

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

**Die Rolle von Parkin bei der Parkinson-Erkrankung:  
Physiologische Funktion und  
Mechanismen der Inaktivierung**

**Iris H. Henn**

aus

Miltenberg

2007

### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried und 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, 05. April 2007

Dissertation eingereicht am 05. April 2007

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

2. Gutachter: Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl

Mündliche Prüfung am 30. Mai 2007

## **Danksagung**

Mein ganz herzlicher Dank gilt Priv. Doz. Dr. Konstanze F. Winklhofer für die umfangreiche und hervorragende Betreuung dieser Arbeit, die fortwährende Unterstützung und zahlreichen Diskussionen.

Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Das gute Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die sehr guten Arbeitsbedingungen in der Abteilung von Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl am Max-Planck-Institut für Biochemie und der Abteilung von Prof. Dr. Christian Haass am Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität nicht möglich gewesen. Dafür, und für viele anregende Fragen und Ideen möchte ich beiden herzlich danken.

Bei Prof. Dr. Jörg Tatzelt möchte ich mich für seine vielseitige Unterstützung und Hilfe besonders bedanken.

Einzelne Bereiche dieser Arbeit wurden durch erfolgreiche Kooperationen ermöglicht. So danke ich Dr. Carsten Culmsee für die Präparierung von primären Neuronen, Dr. Daniel Krappmann für die Überlassung zahlreicher Plasmide und Dr. Kazuhiro Nakaso für die Bereitstellung von Patienten-Fibroblasten.

Großer Dank gilt den Arbeitsgruppen Winklhofer und Tatzelt und allen Mitarbeitern der Abteilungen Hartl und Haass für die gute Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit im sowie außerhalb des Labors. Besonders danke ich Lena Bouman, Julia Schlehe und Anita Schlierf für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor, die zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön geht an alle meine Freunde für Motivation, Spass und Unterstützung. Besonders danke ich Dr. Sophia Kiachopoulos, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem danke ich ihr für das Korrekturlesen dieser Arbeit und anregende Kommentare.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich mit voller Kraft unterstützt haben und immer für mich da sind.

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Parkinson-Erkrankung .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Einführung .....	1
1.1.2 Neuropathologische und neurophysiologische Charakteristika.....	1
1.1.3 Klinische Charakteristika und Therapieansätze.....	4
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese .....	6
1.1.4.1 Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion .....	7
1.1.4.2 Proteinaggregation und proteasomale Fehlfunktion .....	8
1.1.5 Familiäre Formen der Parkinson-Erkrankung und ihre genetischen Grundlagen .....	9
1.1.5.1 Autosomal-dominant erbliche Formen der Parkinson-Erkrankung ...	11
1.1.5.1.1 $\alpha$ -Synuclein .....	11
1.1.5.1.2 UCH-L1 .....	12
1.1.5.1.3 LRRK2.....	12
1.1.5.2 Autosomal-rezessiv erbliche Formen der Parkinson-Erkrankung ....	13
1.1.5.2.1 Parkin.....	13
1.1.5.2.2 PINK1 .....	13
1.1.5.2.3 DJ-1 .....	14
<b>1.2 Parkin-assoziierte autosomal-rezessive Parkinson-Erkrankung .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Klinische und neuropathologische Charakteristika .....	15
1.2.2 Molekulargenetische und zellbiologische Charakteristika von Parkin....	16
1.2.3 Physiologische Funktion von Parkin .....	19
1.2.3.1 Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Parkin.....	19
1.2.3.1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System .....	19
1.2.3.1.2 Unterschiedliche Arten der Ubiquitin-Verknüpfung.....	22
1.2.3.1.3 Potentielle Parkin-Substrate .....	22
1.2.3.2 Parkin besitzt neuroprotektives Potential.....	27
1.2.4 Parkin-Mutationen .....	30
1.2.5 Parkin- <i>Knock-out</i> -Modelle .....	31
1.2.5.1 Maus-Modelle .....	31
1.2.5.2 <i>Drosophila</i> -Modell.....	32
<b>1.3 Protektive Signaltransduktionswege.....</b>	<b>33</b>
1.3.1 Molekulare Chaperone und die Hitzeschock-Antwort .....	33

1.3.2	Die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade.....	35
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>39</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>40</b>
<b>2.1</b>	<b>Biologisches Material.....</b>	<b>40</b>
2.1.1	Zelllinien.....	40
2.1.2	Vektoren und Plasmide.....	40
2.1.3	Bakterienstämme .....	41
2.1.4	Antikörper.....	41
2.1.5	Enzyme und Proteine.....	42
2.1.6	Standardgrößenmarker für Proteine und Nukleinsäuren .....	42
2.1.7	Synthetische Oligonukleotide.....	42
2.1.7.1	PCR-Primer.....	42
2.1.7.2	RT-PCR-Primer .....	44
2.1.7.3	siRNA .....	44
2.1.7.4	EMSA-Sonden.....	44
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>44</b>
<b>2.3</b>	<b>Lösungen und Puffer .....</b>	<b>47</b>
<b>2.4</b>	<b>Medien .....</b>	<b>49</b>
<b>2.5</b>	<b>Kits .....</b>	<b>50</b>
<b>2.6</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>50</b>
<b>2.7</b>	<b>Sonstige Materialien .....</b>	<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>54</b>
3.1.1	Bedingungen für die PCR.....	55
3.1.2	Sequenzierungen.....	55
3.1.3	Klonierung von Parkin-Mutanten.....	55
3.1.3.1	Parkin mit HA-Tag am N-Terminus: HA-hP-fl.....	56
3.1.3.2	Parkin mit verkürztem N-Terminus: hP- $\Delta$ 1-79.....	56
3.1.3.3	Parkin mit deletiertem C-Terminus: hP-N .....	56
3.1.3.4	Parkin mit Punktmutationen.....	56

3.1.3.5	Parkin mit pathogenen C-terminalen Deletionsmutationen .....	57
<b>3.2</b>	<b>Bakterienkultur.....</b>	<b>58</b>
3.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	58
3.2.2	Transformation kompetenter Bakterien .....	59
<b>3.3</b>	<b>DNA-Präparation .....</b>	<b>59</b>
<b>3.4</b>	<b>RNA-Präparation .....</b>	<b>59</b>
<b>3.5</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>59</b>
3.5.1	Kultivierung von Zellen.....	59
3.5.2	Passagierung .....	60
3.5.3	Ausplattieren.....	60
3.5.4	Transfektion.....	61
3.5.5	Zellernte.....	61
3.5.6	Herstellen eines nukleären Extrakts.....	61
<b>3.6</b>	<b>Präparierung und Kultivierung von primären kortikalen Rattenneuronen.....</b>	<b>61</b>
<b>3.7</b>	<b>Protein- und Nukleinsäureanalytik.....</b>	<b>62</b>
3.7.1	Nachweis der Löslichkeit .....	62
3.7.2	Proteinkonzentration nach Bradford.....	62
3.7.3	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
3.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	63
3.7.5	Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot).....	63
3.7.6	Immundetektion von Proteinen.....	63
3.7.7	Immunpräzipitation (IP) .....	64
3.7.8	Co-Immunpräzipitation (Co-IP) .....	64
3.7.9	Radioaktive Markierung von Proteinen mit [ <sup>35</sup> S].....	64
3.7.10	Autoradiodiagramme und Phosphoimaging .....	65
3.7.11	Behandlung mit proteasomalem Inhibitor .....	65
3.7.12	TCA-Fällung.....	66
3.7.13	<i>In vitro</i> Translation .....	66
3.7.14	Indirekte Immunfluoreszenz.....	66
3.7.15	Nachweis von Apoptose .....	67
3.7.15.1	Aktive Caspase-3 .....	67
3.7.15.2	Hoechst 33342 .....	67
3.8.18	Zellfraktionierung.....	68

3.8.18.1	Renografin-Gradient .....	68
3.8.18.2	Sucrose-Gradient.....	68
3.8.19	Luciferase-Reporter-Assay .....	69
3.8.20	Transienter <i>Knock-down</i> mittels RNA-Interferenz (siRNA).....	69
3.8.20.1	Luciferase-Reporter-Assay in <i>Knock-down</i> -Zellen.....	69
3.8.20.2	Nachweis von Zelltod in <i>Knock-down</i> -Zellen mit Trypan blau.....	70
3.8.21	Nachweis der Ubiquitylierung.....	70
3.8.21.1	Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ oder TRAF2 .....	70
3.8.21.2	Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ mit Ubiquitin-Mutanten .....	70
3.8.22	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) .....	71
3.8.23	<i>Real-Time</i> quantitative PCR (RT-PCR).....	71
<b>3.9</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>72</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1</b>	<b>Teil 1: Mechanismen der Inaktivierung von Parkin .....</b>	<b>74</b>
4.1.1	Inaktivierung von Parkin durch Missfaltung und Aggregation: Charakterisierung pathogener C-terminaler Deletionsmutanten .....	74
4.1.1.1	Löslichkeitsprofil der Parkin-Mutanten W453Stop, E409Stop und Q311Stop .....	75
4.1.1.2	Sedimentationsverhalten der Mutanten W453Stop und E409Stop....	76
4.1.1.3	Zelluläre Lokalisierung von W453Stop, E409Stop und Q311Stop ...	77
4.1.1.4	Einfluss der Mutationen W453Stop, E409Stop und Q311Stop auf die Assoziation von Parkin mit Zellmembranen .....	78
4.1.2	Inaktivierung von Parkin durch Destabilisierung und proteasomalen Abbau: Charakterisierung pathogener N-terminaler Punktmutanten .....	80
4.1.2.1	Löslichkeitsprofil und zelluläre Lokalisierung der Parkin-Mutanten R33Q, R42P, K48A und V56E.....	81
4.1.2.2	Biogenese einer N-terminal verkürzten Parkin-Spezies <i>in vivo</i> .....	82
4.1.2.3	Untersuchungen zur Stabilität der Parkin-Mutanten R33Q und R42P .....	86
4.1.2.4	Einfluss der pathogenen Mutationen auf die E3-Ligase-Aktivität von Parkin.....	88
4.1.3	Zusammenfassung Teil 1 .....	89
<b>4.2</b>	<b>Teil 2: Physiologische Funktion von Parkin.....</b>	<b>90</b>
4.2.1	Neuroprotektives Potential von Parkin.....	90
4.2.2	Stress-induzierte Transkription und Translation von Parkin .....	93

4.2.3	Aktivierung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription durch Parkin .....	94
4.2.4	Kausaler Zusammenhang zwischen Neuroprotektion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	100
4.2.4.1	Pathogene Parkin-Mutanten sind in der Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription beeinträchtigt.....	100
4.2.4.2	Untersuchungen des neuroprotektiven Potentials von Parkin in Gegenwart von Repressoren der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion .....	102
4.2.5	Parkin-medierte Ubiquitylierung von Komponenten der NF- $\kappa$ B- Signaltransduktionskaskade.....	107
4.2.5.1	Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ und TRAF2 durch Parkin.....	109
4.2.5.2	Parkin vermittelt die regulierende Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ über Lysin-63 .....	111
4.2.6	Interaktion von Parkin mit IKK $\gamma$ und TRAF2 .....	112
4.2.7	Der <i>Knock-down</i> von Parkin beeinflusst den Stress-induzierten Zelltod und die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion.....	115
4.2.7.1	<i>Knock-down</i> von endogenem Parkin in Zellkultur.....	115
4.2.7.2	Analyse von PARK2 Patienten-Fibroblasten.....	117
4.2.8	Zusammenfassung Teil 2 .....	119
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>120</b>
<b>5.1</b>	<b>Pathogene Mutationen inaktivieren Parkin durch unterschiedliche Mechanismen.....</b>	<b>120</b>
5.1.1	Inaktivierung von Parkin durch Missfaltung und Aggregation .....	121
5.1.2	Inaktivierung von Parkin durch Destabilisierung und vermehrte proteasomale Degradierung .....	124
<b>5.2</b>	<b>Eine N-terminal verkürzte Parkin-Spezies, der die UBL fehlt, existiert <i>in vivo</i>.....</b>	<b>125</b>
<b>5.3</b>	<b>Parkin schützt neuronale Zellen vor Stress-induziertem Zelltod .....</b>	<b>128</b>
5.3.1	Parkin ist ein stress-induzierbares Protein mit neuroprotektiver Aktivität .....	128
5.3.2	Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion ist essentiell für die neuroprotektive Aktivität von Parkin .....	129
5.3.3	Parkin mediiert die regulierende Ubiquitylierung von zwei Komponenten der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion: IKK $\gamma$ und TRAF2.....	130
5.3.4	Die Rolle von Parkin in dopaminergen Neuronen - Implikationen für die Parkinson-Erkrankung.....	132
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>136</b>

<b>7. GLOSSAR .....</b>	<b>138</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>141</b>
<b>9. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>160</b>
<b>10. LEBENSLAUF .....</b>	<b>161</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die Parkinson-Erkrankung**

#### **1.1.1. Einführung**

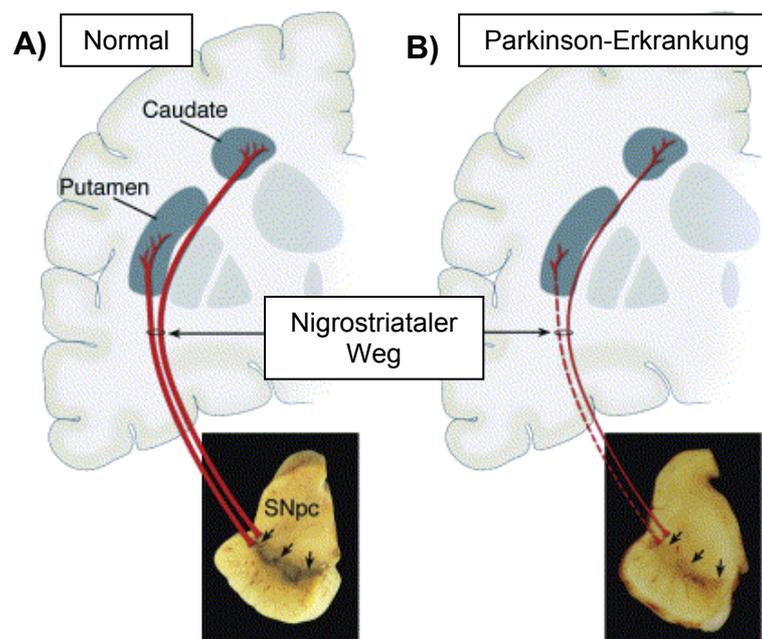
Die Parkinson-Erkrankung ist die häufigste motorische und die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Erkrankung. Sie wurde nach dem englischen Arzt James Parkinson benannt, der 1817 in seiner Monographie „*Essay on the Shaking Palsy*“ (Abhandlung über die Schüttellähmung) erstmals die Paralysis agitans oder Schüttellähmung als klinisch definiertes Krankheitsbild beschrieb. Ruhetremor, Rigor, Brady- bzw. Akinese sind die Kardinalsymptome der Parkinson-Erkrankung. Pathophysiologisch ist die Krankheit durch den progressiven und weitgehend selektiven Verlust dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) und den daraus resultierenden Dopaminmangel im Striatum gekennzeichnet. Die Ursachen der sporadischen oder idiopathischen Parkinson-Erkrankung sind weitgehend unbekannt. In den letzten zehn Jahren wurden mehrere monogene familiäre Formen der Parkinson-Erkrankung identifiziert. Die funktionelle Charakterisierung der dabei mutierten Genprodukte verspricht neue Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung.

#### **1.1.2. Neuropathologische und neurophysiologische Charakteristika**

Die neuropathologischen Charakteristika der Parkinson-Erkrankung sind der weitgehend selektive Verlust dopaminerger Neuronen in der SNpc sowie das Auftreten von intraneuronalen zytosolischen Einschlüssen, den sog. Lewy-Körpern (*Lewy Bodies*), in den betroffenen Hirnregionen (Baba, M. *et al.* 1998; Forno, L. S. 1996; Riess, O. *et al.* 2000; Spillantini, M. G. *et al.* 1998; Spillantini, M. G. *et al.* 1997). Degenerationen finden sich auch in noradrenergen (Locus coeruleus), serotonergen (Raphe-Kerne) und cholinergen (Nucleus basalis Meynert, dorsaler

Vagus Kern) Systemen des Gehirns sowie in den peripheren sympathischen Ganglien (Dubois, B. *et al.* 1990; Forno, L. S. 1996; Hornykiewicz, O. und S. J. Kish 1987).

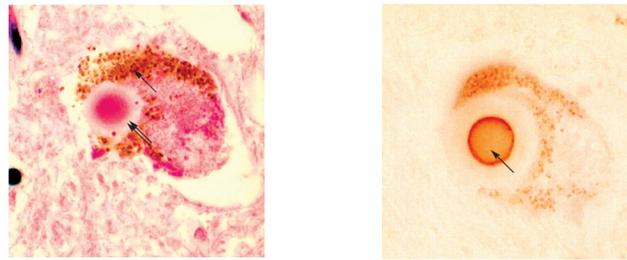
Die SNpc ist in zentraler Weise in diverse Schaltkreise des extrapyramidal-motorischen Systems eingegliedert. Aus ihr projizieren dopaminerge Neuronen über das mediale Vorderhirnbündel in das Striatum und vermitteln Signale, die auf die Kontrolle und Modulation von Bewegungsimpulsen und -abläufen Einfluss nehmen. Das Absterben der dopaminergen Neuronen, die normalerweise das dunkle Pigment Neuromelanin enthalten, führt zur charakteristischen Depigmentierung der SNpc und zu einer reduzierten Innervation des Striatums, insbesondere des Putamens (Marsden, C. D. 1983) (Abb. 1). Zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten Symptome sind bereits etwa 60% der dopaminergen Neuronen der SNpc degeneriert sowie nahezu 80% des striatalen Dopamingehalts verloren (Hornykiewicz, O. 1982).



**Abbildung 1. Schematische Darstellung der nigrostriatalen Projektion.** A) Kontrollhirn mit normaler nigrostriataler Projektion (durchgehende rote Linie). B) Gehirn eines Parkinson-Patienten mit degenerierter nigrostriataler Projektion (gestrichelte rote Linie). Abbildung modifiziert nach (Dauer, W. und S. Przedborski 2003).

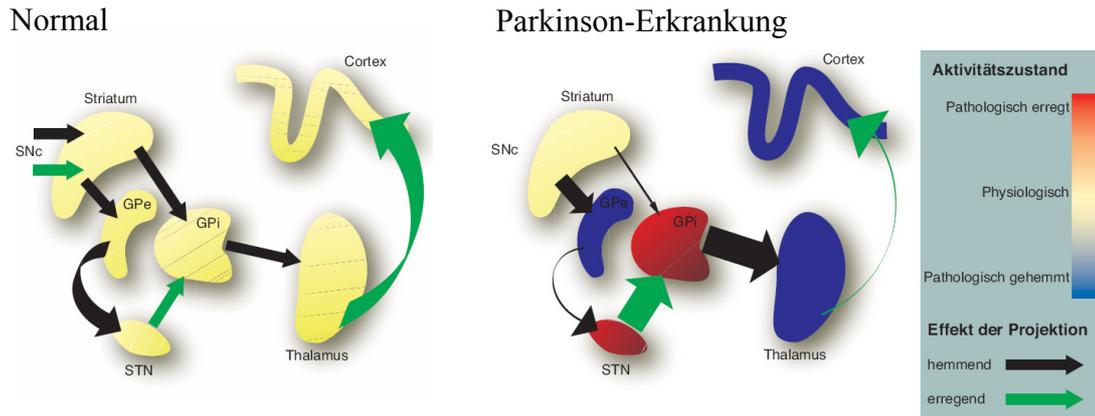
Die charakteristischen Lewy-Körper sind sphärische, eosinophile Proteinaggregate, die aus zahlreichen Proteinen wie z.B.  $\alpha$ -Synuclein, Ubiquitin, Neurofilamenten und Hitzeschockproteinen bestehen. Die Lewy-Körper sind über 15  $\mu\text{m}$  in ihrem Durchmesser und besitzen einen dichten Kern, welcher von einem

blassen Halo umgeben ist (Pappolla, M. A. 1986) (Abb. 2). Die Rolle der Lewy-Körper bei der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung ist weitgehend unklar.



**Abbildung 2. Histologische Darstellung eines Lewy-Körpers.** Lewy-Körper in einem Neuron der SNpc eines Parkinson-Patienten. Links: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Pfeil: Pigment Melanin, Doppelpfeil: Lewy-Körper, roter Kern von einem blassen Halo umgeben. Rechts: Anti-Ubiquitin-Antikörper, Pfeil: Lewy-Körper, immunopositiver Kern von einem blassen Halo umgeben. Abbildung aus (Bogdanovic, N. 2001).

Um zu verstehen, welche therapeutischen Möglichkeiten für die Behandlung der Parkinson-Erkrankung zur Verfügung stehen, ist es hilfreich, die neuropathologischen Veränderungen in der Basalganglienschleife deutlich zu machen (Abb. 3). Der Verlust der dopaminergen nigrostriatalen Projektionen bei der Parkinson-Erkrankung führt zu einer Dysinhibition der direkten Projektion vom Striatum auf den Globus pallidus internus (GPi) mit der Folge einer Zunahme der neuronalen Aktivität im GPi. Gleichzeitig nimmt die Inhibition von striatalen Neuronen auf den Globus pallidus externus (GPe) zu, so dass die Aktivität der Neurone im Nucleus subthalamicus (STN) durch den GPe nicht mehr suffizient gehemmt wird. Folge der daraus resultierenden Aktivitätssteigerung im STN ist eine Zunahme der Übererregung im GPi, welcher die wichtigste Ausflusstruktur innerhalb der Basalganglienschleife darstellt. Aus der Übererregung des GPi resultiert letztlich eine Hemmung der thalamocorticalen Projektionen, welche Ursache zumindest für einen Teil der klinischen Symptome der Parkinson-Erkrankung ist.



**Abbildung 3. Aktivitätszustand der Basalganglien, Thalamus und Cortex.** Links: Normalzustand. Rechts: Parkinson-Erkrankung, gekennzeichnet durch den Verlust der dopaminergen nigrostriatalen Projektion. SNc: Substantia nigra compacta, GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, STN: Nucleus subthalamicus. Abbildung aus (Herzog, J. und J. Volkmann 2006).

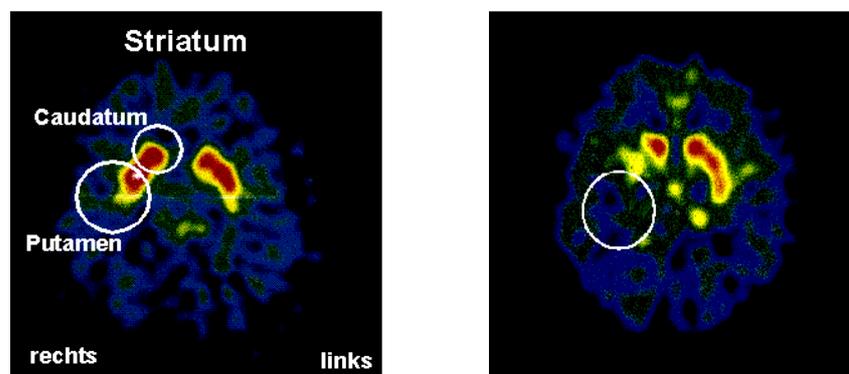
### 1.1.3. Klinische Charakteristika und Therapieansätze

Die Parkinson-Erkrankung tritt im Durchschnitt mit einem Alter von 55 Jahren auf, die Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter. Rund 1-2% der über 60-Jährigen sind betroffen (Tanner, C. M. und Y. Ben-Shlomo 1999), bei den über 85-Jährigen sind es bereits 4-5% (Giasson, B. I. und V. M. Lee 2001). In ca. 75% der Parkinson-Fälle besteht keine familiäre Häufung; sie werden deshalb als sporadisch oder idiopathisch bezeichnet. In ca. 10 % der Fälle handelt es sich um familiäre Formen der Erkrankung mit autosomal dominantem oder rezessivem Erbgang. Die restlichen Fälle verteilen sich auf symptomatische (sekundäre) Parkinson-Syndrome die durch Entzündungen, Durchblutungsstörungen, Medikamente, Toxine, Tumore oder Traumata hervorgerufen werden können (Dauer, W. und S. Przedborski 2003).

Charakteristische Symptome der Parkinson-Erkrankung sind Ruhetremor, Rigor, Brady- oder Akinesie, ferner kleinschrittiges Gangbild, Haltungsstörung (Beugung im Bereich der Hals- und Brustwirbelsäule), Beeinträchtigung der Halte- und Stellreflexe, Hypomimie und Mikrographie (Hughes, A. J. *et al.* 1991; Lang, A. E. und A. M. Lozano 1998a; Lang, A. E. und A. M. Lozano 1998b). Hinzu treten vegetative Störungen wie Seborrhö („Salbengesicht“, erhöhte Talgproduktion), Hyperhidrosis (vermehrte Schweißsekretion), Obstipation (Verstopfung) und Miktionsstörungen (Funktionsstörungen der Blase) sowie psychische Störungen wie

depressive Verstimmung, Schlafstörungen und Verlangsamung der Denkabläufe. Gewöhnlich ist der Beginn der Erkrankung einseitig, im weiteren Verlauf wird auch die Gegenseite mit einbezogen.

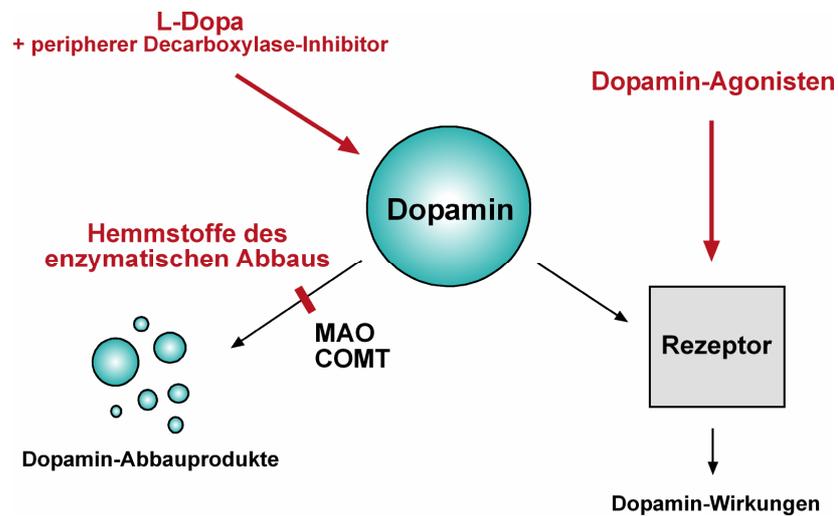
Die Diagnose der Parkinson-Erkrankung erfolgt in der Regel durch eine klinisch-neurologische Untersuchung. Bildgebende Verfahren, wie z.B. die Positron-Emissions-Tomographie (PET), können zur differentialdiagnostischen Abklärung insbesondere bei jüngeren Patienten eingesetzt werden. Dabei werden präsynaptische dopaminerge Terminale durch die Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoro-L-Dopa visualisiert (Abb. 4). Eine endgültige Diagnose kann allerdings erst *post mortem* gestellt werden.



**Abbildung 4.** PET-Abbildung nach Applikation von [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoro-L-Dopa. Links: Kontrollhirn nach Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Dopa im Striatum (Gelb-/Rotfärbung). Rechts: Gehirn eines Parkinson-Patienten mit stark verminderter Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Dopa v.a. im rechten Putamen. Abbildung aus ([www.parkinson.de](http://www.parkinson.de)).

Therapeutisch versucht man den Mangel an Dopamin (DA) und das daraus resultierende Ungleichgewicht der Neurotransmitter medikamentös zu beeinflussen. Basis der Therapie ist nach wie vor die Gabe von L-Dopa, der Vorstufe des DA, das die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. L-Dopa wird über einen aktiven Transporter ins Zentralnervensystem aufgenommen und in dopaminergen Neuronen durch das Enzym Dopa-Decarboxylase in DA umgewandelt. Die Kombination von L-Dopa mit peripher wirksamen Decarboxylasehemmern ermöglicht eine nebenwirkungsärmere Behandlung und zudem eine Dosisreduktion vom L-Dopa. Darüber hinaus kommen Dopaminagonisten, die direkt postsynaptische Dopaminrezeptoren stimulieren, zum Einsatz. Monoaminoxidase (MAO)- oder Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-Inhibitoren erhöhen die DA-Konzentration durch Hemmung des Abbaus von DA und dessen Vorläufermolekülen (Abb. 5).

MAO- und COMT-Inhibitoren können auch in Kombination mit L-Dopa eingesetzt werden. Anticholinergika werden wegen ihres ungünstigen Nebenwirkungsprofils nicht als Medikamente der 1. Wahl eingesetzt. Die Wahl der geeigneten Wirkstoffgruppe(n) orientiert sich vornehmlich am Alter des Patienten (Fahn, S. 1998).



**Abbildung 5. Schematische Darstellung pharmakologischer Therapieansätze.** MAO: Monoaminoxidase, COMT: Catechol-O-Methyltransferase. Abbildung wurde freundlicherweise von K. F. Winklhofer zur Verfügung gestellt.

Eine operative Therapie wie die Tiefenhirnstimulation ist insbesondere bei medikamentös nicht (mehr) behandelbaren Symptomen indiziert. Durch stereotaktische Implantation einer Mikroelektrode in eine bestimmte Region der Basalganglien lassen sich die Kernsymptome der Parkinson-Erkrankung (v.a. Tremor) positiv beeinflussen (Volkman, J. 2004). Bis heute existiert jedoch keine kurative Therapie; die derzeitige medikamentöse und operative Therapie ist rein symptomatisch.

#### 1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die Ursache der sporadischen Parkinson-Erkrankung ist weitgehend unbekannt. *Post mortem*-Untersuchungen an Mittelhirngewebe von Parkinson-Patienten lassen allerdings vermuten, dass mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress sowie Proteinaggregation und eine Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems dem

Absterben der dopaminergen Neuronen zugrunde liegen (Dauer, W. und S. Przedborski 2003).

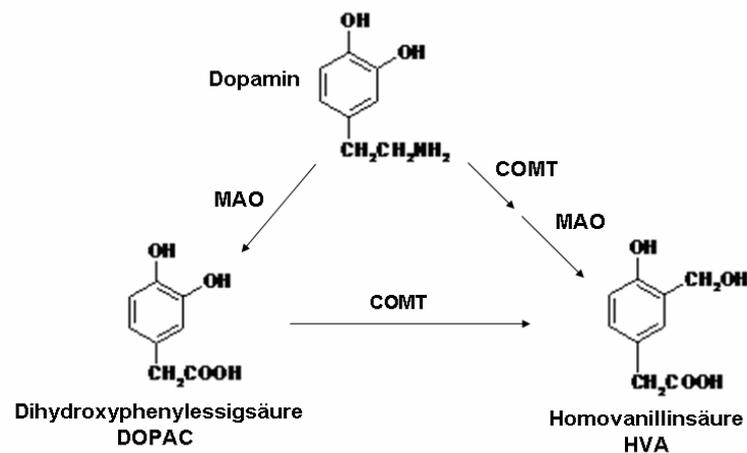
#### **1.1.4.1 Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion**

Im Organismus werden nahezu 100% des molekularen Sauerstoffs in der Atmungskette der Mitochondrien in Energie umgesetzt. Hierbei entstehen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) als Nebenprodukt. ROS sind toxische Formen des Sauerstoffs, zu welchen u.a. das Superoxid-Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ( $HO^{\cdot}$ ) und stabile Oxidantien wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gehören. ROS können funktionelle Moleküle wie Lipide, Proteine oder DNA attackieren und dabei inaktivieren. Der gesunde Körper verfügt über ausreichend anti-oxidative Systeme wie u.a. Glutathion (GSH) und Superoxid-Dismutasen (SOD), um diese aggressiven Verbindungen abzufangen und eine oxidative Modifizierung von Biomolekülen zu verhindern.

Zahlreiche Studien lieferten Evidenz für erhöhten oxidativen Stress bei der Parkinson-Erkrankung. So zeigt die SNpc von Parkinson-Patienten typischerweise eine stark reduzierte Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Eine reduzierte Komplex I-Aktivität führt zu einem Energiedefizit der Zelle und zu erhöhtem oxidativem Stress, was schließlich zum Tod der Zelle führen kann. Zudem zeigen *post mortem*-Analysen eine vermehrte oxidative Modifizierung von Lipiden und Proteinen bei Parkinson-Patienten (Pearce, R. K. *et al.* 1997; Shapira, L. *et al.* 1998; Sherer, T. B. *et al.* 2002; Sian, J. *et al.* 1994). Tiermodelle der sporadischen Parkinson-Erkrankung unterstützen die These, dass eine Dysfunktion der Mitochondrien dem Zelltod vorausgeht. So induziert der mitochondriale Komplex I-Inhibitor 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) in Mäusen und Primaten einen spezifischen Verlust der dopaminergen Neuronen und ruft in Tieren ein Krankheitsbild hervor, welches der menschlichen Parkinson-Erkrankung ähnlich ist. (Bloem, B. R. *et al.* 1990; Dauer, W. und S. Przedborski 2003; Forno, L. S. *et al.* 1986; Greenamyre, J. T. *et al.* 2001; Sherer, T. B. *et al.* 2003; Vila, M. und S. Przedborski 2003).

Eine Ursache für erhöhten oxidativen Stress in dopaminergen Neuronen ist der Metabolismus von Dopamin. Der nicht-enzymatische Dopamin-Metabolismus

(Autooxidation) führt zur Generierung von toxischen Chinonen und Semi-Chinonen, welche durch ihre Reaktion mit Cystein-Resten Proteine schädigen. Bei der enzymatischen Metabolisierung von Dopamin durch die Monoaminoxidase (MAO) entsteht neben den desaminierten Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) reaktives Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) (Abb. 6).



**Abbildung 6. Enzymatischer Abbau von Dopamin.** MAO: Monoaminoxidase, COMT: Catechol-O-Methyltransferase. Abbildung aus (www.chemsoc.org).

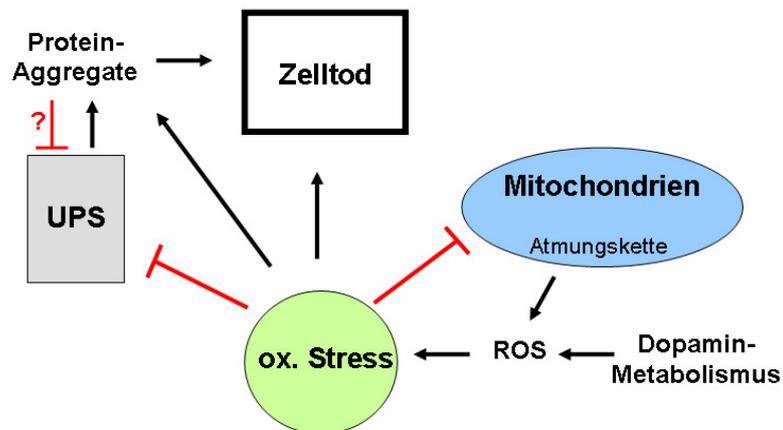
#### 1.1.4.2 Proteinaggregation und proteasomale Fehlfunktion

Das Auftreten von Proteinaggregaten ist charakteristisch für alle neurodegenerativen Erkrankungen. Neuere Studien weisen darauf hin, dass nicht die Endprodukte des Aggregationsprozesses toxisch sind, sondern vielmehr oligomere Intermediate. Proteinaggregate treten auch bei der Parkinson-Erkrankung auf und zwar in Form von zytosolischen Lewy-Körpern. Die Bedeutung der Lewy-Körper ist weitgehend unklar, es mehren sich allerdings Hinweise, dass Lewy-Körper kein toxisches Potential haben und möglicherweise eher protektiv sein könnten (Ciechanover, A. und P. Brundin 2003).

Der Abbau von intrazellulären Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein komplexer und streng regulierter Prozess, der essentiell für die Zelle ist. Es wird spekuliert, dass eine Beeinträchtigung des UPS bei der Parkinson-Erkrankung eine pathogenetische Rolle spielen könnte. Ratten, die mit Hemmstoffen des Proteasoms behandelt wurden, entwickelten einen progredienten Verlust dopaminerger Neuronen,  $\alpha$ -Synuclein-positive Aggregate und Parkinson-ähnliche

motorische Symptome (McNaught, K. S. und C. W. Olanow 2006). Bisherige Studien lieferten erste Hinweise für zwei mögliche Mechanismen. Bence *et al.* zeigten, dass Proteinaggregate direkt das Proteasom hemmen können (Bence, N. F. *et al.* 2001). Auch die Sequestrierung von Komponenten des UPS in Aggregate könnte die Beeinträchtigung des Proteasoms erklären. Die Mengen spezifischer Untereinheiten des Proteasoms in der SNpc von Parkinson-Patienten war in einer Untersuchung von McNaught *et al.* reduziert (McNaught, K. S. *et al.* 2002; McNaught, K. S. und C. W. Olanow 2003).

Daneben könnte oxidativer Stress eine bedeutende Rolle bei der Schädigung des Proteasoms spielen. Oxidativer Stress führt durch Schädigung der Mitochondrien zur Reduktion der ATP-Produktion. Als Folge kommt es zur Beeinträchtigung des ATP-abhängigen Proteasoms. Es entsteht ein sog. „Teufelskreis“: Eine Beeinträchtigung des Abbaus oxidierter Proteine führt zur Steigerung der ROS und die vermehrte Bildung von ROS wiederum führt zu weiterer Schädigung der Mitochondrien (Abb. 7).



**Abbildung 7. Pathogeneseschema der Parkinson-Erkrankung.** Mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress sowie Proteinaggregation und eine Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems spielen eine zentrale Rolle bei der Parkinson-Erkrankung. Die einzelnen Faktoren verstärken sich innerhalb des Kreislaufs gegenseitig und führen zum Zelltod. UPS: Ubiquitin-Proteasom-System, ox: oxidativ, ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

### 1.1.5 Familiäre Formen der Parkinson-Erkrankung und ihre genetischen Grundlagen

Die Identifizierung mehrerer monogen-erblicher Formen der Parkinson-Erkrankung revolutionierte die Parkinson-Forschung der letzten Jahre. Die krankheitsassoziierten

Gene können die Etablierung von Tier- und Zellkulturmodellen erleichtern und somit neue Einblicke in die pathophysiologischen Mechanismen der Parkinson-Erkrankung ermöglichen (Vila, M. und S. Przedborski 2004). Seit 1997 konnten mindestens zehn Genloci für familiäre Parkinson-Erkrankungen identifiziert werden, die entsprechenden Gene sind für sieben dieser Loci bekannt (Tab. 1).

<b>Locus</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Genprodukt</b>	<b>Erbgang</b>
PARK1	4q21-q23	$\alpha$ -Synuclein	AD
PARK2	6q25.2-27	Parkin	AR
PARK3	2p13	?	AD
PARK4	4p15 (Duplikation/Triplikation)	$\alpha$ -Synuclein	AD
PARK5	4p14	UCH-L1	AD?
PARK6	1p35-36	PINK1	AR
PARK7	1p36	DJ-1	AR
PARK8	12p11.2-q13.1	LRRK2	AD
PARK9	1p36	ATP13A2	AR
PARK10	1p32	?	Suszeptibilitätsgen?
PARK11	2q34	?	AD?
PARK12	Xq21-q25	?	Suszeptibilitätsgen?
PARK13	2p12	HtrA2/Omi	Suszeptibilitätsgen?

**Tabelle 1. Genloci für monogen-erbliche Formen der PD.** AD: autosomal-dominant, AR: autosomal-rezessiv, UCH-L1: *Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1*, PINK1: *PTEN-induced kinase 1*, LRRK2: *Leucin-rich repeat kinase 2*, ATP13A2: *P-Typ ATPase*; HtrA2: *High temperature requirement protein A2*.

### 1.1.5.1 Autosomal-dominant erbliche Formen der Parkinson-Erkrankung

#### 1.1.5.1.1 $\alpha$ -Synuclein (PARK1, PARK4)

Im Jahr 1997 wurde das erste Gen für eine dominante Form des Parkinson-Syndroms auf Chromosom 4q21-23 (PARK1) kartiert (Polymeropoulos, M. H. *et al.* 1996). Zwei Missense-Mutationen (A53T und A30P) wurden im Gen für  $\alpha$ -Synuclein identifiziert (Kruger, R. *et al.* 1998; Polymeropoulos, M. H. *et al.* 1997). Interessanterweise konnte kurz darauf gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synuclein Hauptbestandteil der Lewy-Körper ist, die ein neuropathologisches Charakteristikum der Parkinson-Erkrankung sind (Spillantini, M. G. *et al.* 1997). Erst vor kurzem wurde eine dritte  $\alpha$ -Synuclein-Punktmutation (E46K) in einer spanischen Familie identifiziert (Zarranz, J. J. *et al.* 2004). Darüber hinaus wurde als Ursache für eine autosomal dominante Form der Parkinson-Erkrankung eine genomische Duplikation bzw. Triplikation beschrieben (PARK4) (Farrer, M. *et al.* 2004; Singleton, A. B. *et al.* 2003).

Das  $\alpha$ -Synuclein gehört zur Familie der Synucleine, die  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Synuclein umfassen. Synucleine wurden bislang nur in Wirbeltieren beschrieben.  $\alpha$ -Synuclein ist ein lösliches, nativ ungefaltetes Protein von 14 kDa, das aus drei Regionen aufgebaut ist. Die N-terminale Domäne nimmt nach Bindung an Membranen eine  $\alpha$ -helikale Konformation an (Davidson, W. S. *et al.* 1998; Eliezer, D. *et al.* 2001). Die zentrale hydrophobe NAC-Domäne (*non-amyloid component of plaques*) ist für das fibrillogene Potential von  $\alpha$ -Synuclein verantwortlich (Giasson, B. I. *et al.* 2001, Bodles, 2004 #1206). Die azide C-terminale Domäne enthält mehrere Phosphorylierungsstellen und könnte dem Protein eine Chaperon-ähnliche Aktivität verleihen (Okochi, M. *et al.* 2000; Park, S. M. *et al.* 2002).

$\alpha$ -Synuclein ist ein präsynaptisch angereichertes Protein, dessen Funktion noch wenig charakterisiert ist (Maroteaux, L. *et al.* 1988). Seine Assoziierung mit synaptischen Membranen lässt allerdings eine Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung oder synaptischen Plastizität vermuten (Abeliovich, A. *et al.* 2000).

### 1.1.5.1.2 UCH-L1 (PARK5)

Die Punktmutation I93M im Gen für die Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1) auf Chromosom 4 wurde in einer deutschen Familie identifiziert (Leroy, E. *et al.* 1998). Über die pathogenetische Rolle dieser Mutation herrscht bislang Unklarheit, da bisher nur zwei Brüder erkrankt sind, während deren Eltern asymptomatisch sind.

Die UCH-L1 ist eine wichtige Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems; sie hydrolysiert kleine C-terminale Addukte von Ubiquitin, um monomeres Ubiquitin zu generieren. Es wurde beobachtet, dass die Mutation I93M die Enzymaktivität der Ubiquitin-Hydrolase *in vitro* reduziert (~50%). Außerdem wurde beschrieben, dass UCH-L1 *in vitro* auch eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt und die Polyubiquitylierung von mono- oder di-ubiquityliertem  $\alpha$ -Synuclein verstärkt (Liu, Y. *et al.* 2002). Beide Beobachtungen lassen einen Zusammenhang zwischen proteasomaler Fehlfunktion und der Parkinson-Erkrankung vermuten. Neben der I93M-Mutation konnte ein weit verbreiteter Polymorphismus (S18Y) identifiziert werden, der mit einem verminderten Parkinson-Risiko assoziiert ist (Healy, D. G. *et al.* 2004).

### 1.1.5.1.3 LRRK2 (PARK8)

Die *Leucin-rich Repeat Kinase 2* (LRRK2) wurde erst vor kurzem als Parkinson-assoziiertes Gen identifiziert (Funayama, M. *et al.* 2002; Paisan-Ruiz, C. *et al.* 2005; Zimprich, A. *et al.* 2004). Als Synonym für das Genprodukt ist auch der Name Dardarin gebräuchlich. Die LRRK2 kodiert für ein 286 kDa Protein, das aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut ist (Taylor, J. P. *et al.* 2006):

- N-terminale Ankyrin-Domäne
- Leucin-reiche Wiederholung von AS (*leucin rich repeat*)
- Roc-Domäne (*Ras in complex proteins*)
- COR-Domäne (*C-terminal of Roc*)
- MAPKKK-Domäne (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*)
- WD40-Domäne

LRRK2-Mutationen sind die häufigste Ursache für die dominante familiäre Form der Parkinson-Erkrankung mit später Manifestation, die durch ein großes Spektrum an unterschiedlich ausgeprägten pathologischen Merkmalen gekennzeichnet ist (+/- Lewy-Körper, Tau-Pathologie) (Wszolek, Z. K. *et al.* 2004). Mittlerweile wurden 19 Missense-Mutationen identifiziert, wobei Mutationen in der Kinasedomäne (z.B. G2019S) die Kinaseaktivität möglicherweise erhöhen (Gloeckner, C. J. *et al.* 2006; West, A. B. *et al.* 2005). Die physiologische Funktion der LRRK2 und die Rolle bei der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung sind noch unbekannt.

### **1.1.5.2 Autosomal-rezessiv erbliche Formen der Parkinson-Erkrankung**

#### **1.1.5.2.1 Parkin (PARK2)**

Mutationen im Parkin-Gen wurden 1998 als Ursache für eine rezessive Form der Parkinson-Erkrankung mit juvenilem Krankheitsbeginn in japanischen Familien identifiziert (Kitada, T. *et al.* 1998). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde weltweit ein breites Spektrum von Parkin-Mutationen beschrieben. Parkin nimmt unter den bereits bekannten Parkinson-assoziierten Genen eine besondere Stellung ein, da Mutationen in diesem Gen für die Mehrheit der familiären Fälle mit früher Manifestation verantwortlich sind.

Eine ausführliche Charakterisierung von Parkin folgt in Kapitel 1.2.

#### **1.1.5.2.2 PINK1 (PARK6)**

Initial wurden zwei homozygote Mutationen (G309D und W437Stop) im PINK1-Gen (*PTEN-induced kinase 1*) in drei blutsverwandten Familien identifiziert (Valente, E. M. *et al.* 2004). Mittlerweile wurden mehr als 20 pathogene Mutationen beschrieben, welche die zweithäufigste Ursache für die rezessiv-vererbte Form der Parkinson-Erkrankung darstellen. Die PINK1-assoziierten Fälle weisen ein breites

phänotypisches Spektrum auf, das von einer frühen Manifestation mit atypischen Symptomen bis hin zu einer späten Manifestation mit dem typischen klinischen Bild der Parkinson-Erkrankung reicht. Bislang gibt es noch keine Daten zur Neuropathologie.

PINK1 kodiert für ein Protein von 581 Aminosäuren. Neben einer Kinase-Domäne besitzt PINK1 ein mitochondriales Lokalisierungssignal (Nakajima, T. *et al.* 2003; Unoki, M. und Y. Nakamura 2001; Valente, E. M. *et al.* 2004). PINK1 vermag Neuronen gegen zellulären Stress zu schützen. Mutationen verhindern, dass PINK1 die Stress-induzierte Apoptose hemmen kann (Hatano, Y. *et al.* 2004; Petit, A. *et al.* 2005). Mehrere Mutationen betreffen die PINK1-Kinasedomäne, weshalb angenommen wird, dass die Kinase-Aktivität für die Schutzfunktion von PINK1 notwendig ist. Tatsächlich reduziert die L347P-Mutation die PINK1-Kinase-Aktivität und führt zur Destabilisierung von PINK1 (Beilina, A. *et al.* 2005). Bis heute konnten weder PINK1-Substrate noch Interaktionspartner von PINK1 entdeckt werden.

#### **1.1.5.2.3 DJ-1 (PARK7)**

Mutationen im DJ-1 Gen wurden erstmals als Ursache einer autosomal-rezessiven Form der Parkinson-Erkrankung in jeweils einer Familie aus den Niederlanden und aus Italien identifiziert (Bonifati, V. *et al.* 2003). Die beiden beschriebenen Mutationen repräsentieren typische *loss-of-function* Mutationen. In der niederländischen Familie wurde eine homozygote Deletion von Exon 1-5 gefunden, während in der italienischen Familie eine homozygote L166P *Missense*-Mutation identifiziert wurde (Bonifati, V. *et al.* 2004). Das DJ-1 Gen ist auf Chromosom 1p36 kartiert und kodiert ein aus 189 Aminosäuren bestehendes Protein, das ubiquitär exprimiert wird (Bandopadhyay, R. *et al.* 2004).

Weiterführende Studien deuteten darauf hin, dass DJ-1 nur als Dimer funktionell ist (Honbou, K. *et al.* 2003; Tao, X. und L. Tong 2003; Wilson, M. A. *et al.* 2003). Für DJ-1 wurden verschiedene Funktionen beobachtet. So konnte DJ-1 als Modulator für transkriptionelle Prozesse identifiziert werden (Hod, Y. *et al.* 1999; Takahashi, K. *et al.* 2001). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DJ-1 ein redox-sensitives Protein mit zytoprotektivem Potential gegenüber oxidativem Stress ist.

Nach Behandlung von Zellen mit Wasserstoffperoxid verschiebt sich der isoelektrische Punkt von DJ-1 in den sauren Bereich, d.h. Cysteine und Methionine von DJ-1 werden zu Cystein- bzw. Methionin-Sulfinsäuren und –sulfonsäuren oxidiert (Martinat, C. *et al.* 2004; Mitsumoto, A. *et al.* 2001; Taira, T. *et al.* 2004; Yokota, T. *et al.* 2003). Die Strukturhomologie zum *E.coli* Chaperon Hsp31 lässt vermuten, dass DJ-1 eine Chaperon-ähnliche Funktion besitzt, was aber noch nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte (Lee, S. J. *et al.* 2003; Shendelman, S. *et al.* 2004).

## **1.2 Parkin-assoziierte autosomal-rezessive Parkinson-Erkrankung**

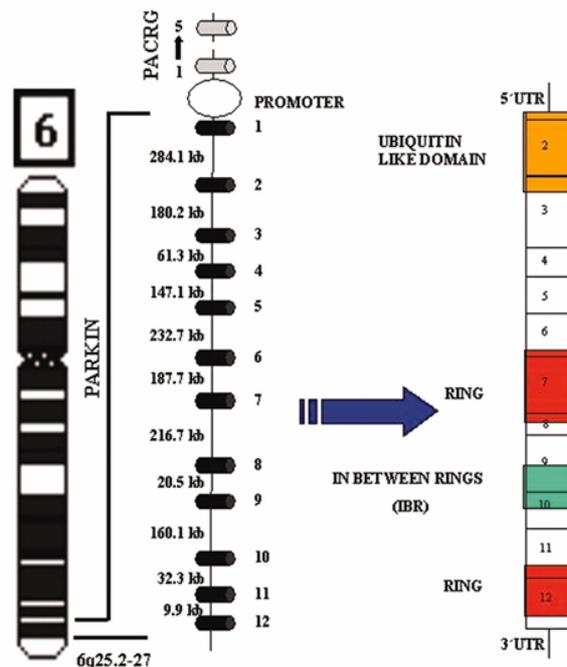
### **1.2.1 Klinische und neuropathologische Charakteristika**

Mutationen im Parkin-Gen sind verantwortlich für eine autosomal-rezessiv vererbte Form der Parkinson-Erkrankung (Kitada, T. *et al.* 1998). In der Mehrzahl der Fälle sind die Mutationen homozygot, einige Fälle zeigen zwei verschiedene monoallelische Mutationen und sehr selten treten heterozygote Mutationen auf. Das klinische Erscheinungsbild ist in der Regel nicht von der sporadischen Parkinson-Erkrankung zu unterscheiden und durch ein gutes Ansprechen auf L-Dopa gekennzeichnet.

Bislang konnten nur wenige Parkin-assoziierte Parkinson-Fälle neuropathologisch analysiert werden. Hierbei zeigten Patienten mit homozygoten Deletionen des PARK2-Gens einen weitgehend selektiven Verlust von dopaminergen Neuronen in der SNpc und im Locus coeruleus (Hayashi, S. *et al.* 2000; Ishikawa, A. und H. Takahashi 1998; Matsumine, H. *et al.* 1998; Mori, H. *et al.* 1998). Initial wurde beschrieben, dass Patienten mit Parkin-Mutationen keine Lewy-Körper-Pathologie aufweisen, kürzlich wurden jedoch Parkin-assoziierte Fälle mit Lewy-Körpern entdeckt, so dass die neuropathologischen Veränderungen - ähnlich wie bei LRRK2-Patienten - vielfältig sind oder möglicherweise vom Alter des Patienten oder von der Art der Mutation abhängen. Für eine eindeutige Schlussfolgerung bedarf es weiterer Autopsien (Farrer, M. *et al.* 2001; Shimura, H. *et al.* 1999; Shimura, H. *et al.* 2001; Takahashi, H. *et al.* 1994).

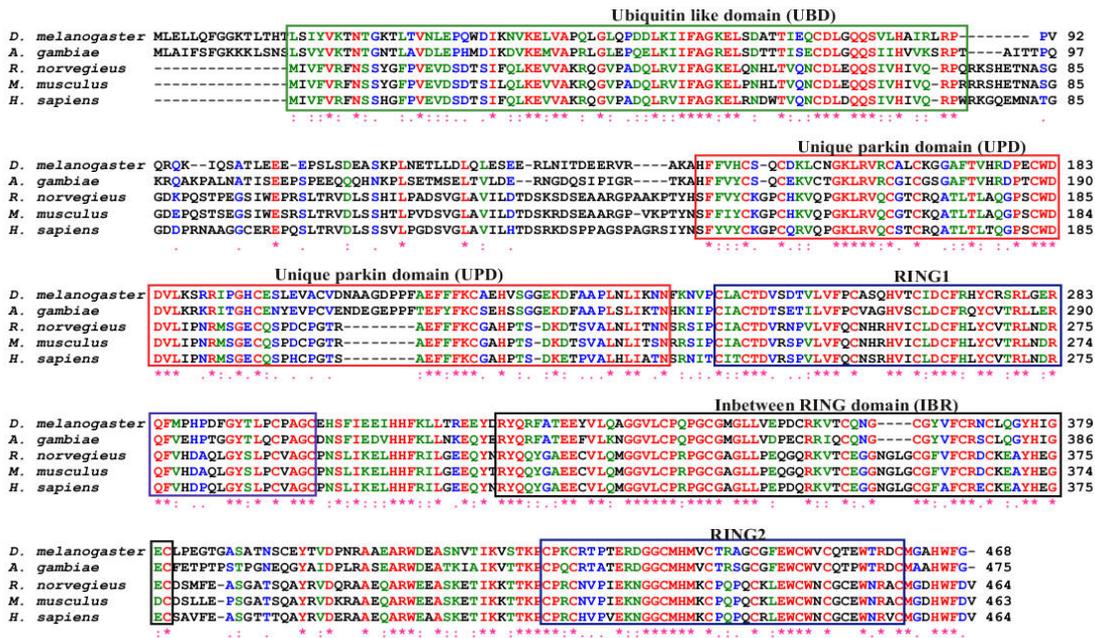
## 1.2.2 Molekulargenetische und zellbiologische Charakteristika von Parkin

Parkin ist mit einer 1,3 Mb langen genomischen DNA eines der größten Gene des humanen Genoms. Es ist auf Chromosom 6q25.2-q27 lokalisiert. Seine 12 Exons kodieren ein Protein von 465 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 52 kDa (Kitada, T. *et al.* 1998) (Abb. 8).



**Abbildung 8.** Schematische Darstellung des Parkinlocus. Parkin ist auf Chromosom 6q25.2-27 lokalisiert. Seine 12 Exons kodieren für ein Protein mit folgenden Domänen: *Ubiquitin-like*-Domäne, RING (*really interesting new gene*)-Domäne und *In-between* RING-Domäne. Abbildung aus (Mata, I. F. *et al.* 2004).

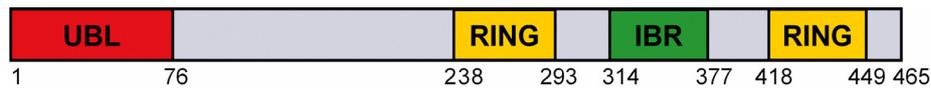
Parkin ist in den verschiedensten Spezies hoch konserviert. Es wurde nicht nur in Wirbeltieren wie Mensch, Ratte und Maus, sondern auch in wirbellosen Tieren wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz von Parkin lässt sich eine große Homologie zwischen den verschiedenen Spezies feststellen (Haywood, A. F. und B. E. Staveley 2004). Das Maus- bzw. Ratten-Parkin-Ortholog zeigt 82% bzw. 83% Homologie zu humanem Parkin. Interessanterweise sind insbesondere die funktionellen Domänen stark konserviert (Abb. 9).



**Abbildung 9. 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, A. F. und B. E. Staveley 2004).

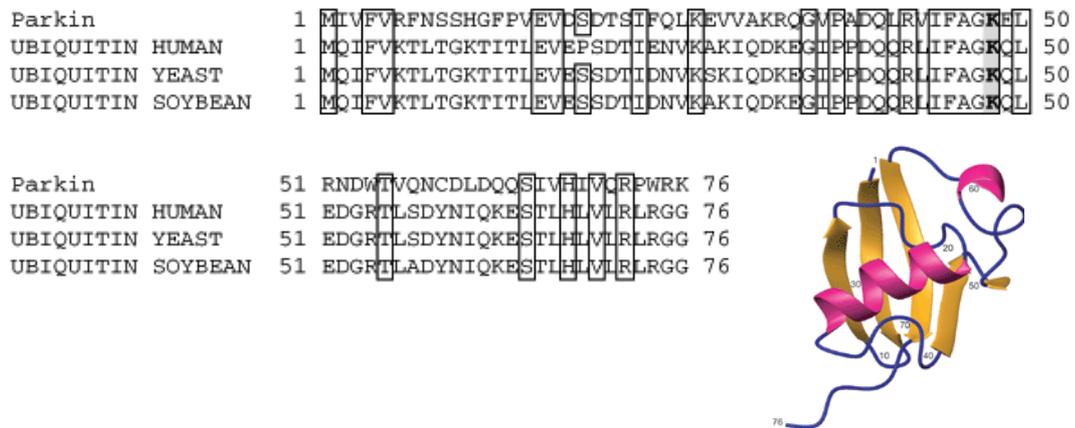
Parkin wird ubiquitär exprimiert, u.a im Gehirn, Herz und in Skelettmuskeln (Kitada, T. *et al.* 1998). Innerhalb des Gehirns wird Parkin in verschiedenen Regionen exprimiert, interessanterweise aber nur schwach in der SNpc (Kitada, T. *et al.* 1998). In der Zelle ist Parkin überwiegend im Zytoplasma zu finden (Shimura, H. *et al.* 1999). Daneben wurde eine Assoziation mit dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Kubo, S. I. *et al.* 2001), Actin- und Tubulin-Filamenten (Huynh, D. P. *et al.* 2003; Ren, Y. *et al.* 2003) sowie synaptischen Vesikeln beschrieben (Fallon, L. *et al.* 2002; Kubo, S. I. *et al.* 2001).

Analysen der Primärstruktur ermöglichen die Zuordnung verschiedener Domänen innerhalb des Proteins. Neben der N-terminalen *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne verfügt Parkin über eine C-terminale *Really Interesting New Gene* (RING)-Box, bestehend aus zwei RING-Motiven und der dazwischen liegenden *In-between* RING (IBR)-Domäne (Abb. 10).



**Abbildung 10. Schematische Darstellung des Parkin-Proteins.** Parkin besteht aus 465 Aminosäuren und weist eine Molekülmasse von 52 kDa auf. Innerhalb des Proteins lassen sich verschiedene Regionen identifizieren: N-terminale UBL-Domäne und C-terminale RING-Box, bestehend aus zwei RING-Motiven und der dazwischen liegenden IBR-Domäne. UBL: *Ubiquitin-like*, RING: *really interesting new gene*, IBR: *in-between RING*.

Die N-terminale UBL-Domäne von Parkin umfasst die Aminosäuren 1-76 und ist zu 62 % dem humanen Ubiquitin homolog (Kitada, T. *et al.* 1998) (Abb. 11). Dem N-Terminus wird eine Funktion bei der Kontrolle der Parkin-Expression (Finney, N. *et al.* 2003), Beteiligung bei der Substraterkennung (Shimura, H. *et al.* 2000) und Interaktion mit der Rpn10-Untereinheit des 26S Proteasoms (Sakata, E. *et al.* 2003) zugeschrieben.



**Abbildung 11. Die Ubiquitin-like (UBL)-Domäne von Parkin.** Vergleich der UBL-Sequenz von Parkin mit der Sequenz von Ubiquitin aus verschiedenen Spezies (Mensch, Hefe, Sojabohne). Rechts: 3D-Struktur der UBL von Parkin (NMR). Gelb:  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, Pink:  $\alpha$ -Helix. Abbildung aus (Kitada, T. *et al.* 1998, Sakata, E. *et al.* 2003).

In der Nähe des C-Terminus finden sich zwei RING-Motive, die durch eine Cystein-reiche IBR-Domäne voneinander getrennt sind (Kitada, T. *et al.* 1998; Morett, E. und P. Bork 1999). Die C-terminalen Domänen werden zusammengefasst auch als RING-Box bezeichnet und spielen vermutlich eine Rolle bei der Interaktion mit Substraten und E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen. Proteine mit dieser RING-Konfiguration zeigen typischerweise eine Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität, d.h.

sie vermitteln das Anhängen von Ubiquitin-Einheiten an spezifische Substrate (Joazeiro, C. A. und A. M. Weissman 2000).

### **1.2.3 Physiologische Funktion von Parkin**

#### **1.2.3.1 Die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Parkin**

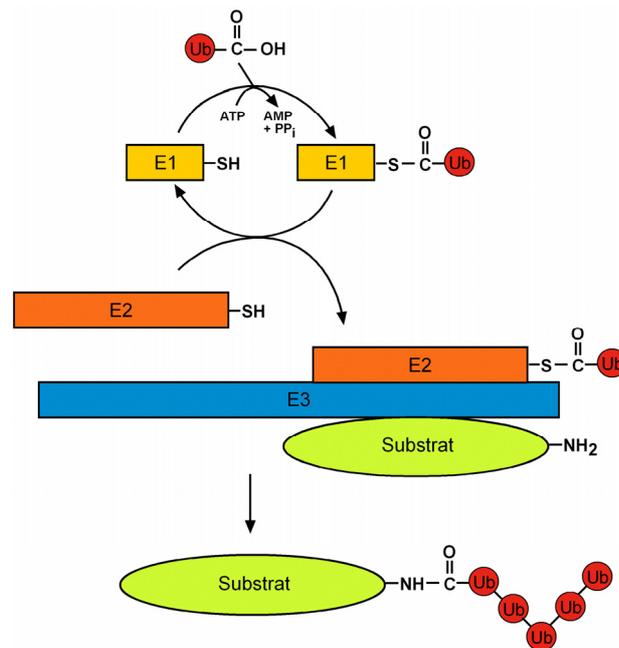
Das Vorhandensein der C-terminalen RING-Box legte nahe, dass es sich bei Parkin um eine E3-Ubiquitin-Ligase handeln könnte. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Parkin tatsächlich eine E3-Ligase-Aktivität aufweist (Imai, Y. *et al.* 2000; Shimura, H. *et al.* 2000; Zhang, Y. *et al.* 2000). Mittlerweile wurden einige putative Parkin-Substrate beschrieben, die insbesondere durch *Yeast Two-Hybrid*-Studien identifiziert wurden. Über die physiologische Relevanz dieser Proteine als authentische Parkin-Substrate herrscht allerdings Unklarheit (siehe Punkt 1.2.3.1.3).

##### **1.2.3.1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System**

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist essentiell für die nicht-lysosomale Degradierung von kurzlebigen, delokalisierten, missgefalteten, mutierten oder beschädigten Proteinen und spielt somit eine wichtige Rolle für das Überleben der eukaryontischen Zelle (Sherman, M. Y. und A. L. Goldberg 2001). Der Abbau von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein regulierter Mehrstufenprozess, der von spezifischen Enzymen katalysiert wird (Ciechanover, A. und P. Brundin 2003) (Abb. 12).

Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym E1 katalysiert die Ausbildung einer ATP-abhängigen Thioester-Bindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und einem reaktiven Cystein des E1. Das aktivierte Ubiquitin wird nun auf einen Cystein-Rest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 transferiert. Es kommt zur Ausbildung einer Thioester-Bindung zwischen Ubiquitin und E2. Die Ubiquitinierung des Zielproteins erfolgt durch den E2/E3-Komplex, der die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins innerhalb des Substrates katalysiert. Die Spezifität des

Ubiquitylierungsprozesses wird durch funktionelle Interaktion des E2/E3-Komplexes mit dem Substrat gewährleistet. Bei einer Polyubiquitylierung werden weitere Ubiquitin-Einheiten an das erste Ubiquitin angefügt. Erfolgt die Ubiquitinverknüpfung über Lysin-48, so werden die markierten Proteine über das 26S-Proteasom abgebaut (DeMartino, G. N. und C. A. Slaughter 1999; Hershko, A. und A. Ciechanover 1998; Hershko, A. *et al.* 2000; Hochstrasser, M. 1996; Pickart, C. M. 2000).



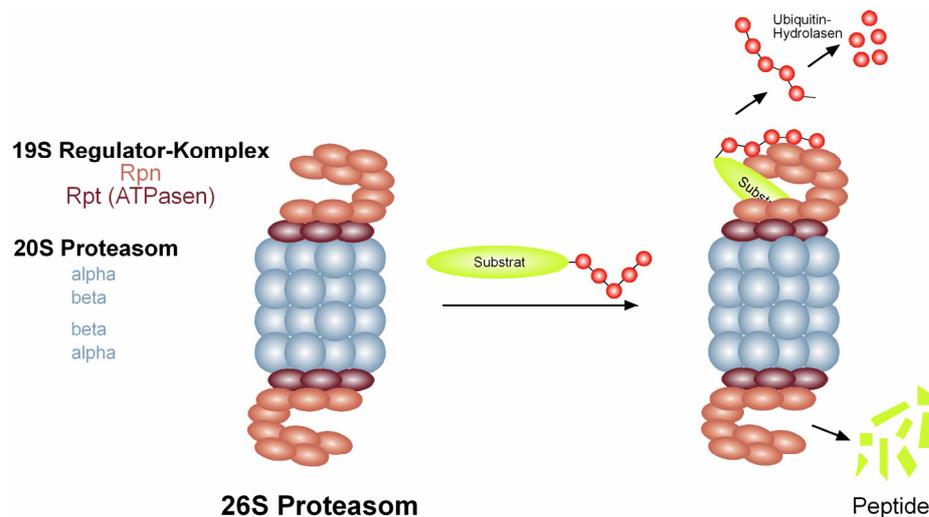
**Abbildung 12. Regulierter Mehrstufenprozess des E1/E2/E3-Systems.** Ubiquitin-aktivierendes Enzym E1, Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2, E3-Ubiquitin-Ligase. Abbildung modifiziert nach (Winklhofer, K. F. 2006).

Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa zwei Mega-Dalton. Nach seinem Sedimentationskoeffizient wird das Holoenzym auch 26S Proteasom genannt. Das Proteasom besteht aus zwei Subkomplexen (Abb. 13).

Der proteolytisch aktive Teil ist das sogenannte 20S Proteasom. Es besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und hat die Form eines hohlen Zylinders, der aus vier übereinanderliegenden Ringen ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ) besteht (Baumeister, W. *et al.* 1998). Die Ringe bestehen aus je sieben Proteinen, die proteolytische Aktivität ist an der Innenseite der  $\beta$ -Ringe lokalisiert (Arendt, C. S. und M. Hochstrasser 1997). Das Proteasom ist eine Threonin-Protease, bei der die Hydroxylgruppe des N-terminalen

Threonins der aktiven Untereinheiten die Carbonylgruppe der Peptidbindung nukleophil angreift (Ditzel, L. *et al.* 1998; Fenteany, G. *et al.* 1995). Die Produkte der Degradierung durch das Proteasom sind Peptide (etwa 4-9 Aminosäuren), die durch zytosolische Peptidasen in ihre Aminosäuren zerlegt werden und für die Synthese von Proteinen wiederverwendet werden.

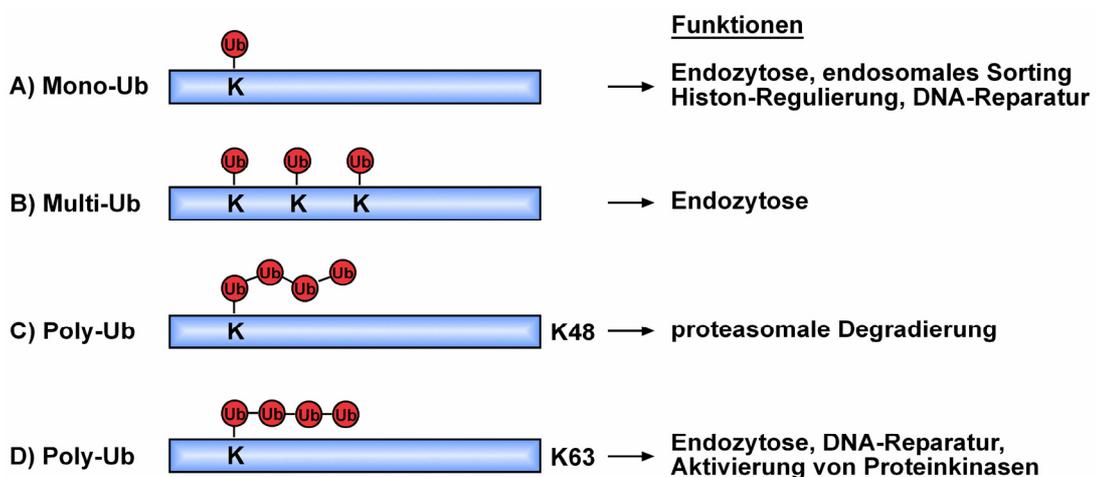
Die zweite Untereinheit des Proteasoms ist der sogenannte 19S Regulator-Komplex oder 19S-Kappe (*cap*), die an beide äußeren Enden des 20S-Komplexes bindet (Glickman, M. H. *et al.* 1998). Er besteht aus über 20 verschiedenen Proteinen (Rpn und Rpt), wovon die sechs Rpt-Untereinheiten AAA-ATPasen (*ATPases associated with various activities*) sind, die Chaperon-Aktivität besitzen (Braun, B. C. *et al.* 1999; Rubin, D. M. *et al.* 1998). Der 19S Regulator-Komplex vermittelt die Erkennung und Entfaltung von ubiquitylierten Substraten sowie ihre Deubiquitylierung vor dem Abbau (durch Rpn11). Die Ubiquitin-Ketten werden durch Ubiquitin-Carboxy-terminale Hydrolasen in monomere Ubiquitin-Moleküle zerlegt.



**Abbildung 13. Das 26S-Proteasom.** Das 26S-Proteasom besteht aus zwei Subkomplexen. Dargestellt ist der 19S-Regulator-Komplex, bestehend aus Rpn- und Rpt-Untereinheiten, oberhalb und unterhalb des 20S-Proteasoms. Das proteolytisch aktive 20S Proteasom besteht aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen. Der 19S-Regulator-Komplex vermittelt die Erkennung und Entfaltung von ubiquitylierten Substraten und ihre Deubiquitylierung vor dem Abbau. Die Ubiquitin-Ketten werden durch Ubiquitin-Carboxy-terminale Hydrolasen in monomere Ubiquitin-Moleküle zerlegt. Die Produkte der Degradierung durch das Proteasom sind Peptide. Abbildung modifiziert nach (Wolf, D. H. und W. Hilt 2004).

### 1.2.3.1.2 Unterschiedliche Arten der Ubiquitin-Verknüpfung

Je nach Art der Ubiquitin-Verknüpfung und Anzahl der Ubiquitin-Einheiten wird das modifizierte Substrat entweder vom Proteasom abgebaut oder es ändert seine Funktion oder zelluläre Lokalisierung. Eine konventionelle Polyubiquitylierung über Lysin-48 markiert Proteine für den proteasomalen Abbau. Dagegen ist die nicht-konventionelle Ubiquitylierung über Lysin-63 für verschiedene zellulären Funktionen verantwortlich, einschließlich Endozytose, DNA-Reparatur und zelluläre Signaltransduktion (Abb. 14).



**Abbildung 14. Arten der Ubiquitin-Verknüpfung.** Proteine können an einem oder mehreren Lysin (K)-Resten monoubiquityliert (A, B) oder polyubiquityliert (C, D) werden. (C) Polyubiquitinketten über K48 markieren Proteine für die proteasomale Degradierung. (D) Polyubiquitinketten über K63 haben eine regulierende Funktion. Abbildung modifiziert nach (Hicke, L. 2001).

### 1.2.3.1.3 Potentielle Parkin-Substrate

#### 1.2.3.1.3.1 Parkin-medierte proteasomale Degradierung

Entsprechend seiner Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase konnte gezeigt werden, dass Parkin mit einigen E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen interagiert (vgl. Tab. 2). Neben den humanen E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen UbcH7 und UbcH8 wurden die mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER)-assoziierten E2-Enzyme Ubc6 und Ubc7 als Bindepartner identifiziert. Es wurde postuliert, dass der

E2/E3-Enzymkomplex die Ubiquitylierung über Lysin-48 katalysiert und die Zielproteine für die proteasomale Degradierung markiert (Imai, Y. *et al.* 2001; Imai, Y. *et al.* 2000; Shimura, H. *et al.* 2000; Shimura, H. *et al.* 2001; Zhang, Y. *et al.* 2000).

<b>E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym</b>	<b>Modellsystem</b>	
UbcH7, UbcH8	Zellkultur (Überexpression)	(Shimura, H. <i>et al.</i> 2000; Zhang, Y. <i>et al.</i> 2000; Imai, Y. <i>et al.</i> 2000)
UbcH7	Humanes Gehirn	(Shimura, H. <i>et al.</i> 2001)
Ubc6, Ubc7	Zellkultur (Überexpression)	(Imai, Y. <i>et al.</i> 2001)
Ubc13/Uev1a	<i>in vitro</i> (rekombinante Proteine)	(Doss-Pepe, E. W. <i>et al.</i> 2005; Matsuda, N. <i>et al.</i> 2006)

**Tabelle 2. Parkin-assoziierte E2-Ubiquitin-konjugierende Enzyme.** Ubc: *Ubiquitin conjugating enzyme E2*, Uev1a: *Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1a*.

Bislang wurden zahlreiche putative Parkin-Substrate durch *Yeast-Two-Hybrid*- oder Co-Immunopräzipitations-Studien identifiziert (vgl. Tab. 3). Die Substrat-Proteine erfüllen die unterschiedlichsten Funktionen in der Zelle. So finden sich Proteine mit vesikulärer und synaptischer Funktion wie CDCrel-1 (Zhang, Y. *et al.* 2000), CDCrel-2a (*cell division control-related protein*) (Choi, P. *et al.* 2003), Synaptotagmin XI (Huynh, D. P. *et al.* 2003), O-glykosyliertes  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ Sp22) (Shimura, H. *et al.* 2001), Synphilin-1 (Chung, K. K. *et al.* 2001) und der Dopamin-Transporter (DAT) (Jiang, H. *et al.* 2004), Kontrollproteine des Zellzyklus wie Cyclin E (Staropoli, J. F. *et al.* 2003), Proteine der Protein-Biosynthese wie p38/JTV-1 (Aminoacyl-tRNA Synthetase-Untereinheit) (Corti, O. *et al.* 2003; Ko, H. S. *et al.* 2005), Transkriptionsfaktoren wie FBP1 (*far upstream sequence element-binding protein 1*) (Ko, H. S. *et al.* 2006), Proteine des Zytoskeletts wie  $\alpha/\beta$ -Tubulin (Ren, Y. *et al.* 2003), Proteine der nukleären Export-Pore wie RanBP2 (Um, J. W. *et al.* 2006) und Proteine der zellulären Signaltransduktion wie Pael-R (*Parkin-*

*associated endothelin-like receptor*) (Imai, Y. *et al.* 2001). Die Relevanz und Authentizität der Mehrzahl dieser Substrate konnte bisher nicht konsistent gezeigt werden. Neuropathologische Untersuchungen der Gehirne von Patienten mit Parkinson-assoziiierter Parkinson-Erkrankung konnten zwar die geringfügige Akkumulation von nicht-ubiquityliertem  $\alpha$ Sp22, Pael-R, Cyclin E, CDCrel-1 und CDCrel-2a, FBP1 und p38/JTV-1 in einigen Gehirnen zeigen, aber nur für FBP1 und p38/JTV-1 wurde eine Akkumulation im Gehirn von Parkin-*Knock-out*-Mäusen nachgewiesen (Choi, P. *et al.* 2003; Imai, Y. *et al.* 2001 Staropoli, 2003 #582; Ko, H. S. *et al.* 2006; Ko, H. S. *et al.* 2005).

<b>Putative Parkin-Substrate</b>	<b>mögliche Bedeutung</b>
CDCrel-1 CDCrel-2a Synaptotagmin XI $\alpha$ Sp22 Synphilin-1 DAT	<i>vesikuläre &amp; synaptische Funktionen</i> (Zhang, Y. <i>et al.</i> 2000) (Choi, P. <i>et al.</i> 2003) (Huynh, D. P. <i>et al.</i> 2003) (Shimura, H. <i>et al.</i> 2001) (Chung, K. K. <i>et al.</i> 2001) (Jiang, H. <i>et al.</i> 2004)
Cyclin E	<i>Zellzyklus</i> (Staropoli, J. F. <i>et al.</i> 2003)
p38/JTV-1  FBP1	<i>Protein-Biosynthese</i> (Corti, O. <i>et al.</i> 2003; Ko, H. S. <i>et al.</i> 2005) (Ko, H. S. <i>et al.</i> 2006)
$\alpha/\beta$ -Tubulin	<i>Zytoskelett</i> (Ren, Y. <i>et al.</i> 2003)
Pael-R	<i>Zelluläre Signaltransduktion</i> (Imai, Y. <i>et al.</i> 2001)
RanBP2	<i>Kernexport</i> (Um, J. W. <i>et al.</i> 2006)

**Tabelle 3. Putative Parkin-Substrate und deren Bedeutung.** CDCrel: *cell division control-related protein*,  $\alpha$ Sp22: O-glykosyliertes  $\alpha$ -Synuclein, DAT: Dopamin-Transporter, FBP1: *far upstream sequence element-binding protein 1*, Pael-R: *Parkin-associated endothelin-like receptor*, RanBP2: *Ran-binding protein 2*.

### 1.2.3.1.3.2 Parkin-medierte regulierende Ubiquitylierung

Erst vor kurzem konnte auch das heterodimere E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym UbcH13/Uev1a als Interaktionspartner von Parkin *in vitro* nachgewiesen werden (Doss-Pepe, E. W. *et al.* 2005; Matsuda, N. *et al.* 2006). In früheren *in vitro*-Studien wurde bereits beschrieben, dass UbcH13/Uev1a die Anheftung von Ubiquitin über Lysin-63 katalysiert (McKenna, S. *et al.* 2001). Neuere *in vivo*-Studien zeigten, dass Parkin neben der konventionellen Ubiquitylierung über Lysin-48 auch die Ubiquitylierung über Lysin-63 katalysiert (Synphilin-1) (Lim, K. L. *et al.* 2005). Zudem konnte eine Parkin-medierte mehrfache Monoubiquitylierung beobachtet werden (p38/JTV-1 und Hsp70) (Hampe, C. *et al.* 2006; Moore, D. J. *et al.* 2005a) (vgl. Tab. 4). Welche physiologische Rolle die Parkin-medierte regulierenden Ubiquitylierung spielt, ist weitgehend unklar.

<b>Putative Substrate für eine Parkin-medierte regulierende Ubiquitylierung</b>	<b>mögliche Bedeutung</b>
Eps15	<i>EGFR-Endozytose</i> (Fallon, L. <i>et al.</i> 2006)
Synphilin-1 (Poly-Ub)	<i>Synaptische Funktion</i> (Lim, K. L. <i>et al.</i> 2005)
p38/JTV-1 (Multi-Ub)	<i>Biosynthese</i> (Hampe, C. <i>et al.</i> 2006)
Hsp70 (Multi-Ub)	<i>Chaperon</i> (Moore, D. J. <i>et al.</i> 2005a)

**Tabelle 4. Putative Substrate für eine Parkin-medierte regulierende Ubiquitylierung und deren Bedeutung.** Eps15: *Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15*, Hsp70: *Heat shock protein 70*, Poly-Ub: Polyubiquitylierung, Multi-Ub: Monoubiquitylierung an mehreren Lysin-Resten.

Es lässt sich festhalten, dass Parkin sowohl eine Polyubiquitylierung über Lysin-48 und Lysin-63 medieren kann, als auch eine mehrfache Monoubiquitylierung. Somit könnte Parkin als multifunktionale E3-Ubiquitin-Ligase fungieren. Basierend auf diesen Befunden wurde spekuliert, dass eine Akkumulation

von toxischen Substraten der Parkin-assoziierten Parkinson-Erkrankung zugrunde liegen könnte. Weiterhin könnte auch der Verlust einer regulierenden Ubiquitylierung zur Pathogenese der Erkrankung beitragen.

#### **1.2.3.1.5 Weitere Parkin-interagierende Proteine**

Neben den bereits genannten E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen und putativen Parkin-Substraten (siehe Punkt 1.2.3.1.3), wurden zahlreiche weitere Proteine als Interaktionspartner von Parkin identifiziert (vgl. Tab. 5).

So ist es vorstellbar, dass Parkin als Bestandteil eines größeren Ligase-Komplexes - dem Skp1-Cullin-F-Box (SCF)-Proteinkomplex - funktionell ist (Staropoli, J. F. *et al.* 2003). Imai *et al.* beschrieben zudem eine Komplexbildung mit den Chaperonen CHIP (*Carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein*) und Hsp70 (Imai, Y. *et al.* 2002). Die Interaktion mit dem Gerüstprotein CASK (*Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent serine protein kinase*) lässt Parkin als Bestandteil eines postsynaptischen Komplexes vermuten, welcher mit postsynaptischen Membranen und *Lipid Rafts* im Gehirn co-lokalisiert (Fallon, L. *et al.* 2002).

<b>putative Parkin-interagierende Proteine</b>	<b>mögliche Bedeutung</b>	
Actin-Filamente	Zytoskelett	(Huynh, D. P. <i>et al.</i> 2000)
CASK/Lin2	postsynaptisches PDZ-Gerüstprotein	(Fallon, L. <i>et al.</i> 2002)
Cullin-1	Multiprotein-Ligase	(Staropoli, J. F. <i>et al.</i> 2003)
$\gamma$ -Tubulin	Zentrosom	(Zhao, J. <i>et al.</i> 2003)
Rpn-10 $\alpha$ 4	proteasomale Untereinheit	(Dachsel, J. C. <i>et al.</i> 2005; Sakata, E. <i>et al.</i> 2003)
14-3-3 $\eta$	Signalregulation	(Sato, S. <i>et al.</i> 2006)
BAG5	Co-Chaperon	(Kalia, S. K. <i>et al.</i> 2004)
CHIP	Chaperon	(Imai, Y. <i>et al.</i> 2002)
LRRK2	?	(Smith, W. W. <i>et al.</i> 2005)
DJ-1-Mutanten	?	(Moore, D. J. <i>et al.</i> 2005b)
PINK1	mitochondriale Kinase	(Moore, D. J. 2006)

**Tabelle 5. Potentielle Parkin-interagierende Proteine und deren Bedeutung.** CASK: Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent serine protein kinase, PDZ: Postsynaptic density-95, disc large, zona occludens, BAG5: Bcl-2-associated athanogene 5, CHIP: Carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein, LRRK2: Leucin-rich repeat kinase 2, PINK1: PTEN-induced kinase 1.

### 1.2.3.2 Parkin besitzt neuroprotektives Potential

In verschiedenen Zellkultursystemen und Tiermodellen wurde ein breites neuroprotektives Potential von Parkin beobachtet (vgl. Tab. 6). So wurde gezeigt, dass Parkin kultivierte Zellen schützt vor Zelltod induziert durch Kainat (Staropoli, J. F. *et al.* 2003), proteasomale Inhibierung (Muqit, M. M. *et al.* 2004; Petrucelli, L. *et al.* 2002), Ceramid (Darios, F. *et al.* 2003), Mangan (Higashi, Y. *et al.* 2004), Dopamin (Jiang, H. *et al.* 2004) und Überexpression von Parkin-Substraten oder anderen Proteinen wie  $\alpha$ -Synuclein (Petrucelli, L. *et al.* 2002), Pael-R (Imai, Y. *et al.* 2001), p38/JTV-1, verlängertes Polyglutamin-Ataxin-3-Fragment (Tsai, Y. C. *et al.*

2003) und Ataxin-2 (Huynh, D. P. *et al.* 2007). In *Drosophila* konnte eine Überexpression von Parkin den durch  $\alpha$ -Synuclein und Pael-R induzierten Verlust dopaminerger Neuronen hemmen (Yang, Y. *et al.* 2003). Darüber hinaus verhindert eine virale Überexpression von Parkin die durch  $\alpha$ -Synuclein oder Tau verursachte dopaminerge Degeneration im Ratten-Modell und schützt die Skelettmuskeln der Maus vor mitochondrialen Toxinen (Klein, R. L. *et al.* 2006; Lo Bianco, C. *et al.* 2004; Rosen, K. M. *et al.* 2006).

<b>Parkin-vermittelte Neuroprotektion gegenüber</b>	<b>Modellsystem</b>	
proteasomaler Inhibierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primäre murine Neuronen (viraler Gentransfer)</li> <li>• Zellkultur (SH-SY5Y)</li> </ul>	(Petrucci, L. <i>et al.</i> 2002)  (Muqit, M. M. <i>et al.</i> 2004)
Ceramid-medierter Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellkultur (PC12)</li> </ul>	(Darios, F. <i>et al.</i> 2003)
Kainat-induzierter Exzitotoxizität	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primäre murine Neuronen (viraler Gentransfer)</li> </ul>	(Staropoli, J. F. <i>et al.</i> 2003)
Mangan-induzierter Toxizität	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellkultur (SH-SY5Y)</li> </ul>	(Higashi, Y. <i>et al.</i> 2004)
Dopamin-induzierter Apoptose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellkultur (SH-SY5Y)</li> </ul>	(Jiang, H. <i>et al.</i> 2004)
mitochondrialen Toxinen: MPP <sup>+</sup> , Rotenon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parkin-<i>Knock-out</i>-Mäuse</li> <li>• Zellkultur (NT-2 and SK-N-MC)</li> <li>• Primäre Muskelzellen</li> </ul>	(Casarejos, M. J. <i>et al.</i> 2006)  (Hyun, D. H. <i>et al.</i> 2005)  (Rosen, K. M. <i>et al.</i> 2006)

<b>Parkin-vermittelte Neuroprotektion gegenüber</b>	<b>Modellsystem</b>	
Toxizität, hervorgerufen durch die Überexpression von Parkin-Substraten oder anderen Proteinen:  Pael-R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellkultur (SH-SY5Y)</li> <li>• <i>Drosophila</i>-Modell</li> </ul>	(Imai, Y. <i>et al.</i> 2001) (Yang, Y. <i>et al.</i> 2003)
p38/JTV-1  $\alpha$ -Synuclein (mutiert)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellkultur (SK-N-MC, SH-SY5Y)</li> <li>• Primäre murine Neuronen (viraler Gentransfer)</li> <li>• Ratten-Modell (viraler Gentransfer)</li> <li>• <i>Drosophila</i>-Modell</li> </ul>	(Ko, H. S. <i>et al.</i> 2005) (Corti, O. <i>et al.</i> 2003)  (Petrucelli, L. <i>et al.</i> 2002)  (Lo Bianco, C. <i>et al.</i> 2004) (Yang, Y. <i>et al.</i> 2003)
Tau (mutiert)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transgene Mäuse (Parkin<sup>-/-</sup>/Tau<sup>VLW</sup>)</li> <li>• Ratten-Modell (viraler Gentransfer)</li> </ul>	(Menendez, J. <i>et al.</i> 2006) (Klein, R. L. <i>et al.</i> 2006)
verlängertes Polyglutamin-Ataxin-3-Fragment	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellkultur (N18)</li> </ul>	(Tsai, Y. C. <i>et al.</i> 2003)
Ataxin-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellkultur (PC12)</li> </ul>	(Huynh, D. P. <i>et al.</i> 2007)
$\beta$ -Amyloid	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primäre Muskelzellen</li> </ul>	(Rosen, K. M. <i>et al.</i> 2006)

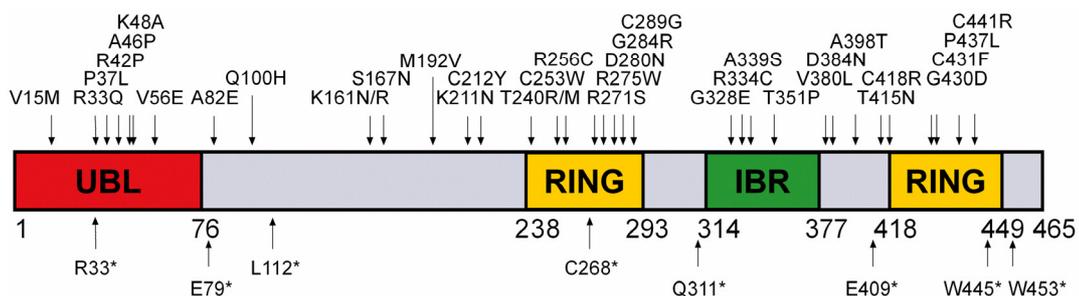
**Tabelle 6. Neuroprotektives Potential von Parkin gegenüber verschiedenen Stressarten.**  
 Tau<sup>VLW</sup>: Tau mit einer dreifachen FTDP-17-Mutation (G272V, P301L und R406W), FTDP-17: *Frontotemporal dementia with parkinsonism-17*.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Parkin eine entscheidende Rolle für die neuronale Integrität unter Stressbedingungen spielt. Hinzu kommt, dass dopaminerge Neuronen aufgrund des Dopamin-Metabolismus besonders hohem

oxidativen Stress ausgesetzt sind (siehe Punkt 1.1.4.1). Über den Mechanismus, der dieses breite neuroprotektive Potential von Parkin erklären könnte, ist bislang nichts bekannt.

### 1.2.4 Parkin-Mutationen

In einer japanischen Population wurden erstmals große homozygote Deletionen im Parkin-Gen beschrieben (Kitada, T. *et al.* 1998). Durch nachfolgende Studien konnten jedoch auch Multiplikationen, kleine Deletionen/Insertionen und eine Vielzahl von Punktmutationen in den verschiedenen ethnischen Gruppen identifiziert werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden über 100 verschiedene Mutationen in Parkinson-Patienten beschrieben (Mata, I. F. *et al.* 2004; West, A. B. und N. T. Maidment 2004). In Abb. 15 sind *Missense*- und *Nonsense*-Mutationen schematisch dargestellt.



**Abbildung 15. Punktmutationen im Parkin-Gen.** Schematische Darstellung von Parkin mit seinen funktionellen Domänen. Die Lokalisation von pathogenen *Missense*- und *Nonsense*-Mutationen im Parkin-Gen ist durch Pfeile gekennzeichnet. UBL: *Ubiquitin-like*, RING: *really interesting new gene*, IBR: *in-between RING*.

Obwohl Mutationen über die gesamte kodierende Region des Parkin-Gen verteilt auftreten, lässt sich eine Anhäufung in den funktionellen Domänen des Proteins beobachten. Die Lokalisierung von Mutationen und die Identifizierung und Charakterisierung von Aminosäuren, die für die Funktion von Parkin essentiell sind, können einen wichtigen Beitrag für die Erforschung der Rolle von Parkin bei der Pathogenese des Parkinson-Syndroms liefern. Durch Interaktionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Mutationen in der RING-IBR-RING-Region die Interaktion mit E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen und/oder die Substratbindung

beeinträchtigen (Chung, K. K. *et al.* 2001; Hershko, A. *et al.* 2000; Imai, Y. *et al.* 2000; Shimura, H. *et al.* 2001; Zhang, Y. *et al.* 2000). Über biochemische Grundlagen der Inaktivierung von Parkin durch pathogene Mutationen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit wenig bekannt.

### 1.2.5 Parkin-Knock-out-Modelle

Um die physiologische Rolle von Parkin *in vivo* aufzuklären, wurden unterschiedliche *Knock-out*-Tiermodelle generiert.

#### 1.2.5.1 Maus-Modelle

Parkin-*Knock-out*-Mäuse wurden generiert durch die gezielte Deletion von Exon 3 (Goldberg, M. S. *et al.* 2003; Itier, J. M. *et al.* 2003; Palacino, J. J. *et al.* 2004), Exon 7 (Von Coelln, R. *et al.* 2004) oder Exon 2 (Perez, F. A. und R. D. Palmiter 2005) des Parkin-Gens der Maus. Alle Deletionen führten zum Verlust des Parkin-Proteins.

Alle bislang publizierten Parkin-*Knock-out*-Mäuse haben keinen signifikanten Phänotyp, sie zeigen lediglich geringfügige Auffälligkeiten in einigen Verhaltenstests (z.B. reduziertes exploratives Verhalten). Die Tiere zeigen keine Parkinson-spezifische Neuropathologie, insbesondere keinen Zelltod in der SNpc bzw. keine nigrostriatale Degeneration. Allerdings lassen sich geringfügige Veränderungen in einigen funktionellen Test feststellen. So zeigen sich Abweichungen im DA-Metabolismus und der dopaminergen Neurotransmission ebenso wie Defizite in der mitochondrialen Respiration (vgl. Tab. 7). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sind dopaminerge Neuronen von *Knock-out*-Tieren wesentlich anfälliger gegenüber oxidativem Stress (induziert durch Rotenon) (Casarejos, M. J. *et al.* 2006).

Ein weiteres Parkin-*Knock-out*-Modell hat seine Ursache in einer Spontandeletion in der Promotorregion des *Quaking*-Gens, das auf Chromosom 17 der Maus lokalisiert ist. Homozygote Tiere sind durch Dysmyelinierung im zentralen Nervensystem gekennzeichnet, was zu ihrem *quaking*-Phänotyp führt (Sidman, R. L.

*et al.* 1964). Die Deletion einer 1,17 Mb umfassenden Region führt auch zur Deletion des kompletten Parkin-Promotors, der ersten fünf Exons des Parkin-Gens und des Parkin-co-regulierten-Gens (PACRG) (Lockhart, P. J. *et al.* 2004; Lorenzetti, D. *et al.* 2004). Phänotypisch sind die Tiere durch eine gestörte Motorik und reduziertes exploratives Verhalten gekennzeichnet. Die Tiere zeigen ebenfalls keine Parkinson-spezifischen neuropathologischen Veränderungen, lediglich geringfügige Veränderungen im DA-Metabolismus und der DA-Rezeptor-Expression wurden beobachtet (Lorenzetti, D. *et al.* 2004; Nikulina, E. M. *et al.* 1995).

Mutation	Charakteristika	
Deletion Exon 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>geringfügige Veränderungen der dopaminergen Neurotransmission</li> <li>vermindertes Orientierungsverhalten</li> <li>verringerte mitochondriale Respiration (Komplex I und IV ↓)</li> <li>gesteigerte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress</li> </ul>	(Itier, J. M. <i>et al.</i> 2003) (Goldberg, M. S. <i>et al.</i> 2003) (Palacino, J. J. <i>et al.</i> 2004)
Deletion Exon 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verlust von catecholaminergen Neuronen im Locus coeruleus</li> </ul>	(Von Coelln, R. <i>et al.</i> 2004)
Deletion Exon 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>keine</li> </ul>	(Perez, F. A. und R. D. Palmiter 2005)
Spontane Deletion ( <i>Quaking mouse</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>gesteigerter Dopamin-Metabolismus</li> <li>erhöhte Expression der Dopamin D2-Rezeptoren</li> </ul>	(Lorenzetti, D. <i>et al.</i> 2004; Nikulina, E. M. <i>et al.</i> 1995)

**Tabelle 7.** *Knock-out*-Maus-Modelle. Unterschiede bestehen in der Art der Mutation, im Phänotyp und der Neuropathologie.

### 1.2.5.2 *Drosophila*-Modell

Greene und Kollegen (Greene, J. C. *et al.* 2003) generierten ein Parkin-*Knock-out*-Modell in *Drosophila melanogaster*. Hierfür wurde das hoch konservierte *Drosophila*-Parkin-Ortholog (siehe Punkt 1.2.2) gezielt inaktiviert. Die *Knock-out*-Tiere sind lebensfähig, ihre Lebensdauer ist allerdings verkürzt. Der Verlust von

funktionellem Parkin führt zur Sterilität der männlichen Fliegen und einer apoptotischen Muskeldegeneration. Zudem zeigen sich geringfügige strukturelle Veränderungen in den dopaminergen Zellen wie Schrumpfen der Zellkörper. Die lokomotorischen Defizite der Fliegen werden durch die apoptotische Muskeldegeneration infolge mitochondrialer Schädigung verursacht. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der *Drosophila*-Parkin-Phänotyp durch generelle mitochondriale Dysfunktion hervorgerufen wird.

### **1.3 Protektive Signaltransduktionswege**

Die Parkinson-Erkrankung ist gekennzeichnet durch den neuronalen Zelltod in der SNpc. Welche Art des Zelltodes – Apoptose oder Nekrose oder möglicherweise beides – bei der Parkinson-Erkrankung auftritt, ist weitgehend unbekannt.

Dopaminerge Neuronen sind vielfältigen Stressbedingungen ausgesetzt, unter anderem oxidativem Stress (DA-Metabolismus) und Exzitotoxizität (glutamaterge Neurotransmission). Folglich sind neuroprotektive Strategien in diesem Zelltyp von besonderer Bedeutung für die Integrität der Zelle. Nachfolgend sind zwei bedeutende Stressantwortsysteme, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, detaillierter aufgeführt.

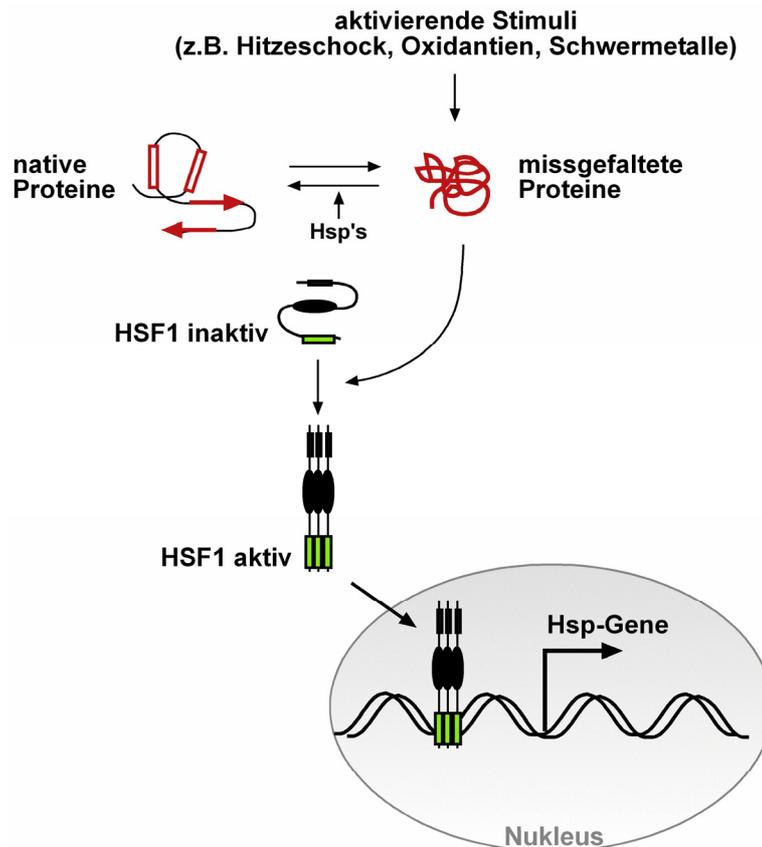
#### **1.3.1 Molekulare Chaperone und die Hitzeschock-Antwort**

Die Hitzeschock-Antwort ist eine komplexe Signaltransduktionskaskade, die in der Regel durch intrazelluläre Akkumulation von nicht-nativ gefalteten Polypeptiden ausgelöst wird und letztendlich zur verstärkten Transkription verschiedener Hitzeschock-Gene führt, die für unterschiedliche Hitzeschock-Proteine (Hsp) kodieren. Diese werden entsprechend ihres Molekulargewichtes in sechs Familien klassifiziert: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 und kleine Hitzeschock-Proteine (Morimoto, R. I. *et al.* 1994). Hitzeschock-Proteine fungieren als molekulare Chaperone und sind essentiell für das Überleben der Zelle.

Im Rahmen der Translation werden Proteine von Ribosomen in ihrer Primärstruktur als Aminosäureketten produziert. Die biologische Aktivität eines

Proteins wird durch seinen nativen Zustand festgelegt, der in der Regel einer einzigartigen dreidimensionalen Struktur entspricht. Partiiell gefaltete Intermediate, wie sie auch während der Neusynthese von Proteinen in der Zelle auftreten, besitzen eine hohe Tendenz zu unspezifischen Aggregationsreaktionen. Molekulare Chaperone verhindern die Aggregation durch Bindung an nicht gefaltete Polypeptidsegmente. Daneben übernehmen Chaperone zahlreiche weitere Aufgaben in der Zelle. So spielen sie eine Rolle bei der Kompartimentierung von Proteinen (z.B. Import in Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum) und bei der Aktivierung, Assemblierung und Maturierung von Komponenten zahlreicher Proteinkomplexe u.a. im Rahmen der Zellzyklusregulation oder Signaltransduktion (z.B. Tyrosinkinase, Steroidhormonrezeptor). Ebenso sind sie wichtig bei der Vermittlung des proteolytischen Abbaus unter Zuhilfenahme von Co-Chaperonen (CHIP, BAG1) (Ellis, R. J. 1990, Ellis, R. J. und F. U. Hartl 1999; Hartl, F. U. 1996; Hartl, F. U. und M. Hayer-Hartl 2002; Netzer, W. J. und F. U. Hartl 1998; Young, J. C. *et al.* 2004). Daneben kommt den Chaperonen eine wichtige Aufgabe beim Schutz der Zelle unter Stressbedingungen zu, die zur Entfaltung und Aggregation von Proteinen führen. Um die Proteinhomeostase aufrecht zu erhalten, reagiert die Zelle unter proteotoxischem Stress daher mit der verstärkten Synthese von molekularen Chaperonen.

Das primäre Signal, das zur Auslösung der Hitzeschock-Antwort führt, ist die intrazelluläre Akkumulation von nicht-nativ gefalteten Polypeptiden. Dies führt zur Aktivierung der Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren (HSF). In humanen Zellen existieren drei HSF-Isoformen (HSF1, HSF2 und HSF4). HSF1 wird ubiquitär exprimiert und induziert die 'klassische' Hitzeschockantwort (Nover, L. *et al.* 1996). HSF1 erreicht seine aktive Form durch Trimerisierung der monomeren inaktiven Form (Ananthan, J. *et al.* 1986; Pirkkala, L. *et al.* 2000). Nach Translokation in den Nukleus bindet HSF1 an Promoterregionen mit Hitzeschock-Element (HSE)-Sequenzen und induziert die Transkription von Hitzeschock-Proteinen (Abb. 16). Die Hitzeschock-Antwort bewirkt unter anderem die Synthese von Hsp70, Hsp90 und Hsp27 (Udelsman, R. *et al.* 1994).



**Abbildung 16. Schematische Darstellung der HSF1-mediierten Hitzeschock-Antwort.** Verschiedene Stressstimuli wie z.B. Hitzeschock, Oxidantien oder Schwermetalle, induzieren die Akkumulation von missgefalteten Proteinen. Dies führt zur Aktivierung von HSF1 durch Trimerisierung und dessen anschließender Translokation in den Nukleus. Die Bindung von HSF1 an HSE-Sequenzen induziert die Transkription von Hsp-Genen. HSF1: Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1, HSE: Hitzeschock-Element, Hsp: Hitzeschock-Protein. Abbildung modifiziert nach (Jolly, C. und R. I. Morimoto 2000).

### 1.3.2 Die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade

Der Nukleäre Faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) ist einer der wichtigsten spezifischen Transkriptionsfaktoren des Organismus. Als solcher kann er an DNA binden und die Transkription NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene beeinflussen. NF- $\kappa$ B ist nicht nur von zentraler Bedeutung für die Regulation von Immunantwort und Zellproliferation, sondern auch für die Kontrolle des programmierten Zelltodes (Apoptose) (Baeuerle, P. A. und T. Henkel 1994; Barnes, P. J. und M. Karin 1997; Ghosh, S. und M. Karin 2002). In Säugetieren existieren die fünf NF- $\kappa$ B-Gene RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2, die für sieben Proteine (p105, p100, p50, p52, RelA, RelB und c-Rel) kodieren. Die Gene für NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) und NF- $\kappa$ B2 (p52/p100) kodieren

jeweils für zwei Proteine, die sich in ihrer Länge unterscheiden und entsprechend ihrem Molekulargewicht benannt sind. Allen Proteinen gemeinsam ist eine Rel-Homologie-Domäne (RHD) mit etwa 300 Aminosäuren, die für die DNA-Bindung, Dimerisierung und Interaktion mit I $\kappa$ B-Proteinen verantwortlich ist. Daneben besitzen RelA, RelB und c-Rel zusätzlich mindestens eine Transaktivierungs-Domäne (TAD) am C-Terminus, welche mit Komponenten des Transkriptionsapparates interagieren kann. Es handelt sich bei NF- $\kappa$ B nicht um ein einzelnes Protein. Vielmehr können jeweils zwei Untereinheiten in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und auf diese Weise Homo- oder Heterodimere bilden. Der klassische NF- $\kappa$ B-Komplex ist das p50/RelA-Heterodimer (Chen, L. F. und W. C. Greene 2004; Hayden, M. S. und S. Ghosh 2004; Karin, M. und Y. Ben-Neriah 2000).

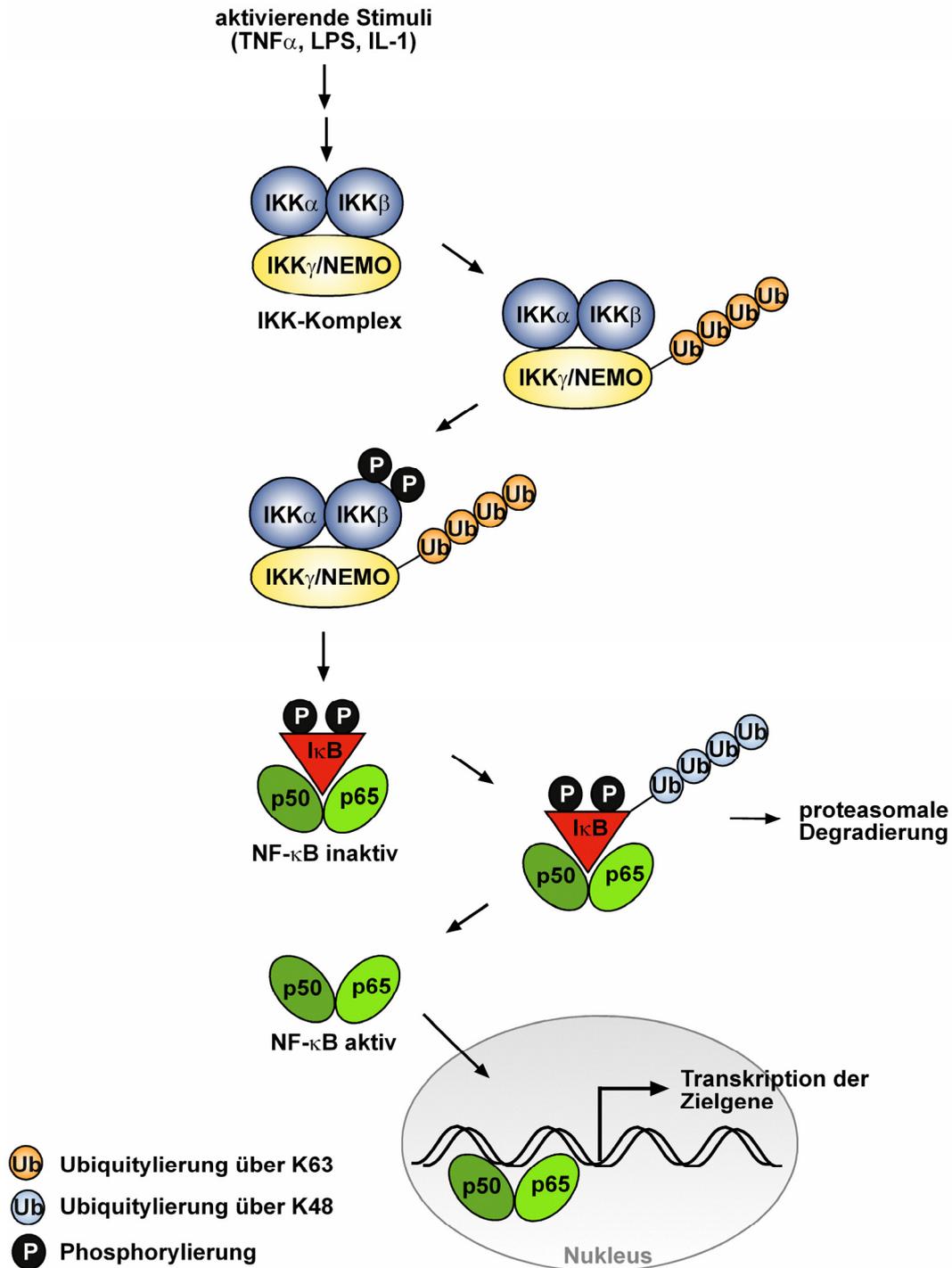
In unstimulierten Zellen liegt NF- $\kappa$ B inaktiv im Zytoplasma vor. Diese Retention im Zytoplasma wird durch inhibitorische  $\kappa$ B-Proteine (I $\kappa$ B) erreicht, die an NF- $\kappa$ B binden (Baldwin, A. S., Jr. 1996; Ghosh, S. *et al.* 1998). Zahlreiche Stimuli aktivieren NF- $\kappa$ B, wobei mehrere Aktivierungswege existieren, die auf Höhe des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK) zusammenlaufen. Am häufigsten wird der kanonische oder klassische Signalweg beobachtet, der durch Zytokine wie den Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder das Interleukin-1 (IL-1) ebenso wie durch bakterielle Antigene wie Lipopolysaccharide (LPS) induziert wird (Hayden, M. S. und S. Ghosh 2004). Die Aktivierung des IKK-Komplexes, bestehend aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$ , ist essentiell für die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an Serin-32 und Serin-36. Der phosphorylierte Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  wird von Ubiquitin-Ligasen erkannt, polyubiquityliert und schließlich durch das Proteasom degradiert. NF- $\kappa$ B-Moleküle werden auf diesem Weg von ihren Inhibitoren freigesetzt und gelangen durch Freilegung ihres Kernlokalisierungssignals in den Zellkern (Abb. 17) (Delhase, M. *et al.* 1999; Karin, M. 1999a; Karin, M. 1999b). Damit ist die erste Phase der NF- $\kappa$ B-Aktivierung abgeschlossen. Die zweite Phase der NF- $\kappa$ B-Aktivierung findet im Zellkern statt. Sie umfasst posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung) des NF- $\kappa$ B-Komplexes und der Histone, welche die verschiedenen NF- $\kappa$ B-Zielgene umgeben (Sizemore, N. *et al.* 1999; Zhong, H. *et al.* 1997). Die Bindung von NF- $\kappa$ B an Promotorregionen, die  $\kappa$ B-Konsensussequenzen enthalten, induziert die Transkription von Genen, welche unter anderem für zelluläre

Apoptoseinhibitoren (c-IAP, *cellular inhibitors of apoptosis*), anti-oxidierende Enzyme (z.B. MnSOD, Mangan-Superoxid-Dismutase) und Proteine der Bcl-2-Familie kodieren (Karin, M. und A. Lin 2002; Mattson, M. P. *et al.* 2000).

Entscheidend für die Aktivierung des IKK-Komplexes ist die regulatorische Untereinheit IKK $\gamma$ /NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modifier*). Zu Beginn der kanonischen Signaltransduktionskaskade induzieren aktivierende Stimuli die regulierende Ubiquitylierung (über Lysin-63) von mehreren Signalmolekülen wie TRAF2 (TNF *receptor-associated factor*) und TRAF6. Die Aktivierung dieser übergeordneten Signalmoleküle führt zur Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ /NEMO (ebenfalls über Lysin-63) und erlaubt die Interaktion des IKK-Komplexes mit Kinasen, die IKK $\beta$  phosphorylieren. Das phosphorylierte IKK $\beta$  fungiert als I $\kappa$ B-Kinase (Abb. 17) (Chen, Z. J. 2005; Haglund, K. und I. Dikic 2005; Krappmann, D. und C. Scheidereit 2005; Ravid, T. und M. Hochstrasser 2004).

Die transkriptionelle Aktivität wird durch einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus terminiert. NF- $\kappa$ B induziert die Synthese von I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinen, die an deacetyliertes RelA binden und zum nukleären Export des NF- $\kappa$ B-Komplexes führen. Somit wird die transkriptionelle Aktivität gestoppt und der Pool an inaktiven NF- $\kappa$ B-Komplexen im Zytosol wiederhergestellt (Arenzana-Seisdedos, F. *et al.* 1995; Arenzana-Seisdedos, F. *et al.* 1997).

NF- $\kappa$ B-Moleküle sind im gesamten Nervensystem zu finden und scheinen eine zentrale Rolle für die neuronale Integrität und synaptische Plastizität zu spielen (Karin, M. und A. Lin 2002). Neue Zellkulturstudien und Tiermodelle konnten zeigen, dass die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion den durch oxidativen Stress, Exzitotoxizität oder Glucosemangel induzierten neuronalen Zelltod verhindern kann (Kaltschmidt, B. *et al.* 2005; Mattson, M. P. *et al.* 2000). Diese Beobachtungen bringen NF- $\kappa$ B in einen möglichen Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson-Erkrankung.



**Abbildung 17.** 'Klassischer' NF- $\kappa$ B-Aktivierungsweg. Die zelluläre Aktivierung durch TNF $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ), LPS (Lipopolysaccharide) oder andere Stimuli wie IL-1 (Interleukin-1) führen zur regulierenden Ubiquitylierung über Lysin (K)-63 von verschiedenen Signalmolekülen und schließlich von IKK $\gamma$ /NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modifier*). Die Aktivierung des IKK (I $\kappa$ B-Kinase)-Komplexes (bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$ /NEMO) führt zur Phosphorylierung der IKK $\beta$ -Untereinheit. Die nachfolgende IKK $\beta$ -medierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  stimuliert dessen rasche Ubiquitylierung und Degradierung durch das Proteasom. NF- $\kappa$ B-Moleküle werden somit vom Inhibitor freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription entsprechender Zielgene induzieren.

## 1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, zwei fundamentale Fragestellungen der Parkin-Forschung zu adressieren:

1. Welche Mechanismen sind für die Inaktivierung von pathogenen Parkin-Mutanten verantwortlich?
2. Was ist die physiologische Funktion von Parkin und warum führt der Funktionsverlust von Parkin zur Parkinson-Erkrankung?

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine biochemische und zellbiologische Charakterisierung verschiedener krankheitsassoziierter Parkin-Mutanten in Zellkultur-Modellen durchgeführt werden. Die Studie sollte in erster Linie eine mechanistische Erklärung für die bei der autosomal-rezessiven Parkinson-Erkrankung vorhandene Inaktivierung von Parkin geben. Hierfür sollten sowohl pathogene C-terminale Deletionsmutanten als auch N-terminale Punktmutanten analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die physiologische Rolle von Parkin untersucht werden. Wir und andere Arbeitsgruppen haben für Parkin ein neuroprotektives Potential beobachtet. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus. Dabei war von Interesse, ob Parkin einen Einfluss auf essentielle Stress-induzierte Signaltransduktionswege hat und welche Rolle die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität spielt.

Die Aufklärung der Funktion von Parkin sowie der Mechanismen, die zum Funktionsverlust von Parkin führen, können neue Einblicke liefern in die Pathomechanismen der Degeneration dopaminergener Neuronen und möglicherweise Grundlagen schaffen für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

## 2. Material

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Zelllinien

SH-SY5Y	Typ: humane Neuroblastomzellen DSMZ-Nr. ACC 209
N2a	Typ: murine Neuroblastomzellen ATCC-Nr. CCL 131
HEK293T	Typ: humane embryonale Nierenzellen ATCC-Nr. CRL-1573
Primäre Fibroblasten	humane Haut-Fibroblasten eines PARK2-Patienten (Deletion von Exon 3-4/Exon3-5) und einer Kontrollperson (Nakaso, K. <i>et al.</i> 2006)

#### 2.1.2 Vektoren und Plasmide

pcDNA3.1/ZEO(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pEYFP, pEGFP	Clontech, Mountain View, Californien, USA
NF- $\kappa$ B-Luc	(Krappmann, D. <i>et al.</i> 2001)
HSE-Luc	(Winklhofer, K. F. <i>et al.</i> 2001)
HA-Ubiquitin, FLAG-I $\kappa$ B $\Delta$ N	(Krappmann, D. <i>et al.</i> 1996)
HA-K48only-Ubiquitin,	(Evans, P. C. <i>et al.</i> 2004)
HA-K63only-Ubiquitin	
FLAG-IKK $\gamma$	(Tegethoff, S. <i>et al.</i> 2003)
FLAG-IKK $\beta$ K/A, FLAG-TRAF2, FLAG-TRAF6	(Krappmann, D. <i>et al.</i> 2000)
FLAG-TRAF2 $\Delta$ N	(Rothe, M. <i>et al.</i> 1995)

### 2.1.3 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$

Genotyp: *supE44*,  $\Delta$ *lac169*,  
( $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15), *hsdR17*, *recA1*,  
*endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*  
Herkunft: Hanahan, 1983

### 2.1.4 Antikörper

Anti-Parkin hP1, polyklonal, ( $\alpha$ -hP1)	Immunisierung eines Kaninchens mit der rekombinanten, rückgefalteten N-terminalen Domäne von Parkin
Anti-Parkin PRK28, monoklonal	(Pawlyk, A. C. <i>et al.</i> 2003)
Anti-Parkin PRK8, monoklonal	(Pawlyk, A. C. <i>et al.</i> 2003)
Anti-Parkin, polyklonal (2132)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-HA, monoklonal (12CA5)	Hiss Diagnostics, Freiburg
Anti-HA, polykolonal	Sigma, Taufkirchen
Anti-FLAG M2, monoklonal	Sigma, Taufkirchen
Anti- $\alpha$ -Tubulin, monoklonal (N356)	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti- $\beta$ -Actin, monoklonal (AC-74)	Sigma, Taufkirchen
Anti-TRAF2, monoklonal (33a1293)	Abcam, Cambridge, Grossbritannien
Anti-TRAF2, polyklonal (C-20)	Santa Cruz, Californien, USA
Anti-IKK $\gamma$ , monoklonal (B-3)	Santa Cruz, Californien, USA
Anti- IKK $\gamma$ , polyklonal (FL-419)	Santa Cruz, Californien, USA
Anti-p65, polyklonal (C-20)	Santa Cruz, Californien, USA
Anti-aktive Caspase-3, polyklonal	Promega, Mannheim
Anti-Kaninchen Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Esel	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Maus Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Schaf	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen Antikörper Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Maus Antikörper FITC	Sigma, Taufkirchen

### 2.1.5 Enzyme und Proteine

Benzonase	Merck, Darmstadt
BSA	USB, Cleveland, OH, USA
DNase I	Sigma, Taufkirchen
Pfu-Polymerase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.6 Standardgrößenmarker für Proteine und Nucleinsäuren

Referenzproteine für SDS-Page: See Blue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Längenstandards: 1 kb DNA-Leiter 100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

#### 2.1.7.1 PCR-Primer

Die Synthese der Primer wurde von der Firma Metabion, Martinsried durchgeführt. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen:

G/ <u>GATCC</u>	<i>Bam</i> HI
A/ <u>AGCTT</u>	<i>Hind</i> III
GC/ <u>GGCCGC</u>	<i>Not</i> I

Primer:	5'-Ende	3'-Ende
<i>Bam</i> HI-5':	CGGGATCCATGATAGTGTGGTTCAGGTTTC	
<i>Not</i> I-3':	ATAAGAATGCGGCCGCCTACACGTCGAACCAGTGCTCCCC	
<i>Hind</i> III-5':	CCCAAGCTTATGATAGTGTGGTTCAGGTTTC	
N-3':	ATAAGAATGCGGCCGCCTAAAAGAAAAATTCTGCACTAGTC	
HA-3':	CCCAAGCTTATGTACCCATACGATGTACCTG	
HA-hP-5':	CCTGACAAACACTATCATGGATCCCGCGTAATC	
HA-hP-3':	GATTACGCGGGATCCATGATAGTGTGGTTCAGG	
M80T-5':	TGGAGAAAAGGTCAAGAAACGAATGCAACTGGAGGCGAC	
M80T-3':	GTCGCCTCCAGTTGCATTTCGTTTCTTGACCTTTTCTCCA	
M80L-5':	TGGAGAAAAGGTCAAGAATTGAATGCAACTGGAGGCGAC	
M80L-3':	GTCGCCTCCAGTTGCATTCAATTCTTGACCTTTTCTCCA	
Q311Stop-3':	ATAAGAATGCGGCCGCCTACTCTTCTCCAGAATCCTGAA GTG	
E409Stop-3':	ATAAGAATGCGGCCGCCTTATTTGGAGGCTGCTTCCCA	
W453Stop-3':	ATAAGAATGCGGCCGCCTACTCGCAGCCACAGTTCCAGCA	
Δ1-79-5':	CCCAAGCTTATGAATGCAACTGGAGGC	
R33Q-5':	AAGGAGGTGGTTGCTAAGCAACAGGGGGTTCCGGCTGAC	
R33Q-3':	GTCAGCCGGAACCCCTGTTGCTTAGCAACCACCTCCTT	
R42P-5':	GTTCCGGCTGACCAGTTGCCTGTGATTTTCGCAGGGAAG	
R42P-3':	CTTCCCTGCGAAAATCTCAGGCAACTGGTCAGCCG	
K48A-5':	CGTGTGATTTTCGCAGGGGCGGAGCTGAGGAATGACTGG	
K48A-3':	CCAGTCATTCTCAGCTCCGCCCTGCGAAAATCACACG	
V56E-5':	CTGAGGAATGACTGGACTGAGCAGAATTGTGACCTGGAT	
V56E-3':	ATCCAGGTCACAATTCTGCTCAGTCCAGTCATTCTCAG	
T415N-5':	GAAACCATCAAGAAAACCAACAAGCCCTGTCCCCGCTGC	
T415N-3':	GCAGCGGGGACAGGGCTTGTGGTTTTCTTGATGGTTTC	
G430D-5':	TGCCATGTACCAGTGGAAAAAATGGAGACTGCATGC	
G430D-3':	GTGCATGCAGTCTCCATTTTTTCCACTGGTACATGGCA	

### 2.1.7.2 RT-PCR-Primer

Die Synthese der RT-PCR-Primer wurde von der Firma Thermo Scientific durchgeführt.

Parkin (Ratte)-5': 5'-AGACAAGCAACCCTCACCTT-3'

Parkin (Ratte)-3': 5'-TGGCACTCTCCACTCATCC-3'

$\beta$ -Actin (Ratte)-5': 5'-CTCTCTTCCAGCCTTCCTTC-3'

$\beta$ -Actin (Ratte)-3': 5'-GGTCTTTACGGATGTCAACG-3'

Die Synthese von TaqMan-Proben wurde von der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Parkin: Hs01038827-m1

$\beta$ -Actin: P/N 4326315 E

### 2.1.7.3 siRNA

Die Synthese der siRNA wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt.

*Parkin Stealth<sup>TM</sup> siRNA duplex 1*: 5'-UUCGCAGGUGACUUUCCUCUGGUCA-3'

*Negative control Stealth<sup>TM</sup> siRNA*

### 2.1.7.4 EMSA-Sonden

Die Synthese der Sonden wurde von der Firma Promega durchgeführt.

NF- $\kappa$ B Konsensus-Oligonukleotid: 5'-AGTTGAGGGTTTCCCAGGC-3'

OCT1 Konsensus-Oligonukleotid: 5'-TGTCGSATGCAAATCACTAGAA-3'

## 2.2 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Amplify	Amersham Biosciences, Freiburg

---

APS	USB, Cleveland, OH, USA
B27-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Desoxycholol	Sigma, Taufkirchen
Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
EDTA	USB, Cleveland, OH, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll 400	Merck, Darmstadt
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
GS ( <i>goat serum</i> )	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
HEPES	Sigma, Taufkirchen
HS	Invitrogen, Karlsruhe
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Instant-Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Kainat	Calbiochem, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Manganchlorid	Sigma, Taufkirchen
Meglumin-Diatrizoat	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt

---

MG 132	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Diatrizoat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
NEM	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
PBS Dulbecco's +/+ Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Dulbecco's -/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
PMA	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	Roth, Karlsruhe
Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
ProMix [ <sup>35</sup> S]-Methionin/Cystein	Amersham Biosciences, Freiburg
L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin	Amersham Biosciences, Freiburg
Protein A-Agarose	Pierce, Perbio Science, Bonn
Protein A-Trisacryl-Matrix	Pierce, Perbio Science, Bonn
Protein G-Matrix	Pierce, Perbio Science, Bonn
Rotenon	Sigma, Taufkirchen
Rubidiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma, Taufkirchen
TaqMan Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
TEMED	USB, Cleveland, OH, USA
TNF $\alpha$	Biomol, Hamburg
Transfektionsreagenz:	
Lipofectamine Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt

---

Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	USB, Cleveland, OH, USA
Trypan Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Tween-20	USB, Cleveland, OH, USA

### 2.3 Lösungen und Puffer

APS-Lösung	10% Ammoniumperoxodisulfat in PBS
<i>Blocking Milk</i> für Western Blot	5% Magermilchpulver in 1x PBST
Blockierungspuffer (IF)	5% Pferdeserum 0,1% Tween 20 in PBS
BSA 100x	New England Biolabs, Schwalbach
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 7% Essigsäure
DNA-Probenpuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau 30% Glycerol
EMSA-Mix	10 mM HEPES pH 7,9 50 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 0,1 mM EDTA 5 % Glycerol 0,5 µg/µl BSA 0,1 µg/µl poly dIdC in PBS
Hochsalzpuffer	20 mM HEPES pH 7,9 300 mM NaCl 10 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mM EDTA 0,1 % Triton X-100 20 % Glycerol 2 mM DTT in PBS
IP-Lysepuffer	0,1% Triton X-100 Complete-Protease-Inhibitor in PBS
Kainat	50 mM Kainat in H <sub>2</sub> O

---

Laemmli-Probenpuffer (2x)	120 mM Tris pH 6.8 2% SDS 20% Glycerol 0.5% Bromphenolblau 2% Mercaptoethanol
Laemmli-Probenpuffer (4x)	240 mM Tris pH 6.8 4% SDS 40% Glycerol 1% Bromphenolblau 4% Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Page (10x)	250 mM Tris, pH 6,8 1,9 M Glycin 1% SDS
Lysepuffer	0,1% Triton X-100 in PBS
Lysepuffer, denaturierend	50 mM Tris-HCl pH 7.4 5 mM EDTA 1% SDS 25 mM NEM 15 U/ml DNase I Complete Protease-Inhibitor in PBS
Lysepuffer, nicht-denaturierend	50 mM Tris-HCl pH 7.4 300 mM NaCl 5 mM EDTA 1% Triton X-100 25 mM NEM Complete-Protease-Inhibitor in PBS
Lysepuffer, hypoton	20 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mM EDTA 0,1 % Triton X-100 20 % Glycerol 2 mM DTT in PBS
MG132	10 mM MG132 in DMSO
NEM	1 M NEM in Ethanol
PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST (10x)	1% Tween 20 in 1 x PBS
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)	Promega, Mannheim
Ponceau S – Färbelösung	0,2 g Ponceau S 5 ml Essigsäure H <sub>2</sub> O ad 100 ml

Renografin 76%	66% Meglumin-Diatrizoat 10% Natrium-Diatrizoat TE pH 7,6
Reporter-Lysepuffer (5x)	Promega, Mannheim
Rotenon	0,5 mg/ml in DMSO
Sammelgelpuffer für SDS-Page (Upper Tris)	0,5M Tris, pH 6,8 0,4% SDS pH 6,8
Shrimp-Alkaline-Phosphatase-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 57,1 ml Eisessig 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O, pH 8,0 H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
TBE	45 mM Trisborat 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
TFB1-Puffer	30 mM K-Acetat 100 mM RbCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 15% Glycerol pH 5,8
TFB2-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15% Glycerol pH 6,5
Transferpuffer für Western Blot	20 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,01% SDS 20% Methanol
Trenngelpuffer für SDS-Page (Lower Tris)	1,5M Tris, pH 8,8 0,4% SDS pH 8,8

## 2.4 Medien

*Dulbecco's Modified  
Eagle's Medium (DMEM)*

Invitrogen, Karlsruhe

<i>Minimal Essential Medium</i> (MEM)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Minimal Essential Medium</i> ohne L-Methionin	Invitrogen, Karlsruhe
OPTIMEM 1	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	1% NaCl 1% Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt Ampicillin bzw. Kanamycin wird nach dem Autoklavieren (20 min 120 °C) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml bzw.30 µg/ml zugegeben.
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Bacto Agar Ampicillin bzw. Kanamycin wird nach dem Autoklavieren (20 min 120 °C) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml bzw.30 µg/ml zugegeben.

## 2.5 Kits

ECL RPN 2106	Amersham Biosciences, Freiburg
Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat	Millipore, Schwalbbach
Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
QIAprep Spin Plasmidextraktionskit Mini/Maxi/ EndoFree Maxi	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Reinigungskit	Qiagen, Hilden
RNeasy Minikit	Qiagen, Hilden
iScript cDNA Synthesekit	Bio-Rad, München

## 2.6 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried
Autoklav GE2606	Getinge Van Dilk, Straelen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
RT-PCR-Gerät: Fast Real Time System 7500	Applied Biosystems, Foster City, USA

---

Filmentwickler X-Omat	Kodak, Stuttgart
Gefrierschränke:	
Forma Scientific Bio Freezer (-80°C)	ThermoQuest, Egelsbach
AEG Öko-Arctis (-20°C)	AEG, Frankfurt am Main
Gelbetrachter	MWG Biotech, Ebersberg
Geltrockner SGD300	Savant, Holbrook, NY, USA
Kühlschrank AEG Öko Santo	AEG, Frankfurt am Main
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest, Egelsbach
Mikroskope:	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen
mit Software Axiovision	
Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
mit Software Leica confocal 2.6.1	
Mikrowelle M633	Samsung, Schwalbach
PCR-Gerät:	
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
pH-Meter	Fischer Scientific, Nidderau
Phosphoimager FLA-2000	Fuji Photo Film, Düsseldorf
mit Software AIDA	
Pipetten Gilson	Abimed, Langenfeld
P2, P10, P20, P200, P1000	
Pipettierhilfe pipet-aid Drummond	Scientific, Broomall, PA, USA
Polyacrylamidgel-Elektrophorese-	
kammer Hoefer SE600	Amersham Biosciences, Freiburg
mit Power Supply EPS	
Reinstwasseranlage Milli-Q <sub>PLUS</sub>	Millipore, Eschborn
Schwenktisch GFL 3017	Merck eurolab, Ismaning
Spektralphotometer DU-640	Beckmann, Unterschleissheim
Thermoblöcke	Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried
Transferkammer Hoefer TE-Serie	
mit Power Supply EPS 2A200	Amersham Biosciences, Freiburg
Überkopfmischer Heidolph REAX 2	Merck eurolab, Ismaning
Ultraschallbad	Roth, Karlsruhe
UV-Tisch Foto/UV 21	Fotodyne, Hartland, WI, USA
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

## Waagen:

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

Zellkulturschränke

ThermoQuest, Egelsbach

## Zentrifugen:

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
Ultrazentrifuge TLX-120 mit Rotor TLA-120.2	Beckman, Unterschleissheim

**2.7 Sonstige Materialien**

Deckgläschen	neoLab, Heidelberg
Einmalkanülen Neolus 26G 0.45mm	Terumo, Tokyo. Japan
Einmalpipetten, steril	Nunc, Wiesbaden
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Expositionskassetten	Fischer Scientific, Nidderau
Gelladespitzen Sørensen MultiFlex Round Tips	Roth, Karlsruhe
Objektträger 76 x 26 mm	neoLab, Heidelberg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen für Gilson P-Serie	Continental Lab Products, San Diego, CA, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhren	Falcon, Heidelberg
Polysterol-Röhrchen, steril, 18 x 95 mm	Greiner, Frickenhausen
Protran Nitrocellulose Nucleinsäure- und Proteintransfer	Schleicher & Schüll, Dassel
Röntgenfilme Kodak Biomax MR	Sigma, Deisenhofen
Reaktionsgefäße: Safe-Lock Micro Test Tubes 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg

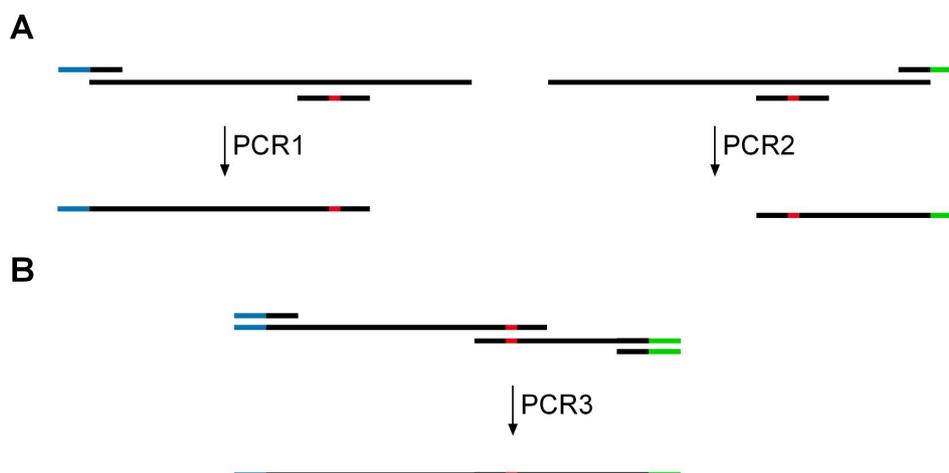
---

Schraubdeckel-Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Sarstedt, Nürnberg
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	Abgene, Hamburg
Sterilfilter Millex <sup>®</sup> -HA 0,45µm	Millipore, Eschborn
Sterilfilter Millex <sup>®</sup> -GS 0,22µm	Millipore, Eschborn
Whatman Chromatographie-Papier 3MM Chr	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen Ø3,5, 6 und 10 cm	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Corning Inc., Corning, NY, USA

### 3. Methoden

#### 3.1 Rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki, R. K. *et al.* 1988) dient der selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotide (Primer). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte rekombinante PCR wird eingesetzt, um verschiedene Genabschnitte ohne Einfügen von Restriktionsschnittstellen miteinander zu verknüpfen (Higuchi, R. 1990). Dabei werden in zwei getrennten Ansätzen Genfragmente mit Primern mit überlappender Sequenzhomologie amplifiziert, welche dann in einer zweiten Reaktion als Matrize eingesetzt werden. Die hybridisierenden Sequenzhomologien dienen als interne Primer. Durch entsprechende Wahl der internen Primer können Mutationen, Insertionen oder Deletionen in ein Gen eingefügt werden (Abb. 18). Die externen Primer enthalten jeweils eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease und dienen der Amplifikation des Produktes.



**Abbildung 18. Klonierungsstrategie zur Einführung einer Punktmutation mittels rekombinanter PCR. (A)** Die beiden zu verknüpfenden Fragmente, die N- und C-terminal zur Mutation liegen, werden separat per PCR amplifiziert (PCR1 und PCR2). Dabei enthalten die internen Primer jeweils die Punktmutation (rot). **(B)** In der folgenden PCR-Reaktion (PCR3) lagern sich die überlappenden Sequenzen aneinander und fungieren somit als interne Primer. Fragmente mit der vollständigen Länge werden durch die externen Primer amplifiziert. Schwarz: Fragmente 1 bzw. 2, blau und grün: nicht-homologe Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen, rot: Mutation.

### 3.1.1 Bedingungen für die PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mit 15 pmol Primern, je 0,25 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 50 ng Matrizen-DNA, 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase und dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Nach dreiminütiger Denaturierungsphase bei 96°C wurde folgender Zyklus 28-mal wiederholt:

Denaturierung	45 Sekunden bei 96°C
Primer-Anlagerung	45 Sekunden bei 50-55°C (je nach Schmelztemperatur des Primers)
Elongation	2 Minuten/Kilobasenpaar zu amplifizierender DNA bei 72°C

Abschließend wurde die Reaktion 10 Minuten bei 72°C inkubiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf 4°C gekühlt.

### 3.1.2 Sequenzierungen

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger, F. *et al.* 1977) von der Firma Medigenomix in Martinsried durchgeführt.

### 3.1.3 Klonierung von Parkin-Mutanten

Alle Parkin-Fragmente wurden in den Vektor pcDNA3.1/ZEO (+), der unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalievirus)-Promotors steht, ligiert, um eine Expression in den verschiedenen Zelllinien zu ermöglichen. Als Matrize diente das Plasmid pcDNA-hP-fl, das humanes Wildtyp-Parkin kodiert (Winklhofer, K. F. *et al.* 2003). Die Klonierung der Parkin-Mutanten wurde, soweit nicht anders vermerkt, nach folgenden Schemata durchgeführt:

C-terminale Deletionsmutanten wurden ausgehend vom Plasmid pcDNA-hP-fl mit den Primern *HindIII*-5' (bzw. *BamHI*-5') und X-3' amplifiziert. Der Buchstabe X steht für die jeweilige Konstruktbezeichnung. Über die Schnittstellen *HindIII* (bzw. *BamHI*-3') und *NotI* wurde das Produkt in das Plasmid pcDNA3.1 ligiert.

Zur Klonierung von Punktmutanten wurden ausgehend vom Plasmid pcDNA-hP-fl das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII*-5' (bzw. *BamHI*-5') und X-3' und das C-terminale Fragment mit den Primern *NotI*-3' und X-5' amplifiziert. Die Amplifikation des Produkts erfolgte dann mit den externen Primern *HindIII*-5' (bzw. *BamHI*-5') und *NotI*-3'. Über die Schnittstellen *HindIII* (bzw. *BamHI*-3') und *NotI* wurde das Produkt in das Plasmid pcDNA3.1 ligiert.

#### **3.1.3.1 Parkin mit HA-Tag am N-Terminus: HA-hP-fl**

Ausgehend vom Plasmid pcDNA3.1-hP-fl wurde ein Parkin-Fragment mit überhängender HA-Sequenzhomologie mittels der Primer HA-hP-5' und *NotI*-3' amplifiziert. Parallel wurde ein HA-Fragment mit überhängender Parkin-Sequenzhomologie mittels der Primer *HindIII*-5' und HA-hP-3' hergestellt. Die beiden Fragmente wurden verknüpft und mit dem externen Primerpaar *HindIII*-5' / *NotI*-3' amplifiziert. Das Konstrukt kodiert Wildtyp (wt)-Parkin mit N-terminalem HA-Tag.

#### **3.1.3.2 Parkin mit verkürztem N-Terminus: hP- $\Delta$ 1-79**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung des Primerpaares *BamHI*-5' /  $\Delta$ 1-79-3'. Es wurden die Aminosäuren 1 bis einschließlich 79 deletiert. Die Deletion umfasst die gesamte UBL-Domäne von Parkin.

#### **3.1.3.3 Parkin mit deletiertem C-Terminus: hP-N**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung des Primerpaares *BamHI*-5' / N-3'. Das Konstrukt kodiert wt Parkin bis zur Aminosäure 210.

#### **3.1.3.4 Parkin mit Punktmutationen**

Hergestellt wurden die Konstrukte unter Verwendung der in Tabelle 9 aufgeführten Primerpaare. Die pathogenen Mutationen R33Q, R42P, K48A und V56E liegen in

der N-terminalen UBL-Domäne und G430D in der RING2-Domäne. Das Konstrukt hP-M80T entspricht der Sequenz von Maus- und Ratten-Parkin.

Konstrukt	Primerpaare	Aminosäureaustausch
hP-R33Q	<i>HindIII</i> -5' / R33Q-3' <i>NotI</i> -3' / R33Q-5'	Arginin → Glutamin
hP-R42P	<i>BamHI</i> -5' / R42P-3' <i>NotI</i> -3' / R42P-5'	Arginin → Prolin
hP-K48A	<i>HindIII</i> -5' / K48A-3' <i>NotI</i> -3' / K48A-5'	Lysin → Alanin
hP-V56E	<i>HindIII</i> -5' / V56E-3' <i>NotI</i> -3' / V56E-5'	Valin → Glutaminsäure
hP-T415N	<i>BamHI</i> -5' / T415N-3' <i>NotI</i> -3' / T415N-5'	Threonin → Asparagin
hP-G430D	<i>BamHI</i> -5' / G430D-3' <i>NotI</i> -3' / G430D-5'	Glycin → Aspartat
hP-M80T	<i>BamHI</i> -5' / M80T-3' <i>NotI</i> -3' / M80T-5'	Methionin → Threonin
hP-M80L	<i>BamHI</i> -5' / M80L-3' <i>NotI</i> -3' / M80L-5'	Methionin → Leucin

Tabelle 9. Primer für Punktmutanten von Parkin.

### 3.1.3.5 Parkin mit pathogenen C-terminalen Deletionsmutationen

Die Konstrukte hP-Q311Stop, hP-E409Stop und W453Stop wurden unter Verwendung der in Tabelle 8 aufgeführten Primerpaare hergestellt. Durch Basenaustausch an den entsprechenden Positionen entsteht ein Stopcodon.

Konstrukt	Primerpaar	Basenaustausch	deletierte Domänen
hP-Q311Stop	<i>Bam</i> HI-5' Q311Stop-3'	CAG → TAG	IBR und RING2
hP-E409Stop	<i>Hind</i> III-5' E409Stop-3'	GAA → TAA	RING2
hP-W453Stop	<i>Bam</i> HI-5' W453Stop-3'	TGG → TAG	13 AS

**Tabelle 8.** Primer für pathogene C-terminalen Deletionsmutanten von Parkin. AS: Aminosäure, IBR: *in between* RING, RING: *really interesting new gene*.

## 3.2 Bakterienkultur

### 3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Zellen von *Escherichia coli* (*E.coli*) kompetent zu machen, d.h. diese zur Aufnahme von Plasmid-DNA zu befähigen, wird eine Kultur bis zur logarithmischen Phase angezogen und mit divalenten Kationen behandelt. Dieses Verfahren führt zu einer Destabilisierung der Zellwand (Sambrook, J. *et al.* 1989).

Zunächst wurde eine Vorkultur hergestellt: 2 ml *Luria Broth* (LB)-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie des *E.coli*-Stammes DH5 $\alpha$  beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend in 250 ml LB-Medium gegeben und 2-3 h lang bis zu einem OD<sub>590</sub>-Wert zwischen 0,4 und 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde 5 min bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskalten TFB1-Puffer resuspendiert, die Suspension 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 5 min lang bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem TFB2-Puffer resuspendiert, 15-60 min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert (100  $\mu$ l/Reaktionsgefäß). Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation (Sambrook, J. *et al.* 1989) dient der Aufnahme und Amplifikation von Plasmiden durch *E.coli*.

Aliquote kompetenter Bakterien (100 µl/Reaktionsgefäß) wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 90 Sekunden bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Es wurden 400 µl LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika zugegeben. Die Kulturen wurden 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.

### 3.3 DNA-Präparation

Zur Herstellung von Plasmid-DNA wurde der Qiagen-Mini- bzw. Qiagen-Maxi-Kit verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers Qiagen verfahren.

### 3.4 RNA-Präparation

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde der RNeasy Minikit verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers Qiagen verfahren.

### 3.5 Zellkultur

#### 3.5.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien und primäre Zellkulturen (Fibroblasten) wurden als adhärenter Einzelzellrasen kultiviert.

Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y), humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) und humane Fibroblasten wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und

1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1 U/ml Penicillin G, 1 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Murine Neuroblastomzellen (N2a) wurden in MEM (*Minimal Essential Medium*) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1 U/ml Penicillin G, 1 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **3.5.2 Passagierung**

Nach Abziehen des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS +/- (*Phosphate Buffered Saline*) gespült und anschließend mit Trypsin (0,5 g/l Trypsin) einige Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden leicht von ihrer Unterlage abgeklopft, in vorgewärmtem Vollmedium sorgfältig resuspendiert und im gewünschten Verhältnis aufgeteilt. Nach Zusatz von Vollmedium wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **3.5.3 Ausplattieren**

Zum Ausplattieren der Zellen wurde zunächst die vorhandene Zellmenge ermittelt. Ein Aliquot der mit Trypsin gelösten Zellen (siehe 3.5.2.) wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt.

SH-SY5Y Zellen wurden in einer Dichte von  $7 \times 10^5$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert. N2a- und HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen bzw.  $2,6 \times 10^6$  Zellen auf 6 cm-Schalen ausplattiert. Fibroblasten wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen dünner ausplattiert, um vereinzelt Zellen besser zu erkennen. In diesem Fall wurden  $5 \times 10^5$  SH-SY5Y Zellen auf 3,5 cm-Schalen, welche Deckgläschen enthielten, ausplattiert.

### **3.5.4 Transfektion**

24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen wurden diese mit Medium gewaschen und mit Plasmid-DNA mit dem Transfektions-Kit Lipofectamine plus nach Angaben des Herstellers Invitrogen transfiziert. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde 1 ml Vollmedium zugesetzt. Für die Reporter- und Apoptose-Versuche wurde endotoxinfreie Plasmid-DNA verwendet (EndoFree Maxi, Qiagen). Die Transfektion der HEK293T-Zellen mit siRNA erfolgte mit dem Transfektions-Kit Lipofectamine 2000 nach Angaben des Herstellers Invitrogen.

### **3.5.5 Zellernte**

24-72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden die Zellen mit PBS -/- gewaschen und anschließend in PBS -/- mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1000 x g abzentrifugiert, das Zellpellet auf Eis gestellt und entsprechend weiterverarbeitet.

### **3.5.6 Herstellen eines nukleären Extrakts**

Das Zellpellet wurde im 3-fachen Volumen des Pellets mit hypotonem Lysepuffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Kerne wurden anschließend in ihrem 3-fachen Volumen in Hochsalzpuffer resuspendiert und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (5 Minuten, 1000 rpm, 4 °C) wurde die Proteinkonzentration des Überstandes nach Bradford (siehe 3.7.2) bestimmt.

## **3.6 Präparierung und Kultivierung von primären kortikalen Rattenneuronen**

Zur Isolierung der Neuronen wurden die Cortices aus den Gehirnen von embryonalen Ratten (E18) entfernt. Die Zellen wurden durch mildes Trypsinieren dissoziiert, auf Polyethylen-beschichteten 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert und in *Neurobasal*

*Medium* (Invitrogen) (+ 5 mM HEPES, 1,2 mM Glutamin, B27-Supplement 20 ml/l, Gentamicin 0,1 mg/ml) kultiviert. Die Stressbehandlung der Zellen erfolgte bei 8-10 Tage alten Kulturen. Zu diesem Zeitpunkt enthielten die Kulturen weniger als 5 % Astrocyten.

Zur Induktion von Exzitotoxizität wurden die Zellen für 6 Stunden mit 5 oder 10  $\mu$ M Glutamat in EBSS Medium (6800 mg/l NaCl, 400 mg/l KCl, 264 mg/l CaCl<sub>2</sub>, 200 mg/l MgCl<sub>2</sub>, 2200 mg/l NaHCO<sub>3</sub>, 140 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) + 10 mM Glucose inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert (siehe 3.4).

### **3.7 Protein- und Nukleinsäureanalytik**

#### **3.7.1 Nachweis der Löslichkeit**

Die Zellpellets (siehe 3.5.5) wurden in kaltem Lysepuffer resuspendiert, 5 Minuten lang auf Eis inkubiert und für 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zelllysate wurde in eine Detergenz-lösliche (Überstand, S) und eine Detergenz-unlösliche (Pellet, P) Fraktion aufgetrennt, in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Die genomische DNA in der detergenz-unlöslichen Fraktion wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Probe in eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle geschert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

#### **3.7.2 Proteinkonzentration nach Bradford**

Nach der Zelllyse wurde die Gesamtproteinmenge des Überstandes mit Hilfe des Protein Assay Kits nach der Methode von Bradford entsprechend den Angaben des Herstellers Bio-Rad bestimmt.

### 3.7.3 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Protein-Nukleinsäurekomplexen erfolgte über ein 4%iges Polyacrylamidgel in 0,5 x TBE-Puffer. Der Gellauf erfolgte bei 160 V und 4°C für 4 Stunden.

### 3.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteine erfolgte durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, U. K. 1970). Je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 8% oder 10% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 150-250 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

### 3.7.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)

Die Proteine wurden zum Zwecke der Immundetektion (siehe 3.7.6) mit Transferpuffer auf eine Nitrozellulose-Membran der Porengröße 0,45 µm transferiert (Towbin, H. *et al.* 1979). Der Transfer erfolgte für 2 Stunden bei einer festen Stromstärke von 1 A bei 4°C.

### 3.7.6 Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion wurden mit dem *Enhanced Chemiluminescenc* (ECL)-System oder dem Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde eine Stunde in PBST mit 5% Milchpulver (*Blocking Milk*) bei Raumtemperatur blockiert und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper bzw. Antiserum inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen und für 40 Minuten mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Schaf-Anti-Maus- bzw. Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:10.000 in PBST) inkubiert. Die Membran wurde erneut mit

PBST gewaschen und mit HPR-Substrat inkubiert. Die Signale wurden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

### **3.7.7 Immunpräzipitation (IP)**

Die Detergenz-lösliche Fraktion des Zelllysats (IP-Lysepuffer) wurde mit 1 µl Antikörper bzw. Antiserum über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Dreher inkubiert. Um die Protein-Antikörper-Komplexe zu isolieren, wurden 30 µl einer in IP-Puffer gewaschenen Protein A-Trisacryl-Matrix bzw. Protein G-Matrix zugefügt und die Inkubation bei 4°C für weitere 90 Minuten in einem Überkopf-Dreher fortgesetzt. Die Komplexe wurden kurz abzentrifugiert, zweimal mit IP-Lysepuffer und zuletzt mit PBS +/- gewaschen und in 50 µl Laemmli-Probenpuffer für 10 Minuten inkubiert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

### **3.7.8 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)**

HEK293T-Zellen wurden mit Parkin und IKK $\gamma$  oder TRAF2 co-transfiziert und am nächsten Tag geerntet. Nach der Lyse in IP-Lysepuffer wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem polyklonalen Antikörper Anti-IKK $\gamma$  oder Anti-TRAF2 über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wie unter Punkt 3.7.7 beschrieben verfahren. Für den Immunblot wurde der monoklonale Anti-Parkin Antikörper PRK28 verwendet.

Für die endogene Co-IP aus SH-SY5Y-Zellen wurde der Überstand mit dem polyklonalen Anti-Parkin Antikörper hP1 (gekoppelt an Protein A-Agarose) über Nacht bei 4°C inkubiert. Für den Immunblot wurden die monoklonalen Antikörper Anti-IKK $\gamma$  oder Anti-TRAF2 verwendet.

### **3.7.9 Radioaktive Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]**

Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 Minuten in MEM ohne Methionin (+ 1x PenStrepGlu) inkubiert, um vorhandenes

Methionin (Met) aufzubrauchen (Hungern). Für die radioaktive Markierung wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl frisches MEM ohne Methionin mit [<sup>35</sup>S]-Met (ProMix, 150 µCi/ml) ersetzt. Nach 30 Minuten wurden die Schalen, die zur Untersuchung der während der *pulse*-Phase synthetisierten Proteine bestimmt waren, geerntet und die Zellen mit IP-Lysepuffer lysiert (*pulse*-Proben). Die restlichen Schalen wurden für die angegebene Zeit mit Vollmedium bei 37°C inkubiert und dann wie oben beschrieben lysiert (*chase*-Proben). Die Detergenzlösliche Fraktion wurde auf eine Endkonzentration von 0,5 % Sarkosyl gebracht und mittels einer Immunpräzipitation analysiert. Die Pellet-Fraktion wurde verworfen.

### **3.7.10 Autoradiodiagramme und Phosphoimaging**

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden 30 Minuten fixiert (40% Methanol, 7% Essigsäure) und weitere 30 Minuten mit Amplify inkubiert. Auf einem Whatman-Papier wurden sie dann in einem Gelrockner für eine Stunde bei 72°C unter Vakuum getrocknet. Die markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert.

Eine computergestützte Visualisierung und Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine wurde mittels Phosphoimaging durchgeführt. Auf die getrockneten Gele wurde für 1-48 Stunden ein Phosphoimaging-Schirm aufgelegt. Die Signale wurden von einem Phosphoimager ausgelesen und mit dem Programm AIDA (Raytest) ausgewertet.

### **3.7.11 Behandlung mit proteasomalem Inhibitor**

Um das Proteasom zu hemmen, wurden die Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (Tsubuki, S. *et al.* 1993) behandelt. Für die Analyse radioaktiv markierter Proteine wurde MG 132 in einer Konzentration von 50 µM während des Hungerns, der *pulse*- und der *chase*-Phase zu den Zellen gegeben.

### 3.7.12 TCA-Fällung

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen einer 50%igen Trichloressigsäure (TCA)-Lösung versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 13.000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

### 3.7.13 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde mit dem TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System gemäß den Angaben des Herstellers Promega durchgeführt. Nach 90-minütiger Translation wurde die Reaktion durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer gestoppt und die Proben auf einem SDS-Gel analysiert.

### 3.7.14 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die zelluläre Lokalisierung von Proteinen in lebenden Zellen zu bestimmen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit permeabilisierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen auf Glasdeckgläschen ausplattiert (siehe 3.5.3.) und transfiziert (siehe 3.5.4). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zur Permeabilisierung für 10 Minuten in Methanol (-20°C) fixiert und anschließend mit dem Erstantikörper (1:200 in PBS -/-, 1% BSA) eine Stunde lang bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS -/- gewaschen und mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Cy3 oder FITC (1:200 in PBS -/-, 1% BSA) versehen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Präparate in Mowiol (+ DAPI, 1µg/ml) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Für Analysen am Konfokalmikroskop wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert und mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert.

### **3.7.15 Nachweis von Apoptose**

#### **3.7.15.1 Aktive Caspase-3**

Die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers, der gegen aktive Caspase-3 gerichtet ist, ermöglicht die spezifische Detektion von apoptotischen Zellen. SH-SY5Y-Zellen wurden auf Glasdeckgläschen aufplattiert (siehe 3.5.3.) und transfiziert (siehe 3.5.4.). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für drei Stunden mit Kainat (500  $\mu\text{M}$ ) oder Rotenon (10  $\mu\text{M}$ ) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten mit 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert, mit 0,2% Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert und für weitere 60-120 Minuten mit Blockierungspuffer bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Inkubation des Anti-aktive Caspase-3 Antikörpers (1:250 in Blockierungspuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden mit PBS -/- gewaschen und mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper Cy3 (1:500 in PBS -/-) versehen. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurden die Zellen in Mowiol (+ DAPI, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die apoptotischen Zellen wurden durch Zählen der Caspase-positiven Zellen quantifiziert.

#### **3.7.15.2 Hoechst 33342**

SH-SY5Y-Zellen wurden auf Glasdeckgläschen ausplattiert und transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 18 Stunden mit Rotenon (0,25  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten mit 3% PFA fixiert und für weitere 10 Minuten bei 37°C mit Hoechst 33342 (1  $\mu\text{M}$ ) angefärbt. Nach dem Waschen in PBS wurden die Präparate in Mowiol eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Apoptotische Zellen wurden durch kondensierte und fragmentierte Kerne identifiziert und quantifiziert.

### 3.8.18 Zellfraktionierung

#### 3.8.18.1 Renografin-Gradient

Die intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen wurde mit einer modifizierten Renografin-Dichtegradientenzentrifugation untersucht (Heller, U. *et al.* 2003; Henn, I. H. *et al.* 2005; Heske, J. *et al.* 2004; Schandel, K. A. und D. D. Jenness 1994; Wang, Q. und A. Chang 1999). Je drei 6 cm-Schalen mit transfizierten N2a-Zellen wurden geerntet (siehe 3.5.5) und die Zellpellets vereint. Das Pellet wurde in 600 µl TE-Puffer mit Complete Protease-Inhibitor aufgenommen, auf Trockeneis eingefroren und anschließend bei 37°C aufgetaut. Dieser Vorhang wurde zweimal wiederholt. Nach Zusatz von 1 µl Benzonase und 10-minütiger Inkubation bei 37°C, wurde für vier Minuten bei 500 rpm zentrifugiert, um die Zellkerne abzutrennen. 500 µl des Lysats wurden mit 500 µl Renografin 76% vermischt und in einem Zentrifugenröhrchen platziert. Die Probe wurde nun mit jeweils 1 ml 34%, 30%, 26% und 22% Renografin überschichtet und für 20 Stunden bei 150.000 x g und 4°C zentrifugiert. Von den Gradienten wurden 13 Fraktionen à 350 µl von oben abgenommen. Je 300 µl der Fraktionen wurden mit 700 µl TE verdünnt und für eine Stunde bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in 100 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel analysiert.

#### 3.8.18.2 Sucrose-Gradient

Je eine 3,5 cm Schale mit transfizierten N2a-Zellen wurde geerntet (siehe 3.5.5) und mittels einer Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 150 µl Detergenzpuffer (0,1% Triton X-100, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 5 % Glycerol) resuspendiert und 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. In einem Zentrifugenröhrchen wurde ein 2 ml Stufengradient gegossen. Hierzu wurden 0,5 ml einer 40%igen Sucroslösung (in Detergenzpuffer) mit 1,5 ml einer 30%igen Sucroslösung (in Detergenzpuffer) überschichtet. 100 µl des Zelllysats wurden auf den Sucrosegradienten pipettiert und anschließend bei 200.000 x g und 4°C für 90 Minuten zentrifugiert. Von dem Gradienten wurden 11

Fraktionen à 200 µl von oben abgenommen. Die Proteine wurden mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (siehe 3.7.13), in 90 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel analysiert.

### 3.8.19 Luciferase-Reporter-Assay

Es wurden die folgenden Reporter-Konstrukte verwendet:

HSE-Luc: Expression des Luciferase-Reportergens unter Kontrolle eines HSF1-regulierbaren Elementes (*heat shock element*, HSE)

NF-κB-Luc: Expression des Luciferase-Reportergens unter Kontrolle von Bindeelementen für den Transkriptionsfaktor NF-κB

HEK293T- oder SH-SY5Y-Zellen wurden mit dem Luciferase-Reporter-Plasmid (0,5 µg HSE-Luc bzw. 0,1 µg NF-κB-Luc/3,5cm-Schale) und Wildtyp-Parkin oder den angegebenen Parkin-Mutanten (je 1 µg) co-transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion mit HSE-Luc wurden die Zellen für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock) und nach weiteren 16 Stunden bei 37°C geerntet. Die mit NF-κB-Luc transfizierten Zellen wurden mit PMA bzw. TNFα in den angegebenen Konzentrationen für drei Stunden bei 37°C inkubiert und nach weiteren 8-16 Stunden geerntet. Die Luciferase-Aktivität der Zelllysate wurde luminometrisch mit dem Dual-Luciferase Assay System entsprechend den Angaben des Herstellers Promega bestimmt.

### 3.8.20 Transienter *Knock-down* mittels RNA-Interferenz (siRNA)

Der *Knock-down* von endogenem Parkin wurde mit dem *Parkin Stealth<sup>TM</sup> siRNA duplex 1* (Invitrogen) durchgeführt. Als Kontrolle diente die *Negative control Stealth<sup>TM</sup> siRNA* (Invitrogen).

#### 3.8.20.1 Luciferase-Reporter-Assay in *Knock-down*-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von  $8 \times 10^5$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert und nach sechs Stunden mit 50 pM Parkin-spezifischer siRNA und

0,1 µg NF-κB-Luc transfiziert (siehe 3.5.4). 48 Stunden später wurden die Zellen für drei Stunden mit PMA (10 bzw. 20 ng/ml) inkubiert und nach weiteren 5 Stunden die Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt.

### **3.8.20.2 Nachweis von Zelltod in *Knock-down*-Zellen mit Trypan blau**

HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von  $8 \times 10^5$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert und mit 500 pM Parkin-spezifischer siRNA transfiziert (siehe 3.5.4). Nach 48 Stunden wurden die Zellen für drei Stunden mit 0,05 µM Rotenon inkubiert und nach weiteren 24 Stunden mit Trypan Blau gefärbt. Die Fraktion der toten Zellen wurde durch Zählen der blau angefärbten Zellen quantifiziert.

### **3.8.21 Nachweis der Ubiquitylierung**

#### **3.8.21.1 Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ oder TRAF2**

Je zwei 6 cm-Schalen HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp-Parkin oder Parkin-Mutanten (5,2 µg), HA-Ubiquitin (0,65 µg) und entweder FLAG-IKK $\gamma$  (4 µg), FLAG-TRAF2 (1,3 µg) oder FLAG-TRAF2 $\Delta$ N (1,3 µg) co-transfiziert (siehe 3.5.4). Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und die Zellpellets vereinigt. Das Pellet wurde in 300 µl denaturierendem Lysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 100°C gekocht. Anschließend wurden die Proteinextrakte 1:10 mit nicht-denaturierendem Lysepuffer verdünnt und mehrmals durch eine 26G Kanüle gezogen. Die Lysate wurden für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Überstände für eine Immunpräzipitation (siehe 3.7.7) mit dem Anti-FLAG-Antikörper verwendet.

#### **3.8.21.2 Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ mit Ubiquitin-Mutanten**

Je zwei 6 cm-Schalen HEK293T-Zellen wurden mit Parkin (5,2 µg), HA-Ubiquitin (0,65 µg), HA-K48only-Ubiquitin oder HA-K63only-Ubiquitin (2,5 µg) und FLAG-

IKK $\gamma$  (4  $\mu$ g) co-transfiziert (siehe 3.5.4). Anschließend wurde wie unter Punkt 3.8.21.1 beschrieben verfahren.

### 3.8.22 *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*

Der EMSA dient zum Nachweis des Aktivierungssatus von DNA-bindenden Proteinen, in diesem Fall der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und OCT1.

Zur Bindereaktion wurden 5  $\mu$ g (Zellkultur) bzw. 10  $\mu$ g (Fibroblasten) des nukleären Extrakts (siehe 3.5.6) und 0,15 ng  $^{32}$ P-markiertes NF- $\kappa$ B bzw. OCT1-Konsensus-Oligonukleotid in einem Endvolumen von 20  $\mu$ l EMSA-Mix für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Für einen *Supershift* wurde zusätzlich ein Antikörper für das Protein (NF- $\kappa$ B-Heterodimer: p50/p65) zugesetzt, hier Anti-p65. Die Auftrennung der Protein-Nukleinsäurekomplexe erfolgte mittel nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.7.3). Das Gel wurde anschließend getrocknet und die markierten Komplexe durch Exposition eines Röntgenfilms bei -80°C visualisiert.

### 3.8.23 *Real-Time quantitative PCR (RT-PCR)*

Die *Real-Time* quantitative PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus durchgeführt, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt.

Untransfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden für 3 Stunden mit 1  $\mu$ M Rotenon oder 50  $\mu$ M Kainat inkubiert und nach weiteren 5, 8, 12 und 24 Stunden geerntet. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA (siehe 3.4) wurde die cDNA mit Hilfe des iScript cDNA Synthese Kits nach Angaben des Herstellers Biorad synthetisiert. Es wurde 1  $\mu$ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die RT-PCR-Reaktion (20  $\mu$ l) setzte sich folgendermaßen zusammen: 2  $\mu$ l cDNA-Lösung, 2 x TaqMan Universal PCR Master Mix und TaqMan Gene Expression Assay (Parkin bzw.  $\beta$ -Actin). Es wurden jeweils Triplikate für jede RNA-Probe durchgeführt. Die RNA-Expression wurde in Bezug

auf das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin normalisiert und die relative Expression jedes Gens mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet.

Im Fall von Rattenneuronen wurde die RT-PCR-Reaktion mit 2 x Power SYBR Green PCR Master Mix und 1  $\mu$ M jedes Primerpaares (Parkin bzw.  $\beta$ -Actin) durchgeführt.

#### **3.9 Statistische Auswertung**

Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Alle Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

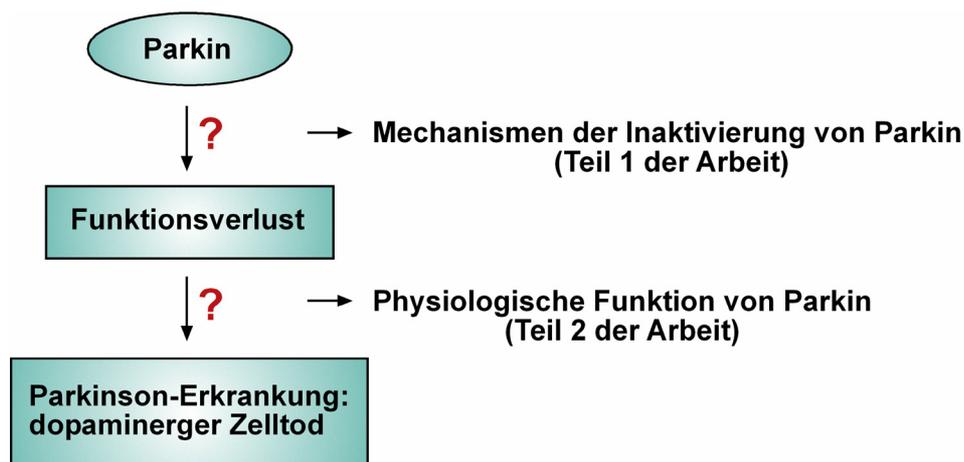
Zur Berechnung der Signifikanz wurde der T-Test angewendet. Die P-Werte sind wie folgend definiert: \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$  und \*\*\*  $P < 0.0001$ .

## 4. Ergebnisse

Mutationen im Parkin-Gen sind verantwortlich für eine autosomal rezessiv vererbte Form der Parkinson-Erkrankung (AR-PD) (Kitada, T. *et al.* 1998). Das Vorhandensein der C-terminalen RING (*really interesting new gene*)-Konformation legt nahe, dass Parkin eine E3-Ligase-Aktivität hat. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten tatsächlich diese Aktivität zeigen (Shimura, H. *et al.* 2000, Imai, 2000 #517; Zhang, Y. *et al.* 2000). Mittlerweile wurden einige putative Parkin-Substrate beschrieben. Über die physiologische Relevanz dieser Proteine als authentische Parkin-Substrate herrscht allerdings Unklarheit.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war lediglich bekannt, dass der Funktionsverlust von Parkin offensichtlich zum dopaminergen Zelltod und somit zur Parkinson-Erkrankung führen kann (Abb. 19). Die vorliegende Arbeit sollte zwei fundamentale Fragen der Parkin-Forschung adressieren:

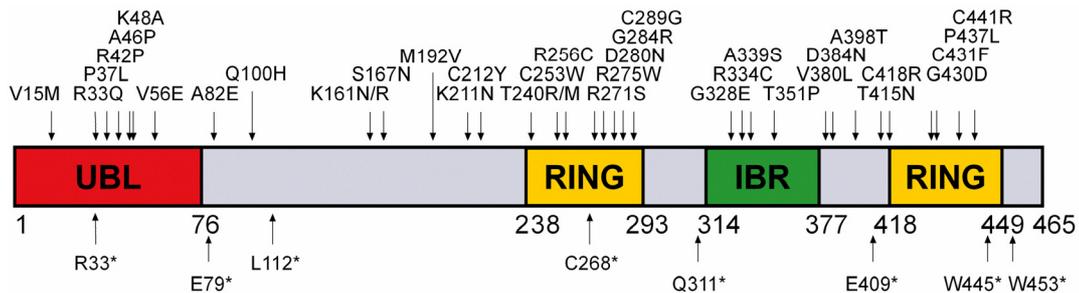
1. Welche Mechanismen sind für die Inaktivierung von Parkin verantwortlich?  
(Teil 1 der Arbeit)
2. Was ist die physiologische Funktion von Parkin?  
(Teil 2 der Arbeit)



**Abbildung 19.** Der Funktionsverlust von Parkin und die Parkinson-Erkrankung. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

## 4.1 Teil 1: Mechanismen der Inaktivierung von Parkin

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine große Anzahl (> 100) pathogener Parkin-Mutationen beschrieben, darunter Deletionen, Insertionen, *Missense*- und *Nonsense*-Mutationen (Abb. 20) sowie Multiplikationen. Die biochemischen Mechanismen der Inaktivierung von Parkin sind jedoch weitgehend unbekannt.



**Abbildung 20.** Darstellung pathogener *Missense*- und *Nonsense*-Mutationen von Parkin. UBL: Ubiquitin-like, RING: really interesting new gene, IBR: in-between RING.

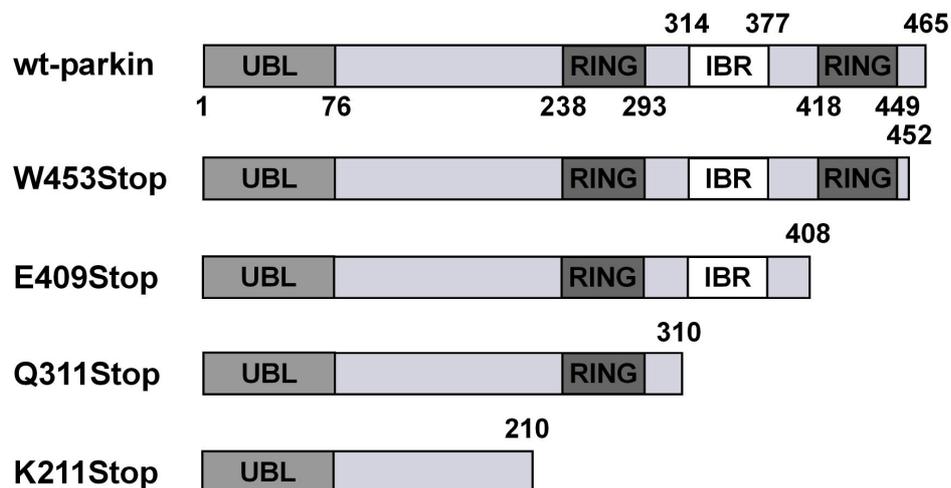
### 4.1.1 Inaktivierung von Parkin durch Missfaltung und Aggregation: Charakterisierung pathogener C-terminaler Deletionsmutanten

Eine frühere Studie unsere Arbeitsgruppe konnte erstmalig zeigen, dass Parkin durch Missfaltung und Aggregation inaktiviert werden kann. So liegt die pathogene Deletionsmutante W453Stop in einer konstitutiv missgefalteten Konformation vor und massiver Stress induziert die Aggregation von Wildtyp-Parkin (Winklhofer, K. F. *et al.* 2003).

Aufbauend auf diesen Daten wurden weitergehende zellbiologische Untersuchungen mit pathogenen C-terminalen Deletionsmutanten von Parkin durchgeführt.

#### 4.1.1.1 Löslichkeitsprofil der Parkin-Mutanten W453Stop, E409Stop und Q311Stop

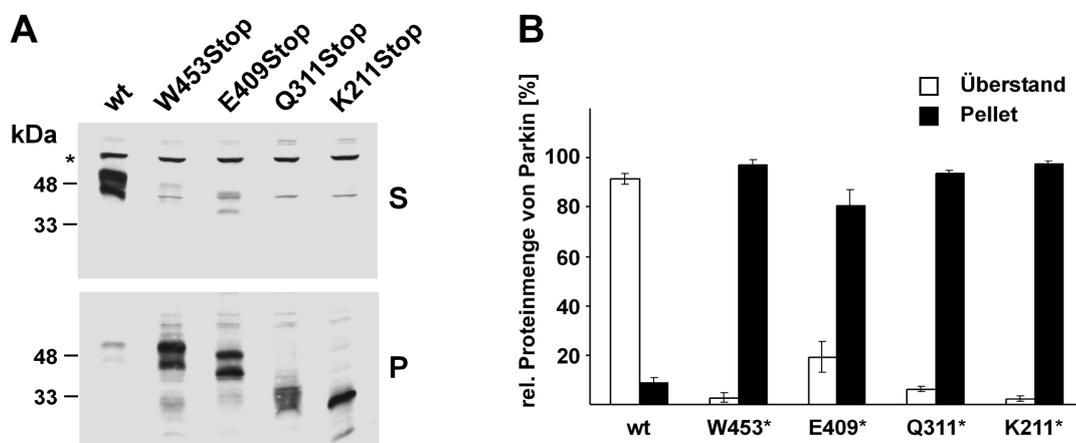
Um die pathogenen C-terminalen Deletionsmutanten in Zellkultur zu untersuchen, wurden die Konstrukte W453Stop (Winklhofer, K. F. *et al.* 2003), E409Stop und Q311Stop (Hattori, N. *et al.* 1998; West, A. *et al.* 2002), sowie ein N-terminales Fragment (K211Stop) von Parkin kloniert. Wie in Abb. 21 zu sehen, verfügt die Mutante W453Stop über eine intakte RING (*really interesting new gene*)-Box bestehend aus zwei RING-Domänen. Im Gegensatz dazu fehlt der Deletionsmutante E409Stop die zweite RING-Domäne. Bei Q311Stop ist zusätzlich die IBR (*in-between RING*)-Domäne und bei K211Stop die komplette RING-Box deletiert.



**Abbildung 21.** Schematische Darstellung der C-terminalen Deletionsmutanten von Parkin. Dargestellt sind die funktionellen Domänen und die entsprechenden Aminosäurepositionen von Wildtyp-Parkin und Parkin-Mutanten. UBL: *Ubiquitin-like*, RING: *really interesting new gene*, IBR: *in-between RING*.

Eine vergleichende Analyse mit Wildtyp-Parkin und W453Stop sollte zunächst klären, ob C-terminale Deletionen die Biogenese und Faltung von Parkin beeinflussen. Hierfür wurden alle Mutanten auf ihre Detergenz-Löslichkeit untersucht. Zum Erstellen des Löslichkeitsprofils wurden N2a-Zellen transient mit Wildtyp-Parkin bzw. den Deletionsmutanten transfiziert. Nach der Lyse in 0,1% Triton X-100 wurden die Lysate mittels Zentrifugation in eine Detergenz-lösliche (S) und -unlösliche (P) Fraktion aufgeteilt. Die Proteine wurden mittels Western Blot

unter Verwendung des polyklonalen Anti-Parkin Antikörpers hP1 analysiert. Wildtyp-Parkin (wt) war in Triton X-100 löslich und daher nahezu ausschließlich in der löslichen (S) Fraktion zu finden. Im Gegensatz dazu waren alle C-terminalen Deletionsmutanten in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion detektierbar (Abb. 22 A). Die quantitative Analyse ergab, dass Wildtyp-Parkin (wt) zu 90% in einer Detergenz-löslichen Konformation vorliegt, wohingegen sich über 80% der C-terminalen Deletionmutanten in der Pellet-Fraktion befinden (Abb. 22 B). Das N-terminale Fragment von Parkin K211Stop lag nahezu ausschließlich (98,4%) in einer Detergenz-unlöslichen Konformation vor (Abb. 22).

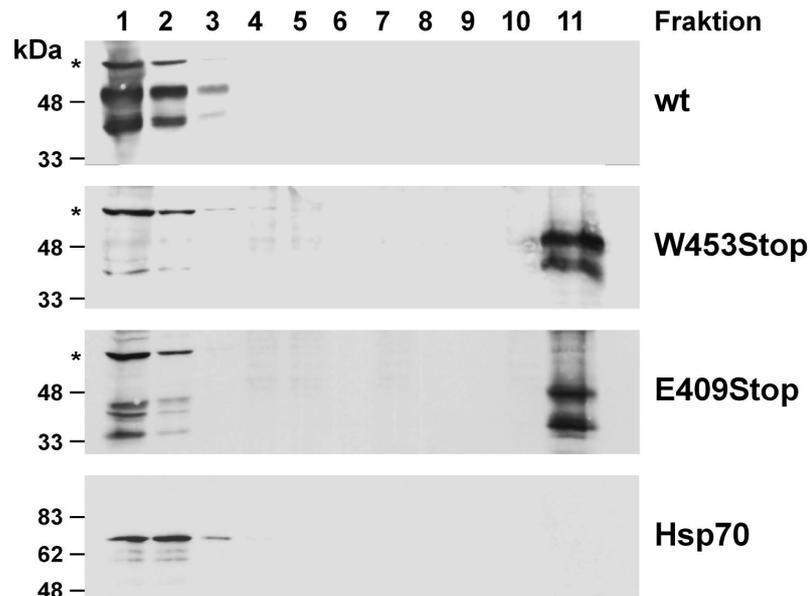


**Abbildung 22. C-terminale Deletionsmutanten liegen in einer Detergenz-unlöslichen Konformation vor.** (A) N2a-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin (wt) oder den Deletions-Mutanten transfiziert und 48 Stunden später in 0,1% TritonX-100 lysiert. Nach der Zentrifugation wurde die Detergenz-lösliche (S) und die Detergenz-unlösliche (P) Fraktion mittels Western Blot unter Verwendung des polyklonalen Anti-Parkin Antikörpers hP1 analysiert. (B) Quantitative Analyse der Proteinmengen von wt und der C-terminalen Deletionsmutanten in der Detergenz-löslichen (Überstand) und der Detergenz-unlöslichen (Pellet) Fraktion. Die Gesamtproteinmenge von Parkin (Überstand + Pellet) wurde als 100 % festgesetzt. Das Sternchen markiert eine unspezifische Bande.

#### 4.1.1.2 Sedimentationsverhalten der Mutanten W453Stop und E409Stop

Um weitere experimentelle Evidenz zu liefern, dass eine Detergenz-Unlöslichkeit eine Änderung der Protein-Konformation widerspiegelt, wurde das Sedimentationsverhalten der Mutanten in einem Sucrose-Stufengradienten untersucht. Hierfür wurden die Deletionsmutanten W453Stop und E409Stop ebenso wie Wildtyp-Parkin in N2a-Zellen exprimiert und die Zelllysate in einem

30-40%igem Sucrose-Stufengradienten mittels Ultrazentrifugation analysiert. Aus der Western Blot-Analyse der Fraktionen ging deutlich hervor, dass Wildtyp-Parkin (wt) ausschließlich in den oberen Fraktionen des Gradienten zu finden ist und mit dem zytosolischen Protein Hsp70 co-lokalisiert. Im Gegensatz dazu waren die beiden pathogenen Mutanten W453Stop und E409Stop nahezu vollständig in der untersten Fraktion lokalisiert (Abb. 23).



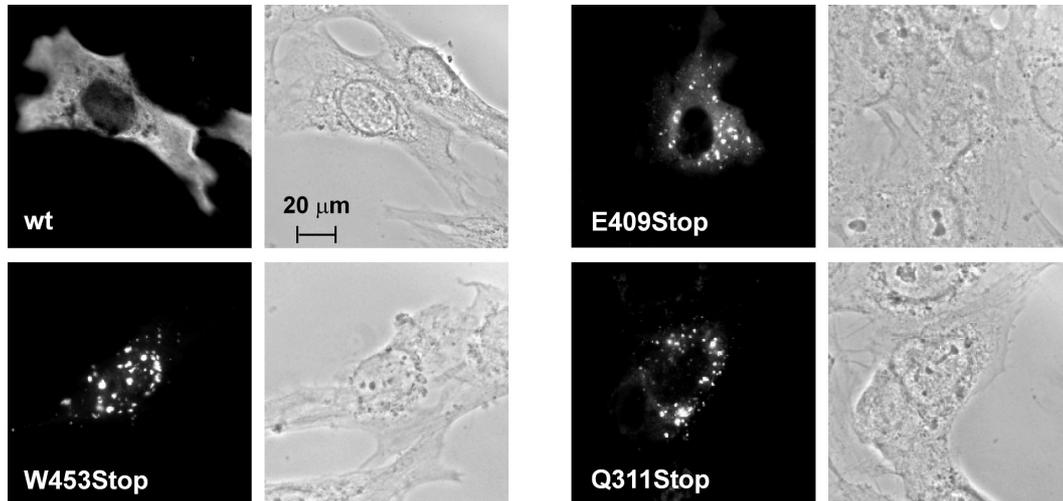
**Abbildung 23. Wildtyp-Parkin und die C-terminalen Deletionsmutanten W453Stop und E409Stop zeigen unterschiedliches Sedimentationsverhalten.** N2a-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin (wt), W453Stop oder E409Stop transfiziert und in 0,1% TritonX-100 lysiert. Das gesamte Zellysate wurde in einem 30-40%igen Sucrose-Stufengradienten mittels Ultrazentrifugation analysiert. Es wurden 11 Fraktionen von oben abgenommen, die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt und mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörper  $\alpha$ -hP1 und  $\alpha$ -Hsp70 (N27) analysiert. Die Sternchen markieren eine unspezifische Bande.

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass C-terminale Deletionen eine Missfaltung von Parkin und die Ausbildung von Protein-Aggregaten induzieren.

#### 4.1.1.3 Zelluläre Lokalisierung von W453Stop, E409Stop und Q311Stop

Nach der biochemischen Charakterisierung wurde die zelluläre Lokalisierung der C-terminalen Deletionsmutanten in der intakten Zelle analysiert. Dazu wurde nach der Transfektion eine indirekte Immunfluoreszenz in permeabilisierten humanen

Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) vorgenommen und Parkin mit dem Antikörper  $\alpha$ -hP1 visualisiert. Wildtyp-Parkin (wt) zeigte eine relativ homogene Verteilung über das gesamte Zytosol. Dagegen lagen alle C-terminalen Deletionsmutanten in Form von zytosolischen Aggregaten vor (Abb.24).



**Abbildung 24. C-terminale Deletionen führen zur Bildung von Parkin-Aggregaten im Zytosol.** SH-SY5Y-Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und mit Wildtyp-Parkin (wt), W453Stop, E409Stop oder Q311Stop transfiziert. Die Lokalisierung von Parkin wurde durch indirekte Immunfluoreszenz in permeabilisierten Zellen unter Verwendung des polyklonalen Anti-Parkin Antikörpers hP1 visualisiert.

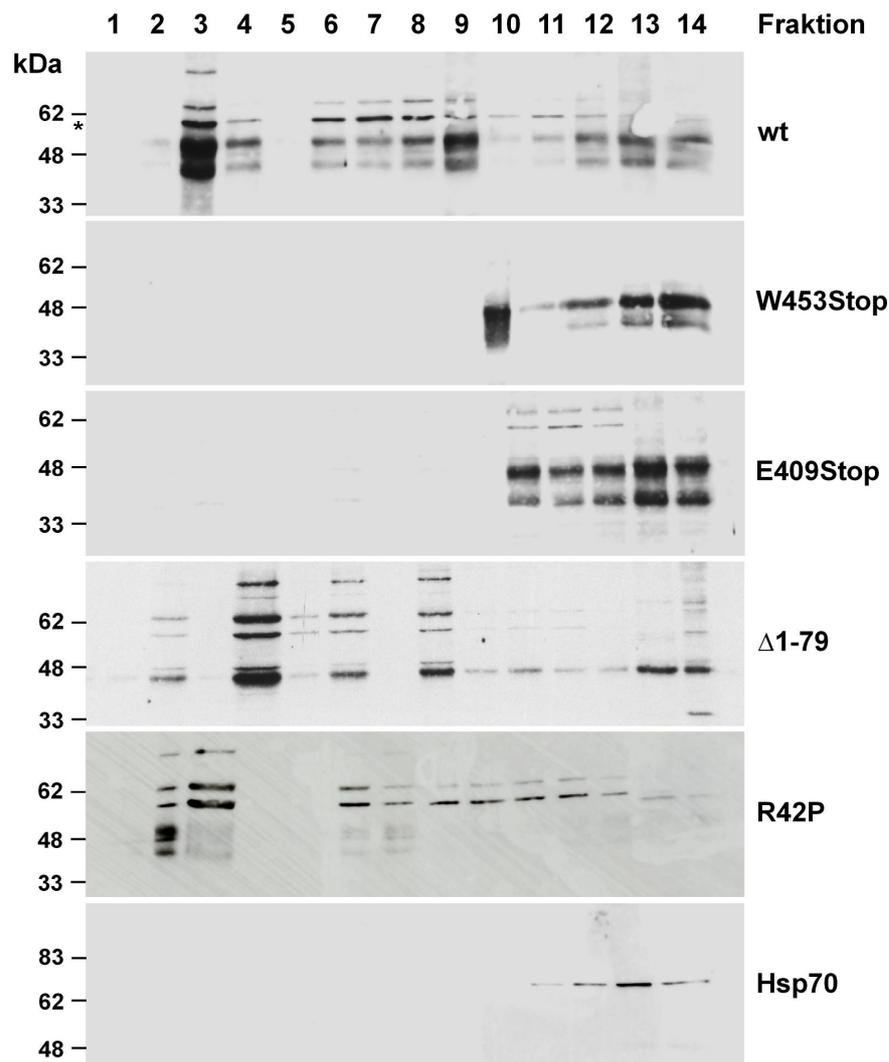
Aus den biochemischen Untersuchungen sowie der Immunfluoreszenz-Analyse ging hervor, dass die pathogenen C-terminalen Deletionsmutationen W453Stop, E409Stop und Q311Stop zu einer Missfaltung und Aggregation von Parkin führen.

#### 4.1.1.4 Einfluss der Mutationen W453Stop, E409Stop und Q311Stop auf die Assoziation von Parkin mit Zellmembranen

In früheren Studien konnte eine Assoziation von Parkin mit zellulären Membranen beobachtet werden. So zeigten Fallon *et al.*, dass Parkin mit dem Gerüstprotein CASK an postsynaptischen Membranen co-lokalisiert (Fallon, L. *et al.* 2002). Kubo *et al.* beschrieben eine Co-Fraktionierung von Parkin mit dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und synaptischen Vesikeln (Kubo, S. I. *et al.* 2001).

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde nun untersucht, ob die C-terminalen Deletionsmutanten in ihrer Fähigkeit, mit zellulären Membranen zu assoziieren, beeinträchtigt sind. Hierfür wurden die Parkin-Konstrukte transient in N2a-Zellen exprimiert und in einem Renografin-Dichtegradienten aufgetrennt (siehe 3.8.18.1). Dabei schwimmen die Membranvesikel je nach ihrer Dichte in dem Gradienten auf (Heller, U. *et al.* 2003; Heske, J. *et al.* 2004; Schandel, K. A. und D. D. Jenness 1994; Wang, Q. und A. Chang 1999). Zytosolische Proteine verbleiben im unteren Bereich des Gradienten. Um die für das Zytosol spezifischen Fraktionen zu bestimmen, wurden Kontroll-Zellen (Vektor-transfiziert) nach dem Gradientenlauf mit Hilfe des Antikörpers  $\alpha$ -Hsp70 analysiert. Das zytosolische Protein Hsp70 war in den unteren vier Fraktionen detektierbar (Abb. 25, Hsp70, 11-14). Über 50% von Wildtyp-Parkin (wt) wurde in einer für Membranen spezifischen frühen Fraktion detektiert (Abb. 25, wt, Fraktion 3). Die beiden C-terminalen Deletionsmutanten W453Stop und E409Stop hingegen waren ausschließlich in den für das Zytosol spezifischen späteren Membranfraktionen zu finden (Abb. 25, W453Stop, E409Stop, Fraktion 10-14). Interessanterweise hatten weder die Deletion der N-terminalen *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne noch die pathogene Punktmutation R42P innerhalb der UBL einen Einfluss auf die Membranassoziation von Parkin (Abb. 25,  $\Delta$ 1-79, R42P, Fraktion 2-4).

Diese Experimente verdeutlichten, dass Deletionen des C-Terminus von Parkin eine Assoziation mit zellulären Membranen verhindern.

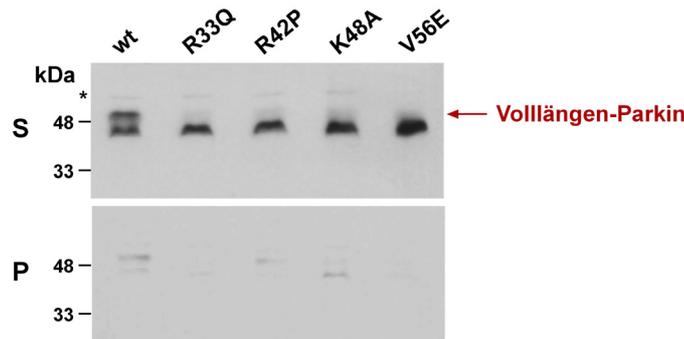


**Abbildung 25. C-terminale Deletionen verhindern die Assoziation von Parkin mit Membranen.** N2a-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin (wt) und den angegebenen Parkin-Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden in TE resuspendiert und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Zelllysate wurden in einem 22-34%igen Renografin-Stufengradienten analysiert. Nach der Ultrazentrifugation wurden 14 Fraktionen von oben abgenommen und Parkin und Hsp70 mittels Immunblot detektiert. Das Sternchen markiert eine unspezifische Bande.

#### 4.1.2 Inaktivierung von Parkin durch Destabilisierung und proteasomalen Abbau: Charakterisierung pathogener N-terminaler Punktmutationen

Punktmutationen lassen sich gehäuft in der C-terminalen RING-Box von Parkin beobachten, interessanterweise aber finden sich Mutationen über das gesamte Protein verteilt. Neuere Studien konnten auch vermehrt Mutationen in der N-terminalen UBL-Domäne identifizieren (vgl. Abb. 20). Die biochemischen Mechanismen der





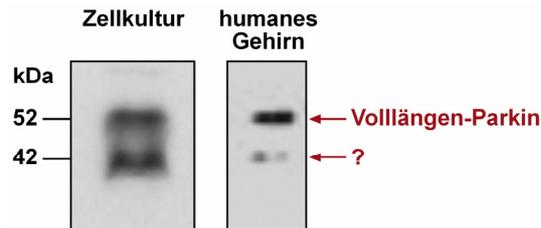
**Abbildung 27. N-terminale Punktmutationen in der UBL destabilisieren Vollängen-Parkin.** N2a-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin (wt) oder den Parkin-Mutanten transfiziert und 48 Stunden später in 0,1% TritonX-100 lysiert. Nach der Zentrifugation wurde die Detergenz-lösliche (S) und die Detergenz-unlösliche (P) Fraktion mittels Western Blot unter Verwendung des polyklonalen Anti-Parkin Antikörpers hP1 analysiert. Das Sternchen markiert eine unspezifische Bande.

Wie in den vorausgegangenen Experimenten bereits beobachtet, wurden bei Parkin zwei distinkte Banden im Western Blot detektiert: eine größere Bande, die der Größe von Vollängen-Parkin entspricht (52 kDa), und eine kleinere Bande (ca. 42 kDa) (vgl. Abb. 27, wt). In diesem Experiment fiel auf, dass im Gegensatz zu Wildtyp-Parkin (wt) der Anteil an Vollängen-Parkin (obere Bande) bei den N-terminalen Mutanten signifikant verringert ist (Abb. 27).

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Punktmutationen innerhalb der UBL die Faltung und zelluläre Lokalisierung von Parkin nicht beeinflussen. Da aber unter *steady state*-Bedingungen Vollängen-Parkin kaum detektierbar war, wurden weitere Untersuchungen zur Stabilität des Vollängen-Proteins durchgeführt.

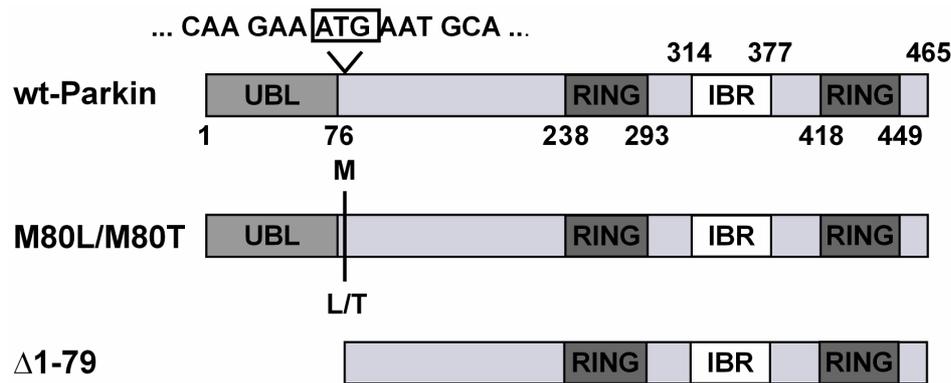
#### 4.1.2.2 Biogenese einer N-terminal verkürzten Parkin-Spezies *in vivo*

Nach transienter Transfektion von kultivierten Zellen mit humanem Wildtyp-Parkin wird neben Vollängen-Parkin eine kleinere Parkin-Spezies exprimiert. Interessanterweise ist diese kleinere Parkin-Spezies auch in humanem Gehirn zu finden (Schlossmacher, M. G. *et al.* 2002; Shimura, H. *et al.* 1999; Staropoli, J. F. *et al.* 2003) (vgl. Abb. 28). Die Existenz dieser Parkin-Spezies ist folglich kein Artefakt der Überexpression in Zellkultur.



**Abbildung 28. Expression einer N-terminal verkürzten Parkin-Spezies.** Links: Expression von Wildtyp-Parkin in humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y). Analyse mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers  $\alpha$ -hP1. Rechts: Proteinlysate aus humanem Gehirnmateriale, Abbildung aus (Schlossmacher, M. G. *et al.* 2002).

Nachfolgend sollte nun die Frage geklärt werden, wie es zur Generierung der kleineren Parkin-Spezies kommt. Unterschiedliche Mechanismen können die Generierung der kleineren Parkin-Spezies erklären. So besteht die Möglichkeit einer proteolytischen Spaltung von Vollängen-Parkin oder aber die Expression als kleineres Protein, z.B. als Splice-Variante. Wir beobachteten, dass die kleinere Spezies nur nach Expression von humanem Parkin, nicht aber nach Expression von murinem Parkin auftritt. Daher verglichen wir die beiden Parkin-Sequenzen und stellten fest, dass sich an Aminosäureposition 80 der humanen Parkin-Sequenz ein ATG-Codon befindet, welches als internes Translationssignal fungieren könnte. Um diese Möglichkeit experimentell zu testen, wurden die beiden Punktmutanten M80L und M80T hergestellt, bei welchen die Aminosäure Methionin an Position 80 der humanen Parkin-Sequenz gegen Leucin oder Threonin ausgetauscht wurde. Der Aminosäureaustausch gegen Threonin entspricht der Maus- bzw. Rattensequenz von Parkin. Um selektiv N-terminal verkürztes Parkin zu exprimieren, wurde zusätzlich die Deletionsmutante  $\Delta$ 1-79 hergestellt, der die ersten 79 Aminosäuren fehlen. Als Startcodon dient hier das Methionin an Position 80 (Abb. 29).

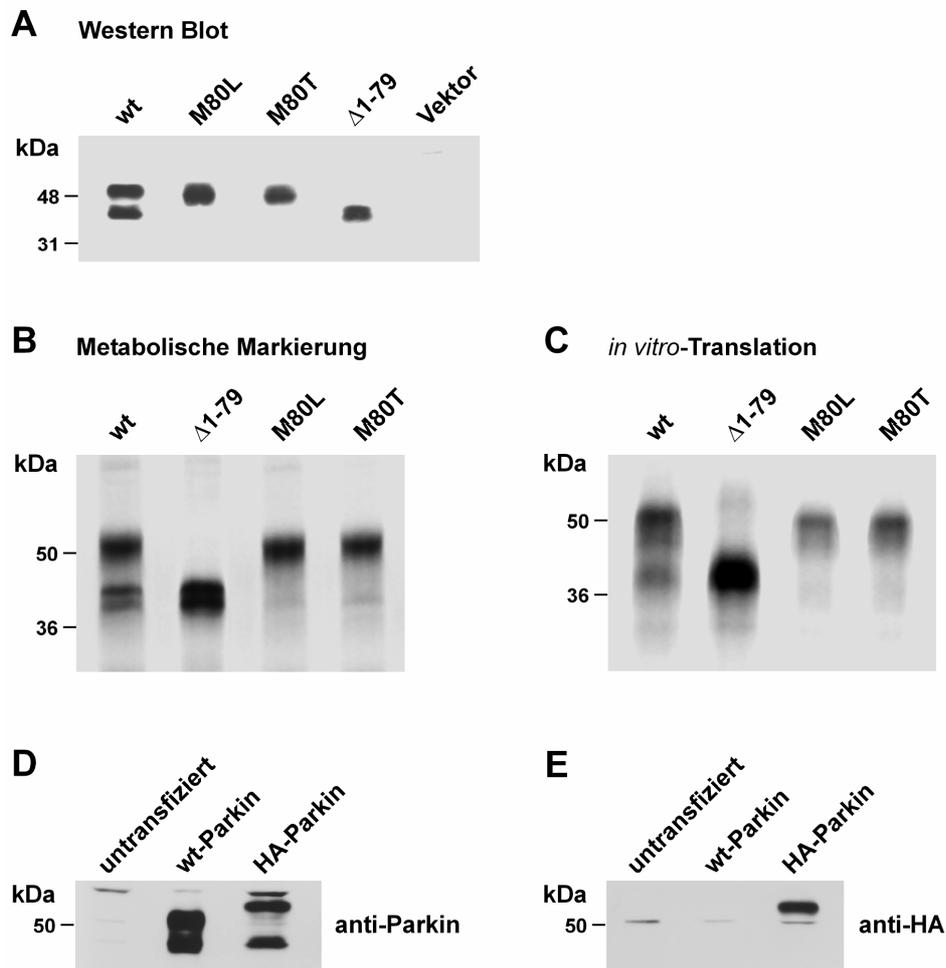


**Abbildung 29.** Schematische Darstellung der Parkin-Punktmutanten M80L und M80T sowie der Parkin Deletionsmutante  $\Delta 1-79$ . Bei Wildtyp (wt)-Parkin ist der Teil der Nukleotidsequenz zu sehen, welche an Position 80 ein ATG-Codon enthält.

Die Konstrukte wurden in N2a-Zellen exprimiert und mittels Western Blot analysiert. Die Proteinanalytik ergab, dass bei der Expression von M80L und M80T lediglich eine Parkin-Spezies detektierbar ist. Diese entsprach in ihrem Molekulargewicht dem Volllängen-Parkin (obere Bande, wt). Darüber hinaus zeigte die N-terminal verkürzte Parkin-Mutante  $\Delta 1-79$  das gleiche Molekulargewicht wie die kleinere Parkin-Spezies (Abb. 30 A). Um die Ergebnisse der *steady-state*-Analyse zu bestätigen, wurden N2a-Zellen transient transfiziert, metabolisch mit [ $^{35}$ S]-Methionin markiert und Parkin mittels Immunpräzipitation analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation des internen Startcodons an Position 80 die Generierung der 42-kDa Parkin-Spezies verhindert. Die  $\Delta 1-79$  Mutante migrierte auf selber Höhe wie die kleinere Parkin-Spezies (Abb. 30 B). Eine zusätzlich durchgeführte *in vitro*-Translation der Parkin-Mutanten in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat lieferte exakt die gleichen Resultate (Abb. 30 C). Interessanterweise konnte nach metabolischer Markierung von Wildtyp-Parkin (wt) und  $\Delta 1-79$  eine zusätzliche Parkin-Spezies von 38 kDa detektiert werden (Abb. 30 B). Es ist anzunehmen, dass diese Parkin-Spezies durch proteolytische Modifikation generiert wurde.

Um spezifisch Parkin mit intaktem N-Terminus detektieren zu können, wurde Parkin mit N-terminalem HA-Tag generiert. Nach transienter Transfektion von HA-Parkin wurden die Proteine mittels Immunoblot analysiert. Hierbei zeigte sich, dass der Antikörper  $\alpha$ -HA ausschließlich Volllängen-Parkin erkennt (Abb. 30 E); der Anti-Parkin Antikörper hP1 hingegen erkennt Volllängen-Parkin ebenso wie die 42-

kDa Spezies (Abb. 30 D). Diese Ergebnisse lieferten einen zusätzlichen Beweis dafür, dass die kleinere Parkin-Spezies N-terminal deletiert ist.



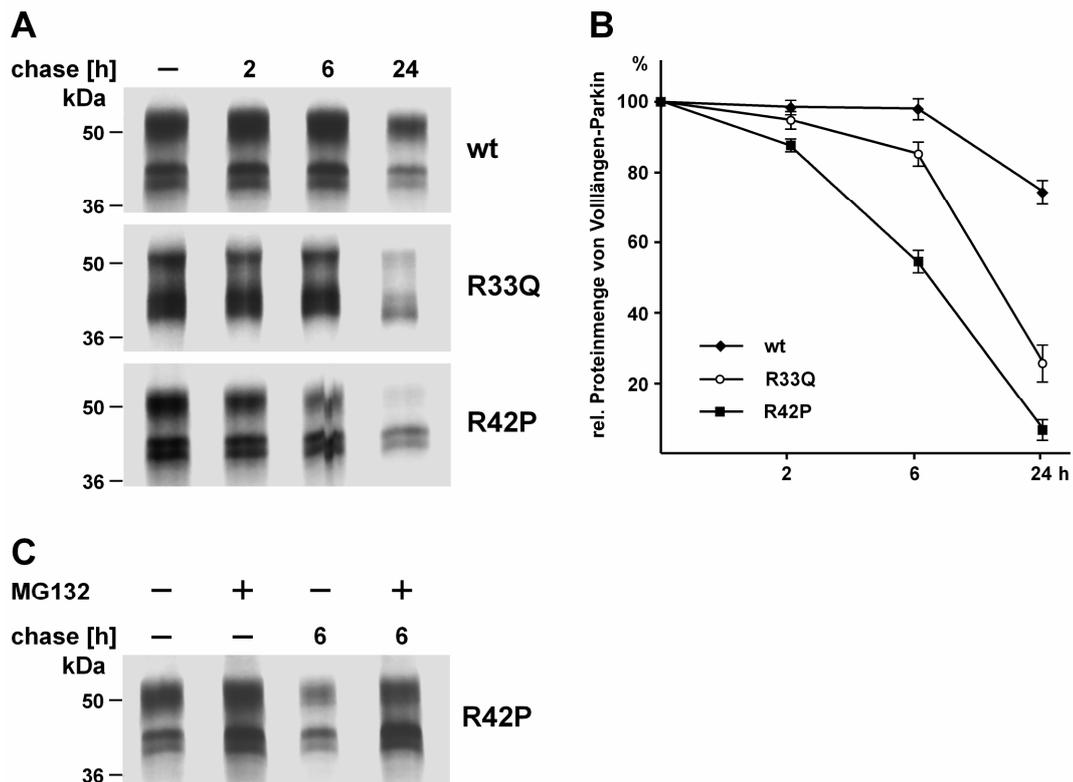
**Abbildung 30. Eine N-terminal verkürzte Parkin-Spezies wird über ein internes Startcodon generiert.** (A, B, C) Eine Mutation des Startcodons an Position 80 von Parkin verhindert die Generierung der kleinen 42-kDa Parkin-Spezies. (A) N2a-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin (wt) oder den angegebenen Parkin-Mutanten transfiziert. 48 Stunden später wurden die Zellen in 0,1% Triton X-100 lysiert, durch Zentrifugation fraktioniert, und Parkin wurde mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers  $\alpha$ -hP1 analysiert. (B) N2a-Zellen wurden transient mit wt oder den angegebenen Parkin-Mutanten transfiziert und für 30 Minuten mit [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markiert. Parkin wurde mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des Anti-Parkin Antikörpers hP1 analysiert. (C) Die angegebenen Parkin-Konstrukte wurden *in vitro* translatiert. Radioaktive Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (D, E) Expressionsanalyse von Parkin mit N-terminalem HA-Tag. Wt-Parkin und HA-Parkin wurden transient in N2a-Zellen exprimiert und mittels Western Blot wie unter (A) beschrieben analysiert. Es wurde entweder der Antikörper  $\alpha$ -hP1 (D) oder  $\alpha$ -HA (E) verwendet.

#### 4.1.2.3 Untersuchungen zur Stabilität der Parkin-Mutanten R33Q und R42P

Wie unter Kapitel 4.1.2.1 beschrieben, beeinflussen pathogene Punktmutationen in der UBL weder Faltung noch zelluläre Lokalisierung von Parkin. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Volllängen-Spezies von Parkin in den Western Blot-Analysen kaum detektierbar ist.

Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde eine metabolische Markierung mit anschließender Immunpräzipitation der Parkin-Mutanten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Volllängen-Spezies der N-terminalen Parkin-Mutanten deutlich weniger stabil ist als Wildtyp-Parkin. Nach einer 24-stündigen *chase*-Periode war die Volllängen-Spezies der Mutanten kaum detektierbar (Abb. 31 A, obere Bande). Die quantitative Analyse bestätigte diese Beobachtungen: nach 24 Stunden war mehr als 70% von Wildtyp (wt)-Volllängen-Parkin aber weniger als 10% der Volllängen-Spezies von R42P detektierbar (Abb 31 B). Dagegen wurde die Stabilität der kleineren Parkin-Spezies nicht beeinflusst, da diese die UBL-Mutationen nicht enthält (Quantifizierung nicht gezeigt). Die Ergebnisse haben klar erkennen lassen, dass Punktmutationen in der UBL die Stabilität des mutierten Proteins signifikant verringern.

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die N-terminalen Parkin-Mutanten proteasomal abgebaut werden. Proteine, die über diesen Degradierungsweg eliminiert werden können, akkumulieren nach einer Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG132, was durch Zunahme der Intensität der Proteinbande auf dem SDS-Gel angezeigt wird. Um dies zu untersuchen, wurde eine metabolische Markierung transfizierter N2a-Zellen in Gegenwart des proteasomalen Inhibitors MG132 durchgeführt. Wie an der Zunahme der Intensität der Proteinbanden von R42P zu erkennen ist, wurde diese Mutante in Gegenwart von MG132 stabilisiert (Abb. 31 C, + MG132, *chase*).

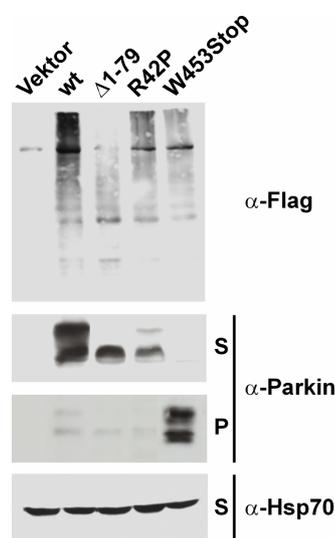


**Abbildung 31. Pathogene Punktmutationen in der UBL destabilisieren Parkin und führen zu dessen proteasomaler Degradierung.** (A) N2a-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin (wt) oder den angegebenen Parkin-Mutanten transfiziert und 30 Minuten mit [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Zellen wurden entweder direkt geerntet (*chase*-) oder für weitere 2, 6 oder 24 Stunden in frischem Medium inkubiert. Nach der Lyse in IP-Lysepuffer wurde Detergenz-lösliches Parkin mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des Antikörpers  $\alpha$ -hP1 analysiert. (B) Quantitative Analyse von (A). Die relative Proteinmenge von Parkin in der Detergenz-löslichen Fraktion wurde als 100% festgesetzt. Zu sehen sind die verbleibenden Proteinmengen der Vollängen-Spezies von Wildtyp-Parkin (wt) und der Parkin-Mutanten nach 2, 6 und 24 Stunden *chase*. (C) N2a-Zellen wurden transient mit R42P transfiziert, 30 Minuten mit [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markiert und weitere 6 Stunden mit (MG132 +) und ohne (MG132 -) den proteasomalen Inhibitor MG132 inkubiert. Parkin wurde wie unter (A) beschrieben mittels Immunpräzipitation analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass N-terminale Mutationen in der UBL von Parkin die Stabilität des Proteins signifikant reduzieren. Die mutierten Proteine werden rasch über das Proteasom abgebaut. Folglich ist weniger funktionelles Parkin in der Zelle vorhanden.

#### 4.1.2.4 Einfluss der pathogenen Mutationen auf die E3-Ligase-Aktivität von Parkin

Schließlich sollte der Einfluss der pathogenen Mutationen auf die Aktivität von Parkin als E3-Ubiquitin-Ligase im Ubiquitylierungs-Assay untersucht werden. Aufgrund der bestehenden Unklarheit über authentische Parkin-Substrate wurde bei den durchgeführten Experimenten die Ubiquitylierung des gesamten zellulären Proteinlysats analysiert. Hierfür wurden N2a-Zellen mit FLAG-Ubiquitin und Wildtyp-Parkin (wt) oder Parkin-Mutanten co-transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 inkubiert und in Detergenzpuffer (0,1% Triton X-100, NEM) lysiert. Die ubiquitylierten Proteine wurden mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers  $\alpha$ -FLAG analysiert. Wie in Abbildung 32 zu sehen, befanden sich bei Expression der pathogenen Mutanten R42P und W453Stop deutlich weniger ubiquitylierte Proteine im Zelllysate als bei Wildtyp-Parkin. Dies deutete auf eine reduzierte E3-Ligase-Aktivität der Parkin-Mutanten hin. Interessanterweise beeinträchtigte auch eine Deletion der UBL-Domäne die E3-Ligase-Aktivität von Parkin signifikant.



**Abbildung 32. Pathogene Mutationen beeinflussen die E3 Ligase-Aktivität von Parkin.** N2a-Zellen wurden transient mit FLAG-Ubiquitin und Wildtyp-Parkin (wt) oder den angegebenen Parkin-Mutanten co-transfiziert. Die Zellen wurden 6 Stunden mit MG132 inkubiert, anschließend geerntet und in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Aliquot diente zur Analyse von ubiquitylierten Proteinen mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers  $\alpha$ -FLAG. Das andere Aliquot wurde durch Zentrifugation in eine Detergenz-lösliche (S) und -unlösliche (P) Fraktion aufgetrennt. In diesen Fraktion wurde die Expression von Parkin und der Parkin-Mutanten mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers  $\alpha$ -hP1 untersucht. Als Ladekontrolle wurde Hsp70 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers  $\alpha$ -Hsp70 (N27) detektiert.

### 4.1.3 Zusammenfassung Teil 1: Mechanismen der Inaktivierung von Parkin

Mutationen im Parkin-Gen und ein daraus resultierender Verlust von funktionellem Parkin stellen die molekulare Grundlage einer autosomal rezessiv vererbaren Form der Parkinson-Erkrankung dar. Die biochemischen Mechanismen der Inaktivierung von Parkin sind jedoch unklar. Um neue Einblicke in die Mechanismen zu gewinnen, die zum Funktionsverlust von Parkin führen, wurden in der vorliegenden Arbeit pathogene C- und N-terminale Parkin-Mutationen analysiert.

In der Studie konnten verschiedene Mechanismen der Parkin-Inaktivierung aufgeklärt werden:

- Deletionen von C-terminalen Aminosäuren führen zur Missfaltung und Aggregation von Parkin
- N-terminale Punktmutationen in der *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne verringern die Stabilität von Parkin

In der zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Analyse der pathogenen C-terminalen Deletionsmutanten W453Stop, E409Stop und Q311Stop konnte gezeigt werden, dass der Verlust von C-terminalen Aminosäuren mit der nativen Faltung von Parkin interferiert. Die Deletionsmutanten lagen in Form von zytosolischen Aggregaten vor. Außerdem konnte gezeigt werden, dass C-terminale Deletionen die Assoziation von Parkin mit Membranen verhindern. In der nachfolgenden Untersuchung pathogener Punktmutationen in der N-terminalen UBL-Domäne von Parkin konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass diese die Stabilität von Parkin signifikant verringern. Die Mutanten wurden rasch über das Proteasom abgebaut. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass verschiedene pathogene Mutationen die E3- Ligase-Aktivität von Parkin durch Missfaltung oder Destabilisierung beeinträchtigen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass *in vivo* zusätzlich zu Vollängen-Parkin eine kleinere Parkin-Spezies gebildet wird aufgrund der Präsenz eines internen Initiationscodons an Position 80. Diese kleinere Parkin-Spezies tritt nur bei der Expression von humanem Parkin auf und ist gekennzeichnet durch das Fehlen der N-terminalen UBL-Domäne.

## 4.2 Teil 2: Physiologische Funktion von Parkin

Während über authentische Parkin-Substrate noch weitgehend Unklarheit herrscht, wurde im Laufe dieser Arbeit beobachtet, dass Parkin Zellen vor Stress-induziertem Zelltod schützen kann. Um Einblicke in den Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung zu gewinnen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine mögliche Rolle von Parkin in protektiven Signaltransduktionswegen näher untersucht.

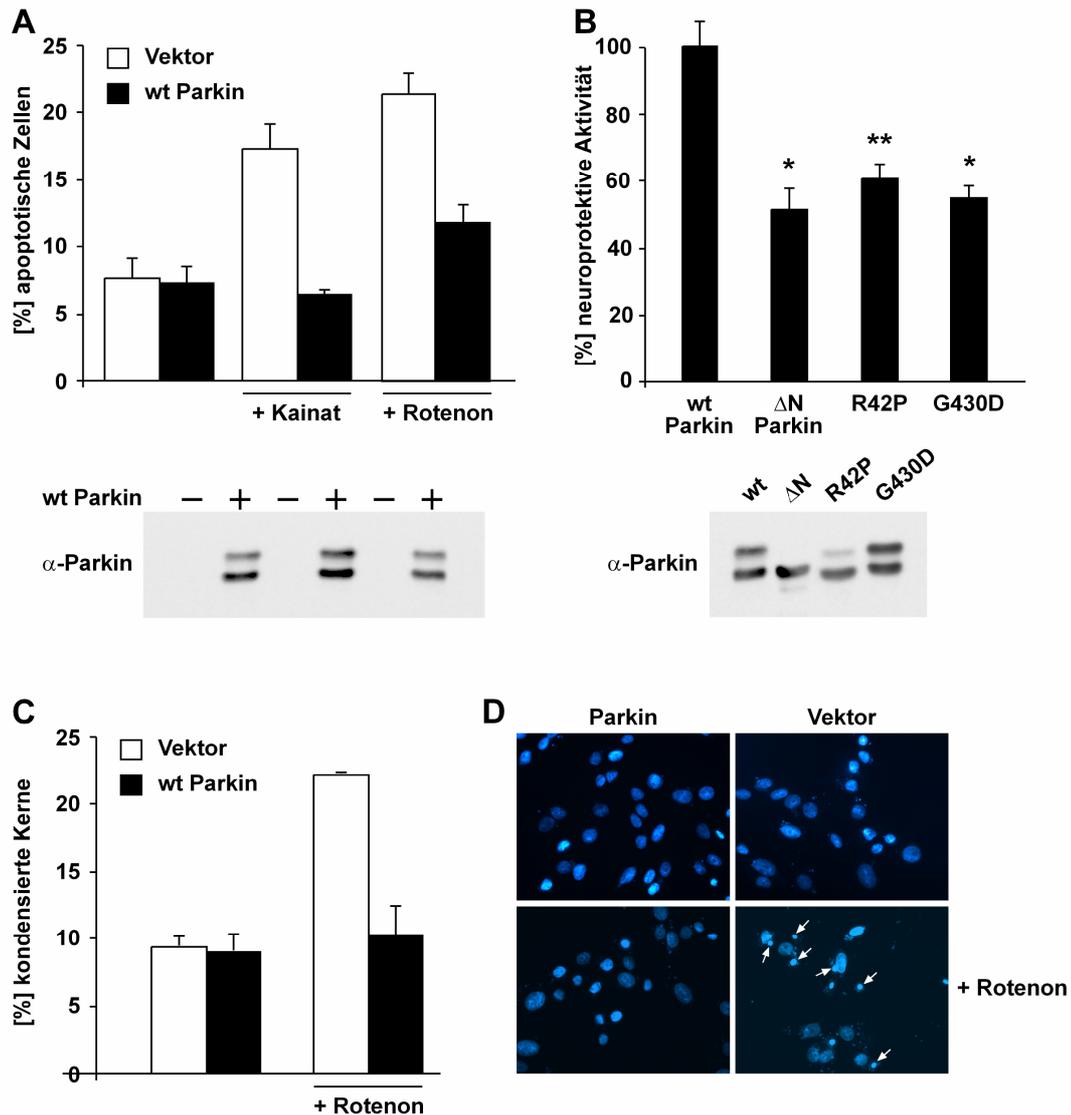
### 4.2.1 Neuroprotektives Potential von Parkin

Um eine mögliche Rolle von Parkin beim Stress-induzierten Zelltod zu untersuchen, wurde der Effekt einer Parkin-Überexpression in verschiedenen Stress-Modellen analysiert. Es wurden insbesondere solche Stressoren gewählt, die in dopaminergen Neuronen auftreten und bei der Parkinson-Erkrankung eine pathophysiologische Rolle spielen, nämlich Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (induziert durch Rotenon) sowie Exzitotoxizität, also eine Überstimulation von Glutamat-Rezeptoren (induziert durch Kainat).

Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) wurden transient mit Wildtyp (wt)-Parkin transfiziert und 24 Stunden später für 3 Stunden mit Kainat (500  $\mu$ M) oder Rotenon (10  $\mu$ M) inkubiert. Da Parkin durch massiven Stress infolge von Missfaltung inaktiviert wird (LaVoie, M. J. *et al.* 2005; Winklhofer, K. F. *et al.* 2003; Yao, D. *et al.* 2004), wurden hier moderate Stressbedingungen gewählt. Apoptotische Zellen wurden anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen aktivierte Caspase-3 analysiert und quantifiziert. In den Stress-behandelten Zellen konnte ein protektiver Effekt von Parkin beobachtet werden. In Gegenwart von Wildtyp-Parkin ging der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen zurück von 17% auf 7% (Kainat-Behandlung) bzw. von 21% auf 12% (Rotenon-Behandlung) (Abb. 33 A). Die pathogenen Mutanten R42P und G430D hingegen zeigten nach Behandlung mit Kainat ein um ca. 50% reduziertes neuroprotektives Potential im Vergleich zu Wildtyp-Parkin (Abb. 33 B). Interessanterweise war auch die kleinere Parkin-Spezies (vgl. 4.1.2.2) in ihrer neuroprotektiven Kapazität deutlich beeinträchtigt (Abb. 33 B,  $\Delta$ N Parkin =  $\Delta$ 1-79).

Zur Expressionkontrolle wurden Zelllysate mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-Parkin Antikörpers hP1 analysiert.

Die neuroprotektive Kapazität von Parkin konnte nicht nur kurz nach Stressbehandlung (Caspase-3 Assay), sondern auch 24 Stunden später beobachtet werden. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen transient transfiziert und am nächsten Tag für 18 Stunden mit Rotenon (0,25  $\mu$ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hoechst 33342 angefärbt und quantifiziert. Der prozentuale Anteil an Zellen mit kondensierten und fragmentierten Kernen, ein typisches Zeichen für apoptotische Zellen, ging in Gegenwart von Parkin auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 33 C, D).

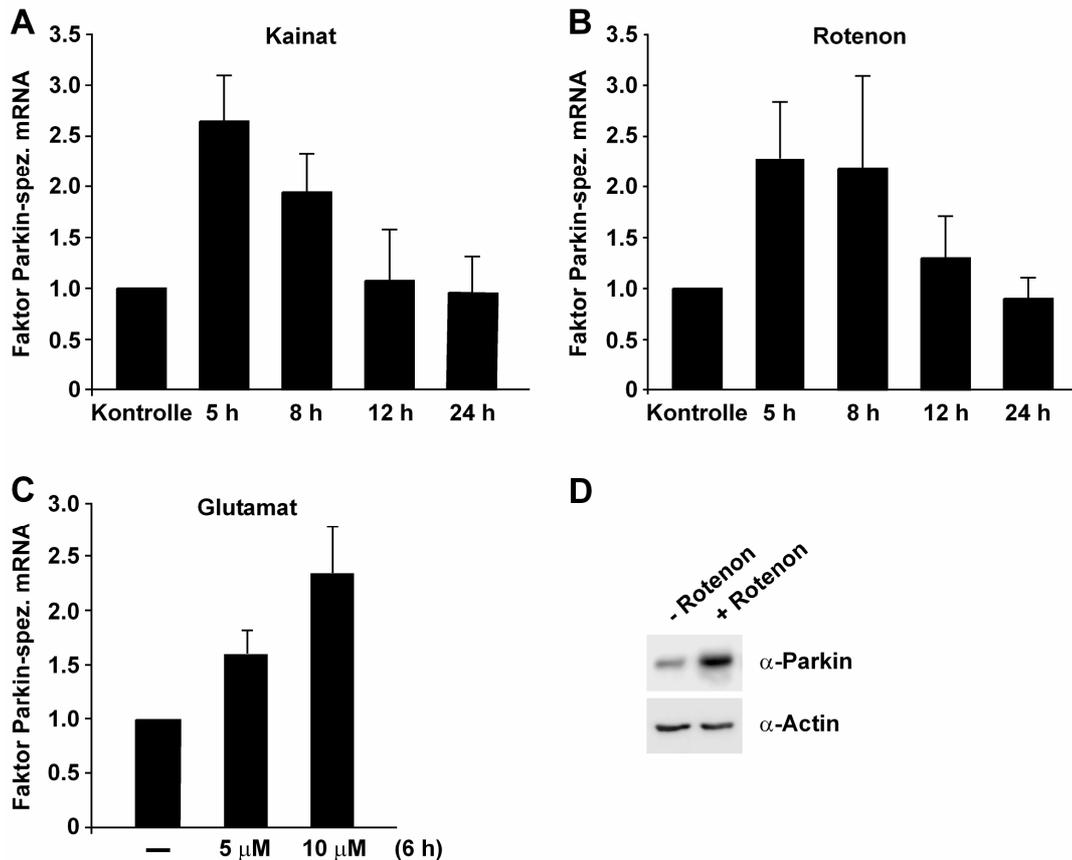


**Abbildung 33. Parkin besitzt ein neuroprotektives Potential.** (A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit Wildtyp (wt)-Parkin oder Vektor transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für 3 Stunden mit Kainat (500  $\mu$ M) oder Rotenon (10  $\mu$ M) inkubiert, fixiert, permeabilisiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen wurden mit dem spezifischen Antikörper 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) SH-SY5Y-Zellen wurden mit wt-Parkin oder den angegebenen Parkin-Mutanten transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für 3 Stunden mit Kainat (500  $\mu$ M) inkubiert und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz, wie unter (A) beschrieben, analysiert. \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,001$  im Vergleich zu wt-exprimierenden Zellen. Zur Expressionskontrolle wurde ein Aliquot des Zelllysats mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-Parkin Antikörpers hP1 analysiert. (C, D) SH-SY5Y-Zellen wurden mit wt-Parkin oder Vektor transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für 18 Stunden mit Rotenon (0,25  $\mu$ M) inkubiert und mit Hoechst 33342 angefärbt (10 min, 37°C). (C) Zur Quantifizierung wurden Zellen mit kondensierten und fragmentierten Kernen gezählt. Zu sehen ist der prozentuale Anteil der Zellen mit kondensierten und fragmentierten Kernen aus der Gesamtheit der transfizierten Zellen. (D) Immunfluoreszenzanalyse des unter (C) beschriebenen Experiments. Die Pfeile markieren transfizierte Zellen mit kondensierten Kernen.

#### 4.2.2 Stress-induzierte Transkription und Translation von Parkin

Um weitere Hinweise für eine mögliche Rolle von Parkin in der zellulären Stressbewältigung zu erlangen, wurde die Transkription von endogenem Parkin unter Stressbedingungen mittels *Real-Time*-PCR untersucht. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen mit Kainat (Exzitotoxizität) oder Rotenon (Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette) behandelt. Anschließend wurde der Anteil von Parkin-spezifischer mRNA mittels quantitativer *Real-Time*-PCR bestimmt (RT-PCR-Experimente wurden freundlicherweise von Lena Bouman durchgeführt). Wie Abb. 34 zeigt, war die Transkription von Parkin-mRNA durch Stress induzierbar. Fünf bis acht Stunden nach der Behandlung mit Kainat oder Rotenon war der maximale Anstieg an mRNA zu verzeichnen (Abb. 34 A, B). Die Stress-Induzierbarkeit von Parkin konnte auch in primären kortikalen Neuronen, die aus embryonalem Rattengehirn präpariert wurden, beobachtet werden. Zur Stressinduktion wurde hier Glutamat (5 oder 10  $\mu\text{M}$ , 6 Stunden) verwendet (Abb. 34 C) (Präparierung und Stressbehandlung der primären Neuronen wurden freundlicherweise in Kooperation mit Dr. Carsten Culmsee, Department für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie-Biotechnologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt).

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt auch mit einer Erhöhung der Proteinmenge von Parkin einhergeht, wurden untransfizierte SH-SY5Y-Zellen mit Rotenon (1  $\mu\text{M}$ , 3h) behandelt und mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-Parkin Antikörpers PRK8 analysiert. 24 Stunden nach der Stressbehandlung konnte ein signifikanter Anstieg von endogenem Parkin auf Proteinebene beobachtet werden (Abb. 34 D). Die Ergebnisse zeigten, dass Parkin durch moderaten Stress induzierbar ist.



**Abbildung 34. Hoch-Regulierung von endogenem Parkin nach zellulärem Stress.** SH-SY5Y-Zellen wurden für 3 Stunden mit 50  $\mu$ M Kainat (A) oder 1  $\mu$ M Rotenon (B) inkubiert. Die Zellen wurden 5, 8, 12 und 24 Stunden nach der Behandlung geerntet. Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels RT-PCR unter Verwendung Parkin-spezifischer Primer analysiert. Die RNA-Mengen wurden mit Hilfe des Kontrollgens  $\beta$ -Actin normalisiert. Zu sehen ist der relative Anteil an Parkin-mRNA. (C) Primäre kortikale Neuronen, die aus embryonalem Rattengehirn (E18) präpariert wurden, wurden für 6 Stunden mit Glutamat (5 oder 10  $\mu$ M) inkubiert und wie unter (A) und (B) beschrieben analysiert. (D) Untransfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden mit Rotenon (1  $\mu$ M, 3 h) behandelt. 24 Stunden später wurde endogenes Parkin mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers PRK8 analysiert.

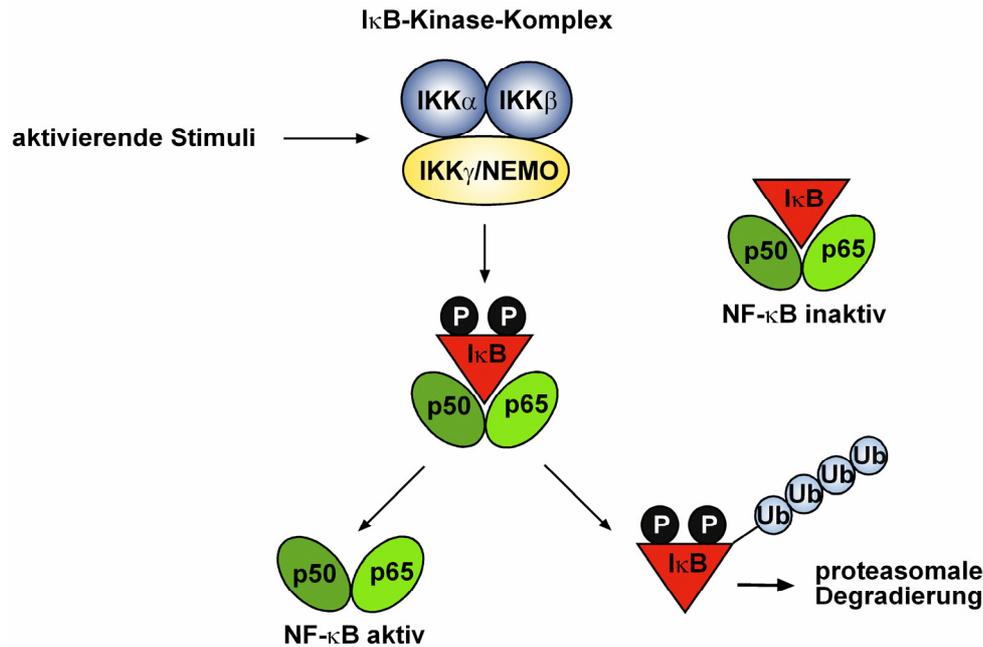
#### 4.2.3 Aktivierung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription durch Parkin

Das Spektrum an Stressoren, gegenüber denen Parkin protektiv wirkt, ist erstaunlich breit und legt die Vermutung nahe, dass Parkin essentielle Signaltransduktionswege beeinflussen könnte. Um dem zugrundeliegenden Mechanismus des protektiven Effekts von Parkin näher zu kommen, wurde im Folgenden der Einfluss von Parkin auf generelle Signalwege von Stress-Antworten analysiert.

Zunächst wurde ein zytosolisches Stress-Antwortssystem untersucht, das über die Aktivierung des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors (HSF1) zur vermehrten

Expression molekularer Chaperone führt (siehe Punkt 1.3.1) und somit eine wichtige Rolle bei proteotoxischem Stress spielt. Hiefür wurde ein Luciferase-Reporterkonstrukt eingesetzt, das unter Kontrolle eines HSF1-regulierbaren Elementes (HSE) steht (HSE-Luc). HEK293T-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin und dem Reporterplasmid HSE-Luc transfiziert und anschließend in Reporter-Lysepuffer lysiert. Die Reporterogen-Aktivität wurde durch die enzymatische Umsetzung von Luciferin durch Luciferase bestimmt. Die dabei emittierenden Photonen können luminometrisch quantifiziert werden. Als Positivkontrolle wurden die Zellen einem moderaten Hitzeschock bei 42°C für 15 Minuten ausgesetzt. In Abb. 36 A lässt sich deutlich erkennen, dass Parkin keinen Einfluss auf dieses Stresssystem hat. Die Luciferase-Aktivität entsprach der von EYFP-exprimierenden Zellen (Negativkontrolle). Die Positivkontrolle zeigte einen ca. 30-fachen Anstieg der Luciferase-Aktivität.

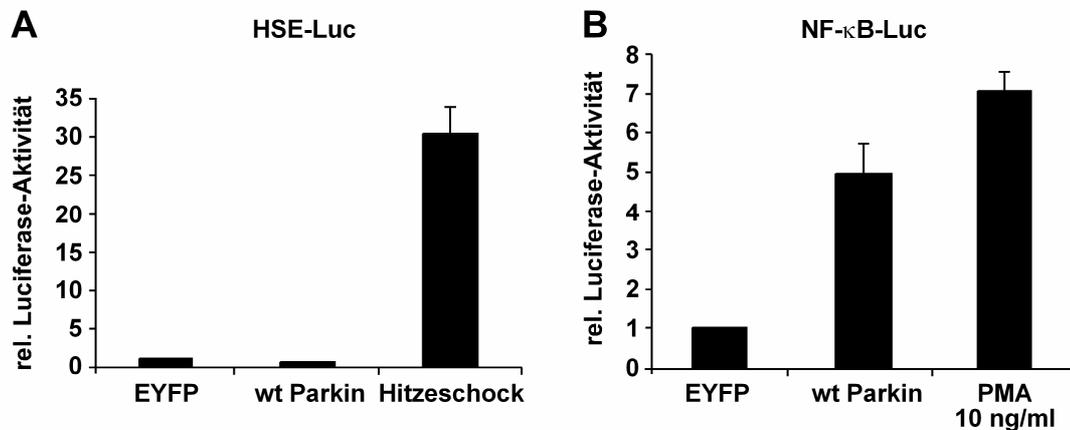
Als weiteres Stress-Antwortsystem wurde der NF- $\kappa$ B-Signalweg untersucht, der zur vermehrten Expression anti-apoptotischer Proteine führt (Abb. 35) (siehe Punkt 1.3.2). Zahlreiche Stimuli (z.B. TNF $\alpha$  oder IL-1) induzieren die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion und führen durch Ubiquitylierung und Phosphorylierung zahlreicher Signalmoleküle zur Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes (bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$ /NEMO). Die nachfolgende IKK-medierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  stimuliert dessen rasche Ubiquitylierung und Degradierung durch das Proteasom. NF- $\kappa$ B-Moleküle (meist p65/p50-Heterodimere) werden somit vom Inhibitor freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription entsprechender Zielgene induzieren.



**Abbildung 35. Der NF- $\kappa$ B-Aktivierungsweg.** Zahlreiche Stimuli (z.B. TNF $\alpha$  oder IL-1) induzieren die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion und führen zur Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$ /NEMO). Die nachfolgende IKK-medierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  stimuliert dessen rasche Ubiquitylierung und Degradierung durch das Proteasom. NF- $\kappa$ B-Moleküle werden somit vom Inhibitor freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription entsprechender Zielgene induzieren. I $\kappa$ B: inhibitorisches  $\kappa$ B-Protein, IKK: I $\kappa$ B-Kinase, Ub: Ubiquitylierung, P: Phosphorylierung.

Für die Analyse dieses Stress-Antwortsystems wurde ebenfalls ein Luciferase-Reporterkonstrukt eingesetzt, das in diesem Fall Bindeelemente für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B enthält (NF- $\kappa$ B-Luc). HEK293T-Zellen wurden transient mit Wildtyp-Parkin und dem Reporterplasmid NF- $\kappa$ B-Luc transfiziert. Nach der Zellyse in Reporter-Lysepuffer wurde die Reporteragen-Aktivität luminometrisch bestimmt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für drei Stunden mit 10 ng/ml Phorbol-Myristataacetat (PMA) behandelt. PMA aktiviert die Proteinkinase C und beeinflusst so die zytosolische NF- $\kappa$ B-Signalkaskade. Im Gegensatz zu EYFP-exprimierenden Zellen konnte in Gegenwart von Parkin ein 5-facher Anstieg der Luciferase-Aktivität beobachtet werden. Die Positivkontrolle induzierte den 7-fachen Anstieg der Luciferaseaktivität (Abb. 36 B). Um sicherzustellen, dass der Parkin-induzierte Unterschied der Luciferase-Aktivität nicht auf Veränderungen von Faltung oder Stabilität des Luciferase-Proteins zurückzuführen ist, wurde Luciferase-mRNA mittels RT-PCR analysiert. Die

Ergebnisse bestätigten einen Anstieg der mRNA-Mengen von Luciferase (Ergebnis nicht gezeigt).



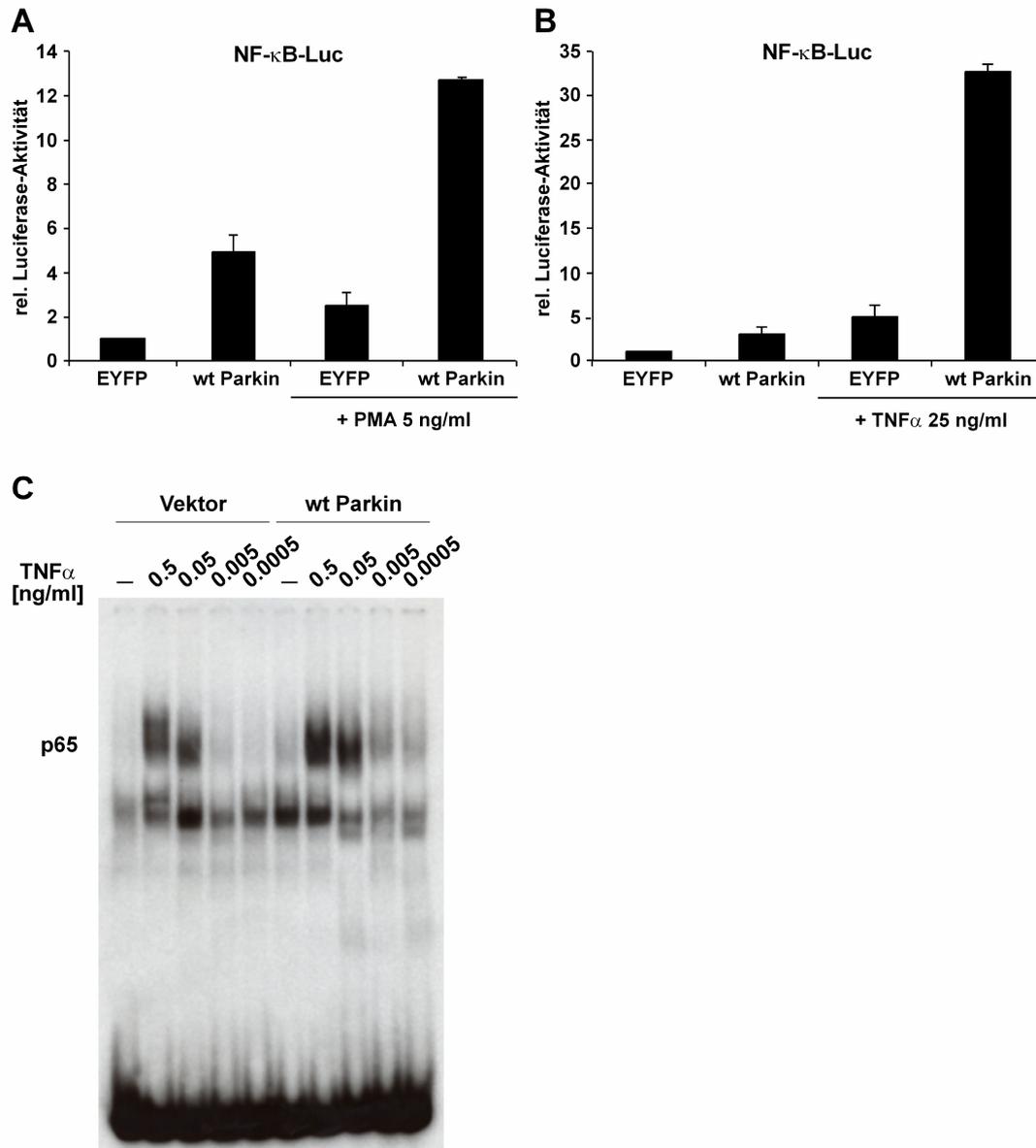
**Abbildung 36. Parkin stimuliert die NF-κB-regulierte Transkription.** (A) HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp (wt)-Parkin und dem Luciferase-Reporterplasmid HSE-Luc co-transfiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen einem moderaten Hitzeschock ausgesetzt (42°C, 15 min) und weitere 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reporter-Gen-Aktivität luminometrisch bestimmt. Zu sehen ist die relative Luciferase-Aktivität. (B) HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp (wt)-Parkin und dem Luciferase-Reporterplasmid NF-κB-Luc co-transfiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für drei Stunden mit PMA (10 ng/ml) behandelt und es wurde weiter wie unter (A) beschrieben verfahren.

Es stellte sich nun die Frage, ob Parkin möglicherweise einen permissiven Effekt auf die NF-κB-induzierte Transkription hat, d.h. ob es unter schwachen Stressbedingungen den Schwellenwert für die Aktivierung von NF-κB senken kann. Um diese Möglichkeit experimentell zu untersuchen, wurden transfizierte HEK293T-Zellen mit zwei klassischen NF-κB-Aktivatoren behandelt, nämlich dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oder PMA. TNF $\alpha$  induziert dabei eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Signalkaskade, PMA hingegen beeinflusst die zytosolische Kaskade durch Aktivierung der Proteinkinase C (Rezeptor-unabhängig). Die Stressbedingungen wurden jeweils so gewählt, dass NF-κB nur schwach aktiviert wird. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von Parkin in Stress-behandelten Zellen zu einem supra-additiven Anstieg der NF-κB-abhängigen Transkription führt (Abb. 37 A, B).

Um diese Resultate mit einem weiteren Assay zu bestätigen, wurde die Bindeaktivität von NF-κB mit Hilfe eines *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) untersucht. Der EMSA beruht darauf, dass ein an ein Protein gebundenes

DNA-Fragment bei der nativen Gelelektrophorese langsamer migriert als das entsprechende freie DNA-Fragment. Im vorliegenden Assay wurde die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an die entsprechende DNA-Konsensussequenz (radioaktiv-markiertes Konsensus-Oligonukleotid) detektiert. NF- $\kappa$ B gelangt nach Aktivierung in den Zellkern und bindet an die entsprechend Konsensus-DNA, womit es zur transkriptionellen Aktivierung der zugrunde liegenden Gene kommt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Parkin die DNA-Bindeaktivität von NF- $\kappa$ B in TNF $\alpha$ -stimulierten Zellen entscheidend steigern kann. Es lies sich die vermehrte Bindung des Konsensus-Oligonukleotids an das p65-Protein (des NF- $\kappa$ B-Heterodimers) beobachten. Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B konnte sogar bei einer sehr geringen Konzentration von TNF $\alpha$  (0,0005 ng/ml) beobachtet werden. Diese war für eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Abwesenheit von Parkin nicht ausreichend (Abb. 37 C) (EMSAs wurden freundlicherweise von Anita Schlierf durchgeführt).

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass Parkin die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription aktivieren kann. Darüber hinaus hat Parkin offensichtlich einen permissiven Effekt auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, d.h. es kann unter moderaten Stressbedingungen den Schwellenwert für die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade senken.



**Abbildung 37. Parkin sensibilisiert Zellen für NF- $\kappa$ B-aktivierende Stimuli.** (A, B) HEK293T-Zellen wurden mit NF- $\kappa$ B-Luc und Wildtyp (wt)-Parkin co-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen für 3 Stunden mit TNF $\alpha$  (25 ng/ml) oder PMA (5 ng/ml) inkubiert und nach weiteren 5 Stunden geerntet. Anschließend wurde die Reportergen-Aktivität luminometrisch bestimmt. Zu sehen ist die relative Luciferase-Aktivität. (C) HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp-Parkin oder Vektor transfiziert und für 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen an TNF $\alpha$  inkubiert. Kernextrakte dieser Zellen wurden mittels EMSA auf die DNA-Bindeaktivität von NF- $\kappa$ B untersucht. Die p65-Bande konnte mittels Supershift (Anti-p65 Antikörper) verifiziert werden.

#### **4.2.4 Kausaler Zusammenhang zwischen Neuroprotektion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

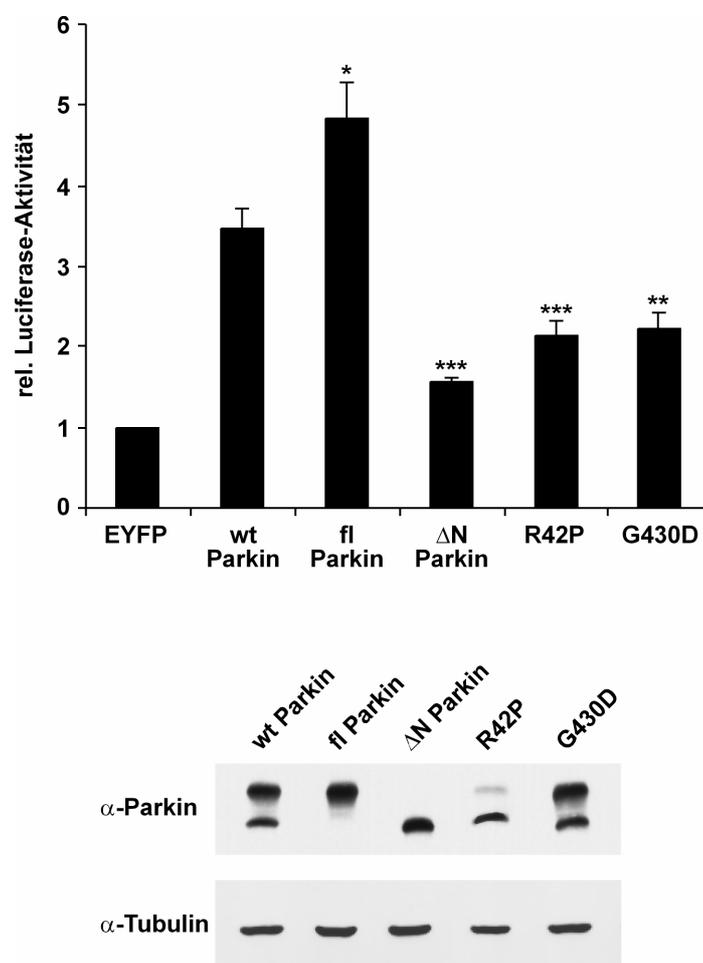
Unsere bisherigen Untersuchungen haben zwei Eigenschaften von Parkin aufgedeckt: Parkin zeigt unter moderaten Stressbedingungen eine protektive Wirkung, und es kann die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription aktivieren. Es stellte sich nun die Frage, ob zwischen beiden Beobachtungen ein Kausalzusammenhang besteht. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden drei experimentelle Ansätze gewählt: 1. Die Analyse pathogener Parkin-Mutanten, 2. die Auswirkung von Repressoren der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion und 3. die Analyse von Parkin-*Knock-down*-Zellen (RNA-Interferenz).

##### **4.2.4.1 Pathogene Parkin-Mutanten sind in der Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription beeinträchtigt**

Wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte, können dem Funktionsverlust der Parkin-Mutanten verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Für die funktionelle Analyse der pathogenen Parkin-Mutanten R42P und G430D sowie  $\Delta$ N Parkin (entspricht  $\Delta$ 1-79) wurde ein NF- $\kappa$ B-Reportergen-Assay durchgeführt. Bei  $\Delta$ N Parkin handelt es sich um die kleinere Parkin-Spezies, die keine UBL-Domäne besitzt, aber physiologischerweise exprimiert wird (siehe Punkt 4.1.2.2). Im Gegensatz zu Wildtyp (wt)-Parkin waren die Mutanten  $\Delta$ N, R42P und G430D in ihrer Fähigkeit, die NF- $\kappa$ B-regulierte Transkription zu aktivieren, signifikant beeinträchtigt. Interessanterweise zeigte  $\Delta$ N Parkin das geringste Potenzial, NF- $\kappa$ B zu aktivieren. Da bei der Expression von Wildtyp-Parkin neben Vollängen (fl)-Parkin auch N-terminal trunkeertes Parkin ( $\Delta$ N) generiert wird, wurde zusätzlich die Aktivität von reinem Vollängen-Parkin (entspricht M80T) untersucht. Im Reportergen-Assay zeigte Vollängen-Parkin die höchste Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription (Abb. 38).

Die Ergebnisse führten zu zwei Schlussfolgerungen:

1. Es besteht in der Tat eine Korrelation zwischen Neuroprotektion und NF- $\kappa$ B-aktivierendem Potential. Parkin-Mutanten, die eine geringere neuroprotektive Aktivität zeigen (vgl. Abb. 33), haben auch eine geringere Fähigkeit, NF- $\kappa$ B zu stimulieren.
2. Die N-terminale UBL-Domäne von Parkin scheint eine entscheidende Rolle bei der Neuroprotektion (vgl. Abb. 33) und der Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription zu spielen.



**Abbildung 38. Pathogene Parkin-Mutationen verringern das Potential von Parkin, NF- $\kappa$ B zu aktivieren.** HEK293T-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid NF- $\kappa$ B-Luc und Wildtyp (wt)-Parkin oder den angegebenen Mutanten co-transfiziert und 24 Stunden später geerntet. Anschließend wurde die Reporter-gen-Aktivität luminometrisch bestimmt. Zu sehen ist die relative Luciferase-Aktivität. \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,001$  im Vergleich zu wt-exprimierenden Zellen. Zur Expressionskontrolle von Parkin wurde ein Aliquot des Zelllysats mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörpers  $\alpha$ -hP1 analysiert. Das  $\alpha$ -Tubulin dient als Ladekontrolle.

#### 4.2.4.2 Untersuchungen des neuroprotektiven Potentials von Parkin in Gegenwart von Repressoren der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion

##### 4.2.4.2.1 Zwei transdominante Repressoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges (I $\kappa$ B $\Delta$ N und IKK $\beta$ K/A) beeinträchtigen die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription durch Parkin

Um einen möglichen Kausalzusammenhang zwischen Neuroprotektion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu untersuchen, wurde der Effekt von Parkin auf die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription in Anwesenheit von dominant-negativen Repressoren der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion analysiert.

Zunächst wurde der transdominante NF- $\kappa$ B-Repressor I $\kappa$ B $\Delta$ N im Luciferase-Reporterassay untersucht. Der Mutante I $\kappa$ B $\Delta$ N fehlt die N-terminale Domäne (Aminosäuren 71-317), welche die I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Phosphoakzeptorstelle besitzt (Krappmann, D. *et al.* 1996). I $\kappa$ B $\Delta$ N kann daher nicht abgebaut werden und bindet dauerhaft an NF- $\kappa$ B, so dass die Signalkaskade unterbrochen wird (Abb. 39).

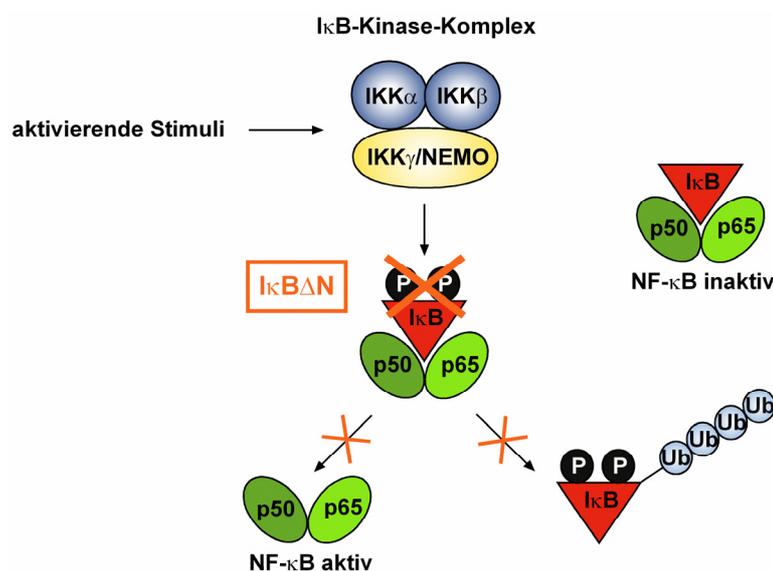
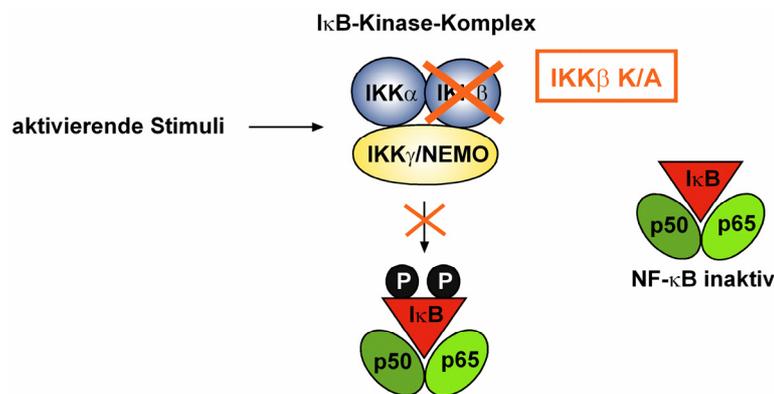


Abbildung 39. Schematische Darstellung der Wirkung des transdominanten NF- $\kappa$ B-Repressors I $\kappa$ B $\Delta$ N. I $\kappa$ B: inhibitorisches  $\kappa$ B-Protein, IKK: I $\kappa$ B-Kinase, Ub: Ubiquitylierung, P: Phosphorylierung.

Wie in Abb. 41 A zu sehen, blockierte die Co-Transfektion von I $\kappa$ B $\Delta$ N die Parkin-medierte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription. Die Luciferase-Aktivität ging auf das Grundniveau (EYFP + I $\kappa$ B $\Delta$ N) zurück. Dieses Ergebnis zeigte, dass Parkin keine eigene transkriptionelle Aktivität besitzt, sondern einen Effekt auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierungskaskade haben muss.

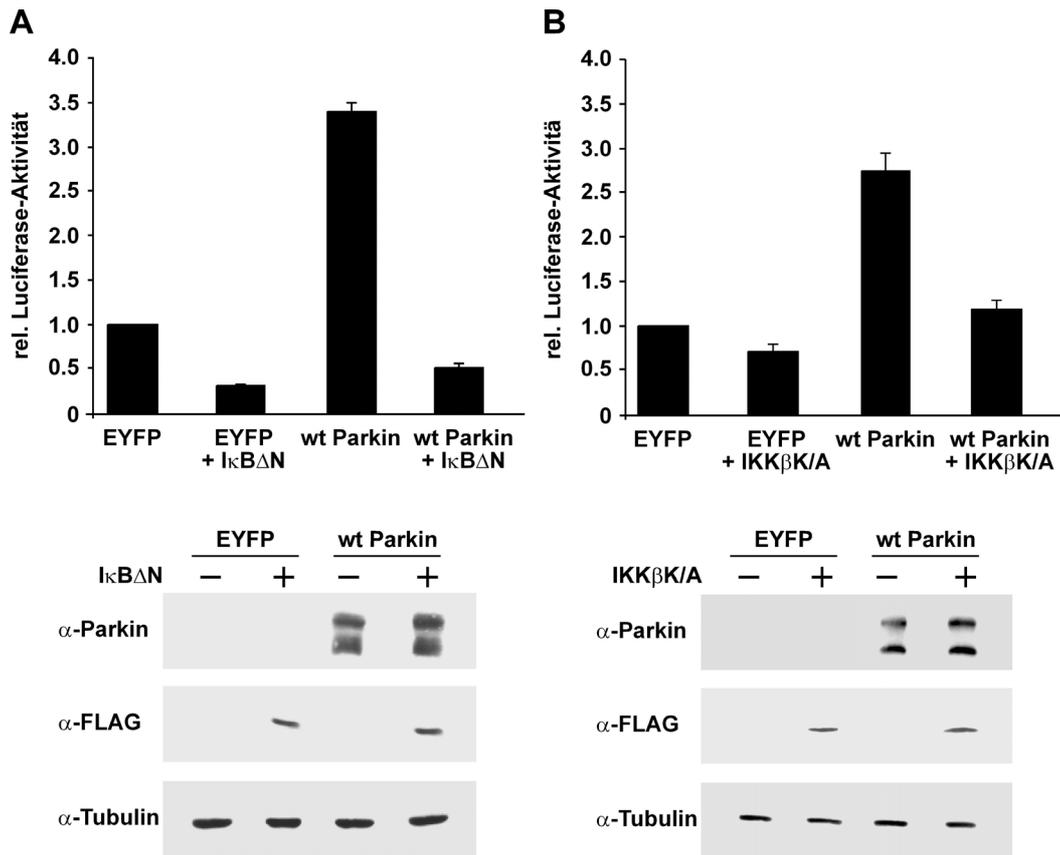
Um weitere Hinweise zu erlangen, auf welcher Ebene der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade Parkin eingreift, wurde ein NF- $\kappa$ B-Inhibitor gewählt, der den Signalweg auf der Ebene der I $\kappa$ B-Kinase hemmt. Dazu wurde eine IKK $\beta$ -Mutante eingesetzt, die zwei Mutationen in der Aktivierungsschleife von IKK $\beta$  trägt (Abb. 40) (Delhase, M. *et al.* 1999).



**Abbildung 40.** Schematische Darstellung der Wirkung des NF- $\kappa$ B-Repressors IKK $\beta$  K/A. I $\kappa$ B: inhibitorisches  $\kappa$ B-Protein, IKK: I $\kappa$ B-Kinase, Ub: Ubiquitylierung.

Zunächst wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass auch IKK $\beta$  K/A den Effekt von Parkin auf die NF- $\kappa$ B-regulierte Transkription aufhebt (Abb. 41 B).

Die bisherigen Experimente haben demonstriert, dass Repressoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges mit der Parkin-medierten Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription interferieren. Folglich wirkt Parkin aktivierend auf oder oberhalb der Ebene des IKK-Signalosoms.



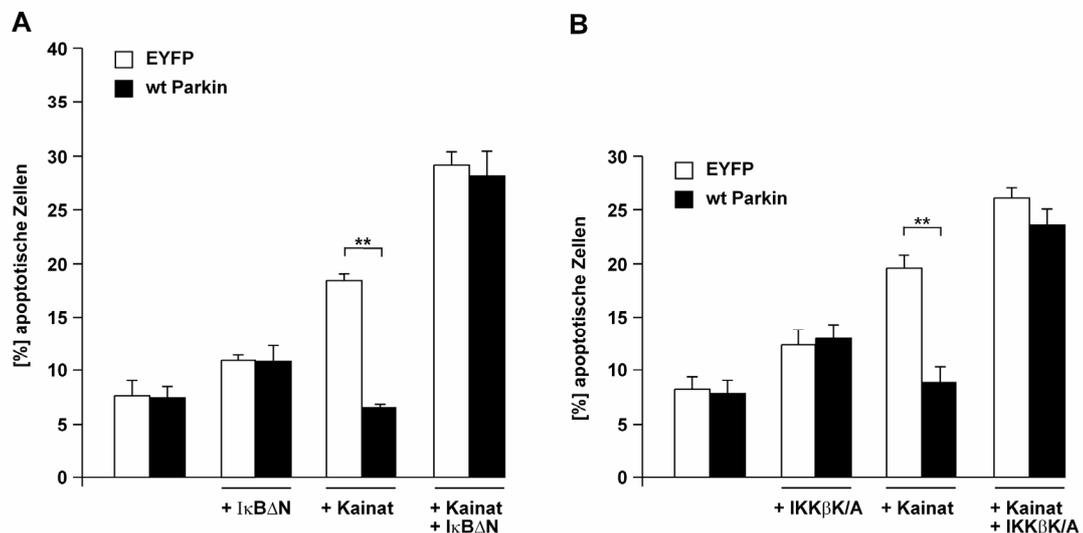
**Abbildung 41. Dominant-negatives IκB oder Kinase-inaktives IKKβ hemmen den Effekt von Parkin auf die NF-κB-regulierte Transkription.** (A) HEK293T-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid NF-κB-Luc, Wildtyp (wt)-Parkin und dem NF-κB-Repressor IκBΔN co-transfiziert. 24 Stunden später wurde die Luciferase-Aktivität der Zelllysate luminometrisch analysiert. Zu sehen ist die relative Luciferase-Aktivität. Zur Expressionskontrolle der Proteine wurden Aliquote des Zelllysats mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörper α-hP1 oder α-FLAG analysiert. Tubulin dient als Ladekontrolle. (B) HEK293T-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid NF-κB-Luc, Wildtyp-Parkin und der Kinase-inaktiven IKKβ-Mutante co-transfiziert. Luciferase-Assay und Immunblot wurden wie unter (A) beschrieben durchgeführt.

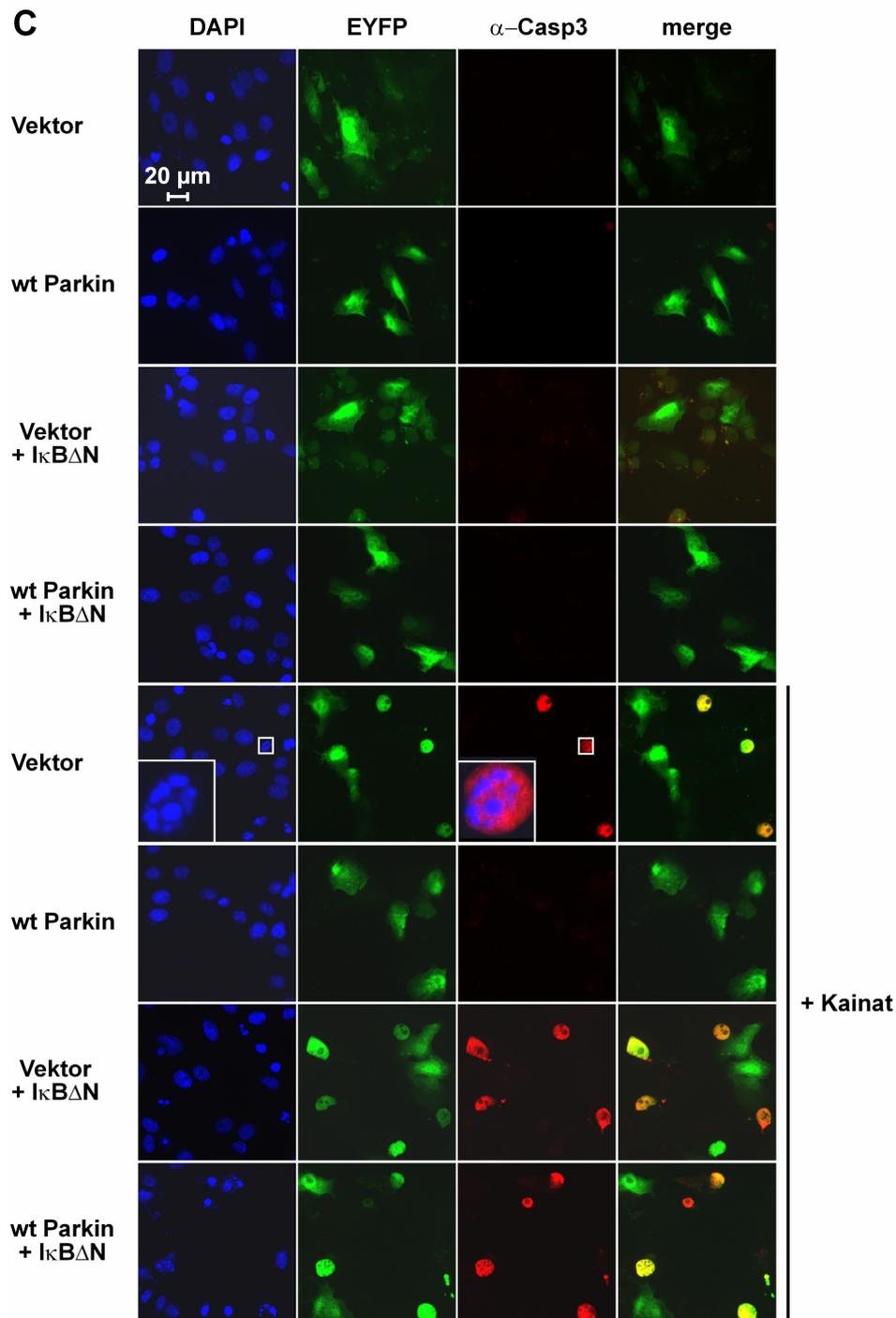
#### 4.2.4.2.2 IκBΔN und IKKβ K/A hemmen die neuroprotektive Wirkung von Parkin

In einem weiteren Schritt sollte geklärt werden, ob ein direkter Zusammenhang besteht zwischen dem neuroprotektiven Potential von Parkin und dessen Fähigkeit, die NF-κB-Signaltransduktion zu aktivieren. Um dies zu untersuchen, wurde die neuroprotektive Kapazität von Parkin unter Bedingungen analysiert, welche die Aktivierung von NF-κB beeinträchtigen.

Zunächst wurde ein Apoptose-Assay in Gegenwart von I $\kappa$ B $\Delta$ N durchgeführt. Hierfür wurden humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) transient mit Wildtyp (wt)-Parkin und I $\kappa$ B $\Delta$ N co-transfiziert und 24 Stunden später für drei Stunden mit Kainat (500  $\mu$ M) inkubiert. Apoptotische Zellen wurden anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen aktivierte Caspase-3 analysiert und quantifiziert. In den Stress-behandelten Zellen konnte ein eindeutiger protektiver Effekt von Parkin beobachtet werden (Abb. 42 A, + Kainat). In Gegenwart des NF- $\kappa$ B-Repressors I $\kappa$ B $\Delta$ N zeigte Parkin jedoch keinen anti-apoptotischen Effekt in Kainat-behandelten Zellen (Abb. 42 A, + Kainat, + I $\kappa$ B $\Delta$ N). Die insgesamt erhöhte Toxizität lässt sich dadurch erklären, dass alle zellulären Aktivatoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges gehemmt werden. Anschließend wurde der oben beschriebene Versuch mit der Kinase-inaktiven IKK $\beta$  K/A-Mutante durchgeführt. Ähnlich wie I $\kappa$ B $\Delta$ N, inhibierte auch IKK $\beta$  K/A die neuroprotektive Wirkung von Parkin nach Kainat-Behandlung (Abb. 42 B).

Diese Experimente haben verdeutlicht, dass in der Tat die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade essentiell ist für die neuroprotektive Wirkung von Parkin.

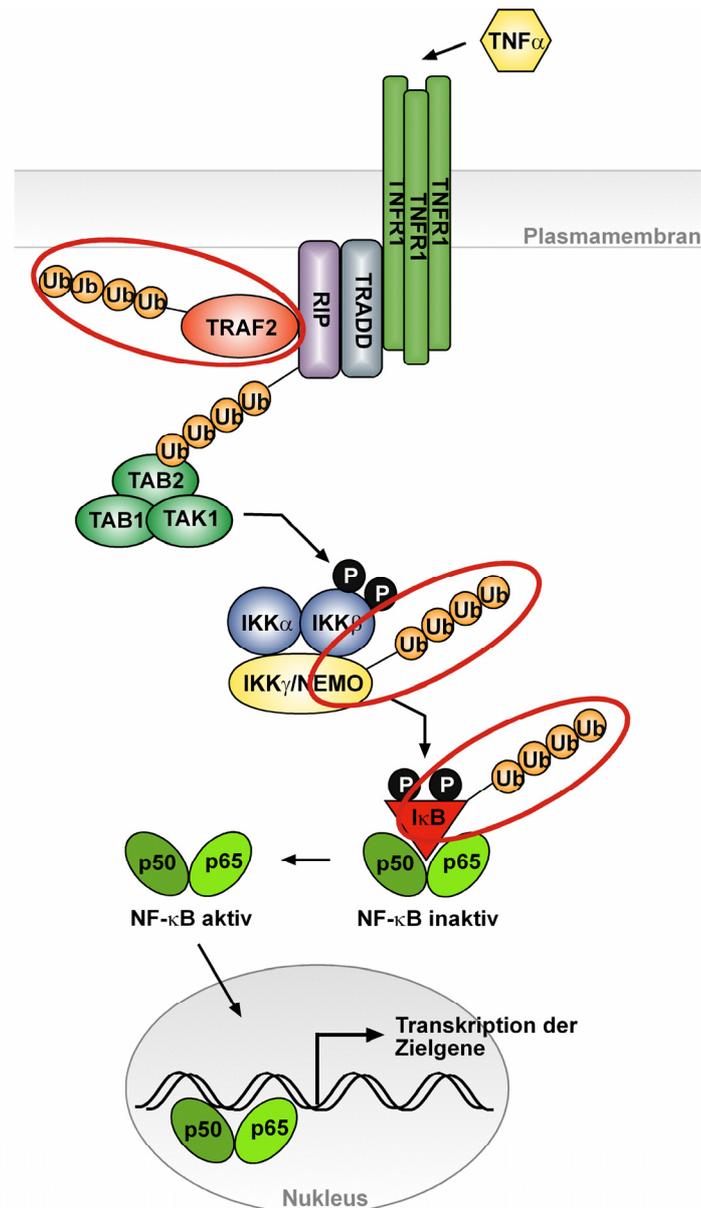




**Abbildung 42. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist essentiell für den neuroprotektiven Effekt von Parkin.** (A) SH-SY5Y-Zellen wurden mit EYFP, Wildtyp (wt)-Parkin und I $\kappa$ B $\Delta$ N co-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen für 3 Stunden mit Kainat (500  $\mu$ M) inkubiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Apoptotische Zellen wurden mit dem spezifischen Antikörper 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. \*\*P<0,001 im Vergleich zu EYFP-exprimierenden Zellen. (B) SH-SY5Y-Zellen wurden mit EYFP, Wildtyp-Parkin und IKK $\beta$  K/A co-transfiziert und wie unter (A) beschrieben, analysiert. (C) Immunfluoreszenz des unter (A) beschriebenen Experiments. Die Aktivierung von Caspase-3 wurde mit dem spezifischen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 (rot) detektiert. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

#### **4.2.5 Parkin-medierte Ubiquitylierung von Komponenten der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionskaskade**

Neuere Studien konnten zeigen, dass Ubiquitylierung eine wichtige Rolle bei der Regulierung der IKK/NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion spielt (siehe Punkt 1.3.2) (Chen, Z. J. 2005; Haglund, K. und I. Dikic 2005; Krappmann, D. und C. Scheidereit 2005; Ravid, T. und M. Hochstrasser 2004). Dabei kann man zwei Arten der Ubiquitylierung unterscheiden. Die konventionelle Polyubiquitylierung über Lysin-48 spielt bei der Regulierung des I $\kappa$ B-Abbaus und der Proteolyse von Vorläufer-Proteinen eine wichtige Rolle. Die Polyubiquitylierung über Lysin-63 hingegen ist essentiell für die Aktivierung des IKK-Komplexes und anderer höher gelegener Regulatoren wie TRAF2 (*TNF receptor-associated factor*), TRAF6 und RIP (*Receptor interacting protein*) (vgl. Abb. 43).

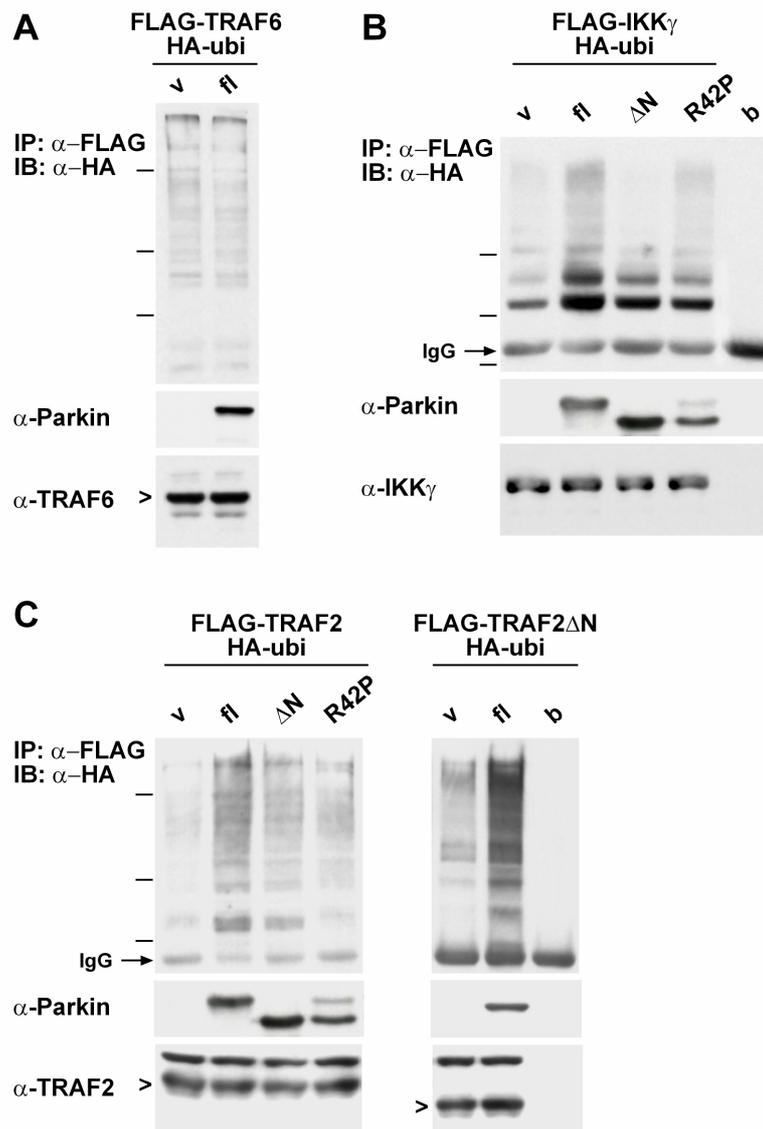


**Abbildung 43. Modell für die Rolle der Ubiquitylierung und Phosphorylierung bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.** Die Bindung des Liganden an den Plasmamembranrezeptor, hier  $TNF\alpha$  und der  $TNF\alpha$ -Rezeptor 1, induziert die Trimerisierung des Rezeptors und die Rekrutierung der Rezeptor-assoziierten Proteine  $TRADD$ ,  $RIP$  und  $TRAF2$ , welche dadurch aktiviert werden. Die Polyubiquitylierung von  $RIP$  und  $TRAF2$  über Lysin-63 scheint die Bindung des Kinase-Komplexes  $TAK1$ - $TAB1$ - $TAB2$  an den Membran-gebundenen Komplex zu stimulieren.  $TAK1$  phosphoryliert den  $I\kappa B$ -Kinase ( $IKK$ )-Komplex und dieser anschließend  $I\kappa B\alpha$ . Dieser Schritt wird durch  $IKK\gamma/NEMO$  reguliert, eine Untereinheit des  $IKK$ -Komplexes, die ihrerseits polyubiquityliert wird. Phosphoryliertes  $I\kappa B\alpha$  wird über Lysin-48 ubiquityliert und durch das Proteasom abgebaut.  $NF-\kappa B$ -Moleküle werden somit vom Inhibitor freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie die Transkription entsprechender Zielgene induzieren.  $TNF\alpha$ : *Tumor necrosis factor  $\alpha$* ,  $TNFR1$ : *TNF receptor 1*,  $TRADD$ : *TNF receptor-associated death domain protein*,  $RIP$ : *Receptor interacting protein*,  $TRAF$ : *TNF receptor-associated factor*,  $TAK$ : *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase*,  $TAB$ : *TAK-binding protein*. Abbildung modifiziert nach (Ravid, T. und M. Hochstrasser 2004).

#### 4.2.5.1 Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ und TRAF2 durch Parkin

Die bisherigen Experimente haben deutlich gezeigt, dass die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges eine essentielle Voraussetzung für die neuroprotektive Wirkung von Parkin ist. Es stellte sich nun die Frage, welche Rolle die E3-Ligase-Aktivität von Parkin spielt, d.h. ob es direkte Zielmoleküle von Parkin im NF- $\kappa$ B-Signalweg gibt. Hierfür wurden die potentiellen Zielproteine TRAF2, TRAF6 und IKK $\gamma$  in Ubiquityierungsassays analysiert. HEK293T-Zellen wurden mit Vollängen (fl)-Parkin, HA-Ubiquitin und entweder FLAG-TRAF2, FLAG-TRAF6 oder FLAG-IKK $\gamma$  co-transfiziert. Um eine mögliche Co-Präzipitation von ubiquitylierten Interaktionspartner von TRAF2, TRAF6 und IKK $\gamma$  zu verhindern, wurden denaturierende Bedingungen gewählt, die mit Protein-Protein-Interaktionen interferieren. Hierfür wurde das Zellpellet in denaturierendem Lysepuffer (+ 1% SDS) lysiert, kurz aufgeköcht und mit nicht-denaturierendem Lysepuffer verdünnt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand für eine Immunpräzipitation mit dem Anti-FLAG Antikörper verwendet. Die Immunpellets wurden anschließend mittels Western Blot unter Verwendung des Anti-HA Antikörpers analysiert. Wie aus Abb. 44 A hervorgeht, nahm die Ubiquitylierung von TRAF6 in Gegenwart von Parkin nicht zu. Im Gegensatz dazu war in Gegenwart von Parkin die Menge an ubiquityliertem IKK $\gamma$  und TRAF2 erhöht. Die Parkin-Mutanten  $\Delta$ N und R42P hingegen waren in ihrer Fähigkeit, die Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  und TRAF2 zu mediieren, beeinträchtigt (Abb. 44 B, C). Für die beiden Mutanten konnte bereits eine geringere Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription sowie ein verringertes neuroprotektives Potential gezeigt werden (siehe Punkt. 4.2.1 und 4.2.3).

Da TRAFs eine intrinsische E3-Ligase-Aktivität besitzen, sollte geklärt werden, ob Parkin möglicherweise die E3-Ligase-Aktivität von TRAF2 stimuliert. Hierfür wurde die Mutante TRAF2 $\Delta$ N in einem Ubiquityierungsassays untersucht. Diesem Konstrukt fehlt die N-terminale RING-Domäne, die für seine E3-Ligase-Aktivität essentiell ist. Das Ergebnis verdeutlichte, dass die erhöhte Ubiquitylierung von TRAF2 in Gegenwart von Parkin nicht durch die intrinsische E3-Ligase-Aktivität von TRAF2 vermittelt wird (Abb. 44 C).

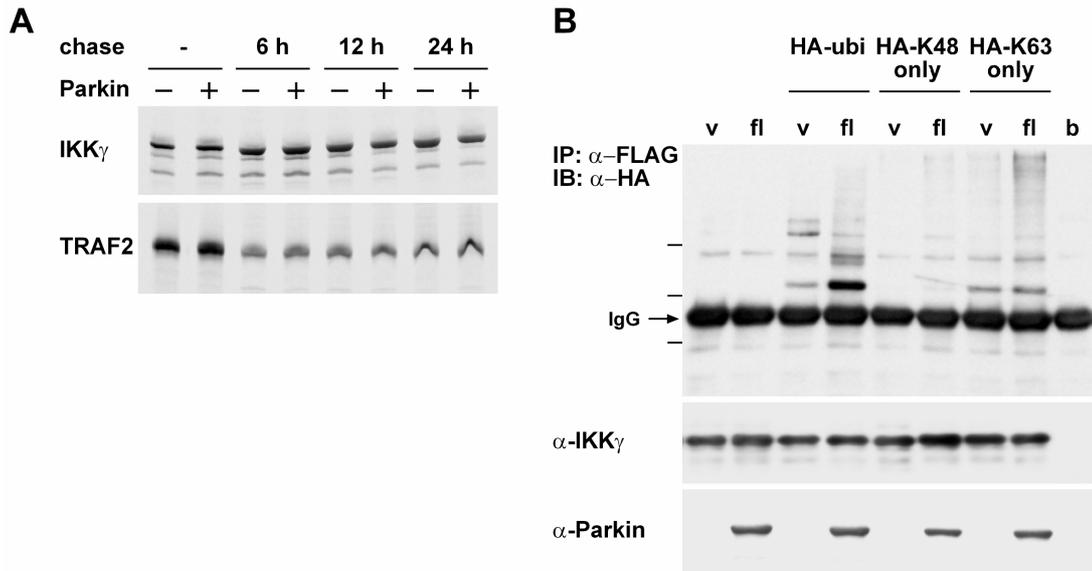


**Abbildung 44. Parkin erhöht die Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  und TRAF2.** (A, B, C) HEK293T-Zellen wurden mit Parkin (fl) bzw.  $\Delta$ N oder R42P, HA-Ubiquitin und FLAG-TRAF6 (A), FLAG-IKK $\gamma$  (B), FLAG-TRAF2 oder FLAG-TRAF2 $\Delta$ N (C) co-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet, in denaturierendem Puffer (+ 1% SDS) lysiert, kurz aufgekocht und mit nicht-denaturierendem Puffer verdünnt. Nach der Zentrifugation wurden gleiche Proteinmengen des Überstandes für eine Immunpräzipitation mit dem Anti-FLAG Antikörper verwendet. Die Immunpellets wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-HA Antikörpers analysiert. Zur Expressionkontrolle wurden Aliquote des Überstandes jeweils mit den Antikörpern  $\alpha$ -hP1,  $\alpha$ -IKK $\gamma$  und  $\alpha$ -TRAF2 immundetektiert. Die Größenmarker sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt und repräsentieren 98, 64 und 50 kDa (B) oder 148, 98 und 64 kDa (A, C); v: Vektor, b: Pufferkontrolle.

#### 4.2.5.2 Parkin vermittelt die regulierende Ubiquitylierung von IKK $\gamma$ über Lysin-63

In einem nächsten Schritt sollte die Art der von Parkin induzierten Ubiquitin-Verknüpfung geklärt werden. Es wurde zunächst in Stabilitätsstudien untersucht, ob die Parkin-medierte Ubiquitylierung IKK $\gamma$  und TRAF2 für den proteasomalen Abbau markiert. Die durchgeführten *pulse/chase*-Experimente ließen keinen Effekt von Parkin auf die Stabilität von IKK $\gamma$  und TRAF2 über einen Zeitraum von 24 Stunden erkennen. In Gegenwart von Parkin war die Proteinmenge von TRAF2 bzw. IKK $\gamma$  unverändert (Abb. 45 A). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass Parkin keine degradierende Art der Ubiquitinverknüpfung vermittelt. Um weitere experimentelle Evidenz für diese Vermutung zu erlangen, wurden im folgenden Experiment Ubiquitin-Mutanten verwendet, die lediglich ein Lysin besitzen (HA-K48only und HA-K63only). Diese Mutanten erlauben lediglich die Verknüpfung der Ubiquitinkette über Lysin-48 (proteasomale Degradierung) oder aber über Lysin-63 (regulierende Funktion) (Pickart, C. M. und D. Fushman 2004). Die Ubiquitylierungsexperimente wurden wie unter Punkt 4.2.5.1 beschrieben durchgeführt und zeigten, dass die Expression der K48only-Mutante die Parkin-medierte Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  deutlich verringert (Abb. 45 B, K48only, fl). Im Gegensatz dazu konnte Parkin in Gegenwart von K63only-Ubiquitin die Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  weiterhin vermitteln (Abb. 45 B, K63only, fl).

Zusammenfassend haben die Experimente gezeigt, dass Parkin eine nicht-proteolytische, regulierende Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  über Lysin-63 vermittelt.



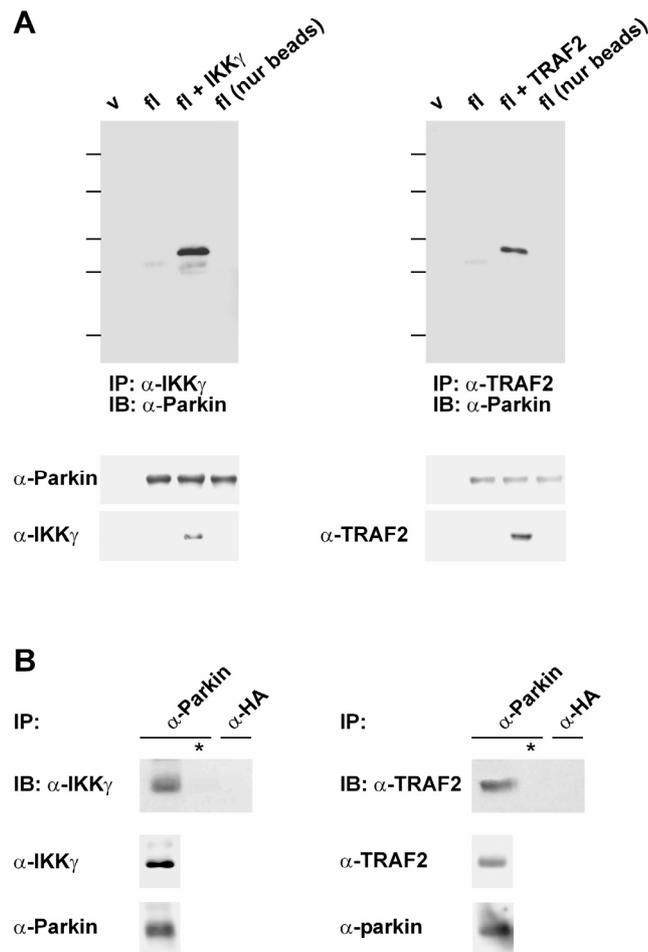
**Abbildung 45. Parkin mediert die Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  und TRAF2 über Lysin-63. (A)** Parkin hat keinen Einfluss auf die Stabilität von IKK $\gamma$  und TRAF2. HEK293T-Zellen wurden mit Wildtyp-Parkin und FLAG-IKK $\gamma$  oder FLAG-TRAF2 co-transfiziert und für 30 Minuten mit [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Zellen wurden entweder direkt geerntet (chase -) oder weitere 6, 12 oder 24 Stunden in frischem Medium inkubiert. Nach der Lyse in IP-Lysepuffer wurde Detergenzlösliches IKK $\gamma$  oder TRAF2 mittels Immunpräzipitation unter Verwendung des anti-FLAG Antikörpers analysiert. **(B)** Parkin vermittelt die Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  über Lysin-63. HEK293T-Zellen wurden mit Parkin (fl), FLAG-IKK $\gamma$  und entweder mit HA-Ubiquitin, K48only- oder K63only-Ubiquitin co-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet, lysiert und mittels Zentrifugation fraktioniert. Gleiche Proteinmengen des Überstandes wurden unter denaturierenden Bedingungen einer Immunpräzipitation mit dem Anti-FLAG Antikörper unterzogen. Die Immunpellets wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-HA Antikörpers analysiert. Zur Expressionkontrolle wurden Aliquote des Überstands jeweils mit den Antikörpern  $\alpha$ -hP1 und  $\alpha$ -IKK $\gamma$  immundetektiert.

#### 4.2.6 Interaktion von Parkin mit IKK $\gamma$ und TRAF2

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass IKK $\gamma$  und TRAF2 potentielle Zielproteine der Parkin-mediierten Ubiquitylierung sind. Um eine physiologische Relevanz der beobachteten Effekte zu erhärten, wurde eine mögliche Interaktion von Parkin und IKK $\gamma$  bzw. TRAF2 mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsexperimenten untersucht. Hierfür wurden HEK293T-Zellen transient mit Parkin (fl) und IKK $\gamma$  oder TRAF2 transfiziert. Die Zellen wurden mit IP-Puffer lysiert, mittels Zentrifugation fraktioniert, und der lösliche Überstand wurde einer Immunpräzipitation mit den polyklonalen Antikörpern  $\alpha$ -IKK $\gamma$  oder  $\alpha$ -TRAF2 unterworfen. Die Immunpellets wurden anschließend mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen

Anti-Parkin Antikörpers PRK28 analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich sowohl IKK $\gamma$  als auch TRAF2 in einem Komplex mit Parkin wiederfinden (Abb. 46 A). Um nun die physiologische Relevanz dieser Interaktion zu bestätigen, wurde eine Co-Immunpräzipitation mit endogenen Proteinen durchgeführt. Hiefür wurden untransfizierte SH-SY5Y-Zellen mit IP-Puffer lysiert und mit dem polyklonalen Anti-Parkin Antikörper hP1 über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen wurde parallel eine IP mit polyklonalem Anti-HA Antikörper durchgeführt. Die Immunpellets wurden anschließend mittels Western Blot unter Verwendung der monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -IKK $\gamma$  oder  $\alpha$ -TRAF2 analysiert. Auch hier konnte eine eindeutige Interaktion beider Proteine beobachtet werden (Abb. 46 B).

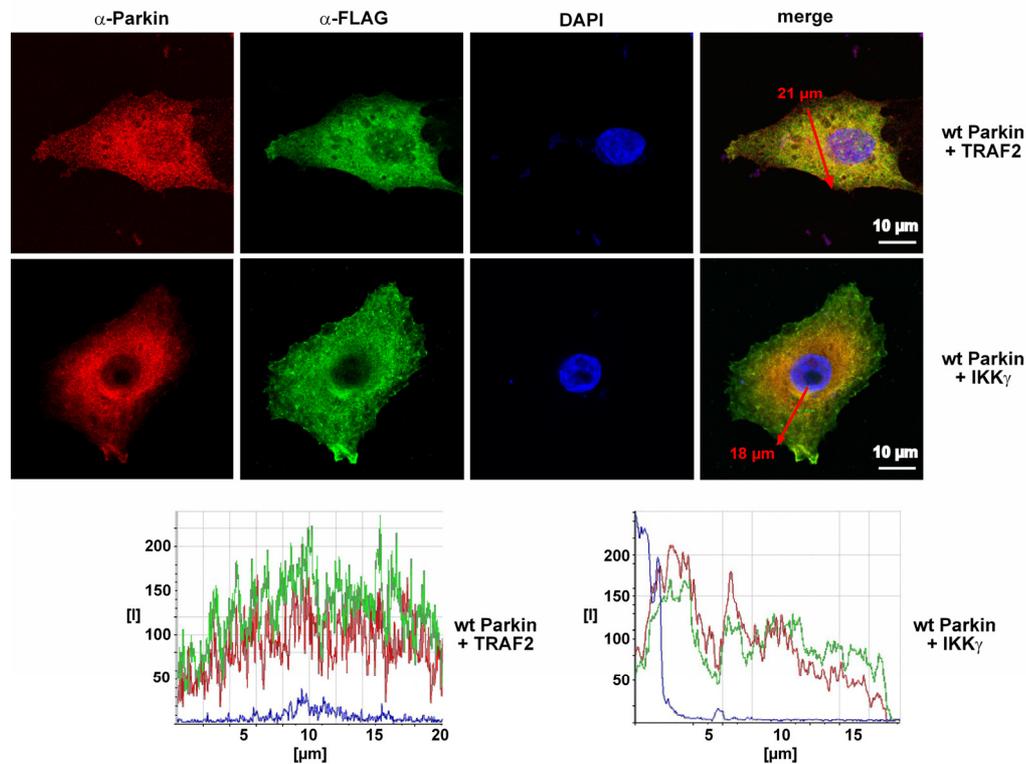
Diese Resultate bestätigten eine direkte oder indirekte Interaktion beider Proteine mit Parkin.



**Abbildung 46. Parkin ist in einem Komplex mit IKK $\gamma$  und TRAF2 zu finden. (A)** HEK293T-Zellen wurden mit Parkin (fl) und IKK $\gamma$  oder TRAF2 co-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet, lysiert und mittels Zentrifugation fraktioniert. Gleiche Proteinmengen des Überstandes wurden einer Immunpräzipitation mit den polyklonalen Antikörpern  $\alpha$ -IKK $\gamma$  oder  $\alpha$ -TRAF2 unterzogen. Die Immunpellets wurden mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-Parkin Antikörpers PRK28 analysiert. Zur Expressionkontrolle wurden Aliquote des Überstandes jeweils mit den Antikörpern  $\alpha$ -hP1 (polyklonal) und  $\alpha$ -IKK $\gamma$  und TRAF2 (beide monoklonal) detektiert. **(B)** Untransfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden lysiert, zentrifugiert, und der Überstand wurde über Nacht mit dem polyklonalen Anti-Parkin Antikörper hP1 oder einem polyklonalen Anti-HA Antikörper (beide an Protein A-Agarose gekoppelt) inkubiert. Die Immunpellets wurden mittels Western Blot unter Verwendung der monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -IKK $\gamma$  oder  $\alpha$ -TRAF2 analysiert. Zur Expressionskontrolle wurden die Proben mittels Immunpräzipitation und anschließendem Immunblot gegen die entsprechenden Proteine analysiert.

Weiterhin wurde die zelluläre Lokalisierung von Parkin, IKK $\gamma$  und TRAF2 untersucht. Hierfür wurden jeweils Parkin, IKK $\gamma$  oder TRAF2 in SH-SY5Y-Zellen exprimiert und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Proteine zeigten eine homogene Verteilung im Zytosol (Ergebnis nicht gezeigt). Interessanterweise konnte bei der Co-Expression von Parkin und IKK $\gamma$  bzw. TRAF2 eine Akkumulation von IKK $\gamma$  und TRAF2 in der perinukleären Region beobachtet werden. In dieser Region

kam es zu einer deutlichen Co-Lokalisierung mit Parkin (Abb. 47, merge) (konfokalmikroskopische Analysen wurden freundlicherweise von Julia Schlehe durchgeführt).



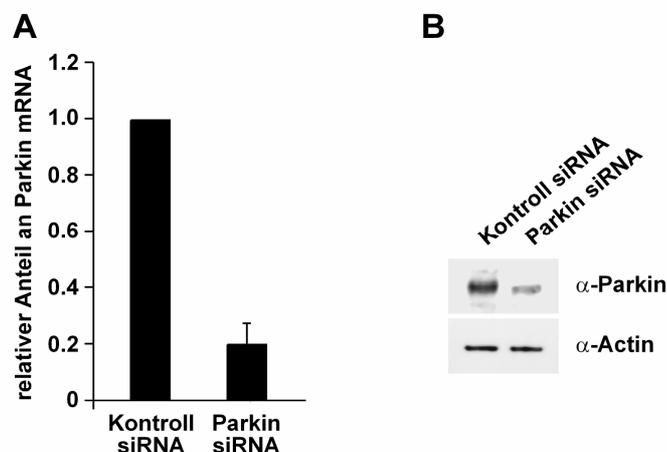
**Abbildung 47. IKK $\gamma$  und TRAF2 co-lokalisieren mit Parkin.** SH-SY5Y-Zellen wurden mit Wildtyp (wt)-Parkin und FLAG-IKK $\gamma$  oder FLAG-TRAF2 co-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit folgenden Antikörpern angefärbt: Polyklonaler Anti-Parkin Antikörper hP1 (rot) und monoklonaler Anti-FLAG Antikörper (grün). Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Die roten Pfeile kennzeichnen die Regionen der Intensitätsprofile (untere Abbildungen), die mittels Leica Confocal Software bestimmt wurden.

## 4.2.7 Der *Knock-down* von Parkin beeinflusst den Stress-induzierten Zelltod und die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion

### 4.2.7.1 *Knock-down* von endogenem Parkin in Zellkultur

Die bislang durchgeführten Experimente konnten das neuroprotektive Potential von überexprimiertem Parkin unter Stressbedingungen zeigen. Um in einem nächsten Schritt die Rolle von endogenem Parkin zu klären, wurde ein *Knock-down* von Parkin mittels RNA-Interferenz durchgeführt. Zunächst wurde die Effizienz der

verwendeten siRNA bestimmt. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit Parkin-spezifischer siRNA transfiziert. Anschließend wurde der Anteil von Parkin-spezifischer mRNA mittels quantitativer *Real-Time*-PCR bestimmt. Wie Abb. 48 A zeigt, war die Parkin-mRNA-Menge im Vergleich zur Kontroll-siRNA um ca. 80% reduziert (RT-PCR-Experimente wurden freundlicherweise von Lena Bouman durchgeführt). Parallel wurde endogenes Parkin mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-Parkin Antikörpers PRK8 analysiert. Nach Behandlung der Zellen mit Parkin-siRNA war deutlich weniger Parkin-Protein detektierbar (Abb. 48 B)

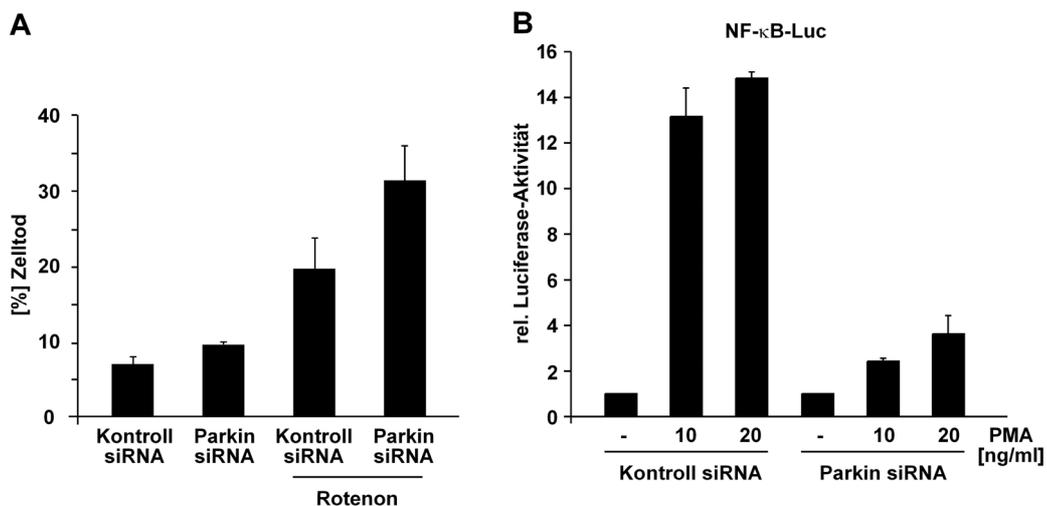


**Abbildung 48. Effizienter *Knock-down* von Parkin mittels RNA-Interferenz.** (A) HEK293T-Zellen wurden mit Parkin-spezifischer siRNA transfiziert. Gesamt-RNA wurde isoliert und Parkin-spezifische mRNA Mengen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die RNA-Mengen wurden mit Hilfe der Kontrollgene GAPDH und  $\beta$ -Actin normalisiert. Zu sehen ist die relative Menge an Parkin-mRNA. (B) Parallel zu (A) wurde endogenes Parkin-Protein mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-Parkin Antikörpers PRK8 analysiert.

Als nächstes wurde die physiologische Rolle von endogenem Parkin bei der Neuroprotektion untersucht. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit Parkin-spezifischer siRNA transfiziert und 48 Stunden später mit Rotenon ( $0,05 \mu\text{M}$ , 3h) behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Zelltod mit dem Trypan Blau-Exklusionsassay analysiert. Die Zellpellets wurden in einer Trypan Blau-Lösung resuspendiert und die blau angefärbten, toten Zellen ausgezählt. Im Vergleich zur Kontroll-siRNA führte der *Knock-down* von Parkin zu einem signifikanten Anstieg des Zelltods nach Rotenon-Behandlung (Abb. 49 A).

In einem zweiten Schritt sollte überprüft werden, ob der Anstieg des Zelltods mit Veränderungen der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion einhergeht. Es wurden

Luciferase-Reporterassays mit siRNA-behandelten Zellen durchgeführt. HEK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid NF- $\kappa$ B-Luc und Parkin-spezifischer siRNA co-transfiziert und drei Stunden mit PMA (10 und 20 ng/ml) behandelt. Nach weiteren fünf Stunden wurde die Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass der *Knock-down* von Parkin die Stress-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B signifikant beeinträchtigt. In Gegenwart von Parkin-spezifischer siRNA konnte NF- $\kappa$ B nicht mehr effizient aktiviert werden (Abb. 49 B).

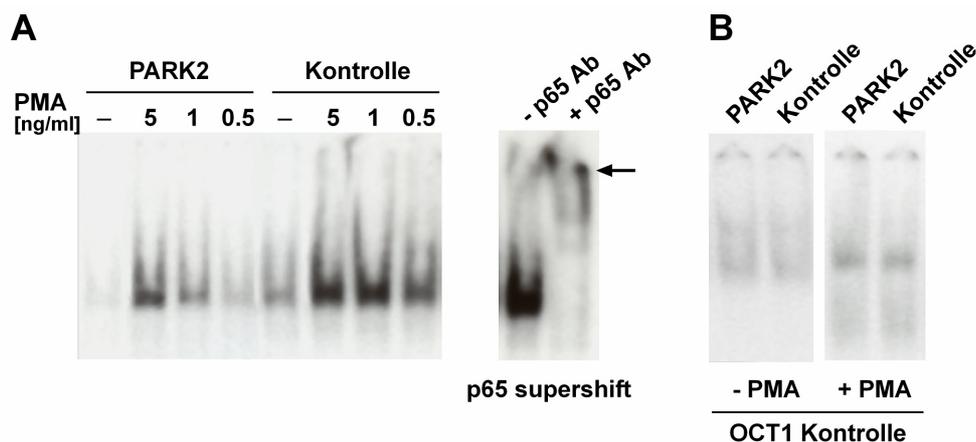


**Abbildung 49. *Knock-down* von Parkin steigert den Zelltod und beeinträchtigt die Stress-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B.** (A) HEK293T-Zellen wurden mit Parkin-spezifischer siRNA transfiziert und 48 Stunden später mit Rotenon (0,05  $\mu$ M, 3 h) behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Zelltod mit dem Trypan Blau-Exklusionsassay analysiert. Zu sehen ist der prozentuale Anteil der toten Zellen. (B) HEK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid NF- $\kappa$ B-Luc und Parkin-spezifischer siRNA co-transfiziert und für 3 Stunden mit PMA (10 und 20 ng/ml) behandelt. Nach weiteren 5 Stunden wurde die Luciferase-Aktivität luminometrisch bestimmt. Zu sehen ist die relative Luciferase-Aktivität.

#### 4.2.7.2 Analyse von PARK2 Patienten-Fibroblasten

Nachdem die *Knock-down* Experimente eindeutig gezeigt haben, dass Parkin essentiell für die Neuroprotektion und die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion ist, sollten die Ergebnisse der Zellkultur-Experimente mit Patientenmaterial verifiziert werden. Hierfür wurden primäre Hautfibroblasten eines Patienten mit autosomal rezessiver Parkinson-Erkrankung (PARK2) verwendet (Patienten- und Kontrollfibroblasten wurden freundlicherweise von Dr. Kazuhiro Nakaso, Department für Neurologie, Tottori Universität, Japan, zur Verfügung

gestellt). Dieser Patient besitzt zwei verschiedene Deletionen im Parkin-Gen (del Exon 3-4/del Exon 3-5), so dass kein Parkin-Protein exprimiert wird (Nakaso, K. *et al.* 2006). Die PARK2-Patientenfibroblasten wurden mittels EMSA (siehe Punkt 3.8.22) auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B untersucht (EMSAs wurden freundlicherweise von Anita Schlieff durchgeführt). Die Ergebnisse zeigten, dass die Patientenfibroblasten im Gegensatz zu den Kontrollfibroblasten nach verschiedenen Stressstimuli in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B deutlich beeinträchtigt sind. Signifikante Unterschiede in der Stress-induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B zeigten sich insbesondere bei geringen Konzentrationen von PMA (30 min, 0,5-5 ng/ml, Abb. 50 A, links). Um eine generelle transkriptionelle Beeinträchtigung der Patientenfibroblasten auszuschließen, wurde die Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors, nämlich von OCT1, in Kernextrakten von unbehandelten und PMA-behandelten PARK2- und Kontroll-Fibroblasten analysiert. Es konnte kein Unterschied beobachtet werden (Abb. 50 B).



**Abbildung 50. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist in Patientenfibroblasten beeinträchtigt. (A)** Fibroblasten von einem PARK2-Patienten oder Kontrollfibroblasten wurden für 30 Minuten mit PMA inkubiert. Die Kernextrakte wurden mittels EMSA auf die Bindeaktivität von NF- $\kappa$ B untersucht. Die mittlere Abbildung zeigt den Supershift, hervorgerufen durch Zugabe des polyklonalen Anti-p65 Antikörper zu Kernextrakten von PMA-behandelten Kontroll-Fibroblasten. **(B)** Zur Kontrolle wurde die Bindeaktivität von OCT1 in Kernextrakten von unbehandelten und PMA-behandelten PARK2-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten mittels EMSA analysiert.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Fibroblasten eines Patienten, der kein Parkin exprimiert, deutlich reduziert ist. Damit wurde ein erster Hinweis erbracht, dass die in dieser Arbeit erzielten Resultate aus dem Zellkultur-Modell von pathophysiologischer Relevanz sind.

#### 4.2.8 Zusammenfassung Teil 2:

##### Untersuchungen zur physiologischen Funktion von Parkin

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine breite neuroprotektive Wirkung von Parkin beobachtet. Um Einblicke in den Mechanismus dieses neuroprotektiven Potentials von Parkin zu erlangen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine mögliche Rolle von Parkin in protektiven Signaltransduktionswegen untersucht. Dabei konnten folgende neue Einblicke in die physiologische Funktion von Parkin gewonnen werden:

- Parkin ist ein Stress-reguliertes Protein
- Parkin aktiviert die NF- $\kappa$ B-regulierte Transkription
- Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ist essentiell für die neuroprotektive Aktivität von Parkin
- Parkin mediiert die nicht-proteolytische, regulierende Ubiquitylierung von zwei Komponenten der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade: IKK $\gamma$  und TRAF2

In der zu Beginn durchgeführten Analyse der zytoprotektiven Aktivität von Parkin gegenüber pathophysiologisch relevanten Stressoren bei der Parkinson-Erkrankung (Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Elektronen-Transportkette, Exzitotoxizität), konnte neben der neuroprotektiven Kapazität von Parkin auch dessen Stressinduzierbarkeit beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade essentiell ist für die neuroprotektive Wirkung von Parkin. Repressoren der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion hemmen das neuroprotektive Potential von Parkin und der *Knock-down* von endogenem Parkin führt zu vermehrtem Zelltod und einer geringeren Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach zellulärem Stress.

Die Studie lieferte Evidenz für die Rolle der E3-Ligase Parkin innerhalb des NF- $\kappa$ B Signalweges. Parkin vermittelt die nicht-proteolytische, regulierende Ubiquitylierung von zwei Komponenten der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade, IKK $\gamma$  und TRAF2. Beide Proteine finden sich in einem Komplex mit Parkin.

Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion essentiell für das neuroprotektive Potential von Parkin ist.

## 5. Diskussion

Die Ursachen der sporadischen Parkinson-Erkrankung sind weitgehend unbekannt. Die Identifizierung mehrerer monogen-erblicher Formen der Parkinson-Erkrankung revolutionierte die Forschung der letzten Jahre. Die Charakterisierung der dabei mutierten Genprodukte verspricht neue Einblicke in die Pathomechanismen der Parkinson-Erkrankung. Beide Formen – die sporadische und familiäre Parkinson-Erkrankung – weisen gemeinsame neuropathologische und klinische Charakteristika auf, vor allem den spezifischen Verlust dopaminerger Neuronen.

Mutationen im Parkin-Gen (PARK2) sind verantwortlich für eine autosomal rezessiv vererbte Form der Parkinson-Erkrankung. Der Funktionsverlust von Parkin führt offensichtlich zum dopaminergen Zelltod und somit zur Parkinson-Erkrankung. Welche Mechanismen für die Inaktivierung von Parkin verantwortlich sind und was die physiologische Funktion von Parkin insbesondere in dopaminergen Neuronen ist, ist weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich eingehend mit diesen fundamentalen Fragen der Parkin-Forschung. Im ersten Teil konnten verschiedene Mechanismen der Inaktivierung pathogener Parkin-Mutanten identifiziert werden (siehe Punkt 4.1). Im zweiten Teil konnte gezeigt werden, dass Parkin ein neuroprotektives Potential besitzt und welcher Mechanismus dieser Wirkung zugrunde liegt (siehe Punkt 4.2).

### 5.1 Pathogene Mutationen inaktivieren Parkin durch unterschiedliche Mechanismen

Das Vorhandensein der RING (*really interesting new gene*)-Konformation (RING1-IBR-RING2) legte nahe, dass Parkin eine E3-Ligase-Aktivität besitzt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten diese Aktivität zeigen (Imai, Y. *et al.* 2000; Shimura, H. *et al.* 2000; Zhang, Y. *et al.* 2000). Es ist vorstellbar, dass Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von Parkin führen, die katalytische Aktivität von Parkin beeinträchtigen oder die Interaktion mit Substraten/E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzymen. Da bisher nur putative, jedoch keine authentischen Parkin-Substrate identifiziert wurden, konnte die Wirkung von Mutationen im Parkin-Gen auf die

Substratubiquitylierung experimentell nicht untersucht werden. Deshalb wurde zu Beginn dieser Arbeit eine biochemische Charakterisierung von Parkin und Parkin-Mutanten in verschiedenen Zellkulturmodellen durchgeführt.

Aus diesem Projekt ging hervor, dass sowohl Missfaltung und Aggregation als auch Destabilisierung und vermehrte proteasomale Degradierung für die Inaktivierung verschiedener pathogener N- und C-terminaler Parkin-Mutanten verantwortlich sind.

### **5.1.1 Inaktivierung von Parkin durch Missfaltung und Aggregation**

In einer vorangegangenen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Parkin ein Protein ist, das zu Missfaltung und Aggregation neigt. Massiver oxidativer und thermischer Stress induziert die Missfaltung von Parkin und inaktiviert dieses somit (Winklhofer, K. F. *et al.* 2003). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Parkin nach proteasomaler Inhibierung in Aggresomen akkumuliert (Ardley, H. C. *et al.* 2003; Junn, E. *et al.* 2002; Muqit, M. M. *et al.* 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene humanpathogene C-terminale Deletionsmutanten von Parkin im Zellkulturmodell untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Funktionsverlust dieser Mutanten auf eine konstitutive Missfaltung zurückzuführen ist. Nach transienter Expression in N2a-Zellen waren mehr als 80% der C-terminalen Deletionsmutanten W453Stop, E409Stop oder Q311Stop in der Detergenz-unlöslichen Fraktion, wohingegen mehr als 90% von Wildtyp-Parkin in einer löslichen Konformation vorlag (vgl. Abb. 22). Entsprechend diesem Löslichkeitsprofil zeigten die C-terminalen Deletionsmutanten ein verändertes Sedimentationsverhalten. Während Wildtyp-Parkin ausschließlich in den oberen Fraktionen eines Sucrose-Gradienten detektiert werden konnte, waren die Mutanten W453Stop und E409Stop nahezu vollständig in der untersten Fraktion lokalisiert (vgl. Abb. 23). Dies deutete auf die Bildung großer Proteinaggregate hin. Diese Vermutung konnte in Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden. Die C-terminalen Deletionsmutanten zeigten eine signifikant veränderte zelluläre Lokalisierung in Vergleich zu Wildtyp-Parkin und lagen in Form von zytosolischen Aggregaten vor (vgl. Abb. 24).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die C-terminale Domäne für die native Faltung von Parkin von Bedeutung ist. Von besonderem Interesse ist die W453Stop-Mutante, der lediglich 13 C-terminale Aminosäuren fehlen, wobei die Deletion nicht in die RING-Box reicht. Deshalb stellte sich die Frage, wie viele C-terminale Aminosäuren deletiert werden können, ohne mit der Faltung von Parkin zu interferieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Deletion von bereits drei Aminosäuren die Missfaltung von Parkin induziert (Winklhofer, K. F. *et al.* 2003). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die C-terminale Domäne von Parkin von Bedeutung ist für intramolekulare Stabilisierung/Wechselwirkungen oder intermolekulare Interaktionen.

Aus der zellbiologischen Charakterisierung der Parkin-Mutanten ging hervor, dass die C-terminalen Deletionsmutanten nicht mit zellulären Membranen assoziieren. Anders verhielt es sich für Wildtyp-Parkin, welches nach subzellulärer Fraktionierung größtenteils in der Membran-Fraktion eines Dichtegradienten nachweisbar war. Interessanterweise konnten die N-terminal verkürzte Parkin-Spezies, der die *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne fehlt ebenso wie die pathogene Parkin-Mutante R42P (Mutation innerhalb der UBL) in der gleichen Fraktion wie Wildtyp-Parkin detektiert werden (vgl. Abb. 25). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die UBL-Domäne keine Rolle für die Assoziation von Parkin mit zellulären Membranen spielt. Es stellt sich die Frage, ob sich essentielle Strukturen hierfür in der C-terminalen Region von Parkin befinden und ob die Membranassoziiierung von funktioneller Relevanz ist. Eine Membranassoziation von Parkin wurde auch in anderen Studien beschrieben. Fallon *et al.* beschrieben die Co-Lokalisierung von Parkin mit dem Gerüst-Protein CASK an postsynaptischen Membranen (Fallon, L. *et al.* 2002), und Kubo *et al.* beobachteten eine Co-Fraktionierung mit dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und synaptischen Vesikeln (Kubo, S. I. *et al.* 2001). Die Identifizierung von putativen Parkin-Substraten wie CDCrel-1 und Synaptotagmin XI, welche mit synaptischen Vesikeln assoziiert sind (Huynh, D. P. *et al.* 2003; Zhang, Y. *et al.* 2000), lassen eine funktionelle Relevanz der subzellulären Lokalisierung von Parkin vermuten.

Unsere Ergebnisse zur Missfaltung von Parkin werfen folgende Fragen auf: Treten Aggregate auch *in vivo* (im Patienten) auf und haben diese Aggregate möglicherweise ein toxisches Potential? Bis jetzt gibt es noch keine Daten von Patienten mit C-terminalen Parkin-Deletionsmutationen. Aus diesem Grund haben

wir ein transgenes Maus-Modell generiert (Expression von W453Stop), das derzeit analysiert wird. In initialen Untersuchungen nach Überexpression von W453Stop in Zellkultur konnte kein erhöhter Zelltod beobachtet werden.

Die vorliegende Zellkulturstudie lieferte experimentelle Evidenz dafür, dass die Missfaltung von Parkin und seine Sequestrierung in Aggregate eine Ursache für den Funktionsverlust von Parkin sein können. Neuere Studien konnten zeigen, dass auch einige Parkin-Punktmutanten wie C289G, C418R und R475W in zellulären Einschlüssen in der Zelle vorliegen (Ardley, H. C. *et al.* 2003; Cookson, M. R. *et al.* 2003; Gu, W. J. *et al.* 2003; Muqit, M. M. *et al.* 2004; Sriram, S. R. *et al.* 2005; Wong, E. S. *et al.* 2007). Diese Beobachtungen zeigen, dass Missfaltung und Aggregation von Parkin nicht auf C-terminale Deletionsmutanten beschränkt ist.

Unsere Arbeiten zeigten, dass nicht nur Mutationen im Parkin-Gen zur Missfaltung von Parkin führen können, sondern auch massiver Stress (Henn, I. H. *et al.* 2005; Winklhofer, K. F. *et al.* 2003). Da dopaminerge Neuronen in hohem Maße oxidativem Stress ausgesetzt sind, liegt der Verdacht nahe, dass die Inaktivierung von Parkin nicht auf familiäre Parkinson-Erkrankungen beschränkt ist, sondern möglicherweise auch bei der sporadischen Parkinson-Erkrankung eine Rolle spielen könnte. Eine kürzlich publizierte Arbeit unterstützt dieses Szenario. LaVoie *et al.* beobachteten, dass Parkin in kultivierten dopaminergen Neuronen durch Dopamin-Chinon kovalent modifiziert wird (LaVoie, M. J. *et al.* 2005). Als Folge davon kommt es zur Missfaltung von Parkin und damit zu einem Verlust der E3-Ligase-Aktivität. Die Untersuchungen von *post mortem*-Hirngewebe bestätigten, dass missgefaltetes Parkin auch *in vivo* auftritt. Patienten mit sporadischer Parkinson-Erkrankung zeigen einen deutlich erhöhten Gehalt an missgefaltetem Parkin im Striatum. Ebenso kann Parkin durch S-Nitrosylierung inaktiviert werden, und auch diese Modifizierung konnte im Hirngewebe von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden (Chung, K. K. *et al.* 2004; Yao, D. *et al.* 2004).

### 5.1.2 Inaktivierung von Parkin durch Destabilisierung und vermehrte proteasomale Degradierung

Die Mehrheit der Missense-Mutationen findet sich in der C-terminalen RING-Box von Parkin. In den letzten Jahren konnten aber auch vermehrt Mutationen in der N-terminalen UBL-Domäne von Parkin identifiziert werden (siehe Punkt 1.2.4). Deshalb stellte sich die interessante Frage, worauf der Funktionsverlust dieser N-terminalen Mutanten beruht.

In der vorliegenden Zellkulturstudie wurde festgestellt, dass N-terminale Punktmutationen die Stabilität von Parkin beeinflussen. Nach transienter Expression der N-terminalen Punktmutanten R33Q, R42P, K48A und V56E waren die mutierten Proteine unter *steady-state*-Bedingungen, im Gegensatz zu Wildtyp-Parkin kaum detektierbar (vgl. Abb. 27). *Pulse/Chase*-Experimente nach metabolischer Markierung von Parkin zeigten, dass eine vermehrte Degradierung die Ursache der reduzierten Proteinmengen ist. Während 24 Stunden nach der Proteinsynthese noch mehr als 70% von Wildtyp-Vollängen-Parkin detektierbar war, ging die Proteinmenge von Vollängen-R42P auf 5% zurück (vgl. Abb. 31). Die Stabilität der kleineren Parkin-Spezies ( $\Delta 1-79$ ) wurde nicht beeinflusst, da diese die UBL-Mutationen nicht enthält. In Gegenwart des proteasomalen Inhibitors MG 132 konnte eine Stabilisierung der Parkin-Mutante R42P beobachtet werden (vgl. Abb. 31 C). Somit wurde Evidenz für eine erhöhte proteasomale Degradierung der Mutanten erbracht.

Über die Funktion der UBL-Domäne von Parkin herrscht Unklarheit. Einige Studien sprechen der UBL eine Rolle bei der Substrat-Erkennung (Shimura, H. *et al.* 2000) und Regulierung der Parkin-Expression (Finney, N. *et al.* 2003) zu. Es ist vorstellbar, dass die UBL-Domäne Protein-Protein-Interaktionen mediiert, welche einen Einfluss auf die Stabilität von Parkin haben. Diese Vermutung konnte jedoch durch eine vergleichende Stabilitätsuntersuchung von Vollängen-Parkin und  $\Delta$ UBL-Parkin widerlegt werden. Beide Proteine unterscheiden sich nicht bezüglich ihrer Stabilität (Daten nicht gezeigt).

Alle in dieser Studie analysierten *Missense*-Mutationen innerhalb der UBL führten zu einer verringerten Stabilität von Parkin und dessen rascher Degradierung durch das Proteasom. Eine neuere strukturelle NMR-Analyse der UBL von Parkin

schlägt die Interaktion der UBL-Domäne mit der Rpn10-Untereinheit des 26S-Proteasoms vor (Sakata, E. *et al.* 2003). Dies konnte experimentell allerdings nicht gezeigt werden. Interaktionen mit dem Proteasom wurden bereits für andere Proteine mit UBL-Domänen beobachtet (Hiyama, H. *et al.* 1999; Walters, K. J. *et al.* 2002). Interessanterweise wurde in den NMR-Analysen beobachtet, dass die Aminosäurepositionen 42 und 48 der UBL von Parkin innerhalb der putativen Rpn10-Bindedomäne lokalisiert sind (Sakata, E. *et al.* 2003). Sakata *et al.* schlossen daraus, dass die Substitution der ursprünglichen Aminosäuren Arginin-42 oder Lysin-48 durch Prolin (R42P) oder Glutaminsäure (K48E) zu einer Konformationsänderung der UBL von Parkin führt und so die Interaktion mit dem 26S-Proteasom beeinträchtigen könnte. Die vermehrte proteasomale Degradierung der mutierten Parkin-Formen könnte die Folge einer möglichen Konformationsänderung und Missfaltung sein.

## **5.2 Eine N-terminal verkürzte Parkin-Spezies, der die UBL fehlt, existiert *in vivo***

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *in vivo* zusätzlich zu Vollängen-Parkin eine kleinere Parkin-Spezies aufgrund der Präsenz eines internen Initiationscodons an Position 80 der humanen Aminosäure-Sequenz gebildet wird. Diese kleinere Parkin-Spezies ist gekennzeichnet durch das Fehlen der N-terminalen UBL-Domäne.

Interessanterweise ist die kleinere Parkin-Spezies auch in humanem Gehirn zu finden (Schlossmacher, M. G. *et al.* 2002; Shimura, H. *et al.* 1999; Staropoli, J. F. *et al.* 2003). Schlossmacher *et al.* diskutierten dabei die Möglichkeit, dass Vollängen-Parkin proteolytisch prozessiert wird und dadurch seine UBL-Domäne verliert. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da eine Mutation der putativen Schnittstelle die Generierung der kleineren Parkin-Spezies nicht verhindert (Schlossmacher, M. G. *et al.* 2002). Darüber hinaus wurde eine mögliche Schnittstelle für Caspasen beschrieben. Nach der Induktion von Apoptose würde Parkin demnach von Caspasen an der Peptidbindung Asp126-Ser127 geschnitten werden (Kahns, S. *et al.* 2003; Kahns, S. *et al.* 2002). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass eine Caspase-Aktivität vermutlich nur während der Apoptose auftritt und zur Generierung

eines 38 kDa-Fragments führen würde. Die durch das zweite Startcodon entstandene 42 kDa Parkin-Spezies ist jedoch unter physiologischen Bedingungen existent.

Wir beobachteten, dass das Vorhandensein des kleineren Parkin-Proteins spezifisch für humanes Parkin ist. Durch einen Parkin-Sequenzvergleich verschiedener Spezies konnte festgestellt werden, dass sich an Aminosäureposition 80 der humanen Parkin-Sequenz ein Methionin befindet, welches als internes Initiierungssignal fungieren könnte. Um diese Vermutung zu testen, wurde die Aminosäure Methionin an Position 80 gegen Leucin oder Threonin (entsprechend der Sequenz von Maus- bzw. Rattenparkin) ausgetauscht. Nach Expression dieser Mutanten wurde ausschliesslich Volllängen-Parkin generiert (vgl. Abb. 30). Es konnte somit gezeigt werden, dass *in vivo* zusätzlich zu Volllängen-Parkin eine kleinere Parkin-Spezies gebildet wird aufgrund des Vorhandenseins eines internen Initiationscodons an Position 80.

Welche Rolle könnte diese verkürzte Parkin-Spezies unter physiologischen Bedingungen spielen?

Um die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität dieser Parkin-Spezies zu untersuchen, wurde ein Ubiquitylierungsassays mit zellulären Lysat durchgeführt. Da bisher kein authentisches Substrat beschrieben wurde, wurde die Gesamtheit an ubiquitylierten Proteinen analysiert. Diese Versuche zeigten, dass die kleinere Parkin-Spezies ( $\Delta 1-79$ ) in ihrer Ligasesaktivität signifikant beeinträchtigt ist. Im Gegensatz zu Wildtyp-Parkin ist bei  $\Delta 1-79$ -exprimierenden Zellen die Menge an ubiquitylierten Proteinen wesentlich geringer (vgl. Abb. 32). Für einige putative Substrate konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein Fehlen der UBL die Parkin-medierte Ubiquitylierung beeinträchtigt (Corti, O. *et al.* 2003; Huynh, D. P. *et al.* 2003).

Der Einfluss der UBL-Deletion auf die neuroprotektive Wirkung von Parkin wurde mit Hilfe von Apoptose-Assays untersucht. Dabei konnte für die Mutante  $\Delta 1-79$  nach der Stressbehandlung mit Kainat (Exzitotoxizität) ein um ca. 50% reduziertes neuroprotektives Potenzial im Vergleich zu Wildtyp-Parkin beobachtet werden (vgl. Abb. 33). In Einklang mit unseren Beobachtungen konnte eine neuere Studie bestätigen, dass die Deletion der UBL den neuroprotektiven Effekt von Parkin gegenüber Ceramid-induziertem Zelltod aufhebt (Darios, F. *et al.* 2003).

---

Die bisherigen Ergebnisse haben demonstriert, dass die kleinere Parkin-Spezies ebenso wie Volllängen-Parkin an Membranen binden kann (vgl. Abb. 25) und sich beide Spezies in einem hochmolekularen Komplex finden (Winklhofer, K. F. *et al.* 2003). Somit stellt sich die Frage: Besitzt die die N-terminal verkürzte Parkin-Spezies physiologische Relevanz und kann sie womöglich einen Effekt auf Volllängen-Parkin ausüben? Es besteht die Möglichkeit, dass die kleinere Spezies keine physiologische Rolle spielt und lediglich als „Beiprodukt“ generiert wird. Es ist aber auch vorstellbar, dass die kleinere Parkin-Spezies einen regulierenden Einfluss auf Parkin ausübt entweder direkt als Komplexbestandteil oder indirekt über seine Genexpression (unterschiedliches Verhältnis der beiden Spezies). Ein dominant-negativer Effekt auf Volllängen-Parkin ist eher unwahrscheinlich, da nach heterologer Expression zum Teil 50%  $\Delta$ UBL-Parkin und 50% Volllängen-Parkin vorliegen. Zusätzliche Zellkultur-Analysen zeigten keinen Hinweis auf einen dominant-negativen Effekt (Daten nicht gezeigt).

Es bleibt allerdings hervorzuheben, dass die kleinere Parkin-Spezies funktionell weniger aktiv ist und  $\Delta$ UBL-Parkin mit hoher Wahrscheinlichkeit eine „pathogene Mutante“ darstellt. Eine Mutation im authentischen Startcodon von Parkin konnte kürzlich identifiziert werden (Mata, I. F. *et al.* 2004; Rawal, N. *et al.* 2003) und lässt die Generierung von N-terminal verkürztem Parkin vermuten. Die Spezifität des internen Startcodons in der humanen Parkin-Sequenz führt dazu, dass in neuronalen Zellen zwei Parkin-Spezies mit unterschiedlicher funktioneller Aktivität co-existieren. Dies könnte erklären, warum der Mensch besonders anfällig gegenüber einer Inaktivierung von Parkin ist.

Der erste Teil dieser Arbeit lieferte experimentelle Evidenz dafür, dass verschiedene humanpathogene Mutationen Parkin durch Missfaltung und Aggregation oder Destabilisierung inaktivieren. Aus den vorliegenden Daten wird ersichtlich, dass pathogene Mutationen die Funktion von Parkin durch verschiedene Mechanismen beeinflussen, wodurch die variablen Phänotypen bei Patienten mit autosomal-rezessiver Parkinson-Erkrankung erklärt werden könnten. Es bleibt zu klären, ob die in Zellkultur beobachteten biochemischen Charakteristika auch bei Parkinson-Patienten auftreten, welche die entsprechenden Mutationen tragen.

### 5.3 Parkin schützt neuronale Zellen vor Stress-induziertem Zelltod

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die physiologische Funktion von Parkin analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Parkin eine protektive Wirkung gegenüber verschiedenen Stressoren zeigt. Darüber hinaus lieferte diese Arbeit eine mechanistische Erklärung für die protektive Wirkung von Parkin. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion essentiell ist für das neuroprotektive Potential von Parkin.

#### 5.3.1 Parkin ist ein stress-induzierbares Protein mit neuroprotektiver Aktivität

Wir und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Parkin Zellen vor Stress-induziertem Zelltod schützen kann. Da Parkin durch massiven Stress infolge von Missfaltung inaktiviert wird (LaVoie, M. J. *et al.* 2005; Wang, C. *et al.* 2005; Winklhofer, K. F. *et al.* 2003, Chung, 2004 #1056; Yao, D. *et al.* 2004), wurden in der vorliegenden Studie moderate Stressbedingungen gewählt, die unter physiologischen Bedingungen auftreten. Zunächst konnte die neuroprotektive Aktivität von Parkin gegenüber zwei Parkinson-relevanten Stressoren festgestellt werden, nämlich der Hemmung von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und Exzitotoxizität (siehe Punkt 4.2.1). Die Hemmung von Komplex I wurde in unserem Zellkultur-Modell induziert durch Rotenon-Behandlung, während Exzitotoxizität durch Kainat-Behandlung ausgelöst wurde. In Gegenwart von Wildtyp-Parkin ging der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen nach Stressinduktion nahezu auf das Ausgangsniveau zurück. Im Vergleich dazu zeigten die pathogenen Mutanten R42P, G430D und  $\Delta$ N-Parkin nach der Stressbehandlung ein um ca. 50% reduziertes neuroprotektives Potential (vgl. Abb. 33).

Um weitere Hinweise für eine mögliche Rolle von Parkin in der zellulären Stressbewältigung zu erlangen, wurde die Transkription von endogenem Parkin unter Stressbedingungen mittels *Real-Time*-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass oxidativer Stress und Exzitotoxizität die Menge an Parkin-spezifischer mRNA sowohl in kultivierten Neuroblastomzellen als auch in primären Neuronen signifikant erhöhen. In Einklang mit der erhöhten Menge an Parkin-spezifischen Transkripten

konnte eine gesteigerte Expression des Parkin-Proteins festgestellt werden (vgl. Abb. 34). Die dargestellten Ergebnisse werden durch eine kürzlich publizierte Studie unterstützt, welche eine Aktivierung des Parkin-Promotors nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid in einem Luciferase-Reporterassay beschreibt (Tan, E. K. *et al.* 2005). Diese Untersuchungen lieferten Evidenz dafür, dass Parkin ein stress-induzierbares Protein mit neuroprotektiver Aktivität ist.

### **5.3.2 Die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion ist essentiell für die neuroprotektive Aktivität von Parkin**

Das erstaunlich breite zytoprotektive Potential von Parkin legte die Vermutung nahe, dass Parkin essentielle protektive Signalwege beeinflussen kann. Eine Analyse verschiedener Stress-induzierter Signaltransduktionswege konnte zeigen, dass Parkin die NF- $\kappa$ B-medierte Transkription aktivieren kann (siehe Punkt 4.2.3). Die im Verlauf dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lieferten Beweise dafür, dass die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade essentiell ist für die neuroprotektive Aktivität von Parkin.

Zunächst konnte ein Kausalzusammenhang zwischen der neuroprotektiven Aktivität von Parkin und der Fähigkeit, NF- $\kappa$ B zu aktivieren, festgestellt werden. Neuroprotektion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung waren bei pathogenen Parkin-Mutanten signifikant beeinträchtigt (siehe Punkt 4.2.1 und 4.2.4.1, Abb. 33 und 38). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass pathogene Parkin-Mutationen keinen kompletten Funktionsverlust zeigen, zumindest nicht nach Überexpression in Zellkultur. Die feinen Aktivitätsunterschiede von Parkin können aber im Laufe von Jahrzehnten durchaus pathophysiologisch relevant werden, besonders unter dem Aspekt, dass im Alter zellulärer Stress zunimmt.

Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges zum Verlust der neuroprotektiven Aktivität von Parkin führt (siehe Punkt 4.2.4.2). In Gegenwart des NF- $\kappa$ B-Superrepressors I $\kappa$ BAN oder der Kinase-inaktiven IKK $\beta$ -Mutante IKK $\beta$  K/A zeigte Parkin keine anti-apoptotischen Effekte unter Stressbedingungen, vielmehr konnte ein signifikanter Anstieg des Zelltodes beobachtet werden (vgl. Abb. 42).

Schließlich lieferten *Knock-down*-Analysen von Parkin weitere entscheidende Beweise dafür, dass Parkin essentiell für die Neuroprotektion und die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ist. So zeigten Zellen, die mit Parkin-spezifischer siRNA behandelt wurden, nach Stressbehandlung einen deutlichen Anstieg an Zelltod und gleichzeitig eine reduzierte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion (vgl. Abb. 49). Interessant ist hierbei, dass die kleinere Parkin-Spezies (siehe Punkt 4.1.2.2), welche auch in humanem Gehirn auftritt, in ihrer Fähigkeit, NF- $\kappa$ B zu aktivieren signifikant beeinträchtigt ist. Demzufolge zeigte sie auch ein vermindertes neuroprotektives Potential (siehe Diskussion, Punkt 5.2).

Die dargestellten Ergebnisse zeigten erstmalig, dass die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion essentiell für das neuroprotektive Potential von Parkin ist. Es stellte sich nun die Frage, auf welche Weise Parkin den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert bzw. welche Rolle die E3-Ligase-Aktivität von Parkin spielt.

### **5.3.3 Parkin mediert die regulierende Ubiquitylierung von zwei Komponenten der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion: IKK $\gamma$ und TRAF2**

Die Forschung der letzten Jahre konnte zeigen, dass Ubiquitin ein sehr vielseitiges Protein ist. Neben der konventionellen Ubiquitylierung, welche Proteine für den proteasomalen Abbau markiert, spielt die regulierende Ubiquitylierung eine Rolle bei zahlreichen zellulären Funktionen, einschließlich Endozytose, DNA-Reparatur und zelluläre Signaltransduktion. Zudem kann eine beträchtliche Variabilität in der Art der Ubiquitylierung festgestellt werden. So werden Mono-, Multi und Polyubiquitylierungen beobachtet (siehe Punkt 1.2.3.1.1).

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg ist beispielhaft für verschiedene Arten der Ubiquitinverknüpfung, die Degradierungs-abhängige und -unabhängige Funktionen medieren. Eine konventionelle Art der Ubiquitylierung im NF- $\kappa$ B-Signalweg stellt die Markierung von I $\kappa$ B für die proteasomale Degradierung ebenso wie die Induktion der proteasomalen Prozessierung der Vorläuferproteine p105 und p100 dar. Eine unkonventionelle, Degradierungs-unabhängige Anknüpfung einer Polyubiquitinkette ist essentiell für die Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes und erfordert die Ubiquitylierung von TRAF2 (*TNF receptor-associated*

*factor*), TRAF6, RIP (*receptor-interacting protein*) und IKK $\gamma$ /NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modifier*) (Chen, Z. J. 2005; Krappmann, D. und C. Scheidereit 2005).

Um eine mögliche Rolle der E3-Ubiquitin-Ligase Parkin im NF- $\kappa$ B-Signalweg zu klären, wurde analysiert, ob Parkin die Ubiquitylierung von Komponenten der Signalkaskade mediiieren kann. Es zeigte sich, dass transdominante Repressoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges (IKK $\beta$  K/A, I $\kappa$ B $\Delta$ N) mit der Parkin-mediierten Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription interferieren (siehe Punkt 4.2.4.2). Dies ließ vermuten, dass Parkin aktivierend auf den NF- $\kappa$ B-Signalwege auf oder oberhalb der Ebene des IKK-Signalsoms wirkt. In der Tat wurde in einer vergleichenden Analyse der Ubiquitylierung der Signalkomponenten TRAF2, TRAF6 und IKK $\gamma$  die Parkin-mediierte Ubiquitylierung von TRAF2 und IKK $\gamma$  beobachtet. Im Gegensatz zu Wildtyp-Parkin waren die pathogenen Mutanten  $\Delta$ UBL und R42P in dieser Fähigkeit signifikant beeinträchtigt (vgl. Abb. 44). Diese Mutanten sind charakterisiert durch eine geringere Aktivierung der NF- $\kappa$ B-regulierten Transkription sowie ein veringertes neuroprotektives Potential (siehe Punkt 4.2.1 und 4.2.3).

Mit Hilfe von Ubiquitin-Mutanten, welche die Verknüpfung der Ubiquitinkette lediglich über Lysin-48 (K48only) oder Lysin-63 (K63only) erlauben, konnte die Parkin-mediierte nicht-proteolytische, regulierende Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  über Lysin-63 identifiziert werden (siehe Punkt 4.2.5.2). Während nach Expression von K48only-Ubiquitin die Parkin-mediierte Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  deutlich verringert war, konnte Parkin in Gegenwart von K63only-Ubiquitin die Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  weiterhin vermitteln (vgl. Abb. 45). Stabilitätsuntersuchungen von IKK $\gamma$  bzw. TRAF2 in Gegenwart von Parkin bestätigten, dass Parkin keine degradierende, sondern eine unkonventionelle, regulierende Ubiquitylierung vermittelt.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch nicht klar, ob Parkin die Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  und TRAF2 direkt oder indirekt induziert. Co-Immunpräzipitations-Experimente haben gezeigt, dass Parkin mit IKK $\gamma$  und TRAF2 interagieren kann (vgl. Abb. 46) und legen den Verdacht nahe, dass sich diese Proteine zu einem Komplex assemblieren können. Unsere Untersuchungen konnten ausschließen, dass die erhöhte Ubiquitylierung von IKK $\gamma$  und TRAF2 in Gegenwart von Parkin durch die intrinsische E3-Ligase-Aktivität von TRAF2 vermittelt wird. In Gegenwart von

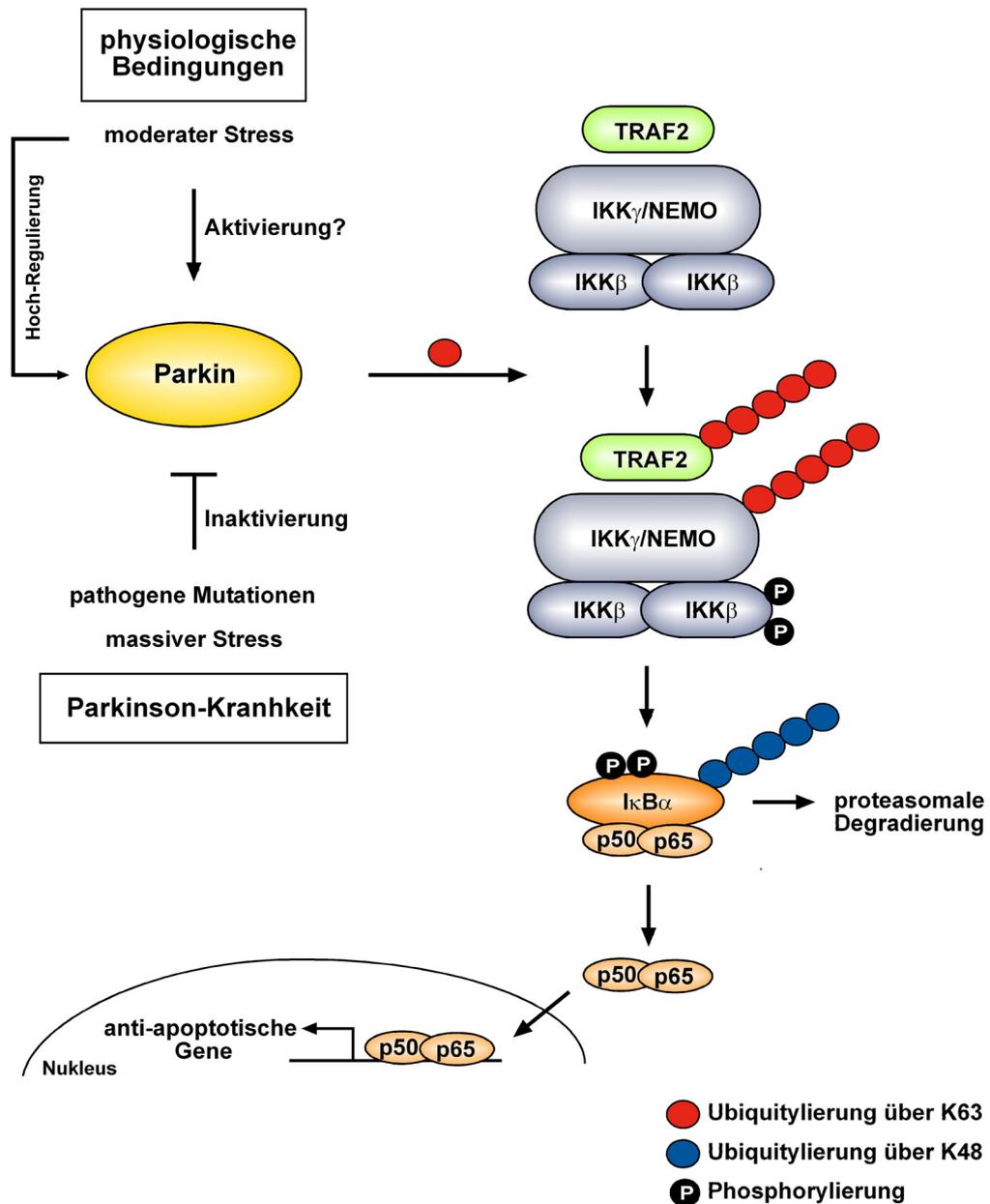
Parkin wurde auch eine erhöhte Ubiquitylierungsrate von TRAF2 $\Delta$ N beobachtet (vgl. Abb. 44), einer Mutante der die funktionelle N-terminale RING-Domäne fehlt. Interessanterweise wurde kürzlich *in vitro* die Interaktion von Parkin mit dem E2-Heterodimer Ubc13/Uev1a beschrieben (Doss-Pepe, E. W. *et al.* 2005; Matsuda, N. *et al.* 2006), welches der essentielle E2-Komplex für die TRAF2- und TRAF6-medierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist und die Polyubiquitylierung über Lysin-63 induziert (Andersen, P. L. *et al.* 2005; Deng, L. *et al.* 2000). Es bleibt in weiteren Analysen - vor allem *in-vivo*-Analysen - zu klären, ob Ubc13/Uev1a ein möglicher E2-Interaktionspartner von Parkin ist und dessen regulierende Ubiquitylierung von NF- $\kappa$ B-Signalkomponenten katalysiert. Es stellt sich ferner die Frage, wie die Parkin-vermittelte Ubiquitylierung (Lysin-48 oder Lysin-63) reguliert ist.

#### **5.3.4 Die Rolle von Parkin in dopaminergen Neuronen - Implikationen für die Parkinson-Erkrankung**

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Einblicke in die physiologische Funktion von Parkin gewonnen werden, welche das breite neuroprotektive Potential von Parkin erklären können.

Welche Rolle könnte Parkin speziell in dopaminergen Neuronen spielen? Die mögliche *in vivo*-Situation lässt sich mit Hilfe des nachfolgend abgebildeten Modells veranschaulichen (Abb. 51). Unter physiologischen Bedingungen kann moderater Stress zu einer Aktivierung von Parkin und dessen transkriptioneller Hoch-Regulierung führen. Der Mechanismus der Parkin-Aktivierung ist noch unbekannt, doch ist es vorstellbar, dass posttranslationale Modifikationen eine unmittelbare und schnelle Aktivierung bewerkstelligen könnten. Die Aktivierung des IKK-Komplexes erfolgt durch erhöhte regulierende Ubiquitylierung von TRAF2 und IKK $\gamma$  in Gegenwart von aktivem Parkin. Folge ist die Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade, die zur vermehrten Expression von anti-apoptischen Genen führt. Die vorliegende Studie konnte ferner zeigen, dass Parkin Zellen für bestimmte Stimuli sensibilisieren kann, d.h. es kann unter moderaten Stressbedingungen den Schwellenwert für die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade senken und so eine supra-additive Stressantwort induzieren (siehe Punkt 4.2.3, Abb. 37). In Falle der Parkinson-Erkrankung stellt sich eine andere Situation dar. Inaktivierende Parkin-

Mutationen und massiver Stress verursachen den Funktionsverlust von Parkin und bedingen eine ineffiziente Aktivierung die neuroprotektiven NF- $\kappa$ B-Signalkaskade. So ist es denkbar, dass die Inaktivierung von Parkin durch massiven Stress auch bei der sporadischen Parkinson-Erkrankung eine Rolle spielen kann.



**Abbildung 51. Modell der funktionellen Rolle von Parkin.** *Physiologische Bedingungen:* Parkin mediert die regulierende Ubiquitylierung von TRAF2 und IKK $\gamma$  nach einem moderaten Stressestimulus und induziert so die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Als Folge kommt es zu einer Hoch-Regulierung von anti-apoptischen Genen. Für eine unmittelbare und schnelle Stressantwort ist es vorstellbar, dass die Aktivität von Parkin durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird. *Parkinson-Erkrankung:* Inaktivierende Parkin-Mutationen und massiver Stress verursachen den Funktionsverlust von Parkin und bedingen eine ineffiziente Aktivierung der neuroprotektiven NF- $\kappa$ B-Signalkaskade.

Warum aber sind dopaminerge Neuronen besonders vulnerabel? Dopaminerge Neuronen in der SNpc sind bereits unter physiologischen Bedingungen erhöhtem Stress ausgesetzt. Neben oxidativem Stress durch den Metabolismus von Dopamin, kommt es auch zu vermehrter Exzitotoxizität durch glutamaterge Neurotransmission und ATP-Mangel. Ferner sind diese Neuronen charakterisiert durch ein geringeres Expressionsniveau von Parkin.

Aufgrund der Beobachtung, dass Parkin ein stress-reguliertes Protein ist, stellte sich die Frage, ob Parkin selbst durch NF- $\kappa$ B reguliert wird. In einer Analyse der Sequenz der Promotorregion konnte wir zwar zahlreiche Stress-abhängige Bindeelemente lokalisieren, aber keines für NF- $\kappa$ B. Wie aber ist die Aktivität von Parkin reguliert? In dem hier verwendeten zellulären Modellsystem ist bereits die Überexpression von Parkin ausreichend, um die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade effizient zu aktivieren (siehe Punkt 4.2.3). Unter physiologischen Bedingungen erscheint aber eine regulierte E3-Ligase-Aktivität von Parkin plausibler als eine konstitutive. Interessanterweise konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von Parkin Einfluss auf dessen Aktivität hat (Yamamoto, A. *et al.* 2005). In wieweit diese oder noch unbekannt posttranslationale Modifikationen oder Interaktionen die Funktion von Parkin regulieren können, müssen zukünftige Untersuchungen klären.

Welche Implikationen ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit für die Parkinson-Erkrankung? Die Aufklärung der pathogenen Mechanismen und die Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten stellen die größten Herausforderungen in der Parkinsonforschung dar. Die vorliegende Studie schafft einen Zusammenhang zwischen der Funktion von Parkin und der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion, und deutet somit darauf hin, dass eine Fehlregulierung dieses neuroprotektiven Signalweges eine pathophysiologische Rolle bei der Parkinson-Erkrankung spielt. Dafür spricht auch eine kürzlich publizierte Transkriptom-Analyse von post mortem-Gehirn von Parkinson-Patienten (Moran, L. B. *et al.* 2007). Pathogene Parkin-Mutanten sind in der Fähigkeit, die neuroprotektive NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion zu aktivieren, signifikant beeinträchtigt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ermöglichen neue Einblicke in die physiologische Funktion von Parkin und könnten den Weg für neue pharmakologische Ansätze ebnen.

Besonders die Analyse möglicher *Cross-Talks* zu anderen Signaltransduktionswegen verspricht die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien.

## 6. Zusammenfassung

Mutationen im Parkin-Gen sind verantwortlich für eine autosomal rezessiv vererbte Form der Parkinson-Erkrankung. Der Funktionsverlust von Parkin spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war lediglich bekannt, dass Parkin eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt und dass ein Funktionsverlust von Parkin offensichtlich zur Parkinson-Erkrankung führen kann.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei fundamentale Themenbereiche der Parkin-Forschung bearbeitet:

1. Die Analyse der Mechanismen der Inaktivierung von pathogenen Parkin-Mutanten.
2. Untersuchungen zur physiologischen Funktion von Parkin.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnten verschiedene Mechanismen der Parkin-Inaktivierung aufgeklärt werden, welche den Funktionsverlust von Parkin erklären. Pathogene C-terminale Deletionsmutationen (W453Stop, E409Stop und Q311Stop) führten zur Missfaltung und Aggregation von Parkin. Im Gegensatz zu Wildtyp-Parkin nahmen diese Mutanten spontan eine missgefaltete Konformation an und lagen in Form von zytosolischen Aggregaten vor. Pathogene Punktmutationen in der N-terminalen *Ubiquitin-like* (UBL)-Domäne (R33Q, R42P, K48A und V56E) verringerten die Stabilität von Parkin. Diese Mutanten wurden rasch über das Proteasom abgebaut. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass *in vivo* zusätzlich zu Vollängen-Parkin eine kleinere Parkin-Spezies entsteht. Diese kleinere Parkin-Spezies ist gekennzeichnet durch das Fehlen der N-terminalen UBL-Domäne und wird aufgrund des Vorhandenseins eines internen Startcodons an Position 80 der humanen Parkin-Sequenz gebildet.

Der zweite Teil der Arbeit konzentrierte sich auf die physiologische Funktion von Parkin. In Zellkultur-Modellen konnte festgestellt werden, dass Parkin nach Stressbehandlung hochreguliert wird und vor Stress-induziertem Zelltod schützt. Die Analyse von protektiven Signaltransduktionswegen konnte erstmalig zeigen, dass die Parkin-medierte Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion essentiell ist für das neuroprotektive Potential von Parkin. In Gegenwart von spezifischen Repressoren

der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade verlor Parkin seine protektive Wirkung in Stress-behandelten Zellen. Die vorliegende Arbeit lieferte Evidenz dafür, dass die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin die NF- $\kappa$ B-Signalkaskade durch eine vermehrte regulierende Ubiquitylierung der zwei Signalmoleküle, IKK $\gamma$  und TRAF2 aktiviert.

Die in dieser Doktorarbeit dargestellten Ergebnisse ermöglichen Einblicke in die physiologische Funktion von Parkin sowie die Mechanismen, die zum Funktionsverlust von Parkin führen. Darüber hinaus können diese neuen Erkenntnisse einen Beitrag leisten zum besseren Verständnis pathogener Mechanismen der Parkinson-Erkrankung.

---

## 7.Glossar

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
Ci	Curie
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium</i>
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhances Chemiluminescence</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
GS	Ziegenserum ( <i>goat serum</i> )
hP	humanes Parkin
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HS	Pferdeserum ( <i>horse serum</i> )

---

HSF	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor
Hsp	Hitzeschockprotein
IBR	<i>In-between</i> RING
IF	Immunfluoreszenz
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	10 <sup>3</sup> Dalton, Molekulargewicht von Proteinen
LB	Lewy-Körper ( <i>lewy body</i> )
MAO	Monoaminoxidase
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MG132	Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
NEM	N-Ethyl-Maleimid
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>B essential modifier</i>
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor - $\kappa$ B
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PET	Positron-Emissions-Tomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> - Ionenkonzentration
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo]- 2,7-naphthalendisulfonsäure
RING	<i>Really intersting new gene</i>
RIP	<i>Receptor interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )

---

rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Phosphatase ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SOD	Superoxiddismutase
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Enzymaktivität, Umsetzung von 1 $\mu$ mol Substanz/min, 1U = $1,667 \cdot 10^{-8}$ Kat
UBL	<i>ubiquitin-like</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
wt	Wildtyp

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben-Code bezeichnet. Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System benannt.

## 8. Literaturverzeichnis

Abeliovich, A., Y. Schmitz, *et al.* (2000). "Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system." Neuron **25**: 239-52.

Ananthan, J., A. L. Goldberg, *et al.* (1986). "Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes." Science **232**: 522-4.

Andersen, P. L., H. Zhou, *et al.* (2005). "Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A." J Cell Biol **170**: 745-55.

Ardley, H. C., G. B. Scott, *et al.* (2003). "Inhibition of proteasomal activity causes inclusion formation in neuronal and non-neuronal cells overexpressing Parkin." Mol Biol Cell **14**: 4541-56.

Arendt, C. S. und M. Hochstrasser. (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**: 7156-61.

Arenzana-Seisdedos, F., J. Thompson, *et al.* (1995). "Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B." Mol Cell Biol **15**: 2689-96.

Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, *et al.* (1997). "Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm." J Cell Sci **110 ( Pt 3)**: 369-78.

Baba, M., S. Nakajo, *et al.* (1998). "Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Am J Pathol **152**: 879-84.

Baeuerle, P. A. und T. Henkel. (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." Annu Rev Immunol **12**: 141-79.

Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-83.

Bandopadhyay, R., A. E. Kingsbury, *et al.* (2004). "The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease." Brain **127**: 420-30.

Barnes, P. J. und M. Karin. (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**: 1066-71.

- Baumeister, W., J. Walz, *et al.* (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." Cell **92**: 367-80.
- Beilina, A., M. Van Der Brug, *et al.* (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**: 5703-8.
- Bence, N. F., R. M. Sampat, *et al.* (2001). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation." Science **292**: 1552-5.
- Bloem, B. R., I. Irwin, *et al.* (1990). "The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease." J Neurol Sci **97**: 273-93.
- Bonifati, V., B. A. Oostra, *et al.* (2004). "Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease." J Mol Med **82**: 163-74. Epub 2004 Jan 08.
- Bonifati, V., P. Rizzu, *et al.* (2003). "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism." Science **299**: 256-9.
- Braun, B. C., M. Glickman, *et al.* (1999). "The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity." Nat Cell Biol **1**: 221-6.
- Casarejos, M. J., J. Menendez, *et al.* (2006). "Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline." J Neurochem **97**: 934-46.
- Chen, L. F. und W. C. Greene. (2004). "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." Nat Rev Mol Cell Biol **5**: 392-401.
- Chen, Z. J. (2005). "Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway." Nat Cell Biol **7**: 758-65.
- Choi, P., H. Snyder, *et al.* (2003). "SEPT5\_v2 is a parkin-binding protein." Brain Res Mol Brain Res **117**: 179-89.
- Chung, K. K., B. Thomas, *et al.* (2004). "S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function." Science **304**: 1328-31.
- Chung, K. K., Y. Zhang, *et al.* (2001). "Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease." Nat Med **7**: 1144-50.
- Ciechanover, A. und P. Brundin. (2003). "The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg." Neuron **40**: 427-46.

- Cookson, M. R., P. J. Lockhart, *et al.* (2003). "RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein." Hum Mol Genet **12**: 2957-65. Epub 003 Sep 30.
- Corti, O., C. Hampe, *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**: 1427-37.
- Dachsel, J. C., C. B. Lucking, *et al.* (2005). "Parkin interacts with the proteasome subunit alpha4." FEBS Lett **579**: 3913-9.
- Darios, F., O. Corti, *et al.* (2003). "Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death." Hum Mol Genet **12**: 517-26.
- Dauer, W. und S. Przedborski. (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**: 889-909.
- Davidson, W. S., A. Jonas, *et al.* (1998). "Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes." J Biol Chem **273**: 9443-9.
- Delhase, M., M. Hayakawa, *et al.* (1999). "Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation." Science **284**: 309-13.
- DeMartino, G. N. und C. A. Slaughter. (1999). "The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms." J Biol Chem **274**: 22123-6.
- Deng, L., C. Wang, *et al.* (2000). "Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." Cell **103**: 351-61.
- Dev, K. K., H. van der Putten, *et al.* (2003). "Part I: parkin-associated proteins and Parkinson's disease." Neuropharmacology **45**: 1-13.
- Ditzel, L., R. Huber, *et al.* (1998). "Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome." J Mol Biol **279**: 1187-91.
- Doss-Pepe, E. W., L. Chen, *et al.* (2005). "Alpha-synuclein and parkin contribute to the assembly of ubiquitin lysine 63-linked multiubiquitin chains." J Biol Chem **280**: 16619-24.
- Dubois, B., B. Pilon, *et al.* (1990). "Cholinergic deficiency and frontal dysfunction in Parkinson's disease." Ann Neurol **28**: 117-21.

- Eliezer, D., E. Kutluay, *et al.* (2001). "Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states." J Mol Biol **307**: 1061-73.
- Ellis, R. J. (1990). "The molecular chaperone concept." Semin Cell Biol **1**: 1-9.
- Ellis, R. J. und F. U. Hartl. (1999). "Principles of protein folding in the cellular environment." Curr Opin Struct Biol **9**: 102-10.
- Evans, P. C., H. Ovaa, *et al.* (2004). "Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity." Biochem J **378**: 727-34.
- Fahn, S. (1998). "Medical treatment of Parkinson's disease." J Neurol **245**: P15-24.
- Fallon, L., C. M. Belanger, *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**: 834-42.
- Fallon, L., F. Moreau, *et al.* (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**: 486-91.
- Farrer, M., P. Chan, *et al.* (2001). "Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations." Ann Neurol **50**: 293-300.
- Farrer, M., J. Kachergus, *et al.* (2004). "Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications." Ann Neurol **55**: 174-9.
- Fenteany, G., R. F. Standaert, *et al.* (1995). "Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin." Science **268**: 726-31.
- Finney, N., F. Walther, *et al.* (2003). "The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain." J Biol Chem **278**: 16054-8.
- Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." J Neuropathol Exp Neurol **55**: 259-72.
- Forno, L. S., J. W. Langston, *et al.* (1986). "Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys." Ann Neurol **20**: 449-55.
- Funayama, M., K. Hasegawa, *et al.* (2002). "A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1." Ann Neurol **51**: 296-301.
- Ghosh, S. und M. Karin. (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109** Suppl: S81-96.

- Ghosh, S., M. J. May, *et al.* (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 225-60.
- Giasson, B. I. und V. M. Lee. (2001). "Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease." *Neuron* **31**: 885-8.
- Giasson, B. I., I. V. Murray, *et al.* (2001). "A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly." *J Biol Chem* **276**: 2380-6.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, *et al.* (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." *Cell* **94**: 615-23.
- Gloeckner, C. J., N. Kinkl, *et al.* (2006). "The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity." *Hum Mol Genet* **15**: 223-32.
- Goldberg, M. S., S. M. Fleming, *et al.* (2003). "Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons." *J Biol Chem* **20**: 20.
- Greenamyre, J. T., T. B. Sherer, *et al.* (2001). "Complex I and Parkinson's disease." *IUBMB Life* **52**: 135-41.
- Greene, J. C., A. J. Whitworth, *et al.* (2003). "Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4078-83.
- Gu, W. J., O. Corti, *et al.* (2003). "The C289G and C418R missense mutations cause rapid sequestration of human Parkin into insoluble aggregates." *Neurobiol Dis* **14**: 357-64.
- Haglund, K. und I. Dikic. (2005). "Ubiquitylation and cell signaling." *Embo J* **24**: 3353-9.
- Hampe, C., H. Ardila-Osorio, *et al.* (2006). "Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity." *Hum Mol Genet* **15**: 2059-75.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* **381**: 571-9.
- Hartl, F. U. und M. Hayer-Hartl. (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." *Science* **295**: 1852-8.

- Hatano, Y., Y. Li, *et al.* (2004). "Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism." Ann Neurol **56**: 424-7.
- Hattori, N., H. Matsumine, *et al.* (1998). "Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene." Biochem Biophys Res Commun **249**: 754-8.
- Hayashi, S., K. Wakabayashi, *et al.* (2000). "An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene." Mov Disord **15**: 884-8.
- Hayden, M. S. und S. Ghosh. (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**: 2195-224.
- Haywood, A. F. und B. E. Staveley. (2004). "Parkin counteracts symptoms in a Drosophila model of Parkinson's disease." BMC Neurosci **5**: 14.
- Healy, D. G., P. M. Abou-Sleiman, *et al.* (2004). "Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1." Cell Tissue Res **318**: 189-94.
- Heller, U., K. F. Winklhofer, *et al.* (2003). "Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain." J Biol Chem **278**: 36139-47.
- Henn, I. H., J. M. Gostner, *et al.* (2005). "Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms." J Neurochem **92**: 114-22.
- Hershko, A. und A. Ciechanover. (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-79.
- Hershko, A., A. Ciechanover, *et al.* (2000). "Basic Medical Research Award. The ubiquitin system." Nat Med **6**: 1073-81.
- Herzog, J. und J. Volkmann. (2006). "[Non-medical neurosurgical Parkinson treatment]." Pharm Unserer Zeit **35**: 234-40.
- Heske, J., U. Heller, *et al.* (2004). "The C-terminal domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **279**: 5435-43.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 195-201.
- Higashi, Y., M. Asanuma, *et al.* (2004). "Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death." J Neurochem **89**: 1490-7.

Higuchi, R. (1990). Recombinant PCR. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White. San Diego, CA, USA, Academic Press: 177-83.

Hiyama, H., M. Yokoi, *et al.* (1999). "Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome." J Biol Chem **274**: 28019-25.

Hochstrasser, M. (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." Annu Rev Genet **30**: 405-39.

Hod, Y., S. N. Pentylala, *et al.* (1999). "Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-protein interaction." J Cell Biochem **72**: 435-44.

Hoehncka, J., L. Vidal, *et al.* (2002). "Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain." Arch Neurol **59**: 966-70.

Honbou, K., N. N. Suzuki, *et al.* (2003). "The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease." J Biol Chem **278**: 31380-4.

Hornykiewicz, O. (1982). "Imbalance of brain monoamines and clinical disorders." Prog Brain Res **55**: 419-29.

Hornykiewicz, O. und S. J. Kish. (1987). "Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease." Adv Neurol **45**: 19-34.

Hughes, A. J., S. E. Daniel, *et al.* (1991). "Idiopathic Parkinson's disease combined with multiple system atrophy. A clinicopathological report." Mov Disord **6**: 342-6.

Huynh, D. P., D. T. Nguyen, *et al.* (2007). "Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death." Exp Neurol **203**: 531-41.

Huynh, D. P., D. R. Scoles, *et al.* (2000). "Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells." Ann Neurol **48**: 737-44.

Huynh, D. P., D. R. Scoles, *et al.* (2003). "The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI." Hum Mol Genet **12**: 2587-97.

Hyun, D. H., M. Lee, *et al.* (2005). "Effect of overexpression of wild-type or mutant parkin on the cellular response induced by toxic insults." J Neurosci Res **82**: 232-44.

Imai, Y., M. Soda, *et al.* (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., M. Soda, *et al.* (2001). "An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of parkin." Cell **105**: 891-902.
- Imai, Y., M. Soda, *et al.* (2000). "Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity." J Biol Chem **275**: 35661-4.
- Ishikawa, A. und H. Takahashi. (1998). "Clinical and neuropathological aspects of autosomal recessive juvenile parkinsonism." J Neurol **245**: P4-9.
- Itier, J. M., P. Ibanez, *et al.* (2003). "Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse." Hum Mol Genet **12**: 2277-91.
- Jiang, H., Y. Ren, *et al.* (2004). "Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis." Hum Mol Genet **13**: 1745-54.
- Joazeiro, C. A. und A. M. Weissman. (2000). "RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity." Cell **102**: 549-52.
- Jolly, C. und R. I. Morimoto. (2000). "Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death." J Natl Cancer Inst **92**: 1564-72.
- Junn, E., S. S. Lee, *et al.* (2002). "Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment." J Biol Chem **277**: 47870-7.
- Kahns, S., M. Kalai, *et al.* (2003). "Caspase-1 and caspase-8 cleave and inactivate cellular parkin." J Biol Chem **278**: 23376-80.
- Kahns, S., S. Lykkebo, *et al.* (2002). "Caspase-mediated parkin cleavage in apoptotic cell death." J Biol Chem **277**: 15303-8.
- Kalia, S. K., S. Lee, *et al.* (2004). "BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration." Neuron **44**: 931-45.
- Kaltschmidt, B., D. Widera, *et al.* (2005). "Signaling via NF-kappaB in the nervous system." Biochim Biophys Acta **1745**: 287-99.
- Karin, M. (1999a). "The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation." J Biol Chem **274**: 27339-42.
- Karin, M. (1999b). "How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex." Oncogene **18**: 6867-74.
- Karin, M. und Y. Ben-Neriah. (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-63.

- Karin, M. und A. Lin. (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." Nat Immunol **3**: 221-7.
- Kitada, T., S. Asakawa, *et al.* (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal parkinsonism." Nature **392**: 605-8.
- Klein, R. L., R. D. Dayton, *et al.* (2006). "Parkin is protective for substantia nigra dopamine neurons in a tau gene transfer neurodegeneration model." Neurosci Lett **401**: 130-5.
- Ko, H. S., S. W. Kim, *et al.* (2006). "Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate." J Biol Chem **281**: 16193-6.
- Ko, H. S., R. von Coelln, *et al.* (2005). "Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death." J Neurosci **25**: 7968-78.
- Krappmann, D., E. N. Hatada, *et al.* (2000). "The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component." J Biol Chem **275**: 29779-87.
- Krappmann, D., A. Patke, *et al.* (2001). "B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's." Mol Cell Biol **21**: 6640-50.
- Krappmann, D. und C. Scheidereit. (2005). "A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways." EMBO Rep **6**: 321-6.
- Krappmann, D., F. G. Wulczyn, *et al.* (1996). "Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor IkappaB alpha in vivo." Embo J **15**: 6716-26.
- Kruger, R., W. Kuhn, *et al.* (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." Nat Genet **18**: 106-8.
- Kubo, S. I., T. Kitami, *et al.* (2001). "Parkin is associated with cellular vesicles." J Neurochem **78**: 42-54.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4." Nature **227**: 680-5.
- Lang, A. E. und A. M. Lozano. (1998a). "Parkinson's disease. First of two parts." N Engl J Med **339**: 1044-53.

- Lang, A. E. und A. M. Lozano. (1998b). "Parkinson's disease. Second of two parts." N Engl J Med **339**: 1130-43.
- LaVoie, M. J., B. L. Ostaszewski, *et al.* (2005). "Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin." Nat Med **11**: 1214-21.
- Lee, S. J., S. J. Kim, *et al.* (2003). "Crystal structures of human DJ-1 and Escherichia coli Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain." J Biol Chem **278**: 44552-9. Epub 2003 Aug 25.
- Leroy, E., R. Boyer, *et al.* (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." Nature **395**: 451-2.
- Lim, K. L., K. C. Chew, *et al.* (2005). "Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation." J Neurosci **25**: 2002-9.
- Liu, Y., L. Fallon, *et al.* (2002). "The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility." Cell **111**: 209-18.
- Lo Bianco, C., B. L. Schneider, *et al.* (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**: 17510-5.
- Lockhart, P. J., R. Bounds, *et al.* (2004). "Lack of mutations in DJ-1 in a cohort of Taiwanese ethnic Chinese with early-onset parkinsonism." Mov Disord **19**: 1065-9.
- Lorenzetti, D., B. Antalffy, *et al.* (2004). "The neurological mutant quaking(viable) is Parkin deficient." Mamm Genome **15**: 210-7.
- Maroteaux, L., J. T. Campanelli, *et al.* (1988). "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." J Neurosci **8**: 2804-15.
- Marsden, C. D. (1983). "Neuromelanin and Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl **19**: 121-41.
- Martinat, C., S. Shendelman, *et al.* (2004). "Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES- derived cell model of primary parkinsonism." PLoS Biol **2**: e327.
- Mata, I. F., P. J. Lockhart, *et al.* (2004). "Parkin genetics: one model for Parkinson's disease." Hum Mol Genet **13** Spec No 1: R127-33.
- Matsuda, N., T. Kitami, *et al.* (2006). "Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro." J Biol Chem **281**: 3204-9.

- Matsumine, H., Y. Yamamura, *et al.* (1998). "Early onset parkinsonism with diurnal fluctuation maps to a locus for juvenile parkinsonism." Neurology **50**: 1340-5.
- Mattson, M. P., C. Culmsee, *et al.* (2000). "Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity." J Neurochem **74**: 443-56.
- McCormack, A. L., M. Thiruchelvam, *et al.* (2002). "Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat." Neurobiol Dis **10**: 119-27.
- McKenna, S., L. Spyropoulos, *et al.* (2001). "Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein Mms2 is required for Ubc13-mediated polyubiquitination." J Biol Chem **276**: 40120-6.
- McNaught, K. S., C. Mytilineou, *et al.* (2002). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures." J Neurochem **81**: 301-6.
- McNaught, K. S. und C. W. Olanow. (2003). "Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease." Ann Neurol **53** Suppl 3: S73-84; discussion S-6.
- McNaught, K. S. und C. W. Olanow. (2006). "Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease." Neurobiol Aging **27**: 530-45.
- Menendez, J., J. A. Rodriguez-Navarro, *et al.* (2006). "Suppression of Parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human-mutated tau protein." Hum Mol Genet **15**: 2045-58.
- Mitsumoto, A., Y. Nakagawa, *et al.* (2001). "Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat." Free Radic Res **35**: 301-10.
- Moore, D. J. (2006). "Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase." Biochem Soc Trans **34**: 749-53.
- Moore, D. J., A. B. West, *et al.* (2005a). "Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease." Annu Rev Neurosci **28**: 57-87.
- Moore, D. J., L. Zhang, *et al.* (2005b). "Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress." Hum Mol Genet **14**: 71-84.
- Moran, L. B., E. Croisier, *et al.* (2007). "Analysis of alpha-synuclein, dopamine and parkin pathways in neuropathologically confirmed parkinsonian nigra." Acta Neuropathol (Berl) **113**: 253-63.

- Morett, E. und P. Bork. (1999). "A novel transactivation domain in parkin." Trends Biochem Sci **24**: 229-31.
- Mori, H., T. Kondo, *et al.* (1998). "Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q." Neurology **51**: 890-2.
- Morimoto, R. I., D. A. Jurivich, *et al.* (1994). Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. R. I. Morimoto, A. Tissieres, *et al.*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Muqit, M. M., S. M. Davidson, *et al.* (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**: 117-35. Epub 2003 Nov 25.
- Nakajima, T., T. Nimura, *et al.* (2003). "The impact of stereotactic pallidal surgery on the dopamine D2 receptor in Parkinson disease: a positron emission tomography study." J Neurosurg **98**: 57-63.
- Nakaso, K., Y. Adachi, *et al.* (2006). "Detection of compound heterozygous deletions in the parkin gene of fibroblasts in patients with autosomal recessive hereditary parkinsonism (PARK2)." Neurosci Lett **400**: 44-7.
- Netzer, W. J. und F. U. Hartl. (1998). "Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms." Trends Biochem Sci **23**: 68-73.
- Nikulina, E. M., J. A. Skrinskaya, *et al.* (1995). "Dopaminergic brain system in the quaking mutant mouse." Pharmacol Biochem Behav **50**: 333-7.
- Nover, L., K. D. Scharf, *et al.* (1996). "The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors." Cell Stress Chaperones **1**: 215-23.
- Okochi, M., J. Walter, *et al.* (2000). "Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein." J Biol Chem **275**: 390-7.
- Oliveira, S. A., W. K. Scott, *et al.* (2003). "Parkin mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease." Ann Neurol **53**: 624-9.
- Paisan-Ruiz, C., A. E. Lang, *et al.* (2005). "LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study." Neurology **65**: 696-700.
- Palacino, J. J., D. Sagi, *et al.* (2004). "Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice." J Biol Chem **279**: 18614-22.

- 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**: 1160-3.
- Park, S. M., H. Y. Jung, *et al.* (2002). "Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone." J Biol Chem **277**: 28512-20.
- Pawlyk, A. C., B. I. Giasson, *et al.* (2003). "Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age." J Biol Chem **278**: 48120-8. Epub 2003 Sep 12.
- Pearce, R. K., A. Owen, *et al.* (1997). "Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease." J Neural Transm **104**: 661-77.
- Perez, F. A. und R. D. Palmiter. (2005). "Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism." Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 2174-9.
- Petit, A., T. Kawarai, *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**: 34025-32.
- Petrucelli, L., C. O'Farrell, *et al.* (2002). "Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons." Neuron **36**: 1007-19.
- Pickart, C. M. (2000). "Ubiquitin in chains." Trends Biochem Sci **25**: 544-8.
- Pickart, C. M. und D. Fushman. (2004). "Polyubiquitin chains: polymeric protein signals." Curr Opin Chem Biol **8**: 610-6.
- Pirkkala, L., T. P. Alastalo, *et al.* (2000). "Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway." Mol Cell Biol **20**: 2670-5.
- Polymeropoulos, M. H., J. J. Higgins, *et al.* (1996). "Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23." Science **274**: 1197-9.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, *et al.* (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**: 2045-7.
- Ravid, T. und M. Hochstrasser. (2004). "NF-kappaB signaling: flipping the switch with polyubiquitin chains." Curr Biol **14**: R898-900.
- Rawal, N., M. Periquet, *et al.* (2003). "New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism." Neurology **60**: 1378-81.

- Ren, Y., J. Zhao, *et al.* (2003). "Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation." J Neurosci **23**: 3316-24.
- Riess, O., W. Kuhn, *et al.* (2000). "Genetic influence on the development of Parkinson's disease." J Neurol **247** Suppl 2: II69-74.
- Rosen, K. M., V. Veereshwarayya, *et al.* (2006). "Parkin protects against mitochondrial toxins and beta-amyloid accumulation in skeletal muscle cells." J Biol Chem **281**: 12809-16.
- Rothe, M., V. Sarma, *et al.* (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." Science **269**: 1424-7.
- Rubin, D. M., M. H. Glickman, *et al.* (1998). "Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome." Embo J **17**: 4909-19.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-91.
- Sakata, E., Y. Yamaguchi, *et al.* (2003). "Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain." EMBO Rep. **4**: 301-6.
- Sambrook, J., E. Fritsch, *et al.* (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**: 5463-7.
- Sato, S., T. Chiba, *et al.* (2006). "14-3-3eta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase." Embo J **25**: 211-21.
- Schandel, K. A. und D. D. Jenness. (1994). "Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor." Mol Cell Biol **14**: 7245-55.
- Schlossmacher, M. G., M. P. Frosch, *et al.* (2002). "Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies." Am J Pathol **160**: 1655-67.
- Shapira, L., V. Barak, *et al.* (1998). "Effects of tetracyclines on the pathologic activity of endotoxin: in vitro and in vivo studies." Adv Dent Res **12**: 119-22.
- Shendelman, S., A. Jonason, *et al.* (2004). "DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation." PLoS Biol **2**: e362.

Sherer, T. B., R. Betarbet, *et al.* (2003). "Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease." Neurosci Lett **341**: 87-90.

Sherer, T. B., R. Betarbet, *et al.* (2002). "An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage." J Neurosci **22**: 7006-15.

Sherman, M. Y. und A. L. Goldberg. (2001). "Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases." Neuron **29**: 15-32.

Shimura, H., N. Hattori, *et al.* (2000). "Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase." Nat Genet **25**: 302-5.

Shimura, H., N. Hattori, *et al.* (1999). "Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients." Ann Neurol **45**: 668-72.

Shimura, H., M. G. Schlossmacher, *et al.* (2001). "Ubiquitination of a new form of alpha- brain: implications for Parkinson's disease." Science **293**: 263-9.

Sian, J., D. T. Dexter, *et al.* (1994). "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia." Ann Neurol **36**: 348-55.

Sidman, R. L., M. M. Dickie, *et al.* (1964). "Mutant Mice (Quaking and Jimpy) with Deficient Myelination in the Central Nervous System." Science **144**: 309-11.

Singleton, A. B., M. Farrer, *et al.* (2003). "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." Science **302**: 841.

Sizemore, N., S. Leung, *et al.* (1999). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit." Mol Cell Biol **19**: 4798-805.

Smith, W. W., Z. Pei, *et al.* (2005). "Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 18676-81.

Spillantini, M. G., R. A. Crowther, *et al.* (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**: 6469-73.

Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, *et al.* (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." Nature **388**: 839-40.

- Sriram, S. R., X. Li, *et al.* (2005). "Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin." Hum Mol Genet **14**: 2571-86.
- Staropoli, J. F., C. McDermott, *et al.* (2003). "Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity." Neuron **37**: 735-49.
- Taira, T., Y. Saito, *et al.* (2004). "DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death." EMBO Rep **5**: 213-8.
- Takahashi, H., E. Ohama, *et al.* (1994). "Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family." Neurology **44**: 437-41.
- Takahashi, K., T. Taira, *et al.* (2001). "DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor." J Biol Chem **276**: 37556-63.
- Tan, E. K., K. Y. Puong, *et al.* (2005). "Impaired transcriptional upregulation of Parkin promoter variant under oxidative stress and proteasomal inhibition: clinical association." Hum Genet **118**: 484-8.
- Tanner, C. M. und Y. Ben-Shlomo. (1999). "Epidemiology of Parkinson's disease." Adv Neurol **80**: 153-9.
- Tao, X. und L. Tong. (2003). "Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease." J Biol Chem **278**: 31372-9.
- Taylor, J. P., I. F. Mata, *et al.* (2006). "LRRK2: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention?" Trends Mol Med **12**: 76-82.
- Tegethoff, S., J. Behlke, *et al.* (2003). "Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation." Mol Cell Biol **23**: 2029-41.
- Terreni, L., E. Calabrese, *et al.* (2001). "New mutation (R42P) of the parkin gene in the ubiquitinlike domain associated with parkinsonism." Neurology **56**: 463-6.
- Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**: 4350-4.
- Tsai, Y. C., P. S. Fishman, *et al.* (2003). "Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function." J Biol Chem **278**: 22044-55.

- Tsubuki, S., H. Kawasaki, *et al.* (1993). "Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome." Biochem Biophys Res Commun **196**: 1195-201.
- Udelsman, R., M. J. Blake, *et al.* (1994). "Endocrine control of stress-induced heat shock protein 70 expression in vivo." Surgery **115**: 611-6.
- Um, J. W., D. S. Min, *et al.* (2006). "Parkin ubiquitinates and promotes the degradation of RanBP2." J Biol Chem **281**: 3595-603.
- Unoki, M. und Y. Nakamura. (2001). "Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway." Oncogene **20**: 4457-65.
- Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, *et al.* (2004). "Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1." Science **304**: 1158-60.
- Vila, M. und S. Przedborski. (2003). "Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **4**: 365-75.
- Vila, M. und S. Przedborski. (2004). "Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease." Nat Med **10**: S58-62.
- Volkman, J. (2004). "Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease." J Clin Neurophysiol **21**: 6-17.
- Von Coelln, R., B. Thomas, *et al.* (2004). "Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 10744-9.
- Walters, K. J., M. F. Kleijnen, *et al.* (2002). "Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a." Biochemistry **41**: 1767-77.
- Wang, C., H. S. Ko, *et al.* (2005). "Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function." Hum Mol Genet **14**: 3885-97.
- Wang, Q. und A. Chang. (1999). "Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast." EMBO J **18**: 5972-82.
- West, A., M. Periquet, *et al.* (2002). "Complex relationship between Parkin mutations." Am J Med Genet **114**: 584-91.
- West, A. B. und N. T. Maidment. (2004). "Genetics of parkin-linked disease." Hum Genet **114**: 327-36.

- West, A. B., D. J. Moore, *et al.* (2005). "Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 16842-7.
- Wilson, M. A., J. L. Collins, *et al.* (2003). "The 1.1-Å resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 9256-61.
- Winklhofer, K. F. (2006). "[Inactivation of parkin in Parkinson disease]." Pharm Unserer Zeit **35**: 186-7.
- Winklhofer, K. F., A. Reintjes, *et al.* (2001). "Geldanamycin restores a defective heat shock response *in vivo*." J Biol Chem **276**: 45160-7.
- Winklhofer, K. F., I. H. Henn, *et al.* (2003). "Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations; a protective role of molecular chaperones." J Biol Chem **278**: 47199-208.
- Wolf, D. H. und W. Hilt. (2004). "The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal." Biochim Biophys Acta **1695**: 19-31.
- Wong, E. S., J. M. Tan, *et al.* (2007). "Relative sensitivity of parkin and other cysteine-containing enzymes to stress-induced solubility alterations." J Biol Chem.
- Wszolek, Z. K., R. F. Pfeiffer, *et al.* (2004). "Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology." Neurology **62**: 1619-22.
- Yamamoto, A., A. Friedlein, *et al.* (2005). "Parkin phosphorylation and modulation of its E3 ubiquitin ligase activity." J Biol Chem **280**: 3390-9.
- Yang, Y., I. Nishimura, *et al.* (2003). "Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*." Neuron **37**: 911-24.
- Yao, D., Z. Gu, *et al.* (2004). "Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 10810-4.
- Yokota, T., K. Sugawara, *et al.* (2003). "Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition." Biochem Biophys Res Commun **312**: 1342-8.
- Young, J. C., V. R. Agashe, *et al.* (2004). "Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol." Nat Rev Mol Cell Biol **5**: 781-91.
- Zarranz, J. J., J. Alegre, *et al.* (2004). "The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia." Ann Neurol **55**: 164-73.

Zhang, Y., J. Gao, *et al.* (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**: 13354-9.

Zhao, J., Y. Ren, *et al.* (2003). "Parkin is recruited to the centrosome in response to inhibition of proteasomes." J Cell Sci **116**: 4011-9. Epub 2003 Aug 19.

Zhong, H., H. SuYang, *et al.* (1997). "The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism." Cell **89**: 413-24.

Zimprich, A., B. Muller-Myhsok, *et al.* (2004). "The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval." Am J Hum Genet **74**: 11-9.

## 9. Publikationen

Konstanze F. Winklhofer, **Iris H. Henn**, Penelope C. Kay-Jackson, Ulrich Heller und Jörg Tatzelt (2003). "Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones." Journal of Biological Chemistry **278**: 47199-208.

**Iris H. Henn**, Johanna M. Gostner, Peter Lackner, Jörg Tatzelt und Konstanze F. Winklhofer (2005). "Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms." Journal of Neurochemistry **92**: 114-121.

**Iris H. Henn**, Lena Bouman, Julia S. Schlehe, Anita Schlierf, Julia E. Schramm, Elmar Wegener, Kazuhiro Nakaso, Carsten Culmsee, Benedikt Berninger, Daniel Krappmann, Jörg Tatzelt und Konstanze F. Winklhofer (2007). "Parkin mediates neuroprotection through activation of IKK/NF- $\kappa$ B signaling." Journal of Neuroscience **27**: 1868-1878.

## 10. Lebenslauf

Name:	Iris H. Henn
Geburtstag:	19.10.1978
Geburtsort	Miltenberg
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand	Ledig
1985-1989	Grundschule, Miltenberg
1989-1998	Johannes-Butzbach-Gymnasium, Miltenberg
1998-2002	Studium der Pharmazeutischen Chemie an der Fachhochschule Isny der Naturwissenschaftlich-Technischen Akademie Prof. Dr. Grübler gGmbH, Isny/Allgäu
09/2000-02/2001	Praxissemester bei der Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Friedberg, Praktische Ausbildung in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung
03/2002 bis 11/2002	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung Zelluläre Biochemie (F.-U. Hartl), Arbeitsgruppe: J. Tatzelt Thema: Biochemische und zellbiologische Charakterisierung von Parkin und krankheitsassoziiertes Parkin-Mutanten
12/2002	Diplom [Dipl.-Ing. (FH) Pharmazeutische Chemie]
02/2003-03/2007	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung Zelluläre Biochemie (F.-U. Hartl),
seit 01/2006	Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Abteilung Biochemie (C. Haass), Arbeitsgruppe: K.F. Winklhofer Thema: Die Rolle von Parkin bei der Parkinson-Erkrankung: Physiologische Funktion und Mechanismen der Inaktivierung