tubulären Mitochondrien durch diese Behandlung zwar sichtbar verkürzten, es jedoch keinen Unterschied zwischen Kontroll-injizierten und Parkin-Knockdown-

Embryonen gab (Abb. 32). Die Wirkung von Rotenon führte in beiden Fällen zu gleichen morphologischen Veränderungen.

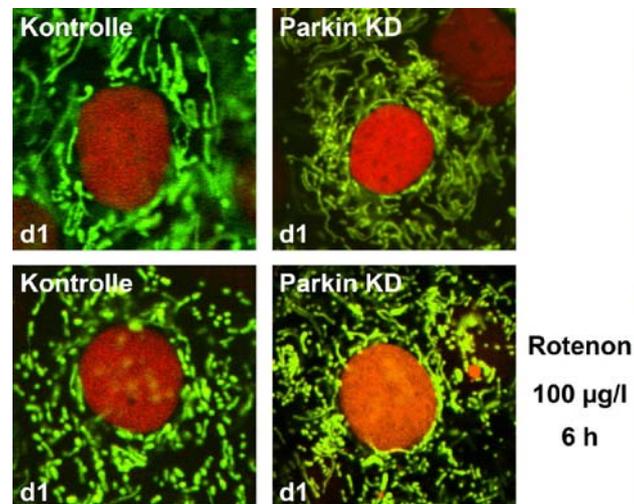


Abb. 32 Knockdown von Parkin führt in Zebrafischembryonen nicht zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie in epidermalen Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der äußeren Hautzellen von ein Tag alten Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen und ihren Kontrollen. Zusätzliche Injektion von mito-GFP-RNA (und H2B-mRF-RNA) ermöglicht die Sichtbarmachung der Mitochondrien in grün (und Zellkerne in rot). Behandlung mit Rotenon über einen Zeitraum von 6 Stunden löst sowohl in Parkin-Knockdown-Embryonen als auch in Kontrollen eine Verkürzung der Mitochondrien hervor.

2.2.2.4.2 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Um das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran zu bestimmen, wurden 24 Stunden nach Fertilisation Mitochondrien aus Wildtyp-, Kontrollinjizierten und Parkin-Knockdown-Embryonen isoliert. Zu diesem Zweck wurden die Embryonen mit Ultraschall homogenisiert und die Mitochondrien anschließend durch differentielle Zentrifugation angereichert. Anschließend wurden sie mit dem lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoff JC-1 (5, 5', 6, 6'-Tetrachlor-1, 1', 3, 3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyaniniodid) inkubiert, der von gesunden Zellen in die mitochondriale Matrix aufgenommen wird und dort orange fluoreszierende J-Aggregate bilden kann. Ist das Membranpotential jedoch vermindert, findet keine Aufnahme statt und der Farbstoff verbleibt als grün fluoreszierendes Monomer. Das Verhältnis zwischen aggregierter und löslicher Form von JC-1, das nach Messung mit einem Fluorometer bestimmt werden kann, gibt somit Auskunft über das Membranpotential. Als Positivkontrolle wurden Mitochondrien aus Wildtyp-Embryonen vor der Inkubation mit

JC-1 mit Valinomycin behandelt. Dieser Ionophor verursacht durch den Transport von Kalium-Ionen durch die Mitochondrien-Membran den Zusammenbruch des Membranpotentials (Safiulina et al., 2006). In den den Mitochondrienpräparationen konnte dies dosisabhängig beobachtet werden (Abb. 33). Im Gegensatz dazu war kein signifikanter Unterschied zwischen den Präparationen aus Wildtyp-, Kontrollinjizierten oder Parkin-Knockdown-Embryonen feststellbar.

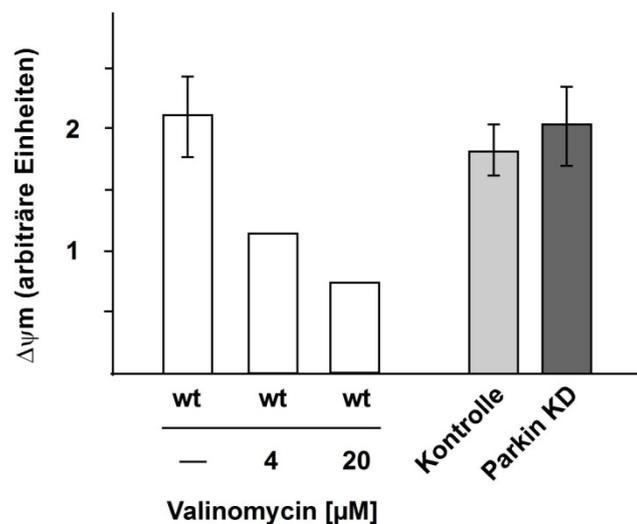


Abb. 33 Knockdown von Parkin führt in Zebrafischembryonen nicht zu Veränderungen des Membranpotentials

Aus 24 Stunden alten Wildtyp-Zebrafischembryonen, Parkin-Knockdown-Embryonen und Kontrollinjizierten Embryonen wurden Mitochondrien isoliert und hinsichtlich ihres mitochondrialen Membranpotentials untersucht. Nach Inkubation in dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 wurde das Membranpotential spektrofluorometrisch bestimmt. Das Membranpotential ist angegeben als Verhältnis zwischen aggregiertem, intramitochondrialem JC-1 (rot) und monomerem, zytosolischem JC-1 (grün). Mitochondrien aus Wildtyp-Embryonen wurden als Positivkontrolle zusätzlich mit dem Ionophor Valinomycin behandelt, das konzentrationsabhängig zur Abnahme des Membranpotentials führt.

Um herauszufinden, ob Mitochondrien durch den Knockdown von Parkin anfälliger gegenüber Stress sind, wurden die verschiedenen Präparationen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Komplex I-Inhibitors Rotenon inkubiert. In Übereinstimmung mit früheren Studien, die zeigen konnten, dass Rotenon zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials führt (Bonsi et al., 2004), manifestierte sich auch hier eine dosisabhängige Abnahme des Membranpotentials (Abb. 34). Nach Inkubation in 10 μM Rotenon fiel das Potential um circa 32%, nach Inkubation in 100 μM um circa 70%. Diese Reduktion betraf jedoch alle Präparationen gleichermaßen. Es war kein Unterschied

zwischen Mitochondrien aus Wildtyp-, Kontroll-injizierten und Parkin-Knockdown-Embryonen sichtbar.

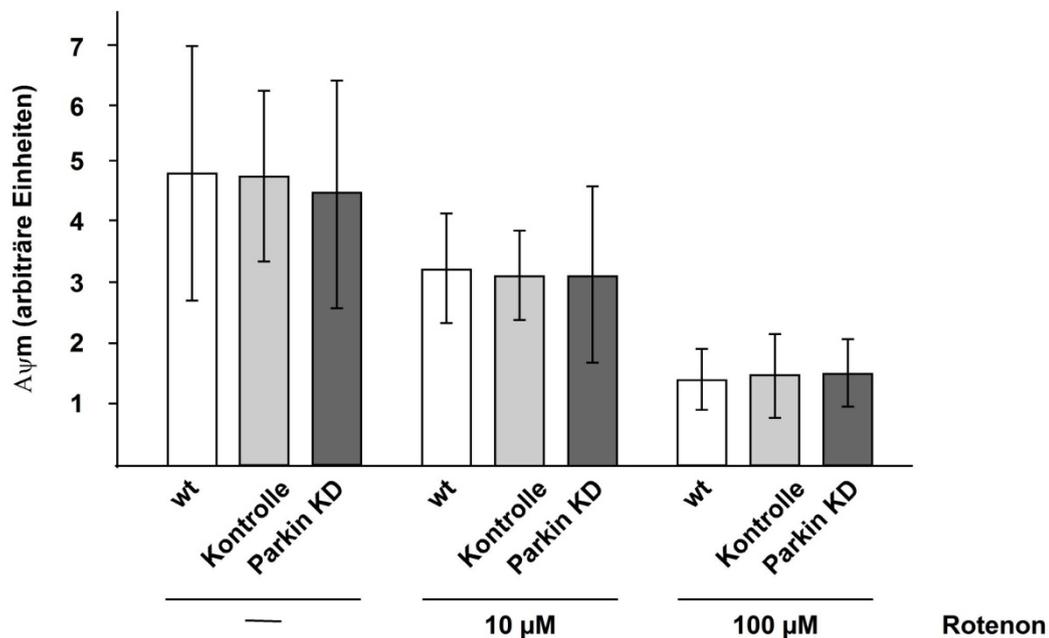


Abb. 34 Mitochondrien aus Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen sind im Vergleich zu Kontrollen nicht anfälliger gegenüber Komplex I-Inhibition

Isolierte Mitochondrien aus Wildtyp-Zebrafischembryonen, Parkin-Knockdown und Kontroll-injizierten Embryonen wurden mit Rotenon in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Das Membranpotential wurde spektrofluorometrisch nach Inkubation mit JC-1 bestimmt und ist angegeben als Verhältnis zwischen aggregiertem, intramitochondrialem JC-1 (rot) und monomerem, zytosolischem JC-1 (grün).

2.2.2.5 Etablierung neurotoxischer Modelle

Da die Reduktion der Genfunktion von Parkin weder zu morphologischen Veränderungen noch zu Entwicklungsstörungen geführt hatte, stellte sich die Frage, ob die verminderte Expression von Parkin unter Stress zu einer erhöhten Anfälligkeit in Form von vermehrtem Zelltod führt.

2.2.2.5.1 Untersuchung von chemischen Inhibitoren

Um dies zu ergründen, galt es zunächst einen Stressor zu finden, der im Zebrafisch titrierbare und quantitativ messbare Apoptose auslöst. Dazu wurden diverse Substanzen getestet, deren Angriffspunkte mit der Parkinson-Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden.

Zur Hemmung der mitochondrialen Atmungskette wurden der Komplex I-Inhibitor Rotenon und der Entkoppler CCCP (Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon)

eingesetzt, der zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Zwei Tage alte Embryonen wurden dechorioniert und in Embryomedium unter Zusatz der genannten Substanzen inkubiert. Unter CCCP-Behandlung setzten bei Konzentrationen zwischen 250 und 750 nM/L nach zwei bis drei Stunden die ersten Symptome ein. Ein verlangsamter Herzschlag führte zunächst zu einem Stocken des Blutflusses und Blutansammlung sowie Ödembildung in Herznähe. Im weiteren Verlauf wurde deutlich, dass der Fluchtreflex (das schnelle Fortschwimmen nach Berührung) nicht mehr vorhanden war und die Embryonen in den folgenden Stunden sukzessive starben. Um diesen Prozess auf zellulärer Ebene zu verfolgen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine mikroskopische Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Embryonen betäubt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridin Orange inkubiert, der selektiv von sterbenden Zellen aufgenommen wird und in die DNA interkaliert. Unter Fluoreszenzlicht wurden die grün leuchtenden, sterbenden Zellen im Rückenmark der noch lebenden Embryonen gezählt. Während in den ersten Stunden der Inkubation keine erhöhte Anzahl vorlag, konnte in der terminalen Phase bis zum Exitus beobachtet werden, dass der Zelltod von der Schwanzspitze ausgehend schnell voran schritt. Ein vorrangiges Sterben der Neurone in Gehirn oder Rückenmark war nicht detektierbar. Ein ähnliches Bild ergab sich unter Behandlung mit Rotenon. Verminderter Herzschlag führte zur Bildung von Ödemen und einer fortschreitenden Unterversorgung der Peripherie, so dass die Zellen der Embryonen vom Schwanz ausgehend abstarben, was fluoreszenzmikroskopisch nachvollziehbar war. Neben mitochondrialen Toxinen wurden auch Substanzen getestet, die durch Exzitotoxizität zum Zelltod führen (Caudle und Zhang, 2009; Yacoubian und Standaert, 2009). Die Zugabe des Neurotransmitters Glutamat und dessen Struktur analogon Kainat zum Embryomedium führte zu vermindertem Fluchtreflex und – abhängig von Dosis und Inkubationszeit – zum Sterben der Embryonen. Übereinstimmend mit den zuvor eingesetzten mitochondrialen Toxinen, konnten auch hier sterbende Zellen nicht quantifiziert werden, da sich der Zelltod von der Peripherie ausgehend, unter Einbeziehung aller umliegenden Zellen, rasch ausbreitete. Als weitere Verbindung aus dieser Substanzklasse wurde Domoinsäure untersucht, die ebenfalls mit Kainat und Glutamat strukturverwandt ist und AMPA- und Kainat-Rezeptoren stimuliert. (Peng et al., 1994). Unterschiedliche Konzentrationen wurden vier Stunden nach Fertilisation in den Dotter von Wildtyp-Zebrafischeiern injiziert. Zwei Tage nach Injektion waren zwischen 8%

und 26% der injizierten Embryonen tot. Unter den verbliebenen Embryonen, die mit Konzentrationen von 1 µg/µL oder 0,5 µg/µL injiziert worden waren, zeigten circa 50% Krampfanfälle, die sich als Zittern und Kontraktion des gesamten Körpers äußerten und sowohl einen Fluchtreflex als auch eine normale Schwimmbewegung verhinderten. Embryonen, die mit geringerer Konzentration injiziert worden waren (0,1 µg/µL), zeigten prozentual weniger Anfallsneigung (34%). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse lieferte auch hier kein Ergebnis, da bis zum Zeitpunkt unmittelbar vor dem Tod kein nennenswerter Zelltod sichtbar war.

Toxizität	Mechanismus	Substanz	Effekt
Mitochondrial	Inhibierung von Komplex I der Atmungskette	Rotenon	Verminderter Fluchtreflex Verminderter Herzschlag Ödeme
Mitochondrial	Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung	CCCP	Verminderter Fluchtreflex Verminderter Herzschlag Ödeme
Exzitatorisch	Stimulierung von Glutamatrezeptoren	L-Glutamat	Verminderter Fluchtreflex
Exzitatorisch	Stimulierung von Glutamatrezeptoren des Kainat-Subtyps	Kainat	Verminderter Fluchtreflex
Exzitatorisch	Stimulierung von Glutamatrezeptoren des Kainat- und AMPA-Subtyps	Domainsäure	Krampfanfälle Verminderter Fluchtreflex

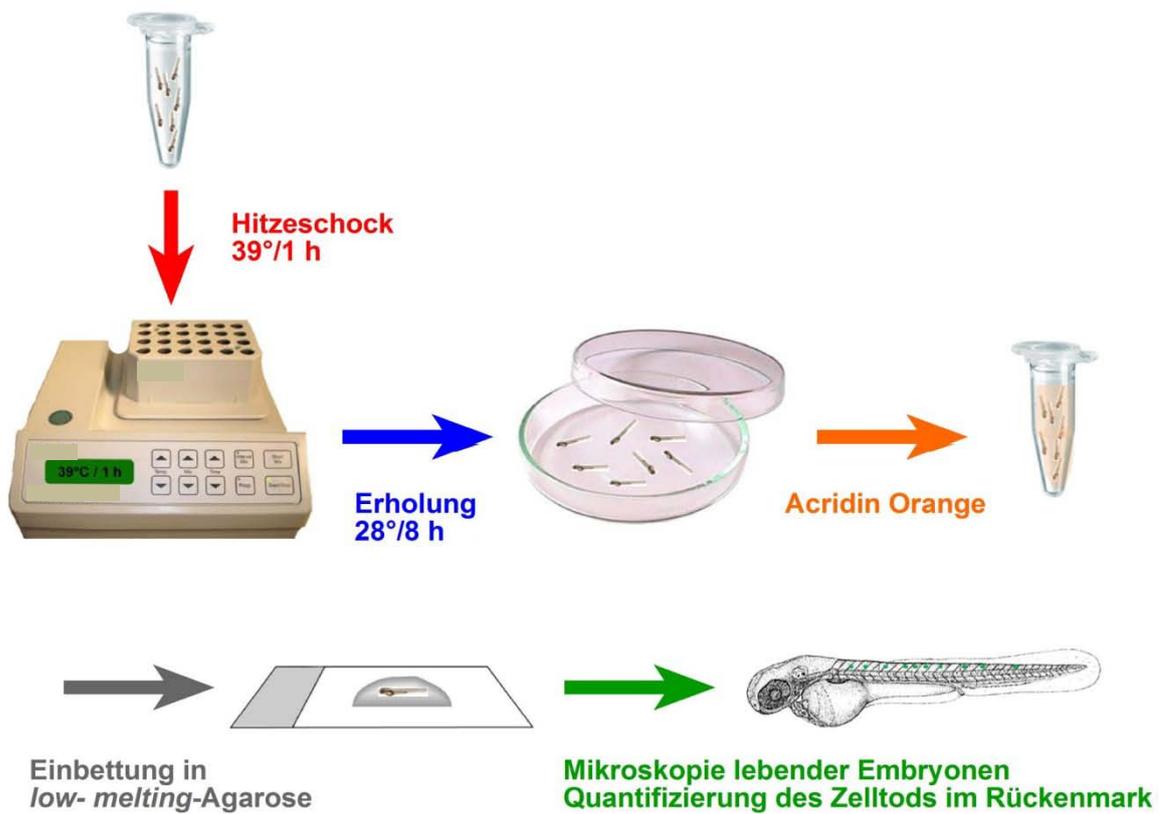
Tab. 1 Untersuchung toxischer Einflüsse auf Zebrafischembryonen

2.2.2.5.2 Untersuchung von proteotoxischem Stress

Eine weitere Möglichkeit, Apoptose zu induzieren, besteht in der Anwendung von Hitzeschock. Dabei handelt es sich um einen klassischen Auslöser für proteotoxischen Stress, der durch Veränderungen in der Proteinfaltung zu apoptotischem Zelltod führt, sobald ein kritischer Schwellenwert überschritten wird (Jolly und Morimoto, 2000; Morimoto, 2008). Im Zebrafish konnte gezeigt werden, dass eine temporäre Erhöhung der Umgebungstemperatur um circa 11°C (von 28,5°C auf 39°C) zu Apoptose führt, die insbesondere empfindliche Regionen wie Gehirn und Rückenmark betrifft (Yabu et al., 2001). Um herauszufinden, ob die Hitzeschock-induzierte Apoptose mikroskopisch quantifizierbar ist, wurden zuerst verschiedene Temperaturen und Inkubationszeiten mit Wildtyp-Zebrafischembryonen getestet. Hierfür wurden Embryonen 48 Stunden nach Fertilisation dechorioniert, in einem definierten Volumen Embryomedium für eine

bestimmte Zeit erhitzt und anschließend in 28,5°C warmes Embryomedium zurückgesetzt. Die anschließende mikroskopische Analyse gab Auskunft über die am besten geeigneten Bedingungen (Abb. 35). Bei einstündigem Hitzeschock von 39°C und folgenden achtstündiger Regeneration bei 28,5°C zeigten sich über das gesamte Rückenmark verteilt apoptotische Zellen (Abb. 35). Diese Bedingungen hatten jedoch keine Auswirkung auf Vitalität, Morphologie oder Verhalten der Embryonen.

A



B

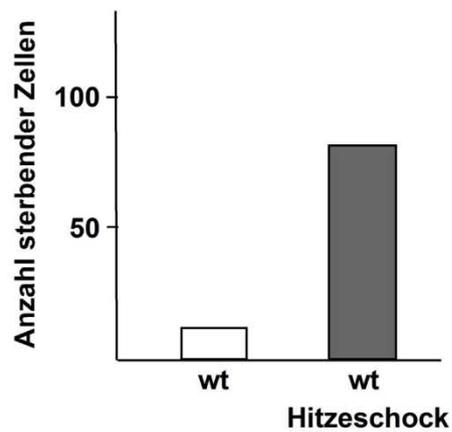


Abb. 35 Hitzeschock führt in Zebrafischembryonen zu Zelltod im Rückenmark

(A) Dechorionierte, zwei Tage alte Embryonen werden für eine Stunde bei 39°C inkubiert und anschließend über acht Stunden bei 28,5°C gehalten. Nach Inkubation in Acridin Orange und Einbettung in *low-melting*-Agarose können die sterbenden Zellen im Rückenmark mikroskopisch quantifiziert werden. (B) Hitzeschock führt in Wildtyp-Embryonen zu deutlichem Anstieg von Zelltod (n= 17 beziehungsweise n= 20).

Da Apoptose eine wichtige Rolle im Entwicklungsprozess spielt, wird Zelltod zu einem gewissen Maß auch unter physiologischen Bedingungen beobachtet (Cole und Ross, 2001). Bevor der Einfluss von proteotoxischem Stress auf Parkin-Knockdown-Embryonen untersucht wurde, galt es, den basalen Zelltod in Knockdown und Kontroll-injizierten Embryonen zu ermitteln. Hierbei zeigten die Parkin-Knockdown-Embryonen einen kleinen, aber signifikanten Anstieg in der Anzahl sterbender Zellen (Abb. 36). Im Vergleich zu nicht injizierten Embryonen war eine generelle Zunahme sterbender Zellen zu verzeichnen, was auf die Injektionsprozedur zurückzuführen ist, die einen massiven Eingriff darstellt. Der leichte Anstieg apoptotischen Zelltods in Parkin-Knockdown-Embryonen führte weder zu einem offensichtlichen morphologischen Phänotyp noch zu Verhaltensänderungen. Er deutete jedoch auf eine möglicherweise erhöhte Vulnerabilität, die anschließend unter proteotoxischem Stress untersucht wurde. Nach Hitzeschock zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Parkin-Knockdown- und Kontroll-injizierten Embryonen. Die Anzahl sterbender Zellen im Rückenmark Parkin-defizienter Embryonen war gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 36).

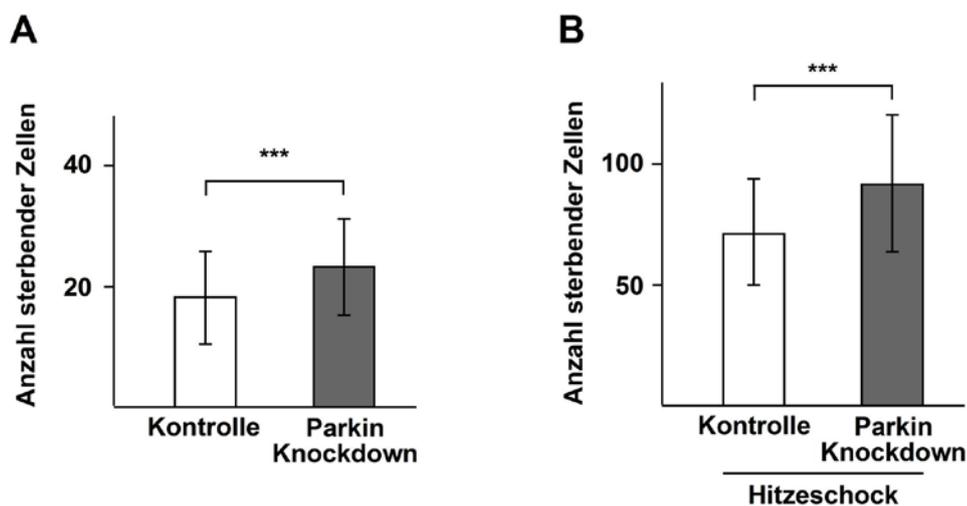


Abb. 36 Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen sind anfälliger für Hitzeschock-induzierten Zelltod. Dechorionierte, zwei Tage alte Embryonen wurden für eine Stunde bei 39°C inkubiert und anschließend über acht Stunden bei 28,5°C gehalten. Nach Inkubation in Acridin Orange wurde Zelltod im Rückenmark quantifiziert. **(A)** Parkin-Knockdown-Embryonen zeigen unter Basalbedingungen einen leichten, aber signifikanten Anstieg sterbender Zellen. **(B)** Hitzeschock führt in Parkin-Knockdown-Embryonen im Vergleich zu Kontroll-injizierten Geschwistern zu einem stärkeren Anstieg von Zelltod. Quantifizierungen beruhen auf drei unabhängigen Experimenten, $n \geq 50$; *** $p < 0,001$.

2.2.3 Generierung und Untersuchung Parkin-transgener Zebrafische

Wie bereits erläutert wurde, konnte bisher vornehmlich im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass Parkin in der Lage ist, Zellen vor einer großen Bandbreite von Stressoren zu schützen, die Apoptose induzieren. Da die Ergebnisse in Teil 2.1 belegen, dass Zebrafisch-Parkin ebenfalls protektiv wirkt und die Ergebnisse in Teil 2.2. darauf hinweisen, dass der Verlust von Parkin zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber proteotoxischem Stress führt, wurden Parkin-transgene Zebrafische generiert, um als neues Vertebratenmodell zur Untersuchung der neuroprotektiven Funktion von Parkin zu dienen.

Alle Prozesse zur Herstellung dieser Fische wurden von Anna Pisl durchgeführt. Hierfür wurde ein Vektorsystem verwendet, das die Klonierung zweier Konstrukte erforderte (Paquet et al., 2009). Während das sogenannte *Driver*-Konstrukt die codierende Sequenz von Gal4-VP16 enthält, dessen Expression durch den ubiquitären Promotor EF1 α kontrolliert wird, enthält das sogenannte *Responder*-Konstrukt die codierenden Sequenzen des Fluoreszenzmarkers DsRed und humanen Volllängen-Parkins unter Kontrolle einer *upstream activating sequence* (UAS). Durch die Expression von Gal4-VP16 kommt es somit zu einer Transaktivierung der UAS und dadurch zur bidirektionalen Expression von DsRed und Parkin (Abb. 37). Die DNA dieser beiden Konstrukte wurde zusammen mit der mRNA von Tol2-Transposase im Einzellstadium in die Zelle von Zebrafischeiern injiziert. Da Zebrafische keine endogene Tol2-Transposase besitzen, wurde hierdurch die stabile Integration des Transgens möglich. Die Zebrafische dieser F₀-Generation, die die beiden Transgene mosaikartig exprimieren, wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen und mit Wildtyp-Fischen ausgekreuzt, um in der folgenden F₁-Generation Nachkommen zu erhalten, die die Transgene durch Weitergabe per Keimbahn stabil ins Genom eingebaut haben. Diese Fische wurden anhand ihrer DsRed-Expression unter Fluoreszenzlicht aussortiert und weiter gezüchtet. Dementsprechend ermöglicht die Fluoreszenzmikroskopie eine schnelle und einfache Identifikation transgener Fische und ihrer nicht-transgenen Geschwister (Abb. 37). Der Nachweis der Parkinexpression wurde immunhistochemisch auf Gefrierschnitten von 24 Stunden alten Embryonen erbracht. Die Schnitte vom Kopfbereich zeigten die ubiquitäre Expression von Parkin, die mit der Expression von DsRed überlappt (Abb. 37). Darüber hinaus war Parkin bereits sechs Stunden nach Fertilisation mittels Western Blot detektierbar und die

Proteinmenge nahm, dem dem Wachstum der Embryonen entsprechend, in der folgenden Entwicklung deutlich zu (Abb. 37).

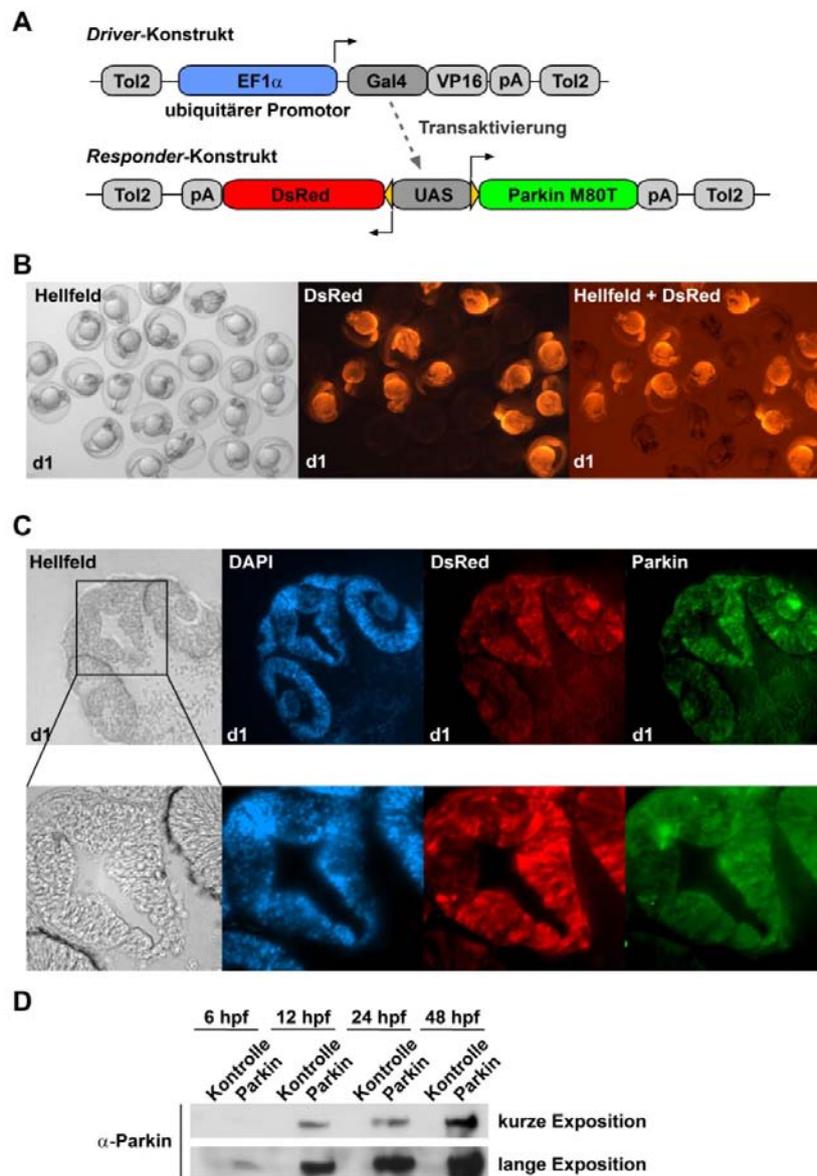


Abb. 37 Charakterisierung Parkin-transgener Zebrafische

(A) Das zur Generierung transgener Zebrafische verwendete Gal4/UAS-basierte bidirektionale Expressionssystem besteht aus zwei Konstrukten. Das *Driver*-Konstrukt enthält den ubiquitären Promotor EF1 α , der die Expression von Gal4/VP16 steuert. Dieses kann an die UAS-Sequenz des *Responder*-Konstrukts binden und somit die Expression von Parkin und DsRed aktivieren. **(B)** Transgene Nachkommen von Parkin-transgenen Zebrafischen, die mit Wildtyp-Fischen ausgekreuzt werden, können 24 Stunden nach Fertilisation aufgrund ihrer DsRed-Expression unter Fluoreszenzlicht von ihren nicht-transgenen Geschwistern unterschieden werden. **(C)** Parkin- und DsRed-Expression überlappen in transgenen Zebrafischembryonen. Gefrierschnitte des Kopfbereichs ein Tag alter transgener Embryonen wurden immunhistochemisch mit dem anti-Parkin-Antikörper PRK8 gefärbt (grün), Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht (blau). **(D)** Western Blot Analyse Parkin-transgener Embryonen und ihrer nicht-transgenen Geschwister (Kontrolle) 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Fertilisation (hpf). Detektion von Parkin ist mit dem anti-Parkin-Antikörper PRK8 bereits nach 6 Stunden möglich.

2.2.3.1 Untersuchung Parkin-transgener Zebrafischembryonen in neurotoxischen Modellen

Um herauszufinden, ob die verstärkte Expression von Parkin einen schützenden Effekt hat, wurden Parkin-transgene Embryonen und ihre nicht-transgenen Geschwister zwei Tage nach Fertilisation dechorioniert und in Embryomedium unter Zusatz von CCCP inkubiert. Durch die Entkopplung des Elektronentransports von der Atmungskettenphosphorylierung verhindert CCCP die Synthese von ATP und führt letztendlich zur Apoptose. Da zuvor beschriebene Ergebnisse gezeigt hatten, dass eine mikroskopische Quantifizierung apoptotischer Zellen nicht praktikabel ist, wurde der Exitus der Embryonen als Endpunkt gewählt. Bei einer Konzentration von 750 μM CCCP zeigten sich bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde die ersten Symptome. Verlangsamter Herzschlag, Ausbildung von Ödemen, verminderter Fluchreflex verbunden mit zunehmender Bewegungsunfähigkeit zeichneten sich jedoch bei transgenen und nicht-transgenen Embryonen gleichermaßen ab. Der Tod der ersten Embryonen konnte nach zwei Stunden festgestellt werden, nach drei Stunden lag die Sterberate bei nahezu 100%. Ein Unterschied zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren konnte dabei nicht detektiert werden (Abb. 38). Der Endpunkt wurde von beiden Gruppen erreicht. Trotz Schwankungen zwischen einzelnen Versuchen, war nicht erkennbar, dass Überexpression von Parkin vor dem toxischen Einfluss von CCCP schützt und somit lebensverlängernd wirkt.

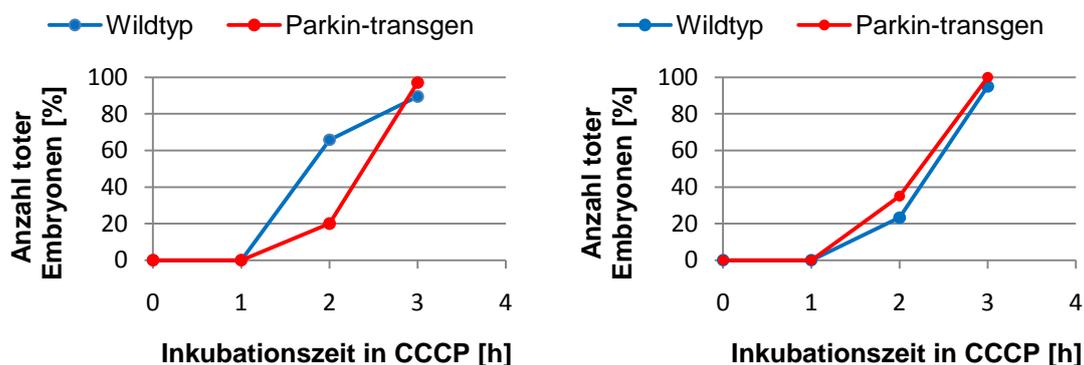


Abb. 38 Einfluss von CCCP auf die Vitalität Parkin-transgener Zebrafischembryonen

Zwei Tage alte Parkin-transgene Zebrafischembryonen wurden nach Dechorionierung in 750 μM CCCP inkubiert. Abgebildet ist der Anteil toter Embryonen im zeitlichen Verlauf in zwei unabhängigen Experimenten.

In Abschnitt 2.2.2.5.2 wurde gezeigt, dass Parkin-Knockdown-Embryonen empfindlicher auf proteotoxischen Stress reagieren, was durch vermehrten Zelltod nach Hitzeschock nachgewiesen werden konnte. Hinsichtlich dieses Ergebnisses stellte sich die Frage, ob – im Umkehrschluss – Überexpression von Parkin im Zebrafisch-Modell protektiv wirkt. Dazu wurde untersucht, ob die generierten transgenen Zebrafische weniger anfällig sind für Proteotoxizitäts-bedingten Zelltod. Um herauszufinden, ob Parkin einen Einfluss auf den basalen Zelltod hat, wurde zunächst die Anzahl apoptotischer Zellen unter physiologischen Bedingungen bestimmt. Wie bereits in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, wurden Parkin-transgene Embryonen und ihre nicht-transgenen Geschwister 48 Stunden nach Fertilisation dechorioniert und mit Acridin Orange inkubiert. Anschließend wurde das Rückenmark der lebenden Embryonen im Hinblick auf grün-fluoreszierende, sterbende Neurone mikroskopisch untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die Apoptoserate, die durch normale Entwicklungsprozesse bedingt ist, durch vermehrte Expression von Parkin nicht verändert wird. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen transgenen Embryonen und den nicht-transgenen Kontrollen sichtbar (Abb. 39 A). Um die Zelltodrate unter Stressbedingungen zu evaluieren, wurden die transgenen Embryonen und ihre Kontrollen analog zu den zuvor untersuchten Knockdown-Embryonen eine Stunde lang einem Hitzeschock von 39°C ausgesetzt und anschließend acht Stunden bei 28,5°C gehalten. Die Analyse der Rückenmarkneurone ergab, dass in Parkin-transgenen Embryonen signifikant weniger Zelltod auftritt als in den nicht-transgenen Geschwistern (Abb. 39 B). Da Parkin unter hohem Stress inaktiviert werden kann, indem es in eine Detergenz-unlösliche Konformation übergeht, wurde ein Solubilitätsassay durchgeführt. Die Embryonen wurden vier, acht oder zwölf Stunden nach dem Hitzeschock in 0,2% Triton X-100 lysiert und durch Zentrifugation in eine Detergenz-lösliche und Detergenz-unlösliche Fraktion aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert. Parkin lag ausschließlich im Detergenz-löslichen Überstand vor (Abb. 39 C). Folglich verursachte die Temperaturerhöhung auf 39°C im Zebrafisch proteotoxischen Stress, hatte jedoch keine Auswirkung auf die Konformation von Parkin.

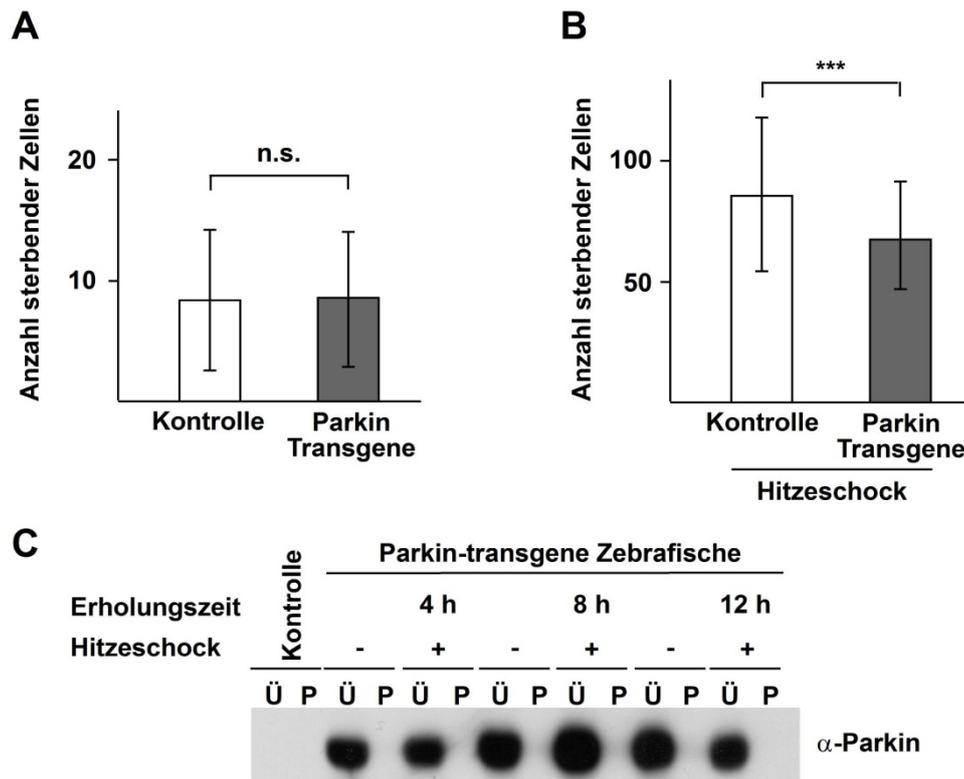


Abb. 39 Parkin-transgene Zebrafische sind weniger anfällig für Hitzeschock-induzierten Zelltod

Dechorionierte, zwei Tage alte Embryonen wurden für eine Stunde bei 39°C inkubiert und anschließend über acht Stunden bei 28,5°C gehalten. Nach Inkubation in Acridin Orange wurde Zelltod im Rückenmark quantifiziert. **(A)** Unter basalen Bedingungen gibt es keinen Unterschied in der Zelltod-Rate zwischen transgenen Embryonen und nicht-transgenen Geschwistern (Kontrolle). **(B)** Die Zunahme sterbender Zellen nach Hitzeschock ist in transgenen Embryonen deutlich weniger stark ausgeprägt als in nicht-transgenen Geschwistern. Quantifizierungen beruhen auf drei unabhängigen Experimenten, $n \geq 50$; $***p < 0,001$.

2.2.4 Zusammenfassung Teil 2

Um die Funktion von Zebrafisch-Parkin *in vivo* zu untersuchen, galt es zunächst die Genexpression von Parkin zu reduzieren und anschließend morphologische Strukturen zu analysieren, die potentiell durch den Verlust von Parkin beeinträchtigt werden. Der durch Injektion eines *Antisense*-Oligonukleotids erzielte transiente Knockdown führte zu einer Reduktion der Parkin-mRNA um 50% bis 60% in den ersten drei Tagen nach Fertilisation. Im selben Zeitraum waren keinerlei offensichtliche morphologische Veränderungen feststellbar. Die Analyse dopaminerger Neurone zeigte eine hohe interindividuelle Variabilität, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und Parkin-Knockdown-Larven. Ebenso wenig waren Abweichungen bezüglich der mitochondrialen Funktion erkennbar, die anhand dynamischer Prozesse und des Membranpotentials untersucht wurden. Im Gegensatz dazu führte der Verlust von Parkin zu einem Anstieg

des neuronalen Zelltods. Dieser war sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter proteotoxischem Stress induziert durch Hitzeschock signifikant höher als in den Kontrollen. Um dieses Ergebnis, das eine neuroprotektive Rolle von Parkin im Zebrafisch impliziert, weiter zu analysieren, wurden transgene Zebrafische generiert, die Parkin ubiquitär exprimieren. Bereits sechs Stunden nach Fertilisation konnte das Protein, das zusammen mit dem Fluoreszenzmarker DsRed exprimiert wird, nachgewiesen werden. Unter proteotoxischen Bedingungen zeigten Parkin-transgene Embryonen im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistern signifikant weniger neuronalen Zelltod und belegen somit das neuroprotektive Potential von Parkin in einem Tiermodell.

2.3 Teil 3: Untersuchung des Einflusses von Parkin auf Mitochondrien

Mitochondrien stellen das primäre energieliefernde System der meisten eukaryotischen Zellen dar und sind zugleich in hohem Maße dynamische Organellen, die kontinuierlich Fusions- und Teilungsprozesse durchlaufen. Auf diese Weise findet sowohl der Austausch von Membranen, Metaboliten und mitochondrialer DNA statt als auch die Anpassung an sich verändernde Anforderungen bezüglich Energiebedarf und subzellulärer Lokalisation. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Schädigungen und Funktionsstörungen der Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Parkinson-Erkrankung spielen. Die Bedeutung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette konnte sowohl in Parkinson-Patienten beobachtet werden (Schapira, 2008) als auch in Drogenabhängigen mit Parkinson-Symptomatik (Langston et al., 1983). Während in Erstgenannten die Komplex I-Aktivität deutlich reduziert war, wurde bei Letzteren durch intravenöse Applikation des Neurotoxins MPTP die Inhibierung von Komplex I ausgelöst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mutationen in mitochondrialer DNA gehäuft in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* von Parkinson-Patienten vorkommen und zu Funktionseinschränkungen der Atmungskette führen können (Bender et al., 2006). Neben diesen Erkenntnissen wurde auch ein Zusammenhang zwischen genetischen Formen der Parkinson-Erkrankung und mitochondrialen Defekten hergestellt. Zu Beginn dieses Projekts war bekannt, dass der Verlust der mitochondrialen Serin/Threonin-Kinase PINK1 in humanen Epithelzellen (HeLa-Zellen) zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie führt (Exner et al., 2007). SiRNA-vermittelte Reduktion der PINK1-Expression verursachte Verkürzungen oder Fragmentierung der Mitochondrien. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp durch Überexpression von Parkin gerettet werden kann. Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion waren zuvor bereits im *Drosophila*-Modell gefunden worden. Der beobachtete Phänotyp in Parkin-defizienten Fliegen umfasste neben Degeneration der Flugmuskeln und Sterilität männlicher Fliegen aufgrund fehlerhafter Spermatogenese auch geschwollene Mitochondrien mit geschädigten Cristae auf subzellulärer Ebene (Greene et al., 2003). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Rolle von Parkin im Hinblick auf die mitochondriale Morphologie und Funktion untersucht. Die experimentelle Analyse wurde gemeinsam mit Kathrin Lutz und Nicole Exner vorgenommen.

2.3.1 Knockdown von Parkin in humanen Zellen

Um die Expression von Parkin zu vermindern, wurden humane SH-SY5Y-Neuroblastomzellen mit Stealth siRNA gegen Parkin transfiziert (Kathrin Lutz). Es wurden zwei verschiedene Parkin-spezifische siRNAs auf ihre Effizienz untersucht. Die Analyse mittels Western Blot ergab, dass beide siRNAs zur verminderten Expression von Parkin führten, während die Kontroll-siRNA keinen Einfluss auf die Expression von Parkin hatte (Abb. 40).

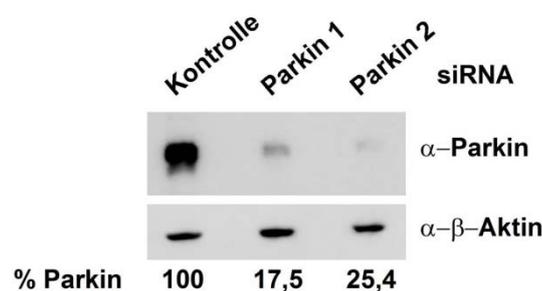


Abb. 40 Parkin-spezifische siRNA führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zur Reduktion von endogenem Parkin-Protein

SH-SY5Y Zellen wurden mit Kontroll-siRNA und zwei verschiedenen Parkin-siRNAs transfiziert. Die Effizienz des Knockdowns wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen anti-Parkin-Antikörpers PRK8 analysiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

2.3.1.1 Knockdown von Parkin führt in humanen Zellen zu mitochondrialer Fragmentierung

Für die Analyse der mitochondrialen Morphologie wurden lebende SH-SY5Y-Zellen drei Tage nach Transfektion mit Parkin-siRNA mikroskopisch untersucht (Kathrin Lutz). Hierfür wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆(3) (3, 3'-Dihexylcarbocyaniniodid) inkubiert, der aufgrund des hohen negativen Membranpotentials selektiv in der Mitochondrienmembran akkumuliert. Circa 70% der unbehandelten oder Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen besaßen ein tubuläres mitochondriales Netzwerk, was früheren Berichten entsprach (Taguchi et al., 2007; Weihofen et al., 2009). Unter Parkin-Knockdown hingegen war nur noch in 30% der Zellen ein solches Netzwerk zu erkennen, während in 70% der Zellen stark verkürzte und fragmentierte Mitochondrien vorlagen

(Abb. 41). Dieser Effekt wurde mit beiden zuvor erwähnten siRNAs erzielt und konnte durch Cotransfektion mit Wildtyp-Parkin aufgehoben werden.

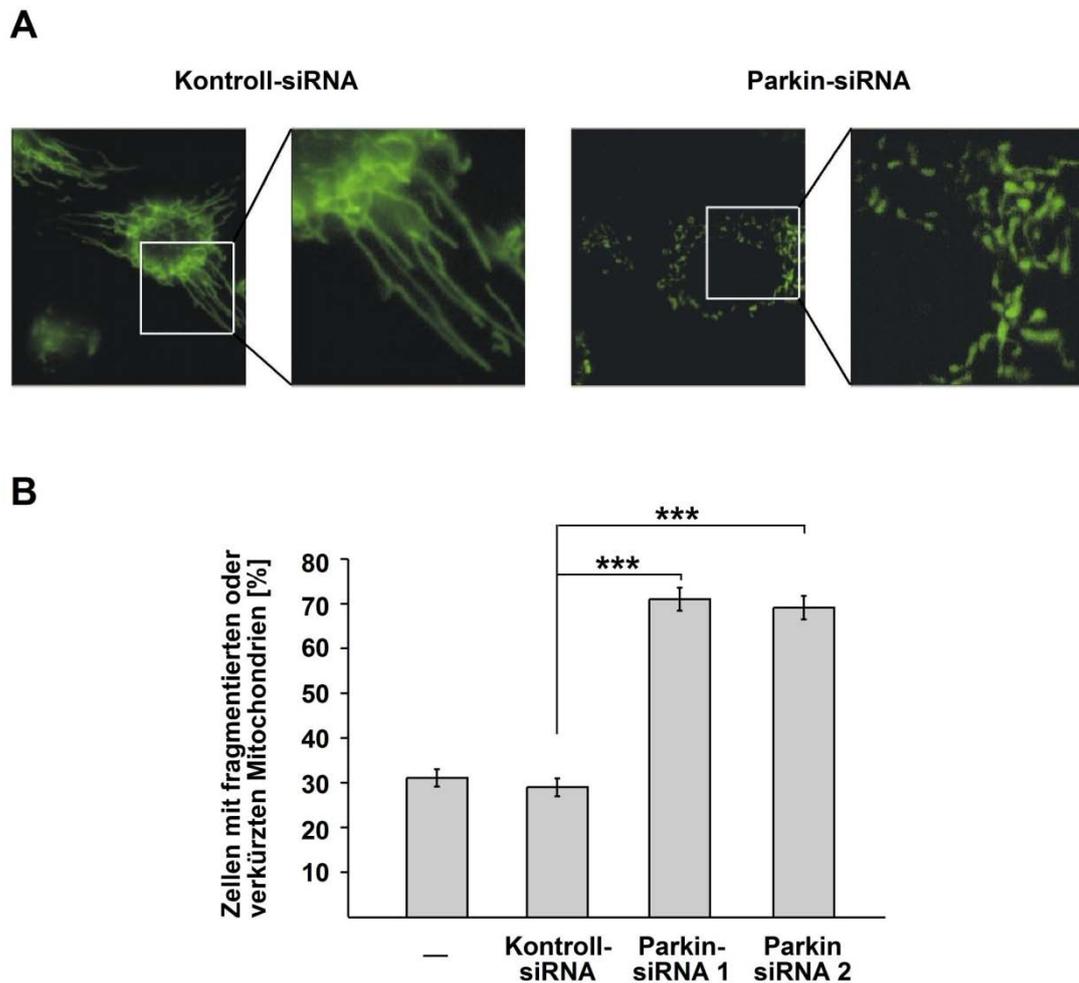


Abb. 41 Knockdown von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie.

(A) SH-SY5Y-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit Kontroll-siRNA und Parkin-siRNA transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmarker DiOC₆(3) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **(B)** Zellen mit einem intakten Netzwerk tubulärer Mitochondrien wurden als tubulär klassifiziert, Zellen mit zerstörtem Netzwerk und vorwiegend sphärischen oder stäbchenförmigen Mitochondrien als fragmentiert. Quantifizierungen beruhen auf Triplikaten von mindestens drei unabhängigen Experimenten, in denen pro Ansatz mindestens 300 Zellen analysiert wurden. Gezeigt ist der prozentuale Anteil von Zellen mit fragmentierten oder verkürzten Mitochondrien.

2.3.1.2 Knockdown von Parkin führt zu Veränderungen der zellulären ATP-Produktion

Um zu klären, ob die veränderte mitochondriale Morphologie die Mitochondrien funktionell beeinflusst, wurden die relativen Mengen an ATP in den Parkin-Knockdown-Zellen drei Tage nach Transfektion gemessen. Hierfür wurde das Zellkulturmedium 24 Stunden vor Zellernte gegen ein Medium mit geringem Glukosegehalt ausgetauscht. Da in kultivierten Zellen der Glukoseabbau durch Glykolyse zur ATP-Gewinnung genutzt wird (Imamura et al., 2009), werden Zellen bei niedrigen Glukosekonzentrationen gezwungen, ATP über die oxidative Phosphorylierung und somit über Mitochondrien zu gewinnen. Nach der Ernte wurden die Zellen lysiert und der ATP-Gehalt luminometrisch bestimmt. Dabei wiesen Parkin-siRNA-transfizierte Zellen eine um mehr als 30% reduzierte ATP-Menge auf, die wiederum durch Cotransfektion mit Wildtyp-Parkin auf das normale Niveau angehoben werden konnte (Abb. 42).

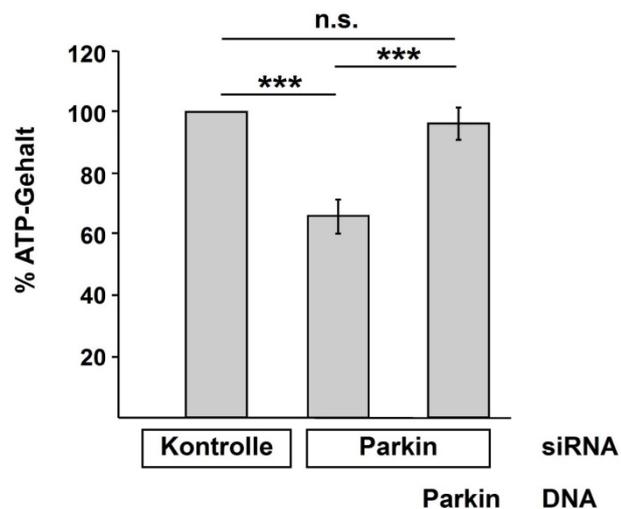


Abb. 42 Knockdown von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu verminderter Produktion von ATP.

SH-SY5Y-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder Parkin-siRNA transfiziert. Ein Ansatz Parkin-siRNA-transfizierter Zellen wurde zusätzlich mit einem Wildtyp-Parkin-Plasmid cotransfiziert. Die Zellen wurden drei Tage nach Transfektion geerntet und der zelluläre ATP-Gehalt bestimmt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil des ATP-Gehalts. ***, $p \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant

2.3.1.3 Untersuchung der Apoptose in humanen Zellen mit Parkin-Knockdown

Da die Fragmentierung von Mitochondrien oftmals ein Teil des Apoptoseprozesses ist, galt es zu klären, ob Parkin-siRNA-transfizierten Zelle eine erhöhte Apoptoserate aufweisen. Nach Transfektion wurden die Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen mittels TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) untersucht, der zur Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen dient. Dafür wurden fixierte Zellen mit dem Enzym terminale Desoxynukleotidtransferase (TdT) behandelt, das in apoptotischen Zellen die freien Hydroxylgruppen an den Bruchstellen der DNA mit Fluoreszenzmarkierten Desoxynukleotiden versieht. Um Apoptose zu induzieren, wurden die Zellen der Positivkontrolle mit Staurosporin inkubiert. Unter dieser Behandlung konnten apoptotische Zellen anhand von deutlich fragmentierten Kernen und TdT-vermittelter Fluoreszenzmarkierung mikroskopisch detektiert werden (Abb. 43 C). Die Quantifizierung der Staurosporin-Kontrolle ergab eine Apoptoserate von circa 60%. Im Gegensatz dazu war in Parkin-siRNA- und Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen so gut wie keine Apoptose nachweisbar (Abb. 43 A). Bei einer Knockdown-Effizienz von 50% bis 70% zwischen Tag 1 und Tag 4 lag die Apoptoserate unterhalb von 1%.

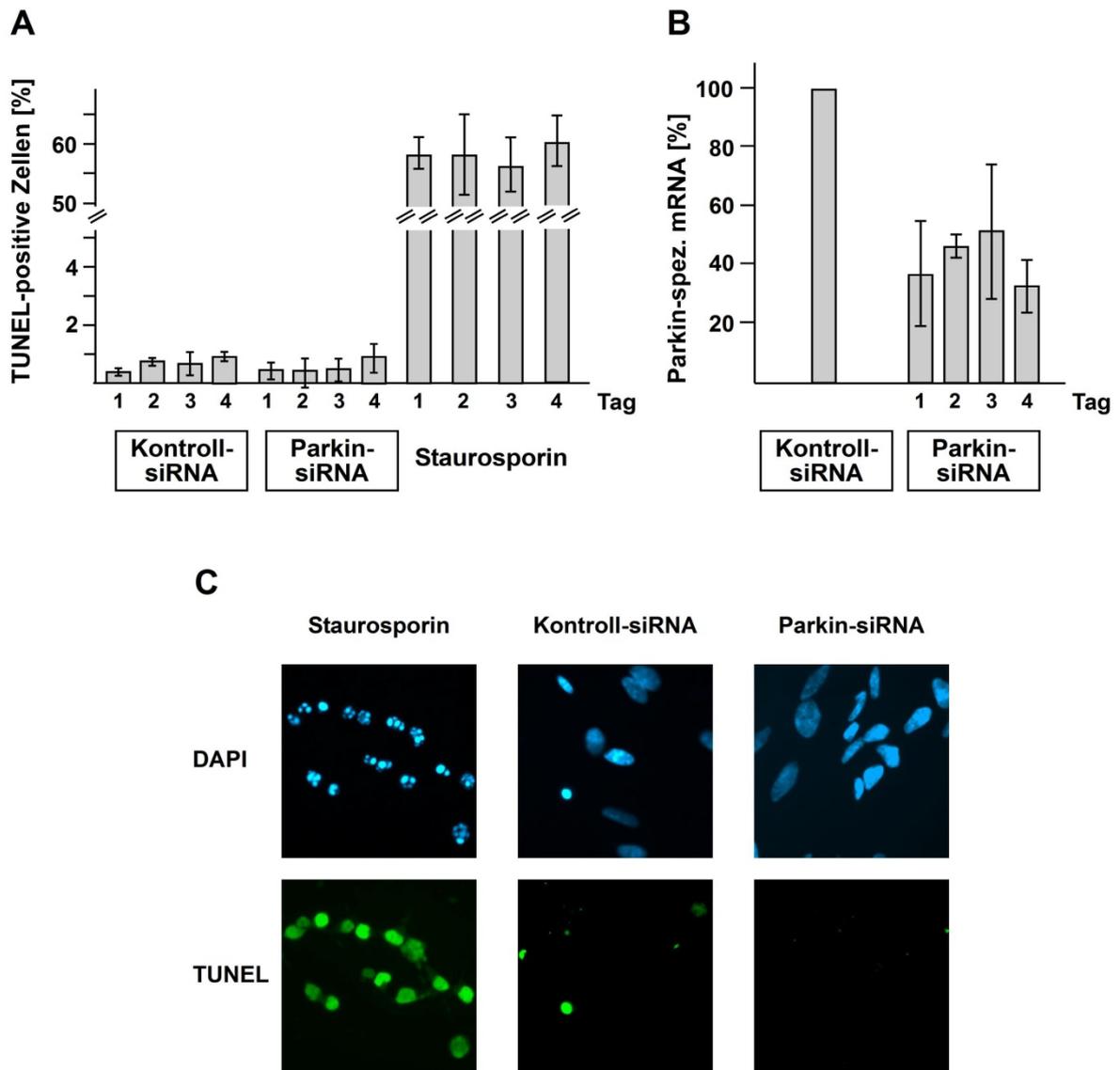


Abb. 43 Knockdown von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen nicht zum Anstieg der Apoptose-Rate.

(A,C) SH-SY5Y Zellen wurden mit Kontroll-siRNA oder Parkin-siRNA transfiziert. Ein, zwei, drei oder vier Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Über Fluoreszenzmarkierung von freien 3'OH-Enden in DNA-Doppelstrangbrüchen wurden apoptotische Zellen detektiert (TUNEL-Assay). Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Staurosporin (1 μ M, 4h) behandelt. (A) Abgebildet ist der Anteil apoptotischer Zellen unter mindestens 300 DAPI-gefärbten Zellen. Die Quantifizierungen beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten. (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen apoptotische (TUNEL-positive) Zellen in grün und DAPI-gefärbte Zellkerne in blau. (B) SH-SY5Y wurden ein, zwei, drei oder vier Tage nach Transfektion mit siRNA geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels semi-quantitativer *real time* PCR analysiert. Die RNA-Mengen wurden mit Hilfe des endogenen Kontrollgens β -Aktin normalisiert. Abgebildet ist der Anteil Parkin-spezifischer mRNA in Zellen nach Parkin-RNA-Behandlung im Vergleich zu Kontroll-siRNA-behandelten Zellen.

2.3.2 Knockdown von Parkin in *Drosophila*-S2-Zellen

Die vermehrte Fragmentierung, die nach dem Knockdown von Parkin in humanen Zellen beobachtet wurde, warf Fragen auf bezüglich bisher publizierter Daten aus dem *Drosophila*-Modell. Verschiedene Gruppen hatten gezeigt, dass der Phänotyp von Parkin-Mutanten im Fliegen-Modell (lokomotorische Defekte als Folge apoptotischer Flugmuskel-Degeneration) durch vermehrte mitochondriale Teilung oder verminderte Fusion gerettet werden kann (Deng et al., 2008; Park et al., 2009b; Poole et al., 2008). Um die widersprüchlichen Ergebnisse zu verstehen, wurden zusätzliche Knockdown-Experimente in *Drosophila*-S2-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden lange doppelsträngige RNAs (dsRNAs) eingesetzt, die nach Zugabe ins Kulturmedium über Endozytose von den Zellen aufgenommen werden (Saleh et al., 2006). Als Matrize für die Synthese der Parkin-dsRNA diente ein Klon mit der codierenden Sequenz von *Drosophila*-Parkin, der vom *Drosophila* Genomics Resource Center bezogen wurde. Es wurden zwei verschiedene dsRNAs hergestellt. Für beide konnte zunächst mit semi-quantitativer RT-PCR eine Parkin-Reduktion nachgewiesen werden. Die anschließende quantitative Bestimmung mittels *real time* PCR ergab eine Knockdown-Effizienz von circa 60% für die Tage 2, 3 und 4 nach dsRNA-Behandlung (Abb. 44).

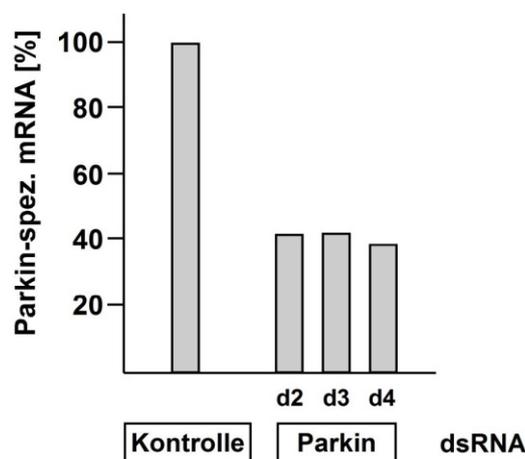


Abb. 44 Effizienz des Knockdowns von Parkin in *Drosophila*-S2-Zellen.

S2-Zellen wurden zwei, drei oder vier Tage (d2, d3, d4) nach Behandlung mit Kontroll-dsRNA oder Parkin-dsRNA geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels semi-quantitativer *real time* PCR analysiert. Die RNA-Mengen wurden mit Hilfe des endogenen Kontrollgens Rp49 normalisiert. Abgebildet ist der Anteil Parkin-spezifischer mRNA in Zellen nach Parkin-dsRNA-Behandlung im Vergleich zu Kontroll-dsRNA-behandelten Zellen.

2.3.2.1 Knockdown von Parkin führt in *Drosophila*-S2-Zellen zu mitochondrialer Fragmentierung

Für die Analyse der mitochondrialen Morphologie wurden lebende S2-Zellen nach Behandlung mit Parkin-dsRNA über einen Verlauf von vier Tagen mikroskopisch untersucht (Nicole Exner). Analog zu humanen Zellen war auch hier eine Zunahme der Fragmentierung sichtbar, die an Tag 2 nach dsRNA-Behandlung am deutlichsten zu Tage trat (Abb. 45). Der Anteil der Zellen mit fragmentierten Mitochondrien stieg im Vergleich zu den unbehandelten oder Kontroll-dsRNA-behandelten Zellen von circa 30% auf über 40% an. Interessanterweise war in den Parkin-Knockdown-S2-Zellen an Tag 3 nur noch eine leicht erhöhte Fragmentierungsrate zu beobachten. Stattdessen trat an Tag 3 und 4 ein dichtes Netzwerk sehr feiner, fadenförmiger Mitochondrien in Erscheinung, das auch in Kontroll-dsRNA-behandelten Zellen zu sehen war.

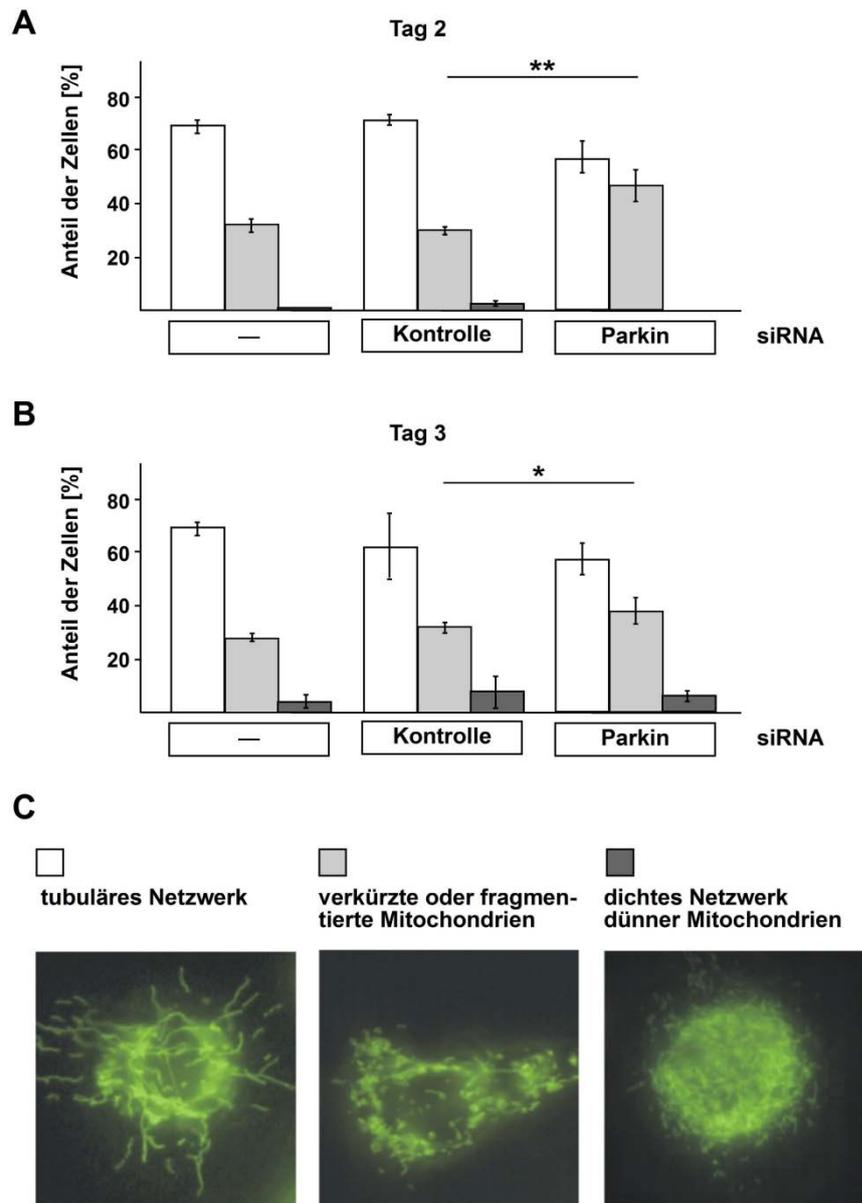


Abb. 45 Knockdown von Parkin führt in *Drosophila*-S2-Zellen zu einem frühen Phänotyp mitochondrialer Fragmentierung.

S2-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und an Tag 2 oder Tag 3 nach Parkin-dsRNA-Behandlung mit dem Fluoreszenzmarker DiOC₆(3) gefärbt, fluoreszenzmikroskopisch analysiert und aufgrund ihrer Morphologie in drei Gruppen eingeteilt. Quantifizierungen beruhen auf Triplikaten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, in denen pro Ansatz mindestens 300 Zellen analysiert wurden. **(A, B)** Gezeigt ist der prozentuale Anteil von Zellen mit tubulärem Netzwerk (weißer Balken), fragmentierten oder verkürzten Mitochondrien (hellgrauer Balken) oder Zellen mit einem dichten Netzwerk dünner, sehr feiner Mitochondrien (dunkelgrauer Balken) an Tag 2 **(A)** beziehungsweise Tag 3. **(B).** **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen repräsentative Abbildungen verschiedener Kategorien der mitochondrialen Morphologie.

2.3.2.2 Untersuchung der Apoptose in *Drosophila*-Zellen mit Parkin-Knockdown

Um nachzuweisen, dass die Fragmentierung der Mitochondrien der S2-Zellen nicht das Resultat von Apoptose ist, wurden die Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen mittels TUNEL-Assay (TdT-vermittelte dUTP-Markierung) analysiert. Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit dem Translationshemmer Cycloheximid inkubiert. Den Ergebnissen in humanen Zellen entsprechend, lag auch hier keine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen vor. Der leichte Anstieg von Tag 2 zu Tag 4 war in Parkin-dsRNA-behandelten und Kontroll-dsRNA-behandelten Zellen gleichermaßen erkennbar. Wesentlich war jedoch die Beobachtung, dass an Tag 2, dem Tag mit der deutlichsten mitochondrialen Fragmentierung, keine erhöhte Apoptose nachgewiesen werden konnte (Abb. 46).

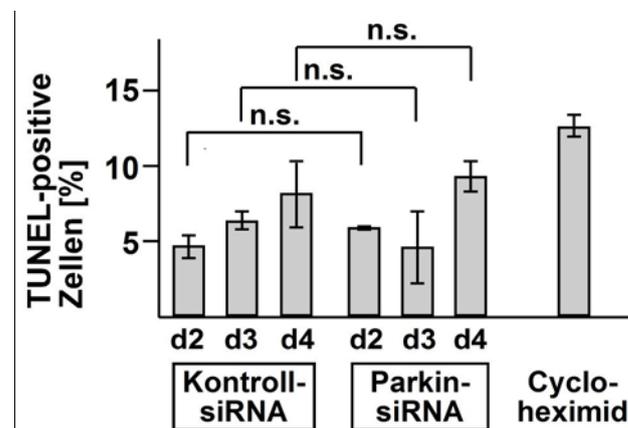


Abb. 46 Knockdown von Parkin führt in *Drosophila*-S2-Zellen nicht zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose-Rate.

S2-Zellen wurden mit Kontroll-dsRNA oder Parkin-dsRNA behandelt. Zwei, drei oder vier Tage nach Behandlung (d2, d3, d4) wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Über Fluoreszenzmarkierung von freien 3'OH-Enden in DNA-Doppelstrangbrüchen wurden apoptotische Zellen detektiert (TUNEL-Assay). Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Cycloheximid (10 μ M, 6h) behandelt. Abgebildet ist der Anteil apoptotischer Zellen unter mindestens 300 DAPI-gefärbten Zellen.

2.3.4 Zusammenfassung Teil 3

Ein reguliertes Gleichgewicht zwischen Teilungs- und Fusionsprozessen von Mitochondrien gilt als Voraussetzung für den Erhalt der normalen Zellfunktion. Eine Beeinträchtigung dieses Gleichgewichts kann weitreichende Folgen haben und in Neuronen zu Degenerationsprozessen führen. Untersuchungen zum Einfluss des Parkinson-assoziierten Gens Parkin zeigten, dass der Verlust von Parkin in humanen Zellen zu Verkürzungen und Fragmentierung der Mitochondrien führt. Dass diese

morphologischen Veränderungen auch funktionell relevant sind, wurde in der Messung des zellulären ATP-Gehalts offenbar, der in den Parkin-defizienten Zellen signifikant niedriger war. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Parkin siRNA-induzierte Fragmentierung der Mitochondrien spezifisch auf die Defizienz von Parkin zurückzuführen ist und nicht etwa das unspezifische Resultat eines Apoptoseprozesses darstellt. Die Analyse von S2 Zellen ergab, dass ein Knockdown von Parkin in *Drosophila* zwar gleiche morphologische Veränderungen verursacht, diese jedoch schwächer ausgeprägt und nur zu einem sehr frühen Zeitpunkt sichtbar sind.

3 DISKUSSION

Die für die kommenden Jahrzehnte erwartete steigende Anzahl der Parkinson-Patienten stellt nicht nur die Betroffenen und Angehörigen, sondern auch die Gesellschaft vor große soziale und wirtschaftliche Herausforderungen. Umso dringlicher ist die Aufklärung der Ursachen, die die Grundlage für zukünftige präventive, therapeutische und – im Idealfall – kurative Ansätze darstellt. Bis heute sind die Ursachen der neurodegenerativen Prozesse im Verlauf der Parkinson-Erkrankung weitgehend unbekannt. 180 Jahre nach Erstbeschreibung der Symptome gelang es 1997 erstmals, Gendefekte mit der Erkrankung in Verbindung zu bringen. Diese Entdeckung forcierte und revolutionierte die Forschung auf diesem Gebiet, so dass bis heute sechs Gene identifiziert werden konnten, die mit erblichen Formen der Erkrankung assoziiert sind. Wichtige neuropathologische Charakteristika - wie der weitgehend selektive Verlust dopaminerger Neurone der *Substantia nigra pars compacta* – werden von der sporadischen und der familiären Form der Erkrankung geteilt. Aufgrund dessen stellen die Untersuchung und funktionelle Charakterisierung Parkinson-assoziiierter Gene und entsprechender Proteine wichtige Schritte auf dem Weg zum Verständnis der Pathomechanismen dar.

Mutationen im Parkin-Gen, die zu einem Funktionsverlust von Parkin führen, sind verantwortlich für den Großteil der autosomal-rezessiv vererbten Form der Parkinson-Erkrankung. Durch Arbeiten in unserer und anderen Gruppen konnten weitreichende Einblicke in biochemische und funktionelle Eigenschaften von Parkin gewonnen werden. Untersuchungen zur Lokalisierung, transkriptionellen Regulation, Inaktivierung, Rolle in Signaltransduktionswegen sowie zum protektivem Potential trugen zu der Erkenntnis bei, dass es sich bei Parkin um eine Stress-sensitive E3-Ubiquitin-Ligase mit neuroprotektiver Funktion handelt.

Da der Großteil der bisherigen Ergebnisse aus Experimenten in Zellkultur stammt, stellt sich die Frage nach der *in vivo*-Relevanz, die in der vorliegenden Arbeit beleuchtet wurde. Im Mittelpunkt stand die Untersuchung der physiologischen Funktion von Parkin im Modellorganismus Zebrafisch (*Danio rerio*).

3.1. Spezifische biochemische und funktionelle Eigenschaften von Parkin sind zwischen Mensch und Zebrafisch konserviert

Im Zebrafischgenom konnte ein Ortholog von humanem Parkin identifiziert werden, das verschiedene spezifische Eigenschaften mit humanem Parkin teilt. Beide Gene bestehen aus 12 Exons und das erste Exon ist mit jeweils 7 Bp extrem kurz (Ensembl Genome Browser). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen ergab einen Anteil von 61,7% gleichen beziehungsweise 71,9% ähnlichen Aminosäuren und spiegelt somit die hohe Konservierung wider, die auch für andere Parkinson-assoziierte Gene im Zebrafisch gefunden wurde. Von den sechs eindeutig mit der Erkrankung in Verbindung gebrachten Genen, konnten bisher PINK1 und DJ-1 im Zebrafisch identifiziert werden. Die Sequenzhomologie für PINK1 beträgt 57,8% (Anichtchik et al., 2008) und für DJ-1 83% (Bai et al., 2006). Während es zu LRRK2 und ATP13A2 noch keine Studien gibt, ist bekannt, dass es im Zebrafisch-Genom offensichtlich kein α -Synuclein gibt (Chen et al., 2009a). Der Anteil von 61,7% identischen Aminosäuren in Zebrafisch-Parkin erhöhte sich bei isolierter Betrachtung der einzelnen Domänen auf bis zu 80% und legte nahe, dass auch funktionelle Eigenschaften von Parkin konserviert sein könnten. Die anschließende Klonierung und Expression von FLAG-Zebrafisch (zf)-Parkin in humanen Zellen ermöglichte die biochemische Charakterisierung.

Da Missfaltung von Parkin, die sowohl durch pathogene Mutationen (Cookson et al., 2003; Gu et al., 2003; Winklhofer et al., 2003) als auch durch massiven zellulären Stress (Winklhofer et al., 2003) bedingt sein kann, eine der Hauptursache für die Inaktivierung von Parkin ist, wurde zunächst untersucht, ob Zebrafisch-Parkin, das unter physiologischen Bedingungen Detergenz-löslich ist, ähnlich auf oxidativen Stress reagiert. In einem Solubilitätsassay zeigte sich, dass in Abhängigkeit von der zur Induktion von oxidativem Stress eingesetzten Wasserstoffperoxid-Konzentration ein zunehmender Anteil von Zebrafisch-Parkin in die Detergenz-unlösliche Fraktion übergeht. Da oxidativer Stress besonders die dopaminergen Neurone der *Substantia nigra* betrifft, könnte die Inaktivierung von Parkin eventuell auch bei der sporadischen Form der Erkrankung eine Rolle spielen. Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde aus der *post mortem* Untersuchung von Hirngewebe sporadischer Parkinson-Patienten gezogen, bei denen inaktiviertes Parkin vorlag, das durch Oxidationsprodukte von Dopamin kovalent modifiziert wurde

(LaVoie et al., 2005). Diese Dopamin-induzierte Missfaltung konnte nun auch für Zebrafisch-Parkin gezeigt werden. Während im Solubilitätsassay in Abhängigkeit von der Dopamin-Konzentration der Übergang von Zebrafisch-Parkin von der Detergenz-löslichen in die –unlösliche Fraktion beobachtet werden konnte, war in der Immunfluoreszenz-Analyse nach Dopamin-Behandlung die Bildung zytosolischer Aggregate sichtbar.

Um der Frage nachzugehen, ob Parkin im Zebrafisch eine Rolle in der zellulären Stressbewältigung spielt, wurde die Transkription von endogenem Zebrafisch-Parkin unter Stressbedingungen untersucht. Hierfür wurden kultivierte Zebrafisch-Pac2-Zellen mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon behandelt. Ähnlich wie zuvor für humanes Parkin in Neuroblastomzellen gezeigt (Henn et al., 2007), führte die Inkubation mit dem mitochondrialen Toxin zur Hochregulation Zebrafisch-Parkin-spezifischer mRNA. Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Stress-induzierte Transkription zu vermehrter Expression des Parkin-Proteins führt. Obwohl dieser Nachweis für Zebrafisch-Parkin in Ermangelung eines Antikörpers bisher nicht erbracht werden konnte, besteht wenig Zweifel daran, dass Transkript- und Proteinmenge im Zebrafisch ebenfalls korrelieren. Diese Annahme wird bekräftigt durch die Tatsache, dass Neuroblastomzellen durch Überexpression von Zebrafisch-Parkin vor Stress-induzierter Apoptose geschützt werden. Unter Anwendung Parkinson-relevanter Stressoren wie dem Exzitotoxin Kainat und dem Komplex I-Inhibitor Rotenon, konnte in Vektor-transfizierten Zellen ein deutlicher Anstieg apoptotischer Zellen beobachtet werden, während in Gegenwart von humanem oder Zebrafisch-Parkin kaum eine merkliche Zunahme an Zelltod feststellbar war. Diese Resultate verdeutlichen, dass Zebrafisch-Parkin analog zu humanem Parkin ein Stress-induzierbares Protein mit neuroprotektiver Aktivität ist. Da humanes Parkin als E3-Ubiquitin-Ligase fungiert und die für diese Substanzklasse charakteristische RING-Box-Domäne in Zebrafisch-Parkin hoch konserviert ist, stellte sich weiterhin die Frage, ob Zebrafisch-Parkin in der Lage ist, Ubiquitinierung zu vermitteln. Da bisher lediglich viele putative Parkin-Substrate beschrieben wurden, die noch nicht als authentische Parkin-Substrate verifiziert werden konnten, wurde die Auto-Ubiquitinierung als Surrogat-Marker für die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Zebrafisch-Parkin untersucht. Sowohl humanes als auch Zebrafisch-Parkin vermochten sich selbst zu ubiquitinieren (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Zellkultur-Analyse zeigen, dass nicht nur die Sequenz von Parkin sondern auch die Funktion sowie Mechanismen, die zur Inaktivierung führen, evolutionär konserviert sind. Somit bekräftigen sie den Einsatz des Zebrafisches als Modell-Organismus zur Untersuchung der physiologischen Funktion von Parkin.

3.2. Der Zebrafisch eignet sich als Modell-Organismus zur Untersuchung der Funktion von Parkin

Ein beständiges Diskussionsthema in der medizinischen Forschung ist die *in vivo*-Relevanz von Ergebnissen, die *in vitro* generiert werden. Der Einsatz von *in vitro*-Systemen ist limitiert, da sie nicht die ganze Bandbreite biologischer *in vivo*-Prozesse wiedergeben können. Hinsichtlich der Morphogenese gibt es beispielsweise keine Alternative zum Tiermodell. Der Zebrafisch kann als Bindeglied zwischen Zell- und Entwicklungsbiologie eingesetzt werden und findet bereits breite Anwendung in der medizinischen Wissenschaft. Neben der Erforschung des kardiovaskulären Systems (Stainier, 2001) werden Zebrafische unter anderem zur Untersuchung des Immunsystems (Langenau und Zon, 2005) eingesetzt oder dienen als Modell für bestimmte Krebsarten (Berghmans et al., 2005).

Da Zebrafische zu den Vertebraten gehören, könnten Studienergebnisse direkter auf den Menschen anwendbar sein als Ergebnisse, die mit den Nicht-Vertebraten-Modellen *Drosophila melanogaster* oder *C. elegans* erzielt werden. Abgesehen davon, können letztere nicht zur Untersuchung Vertebraten-spezifischer Merkmale (z.B. Niere, mehrkammriges Herz oder Neuralleiste) verwendet werden. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass sich der Zebrafisch durch viele Eigenschaften auszeichnet, die ihn als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen befähigen. Das zentrale Nervensystem setzt sich aus dem Rückenmark, Hinter-, Mittel- und Vorderhirn zusammen und ähnelt somit im Aufbau den Gehirnen anderer Vertebraten. Insbesondere solche Bereiche, die bei humanen Erkrankungen betroffen sind, sind strukturell konserviert. Die Charakterisierung des dopaminergen Systems und die Identifizierung eines homologen nigrostriatalen Systems prädestinieren den Zebrafisch als Modell für die Parkinson-Erkrankung.

3.2.1 Über Inhibition des Spleißvorgangs kann im Zebrafisch ein Knockdown von Parkin erzielt werden

Zur Untersuchung der Parkin-Funktion im Zebrafisch wurde zunächst eine mRNA-Expressionsanalyse durchgeführt, um Einblicke in die räumliche und zeitliche Verteilung von Parkin zu erhalten. Parkin-mRNA konnte in den frühesten Stadien der Entwicklung nachgewiesen werden, was bedeutete, dass maternale Parkin-mRNA bereits in der Oozyte vorliegt. *In situ*-Hybridisierungen zeigten, dass Parkin ubiquitär vorhanden ist (Daten nicht gezeigt). Diese Erkenntnisse stellten den Ausgangspunkt für die folgenden Untersuchungen dar. Unter Verwendung von *Antisense*-Oligonukleotiden wurde ein transienter Knockdown von Parkin durchgeführt, um die Frage zu klären, ob Parkin eine Rolle in der frühen Entwicklung spielt und/oder ob bestimmte Merkmale der Parkinson-Erkrankung durch den Verlust von Parkin im Zebrafisch nachgeahmt werden können. Durch die Wahl eines *Antisense*-Oligonukleotids, das durch Inhibierung einer Spleiß-Donor-Stelle zum inkorrekten Spleißen der prä-mRNA führt, wurde die Verifizierung und Quantifizierung des Knockdowns ermöglicht. Mittels semi-quantitativer *real time* PCR ließ sich die Knockdown-Effizienz auf 52% (Tag 1) bis 63% (Tag 3) beziffern. Diese Methode gab jedoch keine Auskunft über die Konsequenz des fehlerhaften Spleißvorgangs, so dass letztendlich zwei Möglichkeiten blieben. Durch das Vorliegen vorzeitiger Stoppcodons würde bei einer Exon-Deletion ein Protein mit einer Länge von vier Aminosäuren, bei einer Intron-Retention ein Protein mit einer Länge von 65 Aminosäuren entstehen. In beiden Fällen handelt es sich um stark trunkierte Proteine, die den Funktionsverlust von Parkin gewährleisten. Die optische Analyse der Parkin-Knockdown-Zebrafische brachte keine Hinweise auf äußerliche, morphologische Veränderungen innerhalb der ersten sechs Tage der Entwicklung. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Gruppen, die Parkin- beziehungsweise DJ-1-Knockdown-Zebrafische untersucht haben (Bretaud et al., 2007; Flinn et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurde für den Knockdown von PINK1 ein neurodegenerativer Phänotyp gezeigt, der sich in Form unterschiedlich starker Schwanzverkürzung, vergrößerter Ventrikel und kleinerer Köpfe äußerte (Anichtchik et al., 2008) und durch mRNA-Injektion teilweise revertiert werden konnte. Da dieser Effekt von anderen Gruppen (unveröffentlichte Daten) nicht reproduziert werden konnte, bleibt die Aussage fraglich. Weiterhin zeigte sich an diesem Beispiel die Schwachstelle aller

Antisense-Methoden. Häufig auftretende unspezifische Effekte (Eisen und Smith, 2008) machen es teilweise schwierig, einen spezifischen *Antisense*-bedingten Phänotyp von einer unspezifischen Nebenwirkung zu unterscheiden. In 15% bis 20% aller *Antisense*-Knockdown-Experimente treten unspezifische Nebenwirkungen auf, die oftmals auf die Aktivierung von p53 und p53-induzierter Apoptose zurückzuführen sind (Eisen und Smith, 2008; Ekker und Larson, 2001; Robu et al., 2007). Verschiedene Vertreter der *Antisense*-Oligonukleotide wie Morpholinos und griPNATM, die sich lediglich im Aufbau des nukleaseresistenten Rückgrats unterscheiden, sind dabei gleichermaßen betroffen (Robu et al., 2007). Im Falle des DJ-1-Knockdowns im Zebrafisch konnte eine solche transkriptionelle Hochregulation von p53 nachgewiesen werden (Bretaud et al., 2007). Bei der Analyse auf zellulärer und subzellulärer Ebene wurde der Focus auf Strukturen gelegt, die typischerweise bei der Parkinson-Erkrankung betroffen sind.

3.2.2 Die mitochondriale Morphologie und Funktionalität wird durch den Parkin-Knockdown nicht beeinträchtigt

Die Analyse mitochondrialer Dynamik im Parkin-Knockdown-Zebrafisch gründete auf zwei Erkenntnisse, die im Teil 3.3. ausführlicher beschrieben werden: Im Drosophila-Modell kam es unter Parkin-Defizienz zu einem ausgeprägten mitochondrialen Phänotyp (Deng et al., 2008; Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004; Whitworth et al., 2005) und für humanes Parkin und PINK1 konnte in unserer Gruppe eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen mitochondrialen Fusions- und Teilungsprozessen beobachtet werden. Im Gegensatz zu humanen Zellen, in denen der Knockdown von Parkin zu mitochondrialer Fragmentierung führt, zeigte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der angefärbten Mitochondrien in Parkin-Knockdown-Zebrafischen keine Hinweise auf Veränderungen des tubulären mitochondrialen Netzwerks. Die zusätzliche Inkubation in einem mitochondrialen Toxin ermöglichte ebenfalls keine Aussage darüber, ob der Knockdown von Parkin in Zebrafischembryonen zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber exogener Stressoren führt. Die Bewertung dieser Ergebnisse muss jedoch unter Berücksichtigung der experimentellen Limitierung erfolgen. Voraussetzung für die Beobachtung der

mitochondrialen Dynamik ist ein Zelltyp mit großem zytoplasmatischem Raum, der die freie Verteilung des mitochondrialen Netzwerks gewährleistet. Im Zebrafisch findet man derartige Zellen ausschließlich in der äußeren Hautschicht, da andere Zellen meist durch einen großen Zellkern gekennzeichnet sind. Die Mitochondrien im vergleichsweise engen zytoplasmatischen Raum neuronaler Zellen konnten mit den vorhandenen mikroskopischen Methoden nicht den Erfordernissen entsprechend dargestellt werden. Infolgedessen erfolgte die Analyse anhand der eher robusten Hautzellen, so dass nicht bekannt ist, ob der Verlust von Parkin in diesen Zellen überhaupt in der Lage ist, einen mitochondrialen Phänotyp zu induzieren. Eine ähnliche Problematik trat mit Fibroblasten von Patienten mit Charcot-Marie-Tooth Typ 2A-Erkrankung auf, in denen trotz Mutation in Mitofusin 2 kein Fusionsdefekt nachweisbar war (Amiott et al., 2008). Obwohl sowohl Parkin als auch Mfn2 ubiquitär exprimiert werden, ist es möglich, dass die Symptomatik des Funktionsverlusts auf spezifische Gewebe und Zelltypen beschränkt ist. Dies könnte auch ein Grund sein, warum kein Unterschied im mitochondrialen Membranpotential zwischen Parkin-Knockdown-Embryonen und Kontroll-Embryonen feststellbar war. Da für die Messung Mitochondrien aus den kompletten Embryonen isoliert wurden, könnte der Effekt der eventuell stärker betroffenen neuronalen Mitochondrien in der Gesamtzahl verdünnt werden. Feine Unterschiede wären somit zwischen Kontrollen und Knockdown-Embryonen nicht detektierbar.

3.2.3 Der Parkin-Knockdown führt nicht zum Verlust dopaminerger Neurone

Die Untersuchung dopaminerger Neurone erfolgte mittels *in situ*-Hybridisierung unter Verwendung einer Tyrosinhydroxylase-Sonde. Demgemäß wurden alle Neurone, die Tyrosinhydroxylase-mRNA enthalten, angefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Sowohl innerhalb der Kontroll-Gruppe als auch innerhalb der Parkin-Knockdown-Gruppe waren auffällige Unterschiede im Verteilungsmuster der Färbung erkennbar. Im Zebrafisch-Gehirn sind die dopaminergen Neurone, die dem humanen mesencephalischen nigrostriatalen System entsprechen, im ventralen *Diencephalon* lokalisiert und sitzen somit sehr tief im Gewebe. Eine erfolgreiche Färbung dieser Zellen

setzt voraus, dass die Permeabilisierung der Zebrafischlarven sowie der vielschrittige Hybridisierungsprozess einwandfrei und für alle Larven gleich verläuft, damit die Sonde ungehindert in alle dopaminergen Zellen gelangen kann. Schwankungen in der Penetrationseffizienz könnten somit eine Ursache für die interindividuellen Unterschiede sein. Als weitere Analysenmethode wurde die semi-quantitative *real time* PCR eingesetzt. Die relative Menge an Tyrosinhydroxylase-mRNA wurde in Parkin-Knockdown-Larven im Vergleich zu Kontroll-Larven bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass der Tyrosinhydroxylase-Gehalt in den Parkin-Knockdown-Larven sehr variabel ist. Während die durch den Knockdown reduzierte Menge an Parkin-mRNA zwischen 32% und 49% betrug, schwankte die Menge an Tyrosinhydroxylase-mRNA zwischen 33% und 159%. Anhand des Durchschnittswerts aus fünf unabhängigen Experimenten war kein Verlust dopaminergere Neurone erkennbar. Es bleibt fraglich, ob der Tyrosinhydroxylase-Gehalt auch in Kontroll- und Wildtyp-Larven Schwankungen unterliegt und worauf diese Variabilität beruht. Da der Tyrosinhydroxylase-Gehalt - bezogen auf den Gesamt-Embryo-Extrakt - sehr gering ist, stößt die Methode vermutlich an die Grenze der Detektierbarkeit und Zuverlässigkeit. Analoge Schwankungen wurden bei der Bestimmung des Dopamin-Gehalts mittels HPLC (Dominik Paquet, unveröffentlichte Ergebnisse) beobachtet. Untersuchungen anderer Gruppen führten bislang ebenfalls zu uneinheitlichen Resultaten. Eine 20%ige Reduktion der Tyrosinhydroxylase-positiven Neurone in Zebrafischembryonen wurde von einer anderen Gruppe für einen Knockdown von Parkin beschrieben (Flinn et al., 2009). Eine mögliche Erklärung für diese, von unseren Daten abweichenden Ergebnisse, könnten die unterschiedlichen Konsequenzen der Knockdown-Strategien sein. Während der von uns durchgeführte Knockdown durch Verlust von Exon 2 beziehungsweise Retention von Intron 2 zu einem Protein bestehend aus vier Aminosäuren oder 65 Aminosäuren führte, erreichten Flinn et al. durch Verlust von Exon 9 eine Deletion von 51 Aminosäuren innerhalb der Nahe am C-Terminus gelegenen *in between* RING (IBR)-Domäne. Aus Untersuchungen unserer Gruppe ist bekannt, dass Deletionen innerhalb des Bereichs der RING *between* RING (RBR)-Domäne die Missfaltung und Aggregation von Parkin verursachen (unveröffentlichte Ergebnisse). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das durch den Knockdown entstehende mutierte Parkin durch Missfaltung toxische Effekte verursachen kann, die einen Einfluss auf dopaminerge Neurone haben. Unseren

Beobachtungen entsprechend konnte in DJ-1-Knockdown-Zebrafischen (Bretaud et al., 2007) und PINK1-Knockdown-Zebrafischen (Dominik Paquet, unveröffentlichte Ergebnisse) kein Verlust dopaminerger Neurone beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde von anderen Gruppen in PINK1-defizienten Zebrafisch-Modellen, für die auch Veränderungen der äußeren Morphologie gezeigt wurden, eine Reduktion dopaminerger Zellen um 30% beziehungsweise 9% (53% in einem bestimmten Cluster) nachgewiesen (Anichtchik et al., 2008; Xi et al., 2010). In adulten PINK1-Knockout-Reisfischen, die durch Verwendung der TILLING-Technologie generiert wurden, war jedoch kein Verlust dopaminerger Neurone sichtbar (Matsui et al., 2009). Ähnlich kontroverse Daten liegen aus Parkin-defizienten Modellen in *Drosophila melanogaster* vor. Während zwei Gruppen keinen Verlust dopaminerger Neurone feststellen konnten (Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004), wurde von anderen ein signifikanter Verlust in einem der insgesamt sechs dopaminergen Zell-Cluster (Whitworth et al., 2005) beziehungsweise eine Zellschrumpfung verbunden mit verminderter Immunreaktivität in einem anderen Cluster beobachtet (Cha et al., 2005). Weiterhin wurde von verschiedenen Gruppen trotz Untersuchung der gleichen α -Synuclein-transgenen Fliegen-Linie entweder ein Verlust dopaminerger Neurone oder keinerlei Schädigung dieser Population beschrieben. Daher wird auch in diesem Feld die Sensitivität verschiedener Detektionsmethoden als Ursache diskrepanter Ergebnisse diskutiert (Whitworth et al., 2006). Sowohl in verschiedenen Parkin-Knockout-Maus-Modellen, die durch Deletion von Exon 2, 3 oder 7 charakterisiert sind (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003; Perez und Palmiter, 2005; Von Coelln et al., 2004b), als auch in der Parkin-/DJ-1/PINK1-Dreifach-Knockout-Maus (Kitada et al., 2009) und im Parkin-defizienten *C. elegans*-Modell (Springer et al., 2005) konnte keine Degeneration dopaminerger Neurone nachgewiesen werden.

Diese Fülle unterschiedlicher Ergebnisse zeigt, dass noch keine endgültige Aussage über den Einfluss Parkinson-assoziiierter Gene auf die dopaminergen Systeme verschiedener Tiermodelle möglich ist. In unserem Fall wird die Untersuchung Parkin-defizienter Zebrafischlarven mit Hilfe von Immunfärbungen fortgesetzt. Allerdings bleibt die generelle Frage, ob eine Knockdown-Effizienz von 50% bis 60% ausreichend ist, um eine phänotypische Veränderung auszulösen.

3.2.3 Ein Parkin-transgenes Zebrafisch-Modell dient der *in vivo*-Evaluierung des neuroprotektiven Potentials von Parkin

Zebrafische zeichnen sich gegenüber anderen Tiermodellen besonders durch ihre relativ einfache genetische Manipulierbarkeit und ein breites Fluoreszenz-basiertes Methodenspektrum aus, das die *in vivo*-Visualisierung pathologischer Prozesse ermöglicht. Weiterhin werden Substanzen, die im Umgebungsmedium gelöst vorliegen, schnell von Zebrafischembryonen aufgenommen. Dadurch eignen sie sich nicht nur als prä-klinisches Modell für groß angelegte *Screens* nach potentiellen neuen Wirkstoffen (Parng et al., 2002), sondern können auch zur Untersuchung pathogener Bedingungen eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden Parkin-transgene Zebrafische als neues Vertebraten-Modell zur *in vivo*-Untersuchung der neuroprotektiven Funktion von Parkin generiert. Die Coexpression von Parkin und DsRed wurde in den transgenen Fischen mit Hilfe des aus zwei Konstrukten bestehenden Gal4/UAS-Expressionssystems erreicht. Dabei steuerte der Promotor EF1 α die ubiquitäre Expression, die der Expression endogenen Parkins nachempfunden ist. Die Coexpression des fluoreszierenden Proteins DsRed ermöglicht die schnelle Identifizierung transgener Zebrafischembryonen, so dass auf aufwendigere Analysemethoden wie z.B. PCR verzichtet werden kann. Der Nachweis für die überlappende Expression von Parkin und DsRed wurde mittels immunhistochemischer Analyse erbracht. Obwohl die zygotische Gentranskription im Zebrafisch erst nach der zehnten Zellteilung circa drei Stunden nach Fertilisation einsetzt (Kimmel et al., 1995), konnte bereits nach sechs Stunden Parkin mittels Western Blot detektiert werden.

Um das neuroprotektive Potential von Parkin in diesem neuen Vertebratenmodell zu evaluieren und um zu überprüfen, ob Parkin-Knockdown-Zebrafischembryonen vulnerabler im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen sind, sollten die Embryonen verschiedenen Parkinson-assoziierten Stressoren ausgesetzt werden. Diese wurden zunächst an Wildtyp-Zebrafischembryonen getestet. Die verschiedenen exzitatorischen Substanzen und mitochondrialen Toxinen führten zwar in hohen Konzentrationen alle zum Tod, doch in keinem der Fälle waren die Effekte der Toxine steuerbar. Es handelte sich vielmehr um einen „Alles oder Nichts“-Effekt, da der Anteil sterbender Zellen entweder nicht über das basale Apoptose-Maß hinausging oder bereits Teile des

Organismus flächendeckend betroffen waren. Für verschiedene Toxine wurden ähnliche Effekte zuvor bereits beschrieben. Insbesondere Rotenon hat nur einen engen Konzentrationsbereich, in dem sich toxische Effekte manifestieren, ohne dass Fische sterben (Bretaud et al., 2004; Cheng und Farrell, 2007). Als mögliche Ursache wird diskutiert, dass Komplex II kurzfristig den Funktionsverlust von Komplex I kompensiert und die mitochondriale Atmungskette bis zu einem gewissen Grad aufrechterhalten werden kann (Cheng und Farrell, 2007). Unter Behandlung mit MPTP (Flinn et al., 2008; Sallinen et al., 2009) und 6-Hydroxydopamin (Flinn et al., 2008) konnte ebenfalls trotz auffälliger lokomotorischer Einschränkungen kein Zelltod gezeigt werden. Die Hitzeschock-Behandlung wurde als weiterer Stressor eingesetzt, da proteotoxischer Stress oberhalb eines kritischen Schwellenwerts Apoptose auslösen kann (Jolly und Morimoto, 2000) und dies bereits im Zebrafisch-Modell nachgewiesen wurde (Yabu et al., 2001). Es zeigte sich, dass eine einstündige Temperaturerhöhung von 28,5°C auf 39°C mit anschließender achtstündiger Regenerationszeit in zwei Tage alten Zebrafischembryonen zu einem mikroskopisch quantifizierbaren Anstieg des Zelltods im Rückenmark führte, ohne dass Änderungen in der Morphologie, der Vitalität oder dem Verhalten auftraten. Die protektive Funktion von Parkin konnte mit diesem experimentellen Ansatz *in vivo* bestätigt werden, da sich im Rückenmark von Parkin-Knockdown-Embryonen signifikant mehr sterbende Zellen detektieren ließen als in den Kontroll-Embryonen. Weiter untermauert wurde dieses Ergebnis durch die Tatsache, dass Parkin-transgene Zebrafischembryonen im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistern weniger Hitzeschock-induzierten neuronalen Zelltod zeigten.

Parkin-transgene Zebrafische können zukünftig mit transgenen Zebrafisch-Modellen für andere neurodegenerative Erkrankungen - wie den bereits existierenden Tau- und α -Synuclein-transgenen Zebrafischen - ausgekreuzt werden, um herauszufinden, ob Parkin einen Einfluss auf pathologische Veränderungen hat und diese eventuell vermindern kann.

3.3 Der Verlust von Parkin führt in humanen SH-SY5Y-Zellen und in Drosophila-S2-Zellen zu verstärkter mitochondrialer Fragmentierung

Mitochondriale Integrität ist Voraussetzung für die zelluläre Energieproduktion. Störungen des mitochondrialen Systems bis hin zur Dysfunktion wirken sich insbesondere auf solche Zellen und Gewebe aus, die durch einen hohen Energiebedarf gekennzeichnet sind. Neben der Herz- und Skelettmuskulatur trifft dies vor allem auf das Gehirn zu, in dem sich Beeinträchtigungen der mitochondrialen Funktion in Form neurodegenerativer Prozesse manifestieren können. Verschiedene mitochondriale Angriffspunkte wie Komplex I der Atmungskette (Mizuno et al., 1989; Schapira et al., 1989) oder mitochondriale DNA (Bender et al., 2006) wurden in der Vergangenheit mit der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht. Ein Zusammenhang mit Parkinson-assoziierten Genen konnte jedoch erst in jüngerer Zeit hergestellt werden und wird seitdem verstärkt untersucht. Verschiedene Beobachtungen deuteten darauf hin, dass Parkin mit der mitochondrialen Integrität verknüpft sein könnte. So wurde gezeigt, dass das vornehmlich zytosolische Parkin mit der äußeren mitochondrialen Membran assoziiert sein kann (Darios et al., 2003a; Stichel et al., 2000), Zellen vor mitochondrialen Toxinen schützt [MPTP (Hyun et al., 2005; Paterna et al., 2007), Rotenon (Casarejos et al., 2006; Henn et al., 2007; Rosen et al., 2006)] und die Freisetzung von pro-apoptotischem Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum verhindern kann (Berger et al., 2009; Darios et al., 2003a). Während sich der mitochondriale Phänotyp in Parkin-Knockout-Mäusen auf eine leichte Abnahme von Proteinen, die die Komplexe I und IV der Atmungskette bilden, beschränkte (Palacino et al., 2004), konnte in Parkin-defizienten Fruchtfliegen eine deutliche mitochondriale Pathologie nachgewiesen werden, die sich auf subzellulärer Ebene in Form geschwollener Mitochondrien mit geschädigter Cristae-Struktur zeigte (Deng et al., 2008; Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004; Poole et al., 2008) und Ursache für die apoptotische Degeneration der Flugmuskulatur und lokomotorische Defekte war. Dass Parkin möglicherweise eine modulierende Rolle in Prozessen spielt, die die mitochondriale Morphologie und Dynamik steuern, konnte

ebenfalls in verschiedenen Studien in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden (Deng et al., 2008; Park et al., 2009b; Poole et al., 2008).

Da der Einfluss von Parkin auf mitochondriale dynamische Prozesse in humanen Zellen bisher nicht Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten war, wurden die Auswirkungen eines Parkin-Knockdowns in humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen analysiert. Durch Behandlung der Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden wurde eine effiziente Reduktion von Parkin erreicht, die mittels Western Blot auf Protein-Ebene und mittels semi-quantitativer *real time* PCR auf mRNA-Ebene nachweisbar war. Die mitochondrialen Konsequenzen ließen sich anschließend fluoreszenzmikroskopisch beobachten. Das in einem Großteil der Zellen unter physiologischen Bedingungen vorliegende tubuläre Netzwerk war in Folge des Parkin-Knockdowns in deutlich weniger Zellen vorhanden. Stattdessen konnten in der Mehrzahl der Zellen drastisch verkürzte bis fragmentierte Mitochondrien beobachtet werden. Dieser Phänotyp entsprach den Ergebnissen, die durch Knockdown von PINK1 in SH-SY5Y-Zellen (Daten nicht gezeigt) beziehungsweise HeLa-Zellen (Exner et al., 2007) erzielt wurden. Die funktionellen Folgen dieser morphologischen Veränderung zeigten sich bei der Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts, der in Parkin-Knockdown-Zellen um mehr als 30% reduziert war. Ein ähnlicher Effekt war zuvor bereits in Fibroblasten von Parkinson-Patienten mit Parkin-Mutation festgestellt worden (Mortiboys et al., 2008). In gleicher Weise führte der Knockdown von PINK1 zur Reduktion des zellulären ATP-Gehalts, was in unserer Gruppe (Daten nicht gezeigt) und anderen Gruppen nachgewiesen werden konnte (Gegg et al., 2009; Liu et al., 2009).

Die Ursachen der veränderten Morphologie bedurfte weiterer Analysen, da mitochondriale Fragmentierung auch ein erstes Anzeichen eines Apoptose-Prozesses sein kann. In der Modellvorstellung der intrinsischen Apoptose-Kaskade kommt es entweder durch In/Aktivierung anti/pro-apoptotischer Proteine der Bcl.2-Familie oder durch Öffnung der *mitochondrial membrane transition pore* zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran. Dies führt zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c, Smac/Diablo oder AIF aus dem Intermembranraum ins Zytosol, wo durch Aktivierung weiterer Zielproteine der Zelltod eingeleitet wird. Im Zeitraum zwischen der Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bax und der Permeabilisierung der äußeren Membran kann verstärkte mitochondriale Teilung beobachtet werden (Martinou und

Youle, 2006). Warum sich die Mitochondrien zu Beginn der Apoptose-Kaskade exzessiv teilen, ist bislang ungewiss. Es ist jedoch bekannt, dass dies eine Voraussetzung für den apoptotischen Prozess ist, Fragmentierung *per se* jedoch nicht zu Apoptose führen muss (Knott et al., 2008). Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob es sich bei der Parkin-Knockdown-induzierten Fragmentierung um einen spezifischen mitochondrialen Phänotyp handelt oder um einen Teilabschnitt eines apoptotischen Prozesses. Die Analyse erfolgte durch Detektion von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL-Assay und ergab keinerlei Hinweis auf einen apoptotischen Prozess in Parkin-defizienten Zellen. Dies galt sowohl für den Zeitpunkt, an dem die Fragmentierung experimentell untersucht wurde (Tag 3 nach siRNA-Transfektion), als auch für die Tage 1, 2 und 4, die einbezogen wurden, um eventuell vorangegangene beziehungsweise nachfolgende apoptotische Prozesse nicht zu übersehen.

Im Laufe der mitochondrialen Analyse wurde deutlich, dass die von uns erhaltenen morphologischen Daten in deutlichem Widerspruch zu den in *Drosophila* postulierten Abläufen und Mechanismen stehen. Im Fliegen-Modell war man von der Beobachtung des Parkin-Knockdown-Phänotyps, der durch verkürzte Lebenserwartung, lokomotorische Defekte und apoptotische Degeneration der Flugmuskeln gekennzeichnet ist (Deng et al., 2008; Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004; Poole et al., 2008; Whitworth et al., 2005), auf mitochondriale Defekte gestoßen, die nachfolgend mittels elektronenmikroskopischer Analyse als Schwellung der Mitochondrien mit Schädigung der Cristae-Struktur beschrieben wurden (Deng et al., 2008; Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004; Poole et al., 2008). Da diese Pathologie beziehungsweise Teile der lokomotorischen Effekte durch Knockdown mitochondrialer Fusionsproteine beziehungsweise Überexpression eines Fissionsproteins revertiert werden konnte, wurde postuliert, dass Parkin die mitochondriale Teilung fördert, ohne dass Evidenzen für Veränderungen der mitochondrialen Dynamik gezeigt wurden. Um diese Informationslücke zu schließen und einen direkten Vergleich mitochondrialer Prozesse zwischen humanen und *Drosophila*-Zellen zu erhalten, wurde in *Drosophila*-S2-Zellen ein Parkin-Knockdown durchgeführt. Die morphologische Analyse zeigte, dass Parkin-Defizienz auch hier zu einer verstärkten Fragmentierung führt. Im Gegensatz zu humanen Zellen war dieser Effekt jedoch schwächer ausgeprägt und vornehmlich an Tag 2 nach Knockdown-Behandlung zu

beobachten. Interessanterweise trat ab Tag 3 sowohl in Kontroll- als auch in Parkin-Knockdown-Zellen ein dichtes Netzwerk dünner, fadenförmiger Mitochondrien in Erscheinung, das die Detektion fragmentierter Mitochondrien erschwerte. Dieses Netzwerk könnte auch die Ergebnisse anderer Gruppen erklären, die verlängerte Mitochondrien und ein hoch vernetztes mitochondriales Netzwerk in Parkin-defiziente S2-Zellen beschrieben, ihre morphologische Analyse jedoch lediglich an Tag 3 beziehungsweise 4 nach Parkin-Knockdown durchgeführt hatten (Poole et al., 2008; Ziviani et al., 2010). Die neuerliche These, dass Parkin die mitochondriale Teilung fördert, stützte sich demnach auf unvollständige Daten da frühe Zeitpunkte nicht untersucht wurden. Dass der Zeitpunkt der morphologischen Analyse nicht nur in Fliegenzellen eine wichtige Rolle spielt, zeigt auch die Tatsache, dass nach 12-tägiger PINK1-siRNA-Behandlung in humanen Neuroblastomzellen keine mitochondriale Fragmentierung sichtbar war (Gegg et al., 2009). Somit wird deutlich, dass die diskrepanten Ergebnisse vor allen Dingen durch den Zeitpunkt der morphologischen Analyse bedingt sind. Mitochondriale Fragmentierung ist ein früher Phänotyp, der nicht nur in humanen und *Drosophila*-Zellen sondern auch in primären Maus-Neuronen beobachtet werden konnte (Lutz et al., 2009). Vermutlich durch Aktivierung zeitnaher kompensatorischer Mechanismen ist die Präsenz ausgeprägter Fragmentierung zeitlich limitiert. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass Fragmentierung unter transientem Knockdown stärker zu Tage tritt als unter stabilen Knockdown-Bedingungen.

4 MATERIAL

4.1 Biologisches Material

4.1.2 Zelllinien

SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzellen	DSMZ-Nr. ACC 209
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	ATCC-Nr. CRL-1573
Pac2	<i>Danio rerio</i> Fibroblasten	Nicholas Foulkes (KIT, Karlsruhe) (Vallone et al., 2007)
S2	<i>Drosophila melanogaster</i>	(Schneider, 1972)

4.1.3 Zebrafischlinien

Wildtyp-Linie AB (George Streisinger, Institute of Neuroscience, University of Oregon, USA)

Wildtyp-Linie TLF (Tübingen Long Fin), (C. Nüsslein-Volhard, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen).

4.1.4 Vektoren und Plasmide

pcDNA 3.1 Zeo+	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV Tag 2B	Stratagene, La Jolla, USA
pCS2+	R. Rupp, LMU München (http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors/home)
pEYFP	Clontech, Mountain View, USA
pBEF1 α -Gal4-VP16	R. W. Köster, HelmholtzZentrum München
pCS-TP	K. Kawakami, National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan
pB-SK zTH	W. Driever, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
HA-Ubiquitin	(Krappmann et al., 1996)

4.1.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen

4.1.6 Antikörper

hP1	Parkin	polyklonal	(Winklhofer et al., 2003)
PRK8	Parkin	monoklonal	(Pawlyk et al., 2003)
#4230	Parkin	polyklonal	Cell Signaling, Danvers, USA
FLAG M2 (F3165)	FLAG	monoklonal	Sigma, Taufkirchen
β -Aktin (AC-74)	Aktin	monoklonal	Sigma, Taufkirchen
GAPDH	GAPDH	monoklonal	Ambion, Austin, USA
HA-HRP 3F10	HA	monoklonal	Roche, Mannheim
aktive Caspase-3 akt.	Caspase-3	polyklonal	Promega, Mannheim

Sekundärantikörper

Esel-anti-Kaninchen Antikörper (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
Schaf-anti-Maus Antikörper (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen Antikörper (Cy3-gekoppelt)	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Maus Antikörper Alexa-488-gekoppelt	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.7 Enzyme und Proteine

BSA	USB, Cleveland, USA
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

T3 RNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.8 Standardgrößenmarker für Proteine und DNA

See Blue Plus 2	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Primername	Sequenz [5' - 3']
Sequenzierprimer:	
pME18S-FL for	CTGCTCCTCAGTGGATGTTGCC
pME18S-FL rev	GGTGTGGGAGGTTTTTCTCTAG
pCS2+ for	GTCGGAGCAAGCTTGATTTA
pCS2+ rev	GTGGTTTGTCCAACTCATCA
Klonierprimer:	
hP- Xba I-F	GCTCTAGAGCCACCATGATAGTGTGGTTCAG
d179- Xba I-R	TGCTCTAGACTACACGTGCAACCACTGGTCCC
MI3-FP	TGTAACACGACGGCCAGT
MI3-RP	CAGGAAACAGCTATGACC
Zf-Parkin for	ATGATCGTTTTTCGTGCGGTT
Zf-Parkin rev	TCATTGCAACCAATGGTTTC
Zf-Parkin Hind III ATG for	CCCAAGCTTGCCACCATGATCGTTTTTCGTGCGG
Zf-Parkin Xho I rev 2	CGCCTCGAGTCATTGCAACCAATGGTTTCCC
Primer für RT-PCR:	
Zf-Park-Ex 2 for	GCGAGTGTGTCTGAGCTGAA
Zf-Park-Ex 5 rev 2	TCTGCCATTACAGCCTTGTG
Primer für quantitative <i>real time</i> PCR	
Zf-Parkin-E23F	ACGAGAGCTCTGCAATGAATCC
Zf-Parkin E23R	ACATGAACCGTGCTCTGCTC
Zf-Parkin-E23M (TaqMan-Sonde)	ATCACAGCCCTGAAGTGT
Zf-Parkin-E23F_2	CGAGAGCTCTGCAATGAATCCA
Zf-Parkin-R23R_2	GGGAGGACCATGAAC
Zf_Parkin-E23M2 (TaqMan-Sonde)	TTCAGGGCTGTGATCTC
Zf-Bactin1-E45F	GCTCTCTCCAGCCTTCCTT
Zf-Bactin1 E45R	TCGCACTTCATGATGGAGTTGA
Zf-Bactin1-E45M1 (probe)	CTGGGTATGGAATCTT
Zf-Tyrosinhydroxylase-E56F	GGAGAACCAATTCCTAGAGTGGACTA
Zf-Tyrosinhydroxylase-E56R	GATCTCGGAGGGTGGAGTAGA
Zf-Tyrosinhydroxylase-E56M (TaqMan-Sonde)	CCTCCCGCCATGTTT
gripNAs	
ZF-Parkin gt	TTACCTGAAGTGTGGATT
ZF-Parkin gt MM	AAGACCTCTGTCTCGACC
Primer für dsRNA Synthese	
T7-Parkin-F	TAATACGACTCACTATAGGGCTGTTGACACGCGAGGAGT
T7-Parkin R	TAATACGACTCACTATAGGGATTTTGGACAGGGCTTTGTG

4.2 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acridin Orange	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer Mannheim,
Ammoniumpersulfat (APS)	USB, Cleveland, USA
ANTI-FLAG® M-affinity gel	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP)	Sigma, Taufkirchen
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Roth, Karlsruhe
Concanavalin A	Sigma, Taufkirchen
Cycloheximid	Sigma, Taufkirchen
4', 6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
3, 3'-Dihexylcarbocyaniniodid (DiOC6(3))	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma, Taufkirchen
Domoinsäure	Sigma, Taufkirchen
Dopaminhydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	USB, Cleveland, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
FluorSave Reagent	Calbiochem/ Merck, Darmstadt
L-Glutamat	Sigma, Taufkirchen
Glyzerin	USB, Cleveland, USA
Immersionsöl	Merck, Darmstadt

Instant-Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Kainat	Calbiochem, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Levamisol	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
MG 132	Merck, Darmstadt
MitoTracker CMXRos	Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
PBS Dulbecco's +/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Dulbecco's -/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol/Choroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	Roth, Karlsruhe
Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rotenon	Sigma, Taufkirchen
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
TaqMan Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth; Karlsruhe
Tissue-Tek OCT compound	Sakura Finetec Europe, Zoeterwoude, Niederlande
Tricain	Sigma, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB, Cleveland, USA

Triton X-100	USB, Cleveland, USA
Trypan Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	USB, Cleveland, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt

4.3 Lösungen und Puffer

Acridin Orange-Lösung	9 µg/mL in Embryo Medium E3
APS-Lösung	10% Ammoniumperoxodisulfat in PBS
Blockierlösung (Western Blot)	5% Magermilchpulver in 1x PBST
Blockierpuffer (IF)	5% BSA 0,1% Tween 20 in PBS
Blockierpuffer (ISH)	10% fötales Kälberserum 1% DMSO 0,1% Tween20 in PBS
BCIP (ISH)	50 mg/mL 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in Dimethylformamid
Embryomedium E3	5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl ₂ 0,33 mM MgSO ₄
DEPC-Wasser	1 mL DEPC in 1l H ₂ O über Nacht bei 37°C rühren danach autoklavieren
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25% Bromphenolblau 30% Glyzerin
Eindeckelmedium (IF, Gefrierschnitte)	2,4 g Mowiol 6 g Glyzerin 6 mL H ₂ O 12 mL 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 DAPI (1:4000)

HYB- -Puffer (ISH)	Formamid 50% 5x SSC 0,1% Tween-20
HYB+ -Puffer (ISH)	50 µg/mL Heparin 0,5 mg/mL Torula-Hefe-RNA in HYB-Puffer
Laemmli Probenpuffer 4x	240 mM Tris/HCl pH 6,8 4% SDS 40% Glyzerin 2% Bromphenolblau 4% β-Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-PAGE (Hoefer-System)	250 mM Tris pH 6,8 1,9 M Glyzin 1% SDS
Lysepuffer	0,1% Triton X-100 in PBS
NCST (ISH)	10% FCS 0,1% Tween 20 1% DMSO in PBS
NBT (ISH)	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid In 70% Dimethylformamid
NTMT (ISH)	100 mM NaCl 100 mM Tris pH 9,0 50 mM MgCl ₂ 0,1% Tween 20
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,75 mM KH ₂ HPO ₄ in H ₂ O, pH 7,4
PBST	1% Tween-20 in PBS
Ponceau S-Färbelösung	0,2 g Ponceau S 5 mL Essigsäure H ₂ O ad 100 mL

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% SDS pH 6,8
SSC 20x (ISH)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat Mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
SSCT (ISH)	SSC 0,1% Tween
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 57,1 mL Eisessig 50 mM Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O, pH 8,0 H ₂ O ad 1000 mL
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0
TFB1-Puffer	30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15% Glyzerin pH 5,8
TFB2-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% Glyzerin pH 6,5
Transferpuffer für Western Blot (Hofer-System)	20 mM Tris-Base 150 mM Glyzin 0,01% SDS 20% Methanol
Trenngelpuffer für SDS-PAGE	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS

4.4 Bakterien- und Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
OPTIMEM 1	Invitrogen, Karlsruhe
L15 (Leibovitz)	Invitrogen, Karlsruhe
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	1% Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 100 µg/mL Ampicillin bzw. 30 µg/mL Kanamycin (nach dem Autoklavieren)
LB-Agar	LB-Medium 1,5% Bacto Agar 100 µg/mL Ampicillin bzw. 30 µg/mL Kanamycin (nach dem Autoklavieren)

4.5 Kits

Ambion Megascript RNA Synthese Kit	Ambion, Austin, USA
ApopTag Fluorescein Direct in situ Apoptosis detection kit	Chemicon, Temecula, USA
ATP Bioluminescence Assay Kit HS II	Roche, Mannheim
ECL RPN 2106	Amersham Biosciences, Freiburg
DIG RNA labeling Kit (Digoxigenin)	Roche Diagnostics, Mannheim
Effectene Reagenz	Qiagen, Hilden
Gateway Clonase LR II enzyme kit	Invitrogen, Karlsruhe
Geneclean Kit	Qbiogene/MP, Heidelberg
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat HRP-Substrat	Millipore, Schwalbach
Lipofectamine Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Lipotectaim RNAiMAX	Invitrogen, Karlsruhe
Mitochondria Isolation Kit MITOISO1	Sigma, Taufkirchen

mMessage mMachine Kit	Ambion, Darmstadt
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid Mini/Maxi	Macherey-Nagel, Düren
PCR [®] 8/GW/TOPO [®] TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
QIAprep Spin Plasmidextraktionskit Mini/Maxi/ EndoFree Maxi	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Reinigungskit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNeasy Minikit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
Zero Blunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit (pCR [®] -Blunt II-TOPO [®])	Invitrogen, Karlsruhe

4.6 Geräte

Agfa Curix 60 Filmentwickler	Agfa, München
Agarosegel-Dokumentationseinheit	Intas, Göttingen
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Peqlab, Erlangen
Farbkamera AxioCam HRc	Zeiss, Jena
Feinwaage	Ohaus, Frankfurt
Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific, Walldorf
Fluoreszenz-Stereomikroskop Leica DMRB	Leica, Wetzlar
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Zeiss Axiovert 200M LSM Meta	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge (J2-21)	Beckman, Krefeld
Luminometer LB96V	Berthold, Bad Wildbad
Mikroinjektor (Femtojet)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Zeiss Axioplan 2 imaging	Zeiss, Jena
Mikroskop Axioscope2 plus	Zeiss, Jena
Mikrotom Microm HM 560	Thermo Scientific, Walldorf

Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Nadelzieher (DMZ)	Zeitz Instrumente, Augsburg
pH-Elektrode (Blueline 23 pH)	Schott, Mainz
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW, Weilheim
Photometer (Jasco V550)	Jasco, Groß-Umstadt
Pipetten (P2, P10, P20, P200, P1000)	Gilson Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand, Wertheim
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer Hofer SE600	Amersham Biosciences, Freiburg
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, München
PowerSupply EPS	Amersham Biosciences, Freiburg
Power Supply EPS 2A200	Amersham Biosciences, Freiburg
Schwenktisch GFL 3017	Merck eurolab, Ismaning
Schüttelinkubator (Certomat BS-1)	B. Braun Biotech, Melsungen
Sonifizierer Cell Disruptor B15	Branson, Danbury, USA
Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Thermocycler	Biometra, Göttingen Bio-Rad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Überkopfmischer Heidolph REAX 2	Merck Eurolab, Ismaning
UV-Detektionssystem	Intas, Göttingen
Vortex (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung	GFL, Burgwedel
Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q academic)	Millipore, Billerica, USA
Zählkammer Neubauer	Merck eurolab, Ismaning
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

7500 Fast Real Time System

Applied Biosystems, Foster City,
USA

4.7 Sonstiges

Deckgläschen

neoLab, Heidelberg
Roth, Karlsruhe

Einmalkanülen Neolus,
21G, 23G, 26G, 27G

Terumo, Tokio, Japan

Einwegauslaufpipetten (25 mL, 10 mL, 5 mL)

Sarstedt, Nümbrecht

Einmalspritzen

Braun, Melsungen

Expositionskassetten

Fischer Scientific, Nidderau

Objektträger Standard 76 x 26 cm

Menzel Gläser, Braunschweig

Objektträger Superfrost plus 76 x 26 cm

Menzel Gläser, Braunschweig

Pinzetten Dumont No. 5

NeoLab, Heidelberg

PCR-Reaktionsgefäße 0,2 mL

Abgene, Hamburg

Polysterol-Röhrchen, steril

Greiner, Frickenhausen

Petrischalen

Greiner, Frickenhausen

Phase Lock Gel Heavy Tubes

Eppendorf

Protran Nitrocellulose-Membran

Schleicher und Schuell, Dassel

ProbeQuant G50 Säulchen

Amersham Pharmacia Biotech,
Freiburg

Polyvinylidenfluorid-Membran

Millipore, Billerica, USA

Reaktionsgefäße (50 mL, 15 mL, 2 mL, 1,5 mL)

Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf, Hamburg

Röntgenfilm Fujifilm SuperRX

Fujifilm Deutschland,
Düsseldorf

Röntgenfilm Kodak

Sigma, Deisenhofen

Whatman Papier

Schleicher und Schuell, Dassel

Zellkulturflaschen

BD Biosciences Falcon,
Heidelberg

Zellkulturschalen

BD Biosciences Falcon,
Heidelberg

Zellschaber

Corning Inc., Corning, NY, U

5 METHODEN

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur enzymatischen Amplifikation doppelsträngiger DNA-Abschnitte mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen (Taq, Pfu) und sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) genutzt (Saiki et al., 1988). Abhängig von der Klonierungsstrategie wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in die Primer eingebaut. Der Ansatz der PCR-Reaktionen enthielt je 4 pmol Primer, je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 100 ng Matrizen-DNA und 2,5 U DNA-Polymerase in Reaktionspuffer. Die Amplifikation richtete sich nach einem PCR-Standardprogramm, wobei die Elongationszeit abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Konstrukts und die Elongationtemperatur abhängig von der verwendeten Polymerase war (Taq bei 72°C, Pfu bei 68°C).

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Hybridisierung	50 °C– 65°C	30 sec – 90 sec
Elongation	68°C/72°C	60 sec – 120 sec
Finale Elongation	68°C/72°C	5 min – 7 min

} 25- 35 Wiederholungen

Nach Beendigung der Amplifikation, die im Thermocycler erfolgte, wurden die Amplifikationsprodukte bis zur weiteren Verwendung auf 4°C gekühlt.

5.1.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

3 µg Plasmid-DNA beziehungsweise die Gesamtmenge einer PCR-Amplifikation wurden für vier Stunden beziehungsweise über Nacht in dem vom Hersteller empfohlenen

Reaktionspuffer unter Zusatz von Restriktionsendonukleasen verdaut. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem Nucleo Spin Extract Kit.

5.1.3 Dephosphorylierung von DNA

Um eine möglichst hohe Ligationseffizienz zu erzielen, wurden alle Vektoren nach dem Restriktionsverdau einer Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase unterzogen, die durch Abspaltung freier Phosphatreste den intramolekularen Ringschluss verhindert. Nach 20-minütiger Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen bei 65°C beziehungsweise 80°C wurde dem Ansatz circa 2 U SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) pro µg DNA zugesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase wurde bei 65°C für 20 Minuten durchgeführt.

5.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Ansatz aus circa 300 ng dephosphoryliertem Vektor und einem Überschuss DNA-Fragment (aus vorherigem Verdau eines Plasmids oder einer PCR-Amplifikation) in T4-DNA-Ligase Puffer erfolgte die Ligation unter Zugabe von T4-DNA-Ligase. Die Reaktion wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt.

5.1.5 TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung ermöglicht eine effiziente, schnelle und direkte Insertion von PCR-Produkten in einen Plasmid-Vektor.

Das Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) enthält einen linearisierten pCR-Blunt II TOPO-Vektor, der durch kovalente Bindung einer DNA Topoisomerase I über einen Tyrosinrest an das 3'Ende der DNA-Stränge aktiviert ist. Die Phosphotyrosylbindung zwischen DNA und Enzym kann durch die 5'-Hydroxylgruppe des zugegebenen PCR-Fragments angegriffen werden. Dadurch wird das Enzym freigesetzt und das DNA-Fragment mit seinen stumpfen Enden in den Vektor integriert.

Für die TOPO-Klonierung wurde zunächst eine PCR mit Oligonukleotiden durchgeführt, die 100% komplementär zur Matrizen-DNA waren. Die verwendete Pfu-Polymerase produzierte ein Amplifikationsprodukt mit stumpfen Enden. Nach DNA-Gelelektrophorese und Aufreinigung aus dem Gel (Elutionsvolumen 30 µL H₂O) wurde folgender Ansatz –

bestehend aus dem PCR-Fragment und den Komponenten des Kits - für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

PCR-Produkt	2 μ L
Salzlösung	1 μ L
Steriles Wasser	2 μ L
TOPO Vektor	1 μ L

Für die anschließende Transformation wurden die mitgelieferten TOP10-Zellen verwendet.

Durch Sequenzierung konnte die Orientierung des Inserts festgestellt und die nachfolgende Subklonierung in andere Vektoren vorgenommen werden.

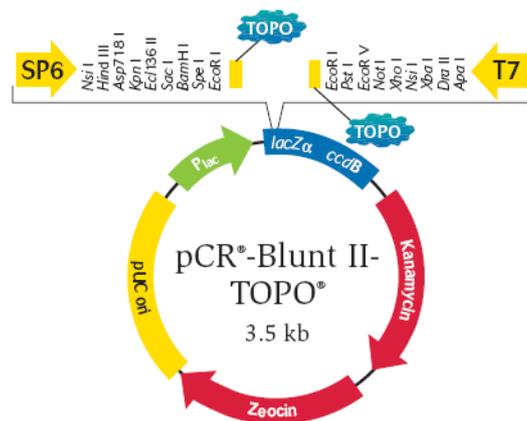


Abb. 47 pCR®-Blunt II-TOPO® Vektor (Invitrogen)

<http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/mainbody/data/diagram.Par.27588.Image.-1.0.1.gif>

5.1.6 Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA beziehungsweise RNA wurden Agarosegele verwendet. Agarose wurde in unterschiedlichen Konzentrationen von 1-2% in TAE-Puffer aufgekocht und in Abhängigkeit der erwarteten Fragmentgröße eingesetzt. Der Zusatz der in die DNA interkalierenden Substanz Ethidiumbromid gestattete die Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht bei 366 nm.

Nach Zugabe des Ladepuffers zu den DNA-Proben wurden diese bei 5-10 V/cm Elektrodenabstand in der mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoreseapparatur aufgetrennt. Als Größenmarker wurden verschiedene Marker von Fermentas verwendet.

5.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen von Plasmid-Konstrukten und RT-PCR-Fragmenten wurde von den Firmen Medigenomix, Martinsried und GATC, Konstanz nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) vorgenommen.

5.1.8 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde ein Verfahren angewendet, bei dem divalente Kationen die Zellwand stabilisieren und somit die Aufnahme von Plasmid-DNA ermöglichen (Sambrook J, 1989).

Als Vorkultur dienten 2 mL Luria Broth (LB-) Medium, die mit einer Bakterienkolonie des *E. coli* Stammes DH5 α beimpft und 16 Stunden bei 37°C geschüttelt wurde. Die Vorkultur wurde in 250 mL LB-Medium gegeben und für zwei bis drei Stunden bis zu einem OD590-Wert von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 3750 rpm wurde das entstandene Bakterienpellet in 100 mL kaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Auf die fünfminütige Inkubation auf Eis folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 3750 rpm. Das neuerliche Pellet wurde in 10 mL kaltem TFB2-Puffer resuspendiert., 30-60 Minuten auf Eis inkubiert und in Portionen von 100 μ L aliquotiert. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung bei -80°C.

5.1.9 Transformation kompetenter Bakterien

Zum Zwecke der Aufnahme und Vermehrung von Plasmiden wurde die Transformation von *E. coli* genutzt (Sambrook J, 1989).

Nach dem Auftauen von 100 μ L Aliquots kompetenter Bakterien auf Eis, wurden diese mit 10 μ L Ligationsansatz beziehungsweise 1 μ g Plasmid-DNA versetzt und vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Der 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42°C und eine weitere fünfminütige Inkubation auf Eis. Dem Ansatz wurden 400 μ L LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika zugefügt . Es folgte eine 60-120-minütige Inkubation bei 37°C im Thermoschüttler. Verschiedene Volumina der Kultur wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (Ampicillin 100 mg/l oder Kanamycin 50 mg/l) ausplattiert und für 16-20 Stunden bei 37°C inkubiert.

5.1.10 Bakterienkultivierung

Einzelne Bakterienkolonien wurden von Agarplatten gepickt und zum Animpfen von LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika verwendet. Diese Flüssigkulturen wurden im Schüttler bei 200 U/min und 37°C für 12 – 16 Stunden bebrütet. Zur dauerhaften Lagerung wurden 0,5 mL Flüssigkultur mit 0,5 mL Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

5.1.11 Plasmid-Präparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Qiagen-Mini- beziehungsweise Qiagen-Maxi-Kit sowie das NucleoSpin Plasmid Kit verwendet. Die Präparation richtete sich nach dem Protokoll der Hersteller.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) und humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotikallösung (Endkonzentration: 50 U/mL Penicillin G, 50 µg/mL Streptomycin) und 2 mM Glutamin kultiviert. Zebrafischfibroblasten (Pac2) wurden in L15 Medium (Leibovitz) unter Zusatz von 15% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotikallösung (Endkonzentration: 50 U/mL Penicillin G und 50 µg/mL Streptomycin) kultiviert. Drosophila-S2-Zellen wurden in Schneider's Drosophila Medium unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotikallösung (Endkonzentration: 50 U/mL Penicillin G, 50 µg/mL Streptomycin) kultiviert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (25 cm² – 75 cm²) im Brutschrank bei 37°C (HEK293, SH-SY5Y) beziehungsweise 28,5°C (Pac2) oder 26°C (S2) und 5% CO₂ bebrütet.

5.2.1.2 Passagierung

Nach Absaugen des Mediums wurden die adhärennten Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und einige Minuten mit Trypsin (0,5 g/l Trypsin) behandelt. Vorsichtiges Klopfen erleichterte die Ablösung vom Boden. Die Zellen wurden in vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert und im angestrebten Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

5.2.1.3 Ausplattieren

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurde ein Aliquot der trypsinisierten Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt und in eine Neubauer-Kammer überführt. Für Western-Blot-Analysen wurden 1×10^6 HEK293T-Zellen und 5×10^5 SH-SY5Y Zellen pro 3,5 cm Schale in Vollmedium ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden 4×10^5 SH-SY5Y-Zellen beziehungsweise 4×10^5 S2-Zellen auf sterile Deckgläschen in 3,5 cm Schalen ausplattiert.

5.1.2.4 Transfektion

24 Stunden nach Ausplattieren wurde das Vollmedium von SH-SY5Y- und HEK293T-Zellen abgesaugt und die Zellen mit Medium ohne Zusatz von FCS und Antibiotikum gespült. Die Transfektion erfolgte in OPTIMEM mit dem Transfektionskit Lipofectamine plus nach dem Protokoll des Herstellers. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurde 1 mL Vollmedium zugegeben.

5.1.2.5 RNAi-induzierter Knockdown

Um Parkin-Expression in *Drosophila*-S2-Zellen zu vermindern, wurde ein Parkin-Plasmid (SD01679) vom *Drosophila* Genomics Resource Center (Bloomington, IN) bezogen. Dieses diente als Matrize für Primer mit einem T7-tag, die von einem Programm für die *de novo* Synthese langer doppelsträngiger RNAs (dsRNAs) ermittelt wurden (E-RNAi Webservice, DKFZ). Nach Synthese der T7-cDNA-Matrizen wurde mit Hilfe des Ambion Megascript RNA Synthese Kits nach Vorgaben des Herstellers dsRNA synthetisiert. S2 Zellen wurden in Serum-freiem Medium mit 5 µg dsRNA und dem Transfektionsreagenz Effectene behandelt. Nach 45-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde Vollmedium zugegeben.

Um Parkin in humanen SH-SY5Y Zellen runterzuregulieren, wurden sie mit Stealth siRNA und Lipofectamine RNAiMAX nach Angaben des Herstellers transfiziert

5.1.2.6 Zellernte

24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 30 Sekunden wurde das Zellpellet bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt.

5.1.2.7 Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie von Mitochondrien

SH-SY5Y Zellen und S2 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Diese waren im Falle der S2 Zellen mit Concanavalin A beschichtet. Dem Kulturmedium wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆(3) zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation und anschließendem Waschen mit PBS wurden die lebenden Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

5.2.2 Protein- und Nukleinsäureanalytik

5.2.2.1 Gesamtzelllysat

Die Zellpellets wurden in kaltem Lysepuffer resuspendiert und unter gelegentlichem Vortexen 10 bis 20 Minuten auf Eis inkubiert. Unter Zusatz von Laemmli-Probenpuffer wurden die Lysate 10 Minuten lang auf 95°C erhitzt.

5.2.2.2 Nachweis der Löslichkeit (Solubilitätsassay)

Die Zellpellets wurden in kaltem Lysepuffer unter Zugabe von Protease-Inhibitor resuspendiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Während einer 20-minütigen Zentrifugation bei 15000 g und 4°C trennte sich das Lysat in eine Detergenz-lösliche (Überstand, Ü) und eine Detergenz-unlösliche (Pellet, P) Fraktion auf. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und beiden Fraktionen wurde Laemmli-Probenpuffer zugesetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 95°C wurde die genomische DNA der Detergenz-unlöslichen Fraktion durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 27G-Kanüle geschert. Gleiche Mengen beider Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert.

5.2.2.3 Proteinkonzentration nach Bradford

Mit Hilfe des Protein Assay Kits (Bio-Rad) wurde die Gesamtproteinmenge des Zelllysats nach der Methode von Bradford ermittelt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

5.2.2.4 Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Für das Sammelgel wurde Polyacrylamid in einer Konzentration von 4% verwendet, für das Trenngel- in Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins – eine Konzentration von 10-12%. Nach Polymerisation des Trenn- und Sammelgels wurden die Taschen gespült und die Proben geladen. Die Elektrophorese wurde entweder in einer Hoefer-SE600-Kammer bei 150 V (Sammelgel) bis 250 V (Trenngel) oder in einer Bio-Rad Mini-PROTEAN-3-Kammer bei 80 V (Sammelgel) bis 120 V (Trenngel) durchgeführt. Zum Größenvergleich wurden 2 µL des See Blue Plus 2 Proteingrößenmarkers geladen.

Zusammensetzung verschiedener Gele (pro Gel):

Sammelgel (4%)	Hoefer-System	Bio-Rad System
H ₂ O	6,4 mL	3,3 mL
Sammelgelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid	1 mL	0,5 mL
TEMED	100 µL	15 µL
APS-Lösung	10 µL	15 µL

Trenngel (10%)	Hoefer-System	Bio-Rad System
H ₂ O	4,9 mL	4 mL
Sammelgelpuffer	2,5 mL	2 mL
Acrylamid	2,5 mL	2 mL
TEMED	100 µL	15 µL
APS-Lösung	10 µL	15 µL

5.2.2.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran (Western Blot)

Nach der Auftrennung durch Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Transferkammer auf Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid- (PVDF)-Membran übertragen. Die PVDF-Membranen wurden vor Verwendung mit Methanol aktiviert. Der Transfer erfolgte bei 4°C und einer konstanten Stromstärke von 1000 mA über 2 Stunden (Hoefer-System) beziehungsweise bei 400 mA über eine Stunde (Bio-Rad-System).

5.2.2.6 Ponceau S- Färbung

Durch Schwenken der Membranen in Ponceau S-Lösung für fünf Minuten und anschließendes Schwenken in H₂O wurden alle transferierten Proteine unspezifisch angefärbt. Somit konnte die Effizienz des Transfers beurteilt werden. Nach Entfärben in PBST erfolgte die Immundetektion.

5.2.2.7 Immundetektion von Proteinen

Die Nitrozellulose- beziehungsweise PVDF-Membran wurde nach dem Proteintransfer zunächst für eine Stunde in Blockierlösung (5% Magermilchpulver in PBST) bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C für 16 Stunden unter Schwenken. Nach drei Waschschritten a 10 Minuten mit PBST bei Raumtemperatur zur Entfernung von unspezifisch gebundenem sowie ungebundenem Antikörper wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundären Meerretich-Peroxidase (HRP)- Antikörper inkubiert. Es folgten weitere drei Waschschrritte a 10 Minuten mit PBST bei Raumtemperatur.

Zur Immundetektion wurde das Enhanced Chemiluminescence (ECL)-System beziehungsweise das Immobilon Western-Chemilumineszenz HRP-Substrat nach den Protokollen der Hersteller verwendet .

Die Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat führte zur Emission von Licht. Diese Signale wurden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

5.2.2.8 Immunfluoreszenz zum Nachweis von Apoptose

5.2.2.8.1 Caspase-Assay

SH-SY5Y Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^5 auf sterile Deckgläschen in 3,5 cm Zellkulturschalen ausplattiert, nach 24 Stunden transfiziert und weitere 24 Stunden später für drei Stunden mit Kainat (1 mM) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 % Paraformaldehyd (PFA) 10 Minuten lang fixiert, mit 0,2% Triton X-100 10 Minuten lang permeabilisiert und für eine Stunde mit Blockierpuffer (IF) blockiert. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem anti-aktive Caspase-3 Antikörper (1:250 in Blockierpuffer) inkubiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Cy3 (1:500 in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit Eindeckelmedium auf Objektträgern eingedeckelt. Nach Trocknung des Mediums konnten die Proben am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

5.2.2.8.2 TUNEL-Assay

SH-SY5Y und S2 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und ein, zwei, drei oder vier Tage nach Transfektion mit 1% PFA bei Raumtemperatur für zehn Minuten fixiert. Die jeweiligen Positivkontrollen waren zuvor mit Staurosporin (SH-SY5Y) beziehungsweise Cycloheximid (S2) behandelt worden. Nach Permeabilisierung mit einer 2:1 Mischung aus Ethanol und Eisessig, die für fünf Minuten bei -20°C erfolgte, wurden apoptotische Zellen mit Hilfe des ApopTag Fluorescein Direct in situ Apoptosis detection Kit gefärbt. Dabei wurde nach Vorgaben des Herstellers verfahren: die fixierten Zellen wurden mit Working Strength TdT enzyme überschichtet und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach zehnminütigem Waschen wurden die Zellen mit FluorSave Reagent auf Objektträgern eingedeckelt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Apoptotische Zellen wurden anhand ihrer grünen Fluoreszenz durch TdT-vermittelte dUTP-Markierung (TUNEL) detektiert.

5.2.2.9 ATP-Assay

SH-SY5Y Zellen wurden mit Parkin Stealth siRNA transfiziert. 24 Stunden vor Ernte wurde das Kulturmedium gegen ein Medium mit 3 mM Glukose ausgetauscht. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, geerntet und in dem Lysepuffer des Assay-Kits lysiert. Die Bestimmung der zellulären basalen ATP-Mengen erfolgte mit dem ATP Bioluminescence Assay Kit HS II nach Vorgaben des Herstellers. Die Biolumineszenz der Proben wurde mit einem LB96V Luminometer gemessen, mit der WinGlow Software (Berthold Technologies) analysiert und auf die Gesamtproteinmenge normalisiert.

5.2.2.10 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen (SHSY-5Y, Pac2) wurde das RNeasy Mini Kit verwendet und nach Protokoll des Herstellers verfahren. Es wurde grundsätzlich ein 30-minütiger DNase Verdau bei Raumtemperatur durchgeführt (RNase-free DNase Set). Die RNA wurde mit 30 µL RNase-freiem Wasser von den Säulchen eluiert. Die Lagerung erfolgte nach Konzentrationsbestimmung bei -80°C. Zur Isolierung von RNA aus Zebrafischembryonen wurde das Protokoll an das veränderte Ausgangsmaterial angepasst. Die bei -80°C gelagerten und zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Embryonen wurden mit 1 mL RLT-Puffer und 10 µL β-Mercaptoethanol versetzt und anschließend homogenisiert. Hierfür wurden sie zehn Mal mit einer sterilen Spritze durch eine 27 *gauge* Kanüle auf- und abgesogen. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit und Raumtemperatur wurde der Überstand in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Es wurde mit 1 mL 70%igem RNase-freiem Ethanol durchmischt und anschließend auf die im Kit enthaltenen Säulchen transferiert. Der Zentrifugation folgten ein 30-minütiger DNase Verdau (RNase-free DNase Set) und anschließende Waschschrte nach Vorgabe des Herstellers. Die RNA wurde mit 30 µL RNase-freiem Wasser eluiert und nach Konzentrationsbestimmung bei -80°C aufbewahrt.

5.2.2.11 Synthese von cDNA

Ausgehend von RNA wurde cDNA unter Verwendung des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits hergestellt.

5.2.2.12 Semi-quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Die semi-quantitative *real time* PCR als Weiterentwicklung der Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials anhand von Fluoreszenz-Messungen. Die in dieser Arbeit verwendete TaqMan™ qRT-PCR beinhaltet die Verwendung einer sequenzspezifischen Sonde, die mit einem Quencher und einem Reporter- Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die steigende Fluoreszenz, die im Lauf der Synthese durch Abbau der Sonde entsteht, wird in jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase gemessen.

Jeder Ansatz setzte sich aus 9 µL cDNA Lösung – je nach Art des Ausgangsmaterials unterschiedlich konzentriert – 10 µL 2x TaqMan Universal PCR Master Mix und 1 µL working stock des TaqMan Gene Expression Assays zusammen. Der TaqMan Gene Expression Assay enthielt jeweils die zur Amplifikation der Ziel-DNA benötigten Oligonukleotide sowie die sequenzspezifische TaqMan- Sonde. Die Quantifizierung erfolgte mit dem 7500 Fast Real Time System (Applied Biosystems). Für jede RNA-Probe wurden Triplikate gemessen und die Expression wurde in Bezug auf β -Actin normalisiert. Die relative Expression jedes Gens wurde mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet.

5.2.2.13 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Stressoren

Um die SH-SY5Y Zellen oxidativem Stress auszusetzen, wurden sie 24 Stunden nach Transfektion für 30 Minuten mit 10 beziehungsweise 20 mM H₂O₂ bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ernte erfolgte ein Solubilitäts-Assay und die anschließende Analyse mittels Western Blot.

Zur Untersuchung des Einflusses von Dopamin auf zf-Parkin wurden SHSY-5Y Zellen für 5 Stunden mit 0,5/0,75/1/2/5 mM Dopamin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ernte erfolgte entweder ein Solubilitäts-Assay und Analyse mittels Western Blot oder eine Analyse mittels Immunfluoreszenz.

Zebrafisch Pac2 Zellen wurden einem Mitochondrien-Toxin ausgesetzt, indem sie für eine Stunde mit 10 nM Rotenon bei 28,5°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Nach Entfernung des Komplex I Inhibitors und einer sechsstündigen Inkubationsphase in Medium erfolgte die Ernte und anschließende Analyse mittels quantitativer *real time* PCR.

Um Apoptose zu induzieren, wurden SH-SY5Y Zellen für vier Stunden mit 1 μ M Staurosporin behandelt beziehungsweise S2 Zellen für sechs Stunden mit 10 μ M Cycloheximid. Nach Fixierung erfolgte die Analyse mittels TUNEL-Assay.

5.3 Arbeiten mit Zebrafischen

5.3.1 Haltung der Zebrafische und Behandlung der Embryonen

Aufzucht, Paarung, Haltung und Züchtung der Fische erfolgte nach Standardmethoden (Mullins et al., 1994). Embryonen wurden gewonnen, indem Zebrafische paarweise in Plexiglasboxen über Nacht angesetzt wurden. Die Embryonen und Larven wurden für maximal sechs Tage bei 28,5°C in E3 Embryomedium gehalten, die Entwicklungsstadien wurden ebenfalls nach Standardmethoden bestimmt (Kimmel et al., 1995).

5.3.2 Homologievergleiche in Datenbanken

Das Zebrafischgenom wird seit Februar 2001 durch das *zebrafish genome project* sequenziert (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/) und annotiert. Die Sequenzdaten sind unter (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index) zugänglich und werden fortlaufend aktualisiert. Die Homologievergleiche der hier vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die achte Version der assemblierten Sequenzdaten (Zv8).

Um mögliche orthologe Sequenzen von humanem Parkin im Zebrafischgenom zu finden wurde die humane Proteinsequenz (NP_054642) mit dem BLAST Algorithmus gegen die Zebrafisch Genomdatenbank abgeglichen. Dabei wurde ein Zebrafisch Ortholog identifiziert (ENSDARG00000021555; zgc: 112390). Mit Hilfe von Boxshade 3.21 wurden die Sequenzen bezüglich Gleichheit und Ähnlichkeit verglichen.

5.3.3 Gewinnung genomischer DNA

Zebrafischeier wurden einen Tag nach Fertilisation einzeln in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte sortiert und mit 100% Methanol bei -20°C über Nacht fixiert. Zur vollständigen Entfernung des Methanols wurden die Embryonen bei 70°C für circa zehn Minuten inkubiert. Nach Zugabe von TE-Puffer mit Proteinase K folgte eine weitere Inkubation bei 55°C über vier Stunden und die anschließende Inaktivierung der Proteinase

K bei 95°C für zehn Minuten. Nach Zugabe von H₂O wurde die Präparation beim -20°C eingefroren und gelagert, um dann für Analysen mittels PCR zur Verfügung zu stehen.

5.3.4 Mikroinjektion von Zebrafischeiern

Zebrafischeier wurden im Einzellstadium auf 1,5%igen Agaroseplatten mit Gitterstruktur ausgerichtet. Die Injektion, die - abhängig von der injizierten Substanz - in den Dotter (RNA, gripNA) oder direkt in die Zelle (DNA) erfolgte, wurde mit Hilfe eines Druckluftinjektors (Femto Jet Microinjector) und einer daran gekoppelten Glaskapillare durchgeführt. Nach Injektion wurden die Embryonen bei 28,5°C in Embryomedium E3 gehalten und unbefruchtete beziehungsweise tote Embryonen aussortiert.

5.3.5 Transienter Knockdown von Parkin in Zebrafischen

Um die Transkription von endogenem Parkin in Zebrafischen transient auszuschalten beziehungsweise weitestgehend zu blockieren (Knockdown), wurden gripNAs (Activ motif) in Zebrafischeier im Einzellstadium injiziert. Diese aus 18 Nukleotiden bestehenden Peptidnukleinsäuren wurden nach Vorgabe des Herstellers in Phosphat-Puffer gelöst und in einer Konzentration von 1 mM injiziert, was unter den eingestellten Injektionsbedingungen einer Dosis von 13 ng entsprach.

5.3.6 Hitzeschock-Behandlung von Zebrafischembryonen

Gruppen von 20 Zebrafischembryonen wurden zwei Tage nach Fertilisation beziehungsweise Injektion in 2 mL Reaktionsgefäße mit 1 mL Embryomedium überführt und für eine Stunde bei 39°C in einem Heizblock inkubiert. Es schloss sich eine achtstündige Regenerationszeit bei 28,5°C an.

5.3.7 Zelltodfärbung in lebenden Zebrafischembryonen

Dechorionierte Zebrafischembryonen wurden zwei Tage nach Fertilisation beziehungsweise Injektion und versuchsabhängiger vorangegangener Hitzeschock-Behandlung für 30 Minuten in Acridin Orange Lösung inkubiert (Furutani-Seiki et al., 1996). Es folgten drei fünfminütige Waschschriffe mit Embryomedium E3, das 1% Tricain enthielt. Die betäubten Embryonen wurden in 1,5%iger *Low-Melting*-Agarose auf einem Objektträger eingebettet und mit E3 überschichtet. Um die Anzahl der sterbenden

Neurone im Rückenmark zu bestimmen, wurden die eingebetteten Embryonen unter einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop mit einer 10x-Linse untersucht. Sterbende Zellen wurden anhand ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert, die durch Interkalierung von Acridin Orange in DNA entsteht.

5.3.8 Synthese einer Digoxigenin-markierten Tyrosinhydroxylase-RNA-Sonde

Das für Tyrosinhydroxylase-codierende Plasmid pB-SK zTH wurde über Nacht mit XhoI bei 37°C verdaut und somit linearisiert. Anschließend wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Präzipitation aufgereinigt. Die DNA wurde mit DEPC-behandeltem dH₂O 1:10 verdünnt, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, in Eppendorf *Phase Lock Gel Heavy Tubes* überführt und über drei Minuten geschüttelt. Während der folgenden Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit wurde die untere, organische Phase (Phenol, Chloroform) durch eine Wachsschicht von der oberen, wässrigen Phase, DNA-haltigen getrennt. Nach Zugabe von Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur wässrigen Phase, weiterem Schütteln und Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen, mit dem gleichen Volumen Isopropanol und einem Zehntel Nuclease-freiem Natriumacetat versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte während der zweistündigen Inkubation bei -20°C. Nach Zentrifugation bei Maximalgeschwindigkeit für 30 Minuten wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit Nuclease-freiem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-enthaltende Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss an die Resuspension in 20 µL DEPC-behandeltem Wasser wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA wurde bei -20°C gelagert. 1 µg der linearisierten, gereinigten DNA wurde zur Digoxigenin-RNA Synthese eingesetzt. Dazu wurden das DIG RNA labeling Kit von Roche und die T3 RNA Polymerase von MBI Fermentas nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die Aufreinigung erfolgte mittels Lithiumchlorid-Fällung. Nach Präzipitation wurde das Pellet in 10 µL DEPC-behandeltem dH₂O resuspendiert und anschließend mit 20 µL Formamid und 10 µL 20x SSC versetzt. Die Qualität der Digoxigenin-Tyrosinhydroxylase-RNA-Sonde wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese ermittelt.

5.3.9 *In situ*-Hybridisierung (ISH)

Bei der *in situ* Hybridisierung wird RNA in Zellen und Geweben mittels einer spezifischen Sonde sichtbar gemacht. Zum Nachweis von Tyrosinhydroxylase in dopaminergen Neuronen des Zebrafischgehirns wurden drei Tage alte Zebrafische in 4% Paraformaldehyd bei 4°C über Nacht fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBST wurden sie für 20 Minuten in Proteinase K (10 µg/mL in PBST) inkubiert, um eine spätere Penetration der Sonde zu ermöglichen. Es schloss sich eine 20-minütige Nachfixierung mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur an sowie zwei weitere Waschschrte in PBST. Die Embryonen wurden bei 65°C für zwei Stunden in Hybridisierungspuffer (HYB+) prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der einsträngigen –Digoxigenin-Tyrosinhydroxylase-RNA-Sonde erfolgte über Nacht bei 65°C. Alle folgenden Waschschrte wurden ebenfalls bei 65°C ausgeführt: 2 x 30 min in einer 1:1 Mischung aus Formamid und 2x SSCT; 1x 15 min in 2x SSCT; 2x 30 min in 0,2x SSCT; 1x 10 min in 66% 0,2x SSCT und 33% PBST; 1x 10 min in 33% 0,2x SSCT und 66% PBST; 1x 10 min in PBST. Die Embryonen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierpuffer inkubiert und daraufhin über Nacht bei 4°C in einer 1:4000 Verdünnung von alkalischer Phosphatase, die an Digoxigenin-Antikörper gebunden ist, in NCST unter Schütteln aufbewahrt. Nach dreimaligem zehnminütigem Waschen in NTMT unter Zusatz von 0,25 mg/mL Levamisol, das zur Reduktion der endogenen alkalischen Phosphatase-Aktivität dient, erfolgte die enzymatische Farbreaktion. Hierzu wurden die Embryonen 30 min in NTMT mit 3,5 µL/mL BCIP und 4,5 µL/mL NBT versetzt. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und abhängig von der Stärke des Signals durch Waschen mit PBST gestoppt. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Mikroskop mit einer Zeiss Plan-Apochromat 10x Linse aufgenommen. Z-Stapel wurden durch automatisches schrittweises Scannen des Gehirns bei optimaler Schnittdicke erzeugt und mit ImageJ zu einer Maximum-Projektion zusammengesetzt.

5.3.10 Färbung und Mikroskopie von Mitochondrien in lebenden

Zebrafischen

5.3.10.1 Synthese und Mikroinjektion von mRNA

Das Plasmid pCS2+ mito-GFP, das die codierende Sequenz von mito-GFP (*green fluorescent protein* mit mitochondrialer Signalsequenz) enthält, wurde über Nacht mit NotI bei 37°C verdaut und somit linearisiert. Nach anschließender Aufreinigung der DNA über Phenol-Chloroform-Präzipitation und Resuspension in DEPC-behandeltem dH₂O wurde 1 µg der linearisierten, gereinigten DNA zur mRNA Synthese mit Hilfe des Ambion mMessage Machine Kits verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Aufreinigung der mRNA erfolgte über Lithiumchlorid-Fällung. Das Pellet wurde in DEPC-behandeltem dH₂O resuspendiert, die Qualität der mRNA mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese bestimmt und die Konzentration photometrisch ermittelt. Die Lagerung der aliquotierten mRNA erfolgte bei -80°C. Ebenso verfahren wurde bei der Synthese von mRNA ausgehend von pCS2+ H2B mRFP, einem Plasmid, das die codierende Sequenz des Histonproteins H2B mit dem *monomeric red fluorescent protein* enthält und folglich Zellkerne sichtbar macht.

Die RNA wurde im Einzellstadium in einer Konzentration von 100 ng/µL mito-GFP und 80 ng/µL H2B-mRFP in den Dotter injiziert.

5.3.10.2 Inkubation in MitoTracker

Der rot-fluoreszierende Farbstoff MitoTracker Red CMXRos, der abhängig vom Membranpotential Mitochondrien in lebenden Zellen anfärbt, wurde 1:500 bis 1:1000 in Embryomedium E3 verdünnt. Das Chorion von Zebrafischembryonen im 50% Epibolie Stadium (sechs bis acht Stunden nach Fertilisation) wurde mit einer feinen Glasnadel punktiert, um einen Flüssigkeitsaustausch mit dem Umgebungsmedium zu gewährleisten. Die Embryonen wurden in einer 3,5 cm Zellkulturschale mit der MitoTracker-Verdünnung überschichtet und 24 Stunden bei 28,5°C inkubiert.

5.3.10.3 Inkubation in Rotenon

Um den Einfluss eines Mitochondrien-Toxins auf die mitochondriale Morphologie zu untersuchen wurden Wildtyp-Zebrafischembryonen für 24 Stunden in 20 µg/l beziehungsweise 50 µg/l Rotenon in Embryomedium inkubiert. Nach Punktierung des Chorions im 50% Epibolie Stadium wurden die Zebrafischembryonen mit der Rotenon-Verdünnung überschichtet. Parkin Knockdown Embryonen und kontrollinjizierte Embryonen wurden für 6 Stunden in 100 µg/l Rotenon inkubiert.

5.3.10.4 Mikroskopie und Bilderstellung

Einen Tag nach Fertilisation wurden die Embryonen dechorioniert und in Embryomedium E3 mit 1% Tricain betäubt. Die Einbettung erfolgte in 1,5%iger *Low-Melting*-Agarose auf einem Deckglas, das von unten an eine gelochte Petrischale geklebt war. Die Agarose wurde mit E3 und 1% Tricain überschichtet. Die Embryonen wurden mit einem Zeiss LSM Meta konfokalen Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 100x/1.4 oil DIC Objektiv untersucht und fotografiert.

5.3.11 Isolierung von Mitochondrien aus Zebrafisch

Die Isolierung von Mitochondrien aus Zebrafischembryonen erfolgte mit Hilfe des MITOISO1-Mitochondrial Isolation Kit von Sigma. Um die Funktionalität der Mitochondrien zu bewahren wurden alle Schritte bei 4°C mit eiskalten Puffern und Lösungen durchgeführt. Das Protokoll des Herstellers wurde dem Ausgangsmaterial entsprechend optimiert.

24 Stunden nach Fertilisation wurden 30 Zebrafischembryonen dechorioniert, in Embryomedium E3 mit 1% Tricain betäubt und zweimal in je 50 µL Extraktionspuffer A gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend mit 500 µL Extraktionspuffer A und 2 mg/mL Albumin versetzt und durch Ultraschall mit einem Branson Cell Disruptor B 15 homogenisiert. Die folgende Zentrifugation bei 600 x g über fünf Minuten bei 4°C führte zur Abtrennung der Debris. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei 11000 x g weitere zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet stellte die mitochondriale Fraktion dar und wurde in 30 µL *storage buffer* resuspendiert.

5.3.12 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Um die Integrität der inneren Mitochondrienmembran zu bestimmen, kann man den elektrochemischen Protonengradienten ($\Delta\psi$) bestimmen. Der fluoreszierende Carbocyanin-Farbstoff JC-1 wird abhängig vom Membranpotential in die mitochondriale Matrix aufgenommen. Das Emissionsspektrum des Fluorophors ist wiederum abhängig von der Konzentration. Bei niedrigen Konzentrationen und einer Exzitationswellenlänge von 490 nm fluoresziert der Farbstoff grün. Bei hohen Konzentrationen bildet JC-1 Aggregate, die rot-orange fluoreszieren. In einer mitochondrialen Matrix, die von einer inneren Membran mit einem hohen Membranpotential umgeben ist, wird der Farbstoff aufkonzentriert und bildet Aggregate, so dass die Emissionswellenlänge ein Indikator für das Membranpotential ist.

5 μL der Mitochondriensuspension wurden mit 20 μL storage buffer und 475 μL JC-1 Assay Puffer durch Invertieren gemischt. Bei Positivkontrollen wurde den Ansätzen weiterhin 4 μM beziehungsweise 20 μM Valinomycin zugefügt und für 10 Minuten inkubiert. Valinomycin führt als Kalium-Ionophor zum Zusammenbruch des Membranpotentials. Um die Proben einem zusätzlichen mitochondrialen Stress auszusetzen wurde der Komplex I Inhibitor Rotenon in Konzentrationen von 10 μM oder 100 μM eingesetzt und für 50 Minuten inkubiert. Es folgte eine zehninütige Inkubation mit 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ JC-1 bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden jeder Probe viermal 100 μL entnommen und mit einem Fluoroskan Ascent FL Mikroplatten Fluorometer vermessen. Der Mittelwert der Emission bei 590 nm (rot) wurde durch den Mittelwert der Emission bei 538 nm (grün) geteilt. Demzufolge weist ein niedriger Wert auf ein gestörtes Membranpotential hin, da weniger JC-1 in die Matrix aufgenommen wird und aus diesem Grund keine Aggregate gebildet werden.

5.3.13 Generierung Parkin-transgener Zebrafische

Um transgene Zebrafische zu generieren, die den Fluoreszenzmarker DsRed und humanes Parkin exprimieren, wurde Parkin mit den Primern hP-XbaI-F und $\Delta 1-79$ -R aus dem Plasmid pCS2+ M80T amplifiziert. Dabei handelt es sich um humanes Vollängen-Parkin, dem im Vergleich zu Wildtyp-Parkin die sekundäre Translationsstartseite fehlt. Die Nutzung dieser sekundären Translationsstartseite führt bei Wildtyp-Parkin zur Expression

von Δ UBL-Parkin, das weniger neuroprotektiv ist (Henn et al., 2007; Henn et al., 2005). Im Hinblick auf die Untersuchung der neuroprotektiven Funktion im Zebrafisch, wurde Parkin-M80T zur Klonierung verwendet. Das Amplicon wurde in den PCR8/GW/TOPO/Entry Vektor kloniert und von dort mit Hilfe des Gateway Rekombinationssystems und LR-Rekombination in den *Responder*-Vektor subkloniert (Paquet et al, 2009). EF1 α -Gal4-VP16 wurde mit den Primern MI3-FP und MI3-RP aus dem Plasmid pBEF1 α -Gal4-VP16 amplifiziert in den Vektor pCR8/GW-ENTR/TOPO kloniert. Anschließend wurde EF1 α -Gal4-VP16 über LR-Rekombination in den Vektor pT2d-DEST-GwRI-R2 transferiert, um das *Driver*-Konstrukt pT2d-EXP-EF1 α -Gal4-VP16.pA zu erhalten. Alle weiteren Schritte einschließlich der Transformation mit *E. coli* DH5 α wurden nach Vorgaben des Herstellers mit dem Gateway Clonase LR II enzyme Kit durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde für die Injektion in Zebrafischeier mit dem GeneClean II Kit gereinigt. Das pCS-TP Plasmid, das die codierende Sequenz der Transposase enthält, wurde linearisiert und mittels Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt. Es diente als Matrize für die mRNA Synthese, für die das Ambion mMessage mMachine Kit eingesetzt wurde. Kurz vor der Injektion wurden die gereinigten DNA Konstrukte mit DEPC-behandeltem dH₂O auf eine Konzentration von 15 ng/ μ L (*Driver*-Konstrukt) beziehungsweise 40 ng/ μ L (*Responder*-Konstrukt) verdünnt und die Transposase-mRNA auf 20 ng/ μ L eingestellt. DNA- und RNA-Verdünnungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit Phenolrot in einer Endkonzentration von 20% (v/v) versetzt. Circa 1 nl der Injektionsmischung wurde im Einzellstadium in die Zelle von Zebrafischeiern injiziert. Die Transposase katalysiert die Integration des *Driver*-und *Responder*-Konstrukts in das Zebrafischgenoms über die Tol2 Seiten (Urasaki et al., 2006). Die injizierten Embryonen wurden anhand ihrer DsRed-Expression nach 24 Stunden fluoreszenzmikroskopisch identifiziert. DsRed-positive Embryonen wurden aufgezogen und im adulten Stadium mit Wildtyp-Zebrafischen ausgekreuzt. Die DsRed-exprimierenden Nachkommen der F1-Generation konnten daraufhin als stabile transgene Linien aufgezogen werden.

5.3.14 Gefrierschnitte und Immunhistochemie

Transgene Zebrafischembryonen und ihre nicht-transgenen Geschwister wurden einen Tag nach Befruchtung dechorioniert und in 4% Paraformaldehyd bei 4°C über Nacht fixiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Embryonen in Tissue-Tek OCT compound

eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Bei -22°C wurden $14\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte mit einem Microm HM 560 Kryotom angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Nach Entfernung des Einbettmediums durch 0,5% Tween-20 in PBS wurden die Schnitte für zwei Stunden mit 10% NCST in PBST überschichtet. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Hierfür wurde der Parkin Antikörper PRK-8 1:200 in 2% NCST in PBST verdünnt. Die Schnitte wurden dreimal für 10 Minuten in PBST gewaschen und anschließend mit einem anti-Maus Alexa-488 Zweitantikörper für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten mit PBST und PBS wurden die Schnitte mit Eindeckelmedium überschichtet und mit Deckgläschen eingedeckelt. Die Schnitte wurden an einem Zeiss Axioscope2 plus Mikroskop mit einer 10x und einer 40x Linse analysiert und fotografiert.

5.3.15 Behandlung mit mitochondrialen und exzitatorischen Stressoren

Zebrafischembryonen wurden zwei Tage nach Fertilisation dechorioniert und in 3,5 cm Schalen in Konzentrationen zwischen 10 nM und 750 μM CCCP, 100 μM und 1 mM Glutamat, 100 μM und 1 mM Kainat beziehungsweise 50 $\mu\text{g/l}$ und 200 $\mu\text{g/l}$ Rotenon inkubiert. Domoinsäure wurde in Konzentrationen zwischen 0,5 $\mu\text{g/l}$ und 1 $\mu\text{g/l}$ vier Stunden nach Fertilisation in den Dotter injiziert.

5.3.16 Statistik

Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) wurden mit Microsoft Excel berechnet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde der zweiseitige t-Test verwendet, mit dem ein p-Wert ermittelt wurde. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die in Teil 2.3 gezeigten Daten beruhen auf Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts. Die statistische Analyse der Mitochondrienlänge wurde mit Varianzanalyse (ANOVA) ausgeführt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aarsland, D., Tandberg, E., Larsen, J.P., and Cummings, J.L. (1996). Frequency of dementia in Parkinson disease. *Arch Neurol* 53, 538-542.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., *et al.* (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239-252.
- Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M., and Wood, N.W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7, 207-219.
- Alavi, M.V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H.F., Ruttiger, L., Beck, S.C., Tonagel, F., Pichler, B.J., *et al.* (2007). A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 130, 1029-1042.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., *et al.* (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature genetics* 26, 211-215.
- Ambani, L.M., Van Woert, M.H., and Murphy, S. (1975). Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol* 32, 114-118.
- Amiott, E.A., Lott, P., Soto, J., Kang, P.B., McCaffery, J.M., DiMauro, S., Abel, E.D., Flanigan, K.M., Lawson, V.H., and Shaw, J.M. (2008). Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Experimental neurology* 211, 115-127.
- Anichtchik, O., Diekmann, H., Fleming, A., Roach, A., Goldsmith, P., and Rubinsztein, D.C. (2008). Loss of PINK1 function affects development and results in neurodegeneration in zebrafish. *J Neurosci* 28, 8199-8207.
- Anichtchik, O.V., Kaslin, J., Peitsaro, N., Scheinin, M., and Panula, P. (2004). Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Journal of neurochemistry* 88, 443-453.
- Asakawa, S., Tsunematsu, K., Takayanagi, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Shintani, A., Kawasaki, K., Mungall, A.J., Beck, S., Minoshima, S., *et al.* (2001). The genomic structure and promoter region of the human parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 863-868.
- Baeuerle, P.A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-179.
- Bai, Q., Mullett, S.J., Garver, J.A., Hinkle, D.A., and Burton, E.A. (2006). Zebrafish DJ-1 is evolutionarily conserved and expressed in dopaminergic neurons. *Brain research* 1113, 33-44.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Baloh, R.H., Salavaggione, E., Milbrandt, J., and Pestronk, A. (2007). Familial parkinsonism and ophthalmoplegia from a mutation in the mitochondrial DNA helicase twinkle. *Arch Neurol* 64, 998-1000.
- Bandopadhyay, R., Kingsbury, A.E., Cookson, M.R., Reid, A.R., Evans, I.M., Hope, A.D., Pittman, A.M., Lashley, T., Canet-Aviles, R., Miller, D.W., *et al.* (2004). The

- expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 127, 420-430. Epub 2003 Dec 2008.
- Barnes, P.J. (1997). Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 867-870.
- Barroso, N., Campos, Y., Huertas, R., Esteban, J., Molina, J.A., Alonso, A., Gutierrez-Rivas, E., and Arenas, J. (1993). Respiratory chain enzyme activities in lymphocytes from untreated patients with Parkinson disease. *Clin Chem* 39, 667-669.
- Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., *et al.* (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *The EMBO journal* 25, 3900-3911.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
- Beal, M.F. (2001). Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2, 325-334.
- Beal, M.F. (2003). Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 53 Suppl 3, S39-47; discussion S47-38.
- Becker, G., Seufert, J., Bogdahn, U., Reichmann, H., and Reiners, K. (1995). Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* 45, 182-184.
- Beilina, A., Van Der Brug, M., Ahmad, R., Kesavapany, S., Miller, D.W., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2005). Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5703-5708.
- Beis, D., and Stainier, D.Y. (2006). In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol* 16, 105-112.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science* 120, 838-848.
- Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., *et al.* (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics* 38, 515-517.
- Berger, A.K., Cortese, G.P., Amodeo, K.D., Weihofen, A., Letai, A., and LaVoie, M.J. (2009). Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. *Human molecular genetics* 18, 4317-4328.
- Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., and Kanki, J.P. (2005). Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques* 39, 227-237.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 3, 1301-1306.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., and Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161, 1169-1175.
- Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A., and Ekker, S.C. (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6, 69-77.

- Bogaerts, V., Nuytemans, K., Reumers, J., Pals, P., Engelborghs, S., Pickut, B., Corsmit, E., Peeters, K., Schymkowitz, J., De Deyn, P.P., *et al.* (2008). Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease. *Human mutation* 29, 832-840.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., *et al.* (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256-259. Epub 2002 Nov 2021.
- Bonsi, P., Calabresi, P., De Persis, C., Papa, M., Centonze, D., Bernardi, G., and Pisani, A. (2004). Early ionic and membrane potential changes caused by the pesticide rotenone in striatal cholinergic interneurons. *Experimental neurology* 185, 169-181.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* 118, 401-415.
- Bretaud, S., Allen, C., Ingham, P.W., and Bandmann, O. (2007). p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 100, 1626-1635.
- Bretaud, S., Lee, S., and Guo, S. (2004). Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol* 26, 857-864.
- Brice, A. (2005). Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain* 128, 2760-2762.
- Brockmann, K., Dreha-Kulaczewski, S., Dechent, P., Bonnemann, C., Helms, G., Kyllerman, M., Bruck, W., Frahm, J., Huehne, K., Gartner, J., *et al.* (2008). Cerebral involvement in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mitofusin2 mutations. *Journal of neurology* 255, 1049-1058.
- Burns, M.P., Zhang, L., Rebeck, G.W., Querfurth, H.W., and Moussa, C.E. (2009). Parkin promotes intracellular Abeta1-42 clearance. *Human molecular genetics* 18, 3206-3216.
- Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M., and Kopin, I.J. (1983). A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 4546-4550.
- Candy, J., and Collet, C. (2005). Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochimica et biophysica acta* 1727, 35-44.
- Canet-Aviles, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9103-9108.
- Casarejos, M.J., Menendez, J., Solano, R.M., Rodriguez-Navarro, J.A., Garcia de Yébenes, J., and Mena, M.A. (2006). Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *Journal of neurochemistry* 97, 934-946.
- Caudle, W.M., and Zhang, J. (2009). Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Experimental neurology* 220, 230-233.

- Cha, G.H., Kim, S., Park, J., Lee, E., Kim, M., Lee, S.B., Kim, J.M., Chung, J., and Cho, K.S. (2005). Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10345-10350.
- Chan, P., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., and Di Monte, D. (1991). Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *Journal of neurochemistry* 57, 348-351.
- Chartier-Harlin, M.C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., *et al.* (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167-1169.
- Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* 280, 26185-26192.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200.
- Chen, Y.C., Cheng, C.H., Chen, G.D., Hung, C.C., Yang, C.H., Hwang, S.P., Kawakami, K., Wu, B.K., and Huang, C.J. (2009a). Recapitulation of zebrafish *snca* expression pattern and labeling the habenular complex in transgenic zebrafish using green fluorescent protein reporter gene. *Dev Dyn* 238, 746-754.
- Chen, Y.C., Priyadarshini, M., and Panula, P. (2009b). Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochem Cell Biol* 132, 375-381.
- Cheng, W.W., and Farrell, A.P. (2007). Acute and sublethal toxicities of rotenone in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): swimming performance and oxygen consumption. *Arch Environ Contam Toxicol* 52, 388-396.
- Choi, J., Sullards, M.C., Olzmann, J.A., Rees, H.D., Weintraub, S.T., Bostwick, D.E., Gearing, M., Levey, A.I., Chin, L.S., and Li, L. (2006). Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *The Journal of biological chemistry* 281, 10816-10824.
- Choi, P., Snyder, H., Petrucelli, L., Theisler, C., Chong, M., Zhang, Y., Lim, K., Chung, K.K., Kehoe, K., D'Adamio, L., *et al.* (2003). SEPT5_v2 is a parkin-binding protein. *Brain research* 117, 179-189.
- Chung, K.K., Thomas, B., Li, X., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Marsh, L., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science* 304, 1328-1331.
- Chung, K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature medicine* 7, 1144-1150.
- Ciechanover, A., and Brundin, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40, 427-446.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15927-15932.

- Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., and Guo, M. (2006). *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162-1166.
- Cole, L.K., and Ross, L.S. (2001). Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Developmental biology* 240, 123-142.
- Cookson, M.R., Lockhart, P.J., McLendon, C., O'Farrell, C., Schlossmacher, M., and Farrer, M.J. (2003). RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein. *Human molecular genetics* 12, 2957-2965. Epub 2003 Sep 2930.
- Corti, O., Hampe, C., Koutnikova, H., Darios, F., Jacquier, S., Prigent, A., Robinson, J.C., Pradier, L., Ruberg, M., Mirande, M., et al. (2003). The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Human molecular genetics* 12, 1427-1437.
- Coulom, H., and Birman, S. (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 24, 10993-10998.
- Cummings, J.L. (1992). Depression and Parkinson's disease: a review. *Am J Psychiatry* 149, 443-454.
- Darios, F., Corti, O., Lucking, C.B., Hampe, C., Muriel, M.P., Abbas, N., Gu, W.J., Hirsch, E.C., Rooney, T., Ruberg, M., et al. (2003a). Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Human molecular genetics* 12, 517-526.
- Darios, F., Lambeng, N., Troadec, J.D., Michel, P.P., and Ruberg, M. (2003b). Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death. *Journal of neurochemistry* 84, 643-654.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.
- Daum, R.F., Sekinger, B., Kobal, G., and Lang, C.J. (2000). [Olfactory testing with "sniffin' sticks" for clinical diagnosis of Parkinson disease]. *Nervenarzt* 71, 643-650.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E., and Votruba, M. (2007). Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Human molecular genetics* 16, 1307-1318.
- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., and Kopin, I.J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1, 249-254.
- de Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet neurology* 5, 525-535.
- Dekker, M.C., van Swieten, J.C., Houwing-Duistermaat, J.J., Snijders, P.J., Boeren, E., Hofman, A., Breteler, M.M., Heutink, P., Oostra, B.A., and van Duijn, C.M. (2003). A clinical-genetic study of Parkinson's disease in a genetically isolated community. *Journal of neurology* 250, 1056-1062.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature genetics* 26, 207-210.
- DeMartino, G.N., and Slaughter, C.A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 274, 22123-22126.

- Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H., and Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14503-14508.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176, 405-414.
- Di Fonzo, A., Chien, H.F., Socal, M., Giraudo, S., Tassorelli, C., Iliceto, G., Fabbrini, G., Marconi, R., Fincati, E., Abbruzzese, G., *et al.* (2007). ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 68, 1557-1562.
- Dickson, D.W., Ruan, D., Crystal, H., Mark, M.H., Davies, P., Kress, Y., and Yen, S.H. (1991). Hippocampal degeneration differentiates diffuse Lewy body disease (DLBD) from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of CA2-3 neurites specific to DLBD. *Neurology* 41, 1402-1409.
- Dodd, A., Curtis, P.M., Williams, L.C., and Love, D.R. (2000). Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Human molecular genetics* 9, 2443-2449.
- Doss-Pepe, E.W., Chen, L., and Madura, K. (2005). Alpha-synuclein and parkin contribute to the assembly of ubiquitin lysine 63-linked multiubiquitin chains. *The Journal of biological chemistry* 280, 16619-16624.
- Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., Amora, R., Hocking, T.D., Zhang, L., Rebar, E.J., *et al.* (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 26, 702-708.
- Draper, B.W., Morcos, P.A., and Kimmel, C.B. (2001). Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30, 154-156.
- Duda, J.E., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2000). Neuropathology of synuclein aggregates. *Journal of neuroscience research* 61, 121-127.
- Duffy, J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1-15.
- Efimov, V.A., Buryakova, A.A., and Chakhmakhcheva, O.G. (1999). Synthesis of polyacrylamides N-substituted with PNA-like oligonucleotide mimics for molecular diagnostic applications. *Nucleic Acids Res* 27, 4416-4426.
- Efimov, V.A., Choob, M.V., Buryakova, A.A., Kalinkina, A.L., and Chakhmakhcheva, O.G. (1998). Synthesis and evaluation of some properties of chimeric oligomers containing PNA and phosphono-PNA residues. *Nucleic Acids Res* 26, 566-575.
- Eisen, J.S., and Smith, J.C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development (Cambridge, England)* 135, 1735-1743.
- Ekker, S.C., and Larson, J.D. (2001). Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* 30, 89-93.
- Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmstrom, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.H., Gasser, T., *et al.* (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27, 12413-12418.

- Fabre, E., Monserrat, J., Herrero, A., Barja, G., and Leret, M.L. (1999). Effect of MPTP on brain mitochondrial H₂O₂ and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. *J Physiol Biochem* 55, 325-331.
- Fallon, L., Belanger, C.M., Corera, A.T., Kontogianna, M., Regan-Klapisz, E., Moreau, F., Voortman, J., Haber, M., Rouleau, G., Thorarinsdottir, T., *et al.* (2006). A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nature cell biology* 8, 834-842.
- Fallon, L., Moreau, F., Croft, B.G., Labib, N., Gu, W.J., and Fon, E.A. (2002). Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *The Journal of biological chemistry* 277, 486-491.
- Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Hernandez, D., Forno, L., Gwinn-Hardy, K., Petrucelli, L., Hussey, J., *et al.* (2001). Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Annals of neurology* 50, 293-300.
- Ferrante, R.J., Schulz, J.B., Kowall, N.W., and Beal, M.F. (1997). Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain research* 753, 157-162.
- Filippi, A., Mahler, J., Schweitzer, J., and Driever, W. (2010). Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes th1 and th2 reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *J Comp Neurol* 518, 423-438.
- Fleming, S.M., Fernagut, P.O., and Chesselet, M.F. (2005). Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2, 495-503.
- Flinn, L., Bretaud, S., Lo, C., Ingham, P.W., and Bandmann, O. (2008). Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *Journal of neurochemistry* 106, 1991-1997.
- Flinn, L., Mortiboys, H., Volkmann, K., Koster, R.W., Ingham, P.W., and Bandmann, O. (2009). Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*). *Brain* 132, 1613-1623.
- Forno, L.S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 259-272.
- Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., and Obata, F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Annals of neurology* 51, 296-301.
- Furutani-Seiki, M., Jiang, Y.J., Brand, M., Heisenberg, C.P., Houart, C., Beuchle, D., van Eeden, F.J., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., *et al.* (1996). Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)* 123, 229-239.
- Gegg, M.E., Cooper, J.M., Schapira, A.H., and Taanman, J.W. (2009). Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. *PLoS One* 4, e4756.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacino, J.J., Cepeda, C., Lam, H.A., Bhatnagar, A., Meloni, E.G., Wu, N., Ackerson, L.C., Klapstein, G.J., *et al.* (2003). Parkin-deficient

- mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry* 278, 43628-43635.
- Good, P.F., Olanow, C.W., and Perl, D.P. (1992). Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain research* 593, 343-346.
- Gorell, J.M., Johnson, C.C., Rybicki, B.A., Peterson, E.L., and Richardson, R.J. (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50, 1346-1350.
- Greenbaum, E.A., Graves, C.L., Mishizen-Eberz, A.J., Lupoli, M.A., Lynch, D.R., Englander, S.W., Axelsen, P.H., and Giasson, B.I. (2005). The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *The Journal of biological chemistry* 280, 7800-7807.
- Greene, J.C., Whitworth, A.J., Kuo, I., Andrews, L.A., Feany, M.B., and Pallanck, L.J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4078-4083.
- Gu, W.J., Corti, O., Araujo, F., Hampe, C., Jacquier, S., Lucking, C.B., Abbas, N., Duyckaerts, C., Rooney, T., Pradier, L., *et al.* (2003). The C289G and C418R missense mutations cause rapid sequestration of human Parkin into insoluble aggregates. *Neurobiol Dis* 14, 357-364.
- Gutschow, M., and Meusel, M. (2006). [Enzyme inhibitors in Parkinson treatment]. *Pharmazie in unserer Zeit* 35, 218-225.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.
- Haehner, A., Hummel, T., and Reichmann, H. (2009). Olfactory dysfunction as a diagnostic marker for Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* 9, 1773-1779.
- Hagenah, J.M., Hedrich, K., Becker, B., Pramstaller, P.P., Seidel, G., and Klein, C. (2006). Distinguishing early-onset PD from dopa-responsive dystonia with transcranial sonography. *Neurology* 66, 1951-1952.
- Hallett, P.J., and Standaert, D.G. (2004). Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* 102, 155-174.
- Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., and Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Human molecular genetics* 15, 2059-2075.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harder, Z., Zunino, R., and McBride, H. (2004). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14, 340-345.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hayashi, S., Wakabayashi, K., Ishikawa, A., Nagai, H., Saito, M., Maruyama, M., Takahashi, T., Ozawa, T., Tsuji, S., and Takahashi, H. (2000). An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov Disord* 15, 884-888.
- Haywood, A.F., and Staveley, B.E. (2004). Parkin counteracts symptoms in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 5, 14.

- Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., and Wood, N.W. (2004). Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res* 318, 189-194.
- Heikkila, R.E., Cabbat, F.S., Manzino, L., and Duvoisin, R.C. (1984). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology* 23, 711-713.
- Henn, I.H., Bouman, L., Schlehe, J.S., Schlierf, A., Schramm, J.E., Wegener, E., Nakaso, K., Culmsee, C., Berninger, B., Krappmann, D., et al. (2007). Parkin mediates neuroprotection through activation of I κ B kinase/nuclear factor- κ B signaling. *J Neurosci* 27, 1868-1878.
- Henn, I.H., Gostner, J.M., Lackner, P., Tatzelt, J., and Winklhofer, K.F. (2005). Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms. *Journal of neurochemistry* 92, 114-122.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61, 761-807.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hershko, A., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (2000). Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nature medicine* 6, 1073-1081.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Higashi, S., Moore, D.J., Colebrooke, R.E., Biskup, S., Dawson, V.L., Arai, H., Dawson, T.M., and Emson, P.C. (2007). Expression and localization of Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 in the mouse brain. *Journal of neurochemistry* 100, 368-381.
- Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Hattori, N., Mizuno, Y., and Ogawa, N. (2004). Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *Journal of neurochemistry* 89, 1490-1497.
- Hilker, R., Klein, C., Ghaemi, M., Kis, B., Strotmann, T., Ozelius, L.J., Lenz, O., Vieregge, P., Herholz, K., Heiss, W.D., et al. (2001). Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. *Annals of neurology* 49, 367-376.
- Hirsch, E.C., and Faucheux, B.A. (1998). Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord* 13 Suppl 1, 39-45.
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458, 422-429.
- Hoglinger, G.U., Feger, J., Prigent, A., Michel, P.P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W.H., and Hirsch, E.C. (2003). Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *Journal of neurochemistry* 84, 491-502.
- Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of cell science* 118, 5411-5419.
- Holzschuh, J., Ryu, S., Aberger, F., and Driever, W. (2001). Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mechanisms of development* 101, 237-243.
- Hornykiewicz, O. (1982). Imbalance of brain monoamines and clinical disorders. *Prog Brain Res* 55, 419-429.

- Huynh, D.P., Nguyen, D.T., Pulst-Korenberg, J.B., Brice, A., and Pulst, S.M. (2007). Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death. *Experimental neurology* 203, 531-541.
- Huynh, D.P., Scoles, D.R., Ho, T.H., Del Bigio, M.R., and Pulst, S.M. (2000). Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Annals of neurology* 48, 737-744.
- Hyun, D.H., Lee, M., Halliwell, B., and Jenner, P. (2005). Effect of overexpression of wild-type or mutant parkin on the cellular response induced by toxic insults. *Journal of neuroscience research* 82, 232-244.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., and Takahashi, R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105, 891-902.
- Imai, Y., Soda, M., and Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *The Journal of biological chemistry* 275, 35661-35664.
- Imamura, H., Nhat, K.P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 15651-15656.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021-1027.
- Irwin, I., DeLanney, L.E., and Langston, J.W. (1993). MPTP and aging. Studies in the C57BL/6 mouse. *Adv Neurol* 60, 197-206.
- Ishikawa, A., and Takahashi, H. (1998). Clinical and neuropathological aspects of autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Journal of neurology* 245, P4-9.
- Itier, J.M., Ibanez, P., Mena, M.A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G.A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L., *et al.* (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human molecular genetics* 12, 2277-2291.
- Jain, S., Wood, N.W., and Healy, D.G. (2005). Molecular genetic pathways in Parkinson's disease: a review. *Clin Sci (Lond)* 109, 355-364.
- Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M., and Snyder, S.H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 2173-2177.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-28.
- Jiang, H., Ren, Y., Zhao, J., and Feng, J. (2004a). Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Human molecular genetics* 13, 1745-1754. Epub 2004 Jun 1715.
- Jiang, H., Ren, Y., Zhao, J., and Feng, J. (2004b). Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Human molecular genetics* 13, 1745-1754.

- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.
- Jolly, C., and Morimoto, R.I. (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1564-1572.
- Karbowski, M., Neutzner, A., and Youle, R.J. (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178, 71-84.
- Kawakami, K. (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn* 234, 244-254.
- Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., and Bennett, J.P., Jr. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci* 26, 5256-5264.
- Khan, N.L., Brooks, D.J., Pavese, N., Sweeney, M.G., Wood, N.W., Lees, A.J., and Piccini, P. (2002). Progression of nigrostriatal dysfunction in a parkin kindred: an [¹⁸F]dopa PET and clinical study. *Brain* 125, 2248-2256.
- Kikuchi, S., and Kim, S.U. (1993). Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *Journal of neuroscience research* 36, 558-569.
- Kim, R.H., Smith, P.D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M.P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A.J., Kalia, S.K., Horne, P., et al. (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5215-5220.
- Kimmel, C.B. (1993). Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annu Rev Neurosci* 16, 707-732.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.
- Kish, S.J., Morito, C., and Hornykiewicz, O. (1985). Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* 58, 343-346.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal parkinsonism. *Nature* 392, 605-608.
- Kitada, T., Tong, Y., Gautier, C.A., and Shen, J. (2009). Absence of nigral degeneration in aged parkin/DJ-1/PINK1 triple knockout mice. *Journal of neurochemistry* 111, 696-702.
- Klein, C., Pramstaller, P.P., Kis, B., Page, C.C., Kann, M., Leung, J., Woodward, H., Castellan, C.C., Scherer, M., Vieregge, P., et al. (2000). Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Annals of neurology* 48, 65-71.
- Klein, C., and Schlossmacher, M.G. (2007). Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution. Multiple clues to a complex disorder. *Neurology*.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzel, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9, 505-518.
- Ko, H.S., Kim, S.W., Sriram, S.R., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2006). Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate. *The Journal of biological chemistry* 281, 16193-16196.
- Ko, H.S., von Coelln, R., Sriram, S.R., Kim, S.W., Chung, K.K., Pletnikova, O., Troncoso, J., Johnson, B., Saffary, R., Goh, E.L., et al. (2005). Accumulation of the authentic

- parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *J Neurosci* 25, 7968-7978.
- Koch, A., Lehmann-Horn, K., Dachsel, J.C., Gasser, T., Kahle, P.J., and Lucking, C.B. (2009). Proteasomal inhibition reduces parkin mRNA in PC12 and SH-SY5Y cells. *Parkinsonism Relat Disord* 15, 220-225.
- Kordower, J.H., Kanaan, N.M., Chu, Y., Suresh Babu, R., Stansell, J., 3rd, Terpstra, B.T., Sortwell, C.E., Steece-Collier, K., and Collier, T.J. (2006). Failure of proteasome inhibitor administration to provide a model of Parkinson's disease in rats and monkeys. *Annals of neurology* 60, 264-268.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Krappmann, D., Wulczyn, F.G., and Scheidereit, C. (1996). Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor I kappa B alpha in vivo. *The EMBO journal* 15, 6716-6726.
- Krige, D., Carroll, M.T., Cooper, J.M., Marsden, C.D., and Schapira, A.H. (1992). Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Annals of neurology* 32, 782-788.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schols, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics* 18, 106-108.
- Kubo, S.I., Kitami, T., Noda, S., Shimura, H., Uchiyama, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Mizuno, Y., and Hattori, N. (2001). Parkin is associated with cellular vesicles. *Journal of neurochemistry* 78, 42-54.
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., Shono, M., Akaike, M., Azuma, H., and Matsumoto, T. (2006). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Human molecular genetics* 15, 883-895.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., and van der Bliek, A.M. (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 4, 815-826.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lam, C.S., Korzh, V., and Strahle, U. (2005). Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *The European journal of neuroscience* 21, 1758-1762.
- Lang, A.E., and Lozano, A.M. (1998a). Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine* 339, 1044-1053.
- Lang, A.E., and Lozano, A.M. (1998b). Parkinson's disease. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 339, 1130-1143.
- Langenau, D.M., and Zon, L.I. (2005). The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nat Rev Immunol* 5, 307-317.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Tetrud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of neurology* 46, 598-605.

- LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Weihofen, A., Schlossmacher, M.G., and Selkoe, D.J. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nature medicine* 11, 1214-1221.
- Ledesma, M.D., Galvan, C., Hellias, B., Dotti, C., and Jensen, P.H. (2002). Astrocytic but not neuronal increased expression and redistribution of parkin during unfolded protein stress. *Journal of neurochemistry* 83, 1431-1440.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15, 5001-5011.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13, 4343-4354.
- Lesage, S., Condroyer, C., Lannuzel, A., Lohmann, E., Troiano, A., Tison, F., Damier, P., Thobois, S., Ouvrard-Hernandez, A.M., Rivaud-Pechoux, S., et al. (2009). Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease. *J Med Genet* 46, 458-464.
- Lesage, S., Magali, P., Lohmann, E., Lacomblez, L., Teive, H., Janin, S., Cousin, P.Y., Durr, A., and Brice, A. (2007). Deletion of the parkin and PACRG gene promoter in early-onset parkinsonism. *Human mutation* 28, 27-32.
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887.
- Lieschke, G.J., and Currie, P.D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature reviews* 8, 353-367.
- Lim, K.L., Chew, K.C., Tan, J.M., Wang, C., Chung, K.K., Zhang, Y., Tanaka, Y., Smith, W., Engelender, S., Ross, C.A., et al. (2005). Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J Neurosci* 25, 2002-2009.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.
- Litvan, I., Hauw, J.J., Bartko, J.J., Lantos, P.L., Daniel, S.E., Horoupian, D.S., McKee, A., Dickson, D., Bancher, C., Tabaton, M., et al. (1996). Validity and reliability of the preliminary NINDS neuropathologic criteria for progressive supranuclear palsy and related disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 97-105.
- Liu, W., Vives-Bauza, C., Acin-Perez, R., Yamamoto, A., Tan, Y., Li, Y., Magrane, J., Stavarache, M.A., Shaffer, S., Chang, S., et al. (2009). PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS One* 4, e4597.
- Lo Bianco, C., Schneider, B.L., Bauer, M., Sajadi, A., Brice, A., Iwatsubo, T., and Aebischer, P. (2004). Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17510-17515. Epub 12004 Dec 17502.

- Lohmann, E., Periquet, M., Bonifati, V., Wood, N.W., De Michele, G., Bonnet, A.M., Fraix, V., Broussolle, E., Horstink, M.W., Vidailhet, M., *et al.* (2003). How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Annals of neurology* 54, 176-185.
- Lu, Y.W., and Tan, E.K. (2008). Molecular biology changes associated with LRRK2 mutations in Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research* 86, 1895-1901.
- Lucking, C.B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., Harhangi, B.S., Meco, G., Deneffe, P., Wood, N.W., *et al.* (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *The New England journal of medicine* 342, 1560-1567.
- Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lammermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., *et al.* (2009). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *The Journal of biological chemistry* 284, 22938-22951.
- Maker, H.S., Weiss, C., Silides, D.J., and Cohen, G. (1981). Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *Journal of neurochemistry* 36, 589-593.
- Manfredsson, F.P., Burger, C., Sullivan, L.F., Muzyczka, N., Lewin, A.S., and Mandel, R.J. (2007). rAAV-mediated nigral human parkin over-expression partially ameliorates motor deficits via enhanced dopamine neurotransmission in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*.
- Manning-Bog, A.B., Reaney, S.H., Chou, V.P., Johnston, L.C., McCormack, A.L., Johnston, J., Langston, J.W., and Di Monte, D.A. (2006). Lack of nigrostriatal pathology in a rat model of proteasome inhibition. *Annals of neurology* 60, 256-260.
- Markey, S.P., Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S., and Herkenham, M.A. (1984). Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311, 464-467.
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., and Scheller, R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8, 2804-2815.
- Marsden, C.D. (1983). Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 19, 121-141.
- Martin, H.L., and Teismann, P. (2009). Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J* 23, 3263-3272.
- Martin, L.J., and Liu, Z. (2002). DNA damage profiling in motor neurons: a single-cell analysis by comet assay. *Neurochem Res* 27, 1093-1104.
- Martinou, J.C., and Youle, R.J. (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ* 13, 1291-1295.
- Mata, I.F., Lockhart, P.J., and Farrer, M.J. (2004). Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Human molecular genetics* 13 Spec No 1, R127-133.
- Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., and Tanaka, K. (2006). Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *The Journal of biological chemistry* 281, 3204-3209.
- Matsui, H., Taniguchi, Y., Inoue, H., Uemura, K., Takeda, S., and Takahashi, R. (2009). A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype,

- movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. *Neurosci Res* 65, 263-271.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nature biotechnology* 18, 455-457.
- McGrath, P., and Li, C.Q. (2008). Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug discovery today* 13, 394-401.
- McKenna, S., Spyropoulos, L., Moraes, T., Pastushok, L., Ptak, C., Xiao, W., and Ellison, M.J. (2001). Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein Mms2 is required for Ubc13-mediated polyubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 276, 40120-40126.
- McKinley, E.T., Baranowski, T.C., Blavo, D.O., Cato, C., Doan, T.N., and Rubinstein, A.L. (2005). Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain research* 141, 128-137.
- McNaught, K.S., Perl, D.P., Brownell, A.L., and Olanow, C.W. (2004). Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of neurology* 56, 149-162.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.
- Menendez, J., Rodriguez-Navarro, J.A., Solano, R.M., Casarejos, M.J., Rodal, I., Guerrero, R., Sanchez, M.P., Avila, J., Mena, M.A., and de Yébenes, J.G. (2006). Suppression of Parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human-mutated tau protein. *Human molecular genetics* 15, 2045-2058.
- Meng, X., Noyes, M.B., Zhu, L.J., Lawson, N.D., and Wolfe, S.A. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology* 26, 695-701.
- Menzies, F.M., Yenissetti, S.C., and Min, K.T. (2005). Roles of Drosophila DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol* 15, 1578-1582.
- Meredith, G.E., Sonsalla, P.K., and Chesselet, M.F. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathol* 115, 385-398.
- Meulener, M., Whitworth, A.J., Armstrong-Gold, C.E., Rizzu, P., Heutink, P., Wes, P.D., Pallanck, L.J., and Bonini, N.M. (2005). Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr Biol* 15, 1572-1577.
- Miller, D.W., Ahmad, R., Hague, S., Baptista, M.J., Canet-Aviles, R., McLendon, C., Carter, D.M., Zhu, P.P., Stadler, J., Chandran, J., et al. (2003). L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system. *The Journal of biological chemistry* 278, 36588-36595.
- Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of cell science* 117, 2791-2804.
- Miranda, A.F., Boegman, R.J., Beninger, R.J., and Jhamandas, K. (1997). Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. *Neuroscience* 78, 967-975.
- Mitsumoto, A., Nakagawa, Y., Takeuchi, A., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Takanezawa, Y. (2001). Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic Res* 35, 301-310.
- Mizuno, Y., Hattori, N., Kubo, S., Sato, S., Nishioka, K., Hatano, T., Tomiyama, H., Funayama, M., Machida, Y., and Mochizuki, H. (2008). Progress in the

- pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2215-2227.
- Mizuno, Y., Ohta, S., Tanaka, M., Takamiya, S., Suzuki, K., Sato, T., Oya, H., Ozawa, T., and Kagawa, Y. (1989). Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 1450-1455.
- Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 57-87.
- Moore, D.J., Zhang, L., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2003). A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization. *Journal of neurochemistry* 87, 1558-1567.
- Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., Suda, K., and Mizuno, Y. (1998). Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 51, 890-892.
- Morimoto, R.I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes & development* 22, 1427-1438.
- Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131, 1315-1326.
- Mortiboys, H., Thomas, K.J., Koopman, W.J., Klaffke, S., Abou-Sleiman, P., Olpin, S., Wood, N.W., Willems, P.H., Smeitink, J.A., Cookson, M.R., et al. (2008). Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Annals of neurology* 64, 555-565.
- Muftuoglu, M., Elibol, B., Dalmizrak, O., Ercan, A., Kulaksiz, G., Ogun, H., Dalkara, T., and Ozer, N. (2004). Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov Disord* 19, 544-548.
- Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., and Nusslein-Volhard, C. (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol* 4, 189-202.
- Muqit, M.M., and Feany, M.B. (2002). Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nat Rev Neurosci* 3, 237-243.
- Muqit, M.M., Moss, J., Sewry, C., and Lane, R.J. (2004). Phenotypic variability in siblings with type III spinal muscular atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 75, 1762-1764.
- Muthane, U., Ramsay, K.A., Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., Fernando, S., Ferreira, M., and Przedborski, S. (1994). Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Experimental neurology* 126, 195-204.
- Mutschler, E. (2001). Mutschler Arzneimittelwirkungen (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart).
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I., and Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nature medicine* 7, 934-940.
- Nasevicius, A., and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics* 26, 216-220.
- Nash, J.E., Ravenscroft, P., McGuire, S., Crossman, A.R., Menniti, F.S., and Brotchie, J.M. (2004). The NR2B-selective NMDA receptor antagonist CP-101,606 exacerbates L-

- DOPA-induced dyskinesia and provides mild potentiation of anti-parkinsonian effects of L-DOPA in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* 188, 471-479.
- Ng, C.H., Mok, S.Z., Koh, C., Ouyang, X., Fivaz, M.L., Tan, E.K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Yu, F., and Lim, K.L. (2009). Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in *Drosophila*. *J Neurosci* 29, 11257-11262.
- Nicklas, W.J., Vyas, I., and Heikkila, R.E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36, 2503-2508.
- Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G., and Henneberry, R.C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain research* 451, 205-212.
- Oberg, K.E. (1964). The Inhibition of the Respiration of Brain Mitochondria of Rotenone-Poisoned Fish. *Exp Cell Res* 36, 407-410.
- Oda, T., Kosuge, Y., Arakawa, M., Ishige, K., and Ito, Y. (2008). Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells. *Neurosci Res* 60, 29-39.
- Olanow, C.W., Stern, M.B., and Sethi, K. (2009). The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72, S1-136.
- Olney, J.W. (1986). Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203, 631-645.
- Ovadia, A., Zhang, Z., and Gash, D.M. (1995). Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys. *Neurobiology of aging* 16, 931-937.
- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., *et al.* (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44, 595-600.
- Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., and Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 279, 18614-18622.
- Pappolla, M.A. (1986). Lewy bodies of Parkinson's disease. Immune electron microscopic demonstration of neurofilament antigens in constituent filaments. *Arch Pathol Lab Med* 110, 1160-1163.
- Paquet, D., Bhat, R., Sydow, A., Mandelkow, E.M., Berg, S., Hellberg, S., Falting, J., Distel, M., Koster, R.W., Schmid, B., *et al.* (2009). A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *The Journal of clinical investigation*.
- Park, H.M., Kim, G.Y., Nam, M.K., Seong, G.H., Han, C., Chung, K.C., Kang, S., and Rhim, H. (2009a). The serine protease HtrA2/Omi cleaves Parkin and irreversibly inactivates its E3 ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 537-542.
- Park, J., Kim, S.Y., Cha, G.H., Lee, S.B., Kim, S., and Chung, J. (2005). *Drosophila* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene* 361, 133-139.

- Park, J., Lee, G., and Chung, J. (2009b). The PINK1-Parkin pathway is involved in the regulation of mitochondrial remodeling process. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 518-523.
- Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M., *et al.* (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157-1161.
- Parker, W.D., Jr., Boyson, S.J., and Parks, J.K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Annals of neurology* 26, 719-723.
- Parng, C., Seng, W.L., Semino, C., and McGrath, P. (2002). Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and drug development technologies* 1, 41-48.
- Paterna, J.C., Leng, A., Weber, E., Feldon, J., and Bueler, H. (2007). DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice. *Mol Ther* 15, 698-704.
- Pawlyk, A.C., Giasson, B.I., Sampathu, D.M., Perez, F.A., Lim, K.L., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Palmiter, R.D., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2003). Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age. *The Journal of biological chemistry* 278, 48120-48128.
- Peng, Y.G., Taylor, T.B., Finch, R.E., Switzer, R.C., and Ramsdell, J.S. (1994). Neuroexcitatory and neurotoxic actions of the amnesic shellfish poison, domoic acid. *Neuroreport* 5, 981-985.
- Perez, F.A., and Palmiter, R.D. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2174-2179.
- Perier, C., Tieu, K., Guegan, C., Caspersen, C., Jackson-Lewis, V., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hirano, M., Przedborski, S., and Vila, M. (2005). Complex I deficiency primes Bax-dependent neuronal apoptosis through mitochondrial oxidative damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 19126-19131.
- Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., Harding, M., Bellen, H., and Mardon, G. (2004). *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development (Cambridge, England)* 131, 2183-2194.
- Peterson, R.T., Shaw, S.Y., Peterson, T.A., Milan, D.J., Zhong, T.P., Schreiber, S.L., MacRae, C.A., and Fishman, M.C. (2004). Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nature biotechnology* 22, 595-599.
- Petit, A., Kawarai, T., Paitel, E., Sanjo, N., Maj, M., Scheid, M., Chen, F., Gu, Y., Hasegawa, H., Salehi-Rad, S., *et al.* (2005). Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *The Journal of biological chemistry* 280, 34025-34032.
- Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P.J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, M., Hardy, J., *et al.* (2002). Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron* 36, 1007-1019.
- Pollard, H.B., Kuijpers, G.A., Adeyemo, O.M., Youdim, M.B., and Goping, G. (1996). The MPTP-induced parkinsonian syndrome in the goldfish is associated with major cell

- destruction in the forebrain and subtle changes in the optic tectum. *Experimental neurology* 142, 170-178.
- Polymeropoulos, M.H., Higgins, J.J., Golbe, L.I., Johnson, W.G., Ide, S.E., Di Iorio, G., Sanges, G., Stenroos, E.S., Pho, L.T., Schaffer, A.A., *et al.* (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274, 1197-1199.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., *et al.* (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J., and Pallanck, L.J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1638-1643.
- Pramstaller, P.P., Schlossmacher, M.G., Jacques, T.S., Scaravilli, F., Eskelson, C., Pepivani, I., Hedrich, K., Adel, S., Gonzales-McNeal, M., Hilker, R., *et al.* (2005). Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Annals of neurology* 58, 411-422.
- Rajput, A.H., Rozdilsky, B., and Rajput, A. (1991). Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *Can J Neurol Sci* 18, 275-278.
- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J., *et al.* (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics* 38, 1184-1191.
- Ren, Y., Zhao, J., and Feng, J. (2003). Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci* 23, 3316-3324.
- Richter, F., Hamann, M., and Richter, A. (2007). Chronic rotenone treatment induces behavioral effects but no pathological signs of parkinsonism in mice. *Journal of neuroscience research* 85, 681-691.
- Rink, E., and Wullimann, M.F. (2001). The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain research* 889, 316-330.
- Rink, E., and Wullimann, M.F. (2002a). Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain research bulletin* 57, 385-387.
- Rink, E., and Wullimann, M.F. (2002b). Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: an immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 137, 89-100.
- Robu, M.E., Larson, J.D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S.A., and Ekker, S.C. (2007). p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* 3, e78.
- Rodriguez, M.C., Obeso, J.A., and Olanow, C.W. (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Annals of neurology* 44, S175-188.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombes, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *Journal of cell science* 115, 1663-1674.

- Rose, S., Nomoto, M., Jackson, E.A., Gibb, W.R., Jaehnig, P., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1993). Age-related effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment of common marmosets. *Eur J Pharmacol* 230, 177-185.
- Rosen, K.M., Veereshwarayya, V., Moussa, C.E., Fu, Q., Goldberg, M.S., Schlossmacher, M.G., Shen, J., and Querfurth, H.W. (2006). Parkin protects against mitochondrial toxins and beta-amyloid accumulation in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 12809-12816.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Safiulina, D., Veksler, V., Zharkovsky, A., and Kaasik, A. (2006). Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *J Cell Physiol* 206, 347-353.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saleh, M.C., van Rij, R.P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P.H., and Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature cell biology* 8, 793-802.
- Sallinen, V., Torkko, V., Sundvik, M., Reenila, I., Khrustalyov, D., Kaslin, J., and Panula, P. (2009). MPTP and MPP+ target specific aminergic cell populations in larval zebrafish. *Journal of neurochemistry* 108, 719-731.
- Sambrook J, F., E.F. Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Santiago, Y., Chan, E., Liu, P.Q., Orlando, S., Zhang, L., Urnov, F.D., Holmes, M.C., Guschin, D., Waite, A., Miller, J.C., *et al.* (2008). Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5809-5814.
- Santpere, G., and Ferrer, I. (2009). LRRK2 and neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 117, 227-246.
- Sato, A., Nakada, K., and Hayashi, J. (2006a). Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 473-481.
- Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., *et al.* (2006b). Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice shown by ex vivo autoradiography. *Journal of neuroscience research* 84, 1350-1357.
- Schapira, A.H. (2008). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet neurology* 7, 97-109.
- Schapira, A.H., Bezard, E., Brotchie, J., Calon, F., Collingridge, G.L., Ferger, B., Hengerer, B., Hirsch, E., Jenner, P., Le Novere, N., *et al.* (2006). Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov* 5, 845-854.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1, 1269.

- Schlehe, J.S., Lutz, A.K., Pils, A., Lammermann, K., Grgur, K., Henn, I.H., Tatzelt, J., and Winklhofer, K.F. (2008). Aberrant folding of pathogenic Parkin mutants: aggregation versus degradation. *The Journal of biological chemistry* 283, 13771-13779.
- Schlossmacher, M.G., Frosch, M.P., Gai, W.P., Medina, M., Sharma, N., Forno, L., Ochiishi, T., Shimura, H., Sharon, R., Hattori, N., *et al.* (2002). Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 160, 1655-1667.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 27, 353-365.
- Schuler, F., and Casida, J.E. (2001). The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci* 57, 932-940.
- Sedelis, M., Hofele, K., Auburger, G.W., Morgan, S., Huston, J.P., and Schwarting, R.K. (2000). MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet* 30, 171-182.
- Seniuk, N.A., Tatton, W.G., and Greenwood, C.E. (1990). Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain research* 527, 7-20.
- Sherer, T.B., Kim, J.H., Betarbet, R., and Greenamyre, J.T. (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Experimental neurology* 179, 9-16.
- Sherman, M.Y., and Goldberg, A.L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., *et al.* (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics* 25, 302-305.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Yamamura, Y., Shimizu, N., *et al.* (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Annals of neurology* 45, 668-672.
- Shimura, H., Schlossmacher, M.G., Hattori, N., Frosch, M.P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K.S., and Selkoe, D.J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. *Science* 293, 263-269.
- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1994). Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of neurology* 36, 348-355.
- Sidhu, A., Wersinger, C., and Vernier, P. (2004). Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB J* 18, 637-647.
- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M., and Casari, G. (2005). Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Human molecular genetics* 14, 3477-3492.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., *et al.* (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.

- Sirinathsinghji, D.J., Kupsch, A., Mayer, E., Zivin, M., Pufal, D., and Oertel, W.H. (1992). Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystokinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain research* 12, 267-274.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245-2256.
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G.P., Hebenstreit, G., and Youdim, M.B. (1988). Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm* 74, 199-205.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6469-6473.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840.
- Springer, W., Hoppe, T., Schmidt, E., and Baumeister, R. (2005). A Caenorhabditis elegans Parkin mutant with altered solubility couples alpha-synuclein aggregation to proteotoxic stress. *Human molecular genetics* 14, 3407-3423.
- Sriram, S.R., Li, X., Ko, H.S., Chung, K.K., Wong, E., Lim, K.L., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Human molecular genetics* 14, 2571-2586.
- Stainier, D.Y. (2001). Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nature reviews* 2, 39-48.
- Staropoli, J.F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., and Abeliovich, A. (2003). Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 37, 735-749.
- Stern, H.M., Murphey, R.D., Shepard, J.L., Amatruda, J.F., Straub, C.T., Pfaff, K.L., Weber, G., Tallarico, J.A., King, R.W., and Zon, L.I. (2005). Small molecules that delay S phase suppress a zebrafish bmyb mutant. *Nat Chem Biol* 1, 366-370.
- Stichel, C.C., Augustin, M., Kuhn, K., Zhu, X.R., Engels, P., Ullmer, C., and Lubbert, H. (2000). Parkin expression in the adult mouse brain. *The European journal of neuroscience* 12, 4181-4194.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G., and Vrana, K.E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *Journal of neuroscience research* 55, 659-665.
- Stout, A.K., Raphael, H.M., Kanterewicz, B.I., Klann, E., and Reynolds, I.J. (1998). Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature neuroscience* 1, 366-373.
- Summerton, J., and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 187-195.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *The Journal of biological chemistry* 282, 11521-11529.
- Takahashi, H., Ohama, E., Suzuki, S., Horikawa, Y., Ishikawa, A., Morita, T., Tsuji, S., and Ikuta, F. (1994). Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family. *Neurology* 44, 437-441.

- Takahashi, R., Imai, Y., Hattori, N., and Mizuno, Y. (2003). Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci* 991, 101-106.
- Talpade, D.J., Greene, J.G., Higgins, D.S., Jr., and Greenamyre, J.T. (2000). In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *Journal of neurochemistry* 75, 2611-2621.
- Tan, E.K., Puong, K.Y., Chan, D.K., Yew, K., Fook-Chong, S., Shen, H., Ng, P.W., Woo, J., Yuen, Y., Pavanni, R., et al. (2005). Impaired transcriptional upregulation of Parkin promoter variant under oxidative stress and proteasomal inhibition: clinical association. *Human genetics* 118, 484-488.
- Trimmer, P.A., Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Keeney, P., Bennett, J.P., Jr., Miller, S.W., Davis, R.E., and Parker, W.D., Jr. (2000). Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines. *Experimental neurology* 162, 37-50.
- Tsai, Y.C., Fishman, P.S., Thakor, N.V., and Oyler, G.A. (2003). Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *The Journal of biological chemistry* 278, 22044-22055. Epub 22003 Apr 22003.
- Turski, L., Bressler, K., Rettig, K.J., Loschmann, P.A., and Wachtel, H. (1991). Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 349, 414-418.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* 27, 433-446.
- Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., and Lipton, S.A. (2006). S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513-517.
- Uhl, G.R., Hedreen, J.C., and Price, D.L. (1985). Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35, 1215-1218.
- Um, J.W., Stichel-Gunkel, C., Lubbert, H., Lee, G., and Chung, K.C. (2009). Molecular interaction between parkin and PINK1 in mammalian neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 40, 421-432.
- Urasaki, A., Morvan, G., and Kawakami, K. (2006). Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* 174, 639-649.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304, 1158-1160.
- Vallone, D., Santoriello, C., Gondi, S.B., and Foulkes, N.S. (2007). Basic protocols for zebrafish cell lines: maintenance and transfection. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 362, 429-441.
- van de Warrenburg, B.P., Lammens, M., Lucking, C.B., Deneffe, P., Wesseling, P., Booij, J., Praamstra, P., Quinn, N., Brice, A., and Horstink, M.W. (2001). Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* 56, 555-557.

- Varastet, M., Riche, D., Maziere, M., and Hantraye, P. (1994). Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63, 47-56.
- Vercammen, L., Van der Perren, A., Vaudano, E., Gijsbers, R., Debyser, Z., Van den Haute, C., and Baekelandt, V. (2006). Parkin protects against neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine rat model for Parkinson's disease. *Mol Ther* 14, 716-723.
- von Coelln, R., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004a). Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 318, 175-184. Epub 2004 Jul 2030.
- Von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J.M., Lim, K.L., Sasaki, M., Hess, E.J., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004b). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10744-10749.
- Wang, C., Lu, R., Ouyang, X., Ho, M.W., Chia, W., Yu, F., and Lim, K.L. (2007a). Drosophila overexpressing parkin R275W mutant exhibits dopaminergic neuron degeneration and mitochondrial abnormalities. *J Neurosci* 27, 8563-8570.
- Wang, C., Tan, J.M., Ho, M.W., Zaiden, N., Wong, S.H., Chew, C.L., Eng, P.W., Lim, T.M., Dawson, T.M., and Lim, K.L. (2005). Alterations in the solubility and intracellular localization of parkin by several familial Parkinson's disease-linked point mutations. *Journal of neurochemistry* 93, 422-431.
- Wang, H.Q., Imai, Y., Kataoka, A., and Takahashi, R. (2007b). Cell type-specific upregulation of Parkin in response to ER stress. *Antioxidants & redox signaling* 9, 533-542.
- Weihofen, A., Thomas, K.J., Ostaszewski, B.L., Cookson, M.R., and Selkoe, D.J. (2009). Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 48, 2045-2052.
- Wessell, R.H., Ahmed, S.M., Menniti, F.S., Dunbar, G.L., Chase, T.N., and Oh, J.D. (2004). NR2B selective NMDA receptor antagonist CP-101,606 prevents levodopa-induced motor response alterations in hemi-parkinsonian rats. *Neuropharmacology* 47, 184-194.
- West, A., Farrer, M., Petrucelli, L., Cookson, M., Lockhart, P., and Hardy, J. (2001). Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *Journal of neurochemistry* 78, 1146-1152.
- West, A.B., Lockhart, P.J., O'Farrell, C., and Farrer, M.J. (2003). Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol* 326, 11-19.
- West, A.B., Moore, D.J., Choi, C., Andrabi, S.A., Li, X., Dikeman, D., Biskup, S., Zhang, Z., Lim, K.L., Dawson, V.L., et al. (2007). Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human molecular genetics* 16, 223-232.
- Whitworth, A.J., Theodore, D.A., Greene, J.C., Benes, H., Wes, P.D., and Pallanck, L.J. (2005). Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8024-8029.
- Whitworth, A.J., Wes, P.D., and Pallanck, L.J. (2006). Drosophila models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug discovery today* 11, 119-126.

- Wienholds, E., van Eeden, F., Kosters, M., Mudde, J., Plasterk, R.H., and Cuppen, E. (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res* 13, 2700-2707.
- Winklhofer, K.F., Henn, I.H., Kay-Jackson, P.C., Heller, U., and Tatzelt, J. (2003). Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones. *The Journal of biological chemistry* 278, 47199-47208.
- Wolf, D.H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et biophysica acta* 1695, 19-31.
- Wolpert, L., Beddington, R., Jessell, T. (1999). *Entwicklungsbiologie* (Spektrum, Akademischer Verlag).
- Wong, E.S., Tan, J.M., Wang, C., Zhang, Z., Tay, S.P., Zaiden, N., Ko, H.S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Lim, K.L. (2007). Relative sensitivity of parkin and other cysteine-containing enzymes to stress-induced solubility alterations. *The Journal of biological chemistry* 282, 12310-12318.
- Xi, Y., Ryan, J., Noble, S., Yu, M., Yilbas, A.E., and Ekker, M. (2010). Impaired dopaminergic neuron development and locomotor function in zebrafish with loss of pink1 function. *The European journal of neuroscience*.
- Yabu, T., Todoriki, S., and Yamashita, M. (2001). Stress-induced apoptosis by heat shock, UV and gamma-ray irradiation in zebrafish embryos detected by increased caspase activity and whole-mount TUNEL staining. *Fisheries Science*, 333-340.
- Yacoubian, T.A., and Standaert, D.G. (2009). Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1792, 676-687.
- Yamamoto, K., Ruuskanen, J.O., Wullimann, M.F., and Vernier, P. (2010). Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci*.
- Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H., and Lu, B. (2006a). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 10793-10798.
- Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R., and Lu, B. (2003). Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in Drosophila. *Neuron* 37, 911-924.
- Yang, Y.X., Muqit, M.M., and Latchman, D.S. (2006b). Induction of parkin expression in the presence of oxidative stress. *The European journal of neuroscience* 24, 1366-1372.
- Yao, D., Gu, Z., Nakamura, T., Shi, Z.Q., Ma, Y., Gaston, B., Palmer, L.A., Rockenstein, E.M., Zhang, Z., Masliah, E., et al. (2004). Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10810-10814. Epub 12004 Jul 10813.
- Yazdani, U., German, D.C., Liang, C.L., Manzano, L., Sonsalla, P.K., and Zeevalk, G.D. (2006). Rat model of Parkinson's disease: chronic central delivery of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). *Experimental neurology* 200, 172-183.
- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., et al. (2006). A novel mitochondrial ubiquitin

- ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *The EMBO journal* 25, 3618-3626.
- Yoshino, H., Nakagawa-Hattori, Y., Kondo, T., and Mizuno, Y. (1992). Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect 4*, 27-34.
- Youdim, M.B., and Riederer, P.F. (2004). A review of the mechanisms and role of monoamine oxidase inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 63, S32-35.
- Youle, R.J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 657-663.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., *et al.* (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* 55, 164-173.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13354-13359.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B., *et al.* (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44, 601-607.
- Ziviani, E., Tao, R.N., and Whitworth, A.J. (2010). Drosophila Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., *et al.* (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature genetics* 36, 449-451.

GLOSSAR

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CCCP	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
ds	Doppelstrang
dsRNA	doppelsträngige RNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoyscytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FCS	fötale Kälberserumalbumin (<i>fetal calf serum</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSF	Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren
Hsp	Hitzeschockprotein
IBR	<i>in-between</i> RING
IF	Immunfluoreszenz
IKK	I κ B-Kinase
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
JC-1	5, 5', 6, 6'-Tetrachlor-1, 1', 3, 3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyaniniodid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MAO	Monoaminoxidase
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenyl-Pyridin
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PET	Positron-Emissions-Tomographie

RNA	Ribonukleinsäure
RING	<i>really interesting new gene</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SAP	alkalische Phosphatase (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPECT	<i>Single-Photon-Emissionscomputertomographie</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Enzymaktivität, Umsetzung von 1 µmol Substanz/ min
UBL	<i>Ubiquitin-like</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USA	United States of America
UPDRS	<i>unified Parkinson's disease rating scale</i>
VTA	ventrale stegmentales Areal
Wt	Wildtyp
zfp	Zebrafisch Parkin

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei PD Dr. Konstanze F. Winklhofer für die exzellente wissenschaftliche Betreuung, wegweisende Anregungen und Ideen sowie vielfältige Unterstützung bedanken. Die stets offene Tür, ihr Interesse und ihre Diskussionsbereitschaft auch über den „Tatort“ Labor hinaus werden mir in besonderer Erinnerung bleiben – auf dem Gebiet des GAPPER-Syndroms sind noch viele Fragen offen und werden auch zukünftig viel Diskussionsstoff liefern.

Prof. Dr. Jörg Tatzelt danke ich für die hervorragende Betreuung, die nicht nur durch fachlichen Rat, zahlreiche wertvolle Tipps und interessante Diskussionen gekennzeichnet war, sondern sich auch in Form regelmäßiger Versorgung mit kohlehydrathaltigen Nahrungsmitteln äußerte und mich vor mehr als einer Unterzuckerung bewahrt hat. Weiterhin danke ich ihm für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die initiale Einarbeitung und fortwährende Betreuung und Beratung bezüglich des *in vivo*-Anteils dieser Arbeit bin ich Dr. Bettina Schmid sehr dankbar.

Prof. Dr. Christian Haass möchte ich für die wissenschaftliche Unterstützung und viele inspirierende Ideen danken.

Prof. Dr. Martin Biel, Prof. Dr. Christian Wahl-Schott, Prof. Dr. Dietmar Martin und Prof. Dr. Klaus Förstemann danke ich für die Begutachtung und Prüfung dieser Dissertation.

Allen Kolleginnen und Kollegen des gesamten Lehrstuhls danke ich für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Die gute Stimmung und Arbeitsatmosphäre am Adolf-Butenandt-Institut trugen ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei. Besonders erwähnen möchte ich Sabine Odoy, der ich für den unermüdlichen Einsatz was die Bestellung (und oft sehr kurzfristige Beschaffung) von Kits, Reagenzien oder sonstigen Laborbedarf betraf, danke. Als unverzichtbarer Retter in der Not erwies sich auch Andreas Kräutler, der meinen Rechner mehr als einmal wiederbeleben konnte und sich zeitweise rund um die Uhr für die Rettung meiner Daten eingesetzt hat.

Weiterhin danke ich den Doktoranden des Graduate Program „Neurodegenerative Disease Research“ für den guten Zusammenhalt, den offenen Ideenaustausch und die zahlreichen dienstlichen und außerdienstlichen Aktivitäten, die die letzten vier Jahre zu einer besonderen Zeit gemacht haben.

Bei unseren „Nachbarn“ aus dem Fisch-Labor (Bettina, Frauke, Dominik, Alex und Mathias) bedanke ich mich für die kompetente Einweisung in alle Techniken, die Unterstützung in Form von Rat, Tat und so manchem Reagenz sowie unschätzbare experimentelle Unterstützung, fortwährende Diskussionsbereitschaft, aufmunternden Zuspruch und das ein oder andere Abendprogramm in netter Runde.

Bei allen Co-Autoren, insbesondere Kathrin, Anna, Julia, Nicole, Dominik und Frauke möchte ich mich für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit bedanken.

Großer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Winklhofer und Tatzelt (Alex, Anna (der ich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke), Anita, Dani, Geli, Iris, Julia, Kathrin, Kerstin, Lena, Margit, Natalie, Uli, Veronika, Vignesh, Viktoria), die mir stets mit Tipps, Tricks, helfenden Händen und Schokolade zur Seite gestanden haben und deren vielfältige Unterstützung in stressigen Zeiten unbezahlbar war.

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle Anita, die mich in den ersten Wochen meiner Doktorarbeit „an die Hand genommen hat“ und in die molekular- und zellbiologischen Methoden eingewiesen hat.

Geli, Margit und Anita gilt ein ganz großes Dankeschön für viele unvergessliche Erlebnisse im und außerhalb des Labors und beständige moralische Unterstützung! „Wir 4“ bleiben uns hoffentlich immer *troy*.

Jupp Löhr, meinem ehemaligem Tutor, Biologie- und Chemielehrer, möchte ich dafür danken, dass er es mit seinem unverwechselbaren Unterricht geschafft hat, meine Begeisterung für die Naturwissenschaften zu wecken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützen, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen, in schwierigen Zeiten den Rücken freihalten und mit ihrer Freude jeden Erfolg noch schöner machen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	<u>Mareike</u> Eva Gertrude Fett
Geburtsdatum	01/11/1980
Geburtsort	Marburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Seit 01/2006	Ludwig-Maximilians-Universität München Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie, Arbeitsgruppe Neurobiochemie – PD Dr. Konstanze F. Winklhofer Promotion
12/2005	Approbation als Apothekerin
05/2005 - 10/2005	Zweiter Teil des praktischen Jahres: Praktikum in der „Berg-Apotheke“ in Cölbe
11/2004 - 05/2005	Erster Teil des praktischen Jahres: Praktikum bei der „HEXAL Pharmaforschung GmbH“ in Holzkirchen Abteilung „Pharmazeutische Entwicklung“
08/2003 – 12/2003	Universität von Kuopio, Finnland Auslandssemester
10/2002 - 09/2004	Philipps-Universität Marburg Hauptstudium Pharmazie
10/2000 - 08/2002	Philipps-Universität Marburg Grundstudium Pharmazie
06/2000	Gymnasium Elisabethschule Marburg Abitur

VERÖFFENTLICHUNGEN

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits teilweise veröffentlicht:

Lutz, A.K.*, Exner, N.*, **Fett, M.E.***, Schlehe, J.S., Kloos, K., Lammermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., Bouman, L., Vogt-Weisenhorn, D., Wurst, W., Tatzelt, J., Haass, C., Winklhofer, K.F. (2009). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *The Journal of biological chemistry* **284**, 22938-22951. (**authors contributed equally*)

Fett, M.E., Pilsl, A., Paquet, D., van Bebber, F., Haass, C., Tatzelt, J., Schmid, B., Winklhofer, K.F. Parkin is protective against proteotoxic stress in a transgenic zebrafish model (*in revision*)