

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



**Charakterisierung der physiologischen
Funktion von Parkin
im Zellkultur- und Maus-Modell**

Anita Schlierf

aus

Eichstätt

2010

ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München durchgeführt und von Frau Priv. Doz. Dr. Konstanze F. Winklhofer betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 17.5.2010

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Anika Schubert', written in a cursive style.

Dissertation eingereicht am: 17.05.2010

1. Gutachter : Priv. Doz. Dr. Konstanze F. Winklhofer

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tatzelt

Mündliche Prüfung am: 06.07.2010

Wer sich Steine zurechtlegen kann, über die er stolpert, hat Erfolg in den
Naturwissenschaften

(Erwin Chargaff 1905-2002)

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	ZUSAMMENFASSUNG	1
1	EINLEITUNG	3
1.1	DIE PARKINSON-ERKRANKUNG	3
1.1.1	Einführung und Geschichte	3
1.1.2	Neuropathologie	4
1.1.3	Symptome und therapeutische Ansätze	7
1.2	ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	10
1.2.1	Familiäre Formen der Parkinson-Erkrankung	10
1.2.1.1	Dominante Gene	11
1.2.1.1.1	α -Synuclein	11
1.2.1.1.2	LRRK2	12
1.2.1.2	Autosomal rezessive Gene	13
1.2.1.2.1	Parkin	13
1.2.1.2.2	PINK1	13
1.2.1.2.3	DJ-1	14
1.2.2	Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress	15
1.2.3	Apoptose und anti-apoptotische Signalwege	17
1.2.4	Protein-Aggregation und proteasomale Dysfunktion	21
1.2.5	Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress)	22
1.3	PARKIN-ASSOZIIERTE PARKINSON-ERKRANKUNG	24
1.3.1	Klinische und neuropathologische Charakteristika	24
1.3.2	Genetische und zellbiologische Charakteristika von Parkin	25
1.3.3	Parkin-Mutationen	27
1.3.4	Putative Parkin-Substrate	27
1.3.4.1	Parkin-mediierte Ubiquitylierung für den proteasomalen Abbau	27
1.3.4.2	Parkin-mediierte regulatorische Ubiquitylierung	28
1.3.4.3	Weitere Parkin-interagierende Proteine	29
1.3.5	Parkin-defiziente Tier-Modelle	30
1.3.6	Parkin besitzt ein neuroprotektives Potential	33
1.4	DAS PARKIN CO-REGULIERTE GEN PACRG	35

1.5	DIE PRION-ERKRANKUNGEN	37
2	ERGEBNISSE	38
2.1	VERSCHIEDENE STRESSOREN INDUZIEREN EINE ERHÖHUNG DER PARKIN-MRNA	38
2.1.1	Hochregulation von Parkin als Antwort der gestörten mitochondrialen Integrität	38
2.1.2	Hochregulation von Parkin unter PrP ^{Sc} -induzierter Toxizität	39
2.1.3	Hochregulation von Parkin als Antwort auf ER Stress	40
2.2	PARKIN IST EIN TARGET DER UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR)	42
2.2.1	Der Parkin-Promotor enthält eine putative ATF4-Bindestelle	42
2.2.2	ATF4 bindet an den Parkin-Promotor	44
2.3	DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON PARKIN	45
2.3.1	Parkin-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber Stress	46
2.3.2	Das neuroprotektive Potential von Parkin	48
2.3.2.1	Parkin ist protektiv gegenüber ER-Stress-induzierte Apoptose	48
2.3.2.2	Parkin ist protektiv gegenüber PrP ^{Sc} -induzierte Toxizität	49
2.3.2.3	Einfluss von Parkin auf protektive Signalwege (NFκB-Signalweg)	51
2.3.3	Einfluss von Parkin auf die mitochondriale Biogenese	56
2.4	PARKIN-MAUS-MODELLE	58
2.4.1	Generierung transgener Parkin-Maus-Modelle	58
2.4.1.1	Klonierung der Rekombinations-Konstrukte	59
2.4.1.2	Test auf Transgenität	61
2.4.1.3	Expressionsanalyse der Parkin-transgenen Tiere	62
2.4.1.3.1	Expression des Transgens im Gehirn	62
2.4.1.3.2	Expression des Transgens in verschiedenen Gehirnbereichen	63
2.4.2	Analyse der Parkin Maus-Modelle	64
2.4.2.1	Die W453X-Mutante befindet sich vermehrt in der Detergenz-unlöslichen Fraktion	64
2.4.2.2	Einfluss der Parkin-Überexpression auf die Expression anderer Gene	65
2.4.2.2.1	Einfluss von Parkin auf andere Parkinson-assoziierten Gene	65
2.4.2.2.2	Einfluss von Parkin auf Gene des Dopamin-Metabolismus	66
2.4.2.2.3	Einfluss von Parkin auf Gene, die für die mitochondriale Funktion oder Apoptose verantwortlich sind	67
2.4.2.2.4	Einfluss von Parkin auf NFκB-Zielgene	69
2.4.2.3	Inokulation der Parkin-transgenen Tiere mit PrP ^{Sc} /Prionen	71

2.4.2.3.1	Parkin hat keinen Einfluss auf die Überlebensdauer der infizierten Mäuse	71
2.4.2.3.2	PrP ^{Sc} /Prionen-infizierte Parkin-transgene Tiere zeigen keinen Unterschied in der neuronalen Zelldichte der CA1-Region des Hippocampus.....	72
2.4.2.3.3	PrP ^{Sc} /Prionen-infizierte Parkin-transgene Tiere zeigen keinen Unterschied in der PrP ^{Sc} - Propagierung.....	73
2.5	DAS PARKIN CO-REGULIERTE GEN PACRG	74
2.5.1	Verschiedene Stressoren induzieren eine Erhöhung der PACRG-mRNA.....	74
2.5.2	PACRG-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber Stress.....	75
2.5.3	PACRG besitzt ein neuroprotektives Potential.....	76
2.5.4	Sind PACRG und Parkin funktionell reziprok?	77
3	DISKUSSION	79
3.1	PARKIN WIRD DURCH VERSCHIEDENE STRESSOREN HOCHREGULIERT	79
3.2	PARKIN IST EIN <i>TARGET</i> DER <i>UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR)</i>	80
3.3	PARKIN BESITZT EIN NEUROPROTEKTIVES POTENTIAL UND AKTIVIERT DEN NFκB-SIGNALWEG.....	82
3.3.1	Parkin hat keinen Einfluss auf die UPR.....	83
3.3.2	Parkin hat keinen Einfluss auf die mitochondriale DNA (mtDNA).....	83
3.3.3	Parkin aktiviert den NFκB-Signalweg.....	85
3.4	IMPLIKATION FÜR DIE PARKINSON-ERKRANKUNG.....	87
3.5	CHARAKTERISIERUNG DER PARKIN-TRANSGENEN MÄUSE	88
3.5.1	Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau anderer Parkinson-assoziiertes Gene.....	89
3.5.2	Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau von Genen des Dopamin-Metabolismus.....	89
3.5.3	Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau von Genen mit elementarer Funktion in der mitochondrialen Integrität und Apoptose.....	90
3.5.4	Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau von NFκB-Zielgenen	91
3.5.5	Die W453X-transgenen Mäuse zeigen keine Hinweise auf ein <i>toxic gain of function</i>	92
3.6	PARKIN SCHÜTZT NICHT VOR PRP^{Sc}-INDUZIERTEN PATHOMECHANISMEN <i>IN VIVO</i>.....	93
3.7	PARKIN UND PACRG ZEIGEN GEMEINSAME CHARAKTERISTIKA.....	95

4	MATERIAL	97
4.1	MAUSSTÄMME	97
4.2	ZELLINIEN	97
4.3	CHEMIKALIEN UND ALLGEMEINE REAGENZIEN	97
4.4	PUFFERLÖSUNGEN	97
4.5	KITS	98
4.6	GERÄTE	99
4.7	PLASMIDE	100
4.8	OLIGONUKLEOTIDE	101
4.8.1	Oligonukleotide für die <i>Real Time</i> PCR	101
4.8.2	Weitere Oligonukleotide	104
4.9	ANTIKÖRPER	105
4.10	SMALL INTERFERING RNA (siRNA)	105
5	METHODEN	106
5.1	STANDARD-METHODEN	106
5.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien	106
5.1.2	Transformation von DNA in kompetente Bakterien	106
5.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	107
5.1.4	Restriktionsverdau	107
5.1.5	Ligation	107
5.1.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen	107
5.1.7	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren im Photometer	108
5.1.8	Generierung von DNA-Expressions-Konstrukten	108
5.2	ZELLKULTUR-METHODEN	108
5.2.1	Kultivierung von Zellen	108
5.2.2	Passagierung	109
5.2.3	Transiente Transfektion	109
5.2.4	RNA-Interferenz	110
5.2.5	Zell-Vitalitätstests	110
5.2.5.1	Caspase- <i>Assay</i>	110
5.2.5.2	MTT- <i>Assay</i>	111

5.2.6	Luziferase-Aktivitätstest	111
5.2.7	Indirekte Immunfluoreszenz	111
5.2.8	Präparation primärer Zellen	112
5.2.8.1	Präparation primärer corticaler Neuronen.....	112
5.2.8.2	Präparation von mouse embryonic fibroblasts (MEF).....	112
5.2.9	Co-Kultivierungs-Assay	113
5.2.10	Beschichtung von Zellkulturschalen.....	113
5.3	NUKLEINSÄURE-METHODEN	113
5.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzgewebe	113
5.3.2	RNA-Isolierung.....	114
5.3.2.1	RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen.....	114
5.3.2.2	RNA-Isolierung aus Gehirngewebe	114
5.3.2.3	Simultane Isolierung von DNA und RNA	114
5.3.3	Reverse Transkription.....	115
5.3.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	115
5.3.4.1	Genotypisierungs-PCR.....	115
5.3.4.2	Quantitative <i>Real Time</i> PCR.....	116
5.3.5	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	116
5.4	PROTEIN-ANALYTISCHE METHODEN	117
5.4.1	Herstellung von Protein-Extrakten.....	117
5.4.1.1	Gesamtzellextrakt.....	117
5.4.1.2	Proteinextrakt aus Gehirn.....	117
5.4.1.3	Nukleärer Extrakt.....	117
5.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	118
5.4.3	<i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i> (EMSA).....	118
5.4.4	Immunochemischer Nachweis von Proteinen (<i>Western Blot</i>)	119
5.4.4.1	Elektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	119
5.4.4.2	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen.....	119
5.4.4.3	Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Membranen	120
5.5	MAUS-METHODEN	120
5.5.1	Tierhaltung.....	120
5.5.2	Generierung Parkin-transgener Mäuse.....	120
5.5.3	PrP ^{Sc} /Prionen-Infektion mittels intracerebraler Inokulation.....	121
5.5.4	Bestimmung der numerischen Zelldichte von CA1-Neuronen.....	121

6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	122
7	LITERATURVEZEICHNIS	126
	CURRICULUM VITAE	149
	PUBLIKATIONEN	150
	DANKSAGUNG	151

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der nigrostratialen Projektion	4
Abb. 2: Schematische Darstellung des Aktivitätszustandes der Basalganglien	6
Abb. 3: Histologische Darstellung von <i>Lewy Bodies</i>	7
Abb. 4: Schematische Darstellung der dopaminergen Neurotransmission	9
Abb. 5: Der intrinsische und extrinsische Weg der Apoptose.....	18
Abb. 6: Der kanonische NFκB-Signalweg.....	20
Abb. 7: Schematische Darstellung des Parkin-Proteins	26
Abb. 8: Aminosäuren-Sequenzvergleich von Parkin verschiedener Spezies.....	26
Abb. 9: Schematische Darstellung des genomischen Locus von Parkin und PACRG	35
Abb. 10: Hochregulation endogener Parkin-mRNA durch CCCP	39
Abb. 11: Hochregulation von endogenem Parkin im Co-Kultivierungs-Assay	40
Abb. 12: Hochregulation endogener Parkin-mRNA durch Thapsigargin	41
Abb. 13: Hochregulation endogener Parkin-mRNA in primären Zellen.....	41
Abb. 14: Der Parkin-Promotor enthält eine putative ATF4-Bindestelle, durch die eine Hochregulation unter ER-Stress mediiert wird	43
Abb. 15: Bindung von ATF4 an die putative ATF4-Bindestelle des Parkin-Promotors.....	45
Abb. 16: Parkin-Defizienz führt zu einer verminderten Zellvitalität unter Stress	46
Abb. 17: Parkin- <i>Knock Out</i> - MEFs zeigen eine verminderte Zellvitalität unter ER Stress	47
Abb. 18: Parkin besitzt ein neuroprotektives Potential gegenüber ER-Stress.....	48
Abb. 19: Parkin besitzt ein neuroprotektives Potential gegenüber PrP ^{Sc} -induzierte Toxizität.....	50
Abb. 20: Parkin sensibilisiert Zellen für NFκB-aktivierende Stimuli.....	52
Abb. 21: <i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i> mit Oligonukleotiden der NFκB- Konsensus-Sequenz.....	53
Abb. 22: PARK2-Patienten-Fibroblasten zeigen eine verminderte Bindung von NFκB....	54
Abb. 23: ScN2a-Zellen zeigen eine verminderte NFκB-Bindung	56
Abb. 24: Einfluss von Parkin auf mitochondriale RNA und DNA	57
Abb. 25: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Generierung der transgenen Mäuse.....	60
Abb. 26: Genotypisierung der transgenen Tiere.....	61
Abb. 27: Die transgenen Linien zeigen unterschiedliche Expressionslevel im Gehirn.....	63

Abb. 28: Die transgenen Linien zeigen eine Expression in verschiedenen Gehirnbereichen	63
Abb. 29: W453X befindet sich vermehrt in der Detergenz- unlöslichen Fraktion.....	65
Abb. 30: Parkin hat keinen Einfluss auf die Expression PD-assoziiertes Gene	66
Abb. 31: Parkin hat keinen Einfluss auf die Expression von Genen des Dopamin- Metabolismus	67
Abb. 32: Parkin hat keinen Einfluss auf Gene der mitochondrialen Integrität und Apoptose.....	68
Abb. 33: Parkin führt nicht zu einer basalen Expressionserhöhung von NFκB-Zielgenen	69
Abb. 34: NFκB-Aktivierung in Neuronen.....	70
Abb. 35: Überlebensdauer der PrP ^{Sc} /Prionen-inokulierten Mäuse.....	72
Abb. 36: Numerische Zelldichte der CA1-Neuronen in PrP ^{Sc} /Prionen-infizierten Mäusen	73
Abb. 37: Parkin hat keinen Einfluss auf die PrP ^{Sc} -Propagierung in infizierten Tieren.....	73
Abb. 38: PACRG- und Parkin-mRNA werden durch Stress hochreguliert	75
Abb. 39: PACRG-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber Stress	76
Abb. 40: PACRG besitzt ein neuroprotektives Potential	77
Abb. 41: Die PACRG-mRNA-Mengen sind in Park-KO- und Parkin-transgenen Mäusen unverändert.....	78
Abb. 42: Die Mengen der PACRG-mRNA und Parkin-mRNA zeigen keine Abhängigkeit voneinander	78

ZUSAMMENFASSUNG

Die Parkinson-Erkrankung ist die häufigste motorische und zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch den weitgehend selektiven Verlust von dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra pars compacta*. Obwohl die Parkinson-Erkrankung vorrangig sporadischer Natur ist, konnten familiäre Häufungen der Erkrankung mit autosomal dominantem oder autosomal rezessivem Erbgang identifiziert werden. Für die Mehrheit der rezessiven Formen der Parkinson-Erkrankung sind Mutationen im Parkin-Gen verantwortlich, wodurch Parkin eine Sonderstellung unter allen Parkinson-assoziierten Genen einnimmt. Die Analyse der physiologischen Funktion von Parkin eröffnet daher die Möglichkeit, den molekularen Ursachen der Parkinson-Erkrankung auf den Grund zu gehen und neue Therapieansätze zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Funktion von Parkin sowohl im Zellkultur-Modell, als auch in transgenen Maus-Modellen untersucht.

In Zellkultur-Analysen konnte eine Hochregulation von Parkin in verschiedenen Stress-Situationen, wie ER-Stress, Störung der mitochondrialen Integrität und PrP^{Sc}-induzierter Toxizität gezeigt werden. Parkin konnte dabei erstmals als direktes *Target* der *Unfolded Protein Response* unter Stress ermittelt werden. Die beobachtete Parkin-Induktion unter ER-Stress wird auf transkriptioneller Ebene durch Bindung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF4 an den Parkin-Promotor bewerkstelligt. Weiter konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hochregulation von Parkin eine Antwort der Zelle zur Stressbewältigung darstellt. Während sich eine Parkin-Defizienz in einer erhöhten Vulnerabilität der Zellen äußerte, führte eine erhöhte Expression von Parkin zu einem protektiven Effekt gegenüber ER-Stress und PrP^{Sc}-induzierter Apoptose. Zudem konnte erstmals eine Verbindung zwischen dem protektiven Potential von Parkin und dem NFκB-Signalweg hergestellt werden. Parkin sensibilisierte Zellen für Stressoren des NFκB-Signalwegs und induzierte eine verstärkte Aktivierung dieses protektiven Signalwegs. Im Gegenzug konnte unter einer Parkin-Defizienz eine reduzierte NFκB-Aktivierung gezeigt werden.

Um die Funktion von Parkin im Kontext eines gesamten Organismus zu analysieren, wurden Parkin-transgene Mäuse generiert, die zum einen Wildtyp-Parkin oder die pathogene Parkin-Mutante W453X exprimierten. Die generierten Maus-Linien waren lebensfähig, fertil und zeigten keine offensichtlichen Auffälligkeiten im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen. Die Überexpression von Wildtyp-Parkin und der Parkin-Mutante hatte unter basalen Bedingungen keinen Effekt auf das Transkriptionsniveau anderer Parkinson-assoziiierter Gene, Gene des Dopamin-Metabolismus, NFκB-Zielgene und Gene, die für apoptotische und anti-apoptotische Prozesse verantwortlich sind. Um das mögliche protektive Potential von Parkin im Maus-Modell näher untersuchen zu können, wurden die Parkin-transgenen Mäuse mit PrP^{Sc}/Prionen infiziert. Die Parkin-transgenen Mäuse zeigten jedoch in den durchgeführten Analysen keinen protektiven Effekt unter diesen Stressbedingungen. Weitere Ergebnisse lieferten Hinweise einer möglichen Inaktivierung von Parkin und wiesen auf mögliche kompensatorische Mechanismen in den Parkin-Maus-Modellen hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben wichtige neue Einblicke in die physiologische Funktion von Parkin und in die molekularen Ursachen der Parkinson-Erkrankung. Zudem konnten wichtige Erkenntnisse in neuartigen Parkin-transgenen Maus-Modellen erbracht werden, die die Grundlage für weitere Analysen darstellen.

1 EINLEITUNG

1.1 DIE PARKINSON-ERKRANKUNG

1.1.1 Einführung und Geschichte

Die Parkinson-Erkrankung (PD) ist die häufigste motorische und zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Erkrankung, die meist nach der 5. Lebensdekade auftritt. Schätzungen zufolge leiden weltweit mehr als 4 Millionen Menschen, in Deutschland ca. 250 000 Menschen an dieser Erkrankung. Aufgrund des demographischen Wandels und der erhöhten Lebenserwartung in der westlichen Welt, ist davon auszugehen, dass sich diese Zahl im Jahr 2030 verdoppelt haben wird (Dorsey et al., 2007). Die Parkinson-Erkrankung ist charakterisiert durch den weitgehend selektiven Verlust dopaminerger Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc), was zu einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin führt. Bereits 1817 wurden die Kardinalsymptome der Parkinson-Erkrankung von dem Arzt und Apotheker James Parkinson (1755-1824) in seiner Monographie „*Essay on the shaking Palsy*“ dokumentiert. In dieser Abhandlung beschrieb er erstmals die *paralysis agitans* (Schüttellähmung) als klinisch definiertes Krankheitsbild mit den Symptomen: Ruhetremor (Zittern), Brady- bzw. Akinese (verlangsamte Bewegung bzw. Bewegungsarmut) und Haltungsinstabilität. Rigor (Muskelstarre) als weiteres Kardinalsymptom wurde 67 Jahre später von dem französischen Arzt Jean-Martin Charcot beschrieben, der die Gesamtheit der Symptome unter dem Namen Parkinson-Erkrankung zusammenfasste. Mehr als ein Jahrhundert verging, bis die pathologischen Veränderungen 1919 von dem Arzt Tretiakof entdeckt wurden. Anfang der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde der biochemische Hintergrund der Erkrankung aufgeklärt. Ehringer und Hornykiewicz entdeckten den Mangel des Neurotransmitters Dopamin im Gehirn von Parkinson-Patienten, der für die klassischen motorischen Defizite verantwortlich gemacht wird (Ehringer und Hornykiewicz, 1960; Sourkes und Poirier, 1965). Diese Erkenntnis legte 1967 den Grundstein für die erste effektive Behandlung der Erkrankung mit L-DOPA, einer Vorstufe des Dopamins. Obwohl die Behandlung mit L-DOPA zu einer symptomatischen Verbesserung der Parkinson-Erkrankung führt, steht bis heute keine Medikation zur Verfügung, die die Degeneration dopaminerger Neuronen verlangsamen oder aufhalten könnte. Zur Verbesserung und Entwicklung neuer Therapie-Ansätze ist es daher von herausragender Bedeutung, die molekularen Ursachen der Erkrankung aufzuklären. Lange Zeit wurde angenommen, dass

die Parkinson-Erkrankung ausschließlich sporadisch auftritt und die Ursache vermutlich ein Zusammenspiel verschiedener Umwelt-Faktoren ist. Doch die Entdeckung von familiär-gehäuften Formen revolutionierte die Parkinson-Forschung und eröffnete eine Reihe neuer Möglichkeiten, den molekularen Ursachen der Erkrankung auf den Grund zu gehen. Seit der Entdeckung von Mutationen im Gen α -Synuclein im Jahr 1997 konnten bisher 13 Loci mit der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht werden.

1.1.2 Neuropathologie

Zu den neuropathologischen Charakteristika der Parkinson-Erkrankung zählen zum einen der Verlust dopaminergener Neuronen in der SNpc, zum anderen das Auftreten intraneuronaler zytosolischer Einschlüsse, die sogenannten *Lewy Bodies*. Die Zellkörper der nigrostriatalen Neuronen befinden sich in der SNpc, deren Projektionen das *Striatum*, bestehend aus *Putamen* und *Nucleus caudatus*, innervieren. Diese striatalen Projektionen scheinen das primäre Ziel der Degeneration zu sein, in dessen Folge es zu einem retrograden Absterben des Neurons kommt (Bernheimer et al., 1973). Der progressive Verlust dieser Neuronen, die normalerweise das dunkle Pigment Neuromelanin enthalten, führt zur charakteristischen Depigmentierung der SNpc und zu einer reduzierten Innervation des *Striatums* (Marsden, 1983) (Abb. 1).

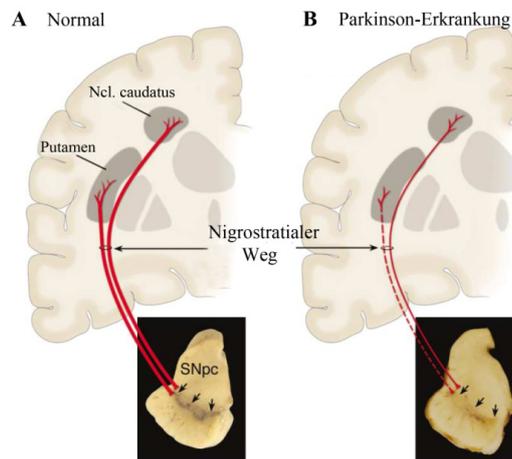


Abbildung 1: Schematische Darstellung der nigrostriatalen Projektion

(A) Nigrostriatale Projektionen zwischen der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) und dem *Putamen* und *Nucleus caudatus* (Ncl. Caudatus) (rote Linie) in einem gesunden Gehirn. Das Photo zeigt die dunkle Pigmentierung der SNpc, die durch den Neuromelanin-Gehalt der dopaminergen Neuronen hervorgerufen wird. (B) Degenerierte nigrostriatale Projektion in dem Gehirn von Parkinson-Patienten. Zu sehen ist der dramatische Verlust dopaminergener Neuronen, die in das *Putamen* projizieren (gestrichelte rote Linie) und ein weniger dramatischer Verlust von Neuronen, die den *Ncl. Caudatus* innervieren (dünne rote Linie). Das Photo zeigt die klassische Depigmentierung der SNpc (Pfeile) im Gehirn eines Parkinson-Patienten. Abbildung modifiziert nach (Dauer und Przedborski, 2003).

Das Striatum und die *Substantia nigra pars compacta* gehören neben dem *Nucleus subthalamicus* (STN) und dem *Globus pallidus externus* (GPe) und *Globus pallidus internus* (GPi) zu den Basalganglien, welche die Initiation und Ausmaß von willkürlichen Bewegungen kontrollieren. Die Basalganglien sind in eine komplexe Regelschleife eingebunden, in der Signale vom Cortex verarbeitet und über den Thalamus zurück zum Cortex gelangen (Abb. 2). Das Striatum lässt sich in zwei funktionell antagonistische Anteile unterscheiden, die beide in ihrem Projektionsziel durch den Transmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) hemmend wirken. Beide Anteile unterscheiden sich in der Expression von Dopaminrezeptoren, die in zwei Klassen unterteilt werden. Die D1-Rezeptorfamilie (D1) ist mit aktivierendem G-Protein (G_s) und die D2-Rezeptorfamilie (D2) mit inhibierendem G-Protein (G_i) gekoppelt (Sibley et al., 1992). Bei dem direkten Weg projizieren die striatalen Neuronen, die Dopaminrezeptoren der Klasse D1 exprimieren, in den GPi. Dieser wiederum wirkt inhibitorisch auf den Thalamus ein, der den Motocortex aktiviert. Dem GPi kann demnach eine hemmende Funktion für motorische Impulse zugeschrieben werden. In der indirekten Regelschleife wirkt Dopamin inhibierend auf die striatalen Neuronen, die die Rezeptorklasse D2 exprimieren. Diese striatalen Neuronen projizieren und inhibieren den GPe. Der GPe projiziert inhibitorisch in den NTC, der wiederum erregend auf den GPi wirkt. In der Parkinson-Erkrankung führt die fehlende Erregung der D1-Rezeptoren in der direkten Regelschleife zu einer Minderung der Inhibierung des Striatums auf den GPi. Dessen Enthemmung führt wiederum zu einer verstärkten Inhibition des Thalamus. Gleichzeitig nimmt die Inhibition auf den GPe durch die mangelnde Erregung der D2-Rezeptoren über den indirekten Weg zu. In dessen Folge werden Neurone im STN vermehrt aktiviert und die inhibitorische Aktivität des GPi auf den Thalamus erhöht (Blandini et al., 2000) (Abb. 2).

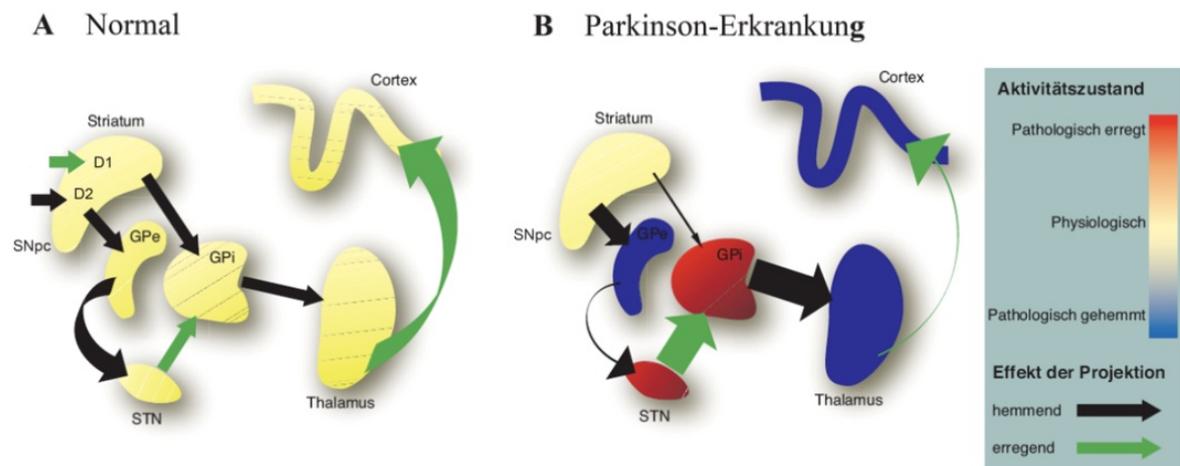


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aktivitätszustandes der Basalganglien

(A) Aktivitätszustand der motorischen Regelkreise im Normalzustand und in der Parkinson-Erkrankung (B). SNpc: *Substantia nigra pars compacta*, GPe: *Globus pallidus externus*, GPi: *Globus pallidus internus*, STN: *Nucleus subthalamicus*. D1 bzw. D2: Dopaminrezeptoren der Klasse 1 und 2. Abbildung modifiziert nach (Herzog und Volkmann, 2006).

In der Parkinson-Erkrankung ist der Zellverlust aber nicht auf das dopaminerge System beschränkt. Neuronale Degeneration konnte auch im noradrenergen, serotonergen und cholinergen System des Gehirns, sowie im cerebralen Cortex, *Bulbus Olfactorius* und autonomen Nervensystem beobachtet werden. In späten Stadien der Erkrankung kann es auch zu einer Beeinträchtigung des Hippocampus kommen, was für eine Demenz verantwortlich gemacht wird, die in etwa 20% der Parkinson-Patienten zu beobachten ist (Dauer und Przedborski, 2003; Forno, 1996).

Ein weiteres pathologisches Merkmal der Parkinson-Erkrankung ist das Auftreten von sogenannten *Lewy Bodies* in den überlebenden Neuronen. *Lewy Bodies* sind eosinophile, zytoplasmatische Einschlusskörperchen, die eine Vielzahl von Proteinen, wie Ubiquitin, α -Synuclein, molekulare Chaperone und Neurofilamente enthalten (Forno, 1996; Spillantini et al., 1998; Spillantini et al., 1997). Histologisch zeigen die im Durchmesser 15 μm großen *Lewy Bodies* einen dichten Kern, der von einem blassen Halo umgeben ist (Pappolla, 1986) (Abbildung 3). Die Rolle der *Lewy Bodies* in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung ist umstritten. Interessanterweise lassen sich *Lewy Bodies* auch in anderen Krankheiten wie DLB (*Dementia with Lewy Bodies*) oder der Multisystematrophie (MSA) finden, die unter dem Namen α -Synucleinopathien zusammengefasst werden (Duda et al., 2000).

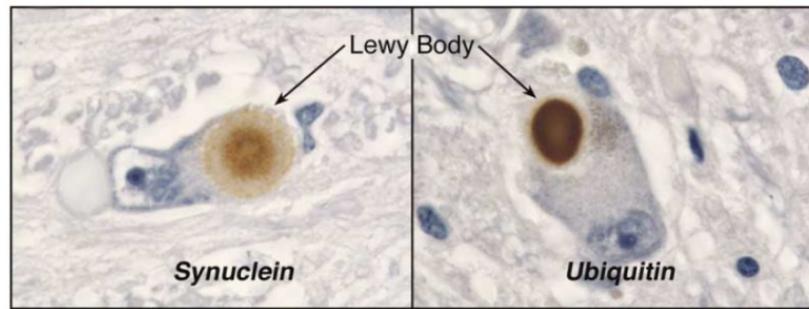


Abbildung 3: Histologische Darstellung von *Lewy Bodies*

Immunohistochemische Färbung von intraneuronalen Einschlüssen, den sog. *Lewy Bodies*. *Lewy Bodies* zeigen eine Immunreaktivität mit einem Antikörper gegen α -Synuclein (linke Spalte) und gegen Ubiquitin (rechte Spalte). Abbildung aus (Dauer und Przedborski, 2003).

1.1.3 Symptome und therapeutische Ansätze

Zu den Kardinalsymptomen der Parkinson-Erkrankung zählen Ruhetremor (Zittern), Brady- bzw. Akinesie (verlangsamte Bewegung bzw. Bewegungsarmut), Rigor (Muskelstarre) und in späten Stadien Haltungsinstabilität (Hughes et al., 1991; Lang und Lozano, 1998). Zu diesen motorischen Symptomen können weitere vegetative und psychische Störungen wie Depression, Verlangsamung der Denkabläufe und Demenz hinzutreten (Aarsland et al., 1996; Cummings, 1992). Gewöhnlich treten die motorischen Symptome zunächst einseitig auf. Im Krankheitsverlauf wird jedoch die Gegenseite mit einbezogen. Obwohl einige familiäre Formen der PD eine frühere Manifestation zeigen können, treten die Symptome der Parkinson-Erkrankung durchschnittlich in einem Alter von 55 Jahren auf. Die Prävalenz steigt mit zunehmenden Alter auf 1-2% bei über 60-jährigen und auf 4% der über 80-jährigen (de Lau und Breteler, 2006). Fatalerweise treten erste Symptome erst dann auf, wenn 60% der dopaminergen Neuronen der SNpc degeneriert bzw. 80% des striatalen Dopamin-Gehaltes verloren gegangen sind (Hornykiewicz, 1982).

Da keine PD-spezifischen Marker existieren, wird die Diagnose in der Regel durch eine neurologische Untersuchung gestellt. Eine endgültige Bestätigung kann aber nur eine Autopsie liefern. Die Behandlungen der Parkinson-Erkrankung beruhen in dem Versuch, den Mangel an Dopamin auszugleichen, oder das Übergewicht der cholinergen Aktivität zurückzudrängen. Zum Verständnis der Therapie-Möglichkeiten ist es wichtig, die

dopaminerge Neurotransmission genauer zu betrachten (Abb. 4). Die Synthese des Neurotransmitters Dopamin geht von der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin aus, welches über die Blut-Hirn-Schranke aufgenommen wird und in catecholaminergen Neuronen zu Dopamin (DA) umgewandelt wird. Durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) wird Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) hydroxyliert, was den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt darstellt. Durch die aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC) wird L-DOPA wiederum zu Dopamin decarboxyliert. Anschließend wird DA über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) in synaptischen Vesikeln gespeichert und bei Eintreffen des Nervenimpuls über Ca^{2+} -abhängige Exozytose in den synaptischen Spalt freigegeben. Postsynaptisch unterscheidet man zwei Klassen von Dopaminrezeptoren: Die D1-Rezeptorfamilie (D1), die mit aktivierendem G-Protein (G_s) und die D2-Rezeptorfamilie (D2), die mit inhibierendem G-Protein (G_i) gekoppelt ist (Sibley et al., 1992). Je nach Verteilung dieser Subtypen kann Dopamin einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt haben und so unterschiedlich in die Schaltkreise des extrapyramidalen Systems eingreifen (siehe Abb. 2). Die Inaktivierung des freigesetzten Dopamins erfolgt hauptsächlich durch Wiederaufnahme in die Präsynapse über den Dopamintransporter (DAT). Dort wird Dopamin entweder erneut in Vesikel gespeichert oder enzymatisch abgebaut. Am Abbau von Dopamin sind maßgeblich die zwei Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) beteiligt. Über Zwischenstufen entstehen dabei die Dopaminmetaboliten Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), Methoxytyramin (3-MT) und Homovanillinsäure (HVA), die über den Harn ausgeschieden werden (Hutson und Curzon, 1983).

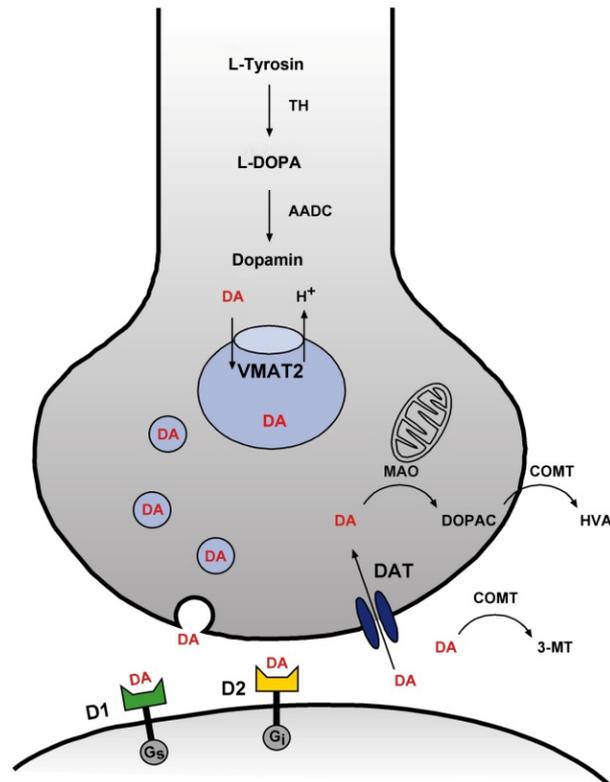


Abbildung 4: Schematische Darstellung der dopaminergen Neurotransmission

Die Synthese von Dopamin (DA) erfolgt aus L-Tyrosin über die Zwischenstufe L-DOPA (L-Dihydroxyphenylalanin) durch die Enzyme TH (Tyrosinhydroxylase) und AADC (aromatische Aminosäure-Decarboxylase). Über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) wird Dopamin in synaptische Vesikel gespeichert und bei Eintreffen des Nervenimpulses in den synaptischen Spalt freigesetzt. Postsynaptisch befinden sich D1- bzw. D2-Dopaminrezeptoren, die mit stimulierenden (Gs) oder inhibitorischen (Gi) G-Proteinen gekoppelt sind. Dopamin kann über den Dopamintransporter (DAT) wieder in die Nervenendigung aufgenommen werden. Der Abbau von Dopamin erfolgt durch die Enzyme Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase (MAO) zu DOPAC (Dihydroxyphenylelessigsäure), HVA (Homovanillinsäure) und 3-MT (Methoxytyramin). Abbildung freundlicherweise von PD Dr. Konstanze Winklhofer zur Verfügung gestellt.

In therapeutischen Ansätzen versucht man den Mangel an Dopamin auszugleichen. Bis heute ist die gängigste Behandlung von Parkinson-Patienten die Gabe von L-DOPA, das im Gegensatz zu Dopamin die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Da L-DOPA auch in der Peripherie zu Dopamin umgewandelt wird und so unerwünschte Nebenwirkungen verursacht, wird eine Kombination von L-DOPA und peripher wirkenden DOPA-Decarboxylase-Hemmer (Carbidopa, Benserazid) verabreicht. Zur Kompensation des Dopaminmangels kommen weiter Dopaminrezeptor-Agonisten zum Einsatz. Eine Erhöhung der Dopamin-Konzentration im Zentralnervensystem kann auch durch die Hemmung des Abbaus von Dopamin durch die Gabe von MAO-Hemmer wie Selegilin erreicht werden. Eine andere Strategie der Behandlung der Parkinson-Erkrankung ist das

Zurückdrängen der cholinergen Aktivität. Aufgrund der großen Nebenwirkungen sind Anticholinergika jedoch nicht die Mittel der ersten Wahl. Sind die Symptome medikamentös nicht mehr behandelbar, kann eine operative Therapie, wie die Tiefenhirnstimulation, in Betracht gezogen werden. Dabei werden Mikroelektroden in eine bestimmte Region der Basalganglien implantiert, wodurch sich die Kernsymptome der Parkinson-Erkrankung (v.a. Tremor) mildern lassen (Nutt und Wooten, 2005; Schapira, 2005). Sowohl die medikamentöse, als auch die operative Therapie kann nur die Symptome der Parkinson-Erkrankung mildern. Bis heute steht keine kurative Therapie zu Verfügung.

1.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE

Die Mehrzahl der Parkinson-Erkrankungen ist sporadischer Natur, dessen Ursache nach wie vor unbekannt ist. Das Zusammenspiel verschiedener Umweltfaktoren und individuelle genetische Prädispositionen scheinen die Entwicklung sporadischer Parkinson-Erkrankung zu fördern. Das Lebensalter scheint dabei den größten Risikofaktor darzustellen. Es wird vermutet, dass mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, sowie Proteinaggregation und eine Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems dem Absterben dopaminerger Neuronen zugrunde liegen. In etwa 10% aller Parkinson-Fälle ist eine familiäre Häufung festzustellen, die einen autosomal rezessiven oder autosomal dominanten Erbgang zeigt (Dauer und Przedborski, 2003).

1.2.1 Familiäre Formen der Parkinson-Erkrankung

Obwohl die Mehrheit der Parkinson-Erkrankung sporadischer Natur ist, konnten in den letzten Jahren Gene identifiziert werden, die mit familiären Formen der PD in Verbindung stehen. In ca. 10% aller Parkinson-Fälle konnten Mutationen in einem dieser Gene beobachtet werden. Durch Positionsklonierungen wurden bis heute 13 Loci identifiziert, die in Zusammenhang mit der Parkinson-Erkrankung gebracht werden. Dabei können Mutationen in sechs dieser Gene eindeutig als Ursache der Parkinson-Erkrankung angesehen werden (Tab. 1). Die Entdeckung dieser monogenen Formen der PD eröffnete die Möglichkeit, durch Entwicklung von Zellkultur- und Tier-Modellen den molekularen Mechanismen der Erkrankung auf den Grund zu gehen. Die konsistente Pathophysiologie

zwischen der sporadischen und der monogenen Formen der PD lässt eine gemeinsame Pathogenese vermuten. Die Aufklärung der molekularen Ursachen der familiären Formen hilft daher auch, das Verständnis für die sporadische Formen der Erkrankung zu erweitern und neue Therapieansätze zu entwickeln (Thomas und Beal, 2007).

LOCUS	CHROMOSOM	GENPRODUKT	ERBGANG	MÖGLICH FUNKTION
Loci und Gene, deren Mutationen eindeutig als Ursache der Parkinson-Erkrankung angesehen werden:				
PARK1/4	4q21-q23	a-Synuclein	AD	Vesikel <i>trafficking</i> /synaptische Plastizität
PARK2	6q25-q27	Parkin	AR	E3-Ubiquitin-Ligase
PARK6	1p36-p35	PINK1	AR	Mitochondriale Kinase
PARK7	1p36	DJ-1	AR	Stress- sensitives Protein
PARK8	12p11-q13	LRRK2	AD	MAPKK Kinase
PARK9	1p36	ATP13A2	AR	Lysosomale ATPase
Weitere Loci und Gene, deren Veränderung mit der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht werden				
PARK3	2p13	SPR?	AD	
PARK5	4p14	UCHL1	AD?	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1</i>
PARK10	1p32	?	?	?
PARK11	2q36-q37	GIGYF2?	?	?
PARK12	Xq	?	?	?
PARK13	2p12	HtrA2/Omi	?	Mitochondriale Protease

Tabelle 1: Genloci für monogen-erbliche Formen der Parkinson-Erkrankung

AR: autosomal rezessiv; AD: autosomal dominant; PINK1: *PTEN-induced kinase 1*; LRRK2: *leucin-rich repeat kinase 2*; ATP13A2: P-Typ ATPase; SPR: *Sepiapterin reductase*; UCH-L1: *Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1*, GIGYF2: *GBR10 interacting GYF protein-2*; HtrA2: *High temperature requirement protein A2*. (Bonifati, 2007; Gasser, 2009).

1.2.1.1 *Dominante Gene*

1.2.1.1.1 *α-Synuclein*

α-Synuclein (SCNA) war das erste Gen, das im Jahr 1997 im Kontext familiärer PD beschrieben wurde. Bislang konnten drei pathogene Mutanten (A30T, A30P und E46K) identifiziert werden (Kruger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997; Zarranz et al., 2004). Zusätzlich wurde eine Erhöhung der Gendosis durch Duplikationen und Triplikationen des α-Synuclein-Genlocus in autosomal dominanten Formen der PD beschrieben (Farrer et al., 2004; Singleton et al., 2003). α-Synuclein ist ein lösliches nativ ungefaltetes Protein von 40 kDa, das vorrangig präsynaptisch lokalisiert ist. Es besitzt

jedoch eine Neigung amyloide Fibrillen zu bilden. Diese Eigenschaft wird gefördert durch pathogene Mutationen, durch eine Erhöhung der Protein-Konzentration und durch eine Hyperphosphorylierung an Serin 129 (Fujiwara et al., 2002; Greenbaum et al., 2005; Miller et al., 2004). Das Protein besitzt eine N-terminale Domäne, die nach Bindung an Membranen eine alpha-helikale Konformation einnimmt. Eine zentrale hydrophobe NAC-Domäne (*non-amyloid component of plaques*) wird für das fibrillogene Potential von α -Synuclein verantwortlich gemacht (Bodles und Irvine, 2004; Giasson et al., 2001). Die C-terminale Domäne enthält mehrere Phosphorylierungsstellen und könnte dem Protein eine Chaperon-ähnliche Aktivität verleihen. Die Funktion von α -Synuclein ist bisher noch unklar. Die Bindung an synaptische Vesikel und Stabilisierung deren Protein und Lipid-Feinstruktur lässt eine Rolle in der Neurotransmitterfreisetzung oder synaptischen Plastizität vermuten (Abeliovich et al., 2000; Sidhu et al., 2004). Interessanterweise ist fibrilläres α -Synuclein der Hauptbestandteil von *Lewy Bodies* und stellt somit die offensichtlichste Verbindung zwischen familiärer und sporadischer Parkinson-Erkrankung dar (Spillantini et al., 1997). Zahlreiche transgene Maus-Modelle, die entweder die pathogenen Mutanten oder Wildtyp- α -Synuclein überexprimieren, wurden entwickelt, um die pathophysiologische Funktion zu untersuchen. Trotz unterschiedlicher Phänotypen zeigten diese Mäuse gemeinsame Merkmale wie α -Synuclein-Aggregate und motorische Defizite. Die meisten pathologischen Veränderungen wurden jedoch in Gehirnbereichen wie Gehirnstamm und Rückenmark beobachtet, die nicht unmittelbar bei der PD betroffen sind. Ein Verlust dopaminerger Neuronen zeigte keines dieser Maus-Modelle (Buchman und Ninkina, 2008; Fernagut und Chesselet, 2004; Kahle, 2008).

1.2.1.1.2 LRRK2

Die *leucin-rich repeat kinase 2* (LRRK2), auch Dardarin genannt, wurde 2002 als Parkinson-assoziiertes Gen identifiziert (Funayama et al., 2002; Paisan-Ruiz et al., 2005; Zimprich et al., 2004). LRRK2 ist ein 286 kDa großes Protein, das folgende Domänen beinhaltet: eine N-terminale Ankyrin-Domäne, eine Leucin-reiche Wiederholung von Aminosäuren (*leucin-rich repeat*), eine Roc-Domäne (*Ras in complex proteins*), eine COR-Domäne (*C-terminal of Roc*), eine MAPKKK-Domäne (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) und eine WD40-Domäne (Taylor et al., 2006). LRRK2-Mutationen sind die häufigste Ursache für die dominante familiäre Form der Parkinson-Erkrankung, die durch eine späte Manifestation gekennzeichnet ist. Bis heute konnten ca. 20

verschiedene pathogene Mutationen im LRRK2-Gen identifiziert werden, unter denen die G2019S Transition in der Kinase-Domäne die häufigste ist. Mutationen in der Kinase-Domäne, als auch in den anderen Domänen, scheinen die Kinase-Aktivität zu erhöhen, was auf einen *toxic gain of function* Mechanismus hindeutet (Brice, 2005; West et al., 2007). Die physiologische Funktion von LRRK2 ist weitgehend unbekannt. Untersuchungen in Rattenneuronen deuteten auf eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Morphologie von Neuriten (MacLeod et al., 2006). Transgene Mäuse, die die Mutante G2019S exprimierten, zeigten allerdings neben leichten Veränderungen im Dopamin-Haushalt keine offensichtliche Neuropathologie (Li et al., 2010).

1.2.1.2 *Autosomal rezessive Gene*

1.2.1.2.1 *Parkin*

Parkin konnte als erstes Gen der Parkinson-Erkrankung mit rezessivem Erbgang zugeschrieben werden. 1998 wurden Mutationen im Parkin-Gen einer Japanischen Familie identifiziert, die durch einen juvenilen Krankheitsbeginn charakterisiert waren (Kitada et al., 1998). Bis heute konnte eine Vielzahl weiterer Mutationen identifiziert werden. Parkin nimmt bei den Parkinson-assoziierten Genen eine besondere Stellung ein, da die Mehrheit der rezessiven Fälle der Parkinson-Erkrankung durch Mutationen in diesem Gen hervorgerufen wird. Eine ausführliche Charakterisierung erfolgt in Kapitel 1.3.

1.2.1.2.2 *PINK1*

Mutationen im PINK1-Gen sind die zweithäufigste Ursache autosomal rezessiver Parkinson-Erkrankungen. Das Gen codiert für ein 581 Aminosäuren (AS) langes ubiquitäres Protein. Es enthält eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz, die für eine mitochondriale Lokalisation von PINK1 verantwortlich ist (Beilina et al., 2005; Silvestri et al., 2005). Zusätzlich enthält PINK1 eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne, dessen Aktivität durch *in vitro* Auto-Phosphorylierung gezeigt wurde (Beilina et al., 2005; Silvestri et al., 2005). Bis heute konnten zwei putative Substrate von PINK1, Trap1, ein mitochondrial lokalisiertes Chaperon und HtrA2/Omi identifiziert werden (Plun-Favreau et al., 2007; Pridgeon et al., 2007). PINK1 ist ein protektives Protein, das Zellen vor oxidativem und proteasomalem Stress, sowie vor Staurosporin induzierte Apoptose schützte (Haque et al.,

2008; Petit et al., 2005; Pridgeon et al., 2007; Valente et al., 2004). Eine PINK1-Defizienz hatte dementsprechend eine erhöhte Vulnerabilität zu Folge (Deng et al., 2005a; Wood-Kaczmar et al., 2008). Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten eine wichtige Rolle von PINK1 in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität und Dynamik (Clark et al., 2006; Exner et al., 2007; Gandhi et al., 2009; Gegg et al., 2009; Marongiu et al., 2009; Morais et al., 2009; Park et al., 2006; Poole et al., 2008). Interessanterweise konnte PINK1 funktionell mit Parkin in Verbindung gebracht werden: PINK1-defiziente *Drosophila*-Modelle zeigten Degeneration der Flugmuskulatur und dopaminergener Neuronen, sowie mitochondriale Veränderungen, ein Phänotyp, der Parkin-defizienten Fliegen (siehe Abschnitt 1.3.5) glich. Die Überexpression von Parkin führte zu einer Revertierung des PINK1-Phänotyps, PINK1 konnte hingegen den Verlust von Parkin nicht kompensieren (Clark et al., 2006; Park et al., 2006; Yang et al., 2006a). Dies führt zur Vermutung, dass Parkin und PINK1 Bestandteile eines gemeinsamen zellulären Signalwegs darstellen, in dem PINK1 oberhalb von Parkin anzusiedeln ist. Diese reziproke funktionelle Relevanz konnte durch weitere Zellkultur-Modelle gestützt werden (Exner et al., 2007; Lutz et al., 2009). Zur genaueren Analyse der PINK1-Funktion wurden auch PINK1-*Knock Out*-Mäuse generiert. Diese zeigten, abgesehen von milden Veränderungen der dopaminergen Neurotransmission und Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion, keine Degeneration dopaminergener Neuronen (Gautier et al., 2008; Kitada et al., 2007). Bis heute sind ca. 20 pathogene Mutationen des PINK1-Gens beschrieben, die hauptsächlich in der Kinase-Domäne liegen und somit dessen katalytische Aktivität beeinträchtigen (Beilina et al., 2005; Bonifati, 2007; Marongiu et al., 2009; Mills et al., 2008). Da bisher noch keine Autopsie von Patienten mit PINK1-Mutationen vorgenommen werden konnte, stehen keine neuropathologischen Daten zur Verfügung.

1.2.1.2.3 DJ-1

Mit einer Frequenz von 1-2% scheinen Mutationen im DJ-1-Gen nur für einen geringen Anteil aller Fälle autosomal rezessiver Parkinson-Erkrankungen mit früher Manifestation verantwortlich zu sein (Bonifati et al., 2003). Die ersten identifizierten Mutationen waren eine Deletion von Exon 1-5 in einer niederländischen Familie und eine *Missense*-Mutation L166P in einer italienischen Familie, was einen Funktionsverlust von DJ-1 in der Erkrankung vermuten lässt (Bonifati et al., 2004). Das DJ-1-Gen codiert für ein ubiquitäres 189 Aminosäuren langes Protein, das sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus und im

Mitochondrium lokalisiert sein kann (Junn et al., 2009; Zhang et al., 2005). DJ-1 scheint nur als ein Dimer funktionell zu sein. Die pathogene Mutation L166P führte zu einer Destabilisierung und zu einem Abbau dieser Dimere (Honbou et al., 2003; Miller et al., 2003; Olzmann et al., 2004; Tao und Tong, 2003). Ursprünglich wurde DJ-1 als Onkogen beschrieben, dem zahlreiche Funktionen zugeschrieben werden können (Nagakubo et al., 1997). Die anerkannteste Funktion ist jedoch das Management von oxidativem Stress. Verschiedene Zellkultur- und Tier-Modelle zeigten, dass DJ-1 vor oxidativem Stress schützt. DJ-1-*Knock Out*-Fliegen zeigten z.B. eine Hypersensitivität gegen oxidativem Stress und eine Neurodegeneration von dopaminergen und Photorezeptor-Neuronen (Yang et al., 2005). Obwohl DJ-1-*Knock Out*-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für oxidativem Stress und MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin*) zeigen, weisen diese eine normale Zellzahl dopaminerger Neuronen auf (Kim et al., 2005). Der Mechanismus, der dem protektiven Potential von DJ-1 zugrundeliegt, bedarf noch weiterer Aufklärung. DJ-1 könnte eine Chaperon-ähnliche Funktion ausüben, was durch eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem bakteriellem Chaperon Hsp13 nahegelegt wird (Lee et al., 2003; Shendelman et al., 2004). Überdies könnte DJ-1 als Stress-Sensor fungieren. So wurde gezeigt, dass unter oxidativem Stress Cystein C106 oxidiert wird; dies hatte eine mitochondriale Lokalisation von DJ-1 zur Folge und schien für das protektive Potential von DJ-1 von Bedeutung zu sein (Canet-Aviles et al., 2004; Mitsumoto et al., 2001; Taira et al., 2004; Waak et al., 2009; Yokota et al., 2003). DJ-1 scheint jedoch Faktor eines Signalwegs zu sein, der nicht mit PINK1 und Parkin assoziiert ist: mitochondriale Veränderungen in PINK1- oder Parkin-defizienten Zellen konnten durch DJ-1 nicht kompensiert werden (Exner et al., 2007; Yang et al., 2005).

1.2.2 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress

Eine mitochondriale Dysfunktion wird seit langem mit der Pathogenese der PD in Verbindung gebracht. Die Hauptaufgabe von Mitochondrien besteht darin, Energie in Form von ATP durch oxidative Phosphorylierung bereitzustellen. Die Elektronentransportkette besteht aus fünf hintereinander geschalteten Redox-Komplexen, die in der Lage sind, Elektronen aufzunehmen bzw. abzugeben. Während des Elektronentransportes werden Protonen aus der Matrix der Mitochondrien in den Intermembranraum transportiert. Dieser elektrochemische Protonengradient ist die Basis des mitochondrialen Membranpotentials und wird von Komplex V (ATP-Synthase) dazu

genutzt, ATP aus ADP und anorganischem Phosphat zu synthetisieren. Etwa 2% der Elektronen reagieren jedoch mit Sauerstoff, wodurch es zur Bildung von sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) kommt. Zu ROS zählen das Superoxid-Radikal (O_2^-), das Hydroxyl-Radikal (HO^\cdot) und stabile Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Beal, 2003; Turrens, 2003). Der Körper verfügt über Mechanismen, diese reaktiven Sauerstoffspezies zu neutralisieren, zu deren Bestandteile z.B. Glutathion (GSH) und Superoxid-Dismutasen (SOD) zählen. Verschiebt sich dieses Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und Eliminierung zu Gunsten der ROS-Produktion, hat dies dramatische Folgen für die Zelle. Zu den Folgen dieses oxidativen Stresses zählen die Oxidation von Lipiden und Proteinen, sowie die Schädigung der DNA, Vorgänge die für den Alterungsprozess mitverantwortlich gemacht werden (Raha und Robinson, 2000).

Erste Hinweise für eine mitochondriale Dysfunktion und oxidativem Stress in der Pathogenese der PD zeigten Fälle von Drogenmissbrauch aus den 1970er und 1980er Jahren. Die intravenöse Injektion von mit MPTP- (*1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin*) kontaminierten Opioiden führte zu einem Parkinson-ähnlichem Phänotyp (Parkinsonismus) und zu einem Verlust dopaminerger Neuronen (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983). MPTP wird über die Blut-Hirn-Schranke aufgenommen und durch die MAO-B in Gliazellen zu toxischem MPP^+ (*1-methyl-4-phenyl-pyridin*) metabolisiert. MPP^+ wird über den DAT selektiv in dopaminerge Neuronen aufgenommen, in deren Mitochondrien es akkumuliert wird und dort Komplex I der Elektronentransportkette irreversibel hemmt. Also Folge kommt es zu einer verringerten ATP-Produktion und einer erhöhten ROS-Produktion und schließlich zum Tod der Zelle. Heute wird MPTP in Primaten und Nagern eingesetzt, um die Parkinson-Erkrankung zu imitieren (Bloem et al., 1990; Dauer und Przedborski, 2003). Weitere Tier-Modelle, in denen Toxine wie das Insektizid Rotenon (Betarbet et al., 2000) und das Herbizid Paraquat (Cicchetti et al., 2005) eingesetzt werden, hemmen ebenfalls Komplex I und führen zu Parkinson-ähnlichen Symptomen. Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress in Parkinson-Patienten verändert ist. In der Tat wurde ein Defizit der Komplex I-Aktivität in der SNpc von Parkinson-Patienten festgestellt (Schapira et al., 1990). Darüber hinaus wurden vermehrte oxidative Modifizierungen von Lipiden und Proteinen, sowie eine verminderte Menge des anti-oxidativem GSH und erhöhte ROS-Produktion nachgewiesen (Jenner, 2003; Sian et al., 1994). Neuere Studien zeigten eine Häufung somatischer mitochondrialer (mt) DNA-

Mutationen in Neuronen der SNpc von Parkinson-Patienten. Von der mtDNA werden 13 Proteine, die Untereinheiten der Atmungskette darstellen, sowie mehrere RNAs und rRNA codiert. Erreichten diese Mutationen einen gewissen Schwellenwert, hatte dies einen Defekt der mitochondrialen Atmungskette zur Folge (Bender et al., 2006; Kraytsberg et al., 2006). Diese mtDNA-Mutationen könnten aufgrund der Nähe zur Atmungskette durch ROS ausgelöst werden, wodurch ein Teufelskreis ausgelöst wird, in der die Schädigungen wiederum zur mitochondrialen Dysfunktion und erhöhter ROS-Produktion führen.

Warum jedoch Neuronen der SNpc im speziellen anfälliger zu sein scheinen, liegt vermutlich darin, dass sie aufgrund des Dopamin-Metabolismus einem erhöhten oxidativem Stress ausgesetzt sind. Durch den enzymatischen Abbau von Dopamin durch MAO und COMT entstehen neben DOPAC, HVA und 3-MT auch das reaktive H₂O₂ (Maker et al., 1981). Der nicht-enzymatische Abbau durch Auto-Oxidation von Dopamin führt zur Generierung von toxischen Chinonen und Semi-Chinonen, welche durch ihre Reaktion mit Cystein-Resten Proteine schädigen (Stokes et al., 1999). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress einen entscheidenden Beitrag zur Pathogenese der PD liefern. Ob dies jedoch die Ursache oder die Konsequenz ist, ist bisher noch unklar.

1.2.3 Apoptose und anti-apoptotische Signalwege

In den letzten Jahren häuften sich die Beweise, dass der Verlust von dopaminergen Neuronen in der Parkinson-Erkrankung auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist (Lev et al., 2003; Singh und Dikshit, 2007). Dabei lassen sich die Mechanismen des intrinsischen und des extrinsischen Weges unterscheiden. Der extrinsische Weg wird über Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie wie CD95 (Fas) an der Zelloberfläche vermittelt. Nach Bindung des Liganden (CD95L, TRAIL, *TNF-related apoptosis inducing ligand*) erfolgt eine Multimerisierung der Rezeptoren. Weitere Adaptormoleküle wie FADD (*Fas-associated death domain*) und die Pro-Caspase-8 werden rekrutiert und bilden den DISC-Komplex (*death inducing signaling complex*). Dies führt zu einer Selbstaktivierung von Caspase-8, die proteolytisch Effektor-Caspasen wie Caspase-3 aktiviert. Eine Verbindung zum intrinsischen Weg wird über das Protein Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) hergestellt. Bid wird durch Caspase-8 zu tBid (*truncated Bid*) geschnitten, was in der Lage ist, den intrinsischen Apoptose-Weg zu aktivieren. Im

intrinsischen Weg bewirkt die stress- induzierbare Apoptose eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, entweder durch den unspezifischen Kanal der inneren mitochondrialen Membran PTP (*permeability transition pore*) oder durch Regulation von Mitgliedern der Bcl-2-Familie (*B cell lymphoma 2*). Die Bcl-2 Familie untergliedert sich in anti-apoptotische Mitglieder, wie Bcl-2, und in pro-apoptotische Mitglieder, wie Bax (*Bcl-2 associated protein X*), Bad (*Bcl-2-associated agonist of cell death*) und Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*). Durch die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran erfolgt die Freisetzung von Cytochrom c, das an APAF-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) bindet. Dadurch kommt es zur Bildung des sogenannten Apoptosomes und zur Aktivierung der Caspase-9, das die apoptotische Kaskade durch Aktivierung der Effektor-Caspasen, wie Caspase-3 einleitet (Hengartner, 2000; MacFarlane und Williams, 2004).

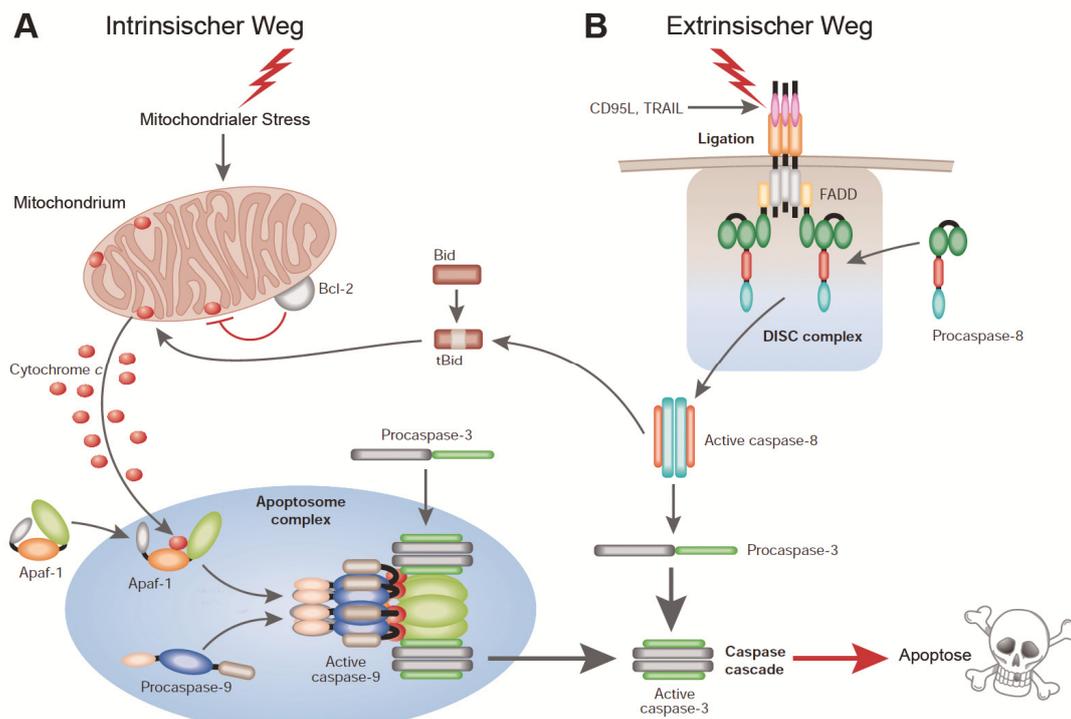


Abbildung 5: Der intrinsische und extrinsische Weg der Apoptose

Dargestellt sind die zwei Hauptwege der Apoptose. Der eine wird intrinsisch durch stress-auslösende Stimuli (**A**), der andere extrinsisch durch Aktivierung von Todesrezeptoren an der Zelloberfläche (**B**) aktiviert. (**A**) Stress-induzierte Apoptose führt zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von Cytochrom c. Reguliert wird dieser Prozess teilweise durch Mitglieder der Bcl-2-Familie. Cytochrom c bindet an Apaf-1. Dies resultiert in der Formation des Apoptosomes. Die Initiator Caspase-9 wird aktiviert und setzt die weitere Caspase-Kaskade in Gang. (**B**) Durch Bindung des Liganden (CD95L, TRAIL *TNF-related apoptosis inducing ligand*) an den Todesrezeptor kommt es zu dessen Multimerisierung und zur Rekrutierung der Procaspase-8 durch FADD in den DISC. Die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 führt zur proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspase-3. Abbildung modifiziert nach (MacFarlane und Williams, 2004).

Die Vorgänge der Apoptose unterliegen einer komplexen Regulation. Verschiedene Signalwege können der Apoptose entgegenwirken. Ein Beispiel ist der sogenannte NF κ B (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells*)-Signalweg. NF κ B ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Entzündung, Immunität, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist. Über 150 NF κ B-Zielgene wurden bisher identifiziert, deren selektive Aktivierung durch verschiedene Mitglieder der NF κ B-Familie erreicht wird (Pahl, 1999). Zu den Mitgliedern zählen RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 und p52, die untereinander Homo- und Heterodimere bilden. Die Zusammensetzung der Dimere, sowie die Interaktion mit verschiedenen zelltypspezifischen Co-Faktoren und der kombinatorischen Genregulation auf Promotor-Ebene führen zur einer enormen funktionellen Bandbreite und Spezifität (Hayden und Ghosh, 2004).

Unter basalen Bedingungen liegt NF κ B in einer inaktiven Form im Zytosol vor. Durch Bindung mit Proteinen der I κ B (*inhibitor of NF κ B*)-Familie wird NF κ B im Zytosol zurückgehalten und kann nicht in den Nukleus translozieren und Zielgene aktivieren (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998). Über 150 Stimuli führen über verschiedene Signalwege zu einer Translokation von NF κ B, die alle auf Ebene des IKK-Komplexes (I κ B-Kinase) zusammenlaufen. Am häufigsten wird der sogenannte kanonische oder klassische Signalweg aktiviert, der durch Zytokine wie den Tumor-Nekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-1 (IL-1) oder durch bakterielle Antigene wie Lipopolysaccharide (LPS) induziert wird (Hayden und Ghosh, 2004). Der IKK-Komplex besteht aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β , sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO, *NF κ B essential modifier*). Für die Aktivierung des IKK-Komplexes ist die IKK γ -Untereinheit von großer Bedeutung. Aktivierende Stimuli führen zu einer regulatorischen Ubiquitylierung über Lysin-63 (K63) und somit zu einer Aktivierung von Signalmolekülen wie TRAF2 (*TNF-Receptor-associated factor 2*) und TRAF6 (*TNF-Receptor-associated factor 6*). Dadurch kommt es zu einer regulatorischen Ubiquitylierung von IKK γ . In dessen Folge wird IKK β durch Phosphorylierung aktiviert (Chen, 2005; Haglund und Dikic, 2005; Krappmann und Scheidereit, 2005; Ravid und Hochstrasser, 2004). Nach Aktivierung des IKK-Komplexes mediiert IKK β die Phosphorylierung von I κ B an Serin 32 und Serin 36, wodurch der Inhibitor in Folge ubiquityliert und über das Proteasom abgebaut wird. Auf diesem Weg wird NF κ B von seinem Inhibitor freigesetzt und die nukleäre Import-Signalsequenz demaskiert. Der

Transkriptionsfaktor kann so in den Kern translozieren, an Promotoren von Zielgenen binden und deren Transkription induzieren (Delhase und Karin, 1999; Karin, 1999a, b). NFκB-Zielgene codieren für Inhibitoren der Apoptose (cIAPs, *cellular inhibitors of apoptosis*) und XIAP, (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Stehlik et al., 1998; You et al., 1999), anti-oxidativ wirkende Enzyme wie MnSOD (*Manganese superoxide dismutase*) (Das et al., 1995) und Proteine der Bcl-2 Familie wie Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) (Lee et al., 1999).

NFκB ist im gesamten Nervensystem ubiquitär exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität und synaptischen Plastizität (Karin und Lin, 2002). Neue Zellkultur-Studien und Tier-Modelle konnten zeigen, dass durch Aktivierung des NFκB-Signalwegs die Apoptose, hervorgerufen durch oxidativem Stress, Exzitotoxizität und Glucosemangel, unterdrückt werden kann (Kaltschmidt et al., 2005; Mattson et al., 2000). Aufgrund dieser Beobachtungen könnte NFκB eine wichtige Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson-Erkrankung spielen.

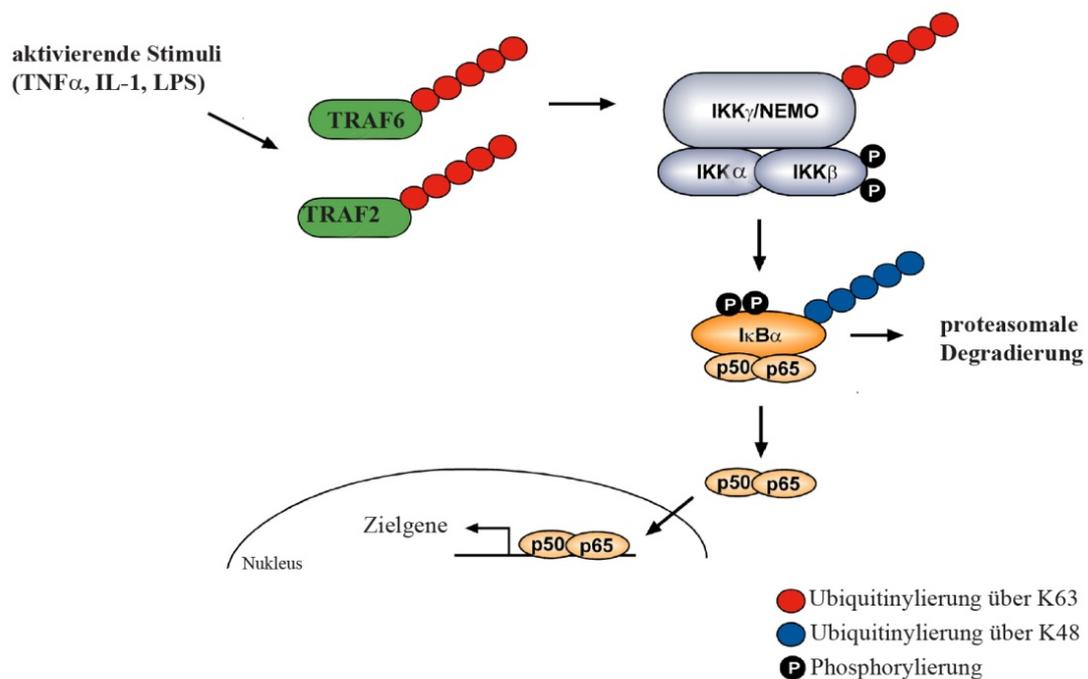


Abbildung 6: Der kanonische NFκB-Signalweg

Aktivierende Stimuli wie Tumor-Nekrosefaktor α (TNFα), Interleukin-1 (IL-1) und Lipopolysaccharide (LPS) führen zur regulatorischen Ubiquitinierung von TRAF2 oder TRAF6. Diese induzieren die regulatorische Ubiquitinierung von IKKγ (NEMO), in dessen Folge IKKβ phosphoryliert wird. Der aktivierte IKK (IκB-Kinase)-Komplex phosphoryliert IκB, der in Folge ebenfalls ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut wird. Der Transkriptionsfaktor, der sich klassischerweise aus den Untereinheiten p65 und p50 zusammengesetzt ist, wird so von seinem Inhibitor entlassen, transloziert in den Nucleus und induziert die Transkription entsprechender Zielgene. Abbildung modifiziert nach (Henn et al., 2007).

1.2.4 Protein-Aggregation und proteasomale Dysfunktion

Protein-Aggregate sind bei allen neurodegenerativen Erkrankungen zu finden. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass nicht die Endprodukte des Aggregationsprozesses, sondern vielmehr die oligomeren Intermediate ein toxisches Potential haben. In der Parkinson-Erkrankung treten Proteinablagerungen in Form von *Lewy Bodies* auf (siehe Abschnitt 1.1.2). Eine mögliche Erklärung für die Anhäufung von Protein-Aggregaten ist eine Beeinträchtigung des Protein-Abbaus. Der Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein streng regulierter Prozess, der durch verschiedene Enzyme katalysiert wird (Ciechanover und Brundin, 2003; Sherman und Goldberg, 2001). Das Protein, das für den Abbau bestimmt ist, wird kovalent mit Ubiquitin verknüpft. Im ersten Schritt katalysiert ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym E1 die Ausbildung einer Thioester-Bindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und einem Cystein des E1-Enzyms unter ATP-Verbrauch. Das so aktivierte Ubiquitin wird nun auf einen Cystein-Rest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 unter Ausbildung einer Thioester-Bindung transferiert. Im letzten Schritt erfolgt die Ubiquitinylierung des Zielproteins durch eine E3-Ubiquitin-Ligase, die in Kombination mit dem E2-Enzym die Ausbildung einer Isopeptid-Bindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins innerhalb des Substrates katalysiert. Die Spezifität des Ubiquitinylierungsprozesses resultiert durch die funktionelle Interaktion des E2/E3-Komplexes mit dem Substrat. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, so dass dem ersten Ubiquitin weitere Ubiquitin-Einheiten angehängt werden und so eine Poly-Ubiquitinylierung des Substrates resultiert. Proteine, die für den Abbau über das 26S-Proteasom bestimmt sind, zeigen eine Poly-Ubiquitinylierung, bei der Ubiquitin über Lysin-48 verknüpft ist. (DeMartino und Slaughter, 1999; Hershko und Ciechanover, 1998; Hershko et al., 2000; Hochstrasser, 1996; Pickart, 2000). Das 26S-Proteasom ist ein Multi-Protein-Komplex, das aus zwei 19S-Untereinheiten und einer 20S-Untereinheit aufgebaut ist. Der proteolytisch aktive Teil ist das sogenannte 20S-Proteasom. Es hat die Form eines hohlen Zylinders, bestehend aus vier Ringen, die ihrerseits wiederum aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind. Die katalytische Protease-Aktivität befindet sich an der Innenwand der β -Ringe. An beiden Öffnungen dieses Zylinders befinden sich wie eine Kappe die 19S-Untereinheiten. Der 19S-Komplex erkennt die zum Abbau bestimmten Substrate anhand der Poly-Ubiquitin-Ketten und vermittelt deren Entfaltung, De-Ubiquitinylierung und initiiert so deren Abbau (Arendt und Hochstrasser, 1997; Baumeister et al., 1998; Glickman et al., 1998).

Bei der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung scheint das Ubiquitin-Proteasom-System eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten des Proteasoms in der SNpc von Parkinson-Patienten reduziert waren und möglicherweise in Aggregate sequestriert sein könnten (McNaught et al., 2002; McNaught und Olanow, 2003). Weitere Studien zeigten, dass Proteinaggregate direkt die proteasomale Funktion beeinträchtigen könnten (Bence et al., 2001). Auch Toxin-induzierte Tier-Modelle der PD zeigten eine Beteiligung des UPS (Betarbet et al., 2006; Fornai et al., 2005; Wang et al., 2006).

Vermutlich trägt oxidativer Stress entscheidend zu einer Beeinträchtigung des Proteasoms bei. Oxidativer Stress führt zur Schädigung der Mitochondrien und zu einer Reduktion der ATP-Produktion. Als Folge kommt es durch das Energiedefizit zu einer Beeinträchtigung des ATP-abhängigen Proteasoms (Abou-Sleiman et al., 2006; Sullivan et al., 2004).

1.2.5 Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER-Stress)

Ein weiterer Grund für die Anhäufung von aggregierten Proteinen im Rahmen der Parkinson-Erkrankung könnte eine Dysfunktion der Proteinfaltungs-Maschinerie sein. Proteinfaltung ist ein komplexer Vorgang und benötigt zusätzliche Faktoren, wie z.B. Chaperone. Chaperone binden an exponierte hydrophobe Bereiche von un- oder fehlgefalteten Proteinen und beugen so passiv einer Aggregation vor oder vermitteln aktiv eine korrekte Faltung (Agashe und Hartl, 2000; Ellis und Hartl, 1999; Hartl, 1996; Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Netzer und Hartl, 1998; Walter und Buchner, 2002). Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist die Faltung von Proteinen noch komplexer, da hier zusätzliche posttranskriptionelle Modifikationen wie Glycosylierung oder die Ausbildung von Disulfidbrücken stattfinden. Die Zelle besitzt ein komplexes Netzwerk, um die Balance zwischen Protein-Biosynthese, -Translokation, -Faltung und -Abbau zu gewährleisten (Morimoto, 2008). Wird dieses sensible Gleichgewicht gestört, führt dies durch Akkumulation von ungefalteten oder missgefalteten Proteinen und Überlastung der Faltungs- und Prozessierungs-Maschinerie zu ER-Stress. Als Folge davon wird die sogenannte „Antwort auf ungefaltete Proteine“ (*Unfolded Protein Response*, UPR) ausgelöst (Gething und Sambrook, 1992; Kozutsumi et al., 1988; Malhotra und Kaufman, 2007; Zhang und Kaufman, 2004). Die UPR verfolgt dabei zwei Ziele: zum einen die Wiederherstellung der zellulären Homöostase, indem die generelle Proteintranslation

gestoppt wird und im Gegenzug Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, die zu einer Erhöhung der Faltungskapazität und zum Proteinabbau führen. So führt UPR z.B. zu einer gesteigerten Transkription des ER-Chaperons BiP (*Immunoglobulin heavy chain binding protein*) (Cox et al., 1993; Mori et al., 1992). Zum anderen leitet die UPR die Apoptose ein, wenn diese Mechanismen versagen und die normale Zellfunktion nicht wiederhergestellt werden kann.

Die UPR wird durch die drei ER-Transmembran-Rezeptoren PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) und IRE1 (*inositol-requiring protein-1*) vermittelt. Mehrere Studien zeigen, dass BiP hierbei eine Rolle als Stress-Sensor erfüllt. In nicht gestressten Zellen liegt BiP im ER-Lumen vor, wo es seine Aufgabe als Chaperon erfüllt, aber auch an die drei Transmembran-Rezeptoren gebunden ist. Kommt es zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen, dissoziiert BiP von den Rezeptoren, um vermehrt an die ungefalteten Proteine zu binden. Dadurch unterliegen die drei Transmembran-Rezeptoren einer Konformationsänderung, werden aktiviert und leiten verschiedene Signalwege ein (Zhang und Kaufman, 2004):

Aktiviertes PERK phosphoryliert und inaktiviert damit den eukaryotischen Initiationsfaktor 2α (eIF2 α). Dies führt zu einem generellen Stopp der Proteintranslation. Diese Hemmung ist jedoch nicht vollständig. Phosphoryliertes eIF2 α kann die Translation spezifischer mRNAs, die bestimmte regulatorische Sequenzen in der 5'-UTR besitzen, gezielt stimulieren. Zu diesen zählt der Transkriptionsfaktor ATF4 (*activating transcription factor 4*) (Lu et al., 2004). ATF4 transloziert in den Nukleus und induziert die Transkription von Genen, die am Aminosäurestoffwechsel, an Proteinsekretion und am Management von oxidativem Stress beteiligt sind. Zusätzlich können auch proapoptische Gene, wie z.B. CHOP (*C/EBP homologous protein*) durch ATF4 positiv reguliert werden (Harding et al., 2003).

Aktiviertes ATF6 transloziert in den Golgi-Apparat, wo es zu einem aktiven Transkriptionsfaktor prozessiert wird (Ye et al., 2000). Zu den ATF6-Zielgenen zählen ER-Chaperone und XBP-1 (*x-box binding protein-1*).

Aktiviertes IRE1 entfernt durch seine Endoribonuclease-Domäne ein Intron der XBP-1 mRNA und führt dadurch zu einem *frameshift*. Das Spleißen der XBP-1-mRNA ermöglicht die Translation des aktiven Transkriptionsfaktors, zu dessen Zielgenen unter anderem ER-Chaperone und Gene des Proteinabbaus zählen (Yoshida et al., 1998).

Verschiedene Studien zeigen, dass ER-Stress eine Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielt. Im Gehirn von Patienten mit sporadischer PD konnte eine Hochregulation von verschiedenen ER-Stress-Markern wie aktiviertes PERK, phosphoryliertes eIF2 α und Caspase-4 gezeigt werden (Hoozemans et al., 2007; Moran et al., 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass Parkinson-spezifische Toxine, wie MPTP, 6-OHDA und Rotenon, ebenfalls ER-Stress auslösten (Conn et al., 2004; Ghribi et al., 2003; Holtz und O'Malley, 2003; Holtz et al., 2006; Holtz et al., 2005; Ryu et al., 2005; Ryu et al., 2002). Neben einer Aktivierung von PERK und IRE1 konnte eine Hochregulation von ER-Chaperonen und anderen Zielgenen der UPR wie z.B. CHOP beobachtet werden (Ryu et al., 2002).

1.3 PARKIN-ASSOZIIERTE PARKINSON-ERKRANKUNG

1.3.1 Klinische und neuropathologische Charakteristika

Mutationen im Parkin-Gen sind die häufigste Ursache für die autosomal rezessive Form der Parkinson-Erkrankung (Kitada et al., 1998). Parkin nimmt daher eine besondere Position unter den PD-assoziierten Genen ein. In Patienten konnten sowohl homozygote, als auch kombinierte heterozygote Mutationen, in der beide Allele von unterschiedlichen Mutationen betroffen sind, gefunden werden. In seltenen Fällen lassen sich auch heterozygote Mutationen finden, was derzeit als möglicher Risikofaktor für die Parkinson-Erkrankung diskutiert wird (Farrer et al., 2001; Foroud et al., 2003; Khan et al., 2003). Aufgrund der enormen Größe des Parkin-Gens von 1,3 Mb ist es allerdings schwer alle Mutationen zu erfassen. Zudem könnten Mutationen in regulatorischen Bereichen übersehen worden sein.

Klinisch sind Parkin-assoziierte PD-Fälle durch einen juvenilen Krankheitsbeginn charakterisiert, da Patienten oft schon vor dem 40. Lebensjahr Symptome entwickeln (Klein et al., 2000). Generell ist ein gutes Ansprechen auf L-DOPA zu beobachten (Lohmann et al., 2003). Nur wenige Parkin-assoziierte PD-Fälle konnten bislang neuropathologisch untersucht werden. Diese zeigten jedoch einen weitgehenden Verlust von dopaminergen Neuronen und Gliose in der SNpc und in einem geringeren Umfang im *Locus coeruleus* (Mori et al., 1998; Takahashi et al., 1994; van de Warrenburg et al., 2001). Ursprünglich wurde beschrieben, dass Patienten mit Parkin-Mutationen

typischerweise keine *Lewy Bodies* aufweisen. Andererseits konnte Parkin in *Lewy Bodies* von Patienten mit sporadischer PD nachgewiesen werden, was zur Vermutung führte, dass funktional aktives Parkin essentiell für die Entwicklung von *Lewy Bodies* sei (Schlossmacher et al., 2002). In der Zwischenzeit wurden jedoch Parkin-assoziierte Fälle mit *Lewy Bodies* berichtet, so dass die neuropathologischen Veränderungen vermutlich vom Alter des Patienten und Art der Mutation abhängen könnten (Farrer et al., 2001; Pramstaller et al., 2005; Rawal et al., 2003). Interessanterweise zeichnen sich manche PD-Fälle, in denen Mutationen im LRRK2-Gen zu finden sind, ebenfalls durch fehlende *Lewy Bodies* aus, wodurch *Lewy Bodies* als klassische neuropathologische Charakteristika in Frage gestellt werden (Gaig et al., 2007).

1.3.2 Genetische und zellbiologische Charakteristika von Parkin

Das Parkin-Gen zählt mit seiner Länge von 1,3 Mb zu den größten Genen des menschlichen Genoms. Es besteht aus 12 Exons und sehr langen, bis zu 284 kb großen Introns. Es codiert für ein Protein mit einer Länge von 465 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 52 kDa (Kitada et al., 1998). Der Parkin-Locus befindet sich auf Chromosom 6q25.2-q27, innerhalb FRA6E, der dritthäufigsten *fragile site* in ovariellen Tumoren (Denison et al., 2003). Ob und welche Rolle Parkin in der Tumorentstehung spielt, ist derzeit noch unklar.

Parkin wird ubiquitär exprimiert und zeigt eine hohe Expression im Gehirn, im Herz, und der Skelettmuskulatur und in den Testes. Im Gehirn zeigt Parkin jedoch nicht in allen Regionen die gleiche Expressionsstärke. Erstaunlicherweise konnte gerade in der SNpc nur eine schwache Expression nachgewiesen werden (Kitada et al., 1998). Parkin ist hauptsächlich ein zytosolisches Protein (Shimura et al., 1999). Es konnte aber auch eine Assoziation mit dem transGolgi-Netzwerk (Kubo et al., 2001), mit dem Zytoskelett (Kubo et al., 2001), mit synaptischen Vesikel (Fallon et al., 2002; Kubo et al., 2001) und mit Mitochondrien (Darios et al., 2003; Kuroda et al., 2006; Stichel et al., 2000) gezeigt werden.

Das Parkin-Protein enthält mehrere strukturelle Domänen (Abb. 7). Am N-Terminus befindet sich eine *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne, am C-Terminus eine RING- (*really interesting new gene*) Box, die aus zwei RING-Fingern besteht, die durch eine cysteinreiche *in-between*-RING-Domäne (IBR) getrennt werden. Die UBL-Domäne weist

eine 62%ige Homologie zu Ubiquitin auf und scheint an der Substraterkennung beteiligt zu sein (Finney et al., 2003; Shimura et al., 2000). Die C-terminale RING-Box scheint für die Interaktion mit Substraten und E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen wichtig zu sein. Proteine, die eine derartige RING-Box aufweisen, zeigen typischerweise eine Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität, die das Anhängen von Ubiquitin-Resten an spezifische Substrate vermittelt (Joazeiro und Weissman, 2000).

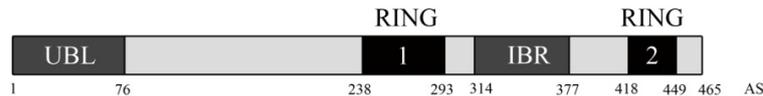


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Parkin-Proteins

Parkin ist ein 465 Aminosäuren langes Protein mit einer N-terminalen UBL (*Ubiquitin-like*)-Domäne und einer C-terminalen RING-Box: RING-Finger 1 (RING 1), RING-Finger 2 (RING 2) und der *in-between-RING* (IBR). Die Zahlen geben die jeweilige Position der Aminosäuren (AS) im Protein an.

Parkin wird nicht nur in Wirbeltieren wie Maus, Ratte und Menschen, sondern auch in wirbellosen Tieren wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* gefunden. Parkin ist in den verschiedenen Spezies hoch konserviert (Abb. 8). Zwischen murinem und humanem Parkin besteht eine 82%ige Übereinstimmung, die Homologie innerhalb der funktionellen Domänen ist noch höher.

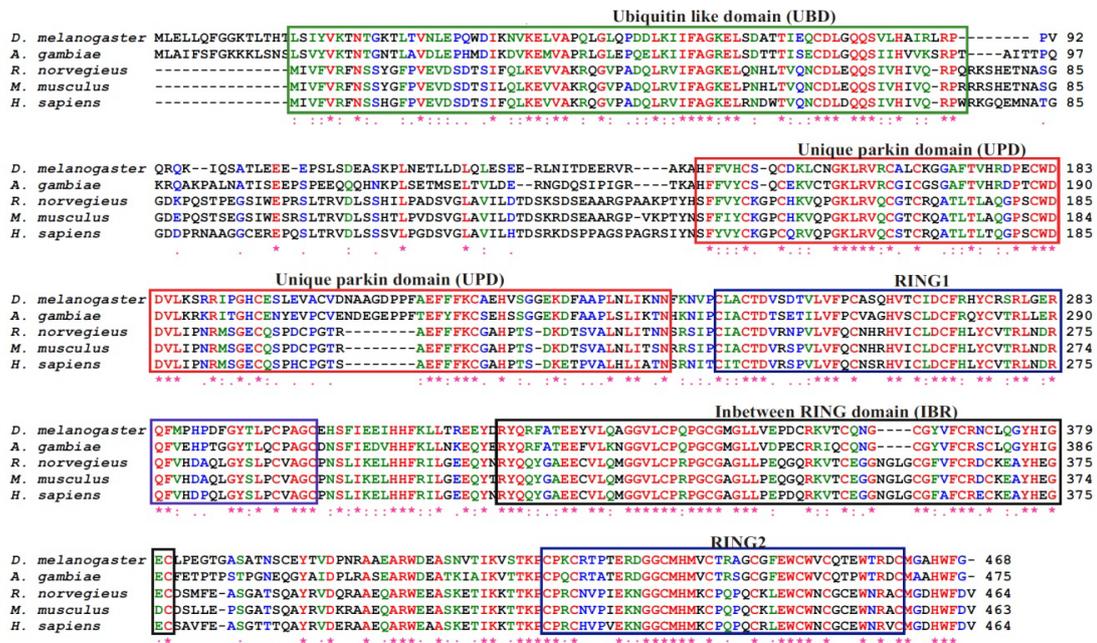


Abbildung 8: Aminosäuren-Sequenzvergleich von Parkin verschiedener Spezies

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

1.3.3 Parkin-Mutationen

Bis heute wurden über 100 verschiedene Parkin-Mutationen in Parkinson-Patienten weltweit beschrieben. Zu diesen zählen Punktmutationen wie *Missense*- oder *Nonsense*-Mutationen, aber auch größere Deletionen oder Neuankordnungen von Exons (Lucking et al., 2000). Mutationen betreffen die gesamte codierende Region von Parkin. Eine Anhäufung in den funktionellen Domänen ist jedoch zu beobachten, was auf eine wichtige Rolle dieser Domänen bei der Funktion von Parkin deutet. Genetische und biochemische Analysen zeigen, dass pathogene Mutationen zu einem Funktionsverlust von Parkin führen. So können Mutationen die katalytische Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität beeinträchtigen oder die Interaktion mit E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen oder anderen Proteinen beeinträchtigen (Chung et al., 2001; Hershko et al., 2000; Imai et al., 2000; Shimura et al., 2001; Zhang et al., 2000). Andererseits zeichnet sich die Mehrzahl der Parkin-Mutationen, insbesondere diejenigen, die den C-Terminus betreffen, durch Missfaltung und Aggregation aus, was ebenfalls zu einem Funktionsverlust führt (Cookson et al., 2003; Gu et al., 2003; Henn et al., 2005; Schlehe et al., 2008; Sriram et al., 2005; Wang et al., 2005a) (Wang et al., 2005b; Winklhofer et al., 2003b).

1.3.4 Putative Parkin-Substrate

Durch *Yeast-Two-Hybrid* oder Co-Immunopräzipitations-Studien wurden eine Vielzahl von Parkin-interagierenden Proteinen und Substraten identifiziert. Diese erfüllen unterschiedlichste Aufgaben in der Zelle und konnten somit bisher nicht ausreichend für das Verständnis der physiologischen Funktion von Parkin beitragen. Die Relevanz und Authentizität der Mehrzahl dieser Parkin-Substrate muss daher genauer untersucht werden. Aufgrund der RING-Box geht man davon aus, dass Parkin eine Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase ausübt. Neuere Daten zeigen, dass Ubiquitin neben der klassischen Rolle im proteasomalen Abbau auch regulatorische Funktionen ausübt (Winklhofer, 2007).

1.3.4.1 *Parkin-mediierte Ubiquitylierung für den proteasomalen Abbau*

In Übereinstimmung mit der postulierten Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase, konnten verschiedene E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme als Bindungspartner für Parkin identifiziert werden. Zu diesen zählen UbcH7 (Ubc, *Ubiquitin conjugating enzyme*) und

UbcH8 (Imai et al., 2000; Shimura et al., 2000; Shimura et al., 2001; Zhang et al., 2000), sowie die ER-assoziierten Enzyme Ubc6 und Ubc7 (Imai et al., 2001). Die E2/E3-Enzymkomplexe katalysieren die Ubiquitylierung über Lysin-48 (K48) und kennzeichnen so das Substrat für die proteasomale Degradierung.

Die identifizierten putativen Substrate sind an den unterschiedlichsten Prozessen in der Zelle beteiligt. Unter ihnen befinden sich Proteine mit vesikulärer und synaptischer Funktion wie CDCrel-1 (Zhang et al., 2000), CDCrel-2a (*cell division control-related protein*) (Choi et al., 2003), Synaptotagmin XI (Huynh et al., 2003), O-glykosyliertes α -Synuclein (α Sp22) (Shimura et al., 2001), Synphilin-1 (Chung et al., 2001) und der Dopamintransporter (DAT) (Jiang et al., 2004). Weiter zählen zu den möglichen Substraten Kontrollproteine des Zellzyklus wie Cyclin E (Staropoli et al., 2003), Proteine der Protein-Biosynthese wie p38/JTV-1 (Aminoacyl-tRNA Synthetase-Untereinheit) (Corti et al., 2003; Ko et al., 2005), Transkriptionsfaktoren wie FBP1 (*far upstream sequence element binding protein 1*) (Ko et al., 2006), Proteine des Zytoskeletts wie α/β -Tubulin (Ren et al., 2003), Proteine des nukleären Exports wie RanBP2 (Um et al., 2006) und Proteine der zellulären Signaltransduktion wie Pael-R (*Parkin associated endothelin-like receptor*) (Imai et al., 2001).

Die Assoziation von Parkin mit dem Proteasom und das Wissen, dass Parkin-Mutationen durch einen Funktionsverlust gekennzeichnet sind, führte zur Hypothese, dass die Akkumulation von Parkin-Substraten einen toxischen Effekt auf die Zelle hat und so in der Degeneration dopaminerger Neuronen resultiert.

Für manche dieser putativen Parkin-Substrate (α Sp22, Pael-R, Cyclin E, CDCrel-1, CDCrel-2a, FBP1, p38/JTV-1) konnte eine geringfügige Akkumulation in deren nicht-ubiquitylierten Formen in einigen Gehirnen von Parkin-assoziierten PD-Fällen beobachtet werden (Choi et al., 2003; Imai et al., 2001; Staropoli et al., 2003). Im Gehirn von Parkin-*Knock Out*-Mäusen konnte hingegen nur eine mögliche Akkumulation von FBP1 und p38/JTV-1 nachgewiesen werden (Ko et al., 2006; Ko et al., 2005).

1.3.4.2 *Parkin-medierte regulatorische Ubiquitylierung*

Ein Poly-Ubiquitylierung über Lysin-48 markiert Proteine für den proteasomalen Abbau. Mono-Ubiquitylierung und eine Verknüpfung über Lysin-63 ist jedoch für verschiedene

zellulären Funktionen wie Endozytose, DNA-Reparatur und zelluläre Signaltransduktion verantwortlich (Hicke, 2001).

Als weiterer Parkin-Interaktionspartner wurde das heterodimere E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym UbcH13/Uev1a nachgewiesen, das die Anheftung von Ubiquitin über Lysin-63 katalysieren kann (Doss-Pepe et al., 2005; Matsuda et al., 2006; McKenna et al., 2001). Neuere Studien zeigten, dass Parkin neben der konventionellen Ubiquitinylierung über Lysin-48 auch direkt die Ubiquitinylierung über Lysin-63 von Synphilin-1 katalysiert (Lim et al., 2005). Zudem konnte eine Parkin-medierte Mono-Ubiquitinylierung von PICK1, Eps-1p38/JTV-1 und Hsp70 beobachtet werden (Fallon et al., 2006; Fallon et al., 2002; Hampe et al., 2006; Moore et al., 2005a).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Parkin offensichtlich verschiedene Arten der Ubiquitin-Verknüpfung katalysieren kann. Welche Rolle der Parkin-medierten regulatorischen Ubiquitinylierung zukommt ist noch weitgehend unbekannt. Man könnte spekulieren, dass die toxische Akkumulation von Parkin-Substraten und der Verlust der regulatorischen E3-Ubiquitin-Ligase Funktion Ursache für den Zelltod seien.

1.3.4.3 *Weitere Parkin-interagierende Proteine*

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen E2-Enzymen und putativen Substraten konnte eine Reihe weiterer Proteine identifiziert werden, die mit Parkin interagieren. So wurde postuliert, dass Parkin ein funktioneller Bestandteil des Ligase-Komplex SCF (*Skp1-Cullin-F-box*) sei (Staropoli et al., 2003). Desweiteren konnte Parkin in einem Komplex mit den Chaperonen CHIP (*carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*) oder Hsp70 (*heat shock protein 70*) gefunden werden (Imai et al., 2002). Auch eine Interaktion mit dem Gerüstprotein CASK (*Ca²⁺-calmodulin-dependent serine protein kinase*) wurde berichtet, was zur Vermutung führt, dass Parkin Bestandteil eines postsynaptischen Komplexes ist (Fallon et al., 2002). Zu den weiteren Interaktionspartnern zählen Proteine des Zytoskeletts wie α/β -Tubulin (Ren et al., 2003), Aktin-Filamente (Huynh et al., 2000) und γ -Tubulin (Zhao et al., 2003), sowie HDAC6 (*histone deacetylase 6*) (Jiang et al., 2008) und proteasomale Proteine wie Rpn10 α 4. Auch für Parkinson-assoziierte Proteine wie LRRK2 (Smith et al., 2005), DJ-1 (Moore et al., 2005b) PINK1 (Moore, 2006; Shiba et al., 2009; Um et al., 2009) und PACRG (Imai et al., 2003) wurde eine Interaktion mit Parkin nachgewiesen.

1.3.5 Parkin-defiziente Tier-Modelle

Aufgrund der Vielzahl der Parkin-Mutationen in PD-Patienten wird angenommen, dass der Verlust der Parkin-Funktion zu der PD-typischen Neurodegeneration führt. Um die Konsequenz des Funktionsverlustes von Parkin zu untersuchen, wurden verschiedene Parkin-defiziente Tier-Modelle generiert. Im Maus-Modell wurde versucht, die Situation von PD-Patienten mit Parkin-Deletionen zu imitieren. Sieben Parkin-defiziente Maus-Modelle wurden entwickelt, in denen eine Deletion von Exon 3 (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003; Kitao et al., 2007; Stichel et al., 2007), welche die häufigste Parkin-Mutation in PD-Patienten darstellt, oder Exon 2 (UBL) (Sato et al., 2006) (Perez und Palmiter, 2005) bzw. Exon 7 (erster RING-Finger) (Von Coelln et al., 2004) erzeugt wurde (Referenzen und Auflistung in Tab. 2). Diese Deletionen führten allesamt zu einem Verlust des Parkin-Proteins. Entgegen der Erwartung zeigte keines dieser Maus-Modelle einen signifikanten Phänotyp (Tab. 2). Bei einigen Modellen konnten leichte und teilweise gegenläufige Veränderungen der dopaminergen Neurotransmission und des Dopamin-Metabolismus festgestellt werden. Verhaltensänderungen, wie reduziertes Erkundungs- und Angst-Verhalten ließen eine nigrostratale Dysfunktion vermuten (Modell 1 bis 6, Tab. 2). Diese Dysfunktion wurde jedoch nicht von einer Degeneration dopaminergener Neuronen in der SNpc, dem pathologischen Charakteristikum der PD, begleitet. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte zwar einen 35%igen Verlust TH-positiver Neuronen in der SNpc in gealterten Mäusen (Modell 2, Tab. 2). Erstaunlicherweise konnte jedoch keine Veränderung im Projektionsziel, dem Striatum, gezeigt werden (Rodriguez-Navarro et al., 2007). Eine offensichtlichere Neurodegeneration konnte in einem weiteren Maus-Modell (Modell 5, Tab. 2) gezeigt werden. Der neuronale Verlust betraf jedoch nicht die dopaminergen Neuronen der SNpc, sondern die catecholaminergen Neuronen im *Locus coeruleus*, eine Region die ebenfalls in der Parkinson-Erkrankung betroffen sein kann (Von Coelln et al., 2004).

Eine Analyse des Proteoms des ventralen Mesencephalons des Maus-Modells 1 zeigte ein vermindertes Vorkommen von Proteinen, die eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Funktion (Komplex I und IV der Atmungskette) und im Management von oxidativem Stress spielen (Palacino et al., 2004). Eine Proteom-Analyse eines anderen Maus-Modells (Modell 2, Tab. 2) zeigte zwar auch Veränderungen im Vorkommen von Proteinen des Energie-Haushaltes, konnte jedoch die Daten von Palacino und Mitarbeiter nicht bestätigen (Periquet et al., 2005). Desweiteren konnte, mit einer fraglichen Ausnahme eine

Akkumulation von p38/JTV-1 in Maus-Modell 5 (Tab. 2), keine signifikante Akkumulation von Parkin-Substraten festgestellt werden (Ko et al., 2005).

Keine der generierten Parkin-defizienten Mäuse konnte die Pathophysiologie der Parkinson-Erkrankung rekapitulieren. Vermutlich sind zusätzliche toxische Ereignisse nötig, um eine Neurodegeneration in der Maus zu induzieren. In der Tat zeigten einige dieser Parkin-*Knock Out*-Maus-Modelle eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber verschiedenen Stressoren (Casarejos et al., 2006; Frank-Cannon et al., 2008; Kitao et al., 2007; Mena et al., 2009; Rawal et al., 2009; Serrano et al., 2005; Solano et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnte aber auch überraschenderweise eine erhöhte Resistenz gegenüber manchen Stressoren beobachtet werden, was vermutlich auf kompensatorische Mechanismen zurückzuführen ist (Casarejos et al., 2009; Perez et al., 2005; Solano et al., 2006; Thomas et al., 2007; Zhu et al., 2007).

Aufgrund der diversen und teilweise kontroversen Daten aus den verschiedenen Parkin-defizienten Maus-Modellen ist es nicht möglich, Parkin eine eindeutige pathophysiologische oder physiologische Rolle zuzuordnen. Zur Aufklärung der Parkin-Funktion sind daher neue Tier-Modelle von entscheidender Bedeutung.

Im Gegensatz zur Maus führte der Verlust von Parkin in der Fliege (*Drosophila melanogaster*) zu einem deutlichen Phänotyp. Neben einer verkürzten Lebensdauer, Sterilität und motorischen Defiziten waren diese Fliegen durch apoptotische Degeneration der Flugmuskulatur gekennzeichnet. Für diesen Phänotyp wurde eine mitochondriale Dysfunktion verantwortlich gemacht, was durch das Auftreten morphologischer Veränderung der Mitochondrien unterstrichen wurde (Cha et al., 2005; Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004). Die Untersuchungen dopaminergener Neuronen in den *Drosophila*-Modellen führte jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen: Von einer verringerten Immunoreaktivität dopaminergener Marker (Cha et al., 2005), bis zu einer Degeneration dopaminergener Neuronen in einem spezifischen Cluster (40%ige Reduktion) (Whitworth et al., 2005), konnte keine Degeneration dopaminergener Neuronen beobachtet werden (Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004).

Parkin^{-/-} Maus- Modelle	Phänotyp	Referenz
Modell 1 (Exon 3- Deletion)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensfähig, fertil, Körpergewicht ↓ • Gehirn-Morphologie und Integrität unverändert • Veränderungen im Dopamin-Metabolismus • ↓ Verhalten und motorische Aktivität 	(Goldberg et al., 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Proteine involviert in der mitochondrialen Funktion und oxidativem Stress-Management 	(Palacino et al., 2004)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen CCCP, Rotenon und Aβ (primäre Muskelzellen) 	(Rosen et al., 2006)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen Neuroinflammation 	(Frank-Cannon et al., 2008)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen mGluII-Rezeptor-Aktivierung 	(Martella et al., 2009)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ synaptische Plastizität 	(Kitada et al., 2009)
Modell 2 (Exon 3- Deletion)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensfähig, fertil, Körpergewicht und Temperatur ↓ • Gehirn-Morphologie und Integrität unverändert (in bis 24 Monaten alten Tieren) • ↓ Verhalten und motorische Aktivität 	(Itier et al., 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ 35%iger Verlust TH-positiver Neuronen in der SNpc (ab 24 Monaten alten Tieren) 	(Rodriguez-Navarro et al., 2007)
	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderungen im Dopamin-Metabolismus 	(Casarejos et al., 2005; Itier et al., 2003)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Proteine des Energie-Metabolismus 	(Periquet et al., 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen Rotenon (primäre Neuronen) 	(Casarejos et al., 2006)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen Wnt3-induzierter Zelltod (primäre Neuronen) 	(Rawal et al., 2009)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen H₂O₂ (primäre Gliazellen) 	(Mena et al., 2009; Solano et al., 2008)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen Calcium-Kanal-Antagonisten (primäre Neuronen) 	(Serrano et al., 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Sensitivität gegen L-DOPA-induzierte Toxizität (primäre Neuronen) 	(Casarejos et al., 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Resistenz gegen Toxizität, ausgelöst durch proteasomale Inhibition (primäre Neuronen) 	(Casarejos et al., 2009)
<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Resistenz gegen ROS (primäre Neuronen) 	(Solano et al., 2006)	
Modell 3 (Exon 3- Deletion)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensfähig, fertil, normales Körpergewicht • Gehirn-Morphologie und Integrität unverändert • Veränderungen im Dopamin-Metabolismus • Normale motorische Aktivität, sonstiges Verhalten ↓ 	(Stichel et al., 2007; Zhu et al., 2007)
	<ul style="list-style-type: none"> • Keine erhöhte Sensitivität gegen MPTP 	(Zhu et al., 2007)
Modell 4 (Exon 3- Deletion)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensfähig, fertil, Körpergewicht ↓ • Gehirn-Morphologie und Integrität unverändert • Veränderungen im Dopamin-Metabolismus • ↑ Vulnerabilität gegen Pael-R-induzierte Toxizität (virale Injektion in das Striatum) 	(Kitao et al., 2007)

Parkin^{-/-} Maus- Modelle	Phänotyp	Referenz
Modell 5 (Exon 7- Deletion)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensfähig, fertil • Morphologie und Integrität der SNpc und Striatum unverändert • ↓ 17%iger Verlust catecholaminerger Neuronen im <i>Locus coeruleus</i> • Keine Veränderungen im Dopamin-Metabolismus • Verhaltensänderungen 	(Von Coelln et al., 2004)
	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Akkumulation des Parkin-Substrats p38/JTV-1 	(Ko et al., 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • Keine erhöhte Vulnerabilität gegen MPTP 	(Thomas et al., 2007)
Modell 6 (Exon 2- Deletion)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensfähig, fertil • Gehirn-Morphologie und Integrität unverändert • Veränderungen im Dopamin-Metabolismus • Verhalten und motorische Aktivität unverändert 	(Sato et al., 2006)
Modell 7 (Exon 2- Deletion)	<ul style="list-style-type: none"> • Lebensfähig, fertil, Körpergewicht ↓ • Gehirn-Morphologie und Integrität unverändert • Dopamin-Metabolismus unverändert • Verhalten und motorische Aktivität unverändert 	(Perez und Palmiter, 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • Keine erhöhte Vulnerabilität gegen 6-OHDA 	(Perez et al., 2005)
	<ul style="list-style-type: none"> • Elektrophysiologische Veränderungen 	(Hanson et al., 2010)

Tabelle 2: Parkin-defiziente Maus-Modelle

Sieben verschiedene Parkin-defiziente Maus-Modelle (Parkin^{-/-}) wurden generiert, indem verschiedene Exons im Parkin-Gen deletiert wurden. Die Deletion von Exon 3 ist die häufigste pathogene Mutation, die Deletion von Exon 2 betrifft die UBL-Domäne und die Deletion von Exon 7 betrifft den ersten RING-Finger. ↑ (Erhöhung), ↓ (Reduktion).

1.3.6 Parkin besitzt ein neuroprotektives Potential

In verschiedenen Studien wurde ein neuroprotektives Potential von Parkin beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass Parkin gegenüber einem außerordentlich großen Spektrum von Stressoren und toxischen Substanzen eine schützende Funktion ausübt. Parkin ist in der Lage, der Apoptose entgegen zu wirken, die z.B. durch MPTP, 6-OHDA, Rotenon (Hyun et al., 2005; Manfredsson et al., 2007; Paterna et al., 2007), Kainat (Staropoli et al., 2003), ER-Stress (Imai et al., 2000), oxidativem Stress (Hyun et al., 2005), proteasomale Inhibition (Muqit et al., 2004; Petrucelli et al., 2002) oder Dopamin (Jiang et al., 2004) ausgelöst wird (Tab. 3). Auch gegen die toxischen Auswirkungen einer Überexpression von putativen Parkin-Substraten oder anderen Proteinen ist Parkin protektiv (Tab. 3). Die meisten der beschriebenen Analysen wurden in Zellsystemen wie z.B. in etablierten Zelllinien oder in primären Zellen, durchgeführt. Nur wenige *in vivo*

Modelle stehen derzeit zur Verfügung, um das protektive Potential im Kontext eines ganzen Organismus zu analysieren. In *Drosophila* konnte eine Überexpression von Parkin der Toxizität von α -Synuclein, Pael-R und einer LRRK2-Mutante entgegenwirken (Ng et al., 2009; Yang et al., 2003). In der Maus bzw. in der Ratte verhinderte eine virale Überexpression von Parkin die durch α -Synuclein oder Tau verursachte dopaminerge Degeneration und schützte vor mitochondrialen Toxinen (Klein et al., 2006; Manfredsson et al., 2007; Vercammen et al., 2006).

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint Parkin eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität unter Stressbedingungen zu spielen. Der Mechanismus, der sich hinter dem breiten neuroprotektiven Potential von Parkin verbirgt, ist jedoch bislang nicht bekannt. Im Einklang mit dem protektiven Potential von Parkin konnte eine Induktion der Parkin-Expression unter verschiedenen Stressbedingungen, wie ER-Stress (Imai et al., 2000; Ledesma et al., 2002; Oda et al., 2008; Wang et al., 2007b), Behandlung mit Rotenon (Koch et al., 2009), H₂O₂ (Tan et al., 2005), Dopamin (Yang et al., 2006b), Exzitotoxizität (Henn et al., 2007) oder MPTP (Hyun et al., 2005; Yang et al., 2006b) nachgewiesen werden.

Parkin ist protektiv gegen	Model-System	Referenz
Mitochondriale Toxine: (MPTP, 6-OHDA und Rotenon)	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (NT-2 und SK-NMC) • Maus-Modell (viraler Gentransfer) • Ratten-Modell (viraler Gentransfer) 	(Hyun et al., 2005) (Paterna et al., 2007) (Manfredsson et al., 2007; Vercammen et al., 2006)
Exzitotoxizität (Kainat)	<ul style="list-style-type: none"> • Primäre murine Neuronen (virale Überexpression) 	(Staropoli et al., 2003)
ER-Stress	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (SH-SY5Y) 	(Imai et al., 2000)
Proteasomale Inhibition	<ul style="list-style-type: none"> • Primäre murine Neuronen (virale Überexpression) • Zellkultur (SH-S5Y) 	(Petrucci et al., 2002) (Muqit et al., 2004)
Ceramid-induzierte Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (PC12) 	(Darios et al., 2003)
Mangan-induzierte Toxizität	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (SH-SY5Y) 	(Higashi et al., 2004)
Dopamin-induzierte Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (SH-SY5Y) 	(Jiang et al., 2004)
Oxidativer Stress (H₂O₂)	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (NT-2 und SK-NMC) 	(Hyun et al., 2005)
Toxizität durch Überexpression von Parkin-Substraten oder anderen Proteinen:		
Pael-R	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (SH-SY5Y) • <i>Drosophila</i>-Modell 	(Imai et al., 2001) (Yang et al., 2003)
p38/JTV-1	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (SH-SY5Y und SK-NMC) 	(Corti et al., 2003; Ko et al., 2005)

Parkin ist protektiv gegen	Model-System	Referenz
α -Synuclein	<ul style="list-style-type: none"> • Primäre Neuronen • Ratten-Modell (viraler Gentransfer) • Drosophila-Modell 	(Petrucci et al., 2002) (Lo Bianco et al., 2004) (Yang et al., 2003)
LRRR2 (G2019S)	<ul style="list-style-type: none"> • Drosophila-Modell 	(Ng et al., 2009)
Tau	<ul style="list-style-type: none"> • Ratten-Modell 	(Klein et al., 2006)
A β	<ul style="list-style-type: none"> • Primäre Muskel-Zellen • Zellkultur (M17, viraler Gentransfer) • Zellkultur (SH-SY5Y) • Primäre Neuronen 	(Rosen et al., 2006) (Burns et al., 2009) (Rosen et al., 2010)
Ataxin-2	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (PC12) 	(Huynh et al., 2007)
verlängertes Polyglutamin-Ataxin-3-Fragment	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkultur (N18) 	(Tsai et al., 2003)

Tabelle 3: Das neuroprotektives Potential von Parkin

1.4 DAS PARKIN CO-REGULIERTE GEN PACRG

2003 konnte ein neues Transkript identifiziert werden, das 204 bp oberhalb des Parkin-Transkriptionsstartes in einer *antisense* Orientierung initiiert wird. Dem 204 bp großen Abschnitt zwischen diesen beiden Genen konnte eine bi-direktionale Promotoraktivität zugeordnet werden (Abb. 9). Daher wurde das neue Gen Parkin Co-reguliertes Gen (PACRG) genannt (West et al., 2003).

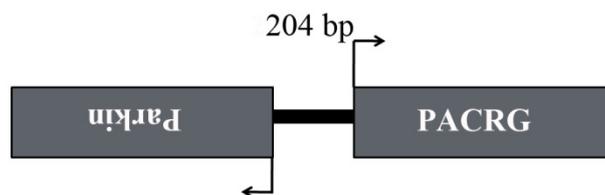


Abbildung 9: Schematische Darstellung des genomischen Locus von Parkin und PACRG

Das PACRG-Gen befindet sich in einer *head to head* Anordnung zu Parkin, wird jedoch von dem gegenüberliegenden DNA Strang kodiert. Beide Gene teilen sich einen 204 bp langen bi-direktionalen Promotor.

Das PACRG-Gen enthält 5 Exons mit einem offenen Leserahmen von 774 Nukleotiden. PACRG zeigt ein überlappendes Expressionsmuster mit Parkin (Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas). Zusätzlich wurde PACRG in Geweben mit niedriger Parkin-Expression wie Lunge und Leber nachgewiesen (Brody et al., 2008; West

et al., 2003). Innerhalb der Metazoen ist PACRG hoch-konserviert, die spezielle Anordnung von Parkin und PACRG auf einem Chromosom ist jedoch nur in Vertebraten aufzufinden. Der 204 bp lange Promotorbereich, den sich Parkin und PACRG teilen, enthält mehrere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie SP1, AP1/CREB, NFAT, AP-4 und N-Myc/E-box (West et al., 2003). Zusätzlich enthält der Promotor mehrere CpG-Inseln, jedoch keine TATA-Box, was für Promotoren von Haushaltsgenen typisch ist (West et al., 2001). Über die Funktion von PACRG ist bisher wenig bekannt. *In silico* Analysen zeigten keine funktionellen Domänen in der codierenden Sequenz von PACRG (West et al., 2003). Erste Hinweise der Funktion von PACRG lieferte das sogenannte *Quaking^{viable}* Maus-Modell. Diese Maus weist eine spontane Deletion von 1 Mb auf Chromosom 17 auf, die das komplette PACRG-Gen, die ersten 5 Exons des Parkin-Gens sowie die Promotor-Region des Quaking-Gens betrifft (Lorenzetti et al., 2004a). Neben einer schwerwiegenden Demyelinisierung zeigten diese Mäuse einen neurologischen Phänotyp, der durch Tremor und Anfälle gekennzeichnet ist. Zusätzlich weisen diese Mäuse einen Defekt in der Spermiogenese auf, welcher durch transgene PACRG-Expression in den Testes komplementiert werden konnte (Lorenzetti et al., 2004b). Für die PACRG-Orthologen in Protozoen konnte eine Lokalisation im Axonem der Cilien festgestellt werden, was auf eine Rolle in der Formation der Mikrotubuli-Dupletts weist (Dawe et al., 2005; Ikeda et al., 2007). In der Literatur sind bereits bi-direktionale Promotoren beschrieben. Gene mit einem gemeinsamen Promotor zeigen häufig ähnliche Funktionen und können auf die gleichen Signalwege einwirken. Die Tatsache, dass der Verlust von Parkin zur autosomal rezessiven Parkinson-Erkrankung führt, lässt vermuten, dass auch PACRG eine Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielen könnte. Interessanterweise konnte PACRG in *Lewy Bodies* und in glialen zytoplasmatischen Einschlüssen von Patienten mit Multisystematrophie (MSA) detektiert werden (Taylor et al., 2007). Eine Studie mit 112 Parkinson-Patienten zeigte zwar Polymorphismen im PACRG-Gen, es konnte aber keine signifikante Verbindung zur Erkrankung hergestellt werden (Deng et al., 2005b). Weitere Untersuchungen sind nötig, um die physiologische Funktion von PACRG aufzuklären.

1.5 DIE PRION-ERKRANKUNGEN

Prion-Erkrankungen sind tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen, die bei Menschen und Tieren auftreten. Beim Menschen können Prion-Erkrankungen hereditärer, spontaner, aber auch infektiöser Natur sein. Aufgrund der Übertragbarkeit und der typischen Pathologie, einer schwammartigen Durchlöcherung des Gehirns, werden Prion-Erkrankungen unter dem Begriff „Transmissible Spongiforme Enzephalopathien“ (TSE) zusammengefasst (Collinge, 2001; Prusiner, 1998). Diese Übertragbarkeit der Erkrankung ist ein einzigartiges Merkmal, das Prion-Erkrankungen gegenüber anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson-, Huntington- oder Alzheimer-Erkrankung abgrenzt. Zu den ersten Symptomen der Erkrankung zählen Seh-, Sprach- und Bewegungsstörungen, gefolgt von Gedächtnisstörungen. Im progressiven Verlauf führt die neurale Degeneration unweigerlich zum Tod.

Charakteristisch für Prion-Erkrankungen ist die Konversion des zellulären, auf der Zelloberfläche lokalisierten Prion-Proteins (PrP^{C}), in eine abnormal gefaltete, die sogenannte *Scrapie*-Form (PrP^{Sc}). Das fehlgefaltete Konformer PrP^{Sc} führt im Gehirn zu Detergenz-unlöslichen, Proteinase K-resistenten Ablagerungen (Caughey, 1991; Gasset et al., 1993; Pan et al., 1993). PrP^{Sc} ist der Hauptbestandteil der infektiösen Partikel (Prionen) (Appel et al., 1999; Klein et al., 1998), von dem zunächst angenommen wurde, dass es sowohl für die Infektiosität als auch für die Neurodegeneration verantwortlich ist. Neuere Studien zeigten aber, dass die Infektiosität und Neurodegeneration zwei voneinander abgrenzbare Prozesse darstellen können. Verschiedene Maus-Modelle zeigten, dass PrP^{Sc} nur in Anwesenheit des zellulären Prion-Proteins PrP^{C} in Neuronen zur Degeneration führt. PrP^{C} -defiziente Mäuse zeigen eine vollständige Resistenz gegenüber einer Infektion mit PrP^{Sc} und können keine Prionen replizieren (Bueler et al., 1993; Mallucci et al., 2003; Sailer et al., 1994). Unterstützt wird diese These durch Transplantations-Experimente. Dabei wurde in das Gehirn PrP^{C} -defizienter Mäuse Gehirnbereiche aus Wildtyp-Mäusen transplantiert. Nach Inokulation dieser Mäuse mit Prionen konnte eine deutliche Abgrenzung der neuropathologischen Veränderungen auf die transplantierten Bereiche, die eine PrP^{C} -Expression zeigten, beobachtet werden (Brandner et al., 1996). Die genauen Mechanismen, die zur Neurodegeneration führen, sind allerdings weitgehend unbekannt. Die Suszeptibilität von Mäusen für Prion-Infektionen machen diese zu idealen Modellen, um die Mechanismen einer Neurodegeneration zu analysieren und potentielle protektive Faktoren zu identifizieren.

2 ERGEBNISSE

2.1 VERSCHIEDENE STRESSOREN INDUZIEREN EINE ERHÖHUNG DER PARKIN-MRNA

Frühere Studien der Arbeitsgruppe zeigten eine Hochregulation der Parkin-Expression als Folge von Stressbehandlungen, die mit der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht werden. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von Komplex I der Atmungskette und Exzitotoxizität zu einer Induktion der Parkin-Expression führt (Henn et al., 2007). Um einen tieferen Einblick in die Funktion von Parkin in der zellulären Stress-Antwort zu erhalten, wurden diese Studien erweitert.

2.1.1 Hochregulation von Parkin als Antwort der gestörten mitochondrialen Integrität

Bereits seit längerer Zeit verdichten sich Hinweise, dass eine mitochondriale Dysfunktion eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung spielt. Neuere Studien zeigten, dass die Genprodukte Parkinson-assoziiierter Gene direkt oder indirekt auf die mitochondriale Integrität einwirken können (Winklhofer und Haass, 2010). Um den Einfluss mitochondrialer Integrität auf die Transkription endogenen Parkins zu analysieren, wurden SH-SH5Y-Zellen mit dem Entkoppler CCCP (*carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*) behandelt. Die Behandlung mit CCCP führt zu einer Reduktion des mitochondrialen transmembranen Protonengradienten durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Die Zellen wurden 5 h bis 36 h mit CCCP behandelt, RNA isoliert und die Parkin-spezifische RNA mittels quantitativer *Real Time* PCR analysiert. Die Behandlung mit CCCP führte zu einem bis zu 4-fachen Anstieg Parkin-spezifischer mRNA, dessen Maximum nach 24 h erreicht war (Abb. 10).

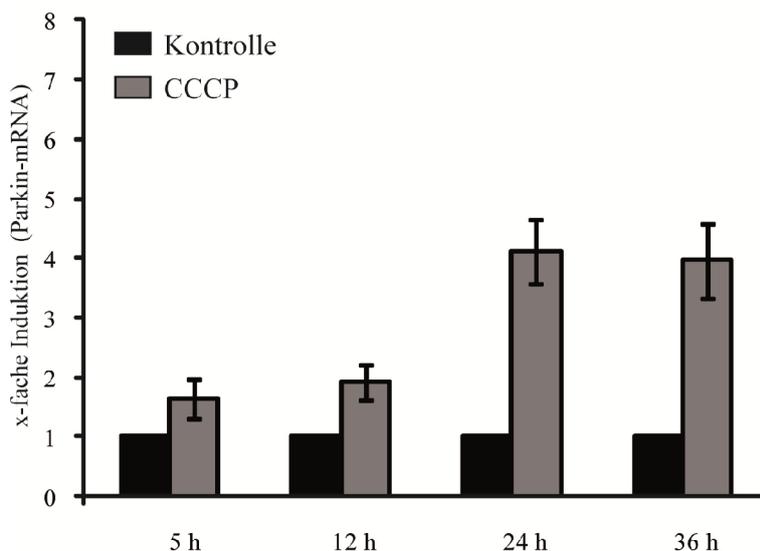


Abbildung 10: Hochregulation endogener Parkin-mRNA durch CCCP

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 10 μM CCCP oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel für die angegebene Dauer inkubiert und anschließend Gesamt-RNA isoliert. Der Gehalt Parkin-spezifischer mRNA wurde mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge Parkin-spezifischer mRNA der behandelten Zellen in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Gemessen wurden jeweils Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

2.1.2 Hochregulation von Parkin unter PrP^{Sc}-induzierter Toxizität

Neben der Parkinson-Erkrankung führen unter anderem Prion-Erkrankungen zur Neurodegeneration (Collinge, 2001; Prusiner, 1998). Die Mehrzahl der Prion-Erkrankungen zeichnet sich durch die Bildung des missgefalteten Konformers PrP^{Sc} und durch infektiöse Prionen aus. Diese Infektiosität ist eine einzigartige Eigenschaft der Prion-Erkrankungen, in der sie sich von anderen neurodegenerativen Erkrankungen unterscheiden (Prusiner, 1982; Prusiner et al., 1981). Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Hochregulation der Parkin-spezifischen mRNA eine generelle Antwort auf Toxizität darstellt, wurde der Gehalt Parkin-spezifischer mRNA unter PrP^{Sc}-vermittelter Toxizität untersucht. Hierzu wurde ein Zellkultur-Modell verwendet, welches die Analyse PrP^{Sc}-induzierter Toxizität ermöglicht. Dieser Co-Kultivierungs-Assay wurde in unserer Arbeitsgruppe (von Angelika Rambold) etabliert und beruht auf der Kultivierung von SH-SY5Y-Zellen zusammen mit PrP^{Sc}/Prionen-infizierten (ScN2a) oder uninfizierten (N2a) murinen Neuroblastomzellen. SH-SY5Y-Zellen wurden auf Deckplättchen ausgesät und anschließend in Zellkulturschalen umgesetzt, in denen ScN2a- oder als Kontrolle N2a-Zellen wuchsen, und für 16 h bis 40 h co-kultiviert (Abb. 11A). Die Induktion der Toxizität in den SH-SY5Y-Zellen beruht auf der aktiven Freisetzung der PrP^{Sc}/Prionen

mittels Exosomen in das extrazelluläre Medium (Alais et al., 2008; Fevrier et al., 2004; Vella et al., 2007). Die Menge Parkin-spezifischer mRNA der co-kultivierten SH-SY5Y-Zellen wurde mittels quantitativer *Real Time* PCR bestimmt. Da dieser Versuch von vielen Faktoren, wie der Menge an sekretierten PrP^{Sc}/Prionen, aber auch von der Menge des zellulären Prion-Proteins PrP^C in den SH-SY5Y-Zellen abhängt (Rambold et al., 2008), zeigte sich eine große Varianz in der Menge Parkin-spezifischer mRNA. Es konnte jedoch eine deutliche Tendenz zu einer bis zu 4-fachen Induktion der Parkin-mRNA nach 40-stündiger Co-Kultivierung mit ScN2a beobachtet werden (Abb. 11B).

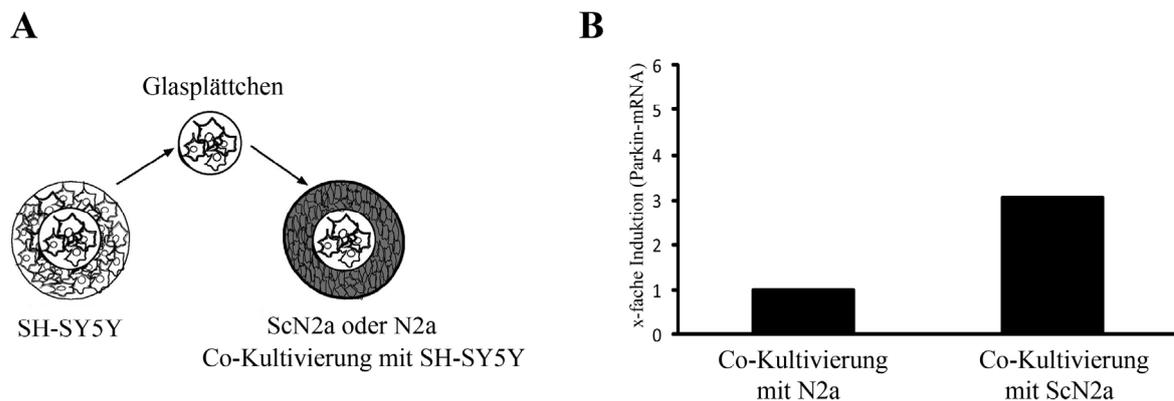


Abbildung 11: Hochregulation von endogenem Parkin im Co-Kultivierungs-Assay

(A) Schematische Darstellung des Co-Kultivierungs-Assays. SH-SY5Y-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und nach 24 h in Zellkulturschalen mit ScN2a- oder mit N2a-Zellen umgesetzt. (Abbildung freundlicherweise von Angelika Rambold zur Verfügung gestellt.) (B) Nach 40-stündiger Co-Kultivierung wurde aus den SH-SY5Y-Zellen Gesamt-RNA isoliert und mittels quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge Parkin-spezifischer mRNA der in ScN2a co-kultivierten Zellen in Bezug auf die in N2a co-kultivierten Zellen (gleich 1 gesetzt). Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Gemessen wurden jeweils Triplikate aus zwei unabhängigen Versuchen.

2.1.3 Hochregulation von Parkin als Antwort auf ER Stress

Frühere Studien zeigten eine Induktion der Parkin-Expression durch Stressoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Imai et al., 2000; Ledesma et al., 2002; Wang et al., 2007b). Um diese Beobachtungen zu verifizieren und zu erweitern wurden SH-SY5Y-Zellen mit dem Inhibitor der ER-Ca²⁺-ATPase Thapsigargin behandelt. Der Effekt dieses Stressors auf endogene Parkin-Expression wurde mittels quantitativer *Real Time* PCR analysiert. Die Behandlung mit dem ER-Stressor führte bereits nach 8 h zu einer erhöhten Menge an Parkin-spezifischer RNA. Nach 12 h wurde ein Maximum der Induktion (ca. 5-fach) erreicht (Abb. 12).

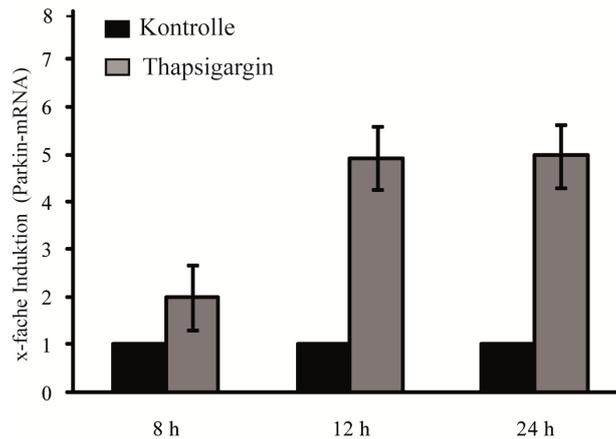


Abbildung 12: Hochregulation endogener Parkin-mRNA durch Thapsigargin

SH-SY5Y-Zellen wurden mit 10 μM Thapsigargin oder als Kontrolle mit dem Lösungsmittel für die angegebene Dauer inkubiert und anschließend daraus Gesamt-RNA isoliert. Der Gehalt Parkin-spezifischer mRNA wurde mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge Parkin-spezifischer mRNA der behandelten Zellen in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Gemessen wurden jeweils Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit ER-Stressoren auch in primären Zellen zu einem Anstieg Parkin-spezifischer RNA führt. Hierzu wurden *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) aus Mäusen der Inzuchtlinie C57BL/6J präpariert und mit Thapsigargin, ein Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase oder mit Tunicamycin, ein Inhibitor der N-Glycosylierung, behandelt (Abb. 13).

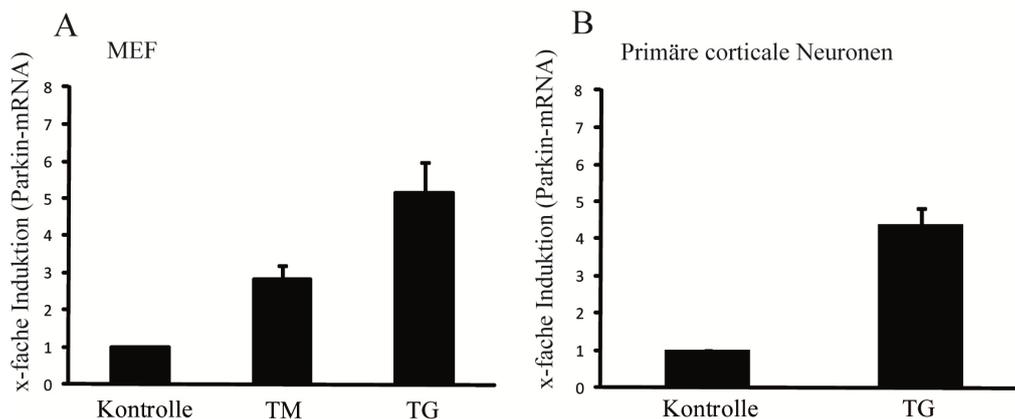


Abbildung 13: Hochregulation endogener Parkin-mRNA in primären Zellen

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) aus Mäusen der Inzuchtlinie C57BL/6J (A) oder primäre corticale Neuronen von 14.5 dpc Embryonen der Inzuchtlinie FvB (B) wurden mit 1 μM Thapsigargin (TG) bzw. 2 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (TM) für 14 h inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge Parkin-spezifischer mRNA der behandelten Zellen in Bezug auf unbehandelte Zellen (Kontrollen), die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Gemessen wurden jeweils Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Beide Stressoren führten zu einer Hochregulation Parkin-spezifischer RNA, wobei Thapsigargin eine stärkere Induktion zeigte (Abb. 13A). Zusätzlich konnte auch in primären Neuronen, die aus dem Cortex von 14.5 dpc (*days post coitum*) Embryonen isoliert wurden, eine ca. 4-fach höhere Menge an Parkin-spezifischer mRNA nach Thapsigargin-Behandlung nachgewiesen werden (Abb. 13B).

2.2 PARKIN IST EIN *TARGET* DER *UNFOLDED PROTEIN RESPONSE* (UPR)

In den vorangegangenen Experimenten wurde eine deutliche Erhöhung Parkin-spezifischer RNA als Antwort der Zelle auf verschiedene Stressoren demonstriert. Diese erhöhten mRNA-Mengen könnten entweder aus einer Erhöhung der RNA-Stabilität, oder aus einer erhöhten transkriptionellen Regulation resultieren. Im Folgenden wurde daher der Parkin-Promotor genauer untersucht.

2.2.1 Der Parkin-Promotor enthält eine putative ATF4-Bindestelle

Die genauere Analyse des Parkin-Promotors ergab eine putative Bindestelle für Transkriptionsfaktoren der CREB/AP1-Familie (West et al., 2003), die eine hohe Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz des Transkriptionsfaktors ATF4 (*activating transcription factor 4*) aufweist (Abb. 14A). Der Transkriptionsfaktor ATF4 wird durch den PERK (*protein kinase like ER kinase*)-Signalweg der UPR (*Unfolded Protein Response*) aktiviert. Die UPR ist eine Antwort der Zelle auf ER-Stress, die das Ziel hat, die normale Funktion der Zelle wiederherzustellen. Dies wird zum einen durch ein Anhalten der generellen Translation von Proteinen, zum anderen aber auch durch Aktivierung von Signalwegen erreicht, die zu einer erhöhten Produktion von Chaperonen führen. Zu den Genen, die unter ER-Stress transkribiert und translatiert werden, zählt ATF4 (Ron und Walter, 2007). Um zu untersuchen, ob diese putative ATF4-Bindestelle im Parkin-Promotor für die Hochregulation von Parkin unter ER-Stress verantwortlich ist, wurden Luziferase-Aktivitätstests durchgeführt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen entweder mit einem Luziferase-Konstrukt, das eine 3-fache Wiederholung der putativen ATF4-Bindestelle des Parkin-Promotors, bzw. eine bestätigte ATF4-Bindestelle des IGFBP-

(*Insulin-like Growth Factor Binding Protein*) Promotors enthält, transfiziert. Anschließende Luziferase-Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass ER-Stress beide Konstrukte in gleichem Maße aktivieren konnte (Abb. 14B). (Die Klonierung und Reporteranalysen wurden freundlicherweise von Lena Bouman durchgeführt).

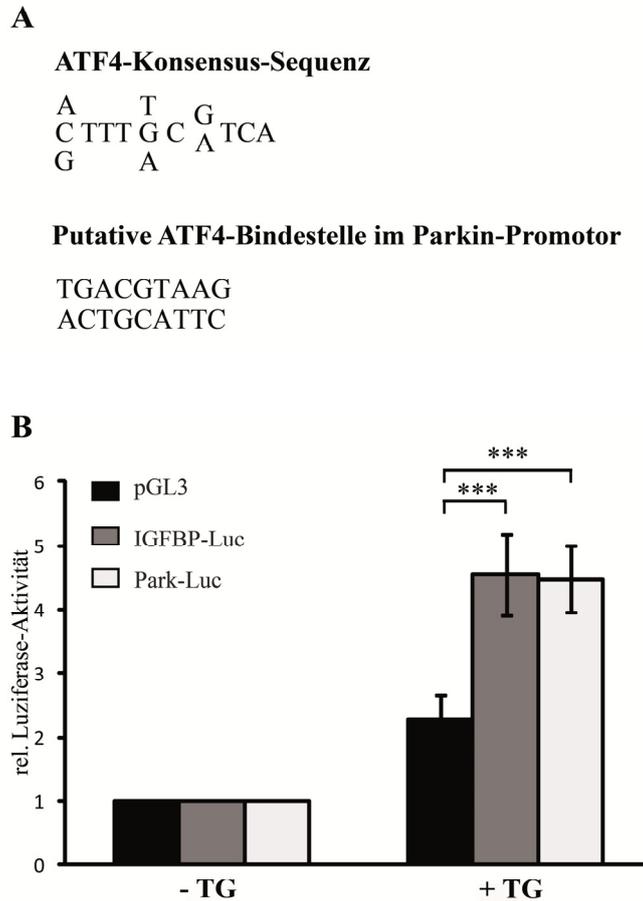


Abbildung 14: Der Parkin-Promotor enthält eine putative ATF4-Bindestelle, durch die eine Hochregulation unter ER-Stress mediiert wird

(A) Schematische Darstellung der ATF4-Konsensus-Sequenz und der putativen Bindestelle im Parkin-Promotor: Die Buchstaben, die ober- und unterhalb der ATF-Konsensus-Sequenz eingezeichnet sind, geben die Basen an, die alternativ genutzt werden können. Die putative ATF4-Bindestelle im Parkin-Promotor befindet sich an Position -169 bis -1612. (B) Luziferase-Aktivitätstest: HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontroll-Luziferase-Konstrukt (pGL3) oder mit dem Park-Luc-Konstrukt, das eine 3-fache Wiederholung der putativen ATF4-Bindestelle enthält bzw. mit IGFBP-Luc-Konstrukten, das eine 3-fache Wiederholung der bestätigten ATF4-Bindestelle enthält, transfiziert. Nach 8 h wurden die Zellen mit 1 μ M Thapsigargin (TG) behandelt und nach weiteren 14 h geerntet. Gezeigt ist die relative Luziferase-Aktivität der gestressten Zellen in Bezug auf ungestresste Zellen (gleich 1 gesetzt), basierend auf Triplikaten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. *** $p < 0,001$. Die Versuche wurden freundlicherweise von Lena Bouman durchgeführt.

2.2.2 ATF4 bindet an den Parkin-Promotor

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hochregulation von Parkin-mRNA als Antwort auf ER- Stress durch die putative ATF4-Bindestelle vermittelt werden kann, sollte nun analysiert werden, ob ATF4 selbst an den Parkin-Promotor bindet. Hierzu wurden *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* (EMSA) durchgeführt. Das Prinzip dieser Untersuchung besteht darin, dass ein „proteinfreies“ DNA-Fragment in der Gelelektrophorese schneller wandert, als ein Protein-DNA-Komplex. Die doppelsträngige radioaktiv-markierte putative ATF4-Bindestelle (Park) wurde mit gleichen Mengen nukleären Extraktes aus HEK293T-Zellen, die entweder unbehandelt oder mit Thapsigargin gestresst worden waren, inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Um unspezifische Bindungen, die auf elektrostatischer Bindung zwischen positiv geladenen Aminosäure-Seitengruppen und negativ geladenen Phosphaten beruhen, zu verhindern, wurde ein Überschuss nicht radioaktiv-markierter unspezifischer DNA (dIdC) jedem Ansatz hinzugefügt (Abb. 15). Sowohl die Inkubation mit Extrakten ungestresster (Abb. 15 Spur 1), als auch mit Extrakten gestresster Zellen, konnte die Wanderung der Park-Oligonukleotide im elektrischen Feld verzögern (Abb. 15 Spur 2). Es konnten, neben einer unspezifischen Bande, zwei Banden detektiert werden, deren Intensität unter ER-Stress zunahm. Zusätzlich konnte eine Bande größerer Laufweite unterhalb der beiden vorher beschriebenen Banden detektiert werden, die nur unter gestressten Bedingungen zu beobachten war. Zur Klärung, ob es sich bei dieser Bande um Protein-DNA-Komplexe handelt, die ATF4 beinhalten, wurde dem Ansatz ein ATF4-spezifischer Antikörper zugegeben. Ein Komplex aus Antikörper, Protein und DNA ist größer als der Protein-DNA-Komplex und führt entweder zu einer verzögerten Wanderung (*Supershift*) oder zu einem erschwerten Einlaufen des Komplexes in das Gel. Das Vorhandensein von ATF4 in den Protein-DNA-Komplexen konnte durch Zugabe eines ATF4-spezifischen Antikörpers und des daraus resultierenden *Supershifts* nachgewiesen werden (Abb. 15 Spur 4). Die zwei Banden geringerer Laufweite wurden durch die Antikörper-Zugabe nicht beeinflusst; es handelte sich dabei aber um spezifische Bindungen von Proteinen an die ATF4-Bindestelle, da auch diese Komplexe durch einen Überschuss kalter Probe kompetitiert werden konnten (Abb. 15 Spur 5). Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie binden als Homo- bzw. Heterodimere an DNA. Die Zugabe eines Antikörpers gegen c-Jun, einem weiteren Mitglied der Familie, resultierte in einem *Supershift* bzw. in einem verringerten Signal der Bande mit geringerer Laufweite (Abb. 15 Spur 3). Demzufolge kann auch c-Jun an die ATF4-Bindestelle des

Parkin-Promotors binden. Im Rahmen der Promotionsarbeit von Lena Bouman wurde die funktionelle Relevanz von c-Jun in der Aktivierung des Parkin-Promotors näher analysiert. Dabei konnte c-Jun als Antagonist für ATF4 identifiziert werden, der die ATF4-vermittelte Expression von Parkin reprimiert.

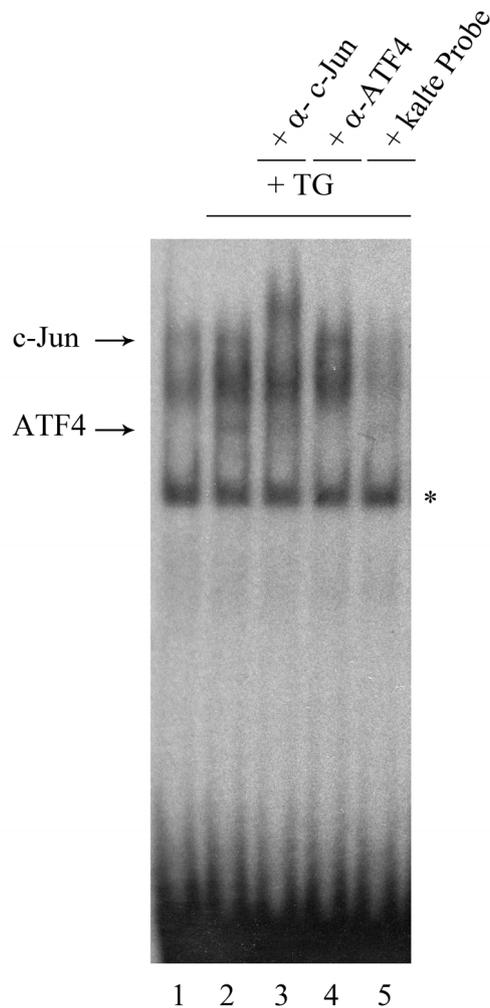


Abbildung 15: Bindung von ATF4 an die putative ATF4-Bindestelle des Parkin-Promotors

HEK293T-Zellen wurden für 3 h mit 1 μ M Thapsigargin gestresst, anschließend nukleärer Extrakt hergestellt und mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden der putativen ATF4-Bindestelle inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 2-5). Als Kontrolle wurde Extrakt aus ungestressten HEK293T-Zellen verwendet (Spur 1). Durch Zugabe von Antikörper, die gegen ATF4 (α -ATF4) (Spur 4) bzw. gegen c-Jun (α -c-Jun) (Spur 3) gerichtet waren, konnte die Identität der Proteine in den DNA-Protein-Komplexen analysiert werden. Eine Kompetition wurde durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses nicht radioaktiv-markierter Oligonukleotide der putativen ATF4-Bindestelle durchgeführt (Spur 5). Der Stern markiert eine unspezifische Bande.

2.3 DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON PARKIN

Die vorherigen Versuche zeigten, dass Stress zu einer Erhöhung der Parkin-mRNA führt. Auch auf Protein-Ebene konnte diese erhöhte Expression beobachtet werden (Daten nicht

gezeigt). Warum jedoch die Zelle eine Parkin-Expression als Antwort auf Stress induziert, sollte im Folgenden untersucht werden.

2.3.1 Parkin-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber Stress

Zur Analyse der physiologischen Funktion von Parkin wurde zunächst die Auswirkung einer verminderten Parkin-Expression untersucht. Hierzu wurde in SH-SY5Y-Zellen ein transienter *Knock Down* (KD) durch RNA-Interferenz herbeigeführt, der zu einer durchschnittlichen 40%igen Reduktion der Parkin-mRNA-Menge führte (Abb. 16B). Anschließend wurden die Zellen mit Thapsigargin bzw. Tunicamycin oder CCCP gestresst und die Vitalität der Zellen mit dem *Vybrant MTT Cell Proliferation Assay* analysiert. Dieser Versuch beruht auf der Reduktion des Farbstoffes MTT, dessen Umsetzung die Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen widerspiegelt. Sowohl die Behandlung mit Thapsigargin, als auch mit Tunicamycin oder CCCP führte in den Parkin-siRNA-transfizierten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 16A).

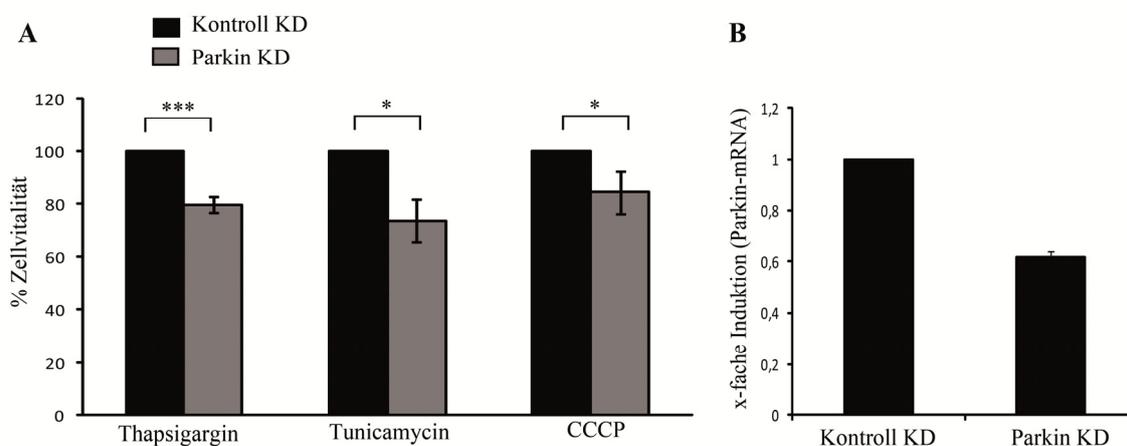


Abbildung 16: Parkin-Defizienz führt zu einer verminderten Zellvitalität unter Stress

Ein transienter *Knock Down* (KD) in SH-SY5Y-Zellen wurde durch Transfektion mit Parkin-siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA induziert. (A) Zwei Tage später wurden die Zellen für 16 h mit 10 μ M Thapsigargin, 2 μ g/ml Tunicamycin bzw. 10 μ M CCCP gestresst. Anschließend wurde die Zellvitalität mit dem *MTT-Assay* analysiert. Gezeigt ist die relative Zellvitalität der Parkin-siRNA-transfizierten Zellen zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (gleich 100% gesetzt). (B) Zur Überprüfung der *Knock Down*-Effizienz wurde aus den siRNA-transfizierten Zellen Gesamt-RNA isoliert und mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge Parkin-spezifischer mRNA der Parkin-siRNA-transfizierten Zellen in Bezug auf die Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Die Abbildung repräsentiert die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, wobei jeder Ansatz in Triplikaten durchgeführt wurde. *** $p < 0,0005$; * $p < 0,05$.

Um diese Daten zu untermauern wurden weitere Versuche an primären Zellen durchgeführt. Hierzu wurden MEF-Zellen aus 12.5 dpc Embryonen einer *Parkin-Knock Out*-Linie (KO), sowie entsprechender Wildtyp-Mäuse (Wt) isoliert. In der *Knock Out*-Maus wurde Exon 3 des *Parkin*-Gens deletiert, was zu einem kompletten Verlust des *Parkin*-Proteins führt (Itier et al., 2003). Interessanterweise waren MEF-Zellen der *Knock Out*-Mäuse anfälliger gegenüber ER-Stress als MEF-Zellen der Wildtyp-Mäuse. (Der *MTT-Assay* wurde freundlicherweise von Lena Bouman durchgeführt) (Abb. 17A).

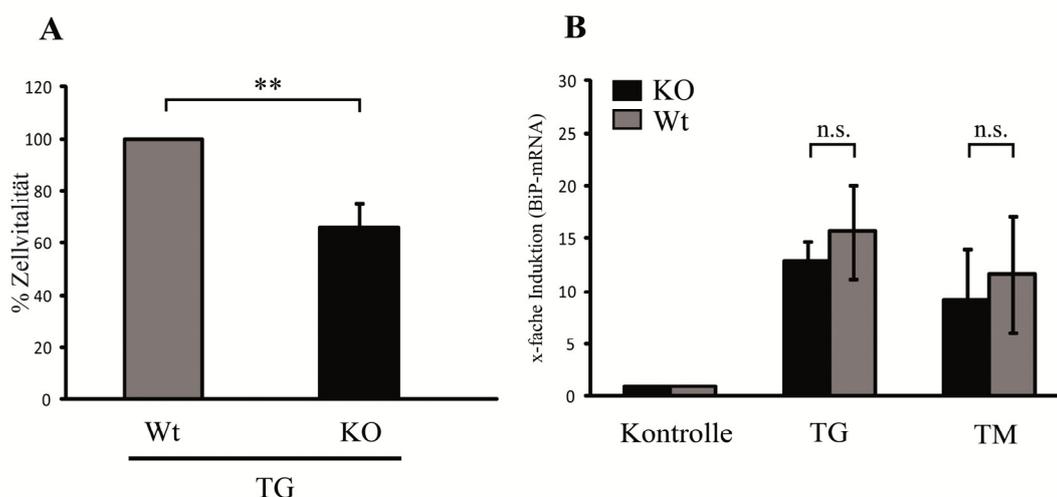


Abbildung 17: Parkin-Knock Out- MEFs zeigen eine verminderte Zellvitalität unter ER Stress

(A) MEF-Zellen von Mäusen einer *Parkin-Knock Out*-Linie (KO) (Itier et al., 2003) und von entsprechenden Wildtyp-Mäusen (Wt) wurden mit 10 μ M Thapsigargin (TG) für 16 h behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mit dem *MTT-Assay* analysiert. Gezeigt ist die relative Zellvitalität der *Parkin*-KO-MEFs im Vergleich zu den Wt-MEFs (gleich 100% gesetzt). Die Abbildung repräsentiert die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten, wobei jeder Ansatz in Triplikaten durchgeführt wurde. $**p < 0,01$. (Experiment freundlicherweise von Lena Bouman durchgeführt). (B) Der Gehalt an BiP-spezifischer mRNA wurde mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. KO- und Wt-MEFs wurden mit 1 μ M Thapsigargin (TG) oder 2 μ g/ml Tunicamycin für 5 h behandelt. Angegeben ist die relative Menge BiP-spezifischer mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). Normalisiert wurde über das *Haushaltsgen* β -Aktin. Gemessen wurden jeweils Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Um die Frage zu klären, ob *Parkin* einen direkten Einfluss auf die Antwort auf ER-Stress ausübt bzw. den Wirkungsgrad der Antwort moduliert, wurden BiP-mRNA-Level in den MEF-Zellen mit quantitativer *Real Time* PCR analysiert. BiP (*Immunoglobulin heavy chain binding protein*) gehört zur Familie der Hitzeschock-Proteine und ist ein *Target* der *Unfolded Protein Response*. Interessanterweise konnte weder nach Thapsigargin noch Tunicamycin-Behandlung ein signifikanter Unterschied des ER-Stress Sensors BiP beobachtet werden (Abb. 17B).

2.3.2 Das neuroprotektive Potential von Parkin

Basierend auf dem Ergebnis, dass die Parkin-Defizienz in einer verringerten Zellvitalität resultierte, sollte nun der Effekt einer erhöhten Parkin-Expression auf das Überleben der Zelle unter Stressbedingungen analysiert werden.

2.3.2.1 *Parkin ist protektiv gegenüber ER-Stress-induzierte Apoptose*

Um einen tieferen Einblick in die Rolle von Parkin in der zellulären Stress-Antwort zu erlangen, wurden humane Neuroblastomzellen SH-SY5Y-Zellen transient mit einem Parkin-Expressionsplasmid bzw. einem Kontrollvektor transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 10 μ M Thapsigargin für 12 h gestresst. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch die aktivierte Form der Effektor-Caspase-3 erkennt, analysiert. Durch die Überexpression von Parkin konnte eine Verminderung der Apoptoserate um ca. 50% beobachtet werden (Abb. 18).

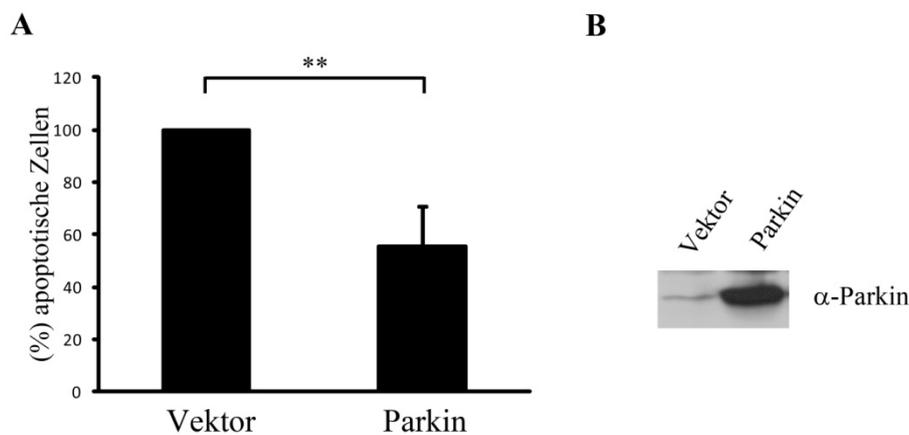


Abbildung 18: Parkin besitzt ein neuroprotektives Potential gegenüber ER-Stress

(A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem Parkin-Expressionsplasmid oder Leervektor transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für 12 h mit 10 μ M Thapsigargin inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen wurden mit dem spezifischen Antikörpers gegen aktivierte Caspase-3 identifiziert. Zur Quantifizierung wurden die Caspase-positiven Zellen gezählt. Zu sehen ist der relative prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in Parkin-transfizierten Zellen im Vergleich zu mit dem Kontrollvektor-transfizierten Zellen (gleich 100% gesetzt). (B) Zur Expressionskontrolle wurden parallel SH-SY5Y-Zellen mit den gleichen Konstrukten transfiziert und mittels *Western Blot* analysiert. Die Parkin-Expression wurde mit einem Antikörper gegen Parkin (α -Parkin) nachgewiesen. ** $p < 0,005$.

Eine erhöhte Parkin-Expression schützt demnach die Zelle vor ER-Stress-induziertem Zelltod. Dies legt die Vermutung nahe, dass die beobachtete Hochregulation von Parkin als Antwort der Zelle auf ER-Stress dazu beiträgt, die zelluläre Funktion beizubehalten bzw. ein Überleben der Zelle zu ermöglichen.

2.3.2.2 *Parkin ist protektiv gegen PrP^{Sc}-induzierte Toxizität*

Eine Hochregulation von Parkin konnte nicht nur durch ER-Stress, sondern auch unter PrP^{Sc}-vermittelter Toxizität induziert werden. Um die Frage zu klären, ob Parkin auch unter diesen Umständen ein protektives Potential entfaltet, wurden Co-Kultivierungs-Assays und anschließende Bestimmungen der Apoptose-Rate durchgeführt. Verschiedene Maus- und Zellkultur-Modelle zeigen, dass die Propagierung von PrP^{Sc} nur dann zum neuronalen Zelltod führt, wenn GPI-verankertes PrP^C auf der Oberfläche von neuronalen Zellen exprimiert wird. (Brandner et al., 1996; Mallucci et al., 2003; Rambold et al., 2008). SH-SY5Y-Zellen besitzen wenig endogenes PrP^C. Um ein höheres Maß an Toxizität zu induzieren, wurden die SH-SY5Y-Zellen mit einem Expressionsplasmid für PrP^C und als Kontrolle mit einem Expressionsplasmid für GPI-verankertes GFP (GFP-GPI) transfiziert. Um den Effekt von Parkin analysieren zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Expressionsplasmiden für Wt-Parkin bzw. für Parkin mit einer N-terminalen Deletion von 79 Aminosäuren (Parkin Δ N) co-transfiziert. Drei Stunden nach der Transfektion wurden die SH-SY5Y-Zellen in ScN2a-Zellen umgesetzt und 16 h co-kultiviert. Die anschließende Analyse ergab einen deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen bei der Expression von PrP^C im Vergleich zur GFP- exprimierenden Zellen (Abb. 19A). Die Überexpression von Wt-Parkin, nicht jedoch der Mutante, konnte die Apoptose-Rate von 20% auf 5% senken (Abb. 19A). Zur Kontrolle der zellulären Lokalisierung von PrP^C und Parkin wurden indirekte Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt (Abb. 19C). Eine Co-Expression beider Proteine führte zu keiner Veränderung der Lokalisation von PrP^C an der Zelloberfläche bzw. der zytosolischen Verteilung von Parkin. Die Versuche wurden freundlicherweise von Angelika Rambold durchgeführt.

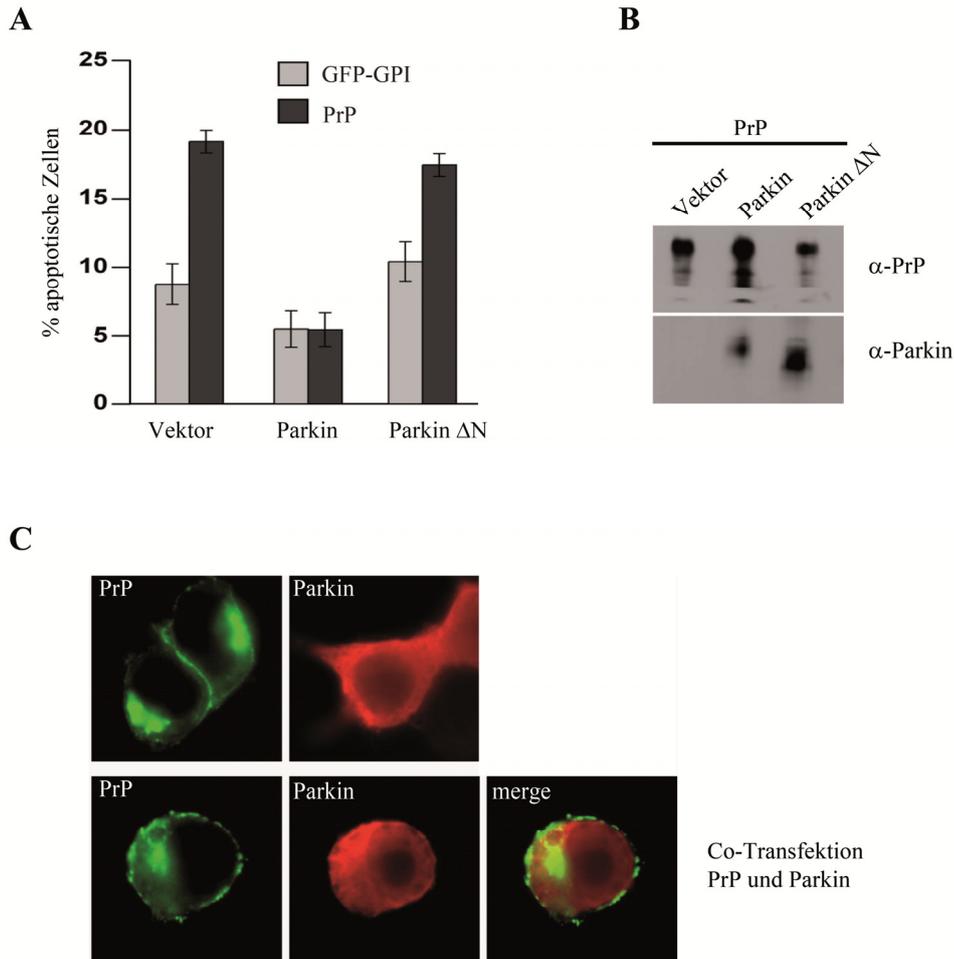


Abbildung 19: Parkin besitzt ein neuroprotektives Potential gegenüber PrP^{Sc}-induzierte Toxizität

(A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für PrP^C (PrP) bzw. für GPI-verankertes GFP transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für Wt-Parkin (Parkin) und für die Parkin-Mutante (ParkinΔN) bzw. mit einem Leervektor (Vektor) transfiziert. 3 h nach der Transfektion wurden die SH-SY5Y-Zellen für 16 h mit ScN2A-Zellen co-kultiviert, anschließend fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen wurden mit dem spezifischen Antikörpers gegen aktivierte Caspase-3 identifiziert. Zur Quantifizierung wurden die Caspase-positiven Zellen gezählt. Zu sehen ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen aus der Gesamtheit der transfizierten Zellen. (B) Zur Expressionskontrolle wurden SH-SY5Y-Zellen mit den gleichen Konstrukten parallel transfiziert und mittels *Western Blot* unter Verwendung eines Antikörpers gegen PrP (α-PrP) bzw. gegen Parkin (α-Parkin) analysiert. (C) Zur Kontrolle der zellulären Lokalisation der Proteine, wurden SH-SY5Y-Zellen entweder einzeln mit den Expressionsplasmiden für Parkin oder PrP^C oder mit beiden gleichzeitig transfiziert. 24 h später wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Verwendet wurden Antikörper, die gegen PrP bzw. gegen Parkin gerichtet sind. (Die Versuche wurden freundlicherweise von Angelika Rambold durchgeführt und zur Verfügung gestellt).

2.3.2.3 *Einfluss von Parkin auf protektive Signalwege (NFκB-Signalweg)*

Die vorangegangenen Versuche sowie weitere Studien zeigten, dass Parkin gegenüber einem erstaunlich großem Repertoire an Stressoren schützend wirkt (siehe Abschnitt 1.3.6.). Dies legt die Vermutung nahe, dass Parkin einen Einfluss auf generelle Stress-Antwort-Mechanismen der Zelle ausübt. Anhand verschiedener Zellkultur- und Tier-Modelle wurde eine zentrale Rolle des NFκB (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells*) -Signalwegs in der Erhaltung der neuronalen Integrität, Plastizität und in der Prävention des neuronalen Zelltods demonstriert (Kaltschmidt et al., 2005; Karin und Lin, 2002; Mattson et al., 2000). NFκB ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der sich klassischerweise aus den Untereinheiten p50 und p65 zusammensetzt. Unter basalen Bedingungen befindet sich dieser Faktor in einem Komplex mit IκB (*inhibitor of NFκB*) und liegt somit in einer inaktiven Form im Zytosol der Zelle vor. Zahlreiche Stimuli, wie z.B. TNFα (Tumor-Nekrosefaktor α) oder IL-1 (Interleukin 1) führen zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes (IκB-Kinase), welcher IκB phosphoryliert, das in Folge ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut wird. Somit wird NFκB freigesetzt, transloziert in den Nukleus und induziert dort die Transkription entsprechender Zielgene (Baeuerle und Baltimore, 1996). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Parkin einen Einfluss auf die NFκB-abhängige Transkription ausübt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit einem Luziferase-Konstrukt, der eine decamere NFκB-Konsensus-Sequenz enthält, sowie mit Expressionsplasmiden für Parkin bzw. eines Kontrollproteins (EYFP) co-transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den beiden klassischen NFκB-Aktivatoren TNFα und PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) behandelt. Die Stressbedingungen wurden so gewählt, dass NFκB nur schwach aktiviert wird. Anschließende Luziferase-Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass die Anwesenheit von Parkin zu einem supra-additiven, bis zu 12-fachem Anstieg der NFκB-abhängigen Transkription führt (Abb. 20). Dies deutet daraufhin, dass Parkin unter schwachen Stressbedingungen den Schwellenwert für die NFκB-Aktivierung senken kann. Die Luziferase-Aktivitätsbestimmungen wurden freundlicherweise von Iris Henn durchgeführt.

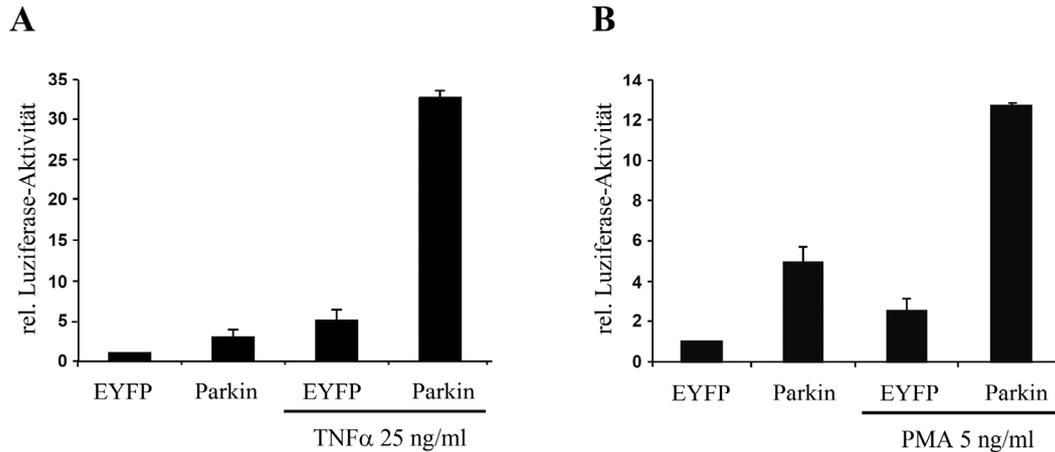


Abbildung 20: Parkin sensibilisiert Zellen für NF κ B-aktivierende Stimuli

HEK293T-Zellen wurden mit dem NF κ B-Luc-Reporterkonstrukt und mit Parkin-Expressionskonstrukt bzw. als Kontrolle mit einem Expressionsplasmid für EYFP co-transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für 3 h mit TNF α (25 ng/ml) (A) oder PMA (5 ng/ml) (B) inkubiert und nach weiteren 5 h geerntet. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Gezeigt ist die relative Luciferase-Aktivität in Bezug auf ungestresste Zellen, die das Kontrollprotein EYFP exprimieren (gleich 1 gesetzt), basierend auf Triplikaten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Experimente wurden freundlicherweise von Iris Henn durchgeführt.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Bindeaktivität von NF κ B in EMSAs untersucht (Abb. 21). HEK293T-Zellen wurden mit Parkin-Expressionsplasmid bzw. mit einem Kontrollvektor transfiziert und für 30 min mit verschiedenen TNF α -Konzentrationen gestresst. Der nukleäre Extrakt dieser Zellen, in dem sich nur die aktivierte Form des Transkriptionsfaktors befinden kann, wurde mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden der NF κ B-Konsensus-Sequenz inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Identität der im Komplex enthaltenen Proteine wurde durch *Supershift*-Analysen verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Bande mit geringster Laufweite enthielt die aktivierende Untereinheit p65 des NF κ B-Heterodimers. Die Anwesenheit von Parkin führte in TNF α -stimulierten Zellen zu einer verstärkten Bindung von NF κ B an die Konsensus-Sequenz. Selbst bei einer sehr geringen Konzentration von 0,0005 ng/ml TNF α führte Parkin zu einer NF κ B-Aktivierung, wohingegen diese Konzentration in Kontrollvektor-transfizierten Zellen nicht ausreichte, um die Bindung von NF κ B zu bewirken.

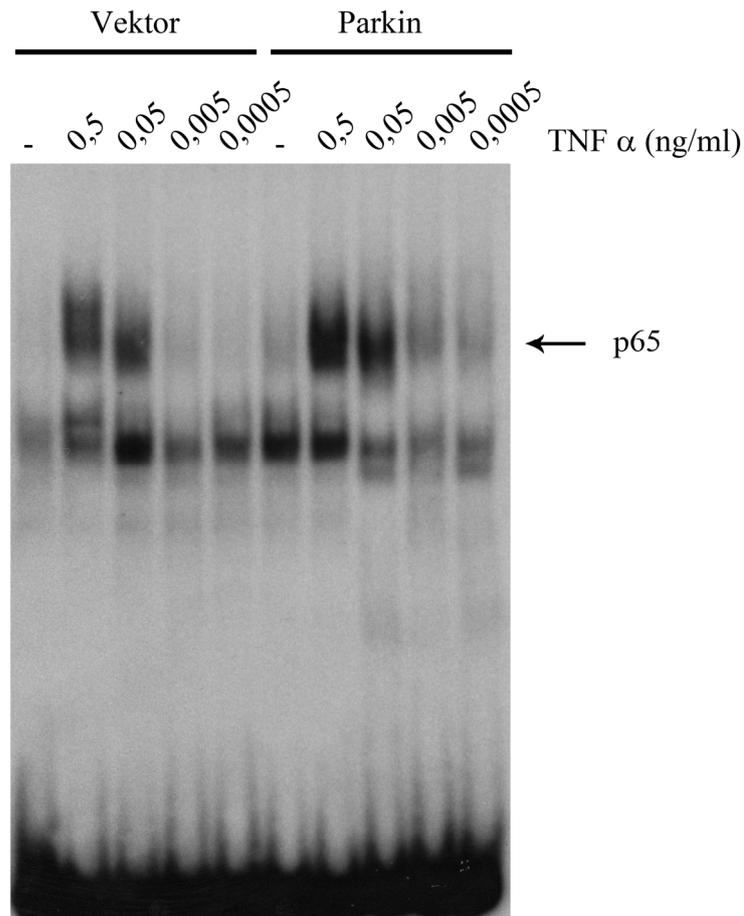


Abbildung 21: Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay mit Oligonukleotiden der NFκB-Konsensus-Sequenz

HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Parkin oder Leervektor transfiziert und für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen an TNFα inkubiert. Nukleärer Extrakt dieser Zellen wurde mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

Um Beweise für die Rolle endogenen Parkins im Zusammenhang mit dem NFκB-Signalweg zu erhalten, wurden weitere *EMSA*s mit primären humanen Fibroblasten durchgeführt. Diese Fibroblasten wurden von einem Parkinson-Patienten mit heterozygoter Deletion von Exon 3-4 und Deletion von Exon 3-5 des Parkin-Gens und einer gesunden Kontrollperson erhalten. In diesem Patienten kann kein Parkin-Protein detektiert werden (Nakaso et al., 2006).

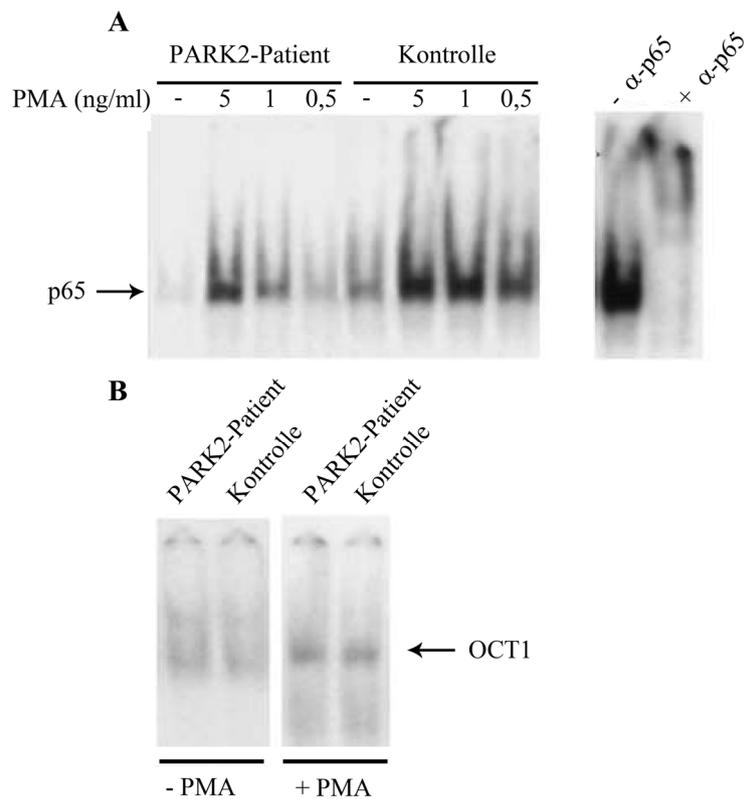


Abbildung 22: PARK2-Patienten-Fibroblasten zeigen eine verminderte Bindung von NFκB

(A) Fibroblasten eines Patienten mit Mutationen im Parkin-Gen (PARK2-Patient) und einer entsprechenden Kontrollperson wurden für 30 min mit den angegebenen Mengen PMA behandelt. Nukleärer Extrakt dieser Zellen wurde mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden der NFκB-Konsensus-Sequenz inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. *Supershift*-Analysen wurden mit einem Antikörper, der gegen die NFκB-Untereinheit p65 (α-p65) gerichtet ist, durchgeführt. (B) Als Kontrolle wurde die Bindung der nukleären Extrakte gestresster und unbehandelter Fibroblasten an eine OCT1-Konsensus-Sequenz analysiert.

In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Überexpressions-Analysen zeigte sich, dass der Verlust von Parkin zu einer geringeren NFκB-Aktivierung führte. Sowohl in PMA-behandelten, als auch bei unbehandelten Fibroblasten des Parkin-defizienten Patienten, konnte eine Bande geringerer Intensität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die Anwesenheit der p65-Untereinheit wurde durch *Supershift*-Analysen mit einem Antikörper gegen p65 verifiziert (Abb. 22A). Um den spezifischen Einfluss von Parkin auf den NFκB-Transkriptionsfaktor zu belegen, wurde zusätzlich die Bindung des ubiquitären Transkriptionsfaktors OCT1 (*octamer binding transcription factor 1*) an dessen Bindemotif untersucht. Sowohl unter basalen, als auch unter Stressbedingungen konnte kein signifikanter Unterschied in der OCT1-Bindung zwischen dem Patienten und der Kontrollperson beobachtet werden (Abb. 22B).

Um einen weiteren Nachweis für die Rolle von Parkin bei der Modulation des NFκB-Signalweges zu erhalten, wurden ScN2a-Zellen untersucht. PrP^{Sc}/Prionen-infizierte ScN2a-Zellen sind ein allgemein genutztes Zellkultur-Modell zur Untersuchung der PrP^{Sc}-Propagierung (Borchelt et al., 1992; Butler et al., 1988; Caughey et al., 1989). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ScN2a-Zellen deutlich sensitiver gegenüber Stressbedingungen sind und unter Stress eine höhere Apoptose-Rate zeigen (Rambold et al., 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass Signalwege, die für das Überleben der Zelle von Bedeutung sind, verändert sein könnten. Mit Hilfe von EMSAs konnte unter Stress eine verringerte NFκB-Aktivierung in ScN2a-Zellen im Vergleich zu nicht infizierten N2a-Zellen beobachtet werden (Abb. 23A). Um zumindest einen indirekten Hinweis zu bekommen, dass die verminderte NFκB-Aktivierung durch PrP^{Sc} verursacht wurde, wurden die PrP^{Sc}-Mengen in ScN2a-Zellen durch Inkubation mit DOSPA (*2,3-Dioleyloxy-N,N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoracetate*) verringert (Winklhofer und Tatzelt, 2000). Anschließend *EMSA*s mit dem NFκB-Konsensus-Oligonukleotid zeigten nicht immer konsistente Ergebnisse, was vermutlich auf den transienten Effekt der DOSPA-Behandlung zurückzuführen ist. Dennoch konnte die Tendenz beobachtet werden, dass unter Erniedrigung des PrP^{Sc}-Gehaltes das Ausmaß der NFκB-Aktivierung in den ScN2a-Zellen sich an das der N2a-Zellen angleich (Abb. 23B). Nun stellte sich die Frage, ob auch Parkin in der Lage ist, die verminderte NFκB-Aktivierung in den ScN2a-Zellen zu erhöhen. Dies stellte sich jedoch als problematisch heraus, da ScN2a-Zellen nur unter Verwendung von DOSPA transfizierbar waren. Daher ließ sich nicht genau klären, ob der beobachtete Effekt auf die ektope Parkin-Expression oder auf die Verminderung der PrP^{Sc}-Menge durch DOSPA zurückzuführen war. Dennoch konnte durch diese Versuche die Relevanz des NFκB-Signalweges bei neurotoxischen und neuroprotektiven Signalwegen der Zelle demonstriert werden.

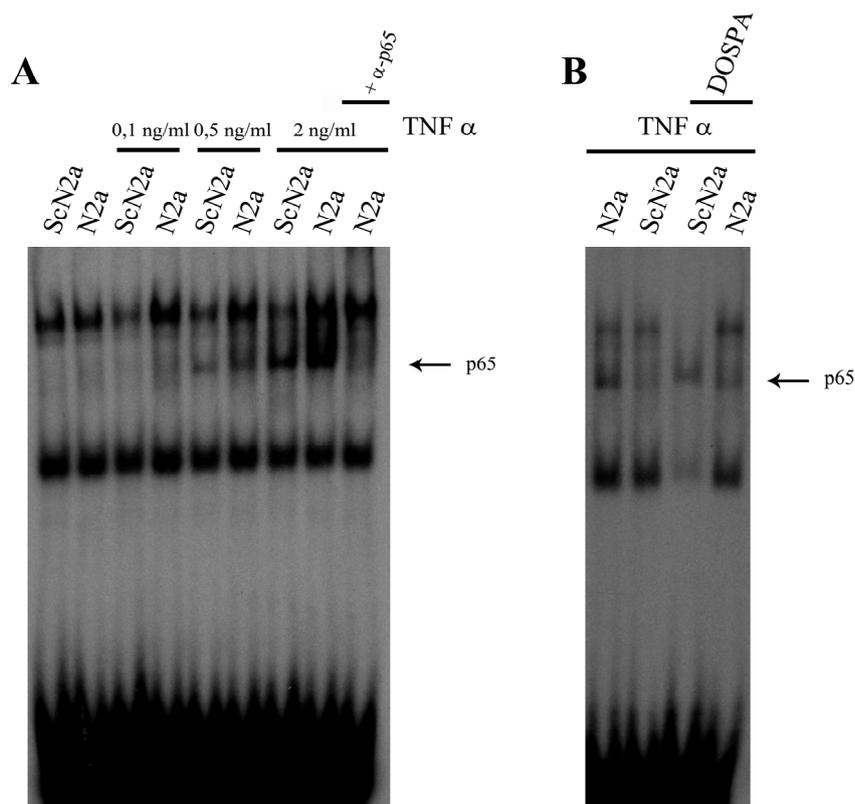


Abbildung 23: ScN2a-Zellen zeigen eine verminderte NFκB-Bindung

(A) N2a- und ScN2a-Zellen wurden für 30 min mit den angegebenen TNF α -Konzentrationen behandelt. Nukleärer Extrakt dieser Zellen wurde mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden der NFκB-Konsensus-Sequenz inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. *Supershift*-Analysen wurden mit einem Antikörper, der gegen die NFκB-Untereinheit p65 (α -p65) gerichtet ist, durchgeführt. (B) Analog wurde der nukleäre Extrakt von DOSPA-behandelten ScN2a- und N2a-Zellen, die mit 0,5 ng/ml TNF α für 30 min gestresst wurden, analysiert.

2.3.3 Einfluss von Parkin auf die mitochondriale Biogenese

Kürzlich veröffentlichte Studien weisen auf eine neuartige Rolle von Parkin in der mitochondrialen Replikation und Transkription. Mitochondrien enthalten mehrfache Kopien der doppelsträngigen zirkulär angeordneten mitochondrialen DNA (mtDNA), die für 13 Proteine codiert, die Untereinheiten der Atmungskette darstellen. Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird jedoch durch die nukleäre genomische DNA codiert. Interessanterweise konnte eine erhöhte Akkumulation somatischer mitochondrialer Mutationen, hauptsächlich großer Deletionen, in dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten beobachtet werden. Erreichen diese Mutationen einen gewissen Schwellenwert, hat dies einen Defekt der mitochondrialen Atmungskette zur Folge (Bender et al., 2006). Es gibt Anlass zur Vermutung, dass Parkin über die Modulation der mitochondrialen

Biogenese einen positiven Einfluss auf das Überleben der Zelle haben könnte. Kuroda und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die mitochondriale Transkription und Replikation durch eine Parkin-Überexpression gesteigert und durch Parkin-Defizienz verringert werden kann (Kuroda et al., 2006). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Parkin die mtDNA vor oxidativem Stress schützt und die Funktion der DNA-Reparatur-Maschinerie unterstützt (Rothfuss et al., 2009). Um diese Studien zu reproduzieren, sollte im Folgenden der Einfluss einer verminderten Parkin-Expression auf die mitochondriale DNA bzw. RNA untersucht werden. Mittels RNA-Interferenz wurde ein transienter Parkin-*Knock Down* in SH-SY5Y-Zellen induziert und anschließend Gesamt-RNA bzw. -DNA isoliert. Mit Hilfe quantitativer *Real Time* PCR-Analysen wurden die Mengen sowohl mitochondrial codierter Untereinheiten der Atmungskette, als auch eines nukleär codierten mitochondrialen Faktors (ATPAF, *ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor*) als Kontrolle bestimmt. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin.

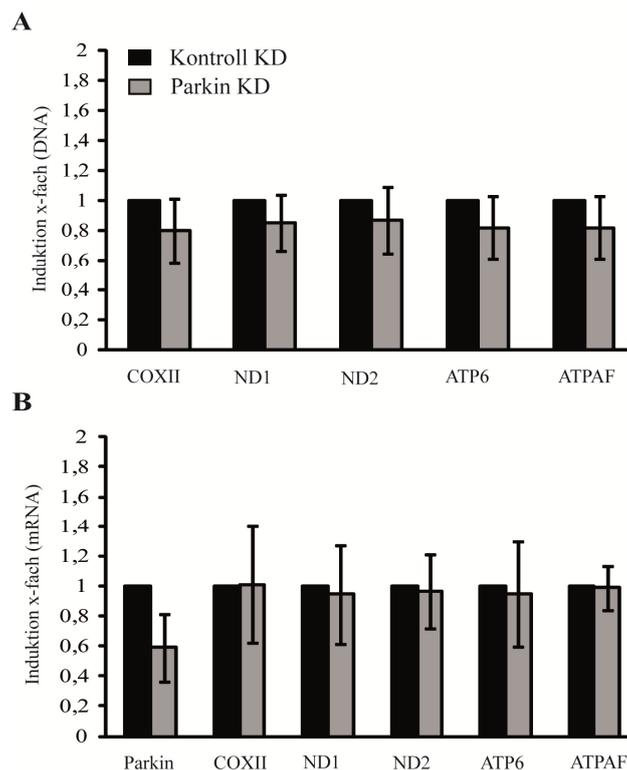


Abbildung 24: Einfluss von Parkin auf mitochondriale RNA und DNA

(A) Ein transienter *Knock Down* (KD) wurde in SH-SY5Y-Zellen durch Transfektion mit einer Parkin-siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA induziert. Drei Tage später wurden aus den Zellen Gesamt-DNA und Gesamt-RNA isoliert. Die DNA wurde direkt für die quantitativen *Real Time* PCR-Analysen eingesetzt. Die RNA wurde zunächst ins cDNA revers transkribiert (B). Gezeigt sind die relativen Mengen in den Parkin-siRNA-transfizierten Zellen in Bezug auf Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Analysiert wurde der Gehalt an *Cytochrome c oxidase subunit 2* (COXII), *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1* (ND1), *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2* (ND2), *ATP-synthase subunit a* (ATP6) und *ATP-synthase mitochondrial F1 complex assembly factor* (ATPAF). Gemessen wurden jeweils Triplikate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Unter Bedingungen des transienten *Knock Downs* der Parkin-Expression konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden, weder in der Menge mitochondrialer RNA (Abb. 24B), noch in der Menge mitochondrialer DNA (Abb. 24A). Im Gegensatz zu den vorherigen Studien konnte demnach in diesem Ansatz kein Einfluss von Parkin auf die mitochondriale Transkription und Replikation gezeigt werden. Zu Beachten ist allerdings, dass durch die RNA-Interferenz im Durchschnitt nur eine ca. 40%ige Reduktion der Parkin-Expression bewirkt werden konnte. Es konnte aber interessanterweise auch keine Korrelation zwischen einer stärkeren Parkin-Reduktion und einer Verringerung des Gehalts an mtDNA und mtRNA beobachtet werden. Da in diesen Versuchen Amplifikate der mtDNA erhalten wurden, konnten auch keine mitochondrialen Deletionen in den untersuchten Regionen unter Parkin-Defizienz beobachtet werden.

2.4 PARKIN-MAUS-MODELLE

2.4.1 Generierung transgener Parkin-Maus-Modelle

Nachdem in Zellkultur-Modellen die Eigenschaft von Parkin als stress-induzierbarer und protektiver Faktor gezeigt werden konnte, sollte nun die physiologische Funktion von Parkin in einem Tier-Modell näher untersucht werden.

Die Maus stellt hierbei eine zentrale Rolle dar, da sie sich in vielen Aspekten, von zellulärer Ebene bis hin zur Funktion ganzer Organe, dem Menschen ähnelt. Tatsächlich zeigen Daten des humanen Genom Projekts eine über 90%ige Homologie der Gene zwischen Mensch und Maus. Verschiedene Maus-Modelle wurden bereits entwickelt, um die Funktion von Parkin zu analysieren. Verschiedene Deletionen, die pathologischen Mutationen des humanen Parkin-Gens entsprechen, wurden in das murine Parkin-Gen eingeführt, was zu einem Verlust des Parkin-Proteins zur Folge hatte. Keines der bereits etablierten Maus-Modelle zeigte jedoch einen signifikanten Phänotyp, der es ermöglicht, die physiologische Funktion von Parkin aufzuklären (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003; Perez et al., 2005; Sato et al., 2006; Von Coelln et al., 2004). Daher wurde in dieser Arbeit eine andere Strategie gewählt, um das neuroprotektive Potential von Parkin sowie der damit verbundene Einfluss auf mögliche Signalwege zu analysieren. Dazu sollten Mäuse generiert werden, die zum einen humanes Wildtyp-Parkin oder zum anderen eine

pathogene C-terminale Deletions-Mutante (W453X) überexprimierten. Ferner sollte untersucht werden, ob Missfaltung und Aggregation des Parkin-Proteins mit einer erhöhten Toxizität *in vivo* assoziiert ist. Alle C-terminalen Deletions-Mutanten und verschiedene *missense* Mutationen zeichnen sich durch Fehlfaltung aus (Henn et al., 2005; Schlehe et al., 2008; Winklhofer et al., 2003b). Es ist daher interessant zu analysieren, ob Parkin neben einer Pathologie durch „*loss of function*“ auch ein toxisches „*gain of function*“ ausüben kann.

2.4.1.1 *Klonierung der Rekombinations-Konstrukte*

Es sollten transgene Mäuse generiert werden, die das 465 Aminosäuren lange Wildtyp-Parkin, oder die W453X-Mutante, der die letzten 13 Aminosäuren fehlen, überexprimieren. Die C-terminale Deletion der W453X-Mutante interferiert interessanterweise nicht mit den funktionellen Domänen des Parkin-Proteins (Abb. 25A). Zur Herstellung beider Konstrukte wurde der offene Leserahmen von humanem Wildtyp-Parkin bzw. der Mutante in den sogenannten halb genomischen phgMmPrP-Vektor kloniert (Fischer et al., 1996); (Abb. 25B). Dieser enthält mit Ausnahme des Introns 2 das nahezu komplette murine Prion-Gen (Prnp) mit dem endogenen PrP^C-Promotor, der zu einer starken Expression in allen Gehirnbereichen führt. Der gesamte offene Leserahmen von PrP^C, der sich in Exon 3 befindet, wurde durch den offenen Leserahmen von Parkin ersetzt (Abb. 25C). Die Klonierung wurde freundlicherweise von Margit Miesbauer durchgeführt.

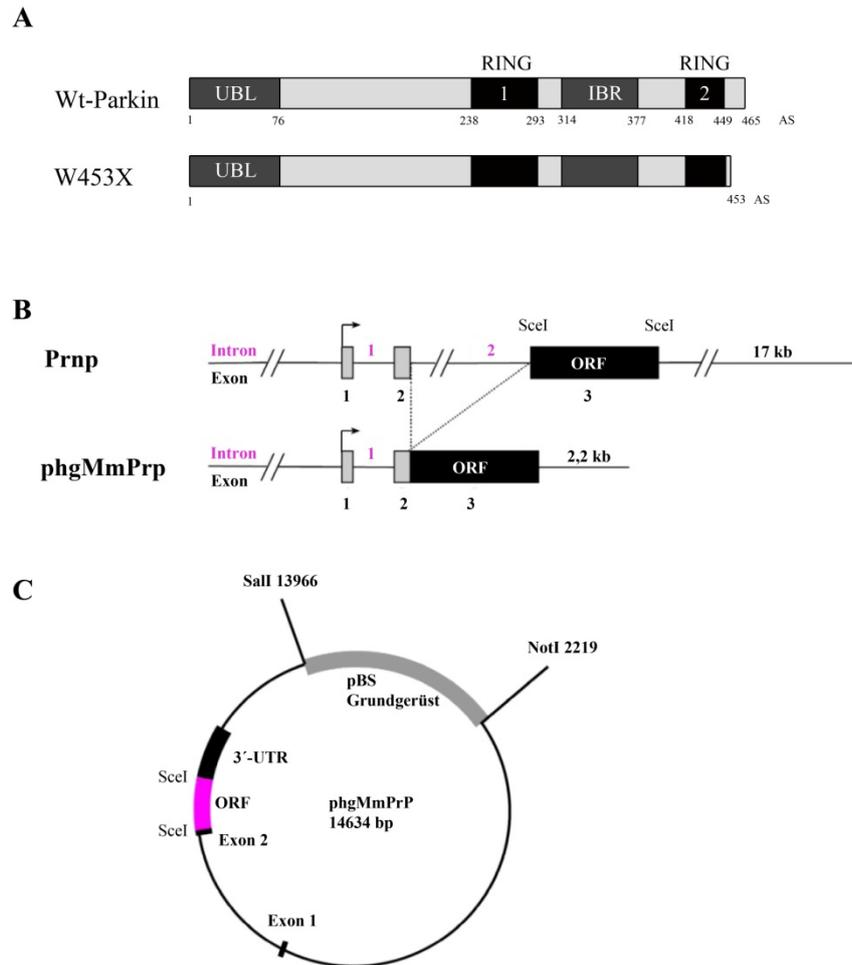


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Konstrukte zur Generierung der transgenen Mäuse

(A) Schematische Darstellung des Parkin-Proteins. Die Deletions-Mutante (W453X) zeichnet sich im Vergleich zu Wildtyp-Parkin (Wt-Parkin) durch eine Deletion der letzten 13 Aminosäuren aus. Die Zahlen geben die jeweilige Position der Aminosäuren (AS) im Protein an. Gezeigt sind weiter die funktionellen Domänen *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne, RING-Finger 1 (RING 1) und 2 (RING 2), sowie die *in-between-RING* (IBR)-Domäne. **(B) Konstruktion des phgMmPrP-Vektors.** Aus dem murinen Prion-Gen (*Prnp*) wurde Intron 2 deletiert sowie die 3' flankierende Region bis auf 2,2 Kilobasen (kb) gekürzt (Westaway et al., 1994). Der 1398 Basenpaar (bp) bzw. im Falle der Mutation 1359 bp große offene Leserahmen (ORF) von Parkin wurde über die Restriktionschnittstelle *SceI* in den Vektor ligiert. **(C) Darstellung des fertigen Vektorkonstrukts,** das für die Generierung der transgenen Mäuse eingesetzt wurde. Eingezeichnet ist die Lage der Exons des *Prnp* Gens, sowie der ORF von Wt-Parkin bzw. der Parkin Mutante. Das bakterielle Grundgerüst wurde durch Verdau mit *Sall* und *NotI* entfernt. Die Klonierung wurde freundlicherweise von Margit Miesbauer durchgeführt, die auch die Abbildung B und C zur Verfügung stellte.

Das linearisierte Rekombinations-Konstrukt wurde anschließend in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen von Mäusen der Linie FvB mikroinjiziert und in pseudoschwangere Weibchen implantiert (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Michael R. Bösl am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried). Die erhaltene *Founder-Generation* F0 wurde auf die Anwesenheit des Transgens mit sequenzspezifischer PCR untersucht.

2.4.1.2 Test auf Transgenität

Um zu verhindern, dass das endogene murine Parkin, das eine sehr große Homologie zum humanen Parkin aufweist, amplifiziert wurde, wurden die Primer so gewählt, dass sie in verschiedenen Exons binden (Abb. 26A). Der Parkin-Locus ist durch sehr große, bis zu 284 kb große Introns gekennzeichnet, was eine Amplifikation mit Primer, die in zwei verschiedenen Exons binden, unter den verwendeten PCR-Bedingungen unmöglich macht. Handelte es sich um eine Parkin-transgene Maus konnte, ein 361 bp Fragment im Agarosegel detektiert werden (Abb. 26B).

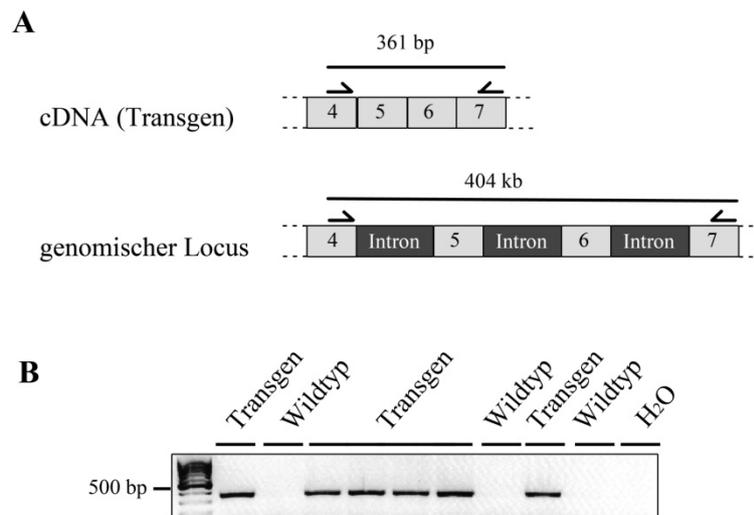


Abbildung 26: Genotypisierung der transgenen Tiere

(A) **Schematische Darstellung der Primer-Bindung auf endogenem und transgenem Status.** Die Lage der Primer ist durch Pfeile gekennzeichnet. Sie binden in Exon 4 und Exon 7, die im genomischen Locus durch Exons und Introns mit einer Gesamtlänge von ca. 400 kb getrennt sind. (B) **Repräsentative Darstellung einer Genotypisierung.** Aus Schwanzbiopsien der Mäuse wurde genomische DNA isoliert und mit transgen-spezifischer PCR analysiert. Eine Auftrennung in einem Agarosegel zeigte im Falle einer transgenen Maus (Transgen) eine Bande von 361 bp. Das endogene murine Parkin-Gen konnte nicht amplifiziert werden (Wildtyp). Als Negativkontrolle wurde H₂O anstelle von DNA in die PCR eingesetzt.

Die Analyse der Linien, die das humane Wt-Parkin (hP Tg) überexprimieren sollten, ergab 7 transgene Foundertiere (4 ♂; 3 ♀). Im Falle der Linien, die die Parkin Mutante (hP W453X) überexprimieren sollten, wurden 6 transgene Tiere (4 ♂; 2 ♀) erhalten. Über Rückkreuzung mit Wildtyp-Mäusen der Linie FvB, konnte festgestellt werden, welche Tiere der F0-Generation das Transgen in die Keimbahn transmittierten. Diese wurden als *Founder* der transgenen Linien verwendet.

2.4.1.3 *Expressionsanalyse der Parkin-transgenen Tiere*

Im Gegensatz zur *Knock Out*-Technologie, in der das DNA-Konstrukt durch homologe Rekombination an eine definierte Stelle in das Genom integriert, inseriert in der von uns eingesetzten Technologie das Rekombinationsprodukt an irgendeine Stelle des Genoms. Jede erhaltene transgene Linie zeichnet sich durch die Integration des Transgens an unterschiedlichen Stellen und in unterschiedlicher Kopien-Anzahl aus. Die Position ist dabei von sehr großer Bedeutung. Lage der Integrationsort des Transgens in Heterochromatin, einem transkriptionell inaktiven Bereich, würde dies zu einer sehr geringen oder sogar einer komplett mangelnden Expression führen. Es ist daher wichtig, nicht nur die Anwesenheit des Transgens, sondern auch dessen Expression auf Proteinebene zu analysieren.

2.4.1.3.1 *Expression des Transgens im Gehirn*

Zur Analyse der Proteinexpression wurden aus Gehirnen der transgenen Tiere ein 10%iges (w/v) Homogenat in Lysis-Puffer (0,5% Triton X-100/DOC) hergestellt und im *Western Blot* analysiert. Als Kontrolle diente eine Wildtyp-Maus desselben Wurfs. Die Analyse mit einem Antikörper, der gegen humanes Parkin gerichtet war, zeigte, dass humanes Wildtyp-Parkin und die Mutante W453X im Gehirn exprimiert wurden (Abb. 27). Es konnten zwei Banden mit einer ungefähren Größe von 52 kDa und 42 kDa detektiert werden. Die kleinere Parkin-Spezies ist auf einen internen Translations-Start im humanen Parkin zurückzuführen, welcher im murinen Parkin nicht vorhanden ist (Henn et al., 2005; Schlossmacher et al., 2002). Auf Grund des Positionseffekts und der unterschiedlichen Kopien-Anzahl des integrierten Transgens wurden Linien mit unterschiedlicher Expression erzeugt. Gezeigt sind die Linien mit hoher und niedriger Expressionsstärke, die für die weiteren Versuche verwendet wurden.

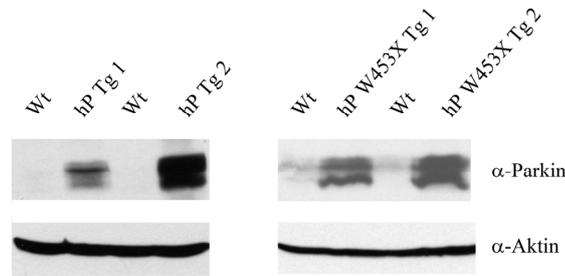


Abbildung 27: Die transgenen Linien zeigen unterschiedliche Expressionslevel im Gehirn

Aus dem gesamten Gehirn von transgenen Mäusen der angegebenen Linien, sowie der entsprechenden Wildtyp-Tiere desselben Wurfs, wurde ein 10%iges (w/v) Homogenat in 0,5% Triton X-100/DOC hergestellt und im *Western Blot* analysiert. Die Detektion des humanen Parkins erfolgte unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen Parkin gerichtet war (α -Parkin). Als Ladekontrolle diente Aktin, das mit einem Antikörper (α -Aktin) nachgewiesen wurde.

2.4.1.3.2 Expression des Transgens in verschiedenen Gehirnbereichen

Nachdem eine Expression von Parkin in ganzen Gehirnen der transgenen Mäuse festgestellt wurde, sollte nun näher analysiert werden, in welchen spezifischen Regionen des Gehirns der Maus-PrP^C-Promotors aktiv ist und somit zu einer Expression des Transgens führt. Hierzu wurden das Mesencephalon, Cortex, Hippocampus, Thalamus und das Striatum präpariert, Proteinextrakte hergestellt und im *Western Blot* analysiert. Repräsentativ ist hier das Expressionsmuster der Linie hP Tg2 gezeigt, die eine sehr gute Expression des humanen Wildtyp-Parkins bereits in Untersuchungen des gesamten Gehirns aufwies. In allen untersuchten Regionen wurde dabei eine gleichmäßige Expression des Transgens nachgewiesen (Abb. 28).

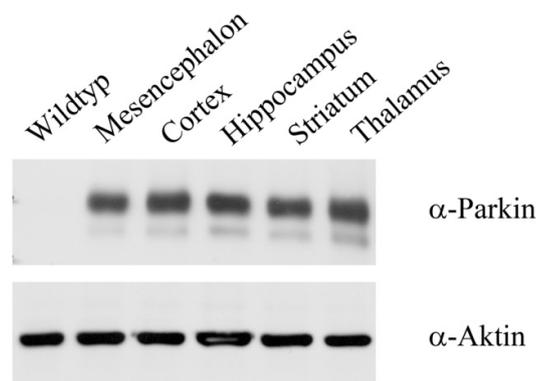


Abbildung 28: Die transgenen Linien zeigen eine Expression in verschiedenen Gehirnbereichen

Aus dem Gehirn einer Maus der Linie hP Tg2 wurden die angegeben Gehirnbereiche präpariert, ein 10%iges (w/v) Homogenat in 0,5% Triton X-100/DOC hergestellt und gleiche Proteinmengen im *Western Blot* analysiert. Als Kontrolle wurde das Mesencephalon einer Wildtyp-Maus desselben Wurfs analysiert. Die Detektion humanen Parkins erfolgte unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen Parkin gerichtet war (α -Parkin). Als Ladekontrolle diente Aktin, das mit einem Antikörper (α -Aktin) nachgewiesen wurde.

2.4.2 Analyse der Parkin Maus-Modelle

Keine der erzeugten transgenen Linien zeigten offensichtliche Auffälligkeiten. Sowohl die Wt-Parkin-, als auch die W453X-überexprimierenden Linien waren fertil und zeigten keinen Unterschied in der Lebenserwartung im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Um einen Effekt der Wt-Parkin- bzw. der W453X-Überexpression auf biochemischer und molekularer Ebene zu untersuchen, wurden detailliertere Analysen angeschlossen.

2.4.2.1 *Die W453X-Mutante befindet sich vermehrt in der Detergenz-unlöslichen Fraktion*

C- terminale Deletions-Mutationen führen zu einer Missfaltung und Aggregation und damit zu einer Inaktivierung von Parkin. Im Zellkultur-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass die pathogene Mutante W453X eine Detergenz-unlösliche Konformation einnimmt und aggregiert. Auch Wt-Parkin neigt unter bestimmten Bedingungen zu einer Missfaltung (Henn et al., 2005; Schlehe et al., 2008; Winklhofer et al., 2003b). Es sollte daher die Löslichkeit von Parkin in den etablierten Tier-Modellen analysiert werden. Hierzu wurde aus dem Gehirn der transgenen Linien Homogenate hergestellt und in Detergenz-lösliche (sup) und -unlösliche Fraktionen (pellet) geteilt. Die anschließende Analyse im *Western Blot* ergab, dass ein großer Anteil sowohl des humanen Wt-Parkins, als auch der Mutante in den Pellet-Fraktionen zu finden ist. Interessanterweise konnte die Mutante W453X fast ausschließlich in den unlöslichen Fraktionen detektiert werden, wohingegen Wt-Parkin auch in der löslichen Fraktion zu finden war.

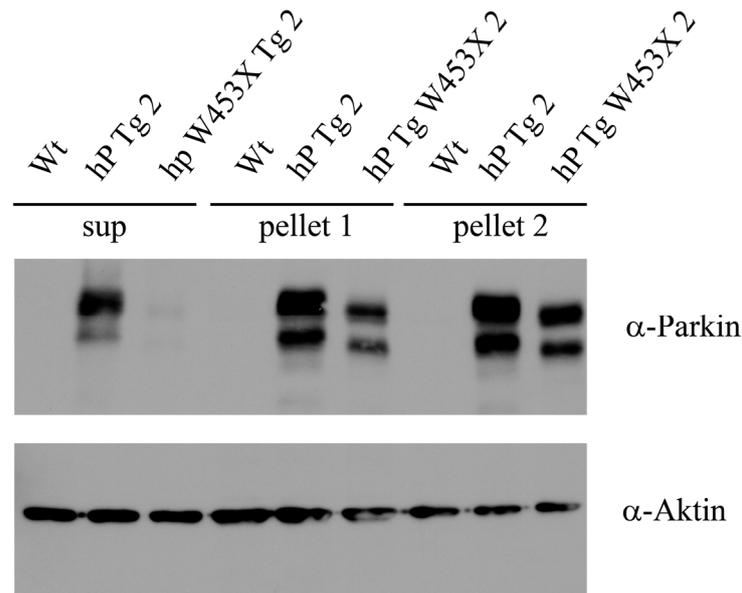


Abbildung 29: W453X befindet sich vermehrt in der Detergenz-unlöslichen Fraktion

Aus dem Gehirn der Linien hP Tg2 und hP W453X Tg2, sowie einer Wildtyp-Maus (Kontrolle), wurde ein 10%iges (w/v) Homogenat in 0,5% Triton X-100/DOC hergestellt. Nach Abtrennung grober Partikel (pellet 1), wurde durch erneute Zentrifugation in lösliche (sup) und unlösliche Fraktionen (pellet 2) getrennt. Die Analyse gleicher Proteinmengen im *Western Blot* erfolgte unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen Parkin (α -Parkin) gerichtet war. Als Ladekontrolle diente Aktin, das mit einem Antikörper (α -Aktin) nachgewiesen wurde.

2.4.2.2 Einfluss der Parkin-Überexpression auf die Expression anderer Gene

2.4.2.2.1 Einfluss von Parkin auf andere Parkinson-assoziierten Gene

Neben Parkin konnten weitere Gene den erblichen Formen der Parkinson-Erkrankung eindeutig zugeordnet werden. Trotz der verschiedenen Ursachen der erblichen Formen zeigen sie überlappende Merkmale, wie eine nigrostratale dopaminerge Neurodegeneration. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten, dass einige der Parkinson-assoziierten Gene funktionell verknüpft sind. So wurde z.B. demonstriert, dass Parkin den Verlust von PINK1 kompensieren kann (Exner et al., 2007; Lutz et al., 2009; Park et al., 2006). Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die Überexpression von Parkin einen Einfluss auf andere Parkinson-assoziierten Gene hat. Hierzu wurde aus Gehirnen von Mäusen der transgenen Linien RNA isoliert und in quantitativer *Real Time* PCR untersucht. Analysiert wurden die mRNA-Level der rezessiven Gene PINK1 und DJ-1, sowie der dominanten Gene α -Synuclein (α -Syn) und LRRK2. Weder die Überexpression

von Wt-Parkin, noch der Mutante W453X führte in der Maus zu einer signifikanten Expressionsänderung der untersuchten Parkinson-assoziierten Gene (Abb. 30).

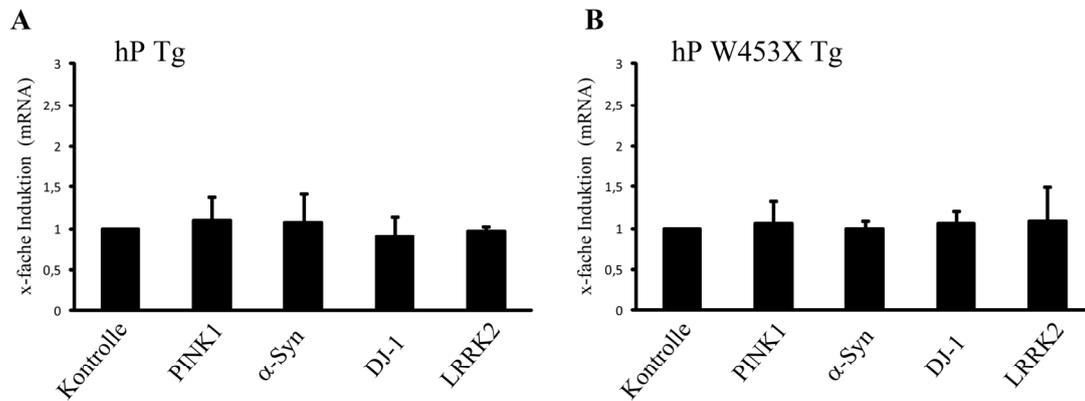


Abbildung 30: Parkin hat keinen Einfluss auf die Expression PD-assoziiierter Gene

Das Gehirn drei Monate alter Tiere der Linien hP Tg1 (A) und hP W453X Tg2 (B) wurde präpariert und Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere desselben Wurfs verwendet. Die mRNA-Level wurden mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge der jeweiligen spezifischen mRNA der transgenen Tiere in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin.

2.4.2.2.2 Einfluss von Parkin auf Gene des Dopamin-Metabolismus

Ein pathologisches Merkmal der Parkinson-Erkrankung ist der Verlust dopaminerger Neuronen. Untersuchungen an *Parkin-Knock Out*-Mäusen zeigten einen möglichen Einfluss von Parkin auf das dopaminerge System und auf die nigrostratale Funktion (siehe 1.3.5.). Es sollte daher analysiert werden, ob die Überexpression von Parkin bzw. der Mutante eine veränderte Expression von Genen, die am Dopamin-Metabolismus beteiligt sind, zur Folge hat. Mit Hilfe von *Real Time* PCR-Analysen konnte kein signifikanter Unterschied in den Expressionslevel der untersuchten Gene im Gehirn drei Monate alter transgener Linien detektiert werden (Abb. 31).

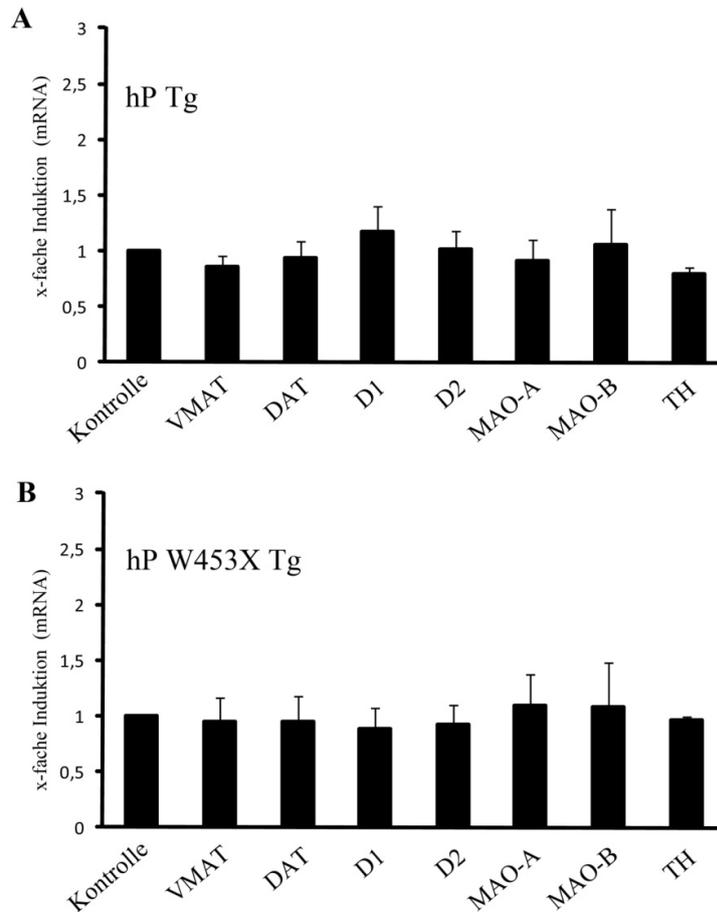


Abbildung 31: Parkin hat keinen Einfluss auf die Expression von Genen des Dopamin-Metabolismus

Das Gehirn drei Monate alter Tiere der Linien hP Tg1 (A) und hP W453X Tg2 (B) wurde präpariert und Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere desselben Wurfs verwendet. Die mRNA-Level wurden mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge der jeweiligen mRNA der transgenen Tiere in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Gezeigt ist Induktion der mRNA des vesikulären Monoamintransporter (VMAT), Dopamintransporter (DAT), Dopaminrezeptor 1 (D1), Dopaminrezeptor (D2), Monoaminoxidase A (MAO-A), Monoaminoxidase B (MAO-B) und Tyrosinhydroxylase (TH).

2.4.2.2.3 Einfluss von Parkin auf Gene, die für die mitochondriale Funktion oder Apoptose verantwortlich sind

Nachdem im Zellkultur-System gezeigt werden konnte, dass Parkin einen positiven Einfluss auf die mitochondriale Funktion und das Überleben der Zelle ausüben kann, wurde nun die Expression verschiedener Gene, die mit diesen Abläufen in Verbindung stehen, in den transgenen Mäusen analysiert. In beiden transgenen Linien konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster der mitochondrialen Chaperone Mortalin und Hsp60, sowie der pro-apoptotischen Gene Bad, Bax und Bak beobachtet

werden (Abb. 32). Auch die Expression der Gene, die sich positiv auf das Überleben der Zelle auswirken, wie die NF κ B-Untereinheit p65 oder Bcl-2, waren unter diesen basalen Bedingungen nicht beeinflusst. Zu beachten ist allerdings, dass die Expressionslevel der untersuchten Gene nicht zwangsläufig mit deren Aktivitätszustand korrelieren. Die Funktion der untersuchten Faktoren wird teilweise z.B. durch posttranskriptionelle Modifikationen und Veränderung der subzellulären Lokalisation reguliert. Ein Einfluss von Parkin auf Apoptose und mitochondriale Integrität kann somit nicht ausgeschlossen werden.

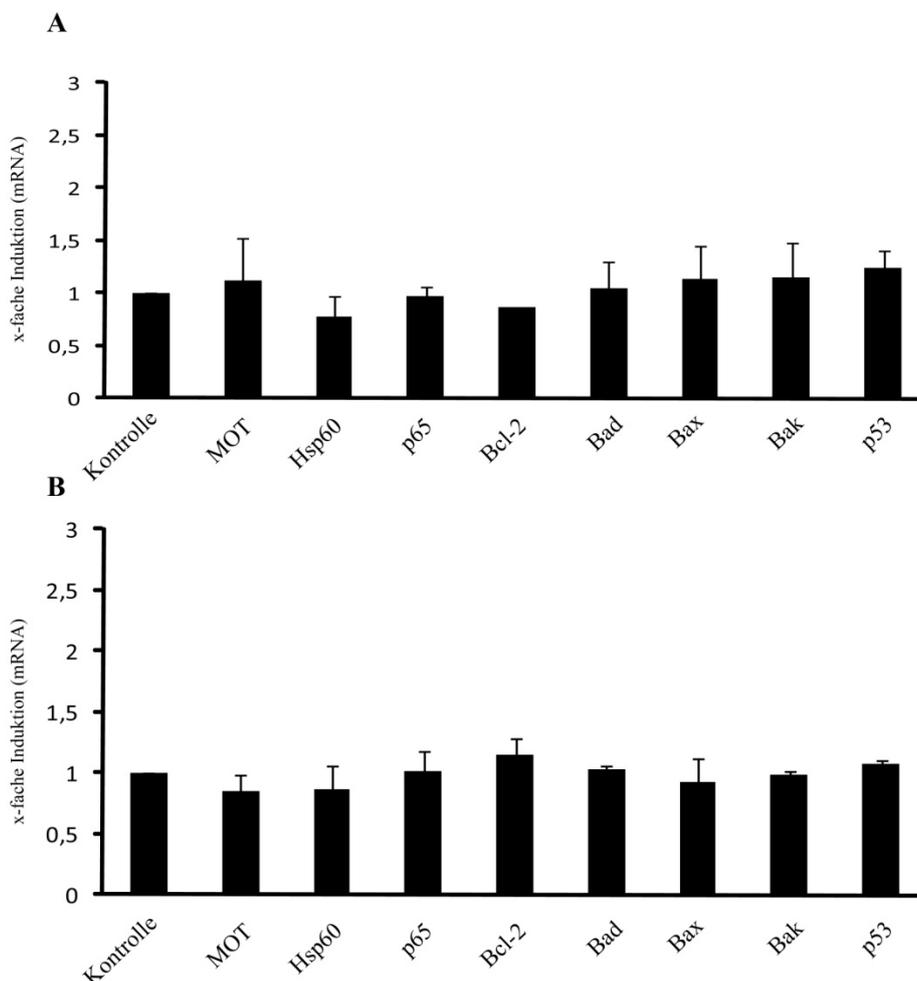


Abbildung 32: Parkin hat keinen Einfluss auf Gene der mitochondrialen Integrität und Apoptose

Das Gehirn drei Monate alter Tiere der Linien hP Tg1 (A) und hP W453X2 (B) wurde präpariert und Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere desselben Wurfs verwendet. Die mRNA-Level wurden mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge der jeweiligen mRNA der transgenen Tiere in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Gezeigt sind die mRNA-Level von Mortalin (MOT), *Bcl-2-associated agonist of cell death* (Bad), *Bcl-2 associated protein X* (Bax), *Bcl-2 antagonist/killer* (Bak), *B cell lymphoma 2* (Bcl- 2), p53, p65 und *heat shock protein 60* (Hsp60).

2.4.2.2.4 Einfluss von Parkin auf NFκB-Zielgene

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Parkin im Zellkultur-Modell den NFκB-Signalweg aktivieren und somit eine erhöhte Transkription von NFκB-Zielgenen induzieren kann. Zur Analyse, ob die Überexpression von Parkin bzw. der Parkin-Mutante auch in der Maus zu einer NFκB-Aktivierung führt, wurde von drei Monaten alten Tieren Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Mengen verschiedener NFκB-Zielgene quantifiziert. Untersucht wurde die Expression von Genen der Stress-Abwehr, wie *Manganese superoxide dismutase* (MnSOD) und *NAD(P)H-quinone oxidoreductase* (NQO1), sowie der anti-apoptotischen Gene Bcl-xL, XIAP und cIAP (Pahl, 1999). Wie aus Abbildung. 33 hervorgeht, reichte eine alleinige Überexpression von Parkin nicht aus, um eine verstärkte Transkription von NFκB-Zielgenen in der Maus zu bewirken.

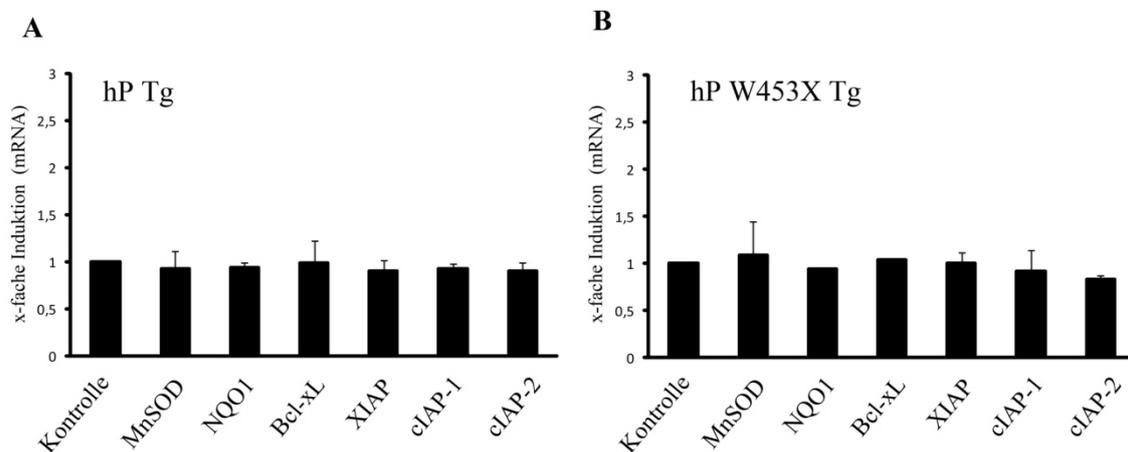


Abbildung 33: Parkin führt nicht zu einer basalen Expressionserhöhung von NFκB-Zielgenen

Das Gehirn drei Monate alter Tiere der Linien hP Tg1 (A) und hP W453X Tg2 (B) wurde präpariert und Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere desselben Wurfs verwendet. Die mRNA-Level wurden mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge der jeweiligen mRNA der transgenen Tiere in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. Gezeigt sind die mRNA-Level der *Manganese superoxide dismutase* (MnSOD), *NAD(P)H-quinone oxidoreductase* (NQO1), *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL), *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP), *cellular inhibitor of apoptosis-1* (cIAP-1) und *cellular inhibitor of apoptosis-2* (cIAP-2).

Unter basalen Bedingungen konnte keine erhöhte NFκB-Aktivierung festgestellt werden. Wie jedoch in den vorherigen Versuchen gezeigt, führte die Parkin-Expression *per se* nicht zu einer übermäßigen NFκB-Aktivierung, sondern übte unter moderaten Stressbedingungen einen permissiven Effekt aus. Um dies experimentell in den transgenen

Mäusen zu untersuchen, wurden primäre corticale Neuronen von Embryonen der Linie hP Tg2 sowie von Wildtyp-Mäusen präpariert und für mindestens vier Tage kultiviert. Anschließend wurden die Neuronen mit $\text{TNF}\alpha$ gestresst und nukleärer Extrakt dieser Zellen in *EMSA*s auf die Bindung an die NF κ B-Konsensus-Sequenz untersucht. In unbehandelten Neuronen konnte keine Bande und somit keine Aktivierung von NF κ B detektiert werden. Interessanterweise konnte aber unter Stress eine verstärkte Aktivierung von NF κ B in den Neuronen der Linie hP Tg2 beobachtet werden. Die Identität der erhaltenen Bande wurde mit einem Antikörper gegen p65 verifiziert (Abb. 34).

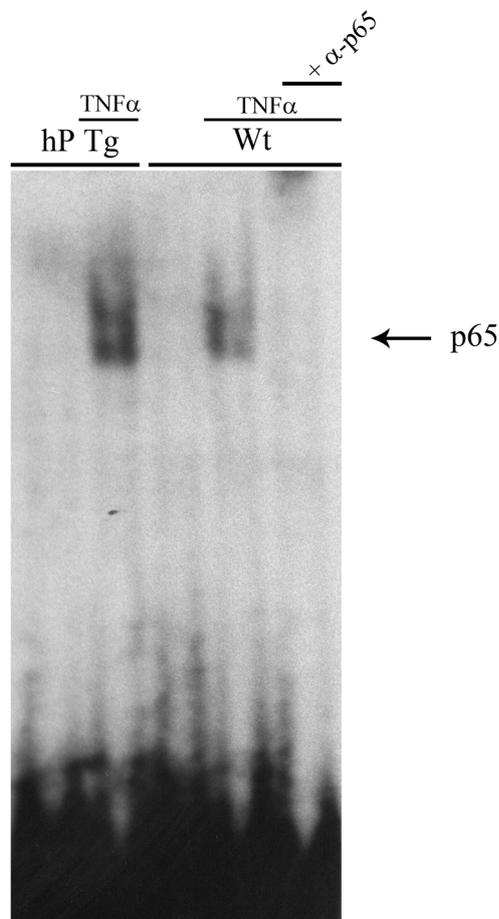


Abbildung 34: NF κ B-Aktivierung in Neuronen

Primäre corticale Neuronen von Wt-Embryonen und Embryonen der Parkin-überexprimierenden Linie hP Tg2 wurden für 30 min mit $\text{TNF}\alpha$ (25 ng/ml) inkubiert. Nukleärer Extrakt dieser Zellen sowie von ungestressten Neuronen wurde mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden der NF κ B-Konsensus-Sequenz inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. *Supershift*-Analysen wurden mit einem Antikörper, der gegen die NF κ B-Untereinheit p65 (α -p65) gerichtet ist, durchgeführt.

2.4.2.3 *Inokulation der Parkin-transgenen Tiere mit PrP^{Sc}/Prionen*

Unter basalen Bedingungen konnte kein Unterschied der untersuchten Gene auf Transkriptionsebene zwischen den Parkin-überexprimierenden Linien und Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Parkin entfaltet jedoch sein neuroprotektives Potential unter Stressbedingungen; so konnte eine verstärkte NFκB-Aktivierung durch Parkin nur in gestressten Neuronen beobachtet werden. Nachdem im Co-Kultivierungs-*Assay* gezeigt werden konnte, dass Parkin vor PrP^{Sc}-induzierter Toxizität schützt, sollte dieses protektive Potential auch *in vivo* analysiert werden. Hierzu wurden Mäuse der Linie hP Tg2 und Wildtyp-Mäuse mit einem Maus-adaptierten PrP^{Sc}/Prionen-Stamm (RML) intracerebral inokuliert. Derart infizierte Mäuse zeigen eine Propagierung von Proteinase K-resistentem und infektiösem PrP^{Sc} im Gehirn, sowie die klassischen histopathologischen Veränderungen von Prion-Erkrankungen wie Spongiose, Astrogliose und neuronalen Zellverlust. Für den Versuch wurden die zu untersuchenden Tiere in drei Gruppen eingeteilt. Die Tötung der Tiere erfolgte 120 dpi (*days post inoculation*), 140 dpi, sowie nach Auftreten terminaler Anzeichen, die mit Prion-Erkrankungen assoziiert sind. Pro Gruppe wurden jeweils 8 Tiere, die humanes Parkin überexprimieren, sowie 10 Wildtyp-Geschwistertiere analysiert. Die Infektionsversuche und Auswertungen wurden freundlicherweise von Dr. Gerda Mitteregger am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) durchgeführt.

2.4.2.3.1 *Parkin hat keinen Einfluss auf die Überlebensdauer der infizierten Mäuse*

Zunächst wurde der Einfluss der Überexpression von Parkin auf das Überleben der PrP^{Sc}/Prionen-infizierten Mäuse untersucht. Parkin-Transgene und Wildtyp-Tiere wurden mit PrP^{Sc}/Prionen intracerebral inokuliert und das Auftreten Prion-relevanter Symptome abgewartet. Zeigten die Mäuse terminale Anzeichen, so dass davon auszugehen war, dass sie innerhalb der nächsten 72 h sterben würden, wurden sie getötet. Die infizierten transgenen Tiere zeigten jedoch keinen Unterschied in der Überlebensdauer im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Mäusen. Im Durchschnitt zeigten beide Linien eine Überlebensdauer von 148 Tagen nach erfolgter Inokulation (Abb. 35).

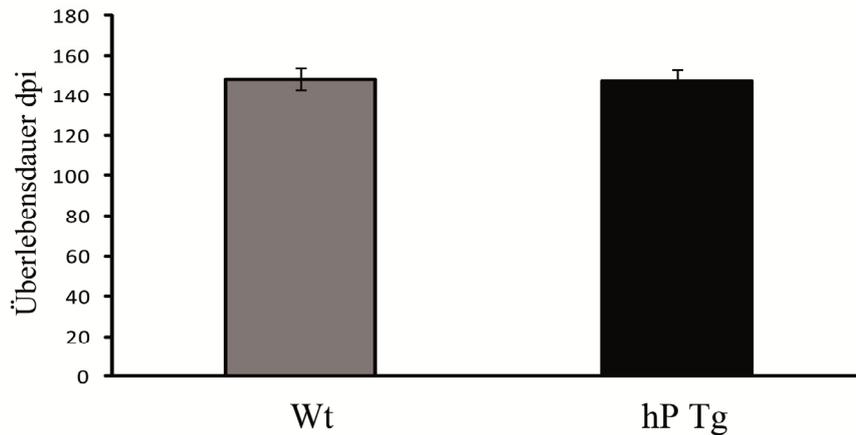


Abbildung 35: Überlebensdauer der PrP^{Sc}/Prionen-inokulierten Mäuse

6 Wochen alte Mäuse der Wt-Parkin-überexprimierenden Linie (hP Tg2) und Wildtyp-Tiere wurden mit 30 µl eines 1%igen RML-Hirnhomogenats intracerebral inokuliert und auf das Auftreten Prion-relevanter Symptome hin überwacht. Tiere, die terminale Symptome aufwiesen, wurden getötet. Gezeigt ist die Überlebensdauer, bzw. die Zeit bis zum Einsetzen terminaler Symptome nach erfolgter Inokulation. Analysiert wurden 8 transgene und 10 Wt-Mäuse.

2.4.2.3.2 PrP^{Sc}/Prionen-infizierte Parkin-transgene Tiere zeigen keinen Unterschied in der neuronalen Zelldichte der CA1-Region des Hippocampus

Als weiteres pathologisches Merkmal wurde der Zellverlust in den infizierten Mäusen untersucht. Viele murine Prion-Stämme wirken gezielt auf den Hippocampus. Die Neuronen der CA1-Region scheinen dabei am empfindlichsten zu sein. Um einen möglichen Einfluss von Parkin auf ein frühes Stadium der PrP^{Sc}/Prionen-induzierten Pathogenese zu untersuchen, wurde die Zelldichte der CA1-Neuronen nicht nur in terminalen Tieren, sondern auch in Tieren 120 dpi und 140 dpi bestimmt. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte ein Unterschied in der numerischen Zelldichte der CA1-Neuronen zwischen infizierten transgenen und infizierten Wt-Mäusen beobachtet werden (Abb. 36). Die Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Mehdi Shakarami am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) durchgeführt.

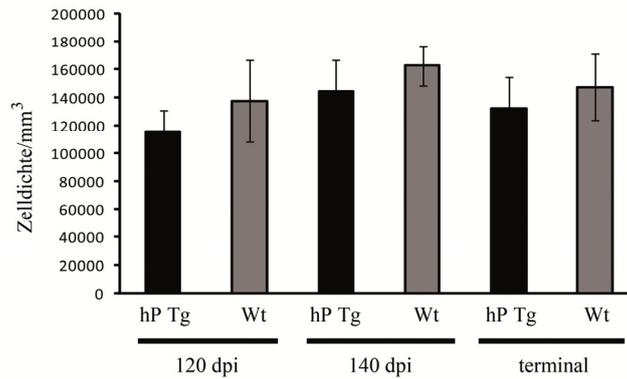


Abbildung 36: Numerische Zelldichte der CA1-Neuronen in PrP^{Sc}/Prionen-infizierten Mäusen

6 Wochen alte Mäuse der Wt-Parkin-überexprimierenden Linie (hP Tg2) und Wildtyp-Tiere (Wt) wurden mit 30 µl eines 1%igen RML-Hirnhomogenats intracerebral inokuliert. Die Mäuse wurden 120 dpi, 140 dpi, bzw. im terminalen Stadium analysiert. Gezeigt ist die numerische Zelldichte der Neuronen der CA1-Region des Hippocampus, deren Bestimmung mit der *physical dissector* Methode durchgeführt wurde (Sterio, 1984). Pro Gruppe wurden 8 transgene und 10 Wt-Tiere analysiert. Die Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Mehdi Shakarami am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) durchgeführt.

2.4.2.3.3 PrP^{Sc}/Prionen-infizierte Parkin-transgene Tiere zeigen keinen Unterschied in der PrP^{Sc}-Propagierung

Als weiteres Merkmal der PrP^{Sc}/Prionen-Infektion wurde der Gehalt an PrP^{Sc} im Gehirn untersucht. Aus dem Gehirn der infizierten Mäuse wurde Homogenat hergestellt, mit Proteinase K verdaut und im *Western Blot* analysiert. Weder in prä-terminalen Stadien (120 dpi und 140 dpi), noch in terminalen Mäusen führte die Überexpression von Parkin zu einer Veränderung des PrP^{Sc}-Gehalts (Abb. 37).

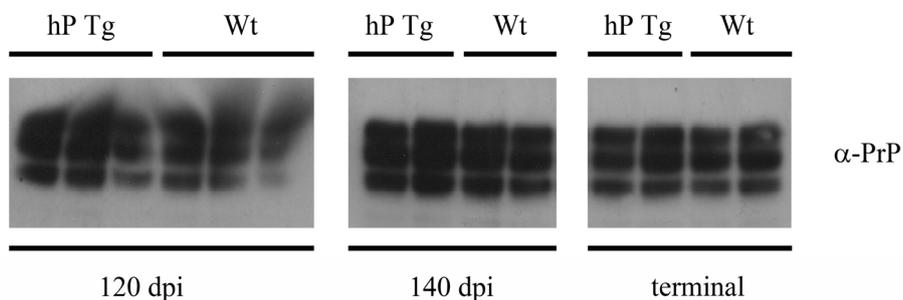


Abbildung 37: Parkin hat keinen Einfluss auf die PrP^{Sc}-Propagierung in infizierten Tieren

6 Wochen alte Mäuse der Wt-Parkin-überexprimierenden Linie (hP Tg 2) und Wildtyp-Tiere (Wt) wurden mit 30 µl eines 1%igen- RML Hirnhomogenats intracerebral inokuliert. Die Mäuse wurden 120 dpi, 140 dpi, bzw. im terminalen Stadium analysiert. Aus dem gesamten Gehirn wurde Homogenat hergestellt, mit Proteinase K verdaut und im *Western Blot* unter Verwendung eines Antikörpers gegen PrP analysiert.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Infektionsversuchen sagen, dass Parkin in diesem Maus-Modell nicht gegen PrP^{Sc}-induzierte Pathomechanismen protektiv wirkt.

2.5 DAS PARKIN CO-REGULIERTE GEN PACRG

Die meisten der erzeugten Parkin-KO-Maus-Modelle zeigten nicht die charakteristischen Merkmale der Parkinson-Erkrankung, wie den Verlust dopaminerger Neuronen. Interessanterweise konnte ein neues Gen identifiziert werden, das über einen bi-direktionalen Promotor mit Parkin in Verbindung gebracht werden kann. Das sogenannte Parkin Co-Regulierte Gen (PACRG) befindet sich in einer *head to head* Anordnung zu Parkin, wird jedoch von dem gegenüberliegenden DNA Strang kodiert. Beide Gene teilen sich einen 204 bp langen bi-direktionalen Promotor (West et al., 2003). Über die Funktion von PACRG ist nicht viel bekannt. Erstaunlicherweise konnte eine PACRG-Immunoreaktivität in *Lewy Bodies* von Parkinson-Patienten gefunden werden, was die Spekulation anregt, dass PACRG zur Pathogenese der Parkinson-Erkrankung beitragen könnte (Taylor et al., 2007). Bislang sind nur wenige bi-direktionale Promotoren in der Literatur beschrieben. Gene, die sich einen Promotor teilen, zeigen häufig ähnliche Funktionen und können auf ähnliche oder gleiche Signalwege einwirken (Li et al., 2006). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob und in welcher Weise Parkin und PACRG funktionell interagieren.

2.5.1 Verschiedene Stressoren induzieren eine Erhöhung der PACRG-mRNA

Parkin ist ein stress-induzierbares Protein. Die Tatsache, dass Parkin und PACRG sich einen Teil des Promotors teilen, legt die Vermutung nahe, dass auch PACRG als Antwort auf Stress in der Zelle hochreguliert wird. Um diese Frage zu klären, wurden SH-SH5Y-Zellen mit dem mitochondrialen Stressor CCCP (Abb. 38A) bzw. mit dem ER-Stressor Thapsigargin (Abb. 38B) behandelt. Die Menge Parkin- bzw. PACRG-spezifischer mRNA wurde mittels quantitativer *Real Time* PCR analysiert. Analog zur Hochregulation von Parkin konnte eine Hochregulation von PACRG in gleichem Maße als Antwort einer gestörten mitochondrialen Integrität oder ER-Stress beobachtet werden. Diese Hochregulation konnte auch in primären Zellen beobachtet werden. *Mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) sowie primäre corticale Neuronen wurden mit den ER-Stressoren

Thapsigargin oder Tunicamycin behandelt. In den Fibroblasten konnte eine bis zu 6-fache Hochregulation (Abb. 38C) und in den Neuronen eine ca. 4-fache Induktion (Abb. 38D), sowohl der Parkin-mRNA, als auch der PACRG-mRNA gezeigt werden.

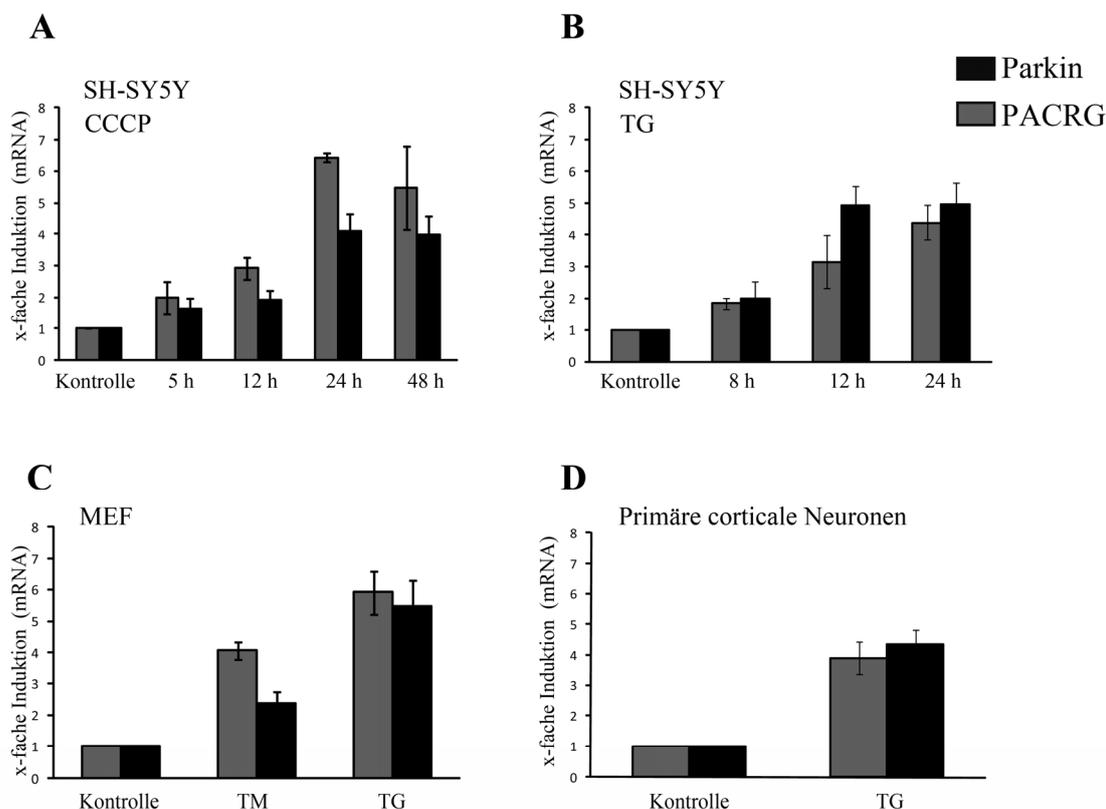


Abbildung 38: PACRG- und Parkin-mRNA werden durch Stress hochreguliert

(A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit 10 μ M CCCP oder mit 10 μ M Thapsigargin (B) für die angegebene Dauer inkubiert und anschließend Gesamt-RNA isoliert. Der Gehalt Parkin-spezifischer mRNA wurde mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge Parkin-spezifischer und PACRG-spezifischer mRNA der behandelten Zellen in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin. (C) Analog wurde der Gehalt PACRG-spezifischer mRNA in primären Zellen untersucht. MEF-Zellen aus Mäusen der Inzuchtlinie C57BL/6J wurden mit 1 μ M Thapsigargin (TG) bzw. 2 μ g/ml Tunicamycin (TM) für 14 h inkubiert. (D) Corticale Neurone von 14.5 dpc Embryonen der Inzuchtlinie FvB wurden mit 1 μ M Thapsigargin (TG) gestresst.

2.5.2 PACRG-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber Stress

Vorherige Versuche zeigten, dass der Verlust von Parkin zu einer verringerten Zellvitalität führt. Analog sollte die Auswirkung einer verminderten PACRG-Expression bzw. die Auswirkung eines kombinierten *Knock Downs* von PACRG und Parkin untersucht werden. SH-SY5Y-Zellen wurden entweder einzeln mit siRNA für Parkin oder PACRG transfiziert oder mit beiden siRNAs co-transfiziert. Dies resultierte in einer durchschnittlichen

40%igen Erniedrigung der Parkin-mRNA-Menge bzw. in einem Rückgang der PACRG-mRNA-Menge um etwa 60%. Anschließend wurden die Zellen mit Thapsigargin bzw. Tunicamycin oder CCCP gestresst und die Vitalität der Zellen mit dem *Vybrant MTT Cell Proliferation Assay* analysiert. Für alle verwendeten Stressoren konnte sowohl in den Parkin-siRNA-transfizierten Zellen, als auch in PACRG-siRNA-transfizierten Zellen, ein Rückgang der Lebensfähigkeit um etwa 20% in Bezug auf Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen beobachtet werden (Abb. 39). Ein kombinierter *Knock Down* von PACRG und Parkin, hatte jedoch keinen weiteren Rückgang der Zellvitalität zur Folge.

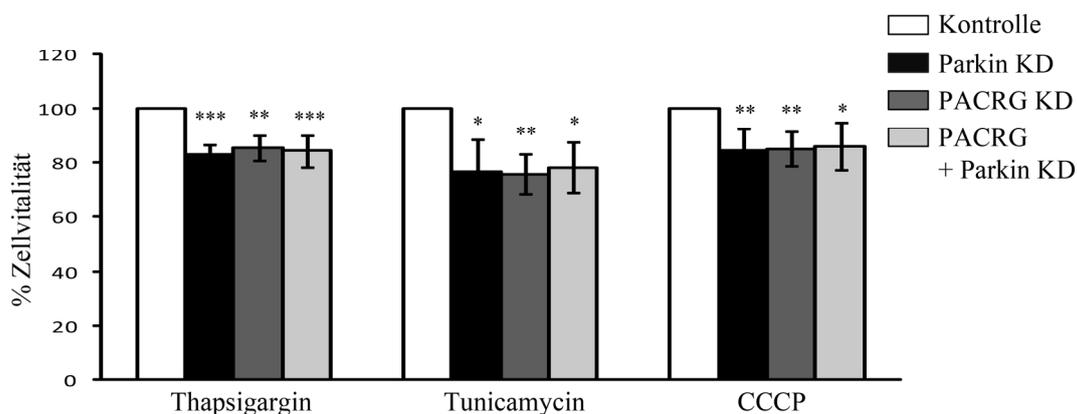


Abbildung 39: PACRG-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber Stress

Ein transients *Knock Down* (KD) wurde in SH-SY5Y-Zellen durch Transfektion mit Parkin-siRNA bzw. PACRG-siRNA oder einer Kontroll-siRNA induziert. Drei Tage später wurden die Zellen für 16 h mit 10 μ M Thapsigargin bzw. 2 μ g/ml Tunicamycin oder 10 μ M CCCP gestresst. Anschließend wurde die Zellvitalität mit dem *MTT-Assay* analysiert. Gezeigt ist die relative Zellvitalität der Parkin- bzw. PACRG-siRNA-transfizierten Zellen zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (gleich 100% gesetzt). Die Abbildung repräsentiert die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, wobei jeder Ansatz in Triplikaten durchgeführt wurde. *** $p < 0,0005$; ** $p < 0,005$; $p < 0,05$.

2.5.3 PACRG besitzt ein neuroprotektives Potential

Zur Klärung der Frage ob PACRG, ähnlich wie Parkin, ein protektives Potential besitzt, wurden SH-SH-SY5Y-Zellen transient mit Expressionsplasmiden für Parkin, PACRG oder einem Kontrollvektor transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 10 μ M Thapsigargin gestresst und der Anteil apoptotischer Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen aktive Caspase-3 analysiert. Interessanterweise konnte auch die Überexpression von PACRG einen Rückgang der Apoptose-Rate um ca. 50% bewirken. PACRG scheint daher ein ähnliches protektives Potential wie Parkin zu besitzen. Die

Überexpression beider Proteine führte jedoch zu keinem weiteren Rückgang der Apoptose-Rate (Abb. 40).

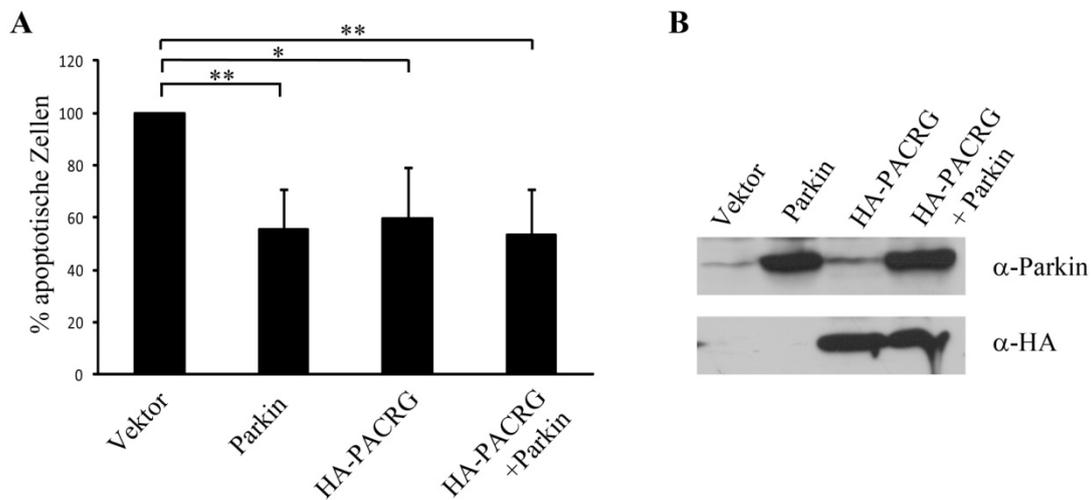


Abbildung 40: PACRG besitzt ein neuroprotektives Potential

(A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Parkin und/oder HA-PACRG oder mit einem Kontrollvektor transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Kontrollvektor konstant gehalten. 24 h später wurden die Zellen für 12 h mit 10 μ M Thapsigargin inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen wurden mit dem spezifischen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 identifiziert und gezählt. Zu sehen ist der relative prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in den Parkin- bzw. PACRG-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen (gleich 100% gesetzt). (B) Zur Expressionskontrolle wurden parallel SH-SY5Y-Zellen mit den gleichen Konstrukten transfiziert und mittels *Western Blot* analysiert. Die Parkin-Expression wurde mit einem Antikörper gegen Parkin, HA-PACRG durch einen Antikörper gegen HA nachgewiesen. ** $p < 0,005$; * $p < 0,05$.

2.5.4 Sind PACRG und Parkin funktionell reziprok?

Es konnte im *Caspase-Assay* gezeigt werden, dass PACRG ein ähnliches neuroprotektives Potential wie Parkin besitzt. Dies lässt vermuten, dass diese Proteine redundante Funktionen ausüben könnten. Es wäre daher möglich, dass der mangelnde Phänotyp der Parkin-Maus-Modelle darauf beruht, dass in diesen Tieren als kompensatorischer Mechanismus die Expression von PACRG verändert ist. Daher wurde aus den Gehirnen von Parkin-KO-Mäusen, sowie von Mäusen der generierten Linie hP Tg2 Gesamt-RNA isoliert und der Gehalt der PACRG-spezifischen mRNA mit quantitativer *Real Time* PCR bestimmt. Weder in den Parkin-KO-Mäusen, noch in den Parkin-überexprimierenden Mäusen konnte jedoch ein verändertes Expressionsmuster von PACRG im Bezug auf die jeweiligen Kontrolltiere beobachtet werden (Abb. 41).

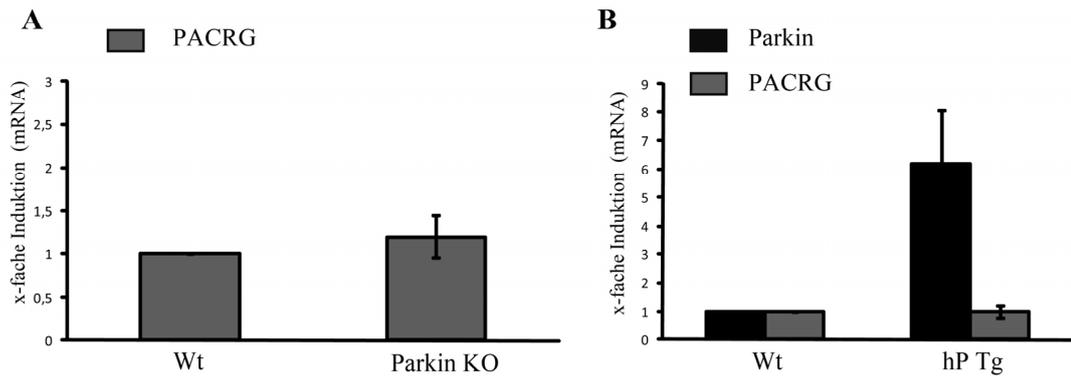


Abbildung 41: Die PACRG-mRNA-Mengen sind in Park-KO- und Parkin-transgenen Mäusen unverändert

(A) Das Gehirn drei Monate alter Tiere der Parkin-KO-Linie und der Linie hP Tg1 (B) wurde präpariert und Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere desselben Wurfs verwendet. Die mRNA-Level wurden mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge der Parkin- bzw. PACRG-spezifischen mRNA in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin.

Zusätzlich wurde der Effekt eines transienten *Knock Downs* in SH-SY5Y-Zellen untersucht. SH-SY5Y-Zellen wurden mit siRNA für Parkin bzw. PACRG transfiziert und drei Tage später die RNA-Menge mittels *Real Time* PCR quantifiziert. Wie aus Abbildung 42 ersichtlich, führt eine verminderte Parkin-Expression zu keiner Veränderung des PACRG-mRNA-Gehalts und umgekehrt.

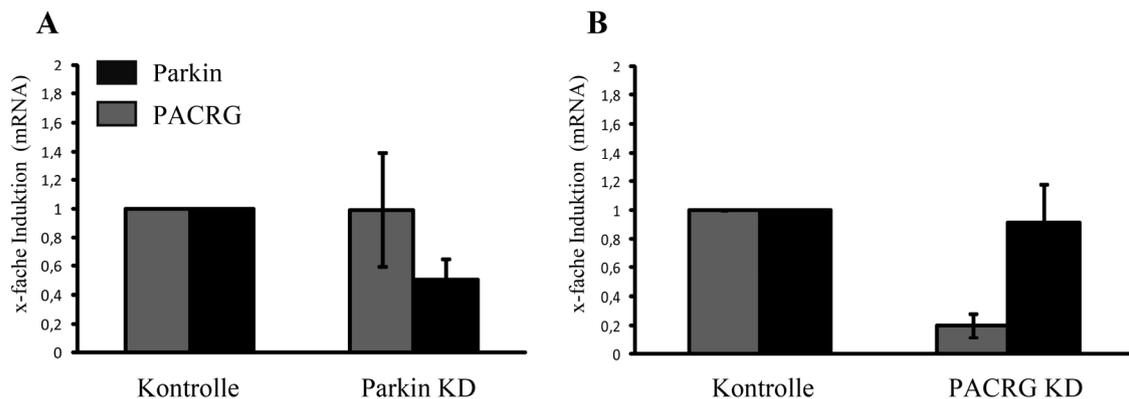


Abbildung 42: Die Mengen der PACRG-mRNA und Parkin-mRNA zeigen keine Abhängigkeit voneinander

Ein transienter *Knock Down* (KD) wurde in SH-SY5Y-Zellen durch Transfektion mit Parkin-siRNA (A) bzw. PACRG-siRNA (B) oder einer Kontroll-siRNA induziert. Drei Tage später wurde die Parkin- bzw. PACRG-spezifische mRNA mit quantitativer Reverse Transkriptase *Real Time* PCR analysiert. Angegeben ist die relative Menge der jeweiligen mRNA in Bezug auf die jeweiligen Kontrollen, die gleich eins gesetzt wurden. Normalisiert wurde über das Haushaltsgen β -Aktin.

3 DISKUSSION

Die Parkinson-Erkrankung ist charakterisiert durch den progressiven Verlust dopaminerger Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta*. Die Ursachen dieser Erkrankung, sowie der selektiven Vulnerabilität dopaminerger Neuronen sind noch weitgehend ungeklärt. Die Entdeckung monogen-erblicher Formen revolutionierte die Parkinson-Forschung und eröffnete die Möglichkeit, anhand von Zellkultur- und Tier-Modellen einen weiteren Einblick in die pathologischen Mechanismen der Erkrankung zu erhalten. Die Mehrheit der autosomal rezessiven Formen der Parkinson-Erkrankung wird durch Mutationen im Parkin-Gen verursacht, wodurch Parkin eine Sonderstellung unter allen PD-assoziierten Genen einnimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Funktion von Parkin sowohl im Zellkultur-Modell, als auch in transgenen Mäusen, die Wildtyp-Parkin oder die pathogene Mutante W453X überexprimieren, untersucht.

3.1 PARKIN WIRD DURCH VERSCHIEDENE STRESSOREN HOCHREGULIERT

Parkin ist gegen ein enorm großes Spektrum an Stressoren protektiv. Unter basalen Bedingungen liegt Parkin in der Zelle nur in sehr geringer Menge vor. Verschiedene Stressbedingungen, wie ER-Stress (Imai et al., 2000) (Ledesma et al., 2002) (Oda et al., 2008) (Wang et al., 2007b), Behandlung mit Rotenon (Koch et al., 2009), H₂O₂ (Tan et al., 2005), Dopamin (Yang et al., 2006b), Kainat (Henn et al., 2007) oder MPTP (Hyun et al., 2005) (Yang et al., 2006b), führen zu einer Hochregulation von Parkin. Oxidativer Stress, mitochondrialer Stress und ER-Stress werden mit der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung in Zusammenhang gebracht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Störung der mitochondrialen Integrität eine Hochregulation von Parkin bewirkt. Die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit dem Entkoppler CCCP, das zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt, resultierte in einer bis zu 4-fach erhöhten Menge der Parkin-mRNA.

Auch ER-Stress konnte die Parkin mRNA-Menge beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde ER-Stress durch die Behandlung mit Thapsigargin und Tunicamycin hervorgerufen. Thapsigargin ist ein Hemmer der ER-Ca²⁺-ATPase, Tunicamycin hingegen ist ein Inhibitor

der N-Glycosylierung. Die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit Thapsigargin führte zu einem signifikanten bis zu 5-fachen Anstieg Parkin-spezifischer mRNA-Spezies. Untermauert wurde dieses Ergebnis durch die Demonstration der Parkin-Hochregulation in primären Zellen, wie *mouse embryonic fibroblasts* und embryonalen corticalen Neuronen nach Behandlung mit Thapsigargin oder Tunicamycin. Diese Parkin-Induktion konnte auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise war diese Hochregulation von Parkin nicht nur auf Behandlung mit Stressoren beschränkt, die eine Rolle in der Parkinson-Erkrankung spielen. Ebenso PrP^{Sc}-induzierte Toxizität resultierte in einem Anstieg der Parkin-mRNA. PrP^{Sc}/Prionen sind die Ursachen anderer neurodegenerativen Erkrankungen, der Prion-Erkrankungen. Nachdem auch unter diesen Stressbedingungen eine Hochregulation von Parkin zu beobachten war, lässt sich vermuten, dass die Hochregulation von Parkin eine generelle Stressantwort der Zelle darstellt.

3.2 PARKIN IST EIN *TARGET* DER *UNFOLDED PROTEIN RESPONSE* (UPR)

Die beobachtete Erhöhung der Parkin-mRNA-Menge ließe sich zum einen durch Erhöhung der RNA-Stabilität, zum anderen durch eine vermehrte Transkription erklären. In der vorliegenden Arbeit konnte im Falle von ER-Stress eine Regulation auf Transkriptionsebene gezeigt werden. Die Analyse des Parkin-Promotors ergab eine putative ATF4-Bindestelle. Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor ATF4 an den Parkin-Promotor bindet und für die Hochregulation unter ER-Stress verantwortlich ist. ATF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der im Rahmen der *Unfolded Protein Response* über den *PERK*-Signalweg aktiviert wird. Aktiviertes PERK phosphoryliert den eukaryotischen Initiations-Faktor 2 α (eIF2 α), der wiederum die Translation spezifischer mRNA-Spezies, wie ATF4, induziert. Luziferase-Aktivitätstests zeigten nach Behandlung mit Thapsigargin eine deutliche Induktion des Parkin-Promotor-Fragments, das die putative ATF4-Bindestelle enthielt. Weiter wurde in *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* die Bindung von ATF4 an den Parkin-Promotor demonstriert. Die Beobachtung, dass Parkin ein *Target* der UPR zu sein scheint, konnte durch weitere Studien unserer Arbeitsgruppe untermauert werden: Sowohl eine Überexpression von PERK, als auch von ATF4 führte in Luziferase-Aktivitätstests zu einer direkten Induktion des Parkin-Promotors. Im Gegenzug resultierte

ein transienter *ATF4-Knock Down* in SH-SY5Y-Zellen in einer verringerten Parkin-mRNA-Menge nach ER-Stress. Weiter konnte in ChiP (*chromatin-immuno-precipitation*)-Analysen eine verstärkte ATF4-Bindung an den Parkin-Promotor unter Stress gezeigt werden.

Interessanterweise offenbarten die durchgeführten *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* einen weiteren Faktor, der an die putative ATF4-Bindestelle des Parkin-Promotors bindet. In *Supershift*-Analysen konnte dieser als c-Jun identifiziert werden. c-Jun ist ein Protoonkogen, das durch den JNK-Signalweg (*c-Jun N-terminal kinase*) aktiviert wird. Als Gegenspieler des NF κ B-Signalwegs, werden durch den JNK-Signalweg vorrangig apoptotische Mechanismen in Gang gesetzt (Papa et al., 2006). Weiterführende Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass c-Jun im Gegensatz zu ATF4 die Parkin-Transkription reprimierte. Die Anwesenheit von c-Jun verringerte die Parkin-Induktion nach ER-Stress. Luziferase-Aktivitätstests zeigten, dass in Anwesenheit von c-Jun ATF4 nicht mehr in der Lage war, eine Induktion des Parkin-Promotors zu bewirken. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass c-Jun ein dominanter Repressor der ATF4-abhängigen Transkription von Parkin ist.

Die physiologische Relevanz von c-Jun könnte demnach in der Termination der ATF4-abhängigen Induktion von Parkin liegen. Die UPR verfolgt zwei Ziele: Im ersten Schritt wird versucht, die zelluläre Homöostase wiederherzustellen. Zu den frühen Signalwegen der ER-Stressantwort zählt der PERK-Pathway, der vornehmlich protektive Mechanismen in Gang setzt. Sind die Schäden jedoch irreparabel, wird im zweiten Schritt die Apoptose eingeleitet. Unter schwerwiegendem und anhaltendem ER-Stress werden über den IRE1-Signalweg anti-apoptotische Proteine gehemmt und pro-apoptotische Mechanismen wie der JNK-Signalweg aktiviert (Nishitoh et al., 2002) (Kim et al., 2008) (Kim et al., 2006) (Szegezdi et al., 2006). Es wäre also vorstellbar, dass es im ersten Schritt der UPR zur einer ATF4-abhängigen Hochregulation von Parkin kommt, das daraufhin sein protektives Potential entfalten kann. Unter langanhaltendem Stress könnte c-Jun, aktiviert durch den JNK-Signalweg, an den Parkin-Promotor binden und mit dem aktivierenden Potential von ATF4 konkurrieren. Dies würde die Expression des protektiven Parkins supprimieren und das Schicksal der Zelle in Richtung Zelltod drängen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Parkin über den PERK/ATF4-Signalweg der UPR als Konsequenz auf die Behandlung mit Thapsigargin und Tunicamycin hochreguliert wird. Wie jedoch lässt sich die Hochregulation als Antwort einer gestörten mitochondrialen Integrität oder PrP^{Sc}-induzierte Toxizität erklären? Neue Forschungsergebnisse zeigten, dass das ER funktionell mit Mitochondrien interagiert, um gemeinsam physiologische Schlüsselprozesse sowie die Viabilität der Zelle zu steuern (Hayashi et al., 2009; Pizzo und Pozzan, 2007). Der Mechanismus von Toxinen, die vermeintlich primär das ER oder Mitochondrien attackieren, dürfen daher nicht immer isoliert voneinander betrachtet werden. So wurde gezeigt, dass mitochondriale Toxine wie MPTP, 6-OHDA oder Rotenon ebenfalls zu ER-Stress führen (Conn et al., 2004; Ghribi et al., 2003; Holtz und O'Malley, 2003; Holtz et al., 2006; Holtz et al., 2005; Ryu et al., 2005; Ryu et al., 2002; Yamamuro et al., 2006). Weiterführende Analysen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die Behandlung von CCCP ebenfalls zu einer effizienten Auslösung der UPR führt. Dies macht eine Hochregulation von Parkin über den PERK/ATF4- Signalweg auch unter CCCP-Behandlung sehr wahrscheinlich. *Vice versa* führte die Auslösung von ER-Stress wiederum zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Integrität, was die Interaktion beider Organelle auch unter Stressbedingungen verdeutlicht.

Der Mechanismus, der sich hinter dem toxischen Potential von PrP^{Sc} verbirgt, ist weitgehend unklar. Dennoch konnte bereits für das missgefaltete Konformer PrP^{Sc} eine Auslösung von ER-Stress berichtet werden (Hetz et al., 2003; Orsi et al., 2006). Zur Klärung, ob jedoch die beobachtete Hochregulation von Parkin auch in diesem Falle über die UPR bewerkstelligt wird, bedarf es weiterer Analysen.

3.3 PARKIN BESITZT EIN NEUROPROTEKTIVES POTENTIAL UND AKTIVIERT DEN NFκB-SIGNALWEG

Nachdem gezeigt wurde, dass Parkin unter verschiedenen Stressbedingungen hochreguliert wird, stellte sich die Frage, welche Konsequenzen dies für die Zelle nach sich zieht. Im Einklang mit der vorherrschenden Meinung, dass der Verlust der Parkin-Funktion zur Parkinson-Erkrankung führt, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Parkin-Defizienz zu einer erhöhten Zell-Vulnerabilität führt. Sowohl die Behandlung mit den ER-Stressoren Thapsigargin und Tunicamycin, als auch dem mitochondrialen Toxin CCCP führte unter transientem *Knock Down* der Parkin-Expression zu einem signifikanten

Rückgang der Zellvitalität. Selbst der Parkin *Knock Down per se* führte bereits zu einer mangelnden Vitalität der Zellen (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde auch für MEF-Zellen einer Parkin-defizienten Maus eine erhöhte Sensitivität gegenüber Stress nachgewiesen. Dies deutete auf eine mögliche Rolle von Parkin in der zellulären Stressbewältigung. Wir und auch andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass Parkin ein protektives Potential gegen verschiedene Toxine besitzt (siehe Abschnitt 1.3.6). Dieses protektive Potential von Parkin wurde auch gegenüber den toxischen Stimuli, welche in den zuvor beschriebenen Analysen eine Hochregulation von Parkin verursachten, bestätigt. In Gegenwart von Wt-Parkin zeigte sich eine 50%ige Reduktion der Apoptoserate, die durch Thapsigargin ausgelöst wurde. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, in denen Parkin gegen die Überexpression von Pael-R und dem daraus resultierendem ER-Stress protektiv wirkt (Imai et al., 2001). Es stellte sich nun die Frage, wie Parkin diese schützende Funktion gegen ER-Stress bewerkstelligt.

3.3.1 Parkin hat keinen Einfluss auf die UPR

Eine Erklärung für das protektive Potential gegenüber ER-Stress könnte der direkte Einfluss von Parkin auf den Schweregrad von ER-Stress sein. BiP gilt als Sensor der Stressantwort, so dass über dessen Expressionsniveau eine Aussage über die Effizienz der Stressantwort getroffen werden kann. Eine Parkin-Defizienz führte jedoch nicht zu einer Auslösung oder Modulation von ER-Stress. In Parkin-KO-MEFs waren die Level der BiP-mRNA im Vergleich zu Wt-MEFs unter Stressbedingungen unverändert. Auch unter akuten *Knock Down*-Bedingungen oder nach Parkin-Überexpression konnte keine Veränderung im Schweregrad von ER-Stress nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Parkin hat keinen Einfluss auf die mitochondriale DNA (mtDNA)

Wie bereits erörtert, kann mitochondriale Dysfunktion zu ER-Stress führen und ER-Stress wiederum zu mitochondrialer Dysfunktion. In der vorliegenden Arbeit führte die Parkin-Defizienz zu einer erhöhten Vulnerabilität gegen das mitochondriale Toxin CCCP. Könnte Parkin sein protektives Potential auf Ebene der Mitochondrien ausüben? Folgende Daten sprechen für diese Hypothese: Zum einen konnte eine Assoziation von Parkin mit der äußeren Mitochondrien-Membran gezeigt werden (Darios et al., 2003) (Stichel et al.,

2000). Eine Parkin-Defizienz äußerte sich im Drosophila-Modell in einer ausgeprägten mitochondrialen Pathologie, gekennzeichnet durch geschwollene Mitochondrien mit geschädigter Cristae-Struktur (Deng et al., 2008; Greene et al., 2003; Pesah et al., 2004; Poole et al., 2008). Auch der *Knock Down* humanen Parkins in Zellkultur resultierte in einer erhöhten mitochondrialen Fragmentierung und Dysfunktion (Lutz et al., 2009). Mitochondriale Dysfunktion führt zu einer erhöhten ROS-Produktion, was wiederum zu schwerwiegenden Schäden der Zelle, wie z.B. DNA-Mutationen, führt. Aufgrund der räumlichen Nähe zur Atmungskette scheint vor allem die mitochondriale DNA betroffen zu sein, die u.a. für Bestandteile der Atmungskette codiert. In dopaminergen Neuronen von Parkinson-Patienten wurde eine Anhäufung somatischer mtDNA-Mutationen, vornehmlich große Deletionen, beobachtet. Erreichen diese Mutationen einen gewissen Schwellenwert, hat dies wiederum weitere Schädigungen der mitochondrialen Funktion zur Folge und resultiert so in einem Teufelskreis (Bender et al., 2006; Kraytsberg et al., 2006). Kürzlich veröffentlichte Studien weisen daraufhin, dass Parkin die mitochondriale Replikation und Transkription erhöht, um vermutlich die mitochondriale Dysfunktion zu kompensieren. Zudem wurde gezeigt, dass Parkin die mtDNA vor Schäden, ausgelöst durch oxidativem Stress, schützt (Kuroda et al., 2006; Rothfuss et al., 2009). Im Gegenzug zeigten diese beiden Arbeitsgruppen unter transientem Parkin-*Knock Down* eine verringerte mitochondriale Transkription und Replikation. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung untersucht. Jedoch konnte hier unter einer Parkin-Defizienz weder eine erhöhte mtDNA-Mutationsrate, noch eine Beeinflussung der mtDNA auf Transkriptions- oder Replikationsebene festgestellt werden. Möglicherweise ist diese Diskrepanz durch die verschiedenen Versuchsbedingungen zu erklären. Der Parkin-*Knock Down* resultierte in einem durchschnittlichen Rückgang der Parkin-mRNA um 40%. Es wäre vorstellbar, dass dies nicht ausreichte, um einen Effekt auf die mtDNA zu beobachten. In den einzelnen Versuchen konnte jedoch eine bis zu 80%ige Reduktion erzielt werden. Aber auch in diesen individuellen Experimenten konnte keine Beeinflussung der mtDNA oder mtRNA festgestellt werden. Vermutlich bedarf es aber auch eines stabilen *Knock Downs*. Interessanterweise zeigten Proteom-Analysen von Parkin-KO-Mausen ein verringertes Vorkommen mitochondrialer Proteine, wie z.B. der Untereinheiten von Komplex I und IV (Palacino et al., 2004). Dies konnte jedoch nicht durch Mutationen der mtDNA hervorgerufen werden, da diese Proteine von der nukleären DNA codiert werden. Zudem stellt sich die Frage, wie Parkin einen Effekt auf die mitochondriale Biogenese ausüben sollte. Eine Arbeitsgruppe zeigte zwar eine direkte Interaktion mit dem mitochondrialen

Transkriptionsfaktor TFAM und mit mitochondrialer DNA (Rothfuss et al., 2009), wie es aber zu einer intramitochondrialen Lokalisation von Parkin kommen könnte ist unklar.

Ein protektives Potential von Parkin gegenüber mitochondrialen Toxinen ist jedoch nicht von der Hand zu weisen. Welche protektiven Mechanismen von Parkin dafür verantwortlich sind, bleibt Gegenstand derzeitiger Forschung. Neben einer Beeinflussung der Cytochrom c-Freisetzung (Berger et al., 2009; Darios et al., 2003) oder der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen mitochondrialen Fusions- und Teilungsprozessen (Deng et al., 2008; Lutz et al., 2009) wird Parkin auch eine Rolle beim Abbau geschädigter Mitochondrien durch Autophagie zugeschrieben (Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2008; Tanaka, 2010; Vives-Bauza et al., 2010).

3.3.3 Parkin aktiviert den NFκB-Signalweg

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich das protektive Potential jedoch nicht nur gegen Stressoren des ER und der Mitochondrien, sondern auch gegen PrP^{Sc}-induzierte Toxizität. In Anwesenheit von Wildtyp-Parkin, nicht jedoch einer Parkin-Mutante, konnte der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen nahezu auf das Grundniveau zurückgedrängt werden. Aufgrund der enormen Bandbreite des protektiven Potentials liegt die Vermutung nahe, dass Parkin Einfluss auf einen generellen protektiven Signalweg ausübt. Zu diesen zählt der NFκB-Signalweg. Verschiedene Studien zeigten, dass NFκB eine wichtige Funktion in der Erhaltung der neuronalen Integrität, Plastizität und in der Prävention des neuronalen Zelltods hat (Kaltschmidt et al., 2005; Karin und Lin, 2002; Mattson et al., 2000). Zudem konnte der NFκB-Signalweg nicht nur in Zusammenhang mit der Parkinson-Erkrankung (Hunot et al., 1997; Moran et al., 2007), sondern auch mit einer weiteren neurodegenerativen Erkrankung, der Prion-Erkrankung gebracht werden (Bourteele et al., 2007). Gestützt wurde dies durch unsere Beobachtung, dass PrP^{Sc}/Prionen-infizierte Zellen (ScN2a-Zellen) eine Defizienz in der Aktivierung des NFκB-Signalwegs aufweisen.

Der Transkriptionsfaktor NFκB befindet sich unter basalen Bedingungen durch Komplexbildung mit IκB in einem inaktiven Zustand im Zytosol. Aktivierung des Signalwegs durch TNFα oder PMA führt zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes, welcher IκB phosphoryliert, das in Folge ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut

wird. Dadurch wird NF κ B freigesetzt, transloziert in den Nukleus und induziert dort die Transkription entsprechender Zielgene (Baeuerle und Baltimore, 1996).

Es stellte sich die Frage, ob Parkin Einfluss auf den NF κ B-Signalweg ausübt. In Luziferase-Aktivitätstests mit der NF κ B-Konsensus-Sequenz konnte Parkin einen supra-additiven Anstieg der NF κ B-abhängigen Transkription unter Stressbedingungen bewirken. Selbst die Überexpression von Parkin allein hatte eine verstärkte NF κ B-Aktivierung zur Folge. Weitere Beweise für die Interaktion von Parkin mit dem NF κ B-Signalweg lieferten *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* mit der NF κ B-Konsensus-Sequenz. Die Anwesenheit von Parkin führte sowohl in ungestressten, als auch in gestressten Zellen zu einer verstärkten NF κ B-Bindung. Interessanterweise konnte eine NF κ B-Aktivierung selbst bei sehr niedrigen Konzentrationen an TNF α in Parkin-überexprimierenden Zellen beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass Parkin den Schwellenwert für die Aktivierung dieses protektiven Signalwegs senkt.

Was hat diese Beobachtung für eine funktionelle Relevanz? Diese Arbeit, sowie weiterführende Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade essentiell ist für die neuroprotektive Funktion von Parkin. Der Funktionsverlust von Parkin führte zu einer Störung der NF κ B-Aktivierung. Patienten-Fibroblasten mit Parkin-Mutationen wiesen eine deutliche Verminderung der NF κ B-Aktivierung bzw. -Bindung auf. Überdies wurde in weiteren Analysen unserer Arbeitsgruppe deutlich, dass eine Blockierung des NF κ B-Signalwegs zum Verlust der neuroprotektiven Aktivität des Parkin-Proteins führt. Auch auf den protektiven Effekt gegenüber PrP^{Sc} hatte in ersten Versuchen die Gegenwart eines NF κ B-Repressors negative Auswirkungen. Parkin ist eine E3-Ubiquitin-Ligase und könnte daher über Ubiquitylierung Einfluss auf den NF κ B-Signalweg nehmen. Neben einer konventionellen Poly-Ubiquitylierung über K48, die zur proteasomalen Degradierung führt, sind auch Ubiquitylierungen über K63 bekannt, die regulatorische Funktionen erfüllen. In der Tat zeigten Daten unserer Arbeitsgruppe, dass Parkin eine regulatorische Ubiquitylierung von zwei Komponenten des NF κ B-Signalweges, TRAF2 (*TNF-Receptor-associated factor 2*) und IKK γ /NEMO, mediiern kann. Weitere Analysen sind jedoch notwendig, um die Relevanz des NF κ B-Signalwegs für das neuroprotektive Potential gegen ER-Stress und mitochondrialer Dysfunktion zu zeigen.

3.4 IMPLIKATION FÜR DIE PARKINSON-ERKRANKUNG

Die bisherigen Experimente in Zellkultur lieferten wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der physiologischen Funktion von Parkin. Verschiedene Stressoren führten zu einer Induktion der Parkin-Expression. Dabei konnte Parkin als direktes *Target* der UPR unter ER-Stress ermittelt werden. Die Hochregulation von Parkin stellt eine Antwort der Zelle zur Stressbewältigung dar. Parkin zeigte sich gegen verschiedene Stressoren als protektives Protein. In Verbindung mit dem protektiven Potential von Parkin konnten in dieser Arbeit erste Zusammenhänge zwischen Parkin und dem protektiven NFκB-Signalweg hergestellt werden. Parkin sensibilisiert Zellen für Stressoren des NFκB-Signalwegs und kann eine verstärkte Aktivierung dieses protektiven Signalwegs induzieren. Im Gegenzug konnte unter einer Parkin-Defizienz eine erhöhte Vulnerabilität der Zellen und eine reduzierte NFκB-Aktivierung gezeigt werden. Wie lassen sich diese Beobachtungen auf die Parkinson-Erkrankung übertragen? Unter basalen Bedingungen ist Parkin nur in geringen Mengen in der SNpc vorzufinden. Unter Stress erfolgte jedoch eine Parkin-Induktion. So konnte im Gehirn von Patienten mit sporadischer Parkinson-Erkrankung in der Tat erhöhte Parkin-Mengen nachgewiesen werden (Moran et al., 2007). Unter moderaten Bedingungen zeigte sich Parkin als protektiv. Erreicht der zelluläre Stress jedoch einen gewissen Schwellenwert, kann es zu einer Inaktivierung von Parkin kommen. Verschiedene Studien zeigten, dass es zu einer Inaktivierung von Parkin durch Missfaltung und Aggregation, ausgelöst durch erhöhten Stress oder pathogene Mutationen kommt. Auch eine Repression der Parkin-Induktion durch den JNK-Signalweg wäre vorstellbar. Ein Funktionsverlust von Parkin scheint zu Schwierigkeiten in der zellulären Stressbewältigung zu führen. Dies wird verdeutlicht durch das frühe Einsetzen der Parkinson-Erkrankung im Falle von Mutationen des Parkin-Gens. Dopaminerge Neuronen sind aufgrund des Dopamin-Metabolismus einem erhöhten intrinsischen Stress ausgesetzt. Dies stellt eine mögliche Erklärung dar, warum es zu einem selektiven Verlust gerade dieser Neuronen in der Parkinson-Erkrankung kommt. Während des enzymatischen und nicht-enzymatischen Abbaus von Dopamin kommt es zu einer vermehrten ROS-Produktion, was zu schwerwiegenden Schäden der Zelle, wie mitochondriale Dysfunktion und ER-Stress, führen kann. In Gehirnen von Patienten sporadischer Parkinson-Erkrankung konnte durch oxidativem Stress-ausgelöste Modifikationen des Parkin-Proteins festgestellt werden (LaVoie et al., 2005). Während des Alterns kommt es zu einem graduellen Verlust effizienter Stress-Abwehrmechanismen und könnte zu einer mangelnden Hochregulation von Parkin führen.

3.5 CHARAKTERISIERUNG DER PARKIN-TRANSGENEN MÄUSE

Im Menschen führen Parkin-Mutationen zu einem selektiven Verlust dopaminerger Neuronen und zu einer frühen Manifestation der Parkinson-Erkrankung. Es wird angenommen, dass der Verlust der Parkin-Funktion und die mögliche Akkumulationen von Parkin-Substraten für den Zellverlust verantwortlich seien. Verschiedene Arbeitsgruppen erzeugten Parkin-defiziente Maus-Modelle, um die Situation in Parkinson-Patienten zu simulieren. Aufgrund der mangelnden Beobachtung signifikanter dopaminerger Neurodegeneration konnte diese Hypothese in diesen Tier-Modellen nicht bestätigt werden und lässt keine allgemein gültige Schlussfolgerung für die physiologische und pathophysiologische Rolle von Parkin zu. In dieser Arbeit wurde daher eine andere Strategie gewählt. Zum einen wurden Mäuse generiert, die Wildtyp-Parkin überexprimieren, um die protektive Funktion und den Einfluss auf mögliche Signalwege zu untersuchen. Zum anderen wurden Mäuse generiert, die die pathogene Mutante W453X überexprimieren. Diese Mutante zeichnete sich bereits im Zellkultur-Modell durch Missfaltung aus, was neben einer Inaktivierung der funktionellen Eigenschaft evtl. auch zu einer toxischen Konsequenz führen könnte. Eine Reihe von Studien belegte, dass eine Inaktivierung von Parkin durch Missfaltung und Aggregation der pathogenen Mutanten hervorgerufen werden (Cookson et al., 2003; Gu et al., 2003; Henn et al., 2005; Schlehe et al., 2008; Sriram et al., 2005; Winklhofer et al., 2003b). Darüber hinaus zeigte sich auch Wildtyp-Parkin als stress-sensitiv und tendierte unter massiven Stressbedingungen zur Missfaltung.

Die in dieser Arbeit generierten transgenen Mauslinien zeigten eine gleichmäßige Expression des Transgens in allen untersuchten Gehirnbereichen. Beide Linien waren lebensfähig, zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren keinen Unterschied in der Lebensdauer, im Verhalten und waren fertil. Die Parkin-Mutante W453X wurde vermehrt in der Detergenz-unlöslichen Fraktion in Gehirnhomogenaten gefunden. In Übereinstimmung mit vorherigen Zellkulturdaten deutete dies also auf eine erhöhte Missfaltung und Inaktivierung dieser Mutante auch *in vivo*. Dies resultierte dennoch nicht in einem stark toxischen Effekt, da auch diese Mäuse lebensfähig waren und keinen Unterschied in der Lebenserwartung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen oder der Wildtyp-Parkin-transgenen Linien aufwiesen. Anzumerken ist dennoch, dass in den Mäusen mit

starker Überexpression auch Wildtyp-Parkin in der Detergenz-unlöslichen Fraktion zu finden war, wenn auch nicht im gleichen Ausmaße wie die Mutante.

3.5.1 Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau anderer Parkinson-assoziiierter Gene

Familiäre Formen der Parkinson-Erkrankung werden durch Mutationen in einer Reihe von Genen hervorgerufen. Dabei konnten Mutationen in den Genen Parkin, PINK1, DJ-1, LRRK2 und α -Synuclein als eindeutige Ursache der Erkrankung identifiziert werden. Pathogene Mutationen dieser Gene führen beim Menschen zu gleichen Symptomen. Dies führt zur Vermutung, dass diese Gene auf gleiche Prozesse der Zelle einwirken könnten, oder sich gegenseitig beeinflussen. Eine funktionelle Verbindung konnte bereits zwischen Parkin und PINK1 dargestellt werden. Parkin konnte den Verlust von PINK1 im Drosophila- und Zellkultur-Modell kompensieren, jedoch nicht *vice versa* (Clark et al., 2006; Exner et al., 2007; Lutz et al., 2009; Park et al., 2006; Yang et al., 2006a). Im Gegensatz zu diesem funktionellen Link konnte in der vorliegenden Arbeit keine Beeinflussung von Wt-Parkin bzw. von der Parkin-Mutante auf die Transkriptionslevel sowohl der rezessiven Gene PINK1 und DJ-1, als auch der dominanten Gene α -Synuclein und LRRK2 gezeigt werden.

3.5.2 Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau von Genen des Dopamin-Metabolismus

Die Parkinson-Erkrankung betrifft hauptsächlich das dopaminerge System. Neben dem Verlust dopaminerger Neuronen und dem daraus resultierendem Mangel an Dopamin im Striatum, konnten auch eine veränderte Expression von Komponenten der dopaminergen Neurotransmission festgestellt werden. So konnte z.B. eine verminderte mRNA- und Protein-Menge des VMAT2 und DAT in *post mortem* Gehirnen von Parkinson-Patienten festgestellt werden (Harrington et al., 1996; Uhl et al., 1994). Die verminderte Expression dieser Transporter führt möglicherweise durch mangelnde intraneuronale Speicherung und verminderte Wiederaufnahme von Dopamin zu einer erhöhten extrazellulären Dopamin-Konzentration. Dies würde wiederum durch Auto-Oxidation oder dem enzymatischen Abbau von Dopamin in einer erhöhten ROS-Produktion resultieren. In Verbindung damit

konnte eine erhöhte MAO-Expression in Parkinson-Patienten beobachtet werden (Jiang et al., 2006). Sowohl die Überexpression von Wt-Parkin als auch der Parkin-Mutante hatte in der Maus keinen Einfluss auf die Transkription der Transporter VMAT2 und DAT sowie der Dopamin-abbauenden Enzyme MAO-A und MAO-B. Auch diese Beobachtung spricht möglicherweise gegen ein toxisches Potential der Mutante. Im Zellkultur-Modell konnte gezeigt werden, dass Parkin die mRNA und Proteinmenge von MAO verringert (Jiang et al., 2006). *In vivo* konnte dies jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Weiter hatte die alleinige Überexpression von Parkin und der Mutante keinen Einfluss auf die Transkription der Tyrosinhydroxylase, wodurch eine massive Beeinträchtigung dopaminerger Neurone ausgeschlossen werden kann. Zudem konnten keine Unterschiede in der Transkription der Dopaminrezeptoren beobachtet werden. Über die Bindungsaffinität der Rezeptoren lässt sich unter diesen Versuchsbedingungen jedoch keine Aussage treffen. In der Maus bewirkte die Überexpression von Wt-Parkin und der pathogenen Mutante W453X keine Veränderungen im Expressionsniveau von Komponenten der dopaminergen Neurotransmission. Da die Analyse am gesamten Gehirn durchgeführt wurde, könnten jedoch kleine Veränderungen in der SNpc und im Striatum überlagert worden sein. Präliminäre HPLC-Analysen bestätigten jedoch, dass keine Veränderung im Dopamin-Gehalt im Striatum der transgenen Mäuse vorlag (Daten nicht gezeigt).

3.5.3 Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau von Genen mit elementarer Funktion in der mitochondrialen Integrität und Apoptose

Eine Reihe von Studien lieferten Beweise, dass Parkin eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität einnimmt (Winklhofer und Haass, 2010). Auch die vorliegende Arbeit konnte Parkin in Zusammenhang mit mitochondrialer Dysfunktion bringen. So führte die Behandlung mit CCCP zu einer Parkin-Induktion, ein Parkin-Verlust hingegen zu einer erhöhten Vulnerabilität gegen CCCP. Neben der Hauptaufgabe als Energie-Lieferant tragen Mitochondrien einen entscheidenden Beitrag zu apoptotischen Mechanismen bei. Es gibt eindeutige Hinweise, dass der Zellverlust bei der Parkinson-Erkrankung auf apoptotische Mechanismen zurückzuführen ist (Anglade et al., 1997; Kosel et al., 1997; Tatton und Kish, 1997). Vor allem der intrinsische Apoptoseweg scheint in der Parkinson-Erkrankung eine wichtige Rolle zu spielen. Veränderte

Expressionsniveaus von p53, Bcl-2, Bcl-xL und Bax in Parkinson-Patienten spiegeln diese Ergebnisse wieder (Hartmann et al., 2002; Hartmann et al., 2001; Marshall et al., 1997; Mogi et al., 1996; Mogi et al., 2000). Auch in einem Toxin-Modell, in dem die Parkinson-Erkrankung durch Behandlung mit MPTP induziert wurde, konnten erhöhte Bax-mRNA-Niveaus in der SNpc gezeigt werden (Hartmann et al., 2001). Da im Zellkultur-Modell Parkin in der Lage war, stressinduzierte Apoptose zu inhibieren, sollte in den Parkin-transgenen Linien die Transkriptionslevel pro-apoptotischer Gene wie p53, Bad, Bax, Bak und anti-apoptotischer Gene wie p65 und Bcl-2 untersucht werden. Trotz einiger Schwankungen konnten keine signifikanten Veränderungen in beiden transgenen Mauslinien beobachtet werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die Menge der Transkripte der untersuchten Gene nicht unbedingt mit deren Aktivierungszustand und Funktionalität korrelieren.

3.5.4 Die transgenen Linien zeigen keinen Unterschied im Transkriptionsniveau von NFκB-Zielgenen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Parkin den protektiven NFκB-Signalweg aktivieren kann. Zu den NFκB-Zielgenen zählen Gene der Stressabwehr, sowie anti-apoptotische Gene (Pahl, 1999). Die alleinige Überexpression von Parkin bzw. der Parkin-Mutante reichte jedoch in der Maus nicht aus, um die Transkription der untersuchten NFκB-Zielgene zu induzieren. Im Zellkultur-Modell konnte zwar die alleinige Überexpression von Parkin eine geringe NFκB-Aktivierung bewirken, jedoch erst unter Stressbedingungen war der Einfluss auf den NFκB-Signalweg von größerem Ausmaß. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Zellkultur-Experimenten, konnte in primären embryonalen Neuronen der Wt-Parkin-überexprimierenden Mäuse eine verstärkte NFκB-Bindung unter leichten Stressbedingungen gezeigt werden.

Zusammenfassend wurden unter basalen Bedingungen keine transkriptionellen Veränderungen der untersuchten Gene in Mäusen, die entweder Wt-Parkin oder die pathogene Mutante W453X überexprimierten, festgestellt. Weitere Versuche sind jedoch notwendig, um einen Einfluss von Parkin auf die Aktivität und Mengen dieser Proteine zu untersuchen.

3.5.5 Die W453X-transgenen Mäuse zeigen keine Hinweise auf ein *toxic gain of function*

Der Verlust der Parkin-Funktion durch homozygote Mutationen ist ein etablierter Mechanismus in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung und ist durch einen frühen Krankheitsbeginn charakterisiert. Allerdings konnten auch heterozygote Mutationen im Parkin-Gen festgestellt werden, was vermutlich einen Risiko-Faktor für die Parkinson-Erkrankung darstellt. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Aufgrund der Größe des Parkin-Gens könnten Mutationen auf dem zweiten Allel schlichtweg übersehen worden sein. Es existiert ferner die Hypothese, dass neben einem Verlust der Parkin-Funktion, auch dominante toxische Mechanismen von Parkin-Mutanten provoziert werden könnten. Die Mehrzahl der Parkin-Mutationen, insbesondere diejenigen, die die C-terminale Domäne betreffen, sind durch Missfaltung und Aggregation gekennzeichnet und stellen dadurch ein mögliches toxisches Potential dar (Cookson et al., 2003; Gu et al., 2003; Henn et al., 2005; Schlehe et al., 2008; Sriram et al., 2005; Wang et al., 2005a; Wang et al., 2005b; Winklhofer et al., 2003b). Ein Hinweis einer möglichen *toxic gain of function* erbrachten Drosophila-Modelle. In transgenen Drosophila-Modellen führte die Expression von Parkin-Mutanten zu einem selektiven Verlust dopaminerger Neuronen (Sang et al., 2007; Wang et al., 2007a).

In dem vorliegenden Maus-Modell konnten jedoch keine Hinweise erhalten werden, dass toxische Mechanismen durch die C-terminal-trunkierte Parkin-Mutante W453X ausgelöst werden. Die W453X-Mäuse zeigten die gleiche Lebensdauer wie Wildtyp-Tiere. Weiterhin konnte keine verstärkte Transkription pro-apoptotischer Gene nachgewiesen werden. Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit dopaminerge Neuronen der SNpc nicht direkt analysiert, die unveränderten TH-Transkripte geben jedoch erste Hinweise, dass keine massive Degeneration dopaminerger Neurone vorlag. Dies steht im Widerspruch zu einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der die Überexpression der C-terminal-trunkierten Parkin-Mutante Q311X auch in der Maus zu toxischen Effekten, wie massive dopaminerge Neurodegeneration, führte (Hart und Xu, 2009). Zwar handelte es sich um eine andere Mutante, als der in dieser Arbeit verwendeten, jedoch haben wir auch für diese Mutante Missfaltung und Aggregation in Zellkultur gezeigt. Ein weiterer Unterschied zu den publizierten Daten ist, dass die Parkin-Mutante mit einem Flag-Tag versehen war. Obwohl sehr unwahrscheinlich, könnte jedoch auch der Flag-Tag diese toxischen Mechanismen provoziert haben, oder mit der Funktion von Parkin interferieren. In dieser Studie wurde

zudem eine massive Überexpression der Parkin-Mutante spezifisch in dopaminergen Neuronen hervorgerufen. Es ist daher unklar, ob die beobachtete Toxizität eine Folge dieser massiven Überexpression oder speziell eine Folge dieser Mutation ist. Eine Maus in der Wildtyp-Parkin überexprimiert wurde, wurde in der publizierten Studie nicht analysiert. Zudem könnten mögliche Positionseffekte des inserierten Transgens die toxischen Auswirkungen bewirkt haben.

Um eine endgültige Schlussfolgerung über eine mögliche *toxic gain of function* in dem vorliegenden Maus-Modell ziehen zu können, bedarf es aber weiterer Untersuchungen auch an älteren Tieren.

3.6 PARKIN SCHÜTZT NICHT VOR PRP^{Sc}-INDUZIERTEN PATHOMECHANISMEN *IN VIVO*

Aus den Daten der Parkin-defizienten Mäusen, bei denen der Verlust von Parkin alleine keine signifikanten Auswirkungen hatte, wird deutlich, dass in der Maus vermutlich zusätzliche toxische Mechanismen notwendig sind, um einen krankheitsähnlichen Phänotyp zu provozieren. In der Tat konnte nur eine signifikante Neurodegeneration in einem Parkin-defizienten Maus-Modell beobachtet werden, in dem zusätzlich eine erhöhte Expression von Pael-R durch viralen Gentransfer erreicht wurde (Kitao et al., 2007). Auch die Expression von mutierten Formen von TAU und Huntingtin in dem Parkin-defizienten Hintergrund führte zu einer Verschlechterung der Pathologie im Vergleich zu den einfachtransgenen Linien (Guerrero et al., 2009; Menendez et al., 2006; Navarro et al., 2008; Rodriguez-Navarro et al., 2008; Rubio et al., 2009).

Um eine mögliche protektive Funktion von Parkin in der Maus zu analysieren, sollten die Wt-Parkin-transgenen Linien zusätzlicher Toxizität ausgesetzt werden. In vorangegangenen Experimenten wurde demonstriert, dass Parkin im Zellkultur-Modell eine ausgesprochene Protektivität gegenüber PrP^{Sc}-induzierter Apoptose ausübte. Zur weiteren Analyse wurden daher Mäuse, die Wt-Parkin überexprimierten mit einem PrP^{Sc}/Prionen-Stamm inokuliert. Derart infizierte Mäuse zeigen die klassischen Merkmale von Prion-Erkrankungen wie Neurodegeneration, Propagierung von PrP^{Sc} und Mortalität. Die Analyse der infizierten Mäuse ergab jedoch keinen Unterschied in der Lebenserwartung und in der PrP^{Sc}-Propagierung zwischen Kontroll-Tieren und den Parkin-

transgenen Tieren. Beide Linien starben im Durchschnitt 148 *days post inoculation* (dpi) und wiesen gleiche Mengen an Proteinase K-resistentem PrP^{Sc} im Gehirn auf. Aufgrund der Vor-Ergebnisse in Zellkultur war jedoch ein Einfluss von Parkin auf den Zelltod am wahrscheinlichsten. Da die meisten Prion-Stämme primär den Hippocampus attackieren, wurde die Zellzahl von Neuronen der CA1-Region des Hippocampus bestimmt. Sowohl in frühen Stadien (120 und 140 dpi), als auch in terminalen Tieren konnte kein Unterschied in der Zellzahl zwischen Kontroll- und Wt-Parkin-transgenen Tieren festgestellt werden. Überraschenderweise war aber auch in den Kontroll-Tieren kein progressiver neuronaler Zellverlust im Zeitraum von 120 dpi bis zum terminalem Stadium (148 dpi) zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte daran liegen, dass die PrP^{Sc}-induzierte Toxizität zu stark gewesen sein könnte und bereits ein Großteil der Neuronen vor 120 dpi verloren gegangen ist. Ein möglicher früherer Effekt von Parkin auf die Apoptoserate von Neuronen konnte daher mit diesem Versuchsansatz nicht analysiert werden. Zum anderen lässt sich eine Neurodegeneration in anderen Gehirnbereichen nicht ausschließen. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die Überexpression von Parkin im vorliegenden Tier-Modell nicht vor PrP^{Sc}-induzierten Pathomechanismen schützt.

Die Diskrepanz zwischen dem Zellkultur- und *in vivo*-Modell lässt sich vermutlich durch die massive Stärke des gewählten Stresses erklären. Wie die Zellkulturdaten zeigten, wurde Parkin zwar unter moderatem Stress hochreguliert und kann seine protektive Funktion ausüben. Gleichzeitig ist Parkin ein stress-sensitives Protein. Studien aus unserer Arbeitsgruppe sowie weitere Studien zeigten, dass es unter massiven Stressbedingungen zu einer Missfaltung und Inaktivierung auch von Wildtyp-Parkin kommen kann. Die Tatsache, dass sich schon unter basalen Bedingungen ein Teil des Wildtyp-Parkins im Gehirnhomogenat in der Detergenz-unlöslichen Fraktion befindet, spricht für eine erhöhte Inaktivierung von Parkin. Zum anderen könnten auf Grund der stabilen Überexpression von Parkin kompensatorische Mechanismen in Gang getreten sein, die den möglichen protektiven Effekt reprimieren. In verschiedenen Maus-Studien führte die Überexpression von Parkin zu einem protektiven Effekt gegenüber 6-OHDA, α -Synuclein und Tau. Interessanterweise wurde jedoch bei diesen Modellen eine akute Parkin-Expression durch virale Injektion in das Gehirn hervorgerufen, so dass hier möglicherweise keine kompensatorischen Mechanismen zum Tragen gekommen waren (Klein et al., 2006; Lo Bianco et al., 2004; Manfredsson et al., 2007; Vercammen et al., 2006). Weitere Analysen sind notwendig, um das neuroprotektive Potential von Parkin im vorliegenden Maus-

Modell zu analysieren und eventuelle Inaktivierungs- und Kompensationsmechanismen zu identifizieren.

Auch die bereits existierenden Parkin-defizienten Maus-Modelle warfen die Möglichkeit kompensatorischer Mechanismen auf. Gegen jede Erwartung konnte keine erhöhte Sensitivität gegenüber 6-OHDA (Perez et al., 2005) und MPTP (Zhu et al., 2007) in einigen Parkin-defizienten Maus-Modellen gezeigt werden. Auch die gleichzeitige Expression von pathogenen α -Synuclein-Mutanten A53T und A30P (Stichel et al., 2007; von Coelln et al., 2006) in Parkin-defizienten Mäusen führte zu keinen erhöhten toxischen Effekten, wenngleich eine Arbeitsgruppe ultrastrukturelle Veränderungen von Mitochondrien zeigen konnte (Stichel et al., 2007). Überraschenderweise wurde sogar eine Verbesserung der Pathologie, ausgelöst durch die Überexpression der α -Synuclein-Mutante A30P (Fournier et al., 2009) und der Schweden-Mutation von APP (*amyloid precursor protein*) (Perucho et al., 2010) beschrieben.

Eine mögliche Erklärung könnte die Analyse von PACRG (Parkin Co-reguliertes Gen) liefern, was im Folgenden näher erläutert wird.

3.7 PARKIN UND PACRG ZEIGEN GEMEINSAME CHARAKTERISTIKA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Parkin und PACRG gemeinsame Charakteristika aufweisen. Parkin und PACRG teilen sich einen gemeinsamen bidirektionalen Promotor. Wie auch für Parkin gezeigt, führte die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit Thapsigargin und CCCP zu einer Hochregulation der PACRG-mRNA. Eine Hochregulation von PACRG unter Behandlung von Thapsigargin wurde überdies in primären Neuronen und MEF-Zellen beobachtet. Ob für die PACRG-Induktion auch der Transkriptionsfaktor ATF4 verantwortlich ist, muss weiterhin untersucht werden. Interessanterweise konnte im Vergleich zu Parkin eine stärkere Induktion von PACRG durch Behandlung mit CCCP nachgewiesen werden. Zwar wurde gezeigt, dass die Promotoregion zwischen beiden Genen für die Hochregulation unter ER-Stress verantwortlich ist, dennoch ist vorstellbar, dass für die Hochregulation von PACRG weitere Transkriptionsfaktoren, die unter Umständen an andere PACRG-spezifische Promotorregionen binden, verantwortlich sind. Belegt wird diese Vermutung durch die

Tatsache, dass Parkin und PACRG zwar ein überlappendes Expressionsmuster aufweisen, verschiedene Gewebe wie Lunge und Leber jedoch vorrangig PACRG exprimieren (Brody et al., 2008; West et al., 2003). Gene, die sich einen Promotor teilen, verfügen häufig über ähnliche Funktionen. Daher wurde zunächst der Einfluss einer PACRG-Defizienz in SH-SY5Y-Zellen untersucht. Wie für den *Knock Down* von Parkin gezeigt, führte auch der Verlust von PACRG zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber ER-Stress und Störung der mitochondrialen Integrität. Interessanterweise resultierte der Verlust beider Proteine zu keiner weiteren Minderung der Zellvitalität. Im Gegenzug resultierte eine Überexpression von PACRG in einem Rückgang der Apoptoserate, die durch Behandlung mit Thapsigargin ausgelöst wurde. Die Anwesenheit von PACRG und Parkin hatte jedoch keinen synergistischen protektiven Effekt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PACRG ein ähnliches neuroprotektives Potential wie Parkin besitzt und ein PACRG-Verlust zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber zellulären Stressoren führt. Es stellte sich daher die Frage, ob der mangelnde Krankheits-Phänotyp der Parkin-defizienten Mäuse und die mangelnde Protektivität der generierten Parkin-transgenen Tiere durch eine Veränderung der PACRG-Expression erklärbar wäre. Es konnte aber weder eine Veränderung der PACRG-mRNA in den Parkin-defizienten Tieren, noch in den Parkin-transgenen Tieren gezeigt werden. Die Detektion von PACRG auf Protein-Ebene konnte auf Grund fehlenden Antikörpers nicht erfolgen. Auch unter transienten *Knock Down*-Bedingungen konnte keine gegenseitige Beeinflussung von PACRG und Parkin auf mRNA-Ebene gezeigt werden. In zukünftigen Arbeiten wäre es interessant zu analysieren, ob und wie PACRG und Parkin möglicherweise funktionell interagieren. Eine detailliertere funktionelle Analyse von PACRG könnte zudem zu neuen Erkenntnissen der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von Parkin führen. Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass PACRG und Parkin ähnliche Charakteristika, wie Stressinduktion und Protektivität aufweisen, lässt sich auch eine Rolle von PACRG in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung vermuten. Gestützt wird dies durch die Beobachtung, dass PACRG in *Lewy Bodies* (Taylor et al., 2007) gefunden wurde und Mutationen im Parkin-Promotor in Parkinson-Patienten beschrieben worden sind (Lesage et al., 2007).

4 MATERIAL

4.1 MAUSSTÄMME

Für die Zucht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden die Wildtyp-Inzucht-Mausstämme FvB und C57BL/6J (bezogen von Charles River Deutschland, Sulzfeld) verwendet. Desweiteren wurde eine Parkin-defiziente Linie, in der Exon 3 des Parkin-Gens deletiert wurde, verwendet (Itier et al., 2003).

4.2 ZELLINIEN

N2a	Murine Neuroblastomazellen; ATCC-Nr. CCI 131
ScN2a	Murine Neuroblastomazellen infiziert mit murinen Prionen
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomazellen; DSMZ-Nr. ACC 209
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen, ATCC-Nr. CRL-1573
Primäre Fibroblasten	Humane Fibroblasten von Parkinson-Patienten mit kombinierter heterozygoter Deletion von Exon 3-4 und Exon 3-5 des Parkin-Gens und entsprechender Kontrollpersonen (Nakaso et al., 2006)

4.3 CHEMIKALIEN UND ALLGEMEINE REAGENZIEN

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Chemikalien und allgemeine Reagenzien von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) und USB, Cleveland, OH, USA bezogen.

4.4 PUFFERLÖSUNGEN

Für die Herstellung von Lösungen und Verdünnungen wurde ausschließlich Reinstwasser aus einer MilliQ Deionisationsanlage der Firma Millipore (Eschborn) mit einem spezifischen Widerstand von $18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}^3$ verwendet.

Material

2x SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,04% Bromphenolblau; 20% Glycerin; 84 mM β -Mercaptoethanol
5x DNA-Probenpuffer	50% TE; 50% Glycerin; 0,02% Xylencyanol; 0,02% Bromphenolblau
10x SDS Laufpuffer	250 mM Tris, pH 6,8, 1,9 M Glycin, 1% SDS
10x <i>Mobility-Shift</i> -Puffer	100 mM Hepes pH 7,9; 50% Glycerol; 500 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$; 20 mM DTT; 1 mM EDTA
Hypotoner Zelllysis-Puffer	20 mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM EDTA; 0,1% Triton; 20% Glycerol
LB-Agar	LB-Medium; 1,5% Agar
LB-Medium	1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt; 0,5% NaCl;
<i>Lower</i> Tris	1,5M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% SDS
Mowiol	6 g Glycerol und 2,4 g Mowiol 4-88 in 6 ml H_2O für 2 h bei RT inkubieren. 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5) zugeben, 24 h bei 53°C rotieren, bei 4000 rpm zentrifugieren. Aufbewahrung bei -20°C
PBS (1x)	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$; 1,8 mM KH_2PO_4 ; pH 7,3
PBST	PBS mit 0,1% Tween-20
PFA (4%)	20 g Paraformaldehyd (PFA) in 300 ml H_2O (65°C) gelöst; 50 ml 10x PBS; ad 500 ml H_2O ; pH 7,4; steril filtriert
TAE (1x)	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0
<i>Tail-Lysis</i> -Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2 M NaCl; 0,2% SDS, 100 $\mu g/ml$ Proteinase K
TBE (1x)	90 mM Tris-Base; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA; pH 8,3
TFB1 (pH 5,8)	30 mM Kaliumacetat; 100 mM RbCl; 10 mM $CaCl_2$; 50 mM $MnCl_2$; 15% Glycerol
TFB2 (pH 6,5)	10 mM MOPS; 75 mM $CaCl_2$; 10 mM RbCl; 15% Glycerol
<i>Upper</i> Tris	0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS
Western Transfer Puffer	20 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 0,01% SDS, 20% Methanol

4.5 KITS

AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit

Qiagen, Hilden

Dual-Luciferase Assay System

Promega, Mannheim

ECL RPN 2106	GE Healthcare Life Science, München
Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat	Millipore, Eschborn
Nucleospin Gelextraktionskit	Macherey-Nagel, Düren
iScript cDNA Synthesekit	Bio-Rad, München
Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
QIAprep Spin Plasmidextraktionskit Mini/Maxi	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Lipid Tissue Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Vybrant MTT Cell Proliferation Assay</i>	Invitrogen, Karlsruhe

4.6 GERÄTE

Brutschränke	Heraeus, Hanau
Filmentwickler X-Omat	Kodak, Stuttgart
Geldokumentation MWG	Biotech, Ebersberg
Geltrockner SGD300	Savant, Holbrook, NY, USA
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest, Egelsbach
Luminometers LB96V	Berthold Technologies, Bad Wildbad
<u>Mikroskope:</u>	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen
Axiovert 200M mit Software Axiovision	Carl Zeiss, Göttingen
Stereomikroskop M80	Leica, Wetzlar
Mini-PROTEAN 3-Apparatur	Biorad, München
<u>PCR-Geräte:</u>	
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Fast Real Time System 7500	Applied Biosystems, Foster City, USA
pH-Meter	Fischer Scientific, Nidderau
Reinstwasseranlage Milli-QPLUS	Millipore, Eschborn

Schwenktisch GFL 3017	Merck Eurolab, Ismaning
Spektralphotometer DU-640	Beckmann, Unterschleißheim
Szintillationszähler Wallac 1410	Pharmacia, Freiburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch Foto/UV 21	Fotodyne, Hartland, WI, USA
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
<u>Waagen:</u>	
Laborwaage Mettler Toledo PB602	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage Mettler Toledo AG285	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Wasserbad MT	Roth, Karlsruhe
Zählkammer, Neubauer	Merck Eurolab, Ismaning
<u>Zentrifugen:</u>	
Kühlzentrifuge GS-6R mit Rotor GH3.8	Beckmann, Unterschleißheim
Kühlzentrifuge J2-21M mit Rotor JA-14	Beckmann, Unterschleißheim
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg

4.7 PLASMIDE

pcDNA3.1/ZEO(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pCMV-EYFP	Clontech, Mountain View, Californien, USA
pCMV-HA	Clontech, Mountain View, Californien, USA
phgMmPrP	halbgenomisches Maus-PrP Plasmid (Fischer et al., 1996)
pGL3	Promega, Mannheim
Parkin Wildtyp	(Winklhofer et al., 2003b)
Parkin Mutante Δ UBL	(Henn et al., 2005)
Parkin Mutante W453X	(Henn et al., 2005)
PrP Wildtyp	(Gilch et al., 2001)
NF κ B-Luc	(Krappmann et al., 1996)
Park-Luc	Freundlicherweise von L. Bouman zur Verfügung gestellt
ATF4RE-Luc	Freundlicherweise von L. Bouman zur Verfügung gestellt
GFP-GPI	(Rambold et al., 2008)

4.8 OLIGONUKLEOTIDE

Die Synthesen der Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corp. (Erlangen) durchgeführt.

4.8.1 Oligonukleotide für die *Real Time* PCR

Für quantitative Reverse Transkription *Real Time* PCR wurden die Primer so gewählt, dass nur cDNA, nicht aber genomische DNA amplifiziert werden kann. Dies wurde durch die Verwendung von Primer erreicht, die entweder an Exon/Exon-Grenzen binden oder die *forward* und *reverse* Primer in unterschiedlichen Exons liegen und somit auf genomischer Ebene durch ein Intron getrennt sind.

NAME	SEQUENZ 5'- 3'	POSITION	EINTRAG ENSEMBL/ CHROMOSOM
mActin-for	AGCCTTCCTTCTTGGGTATG	867-887	ENSMUST00000031564
m/rActin-rev	GGTCTTTACGGATGTCAACG	937-957	ENSMUST00000031564
huActin-for	TGGACTTCGAGCAAGAGATG	854-865	ENST00000331789
huActin-rev	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	973-993	ENST00000331789
ATPAFrt-for	GGCTCAGTCCTGTCCAACAT	612-632	OTTHUMT0000002192
ATPAFrt-rev	GTGCCTCAGCAACATTCAGA	831-851	OTTHUMT0000002192
mBAD-for	GCAGCCACCAACAGTCATC	736-754	ENSMUST00000025910
mBAD-rev	CTCCATCCCTTCATCCTCCT	815-834	ENSMUST00000025910
mBAK-for	AGGTGGGCTGCGATGAGT	286-303	ENSMUST00000078691
mBAK-rev	CCTGGGTCTCCTGTTCTG	381-399	ENSMUST00000078691
mBAX-for	ATGCGTCCACCAAGAAGC	212-229	ENSMUST00000033093
mBAX-rev	CGTCAGCAATCATCCTCTGC	282-301	ENSMUST00000033093
mBcl-2-for	GAGCGTCAACAGGGAGATGT	1645-1664	ENSMUST00000080103

NAME	SEQUENZ 5'-3'	POSITION	EINTRAG ENSEMBL/ CHROMOSOM
mBcl-2-rev	CATGCTGGGGCCATATAGTT	1764-1783	ENSMUST00000080103
mBcl-xL-for	GGCCACCTATCTGAATGACC	702-712	ENSMUST00000007803
mBcl-xL-rev	GCTGCATTGTTCCCGTAGAG	772-791	ENSMUST00000007803
mBiP-for	GCCTCATCGGACGCACTT	441-459	ENSMUST0000002822
mBiP-rev	GGGGCAAATGTCTTGGTT	558-576	ENSMUST0000002822
mcIAP1-for	CGAGGAGGAGGAGTCAGATG	1599-1618	ENSMUST00000013949
mcIAP1-rev	GCACTTAGGAGGCAATACAGC	1683-1703	ENSMUST00000013949
mcIAP2-for	TGTGATGGTGGCTTGAGATG	1695-1714	ENSMUST00000074246
mcIAP2-rev	CAACAAACTCCTGACCCTTC	1787-1806	ENSMUST00000074246
mD1-for	GGACATACGCCATTTTCATCC	1093-1112	ENSMUST00000021932
mD1-rev	GCTTCTGGGCAATCCTGTAG	1169-1188	ENSMUST00000021932
mD2-for	TCCCAGCAGAAGGAGAAGAA	1222-1241	ENSMUST00000075764
mD2-rev	GATGTGCGTGATGAAGAAGG	1295-1314	ENSMUST00000075764
mDAT-for	TGGCATCAGAGCATACTCA	1030-1049	ENSMUST00000022100
mDAT-rev	AACTGGAGAAGGCAATCAGC	1138-1157	ENSMUST00000022100
mDJ-1-for	CTCAAGGAGCAGGAGAGCAG	358-377	ENSMUST00000030805
mDJ-1-rev	CAGTGGGTGTGTTGTGACCT	449-468	ENSMUST00000030805
mHsp60-for	TGCTCATCGGAAGCCATT	864-881	ENSMUST00000027123
mHsp60-rev	ACTGCCACAACCTGAAGACC	949-968	ENSMUST00000027123
mLRRK2-for	CTACAGCACTCACCCCACT	4203-4222	ENSMUST00000060642
mLRRK2-rev	GGGAAGAAGAGGCACGAG	4319-4336	ENSMUST00000060642
mMAOA-for	TGTGAGGCAGTGTGGAGGTA	734-753	ENSMUST00000026013
mMAOA-rev	CCCCAAGGAGGACCATTATC	734-753	ENSMUST00000026013
mMAOB-for	ACGCTCTTTGTGAACCTGTG	587-606	OTTMUST00000018395
mMAOB-rev	TTCCTCTCCTGTCCTCCATT	698-717	OTTMUST00000018395
mMnSOD-for	ACGCCACCGAGGAGAAGTA	395-414	ENSMUST00000007012
mMnSOD-re	TATGTCCCCACCATTGAAC	475-493	ENSMUST00000007012
mMOT-for	TCCCCTCTCTCTGGGTATTG	1386-1405	ENSMUST00000025217
mMOT-rev	GAGTTTGTCCATCAGCAGCA	1485-1504	ENSMUST00000025217
mNQO1-for	GTTCCACAGAGCCATCAGGT	193-212	ENSMUST00000029850

NAME	SEQUENZ 5'-3'	POSITION	EINTRAG ENSEMBL/ CHROMOSOM
mNQO1-rev	CCCCAGAGCGAATGTATGTC	252-271	ENSMUST00000029850
mPACRG-for	GAACACGGAGGGAACAAGAT	676-695	ENSTMUST00000041463
mPACRG-rev	CGAAGACACAACCAGATGCT	788-807	ENSTMUST00000041463
hPACRG-for	GGTTTCTGAGGGTTTCACAGTC	335-355	ENST00000366889
hPACRG-rev	GGGCTTGGTTGGTCTTTCTT	411-431	ENST00000366889
Park2-for	AGTGTTTGTTCAGGTTCAACTCCAGC	109-133	ENST00000366898
Park2-rev	AACCCCTGTCTGCTTAGCAAC	191-211	ENST00000366898
mPINK1-for	GACTCCCACCTTTCCCTTTG	682-701	ENSMUST00000030536
mPINK1-rev	GCTCCTGGCTCATTTTGC	756-773	ENSMUST00000030536
mp53-for	AACCGCCGACCTATCCTTAC	841-860	ENSMUST00000005371
mp53-rev	CAGGCACAAACACGAACCT	914-932	ENSMUST00000005371
mp65-for	GACCTGGAGCAAGCCATTAG	718-737	ENSMUST00000025867
mp65-rev	CACTGTCACCTGGAAGCAGA	821-840	ENSMUST00000025867
mSyn-for	CAGCAGTCGCTCAGAAGACA	435-454	ENSMUST00000027017
mSyn-rev	CCTCACCTTGCCCATCT	507-524	ENSMUST00000027017
mTH-for	AAGTTTGACCCTGACCTGGA	552-571	ENSMUST00000000219
mTH-rev	GCTCACCTGCTTGTATTGG	641-660	ENSMUST00000000219
mVMAT-for	AATGGGAAGGTGGCTGTGT	1206-1224	ENSTMUST00000026084
mVMAT-rev	GGAGCGATGAGTCCGTAGAT	1285-1304	ENSTMUST00000026084
mXIAP-for	AGTGAAGACCCTTGGAACA	1145-1164	ENSMUST00000055483
mXIAP-rev	ATTCTTGCCCCTTCTCATCC	1201-1220	ENSMUST00000055483
ATPAF-for	GGTGCCTGGGAAGGATTA	46813031- 46813051	Chromosom 1
ATPAF-rev	TCTCAGCATACTTGAGGTTTCC	46813246- 46813266	Chromosom 1
ATPase6-for	CACCTACCTCCCTCACAAA	8466-8486	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>
ATPase6-rev	GGGATCAATAGAGGGGAAA	8603-8623	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>
COX II-for	GGCCACCAATGGTACTGAAC	7887-7907	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>

NAME	SEQUENZ 5'-3'	POSITION	EINTRAG ENSEMBL/ CHROMOSOM
COX II-rev	CGGGAATTGCATCTGTTTTT	8096-8116	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>
ND1-for	CCCTTCGCCCTATTCTTCAT	3962+3982	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>
ND1-rev	GAGTTGGTCGTAGCGGAATC	4143-4163	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>
ND2-for	TAGCCCCCTTCACTTCTGA	4792-4812	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>
ND2-rev	CCCTTCGCCCTATTCTTCAT	4978-4998	Chromosom Mitochondrium <i>forward strand</i>

4.8.2 Weitere Oligonukleotide

NAME	SEQUENZ 5'-3'	VERWENDUNG
hP tg-for2	ACCTGCAGGCAGGCAACGCTCAC	Genotypisierung
hP tg-rev1	GCAGGGAGTAGCCAAGTTGAGGG	Genotypisierung
Park KO-for	TTGTTTTGCCAAGTTCTAAT	Genotypisierung
Park KO-rev	TCCACTGGCAGAGTAAATGT	Genotypisierung
Wt-for	TGCTCTGGGGTTCGTC	Genotypisierung
Wt-rev	TCCACTGGCAGAGTAAATGT	Genotypisierung
Parkin-SceI_forw	ATTACCCTGTTATCCCTAATGATAGTGTTTGTGTCAGGTTC	Klonierung
Parkin-SceI_rev	TAGGGATAAC AGGGTAATCTACACGTCGAACCAGTGGTC	Klonierung
W453X-SceI_rev	TAGGGATAACAGGGTAATCTACTCGCAGCCACAGTTCCA	Klonierung
hP-Bam-for	CGCGGATCCGCCACCATGATAGTGTTTGTGTCAGG	Klonierung
hP-Not-rev	ATTTGCGGCCGCTACACGTCGAACCAGTGGTC	Klonierung
Park-for	CCCCGGTGACGTAAGATTGC	EMSA

NAME	SEQUENZ 5'-3'	VERWENDUNG
Park-rev	GCAATCTTACGTCACCGGGG	EMSA

4.9 ANTIKÖRPER

BEZEICHNUNG	SPEZIES	ANWENDUNG	VERDÜNNUNG	HERKUNFT
α -ATF4	Kaninchen polyklonal	EMSA	1:20	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, U.S.A
α -beta actin	Maus monoklonal	WB	1:2000	Sigma (Taufkirchen)
α -Active Caspase-3	Kaninchen polyklonal	IF	1:250	Promega (Mannheim)
α -c-jun (N) sc45	Kaninchen polyklonal	EMSA	1:20	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, U.S.A)
α -HA-HRP	Ratte monoklonal	WB	1:2000	Roche Applied Science (Mannheim)
α -hP1	Kaninchen polyklonal	WB/IF	1:2000/1:200	(Winklhofer et al., 2003b)
α -PRK8°	Maus monoklonal	WB	1:2000	Millipore (Eschborn)
α -mouse HRP	Ziege polyklonal	WB	1:10000	Promega (Mannheim)
α -mouse Alexa 488 nm	Ziege polyklonal	IF	1:200	Invitrogen (Karlsruhe)
α -Parkin	Kaninchen polyklonal	WB	1:1000	Cell signaling technology
α -p65	Kaninchen polyklonal	EMSA	1:20	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, U.S.A)
α -PrP A7	Kaninchen polyklonal	WB	1:10000	(Winklhofer et al., 2003a)
α -PrP 3F4	Maus monoklonal	IF	1:200	Signet Laboratories
α -rabbit HRP	Ziege polyklonal	WB	1:10000	Promega (Mannheim)
α -rabbit Alexa 555 nm	Ziege polyklonal	IF	1:200	Invitrogen (Karlsruhe)

4.10 SMALL INTERFERING RNA (siRNA)

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden von der Firma Dharmacon RNAi Technologies (Erembodegem, Belgien) bezogen.

PACRG	SiGenome SMARTpool (M-003603)
Parkin	SiGenome SMARTpool (M-003603)
Kontrolle	siGenome Non-Targeting siRNA Pool 2 (D-001206-14-05)

5 METHODEN

5.1 STANDARD-METHODEN

5.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Zellen von *Escherichia coli* (*E.coli*) kompetent zu machen, d.h. diese zur Aufnahme von Plasmid-DNA zu befähigen, wurde die Zellwand durch die Behandlung mit divalenten Kationen destabilisiert. Zunächst wurde eine Vorkultur hergestellt, indem 2 ml *Luria Broth* (LB)-Medium mit einer Bakterienkolonie des *E.coli*-Stammes DH5 α beimpft und 16h bei 37°C geschüttelt wurden. Diese Vorkultur wurde anschließend in 250 ml LB-Medium überführt und bis zur logarithmischen Phase (OD₅₉₀ 0,4) kultiviert. Die Bakterien wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 4°C und 3750 rpm pelletiert und in 100 ml kalten TFB1-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min lang auf Eis inkubiert, erneut pelletiert und in 10 ml kalten TFB2-Puffer resuspendiert. Nach einem weiteren Inkubationsschritt von 15-60 min auf Eis wurden die Bakterien aliquotiert (100 μ l/Reaktionsgefäß) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

5.1.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Zur Vervielfältigung von DNA-Plasmiden wurden diese in Bakterien eingebracht. Hierzu wurde der *E.coli* Stamm DH5 α (Genotyp: *supE44*, Δ *lac169*, (Φ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*; Herkunft: (Hanahan und Meselson, 1983)) verwendet. Zu 100 μ l der kompetenten Bakterien wurde 10 μ l des Ligationsansatzes bzw. 1 μ g Plasmid-DNA gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 90 sec bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 400 μ l LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt und in unterschiedlichen Konzentrationen auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden 16-20 h lang bei 37°C inkubiert.

5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte unter Verwendung des Mini- bzw. Maxi QIAprep Spin Plasmidextraktionskits (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Spektralphotometer DU-640 (Beckmann, Unterschleißheim) bestimmt.

5.1.4 Restriktionsverdau

Für analytische Zwecke wurde ein Ansatzvolumen von 15 µl gewählt. Eingesetzt wurden 1/10 einer Mini-DNA-Präparation, 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U/µl, New England Biolabs, Frankfurt), 1,5 µl des vom Hersteller empfohlenen 10xPuffers und gegebenenfalls 1,5 µl BSA (10x). Für den Zweck der Klonierung wurden 3-5 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 30-40 µl eingesetzt. Der Verdau wurde bei der optimalen Temperatur des jeweiligen Enzyms für 1-4 h durchgeführt.

5.1.5 Ligation

Ligationen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und enthielten 2 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl, Fermentas, St. Leon-Rot). Die Mengen an Vektor und Insert wurden mit Hilfe eines Agarosegels abgeschätzt und so eingesetzt, dass die Anzahl an DNA-Molekülen des Insert-Fragments ungefähr die fünffache Menge des Vektors (Plasmid) betrug. Dieser Ansatz wurde für 1-12 h bei Raumtemperatur inkubiert.

5.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen

Das zu eluierende DNA-Fragment wurde unter UV-licht (256 nm) durch EtBr-Einlagerung lokalisiert und ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Agaroseblocks mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eluiert.

5.1.7 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren im Photometer

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Spektralphotometer DU-640 (Beckmann, Unterschleißheim) ermittelt. Da Nukleinsäuren UV Licht mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm absorbieren, wurden für die Messungen Quarzküvetten verwendet, die keine Absorption in diesem Bereich des Lichts zeigen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht die OD von 1,0 einer Konzentration von 50 mg/ml (DNA) bzw. 40 mg/ml (RNA). Um die Reinheit der Lösung abzuschätzen, wurde neben der Absorption bei 260 nm auch die Absorption bei 280 nm bestimmt, der Bereich des Lichts, in dem die aromatischen Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum haben. Eine reine Nukleinsäurelösung hat ein Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von 1,8.

5.1.8 Generierung von DNA-Expressions-Konstrukten

Um eine bessere Expression von Parkin zu ermöglichen wurde die optimale Kozak-Sequenz GCC ACC ATG in das ursprüngliche Wt-Parkin-Expressions-Konstrukt (Winklhofer et al., 2003b) eingefügt. Hierzu wurde das mit den Primern hP-Bam-for und hP-Not-rev amplifizierte Fragment über die Schnittstellen der Enzyme BamHI und NotI in den Vektor pcDNA3.1/ZEO(+) ligiert.

5.2 ZELLKULTUR-METHODEN

Materialien und Medien zum Einsatz in der Zellkultur wurde von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Nunc (Wiesbaden) und BD Biosciences Falcon, (Heidelberg) bezogen.

5.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Die Zelllinien wurden als adhärenter Einzelzellrasen in Zellkulturflaschen beziehungsweise -schalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

N2a	MEM, 10% fetales Kälberserum, 10 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin
ScN2a	MEM, 10% fetales Kälberserum, 10 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin, G418 10 mg/l
SH-SY5Y	DMEM/Hams's F12, 15% fetales Kälberserum, 10 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin, 1% nicht essentielle Aminosäuren
HEK293T	DMEM (+ Glutamax I), 10% fetales Kälberserum, 10 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin
Primäre Fibroblasten	DMEM (+Glutamax I, +Pyruvat), 10% fetales Kälberserum, 10 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin

5.2.2 Passagierung

Das Kulturmedium wurde zunächst abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die adhärenen Zellen wurden durch Inkubation mit Trypsin (0,5 g/l) von der Unterlage gelöst, in vorgewärmtem Medium sorgfältig resuspendiert und in gewünschter Zellzahl auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Passagierung der Zelllinien erfolgte durchschnittlich alle 3 bis 4 Tage. Zum Ausplattieren der Zellen wurde zunächst die vorhandene Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Kammer ermittelt. Sofern nicht gesondert angegeben wurden pro 3,5 cm Zellkulturschale 5×10^5 SH-SY5Y-Zellen bzw. 1×10^6 Zellen der Linien N2a-, ScN2a-Zellen und HEK293T-Zellen ausplattiert. Fibroblasten wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen in 3,5 cm Schalen ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen dünner ausplattiert, um vereinzelte Zellen besser zu erkennen

5.2.3 Transiente Transfektion

24 h nach dem Ausplattieren wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Transfektionsreagenz Lipofectamine plus nach Angaben des Herstellers Invitrogen in die Zellen eingebracht. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen mit serumfreien Medium gewaschen.

Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium gewechselt (Heraeus, Hanau). Die Ernte erfolgte nach 24 h.

5.2.4 RNA-Interferenz

Um die Expression von Parkin und PACRG zu verringern, wurden Zellen mit *small interfering RNAs* mit Hilfe von RNAiMax (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Verwendet wurde eine Mischung verschiedener siRNAs (SiGENome SMARTpool; Dharmacon RNAi Technologies Erembodegem, Belgien), die gegen das gewünschte Zielgen gerichtet waren und die vom Hersteller empfohlener Kontroll-siRNA. Die reverse Transfektion erfolgte in 12 *well* Zellkulturplatten. Der Ansatz für ein *well* bestand aus 150 µl OptiMEM Medium (Invitrogen, Karlsruhe), 1 nM siRNA und 1 µl RNAiMax. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von $0,5 \times 10^5$ Zellen in normalem Wachstumsmedium ohne Antibiotika zu einem Gesamtvolumen von 500 µl. Nach 24 h erfolgte eine Zugabe von 500 µl Medium, nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die *Knock Down*-Effizienz wurde mittels quantitativer *Real Time* PCR (siehe 5.3.4.2) bestimmt.

5.2.5 Zell-Vitalitätstests

5.2.5.1 *Caspase-Assay*

Zur Detektion von apoptotischen Zellen wurde ein Antikörper verwendet, der gegen aktive Caspase-3 gerichtet ist. SH-SY5Y-Zellen wurden auf Glasplättchen ausplattiert, transfiziert und mit den angegebenen Stressoren behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 20 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) bei RT fixiert. Nach Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% Triton X-100 für 10min wurden unspezifische Proteindeterminanten für 60-120 min blockiert (PBS, 0,1% Tween 20, 5% *horse serum*). Die Inkubation des Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörpers (1:250 in Blockierungspuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden folgende Waschrinne durchgeführt: 2x mit PBS, 2x mit 0,1% Tween 20, 2x mit PBS. Die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Alexa 555 (1:500 in Blockierlösung) erfolgte für 1h bei Raumtemperatur. Nach weiteren Waschrinnen wurden die Zellen in

Mowiol (+ DAPI, 1 µg/ml) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die apoptotischen Zellen wurden durch Zählen der Caspase-positiven Zellen quantifiziert.

5.2.5.2 *MTT-Assay*

Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des Farbstoffes -(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Der Farbumschlag von gelb nach blau-violett wurde colorimetrisch mit dem Spectralphotometer PowerWave Microplate XS (Bio Tek, Bad Friedrichshall) bestimmt. Der MTT-Assay wurde in 12 *well* Zellkulturplatten durchgeführt. MEF-Zellen wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ ausplattiert. Die SH-SY5Y-Zellen wurden mit siRNA revers transfiziert (siehe 5.2.4). Zwei Tage später wurden die Zellen mit Thapsigargin (10 µM) oder Tunicamycin (2 µg/ml) für 16 h gestresst. Anschließend wurde der *Vybrant MTT Cell Proliferation Assay* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.6 **Luziferase-Aktivitätstest**

Luziferase-Aktivitätstests wurden mit dem *Dual-Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim) in 3,5 cm Zellkulturschalen durchgeführt. Die Renilla- und Luziferase-Reporter-Plasmide (0,3 µg pro well) wurden zusammen mit den angegebenen DNA Konstrukten (0,5-1µg pro well) in SH-SY5Y- oder HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 8 h bzw. 24 h wurden die Zellen für 3 h entweder mit 25 ng/ml TNF α (Biomol, Hamburg), 5 ng/ml PMA (Sigma, Taufkirchen) bzw. 14 h mit 1 µM Thapsigargin (Sigma, Taufkirchen) behandelt. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität mit Hilfe des Luminometers LB96V (Berthold Technologies, Bad Wildbad) mit dem *Dual-Luciferase Assay System* entsprechend den Angaben des Herstellers Promega gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der WinGlow Software (Berthold Technologies, Bad Wildbad).

5.2.7 **Indirekte Immunfluoreszenz**

Die Bestimmung der zellulären Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz permeabilisierter Zellen. Dazu wurden SH-SY5Y-

Zellen auf Glasplättchen ausplattiert und transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für 20 min mit 4% PFA fixiert und mit 0,1% Triton X für 10min permeabilisiert. Nach einstündiger Blockierung mit 1% BSA in PBS erfolgte die Inkubation des Erstantikörpers in entsprechender Verdünnung (siehe 4.9) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe 4.9) in PBS, 1% BSA versehen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Präparate in Mowiol (+ DAPI, 1 µg/ml) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

5.2.8 Präparation primärer Zellen

5.2.8.1 *Präparation primärer corticaler Neuronen*

Die Isolierung primärer corticaler Neuronen erfolgte aus 14.5 dpc (*days post coitum*) Embryonen. Das Gehirn wurde entnommen, die Meningen entfernt und die Cortices in HBSS + 10 mM HEPES (Invitrogen) überführt. Zur anschließenden Dissoziation der Zellen wurden die Cortices mit Trypsin (Sigma, Taufkirchen; 1 mg/ml in HBSS) 15 min bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe eines Trypsin-Inhibitors (Sigma, Taufkirchen; 1 mg/ml in HBSS) für 2 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurden die Zellen durch vorsichtiges Tituieren aus dem Zellverband gelöst. Hierzu wurden die Cortices bis zu 20x durch eine abgerundete Glaspipette auf- und abpipettiert und die Überstände anschließend für 12 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Neurobasalmedium (+ B27; + 10 ng/ml NGF (2,5S) + 10 ng/ml bFGF; aufgenommen und 400 000 Zellen auf eine mit Poly-L-Lysin beschichtete 3,5 cm Zellkulturplatte ausgesät. Nach 3 h erfolgte ein Medimwechsel. Für weitere Analysen wurden die Neuronen 4 bis 7 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

5.2.8.2 *Präparation von mouse embryonic fibroblasts (MEF)*

Zur Präparation von *mouse embryonic fibroblasts* (MEF) wurden 12.5 dpc Embryonen der Kopf abgeschnitten und alle roten inneren Organe entfernt. Die Embryonen wurden daraufhin 5x mit PBS gespült und in 10 ml Trypsin durch ein Sieb gedrückt. Der Durchfluss wurde in einen Erlenmeyer Kolben überführt und mit Glasperlen und Rührfisch 30 min gerührt. Nach Zugabe von Medium wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) pelletiert und in Medium resuspendiert (DMEM (+ Glutamax I, +Pyruvat) 10% fetales Kälberserum, 10 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin). Pro 10 cm

Zellkulturschale wurden ca. 5×10^6 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

5.2.9 Co-Kultivierungs-Assay

Um den zytotoxischen Effekt von PrP^{Sc} auf SH-SY5Y-Zellen zu analysieren, wurden SH-SY5Y-Zellen zusammen mit PrP^{Sc}/Prionen-infizierten (ScN2a) und uninfizierten (N2a) murinen Neuroblastomzellen co-kultiviert. Am ersten Tag des Versuchs wurden ScN2a- und N2a- Zellen in 6 cm Zellkulturschalen, die ein Glasplättchen (30 mm) als prospektiver Platzhalter enthielten, ausplattiert. Am dritten Tag wurden SH-SY5Y-Zellen in einer Dichte von 5×10^5 in 3,5 cm Zellkulturschalen, die ebenfalls ein Glasplättchen (30 mm) enthielten, ausgesät und 24 h später transfiziert. Zwei Stunden nach der Transfektion wurde das Glasplättchen in den Schalen der ScN2a- und N2a-Zellen, durch das Glasplättchen, auf dem die SH-SY5Y-Zellen gewachsen waren, ersetzt und die Zelllinien für 20-40 h co-kultiviert. Die SH-SY5Y-Zellen wurden daraufhin anhand des *Caspase-Assays* (siehe 5.2.5.1) oder quantitativer *Real Time PCR* (siehe 5.3.4.2.) analysiert.

5.2.10 Beschichtung von Zellkulturschalen

Zur optimalen Kultivierung von Neuronen wurden die Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurde 1,9%ige Borax Lösung mit 1,25% Borsäure zu gleichen Teilen vermischt, 1 mg/10 ml Poly-L-Lysin (Sigma, Taufkirchen) zugesetzt und steril filtriert. Diese Lösung wurde in 3,5 cm Zellkulturschalen gegeben und 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für weitere 12 h durch steriles Wasser ersetzt.

5.3 NUKLEINSÄURE-METHODEN

5.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzgewebe

Um die Nachkommen der entsprechenden Mauslinien zu genotypisieren wurde 3-6 Wochen alten Mäusen ein ca. 3 mm langes Schwanzstück abgenommen. Die Schwanzbiopsie wurde in 500µl *Tail-Lysis-Puffer* mit Proteinase K (100 µg/ml, Roche, Mannheim) bei 55°C unter Schütteln für 12 h lysiert. Anschließend wurde die DNA mit 400 µl Isopropanol gefällt und für 30 min bei 10 000 rpm in einer Tischzentrifuge

(Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 500 µl H₂O resuspendiert. Für die Genotypisierungs-PCR wurde 1 µl dieser genomischen DNA-Lösung verwendet.

5.3.2 RNA-Isolierung

5.3.2.1 *RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen*

Die Zellen wurden in PBS von der Platte geschabt, pelletiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe des Qiasredder Kits (Qiagen, Hilden). Im Anschluss wurde die RNA mit dem *RNeasy Minikit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Um mögliche Verunreinigungen genomischer DNA zu eliminieren wurde ein DNase Verdau mit dem RNase-Free DNase Set nach Hersteller-Angaben (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer DU-640 (Beckmann, Unterschleissheim) ermittelt. Nach reverser Transkription der RNA (siehe 5.3.3) wurden die Proben mit Hilfe quantitativer *Real Time* PCR (siehe 5.3.4.2) analysiert.

5.3.2.2 *RNA-Isolierung aus Gehirngewebe*

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und zügig das Gehirngewebe entnommen, das sofort schockgefroren wurde. Zur Homogenisierung wurden die Gehirne in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des *RNeasy Lipid Tissue Midi Kit* (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Um mögliche Verunreinigungen genomischer DNA zu eliminieren wurde ein DNase Verdau mit dem RNase-Free DNase Set nach Hersteller-Angaben (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit dem Spektralphotometer DU-640 (Beckmann, Unterschleissheim) ermittelt. Nach reverser Transkription der RNA (siehe 5.3.3) wurden die Proben mit Hilfe quantitativer *Real Time* PCR (siehe 5.3.4.2) analysiert.

5.3.2.3 *Simultane Isolierung von DNA und RNA*

Zur RNA- und DNA- Isolierung aus derselben Probe wurde das *AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Zellen wurden pelletiert, schockgefroren und anschließend nach Angaben des Herstellers bearbeitet. Für weitere Analysen mit quantitativer *Real Time* PCR wurde die RNA in cDNA (siehe 5.3.3) umgeschrieben bzw. 0,05 µg der isolierten DNA direkt verwendet.

5.3.3 Reverse Transkription

Das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesekit (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers. 0,5 -1 µg wurde in einem Volumen von 20 µl umgeschrieben. Für anschließende Analysen mit quantitativer *Real Time* PCR wurden 0,5-1 µl der cDNA pro Ansatz verwendet.

5.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Reaktionsansätze zur Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR (*polymerase chain reaction*) wurden in einem Volumen von 20 µl in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich aus 1 µl *template*-DNA, 0,5 µl dNTP-Mix (je 25 mM), 0,5 µl *forward* Primer (100 pmol/µl), 0,5 µl *reverse* Primer (100 pmol/µl), 2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl; Promega, Mannheim) bzw. 0,5 µl Pfu-Ploymerase (3 U/µl; Promega, Mannheim). Die Proben wurden in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) für 3 min bei 94°C denaturiert und durchliefen 25 bis 32 Zyklen Denaturierungs- (94°C, 30 sec), *Annealing*- (30 sec bei geeigneter Temperatur) und Elongationsschritten (72°C, 30-90 sec). Um die Verlängerung aller DNA-Fragmente sicherzustellen, erfolgte eine abschließende Elongationsphase von 5 min bei 72°C.

5.3.4.1 Genotypisierungs-PCR

Die PCR-Reaktionen für die Genotypisierung wurden in einem T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Der PCR-Ansatz für die Analyse der Parkin-transgenen Linien setzte sich wie folgt zusammen: 1µl genomische DNA, 0,3 µl hP tg-for2 (100 pmol/µl), hP tg-rev1 (100 pmol/µl), 0,2 µl dNTPs (25 mmol je dNTP), 4 µl 5x PCR-Mix (Promega, Mannheim), 1 µl DMSO, 0,2 µl Taq Polymerase (5 U/µl) (Promega, Mannheim). Folgendes Programm wurde durchlaufen: 3 min 94°C, 28 x [30 sec 94°C, 40 sec 64°C, 40 sec 72°C], 10 min 72°C. Handelte es sich um eine Maus, die das Transgen integriert hatte, konnte ein 361 bp großes Fragment im Agarosegel detektiert werden.

Zur Analyse der Nachkommen der heterozygoten Parkin-KO-Linie wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, die zum einen spezifisch das Wt-Allel bzw. zum anderen

spezifisch das KO-Allel amplifizierten. Die Genotypisierungs-PCRs setzten sich wie folgt zusammen: 1 μl genomische DNA, 0,5 μl Park KO for (100 pmol/ μl), Park KO rev (100 pmol/ μl) bzw. Wt for (100 pmol/ μl), Wt rev (100 pmol/ μl), 0,2 μl dNTPs (25 mmol je dNTP), 4 μl 5x PCR-Mix (Promega, Mannheim), 0,2 μl Taq Polymerase (5 U/ μl) (Promega, Mannheim). Nach Durchführung des PCR Programms - 3 min 94°C, 33 x [30 sec 94°C, 40 sec 57°C, 40 sec 72°C], 10 min 72°C - konnte für die Wt-spezifische PCR eine Bande von 297 bp, für die Park-KO-spezifische PCR ein Fragment von 285 bp detektiert werden.

5.3.4.2 **Quantitative Real Time PCR**

Quantitative *Real Time* PCRs wurden mit dem *Fast Real Time System 7500* (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. In jedem Zyklus der DNA-Synthese bindet ein fluoreszierender Farbstoff an das amplifizierte PCR-Produkt. Die messbare Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung der DNA ermöglicht. Für einen Ansatz von 20 μl wurden 0,5-1 μl cDNA bzw. DNA, 10 μl 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), der bereits den Farbstoff, die Taq DNA Polymerase und dNTPs enthält, mit je 1 μl *forward* und *reverse* Primer (5 pmol/ μl) vermischt. Dabei wurden pro Primer-Set Triplikate angesetzt und folgendes PCR Programm durchlaufen: Denaturierung (10 min 95°C), Amplifikation (45 Zyklen aus: 15 sec 95°C, 1 min 60°C, 15 sec 72°C), Schmelzkurve (10 sec 95°C, 10 sec 66°C, 5 min ansteigend bis 95°C bei 0,1°C/sec) und Kühlung (5 sec 40°C). Die Auswertung der relativen Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ Methode, wobei über das Haushaltsgen β -Aktin normalisiert wurde.

5.3.5 **Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden**

Zur Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden wurde je 0,25 μg Einzelstrangoligonukleotid in 100 mM KCl in einem Gesamtvolumen von 50 μl für 10 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Oligonukleotide der NF κ B- und Oct1-Konsensus-Sequenz wurden bereits in doppelsträngigem Zustand bei Promega, Mannheim bezogen (1,75 pmol/ μl). Für den Einsatz zum Gelshift wurde an die doppelsträngigen Oligonukleotide radioaktives γ -³²P-dCTP mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (Promega, Mannheim) angehängt. Dazu wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 μl 1 μl der doppelsträngigen Konsensus-

Oligonukleotide, 5 μ l γ -³²P-dCTP (50 μ Ci), 5 μ l 10x T4 Polynukleotidkinase Puffer und 1 μ l T4 Kinase (10 U/ μ l) 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Ansatz durch ProbeQuant G-50 Micro-Säulchen (GE Healthcare, München) aufgereinigt und 1 μ l der Sonde im Szintillationszähler (Wallac 1410, Pharmacia, Freiburg) vermessen.

5.4 PROTEIN-ANALYTISCHE METHODEN

5.4.1 Herstellung von Protein-Extrakten

5.4.1.1 *Gesamtzellextrakt*

Zur Herstellung von Zellysaten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS von der Zellkulturschale geschabt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 15 sec pelletiert und in kaltem Lysis-Puffer (0,1% Triton X-100) resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellysate in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

5.4.1.2 *Proteinextrakt aus Gehirn*

Zur Extraktion von Proteinen aus Mäusegehirnen wurde ein 10%iges (w/v) Homogenat in Lysis-Puffer (0,5% Triton X-100/DOC) mit Proteinaseinhibitoren (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Mannheim) hergestellt. Dazu wurden die Gehirne durch einen Dounce-Homogenisator homogenisiert und die Suspension durch immer dünner werdenden Kanülen gezogen (21G - 23G - 27G Nadel) (Terumo, Tokyo, Japan). Anschließend erfolgte die Abtrennung grober Partikel durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bei 4°C (Pellet Fraktion, P1). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut bei 13 000 rpm für 20 min zentrifugiert. Die Detergenz-lösliche (S) und -unlösliche (P2) Fraktion wurde in äquivalenten Mengen mit Laemmli-Probenpuffer versehen, 10 min bei 95°C aufgeköcht und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Für die Analyse von Gehirnen der PrP^{Sc}/Prionen-infizierten Mäuse wurde das Lysat zusätzlich mit Proteinase K (10 μ g/ml) 30 min bei 37°C behandelt.

5.4.1.3 *Nukleärer Extrakt*

Zur Herstellung nukleärer Extrakte wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS von der Zellkulturschale geschabt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für

15 Sekunden pelletiert und in 3-fachem Pellet Volumen hypotonem Lysis-Puffer, dem zuvor Proteinaseinhibitoren (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Mannheim) und 2 mM DTT hinzugefügt wurden, resuspendiert. Die Proben wurden 15 min unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 10 000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das nukleäre Pellet wurde in 3-fachem Volumen hypotonem Lysis-Puffer resuspendiert, dem zuvor 400 mM NaCl zugesetzt wurde. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und nochmaliger Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration des Überstandes nach Bradford bestimmt. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -80°C.

5.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung proteinhaltiger Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit dem Protein *Assay* Kit entsprechend den Angaben des Herstellers Bio-Rad durchgeführt.

5.4.3 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

Für den Nachweis von Protein-DNA-Komplexen wurden *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assays* durchgeführt. Hierzu wurden die Protein-DNA-Komplexe in 4%igen nativen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung eines 4%igen Polyacrylamidgels wurden 50,4 ml H₂O, 3 ml einer 10x TBE Lösung, 6 ml 40% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1), 600 µl 10% APS sowie 60 µl TEMED gemischt und zum Polymerisieren in eine Vertikal-Gelapparatur gegossen. Nach einstündiger Polymerisation erfolgte bei 120V für 1 h eine Vorelektrophorese des Gels in 0,5% TBE Laufpuffer.

Pro Reaktionsansatz von 20 µl wurden 20 000 cpm (*counts per minute*) der radioaktiv markierten Oligonukleotide, 2 µl 10x *Mobility-Shift*-Puffer (10 mM HEPES pH 8,0; 2 mM DTT; 5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 25 mM NaCl; 5% Glycerin), 1 µl DTT (100 mM), 2 µl BSA (1,4 µg/µl), 1 µl poly-dIdC (2 µg/µl) und 5-15 µg des nukleären Extrakts eingesetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit DNA-Probenpuffer versetzt auf das Gel aufgetragen. Im Falle von *Supershift*-Analysen wurde dem Reaktionsansatz nach 15 minütiger Inkubation auf Eis 1 µl des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt. Im Falle von Konkurrenzexperimenten wurden dem Ansatz 50

ng kalter Probe hinzugefügt. Zu Beginn erfolgte die Auftrennung bei 80V, anschließend bei 140V für ca. 2 h. Die Gele wurden im Anschluss auf Whatman 3MM Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) 1 h bei 80°C im Vakuum mit einem Gelrockner (Savant, Holbrook, NY, USA) getrocknet und einem Röntgenfilm (Sigma, Taufkirchen) exponiert.

5.4.4 Immunochemischer Nachweis von Proteinen (*Western Blot*)

5.4.4.1 *Elektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gele*

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gele nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Die Gele setzten sich aus einem unteren 10%igen Polyacrylamid-Trenngel und einem oberen Sammelgel mit 4% Polyacrylamid-Anteil zusammen. Zum Gießen der Gele und für die Elektrophorese wurden *Mini-PROTEAN 3*-Apparaturen (Biorad, München) verwendet. Die Lösung für ein 10%iges Trenngel setzte sich zusammen aus 2,5 ml 40% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1), 2,5 ml Lower Tris (1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% SDS), 10 µl TEMED, 4,9 ml H₂O und 10 µl 10% APS. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit der Sammelgel-Lösung überschichtet. Diese bestand aus 1 ml 40% Acrylamid-Bisacrylamid (29:1), 2,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS), 10 µl TEMED, 6,4 ml H₂O sowie 7,5 µl 20% APS. Die Proben wurden vor dem Auftragen in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-120V und wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblau-Front die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

5.4.4.2 *Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen*

Der Transfer von Proteinen aus einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran (Millipore, Eschborn) erfolgte mittels der *Mini-PROTEAN 3*-Apparatur (Biorad, München). Die PVDF-Membran wurde kurz mit Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit Whatman 3MM Papiere (Whatman, Maidstone, USA) in Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,01% SDS, 20%, Methanol) getränkt. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel so zwischen Membran und Whatman 3MM Papiere platziert, dass die PVDF-Membran zur Anode orientiert war. Der elektrophoretische Transfer erfolgte für 60 min bei 0,8 mA/cm².

5.4.4.3 *Immunochemischer Nachweis von Proteinen auf Membranen*

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese mit 5% Magermilchpulver in PBST (PBS und 0,1% Tween-20) für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (verdünnt in 5% Magermilchpulver in PBST) zugegeben und über Nacht bei 4°C unter vertikalem Schwenken inkubiert. Nach drei Waschstritten von je 10 min mit PBST, erfolgte die Zugabe des Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper für 40 min bei RT. Durch drei 10-minütige Waschrunde wurden nichtgebundene Sekundärantikörper entfernt. Die Detektion der Protein/Antikörper-Komplexe erfolgte mit einem ECL-Reagenz (GE Healthcare Life Science, München).

5.5 MAUS-METHODEN

5.5.1 Tierhaltung

Die Haltung aller Mauslinien erfolgte artgerecht gemäß Tierschutzgesetz (TSchG), in einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. Alle Tiere wurden in heterozygotem Zustand gehalten. Die heterozygoten Parkin-transgenen Tiere wurden kontinuierlich mit Wildtyp-Tieren gekreuzt.

5.5.2 Generierung Parkin-transgener Mäuse

Zur Klonierung des transgenen Rekombinations-Konstruktes wurde dem ORF des human Parkins (Genbank, NM004562) bzw. der Stopp-Mutante die Restriktionsschnittstellen für die Endonuklease I-Sce I, durch PCR mit den Primern Parkin-SceI_forw und Parkin-SceI_rev beziehungsweise W453X-SceI_rev, eingefügt. Die PCR-Fragmente wurden anschließend in das halbgenomische Maus-PrP-Plasmid (phgMmPrP), (Fischer et al., 1996) ligiert, das freundlicherweise von Herrn Professor Kretschmar zur Verfügung gestellt wurde. Um das bakterielle Vektor-Grundgerüst zu entfernen wurde das Konstrukt mit NotI und Sall geschnitten und das transgene Fragment über darauffolgende Gelelektrophorese und Elektroelution isoliert. Die DNA wurde über Elutip-D-Mini-Säulen (Schleicher & Schüll, Dassel) laut Angaben des Hersteller aufgereinigt und nach Ethanol-Präzipitation in Injektionspuffer (10 mM TrisHCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.5) verdünnt. Die

Mikroinjektion in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen von Mäusen der Linie FvB wurde von Dr. Michael R. Bösl am Max-Planck-Institut für Neurobiologie (Martinsried) durchgeführt. Die daraus erhaltenen chimären Tiere, die das Transgen in die Keimbahn transmittierten, wurden als Gründer der transgenen Linien verwendet.

5.5.3 PrP^{Sc}/Prionen-Infektion mittels intracerebraler Inokulation

Die PrP^{Sc}/Prionen-Infektion der transgenen bzw. der Wildtyp-Mäuse erfolgte durch intracerebraler Inokulation mit dem Maus-adaptiertem Erregerstamm RML (Rocky Mountain Laboratory) (Chandler, 1961). Aus dem Gehirn RML-infizierter Mäuse wurde ein 1%iges Hirnhomogenat hergestellt. Im Alter von 6 Wochen wurden die Parkin-transgenen Tieren bzw. Wildtyp-Tiere mit 30 µl diesen Homogenates intracerebral inokuliert. Die Tötung der Tiere erfolgte 120 dpi (*days post inoculation*), 140 dpi sowie nach Auftreten terminaler Anzeichen, die mit Prion-Erkrankungen assoziiert sind.

Pro Gruppe wurden jeweils 8 Parkin-Transgene und 10 Wildtyp-Nachkommen desselben Wurfs analysiert. Die Infektionsversuche wurden freundlicherweise von Dr. Gerda Mitteregger am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) durchgeführt.

5.5.4 Bestimmung der numerischen Zelldichte von CA1-Neuronen

Die numerische Zelldichte der Neuronen der CA1-Region des Hippocampus wurde mit der *physical dissector* Methode durchgeführt (Sterio, 1984). Diese Methode beruht auf der Analyse von in Serien angefertigten Gehirnschnitten bekannter Dicke (h). Dabei wurden Neuronen gezählt, die in dem einen, nicht aber in dem darauffolgenden Schnitt ersichtlich sind (Q). Die numerische Zelldichte N_v wurde nach der Formel $N_v = Q/h$ bestimmt. Die Bestimmung der numerischen Zelldichte wurde freundlicherweise von Dr. Mehdi Shakarami am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) durchgeführt.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	anti
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (x10 ⁻⁶)
A	Adenin oder Adenosin; Ampère
AADC	Aminosäure-Decarboxylase
Abb.	Abbildung
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
ATP6	<i>ATP-synthase subunit a</i>
<i>ATPAF</i>	<i>ATP-synthase mitochondrial F1 complex assembly factor</i>
<i>Bad</i>	<i>Bcl-2-associated agonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BiP	<i>Immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytidin oder Cytosin
CASK	<i>Ca²⁺-calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
CCCP	<i>carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CDCrel	<i>cell division control-related protein</i>
CHIP	<i>carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
Ci	Curie
cIAP	<i>cellular inhibitors of apoptosis</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COXII	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
cpm	gezählte Zerfälle pro min (<i>counts per million</i>)
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Da	Dalton (relative Masse)
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DAPI	4', 6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
dCTP	desoxy-Cytosin-5'-triphosphat
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DLB	<i>Dementia with Lewy Bodies</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-nukleotid-5'-triphosphat
DOC	Desoxycholol

Abkürzungsverzeichnis

DOPAC	Dihydroxyphenylessigsäure
DOSPA	(2,3-Dioleyloxy-N,N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoracetate)
dpc	Tag <i>post coitum</i> (day post coitum)
dpi	Tag <i>post inoculation</i> (day post inoculation)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
ds	Doppelstrang
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 α	eukaryotischer Initiations-Faktor 2 α
EMSA	<i>Electrophoretic-Mobility- Shift-Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FBP1	<i>far upstream sequence element binding protein 1</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FCS	<i>fötales Kälberserum (fetal calf serum)</i>
G	Guanin oder Guanosin
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPe	<i>Globus pallidus externus</i>
GPi	<i>Globus pallidus internus</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure
hP	humanes Parkin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein
HVA	Homovanillinsäure
IBR	<i>in-between-RING</i>
IF	Immunfluoreszenz
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IHC	Immunhistochemie
I κ B	<i>inhibitor of NFκB</i>
IKK	I κ B-Kinase
IL-1	Interleukin-1
IRE1	<i>inositol-requiring protein-1</i>
J	Joule
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
k	Kilo (x10 ³)
kb	Kilobasenpaare
KD	<i>Knock Down</i>
kDa	Kilodalton (relative Masse)
KO	<i>Knock Out</i>
l	Liter

LB	<i>Luria broth</i>
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LPS	Lipopolysaccharide
LRRK2	<i>leucin-rich repeat kinase 2</i>
M	molar
m	Meter; Milli ($\times 10^{-3}$)
MAO	Monoaminoxidase
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
MnSOD	<i>Manganese superoxide dismutase</i>
MOT	Mortalin
MPP ⁺	<i>1-methyl-4-phenyl-pyridin</i>
MPTP	<i>1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridin</i>
MSA	Multisystem Atrophie
3-MT	Methoxytyramin
mt	mitochondrial
n	nano ($\times 10^{-9}$)
NEMO	<i>NFκB essential modifier</i>
ND1/ND2	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1/2</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NQ1	<i>NAD(P)H-quinone oxidoreductase</i>
Oct1	<i>octamer binding transcription factor 1</i>
OD	optische Dichte
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p	pico ($\times 10^{-12}$)
p38/JTV-1	Aminoacyl-tRNA Synthetase-Untereinheit
PACRG	Parkin Co-reguliertes Gen
Pael-R	<i>Parkin associated endothelin-like receptor</i>
PERK	<i>protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	Parkinson-Erkrankung (Parkinson's Disease)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
poly-dIdC	<i>polydeoxyinosinic-deoxycytidylic acid</i>
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein
PrP ^{Sc}	<i>Scrapie</i> -Form des Prion-Proteins
Q	Glutamin
RING	<i>really intersting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SCF	<i>Skp1-Cullin-F-box</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)

sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
STN	<i>Nucleus subthalamicus</i>
T	Thymin oder Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Boratsäure/EDTA
TE	Tris-Puffer mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Thapsigargin
Tg	Transgen
TH	Tyrosinhydroxylase
TM	Tunicamycin
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
TRAF	<i>TNF-Receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitanmonolaureat
U	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
Ubc	<i>Ubiquitin conjugating enzyme</i>
UBL	<i>Ubiquitin-like</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter 2
Vol	Volumen
W	Tryptophan
WB	Western-Blot
Wnt	<i>Wingless/INT</i>
Wt	Wildtyp
XBP-1	<i>x-box binding protein-1</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

7 LITERATURVEZEICHNIS

- 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.
- Agashe, V.R., and Hartl, F.U. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 11, 15-25.
- Alais, S., Simoes, S., Baas, D., Lehmann, S., Raposo, G., Darlix, J.L., and Leblanc, P. (2008). Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol Cell* 100, 603-615.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12, 25-31.
- Appel, T.R., Dumpitak, C., Matthiesen, U., and Riesner, D. (1999). Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem* 380, 1295-1306.
- Arendt, C.S., and Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7156-7161.
- Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-683.
- 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. (2003). Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 120-131.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5703-5708.
- Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552-1555.
- 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. *Nat Genet* 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. *Hum Mol Genet* 18, 4317-4328.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., and Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20, 415-455.
- Betarbet, R., Canet-Aviles, R.M., Sherer, T.B., Mastroberardino, P.G., McLendon, C., Kim, J.H., Lund, S., Na, H.M., Taylor, G., Bence, N.F., *et al.* (2006). Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide

- rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis* 22, 404-420.
- 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. *Nat Neurosci* 3, 1301-1306.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., and Martignoni, E. (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62, 63-88.
- Bloem, B.R., Irwin, I., Buruma, O.J., Haan, J., Roos, R.A., Tetrud, J.W., and Langston, J.W. (1990). The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 97, 273-293.
- Bodles, A.M., and Irvine, G.B. (2004). Alpha-synuclein aggregation. *Protein Pept Lett* 11, 271-279.
- Bonifati, V. (2007). Genetics of parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3, S233-241.
- Bonifati, V., Oostra, B.A., and Heutink, P. (2004). Unraveling the pathogenesis of Parkinson's disease--the contribution of monogenic forms. *Cell Mol Life Sci* 61, 1729-1750.
- 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.
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A., and Prusiner, S.B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267, 16188-16199.
- Bourteele, S., Oesterle, K., Weinzierl, A.O., Paxian, S., Riemann, M., Schmid, R.M., and Planz, O. (2007). Alteration of NF-kappaB activity leads to mitochondrial apoptosis after infection with pathological prion protein. *Cell Microbiol* 9, 2202-2217.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blattler, T., Fischer, M., Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13148-13151.
- Brice, A. (2005). Genetics of Parkinson's disease: LRRK2 on the rise. *Brain* 128, 2760-2762.
- Brody, K.M., Taylor, J.M., Wilson, G.R., Delatycki, M.B., and Lockhart, P.J. (2008). Regional and cellular localisation of Parkin co-regulated gene in developing and adult mouse brain. *Brain Res* 1201, 177-186.
- Buchman, V.L., and Ninkina, N. (2008). Modulation of alpha-synuclein expression in transgenic animals for modelling synucleinopathies--is the juice worth the squeeze? *Neurotox Res* 14, 329-341.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- Burns, M.P., Zhang, L., Rebeck, G.W., Querfurth, H.W., and Moussa, C.E. (2009). Parkin promotes intracellular Abeta1-42 clearance. *Hum Mol Genet* 18, 3206-3216.
- Butler, D.A., Scott, M.R., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T., and Prusiner, S.B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* 62, 1558-1564.
- 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-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9103-9108.
- Casarejos, M.J., Menendez, J., Solano, R.M., Rodriguez-Navarro, J.A., Garcia de Yebenes, J., and Mena, M.A. (2006). Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *J Neurochem* *97*, 934-946.
- Casarejos, M.J., Solano, R.M., Menendez, J., Rodriguez-Navarro, J.A., Correa, C., Garcia de Yebenes, J., and Mena, M.A. (2005). Differential effects of L-DOPA on monoamine metabolism, cell survival and glutathione production in midbrain neuronal-enriched cultures from parkin knockout and wild-type mice. *J Neurochem* *94*, 1005-1014.
- Casarejos, M.J., Solano, R.M., Rodriguez-Navarro, J.A., Gomez, A., Perucho, J., Castano, J.G., Garcia de Yebenes, J., and Mena, M.A. (2009). Parkin deficiency increases the resistance of midbrain neurons and glia to mild proteasome inhibition: the role of autophagy and glutathione homeostasis. *J Neurochem* *110*, 1523-1537.
- Caughey, B. (1991). In vitro expression and biosynthesis of prion protein. *Curr Top Microbiol Immunol* *172*, 93-107.
- Caughey, B., Race, R.E., Ernst, D., Buchmeier, M.J., and Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* *63*, 175-181.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 10345-10350.
- Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* *1*, 1378-1379.
- Chen, Z.J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* *7*, 758-765.
- 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 Res Mol Brain Res* *117*, 179-189.
- 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. *Nat Med* *7*, 1144-1150.
- Cicchetti, F., Lapointe, N., Roberge-Tremblay, A., Saint-Pierre, M., Jimenez, L., Ficke, B.W., and Gross, R.E. (2005). Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis* *20*, 360-371.
- Ciechanover, A., and Brundin, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* *40*, 427-446.
- 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.
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* *24*, 519-550.
- Conn, K.J., Gao, W., McKee, A., Lan, M.S., Ullman, M.D., Eisenhauer, P.B., Fine, R.E., and Wells, J.M. (2004). Identification of the protein disulfide isomerase family member PDIP in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology. *Brain Res* *1022*, 164-172.

- 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. *Hum Mol Genet* 12, 2957-2965.
- 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. *Hum Mol Genet* 12, 1427-1437.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197-1206.
- 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.* (2003). Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 12, 517-526.
- Das, K.C., Lewis-Molock, Y., and White, C.W. (1995). Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am J Physiol* 269, L588-602.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.
- 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.
- Dawe, H.R., Farr, H., Portman, N., Shaw, M.K., and Gull, K. (2005). The Parkin co-regulated gene product, PACRG, is an evolutionarily conserved axonemal protein that functions in outer-doublet microtubule morphogenesis. *J Cell Sci* 118, 5421-5430.
- de Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5, 525-535.
- Delhase, M., and Karin, M. (1999). The I kappa B kinase: a master regulator of NF-kappa B, innate immunity, and epidermal differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64, 491-503.
- DeMartino, G.N., and Slaughter, C.A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14503-14508.
- Deng, H., Jankovic, J., Guo, Y., Xie, W., and Le, W. (2005a). Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 1133-1138.
- Deng, H., Le, W.D., Xie, W.J., Pan, T.H., Zhang, X., and Jankovic, J. (2005b). Genetic analysis of parkin co-regulated gene (PACRG) in patients with early-onset parkinsonism. *Neurosci Lett* 382, 297-299.
- Denison, S.R., Callahan, G., Becker, N.A., Phillips, L.A., and Smith, D.I. (2003). Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 40-52.
- Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., *et al.* (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68, 384-386.

- 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. *J Biol Chem* 280, 16619-16624.
- Duda, J.E., Giasson, B.I., Gur, T.L., Montine, T.J., Robertson, D., Biaggioni, I., Hurtig, H.I., Stern, M.B., Gollomp, S.M., Grossman, M., *et al.* (2000). Immunohistochemical and biochemical studies demonstrate a distinct profile of alpha-synuclein permutations in multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 830-841.
- Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1960). [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system.]. *Klin Wochenschr* 38, 1236-1239.
- Ellis, R.J., and Hartl, F.U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* 9, 102-110.
- 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.
- Fallon, L., Belanger, C.M., Corera, A.T., Kontogiannea, 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. *Nat Cell Biol* 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. *J Biol Chem* 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. *Ann Neurol* 50, 293-300.
- Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D.S., Hulihan, M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, Z., Dickson, D., *et al.* (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 55, 174-179.
- Fernagut, P.O., and Chesselet, M.F. (2004). Alpha-synuclein and transgenic mouse models. *Neurobiol Dis* 17, 123-130.
- Fevrier, M., le Borgne, S., Marty, C., Talarmin, A., and Riviere, Y. (2004). Functional characterization of human Tc0, Tc1 and Tc2 CD8+ T cell clones: control of X4 and R5 HIV strain replication. *J Clin Immunol* 24, 272-280.
- Finney, N., Walther, F., Mantel, P.Y., Stauffer, D., Rovelli, G., and Dev, K.K. (2003). The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain. *J Biol Chem* 278, 16054-16058.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 15, 1255-1264.
- Fornai, F., Schluter, O.M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C.L., Pontarelli, F., Battaglia, G., *et al.* (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3413-3418.
- Forno, L.S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 259-272.

- Foroud, T., Uniacke, S.K., Liu, L., Pankratz, N., Rudolph, A., Halter, C., Shults, C., Marder, K., Conneally, P.M., and Nichols, W.C. (2003). Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* 60, 796-801.
- Fournier, M., Vitte, J., Garrigue, J., Langui, D., Dullin, J.P., Saurini, F., Hanoun, N., Perez-Diaz, F., Cornilleau, F., Joubert, C., *et al.* (2009). Parkin deficiency delays motor decline and disease manifestation in a mouse model of synucleinopathy. *PLoS One* 4, e6629.
- Frank-Cannon, T.C., Tran, T., Ruhn, K.A., Martinez, T.N., Hong, J., Marvin, M., Hartley, M., Trevino, I., O'Brien, D.E., Casey, B., *et al.* (2008). Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *J Neurosci* 28, 10825-10834.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160-164.
- 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. *Ann Neurol* 51, 296-301.
- Gaig, C., Marti, M.J., Ezquerra, M., Rey, M.J., Cardozo, A., and Tolosa, E. (2007). G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 626-628.
- Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Yao, Z., Plun-Favreau, H., Deas, E., Klupsch, K., Downward, J., Latchman, D.S., Tabrizi, S.J., Wood, N.W., *et al.* (2009). PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* 33, 627-638.
- Gasser, T. (2009). Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792, 587-596.
- Gasset, M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., and Prusiner, S.B. (1993). Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1-5.
- Gautier, C.A., Kitada, T., and Shen, J. (2008). Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11364-11369.
- 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.
- Geisler, S., Holmstrom, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12, 119-131.
- Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.
- Ghribi, O., Herman, M.M., Pramoongago, P., and Savory, J. (2003). MPP+ induces the endoplasmic reticulum stress response in rabbit brain involving activation of the ATF-6 and NF-kappaB signaling pathways. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1144-1153.
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276, 2380-2386.
- Gilch, S., Winklhofer, K.F., Groschup, M.H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J., and Schatzl, H.M. (2001). Intracellular re-

- routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J* 20, 3957-3966.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-623.
- 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. *J Biol Chem* 278, 43628-43635.
- 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. *J Biol Chem* 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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.
- Guerrero, R., Navarro, P., Gallego, E., Garcia-Cabrero, A.M., Avila, J., and Sanchez, M.P. (2009). Hyperphosphorylated tau aggregates in the cortex and hippocampus of transgenic mice with mutant human FTDP-17 Tau and lacking the PARK2 gene. *Acta Neuropathol* 117, 159-168.
- Haglund, K., and Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* 24, 3353-3359.
- 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. *Hum Mol Genet* 15, 2059-2075.
- Hanahan, D., and Meselson, M. (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* 100, 333-342.
- Hanson, J.E., Orr, A.L., and Madison, D.V. (2010). Altered Hippocampal Synaptic Physiology in Aged Parkin-Deficient Mice. *Neuromolecular Med.*
- Haque, M.E., Thomas, K.J., D'Souza, C., Callaghan, S., Kitada, T., Slack, R.S., Fraser, P., Cookson, M.R., Tandon, A., and Park, D.S. (2008). Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1716-1721.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., *et al.* (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-633.
- Harrington, K.A., Augood, S.J., Kingsbury, A.E., Foster, O.J., and Emson, P.C. (1996). Dopamine transporter (Dat) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 36, 157-162.
- Hart, M.P., and Xu, A. (2009). Mice expressing mutant parkin exhibit hallmark features of Parkinson's disease. *J Neurosci* 29, 7392-7394.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.

- Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Vila, M., Abbas, N., Perier, C., Faucheux, B.A., Vyas, S., and Hirsch, E.C. (2002). Increased expression and redistribution of the antiapoptotic molecule Bcl-xL in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 10, 28-32.
- Hartmann, A., Troadec, J.D., Hunot, S., Kikly, K., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (2001). Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci* 21, 2247-2255.
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19, 81-88.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.
- Haywood, A.F., and Staveley, B.E. (2004). Parkin counteracts symptoms in a Drosophila model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 5, 14.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- 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 IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB 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. *J Neurochem* 92, 114-122.
- 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. *Nat Med* 6, 1073-1081.
- Herzog, J., and Volkmann, J. (2006). [Non-medical neurosurgical Parkinson treatment]. *Pharm Unserer Zeit* 35, 234-240.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J., and Soto, C. (2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* 22, 5435-5445.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Hattori, N., Mizuno, Y., and Ogawa, N. (2004). Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 89, 1490-1497.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.
- Holtz, W.A., and O'Malley, K.L. (2003). Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278, 19367-19377.
- Holtz, W.A., Turetzky, J.M., Jong, Y.J., and O'Malley, K.L. (2006). Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J Neurochem* 99, 54-69.
- Holtz, W.A., Turetzky, J.M., and O'Malley, K.L. (2005). Microarray expression profiling identifies early signaling transcripts associated with 6-OHDA-induced dopaminergic cell death. *Antioxid Redox Signal* 7, 639-648.
- Honbou, K., Suzuki, N.N., Horiuchi, M., Niki, T., Taira, T., Ariga, H., and Inagaki, F. (2003). The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *J Biol Chem* 278, 31380-31384.
- Hoozemans, J.J., van Haastert, E.S., Eikelenboom, P., de Vos, R.A., Rozemuller, J.M., and Scheper, W. (2007). Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 707-711.
- Hornykiewicz, O. (1982). Imbalance of brain monoamines and clinical disorders. *Prog Brain Res* 55, 419-429.

- Hughes, A.J., Daniel, S.E., and Lees, A.J. (1991). Idiopathic Parkinson's disease combined with multiple system atrophy. A clinicopathological report. *Mov Disord* 6, 342-346.
- Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P.P., Muriel, M.P., Ruberg, M., Faucheux, B.A., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (1997). Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7531-7536.
- Hutson, P.H., and Curzon, G. (1983). Monitoring in vivo of transmitter metabolism by electrochemical methods. *Biochem J* 211, 1-12.
- 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. *Exp Neurol* 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. *Ann Neurol* 48, 737-744.
- Huynh, D.P., Scoles, D.R., Nguyen, D., and Pulst, S.M. (2003). The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet* 12, 2587-2597.
- 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. *J Neurosci Res* 82, 232-244.
- Ikeda, K., Ikeda, T., Morikawa, K., and Kamiya, R. (2007). Axonemal localization of Chlamydomonas PACRG, a homologue of the human Parkin-coregulated gene product. *Cell Motil Cytoskeleton* 64, 814-821.
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I., and Takahashi, R. (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 10, 55-67.
- 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., Murakami, T., Shoji, M., Abe, K., and Takahashi, R. (2003). A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. *J Biol Chem* 278, 51901-51910.
- Imai, Y., Soda, M., and Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 275, 35661-35664.
- 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. *Hum Mol Genet* 12, 2277-2291.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-28.
- Jiang, H., Jiang, Q., Liu, W., and Feng, J. (2006). Parkin suppresses the expression of monoamine oxidases. *J Biol Chem* 281, 8591-8599.
- Jiang, H., Ren, Y., Zhao, J., and Feng, J. (2004). Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 13, 1745-1754.
- Jiang, Q., Ren, Y., and Feng, J. (2008). Direct binding with histone deacetylase 6 mediates the reversible recruitment of parkin to the centrosome. *J Neurosci* 28, 12993-13002.

- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* *102*, 549-552.
- Junn, E., Jang, W.H., Zhao, X., Jeong, B.S., and Mouradian, M.M. (2009). Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *J Neurosci Res* *87*, 123-129.
- Kahle, P.J. (2008). alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* *115*, 87-95.
- Kaltschmidt, B., Widera, D., and Kaltschmidt, C. (2005). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* *1745*, 287-299.
- Karin, M. (1999a). The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* *274*, 27339-27342.
- Karin, M. (1999b). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* *18*, 6867-6874.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* *3*, 221-227.
- Khan, N.L., Graham, E., Critchley, P., Schrag, A.E., Wood, N.W., Lees, A.J., Bhatia, K.P., and Quinn, N. (2003). Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* *126*, 1279-1292.
- Kim, I., Xu, W., and Reed, J.C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* *7*, 1013-1030.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Murakami, S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* *11*, 5-13.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 5215-5220.
- 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 recessive juvenile parkinsonism. *Nature* *392*, 605-608.
- Kitada, T., Pisani, A., Karouani, M., Haburcak, M., Martella, G., Tscherter, A., Platania, P., Wu, B., Pothos, E.N., and Shen, J. (2009). Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of parkin^{-/-} mice. *J Neurochem* *110*, 613-621.
- Kitada, T., Pisani, A., Porter, D.R., Yamaguchi, H., Tscherter, A., Martella, G., Bonsi, P., Zhang, C., Pothos, E.N., and Shen, J. (2007). Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11441-11446.
- Kitao, Y., Imai, Y., Ozawa, K., Kataoka, A., Ikeda, T., Soda, M., Nakimawa, K., Kiyama, H., Stern, D.M., Hori, O., *et al.* (2007). Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum Mol Genet* *16*, 50-60.
- Klein, C., Schumacher, K., Jacobs, H., Hagenah, J., Kis, B., Garrels, J., Schwinger, E., Ozelius, L., Pramstaller, P., Vieregge, P., *et al.* (2000). Association studies of Parkinson's disease and parkin polymorphisms. *Ann Neurol* *48*, 126-127.
- Klein, R.L., Dayton, R.D., Henderson, K.M., and Petrucelli, L. (2006). Parkin is protective for substantia nigra dopamine neurons in a tau gene transfer neurodegeneration model. *Neurosci Lett* *401*, 130-135.
- Klein, T.R., Kirsch, D., Kaufmann, R., and Riesner, D. (1998). Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem* *379*, 655-666.

- 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. *J Biol Chem* 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.
- Kosel, S., Egensperger, R., von Eitzen, U., Mehraein, P., and Graeber, M.B. (1997). On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra. *Acta Neuropathol* 93, 105-108.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J. (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464.
- Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2005). A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep* 6, 321-326.
- Krappmann, D., Wulczyn, F.G., and Scheidereit, C. (1996). Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor IkappaB alpha in vivo. *EMBO J* 15, 6716-6726.
- Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W., and Khrapko, K. (2006). Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 38, 518-520.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Eppelen, J.T., Schols, L., and Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 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. *J Neurochem* 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. *Hum Mol Genet* 15, 883-895.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lang, A.E., and Lozano, A.M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339, 1044-1053.
- 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.
- LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Weihofen, A., Schlossmacher, M.G., and Selkoe, D.J. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med* 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. *J Neurochem* 83, 1431-1440.
- Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9136-9141.
- Lee, S.J., Kim, S.J., Kim, I.K., Ko, J., Jeong, C.S., Kim, G.H., Park, C., Kang, S.O., Suh, P.G., Lee, H.S., *et al.* (2003). Crystal structures of human DJ-1 and Escherichia coli

- Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. *J Biol Chem* 278, 44552-44559.
- 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. *Hum Mutat* 28, 27-32.
- Lev, N., Melamed, E., and Offen, D. (2003). Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 245-250.
- Li, X., Patel, J.C., Wang, J., Avshalumov, M.V., Nicholson, C., Buxbaum, J.D., Elder, G.A., Rice, M.E., and Yue, Z. (2010). Enhanced striatal dopamine transmission and motor performance with LRRK2 overexpression in mice is eliminated by familial Parkinson's disease mutation G2019S. *J Neurosci* 30, 1788-1797.
- Li, Y.Y., Yu, H., Guo, Z.M., Guo, T.Q., Tu, K., and Li, Y.X. (2006). Systematic analysis of head-to-head gene organization: evolutionary conservation and potential biological relevance. *PLoS Comput Biol* 2, e74.
- 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.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17510-17515.
- 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? *Ann Neurol* 54, 176-185.
- Lorenzetti, D., Antalffy, B., Vogel, H., Noveroske, J., Armstrong, D., and Justice, M. (2004a). The neurological mutant quaking(viable) is Parkin deficient. *Mamm Genome* 15, 210-217.
- Lorenzetti, D., Bishop, C.E., and Justice, M.J. (2004b). Deletion of the Parkin coregulated gene causes male sterility in the quaking(viable) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8402-8407.
- Lu, P.D., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167, 27-33.
- 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. *N Engl J Med* 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. *J Biol Chem* 284, 22938-22951.
- MacFarlane, M., and Williams, A.C. (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 5, 674-678.
- MacLeod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K., and Abeliovich, A. (2006). The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron* 52, 587-593.
- 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. *J Neurochem* 36, 589-593.

- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 18, 716-731.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S., and Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302, 871-874.
- 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. *Exp Neurol* 207, 289-301.
- Marongiu, R., Spencer, B., Crews, L., Adame, A., Patrick, C., Trejo, M., Dallapiccola, B., Valente, E.M., and Masliah, E. (2009). Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux. *J Neurochem* 108, 1561-1574.
- Marsden, C.D. (1983). Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 19, 121-141.
- Marshall, K.A., Daniel, S.E., Cairns, N., Jenner, P., and Halliwell, B. (1997). Upregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 may be an early event in neurodegeneration: studies on Parkinson's and incidental Lewy body disease. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 84-87.
- Martella, G., Platania, P., Vita, D., Sciamanna, G., Cuomo, D., Tassone, A., Tschertter, A., Kitada, T., Bonsi, P., Shen, J., *et al.* (2009). Enhanced sensitivity to group II mGlu receptor activation at corticostriatal synapses in mice lacking the familial parkinsonism-linked genes PINK1 or Parkin. *Exp Neurol* 215, 388-396.
- 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. *J Biol Chem* 281, 3204-3209.
- Mattson, M.P., Culmsee, C., Yu, Z., and Camandola, S. (2000). Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 74, 443-456.
- 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. *J Biol Chem* 276, 40120-40126.
- McNaught, K.S., Mytilineou, C., Jnobaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jennert, P., and Olanow, C.W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem* 81, 301-306.
- McNaught, K.S., and Olanow, C.W. (2003). Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S73-84; discussion S84-76.
- Mena, M.A., Casarejos, M.J., Solano, R., Rodriguez-Navarro, J.A., Gomez, A., Rodal, I., Medina, M., and de Yébenes, J.G. (2009). NP7 protects from cell death induced by oxidative stress in neuronal and glial midbrain cultures from parkin null mice. *FEBS Lett* 583, 168-174.
- 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. *Hum Mol Genet* 15, 2045-2058.
- 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. *J Biol Chem* 278, 36588-36595.

- Miller, D.W., Hague, S.M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M.R., and Singleton, A.B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 62, 1835-1838.
- Mills, R.D., Sim, C.H., Mok, S.S., Mulhern, T.D., Culvenor, J.G., and Cheng, H.C. (2008). Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 105, 18-33.
- 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.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Narabayashi, H., Riederer, P., and Nagatsu, T. (1996). bcl-2 protein is increased in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 215, 137-139.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm* 107, 335-341.
- Moore, D.J. (2006). Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase. *Biochem Soc Trans* 34, 749-753.
- Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005a). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 57-87.
- Moore, D.J., Zhang, L., Troncoso, J., Lee, M.K., Hattori, N., Mizuno, Y., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2005b). Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 14, 71-84.
- Morais, V.A., Verstreken, P., Roethig, A., Smet, J., Snellinx, A., Vanbrabant, M., Haddad, D., Frezza, C., Mandemakers, W., Vogt-Weisenhorn, D., *et al.* (2009). Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med* 1, 99-111.
- Moran, L.B., Croisier, E., Duke, D.C., Kalaitzakis, M.E., Roncaroli, F., Deprez, M., Dexter, D.T., Pearce, R.K., and Graeber, M.B. (2007). Analysis of alpha-synuclein, dopamine and parkin pathways in neuropathologically confirmed parkinsonian nigra. *Acta Neuropathol* 113, 253-263.
- 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.
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M.J., and Sambrook, J.F. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J* 11, 2583-2593.
- Morimoto, R.I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* 22, 1427-1438.
- Muqit, M.M., Davidson, S.M., Payne Smith, M.D., MacCormac, L.P., Kahns, S., Jensen, P.H., Wood, N.W., and Latchman, D.S. (2004). Parkin is recruited into aggresomes in a stress-specific manner: over-expression of parkin reduces aggresome formation but can be dissociated from parkin's effect on neuronal survival. *Hum Mol Genet* 13, 117-135.
- Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S.M., and Ariga, H. (1997). DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 509-513.
- Nakaso, K., Adachi, Y., Yasui, K., Sakuma, K., and Nakashima, K. (2006). Detection of compound heterozygous deletions in the parkin gene of fibroblasts in patients with autosomal recessive hereditary parkinsonism (PARK2). *Neurosci Lett* 400, 44-47.

- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183, 795-803.
- Navarro, P., Guerrero, R., Gallego, E., Avila, J., Luquin, R., Ruiz, P.J., and Sanchez, M.P. (2008). Memory and exploratory impairment in mice that lack the Park-2 gene and that over-express the human FTDP-17 mutant Tau. *Behav Brain Res* 189, 350-356.
- Netzer, W.J., and Hartl, F.U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* 23, 68-73.
- 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.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16, 1345-1355.
- Nutt, J.G., and Wooten, G.F. (2005). Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 353, 1021-1027.
- 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.
- Olzmann, J.A., Brown, K., Wilkinson, K.D., Rees, H.D., Huai, Q., Ke, H., Levey, A.I., Li, L., and Chin, L.S. (2004). Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem* 279, 8506-8515.
- Orsi, A., Fioriti, L., Chiesa, R., and Sitia, R. (2006). Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem* 281, 30431-30438.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Paisan-Ruiz, C., Lang, A.E., Kawarai, T., Sato, C., Salehi-Rad, S., Fisman, G.K., Al-Khairallah, T., St George-Hyslop, P., Singleton, A., and Rogaeva, E. (2005). LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology* 65, 696-700.
- 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. *J Biol Chem* 279, 18614-18622.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., *et al.* (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10962-10966.
- Papa, S., Bubici, C., Zazzeroni, F., Pham, C.G., Kuntzen, C., Knabb, J.R., Dean, K., and Franzoso, G. (2006). The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* 13, 712-729.
- 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.
- 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.

- 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.
- Perez, F.A., Curtis, W.R., and Palmiter, R.D. (2005). Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity. *BMC Neurosci* 6, 71.
- Perez, F.A., and Palmiter, R.D. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2174-2179.
- Periquet, M., Corti, O., Jacquier, S., and Brice, A. (2005). Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem* 95, 1259-1276.
- Perucho, J., Casarejos, M.J., Rubio, I., Rodriguez-Navarro, J.A., Gomez, A., Ampuero, I., Rodal, I., Solano, R.M., Carro, E., Garcia de Yébenes, J., *et al.* (2010). The effects of parkin suppression on the behaviour, amyloid processing, and cell survival in APP mutant transgenic mice. *Exp Neurol* 221, 54-67.
- 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* 131, 2183-2194.
- 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. *J Biol Chem* 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.
- Pickart, C.M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25, 544-548.
- Pizzo, P., and Pozzan, T. (2007). Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol* 17, 511-517.
- Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., *et al.* (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 9, 1243-1252.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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. *Ann Neurol* 58, 411-422.
- Pridgeon, J.W., Olzmann, J.A., Chin, L.S., and Li, L. (2007). PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol* 5, e172.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13363-13383.

- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Groth, D.F., Bowman, K.A., Mock, N.I., Cochran, S.P., and Masiarz, F.R. (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6675-6679.
- Raha, S., and Robinson, B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 25, 502-508.
- Rambold, A.S., Muller, V., Ron, U., Ben-Tal, N., Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2008). Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions. *EMBO J* 27, 1974-1984.
- Ravid, T., and Hochstrasser, M. (2004). NF-kappaB signaling: flipping the switch with polyubiquitin chains. *Curr Biol* 14, R898-900.
- Rawal, N., Corti, O., Sacchetti, P., Ardilla-Osorio, H., Sehat, B., Brice, A., and Arenas, E. (2009). Parkin protects dopaminergic neurons from excessive Wnt/beta-catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 473-478.
- Rawal, N., Periquet, M., Lohmann, E., Lucking, C.B., Teive, H.A., Ambrosio, G., Raskin, S., Lincoln, S., Hattori, N., Guimaraes, J., *et al.* (2003). New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism. *Neurology* 60, 1378-1381.
- 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.
- Rodriguez-Navarro, J.A., Casarejos, M.J., Menendez, J., Solano, R.M., Rodal, I., Gomez, A., Yebenes, J.G., and Mena, M.A. (2007). Mortality, oxidative stress and tau accumulation during ageing in parkin null mice. *J Neurochem* 103, 98-114.
- Rodriguez-Navarro, J.A., Gomez, A., Rodal, I., Perucho, J., Martinez, A., Furio, V., Ampuero, I., Casarejos, M.J., Solano, R.M., de Yebenes, J.G., *et al.* (2008). Parkin deletion causes cerebral and systemic amyloidosis in human mutated tau over-expressing mice. *Hum Mol Genet* 17, 3128-3143.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Rosen, K.M., Moussa, C.E., Lee, H.K., Kumar, P., Kitada, T., Qin, G., Fu, Q., and Querfurth, H.W. (2010). Parkin reverses intracellular beta-amyloid accumulation and its negative effects on proteasome function. *J Neurosci Res* 88, 167-178.
- 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. *J Biol Chem* 281, 12809-12816.
- Rothfuss, O., Fischer, H., Hasegawa, T., Maisel, M., Leitner, P., Miesel, F., Sharma, M., Bornemann, A., Berg, D., Gasser, T., *et al.* (2009). Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Mol Genet* 18, 3832-3850.
- Rubio, I., Rodriguez-Navarro, J.A., Tomas-Zapico, C., Ruiz, C., Casarejos, M.J., Perucho, J., Gomez, A., Rodal, I., Lucas, J.J., Mena, M.A., *et al.* (2009). Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice. *Brain Res* 1281, 91-100.
- Ryu, E.J., Angelastro, J.M., and Greene, L.A. (2005). Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 18, 54-74.
- Ryu, E.J., Harding, H.P., Angelastro, J.M., Vitolo, O.V., Ron, D., and Greene, L.A. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22, 10690-10698.
- Sailer, A., Bueler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77, 967-968.
- Sang, T.K., Chang, H.Y., Lawless, G.M., Ratnaparkhi, A., Mee, L., Ackerson, L.C., Maidment, N.T., Krantz, D.E., and Jackson, G.R. (2007). A Drosophila model of

- mutant human parkin-induced toxicity demonstrates selective loss of dopaminergic neurons and dependence on cellular dopamine. *J Neurosci* 27, 981-992.
- Sato, S., Chiba, T., Nishiyama, S., Kakiuchi, T., Tsukada, H., Hatano, T., Fukuda, T., Yasoshima, Y., Kai, N., Kobayashi, K., *et al.* (2006). Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice shown by ex vivo autoradiography. *J Neurosci Res* 84, 1350-1357.
- Schapira, A.H. (2005). Present and future drug treatment for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 1472-1478.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54, 823-827.
- Schlehe, J.S., Lutz, A.K., Pilsl, A., Lammermann, K., Grgur, K., Henn, I.H., Tatzelt, J., and Winklhofer, K.F. (2008). Aberrant folding of pathogenic Parkin mutants: aggregation versus degradation. *J Biol Chem* 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.
- Serrano, A., Menendez, J., Casarejos, M.J., Solano, R.M., Gallego, E., Sanchez, M., Mena, M.A., and Garcia de Yebenes, J. (2005). Effects of cinnarizine, a calcium antagonist that produces human parkinsonism, in parkin knock out mice. *Neuropharmacology* 49, 208-219.
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., and Abeliovich, A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* 2, e362.
- Sherman, M.Y., and Goldberg, A.L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.
- Shiba, K., Arai, T., Sato, S., Kubo, S., Ohba, Y., Mizuno, Y., and Hattori, N. (2009). Parkin stabilizes PINK1 through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 331-335.
- 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. *Nat Genet* 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. *Ann Neurol* 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 by parkin from human brain: 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. *Ann Neurol* 36, 348-355.
- Sibley, D.R., Monsma, F.J., Jr., McVittie, L.D., Gerfen, C.R., Burch, R.M., and Mahan, L.C. (1992). Molecular neurobiology of dopamine receptor subtypes. *Neurochem Int* 20 Suppl, 17S-22S.
- Sidhu, A., Wersinger, C., and Vernier, P. (2004). alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett* 565, 1-5.

- 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. *Hum Mol Genet* *14*, 3477-3492.
- Singh, S., and Dikshit, M. (2007). Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev* *54*, 233-250.
- 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.
- Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Moore, D.J., Liang, Y., West, A.B., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (2005). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18676-18681.
- Solano, R.M., Casarejos, M.J., Menendez-Cuervo, J., Rodriguez-Navarro, J.A., Garcia de Yebenes, J., and Mena, M.A. (2008). Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging. *J Neurosci* *28*, 598-611.
- Solano, R.M., Menendez, J., Casarejos, M.J., Rodriguez-Navarro, J.A., Garcia de Yebenes, J., and Mena, M.A. (2006). Midbrain neuronal cultures from parkin mutant mice are resistant to nitric oxide-induced toxicity. *Neuropharmacology* *51*, 327-340.
- Sourkes, T.L., and Poirier, L. (1965). Influence of the substantia nigra on the concentration of 5-hydroxytryptamine and dopamine of the striatum. *Nature* *207*, 202-203.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *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.
- 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. *Hum Mol Genet* *14*, 2571-2586.
- 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.
- Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., and Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* *188*, 211-216.
- Sterio, D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* *134*, 127-136.
- 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. *Eur J Neurosci* *12*, 4181-4194.
- Stichel, C.C., Zhu, X.R., Bader, V., Linnartz, B., Schmidt, S., and Lubbert, H. (2007). Mono- and double-mutant mouse models of Parkinson's disease display severe mitochondrial damage. *Hum Mol Genet* *16*, 2377-2393.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G., and Vrana, K.E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* *55*, 659-665.
- Sullivan, P.G., Dragicevic, N.B., Deng, J.H., Bai, Y., Dimayuga, E., Ding, Q., Chen, Q., Bruce-Keller, A.J., and Keller, J.N. (2004). Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. *J Biol Chem* *279*, 20699-20707.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* *7*, 880-885.

- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M., Takahashi, K., and Ariga, H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5, 213-218.
- 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.
- 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. *Hum Genet* 118, 484-488.
- Tanaka, A. (2010). Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. *FEBS Lett* 584, 1386-1392.
- Tao, X., and Tong, L. (2003). Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem* 278, 31372-31379.
- Tatton, N.A., and Kish, S.J. (1997). In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77, 1037-1048.
- Taylor, J.M., Song, Y.J., Huang, Y., Farrer, M.J., Delatycki, M.B., Halliday, G.M., and Lockhart, P.J. (2007). Parkin Co-Regulated Gene (PACRG) is regulated by the ubiquitin-proteasomal system and is present in the pathological features of Parkinsonian diseases. *Neurobiol Dis* 27, 238-247.
- Taylor, J.P., Mata, I.F., and Farrer, M.J. (2006). LRRK2: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention? *Trends Mol Med* 12, 76-82.
- Thomas, B., and Beal, M.F. (2007). Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 16 *Spec No. 2*, R183-194.
- Thomas, B., von Coelln, R., Mandir, A.S., Trinkaus, D.B., Farah, M.H., Leong Lim, K., Calingasan, N.Y., Flint Beal, M., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2007). MPTP and DSP-4 susceptibility of substantia nigra and locus coeruleus catecholaminergic neurons in mice is independent of parkin activity. *Neurobiol Dis* 26, 312-322.
- 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. *J Biol Chem* 278, 22044-22055.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Uhl, G.R., Walther, D., Mash, D., Faucheux, B., and Javoy-Agid, F. (1994). Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol* 35, 494-498.
- Um, J.W., Min, D.S., Rhim, H., Kim, J., Paik, S.R., and Chung, K.C. (2006). Parkin ubiquitinates and promotes the degradation of RanBP2. *J Biol Chem* 281, 3595-3603.
- 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.
- 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.
- 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.
- Vella, L.J., Sharples, R.A., Lawson, V.A., Masters, C.L., Cappai, R., and Hill, A.F. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 211, 582-590.
- Vercammen, L., Van der Perren, A., Vaudano, E., Gijbsers, 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.
- Vives-Bauza, C., de Vries, R.L., Tocilescu, M., and Przedborski, S. (2010). PINK1/Parkin direct mitochondria to autophagy. *Autophagy* 6, 315-316.
- von Coelln, R., Thomas, B., Andrabi, S.A., Lim, K.L., Savitt, J.M., Saffary, R., Stirling, W., Bruno, K., Hess, E.J., Lee, M.K., *et al.* (2006). Inclusion body formation and neurodegeneration are parkin independent in a mouse model of alpha-synucleinopathy. *J Neurosci* 26, 3685-3696.
- Von Coelln, R., Thomas, B., Savitt, J.M., Lim, K.L., Sasaki, M., Hess, E.J., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10744-10749.
- Waak, J., Weber, S.S., Gorner, K., Schall, C., Ichijo, H., Stehle, T., and Kahle, P.J. (2009). Oxidizable residues mediating protein stability and cytoprotective interaction of DJ-1 with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* 284, 14245-14257.
- Walter, S., and Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 1098-1113.
- Wang, C., Ko, H.S., Thomas, B., Tsang, F., Chew, K.C., Tay, S.P., Ho, M.W., Lim, T.M., Soong, T.W., Pletnikova, O., *et al.* (2005a). Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet* 14, 3885-3897.
- 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. (2005b). Alterations in the solubility and intracellular localization of parkin by several familial Parkinson's disease-linked point mutations. *J Neurochem* 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. *Antioxid Redox Signal* 9, 533-542.
- Wang, X.F., Li, S., Chou, A.P., and Bronstein, J.M. (2006). Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 23, 198-205.
- West, A., Farrer, M., Petrucelli, L., Cookson, M., Lockhart, P., and Hardy, J. (2001). Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *J Neurochem* 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. *Hum Mol Genet* 16, 223-232.
- Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G.A., and Prusiner, S.B. (1994). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6418-6422.

- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 8024-8029.
- Winklhofer, K.F. (2007). The parkin protein as a therapeutic target in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets* *11*, 1543-1552.
- Winklhofer, K.F., and Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* *1802*, 29-44.
- Winklhofer, K.F., Heller, U., Reintjes, A., and Tatzelt, J. (2003a). Inhibition of complex glycosylation increases the formation of PrP^{Sc}. *Traffic* *4*, 313-322.
- Winklhofer, K.F., Henn, I.H., Kay-Jackson, P.C., Heller, U., and Tatzelt, J. (2003b). Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones. *J Biol Chem* *278*, 47199-47208.
- Winklhofer, K.F., and Tatzelt, J. (2000). Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP^{Sc} in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol Chem* *381*, 463-469.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z., Abramov, A.Y., Miljan, E.A., Keen, G., Stanyer, L., Hargreaves, I., Klupsch, K., Deas, E., *et al.* (2008). PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* *3*, e2455.
- Yamamuro, A., Yoshioka, Y., Ogita, K., and Maeda, S. (2006). Involvement of endoplasmic reticulum stress on the cell death induced by 6-hydroxydopamine in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res* *31*, 657-664.
- Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M.E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., Beal, M.F., Nishimura, I., Wakamatsu, K., Ito, S., *et al.* (2005). Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13670-13675.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *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. *Eur J Neurosci* *24*, 1366-1372.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* *6*, 1355-1364.
- Yokota, T., Sugawara, K., Ito, K., Takahashi, R., Ariga, H., and Mizusawa, H. (2003). Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* *312*, 1342-1348.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* *273*, 33741-33749.
- You, L.R., Chen, C.M., and Lee, Y.H. (1999). Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* *73*, 1672-1681.

- 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. *Ann Neurol* 55, 164-173.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 25935-25938.
- Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D.J., Yu, S.W., Marupudi, N.I., Torp, R., Torgner, I.A., Ottersen, O.P., Dawson, T.M., *et al.* (2005). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14, 2063-2073.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13354-13359.
- Zhao, J., Ren, Y., Jiang, Q., and Feng, J. (2003). Parkin is recruited to the centrosome in response to inhibition of proteasomes. *J Cell Sci* 116, 4011-4019.
- Zhu, X.R., Maskri, L., Herold, C., Bader, V., Stichel, C.C., Gunturkun, O., and Lubbert, H. (2007). Non-motor behavioural impairments in parkin-deficient mice. *Eur J Neurosci* 26, 1902-1911.
- 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.

CURRICULUM VITAE

Name: Anita Schlierf
geboren am: 23.07.1978 in Eichstätt / Bay.
Familienstand: nicht verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Seit 01/2006 **Promotion** am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München, Abteilung Neurobiochemie

Thema „Charakterisierung der physiologischen Funktion von Parkin im Zellkultur- und Maus-Modell“

Arbeitsgruppe: PD Dr. K.F. Winklhofer
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. C. Haass

07/2004–04/2005 **Diplomarbeit** am Institut für Biochemie, FAU Erlangen

Thema „Untersuchungen zur Regulation und Interaktion der Transkriptionsfaktoren L-Sox5 und Sox6 durch und mit Sox8, Sox9 und Sox10“

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. M. Wegner

04/2004 Diplom-Hauptprüfung

12/2001 Diplom-Vorprüfung

11/1999–04/2005 **Studium der Biologie** an der Friedrich-Alexander-Universität (FAU), Erlangen

1999 Allgemeine Hochschulreife

1989-1999 Gabrieli-Gymnasium Eichstätt

PUBLIKATIONEN

Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, **Schlierf A**, Schramm JE, Wegener E, Nakaso K, Culmsee C, Berninger B, Krappmann D, Tatzelt, Winklhofer KF.

Parkin mediates neuroprotection through activation of IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling. J. Neurosci. 2007Feb; 27(8):1868-78

Stolt CC, **Schlierf A**, Lommes P, Hillgärtner S, Werner T, Kosian T, Sock E, Kessaris N, Richardson WD, Levebre V, Wegner M.

SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate Sox E function. Dev. Cell. 2006 Nov; 11(5)697-709

DANKSAGUNG

Zuerst gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. Konstanze Winklhofer für die Überlassung dieses spannenden Themas, für ihre außerordentliche wissenschaftliche Betreuung und für ihr großes Engagement auch in den manchmal schwierigen Phasen des Projekts. Danke für die stets offene Tür und für die Unterstützungen in vielerlei Hinsicht.

Herrn Prof. Jörg Tatzelt möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, aber besonders für die hilfreichen Diskussionen, Herausforderungen und Aufrechterhaltung meines Blutzuckerspiegels danken.

Herrn Prof. Christian Haass danke ich für sein stetes Interesse, anregende Ideen und wissenschaftliche Unterstützung.

Großer Dank gilt den Kooperationspartnern Herrn Prof. Hans Kretzschmar, Dr. Gerda Mitteregger, Dr. Mehdi Shakarami, Prof. Carsten Culmsee, Dr. Benedikt Berninger und Dr. Michael Bösl, deren Hilfsbereitschaft und Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Margit Miesbauer, Angelika Rambold, Lena Bouman, Iris Henn und Anna Pilsl nicht nur für die tolle Zusammenarbeit, sondern auch für die tatkräftige Unterstützung, die wichtige Beiträge zu dieser Arbeit lieferten.

Weiterhin danke ich allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für die sehr gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft, Unternehmungen und das harmonische Arbeitsklima, in dem es Spaß gemacht hat zu arbeiten. Großer Dank geht insbesondere an Sabine Odoy, Andreas Kräutler, Annette Schell, Barbara Kassner, Veronika Müller und an das „Tierstall-Team“ Antonia Weis und Darko Vukmanovic, die alle den Lehrstuhl am Laufen halten.

Ganz besonderer Dank gilt den Arbeitsgruppen Winklhofer und Tatzelt. Neben der großartigen Zusammenarbeit und Unterstützung danke ich euch für die schönen außerwissenschaftlichen Aktivitäten, die den Labor-Alltag versüßten.

Mareike, Margit und Geli: Ich werde unsere Mädelsabende und Unternehmungen zu viert vermissen. Danke für die tolle unvergessliche Zeit! Ein großes Dankeschön auch an Natalie, die zu einer tollen Freundin geworden ist, die ich nicht mehr missen möchte! Ein großer Dank auch an Anna für die zahlreichen Aufmunterungen, Unternehmungen und fürs Versorgen mit fester und flüssiger Nahrung!

Mein größter Dank geht an meine Familie: Meinen Schwestern Elke und Beate bin ich für die stete moralische Unterstützung und Beate zusätzlich für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge und Tipps unendlich dankbar. Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir so vieles im Leben ermöglichen, mir immer Rückhalt geben und an mich glauben. DANKE!