

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Hans A. Kretzschmar

Einzelmolekülbasierte Aggregationsanalyse von Alpha-Synuclein und Tau-Protein

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwigs Maximilians Universität, München

vorgelegt von

Benedikt Ludwig Wassilij Bader
aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Armin Giese

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Dan Rujescu

Priv. Doz. Dr. Alexander Faußner

Prof. Dr. Jörg Tatzelt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Jan Bieschke

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Bieschke, J. G., Giese, A., Bertsch, U., Weber, P., Levin, J., Bader, B., Kretzschmar, H. (2003) Single molecule fluorescence detection and characterization of amyloid protein aggregation, *Biophysical Journal*, 2:313A

Giese, A., Bader, B., Bieschke, J., Schaffar, G., Odoy, S., Kahle, P. J., Haass, C., Kretzschmar, H. (2005) Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 4:1202-1210

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Neurodegenerative Erkrankungen des Menschen	4
1.2.	Synucleinopathien	5
1.3.	Das Alpha-Synuclein Protein	7
1.3.1.	Die Synuclein Proteinfamilie	7
1.3.2.	Alpha-Synuclein	8
1.4.	Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	13
1.4.1.	Theoretische Grundlagen der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie.....	13
1.4.2.	Konfokaler Versuchsaufbau	15
1.5.	Zielsetzung.....	20
2.	Material und Methoden.....	22
2.1.	Materialien.....	22
2.1.1.	Puffer- und Stammlösungen.....	25
2.1.2.	Synuclein-Proteine	27
2.1.3.	Fluoreszenzfarbstoffe	28
2.1.4.	Liquorproben.....	29
2.2.	Proteinsynthese	30
2.2.1.	Synuclein	30
2.2.2.	Tau.....	31
2.3.	Gelelektrophorese und Westernblot	32
2.4.	Proteinbestimmung.....	34
2.4.1.	BCA Methode	34
2.4.2.	OD280 Methode	34
2.5.	Fluoreszenzmarkierung	35
2.5.1.	Markierungsansatz	35
2.5.2.	Evaluierung der markierten Proteinsonden	36
2.6.	Aggregationsansatz	37

2.6.1.	Amyloid Aggregationsansatz	37
2.6.2.	Oligomer-Aggregationsansatz	39
2.7.	FCS und SIFT: Messung und Analyse	39
2.7.1.	Messaufbau und Justage	39
2.7.2.	Softwareanalyse der Messdaten	40
2.7.3.	Kreuzkorrelation.....	41
2.7.4.	Aggregationsanalyse mit SIFT	41
2.8.	Thioflavin T Messungen	42
2.9.	Elektronenmikroskopie.....	43
2.10.	Gelfiltration von Liquorproben	43
2.11.	Antigen-Antikörper-Reaktionen	44
2.11.1.	Influenza Antigene	44
2.11.2.	Hämagglutinin Antikörper	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Detektion von Alpha-Synuclein Aggregaten	47
3.1.1.	Nachweis mit Thioflavin T.....	47
3.1.2.	Zeitverlaufexperimente	49
3.1.3.	Hochsensitiver Nachweis mit SIFT.....	51
3.1.4.	Resistenz gegen Proteinase K	52
3.1.5.	Elektronenmikroskopie	53
3.2.	Koaggregation	54
3.2.1.	Koaggregation mit Alpha-Synuclein der Maus, A30P und A53T.....	56
3.2.2.	Einfluss durch das molare Verhältnis der Monomere.....	57
3.2.3.	Einwirkung von Beta-Synuclein	59
3.2.4.	Anlagerung an vorbestehende Aggregate.....	59
3.2.5.	Interaktion mit Tau-Protein	61
3.3.	Liquoranalyse	65
3.3.1.	Effekt auf die Alpha-Synuclein Aggregation	66
3.3.2.	Bedeutung der Liquorgelfraktionierung	67
3.4.	Typisierung von Influenza Impfstoffpräparationen	70
4.	Diskussion	74

4.1.	Methodenentwicklung und Evaluation.....	74
4.1.1.	Methoden.....	74
4.1.2.	Evaluation	75
4.2.	Anwendungen.....	77
4.2.1.	Koaggregation und Mutationen	77
4.2.2.	Influenza-Typisierung	80
4.2.3.	Therapieansätze	81
4.2.4.	Liquoranalyse	82
5.	Zusammenfassung	84
6.	Abkürzungsverzeichnis	87
7.	Literaturverzeichnis.....	89

1. Einleitung

1.1. *Neurodegenerative Erkrankungen des Menschen*

Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung spielen neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer, die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, der Morbus Huntington oder der Morbus Parkinson, deren Früherkennung und deren Behandlung eine zunehmend wichtige Rolle. Trotz des Fortschritts in Diagnostik und Therapie existieren heute nach wie vor keine kausalen Behandlungsmöglichkeiten. Aufgrund intensiver Bemühungen der Forschung der letzten Jahre und Jahrzehnte sind bereits viele krankheitsverursachende Vorgänge auf molekularer Ebene bekannt. Als gemeinsamer pathologischer Prozeß gilt die Bildung und Ablagerung von krankheitsspezifischen, fibrillären, amyloiden Proteinaggregaten [Koo, 1999; Muchowski, 2002; Aguzzi, 2003; Ross, 2004]. Im Falle der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung sind dies Ablagerungen des fehlgefalteten Prionproteins, beim Morbus Huntington pathologische Aggregate des Huntingtins. Beim Morbus Alzheimer bildet das Tau-Protein intrazelluläre Ablagerungen, so genannte neurofibrilläre „Tangles“, innerhalb der Neuronen, während ein Amyloid-Vorläufer-Protein-Spaltprodukt (engl. *Amyloid precursor protein*, APP), das Amyloid-Beta Peptid, extrazelluläre Ablagerungen in Form von senilen Plaques formt. In den Neuronen der Substantia nigra finden sich beim Morbus Parkinson intrazelluläre Ablagerungen fibrillären Alpha-Synucleins. Durch die Forschung konnten viele Erkenntnisse hinsichtlich krankheitsassoziierter Mutationen, biochemischer Modifikationen oder veränderter Expression der betroffenen Gene gewonnen werden. Die genauen biochemischen Abläufe, die zur Bildung von oligomeren Zwischenstufen und letztendlich fibrillären Aggregaten führen, sind nach wie vor Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Bemühungen [Small, 2001; Hardy, 2002; Caughey, 2003; Aguzzi, 2003]. Durch ein besseres Verständnis dieser Vorgänge wird die Basis geschaffen, gezielt wirksame pharmakologische Substanzen zu entwickeln, die bereits in der Frühphase pathologische Prozesse verhindern, oder sogar existierende Ablagerungen in fortgeschrittenen Krankheitsstadien disintegrieren können.

1.2. Synucleinopathien

Als Synucleinopathien werden diejenigen neurodegenerativen Krankheiten zusammengefasst, die pathologische Ablagerungen des Proteins Alpha-Synuclein zeigen [Goedert, 2001]. Zu dieser Gruppe gehören:

- Morbus Parkinson
- Demenz mit Lewy-Körperchen (engl. *Dementia with Lewy bodies*, DLB)
- Multiple Systematrophie (engl. *Multiple system atrophy*, MSA)
- Neurodegeneration mit Eisenablagerung Typ 1
(Hallervorden-Spatz-Syndrom; engl. *Neurodegeneration with brain iron accumulation*, NBIA)

Unter diesen Erkrankungen stellt der durch James Parkinson 1817 als „*shaking palsy*“ beschriebene Morbus Parkinson [Parkinson, 1817] mit einer Prävalenz von mehreren hundert Personen (ca. 200) pro 100000 Bevölkerung [Vieregge, 1991; Trenkwalder, 1995] die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer dar. Ab dem 65. Lebensjahr steigt die Inzidenz deutlich an [Aarsland, 2005]. Es findet sich das Phänomen einer gehäuften Prävalenz in den westlichen Industrieländern [Ben Shlomo, 1997]. Die Trias mit den Leitsymptomen Rigor, Tremor und Akinese ist typisch und häufig in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten. Als neuropathologisches Korrelat finden sich im Morbus Parkinson Nervenzelluntergänge vornehmlich in der Substantia nigra, aber auch in anderen Regionen des zentralen Nervensystems wie dem Nucleus basalis Meynert, dem Locus coeruleus oder den medullären gigantozellulären Hirnnervenkernen wie dem Nucleus dorsalis nervi vagi [Braak, 2003]. In all diesen Bereichen finden sich charakteristische zytoplasmatische Nervenzelleinschlüsse, die Lewy-Körperchen und die Lewy Neuriten [Lewy, 1912; Spillantini, 1997; Goedert, 1998; Irizarry, 1998; Tofaris, 2005; Shults, 2006]. Lichtmikroskopisch stellen sich Lewy-Körperchen in der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung als bis zu 25 µm durchmessende intrazelluläre Einschlusskörperchen mit einem dichten, eosinophilen Kern und einer hellen äußeren, ringförmigen Struktur dar (Abb. 1.1). Elektronenmikroskopisch zeigt sich der Kern aus dichtem filamentartigem und granulärem Material zusammensetzt und von kreisförmig angeordneten Filamenten mit einem Durchmesser von 10 – 20 nm umgeben [Forno, 1996a;

Forno, 1996b]. Durch Antikörper gegen Alpha-Synuclein, nicht jedoch gegen Beta-, oder Gamma-Synuclein, lassen sich die größtenteils aus Alpha-Synuclein bestehenden Lewy-Körperchen [Conway, 1998; Crowther, 1998; Spillantini, 1998b] gut immunhistochemisch - sowohl im Kern, als auch in der hellen Korona – darstellen [Spillantini, 1997]. Bei Erkrankungen aus dem Spektrum der MSA finden sich keine intraneuronalen Lewy-Körperchen, sondern aus Alpha-Synuclein bestehende, intraglial gelegene Einschlüsse in Oligodendrozyten, sogenannte Papp-Lantos-Körperchen [Spillantini, 1998a; Tu, 1998].

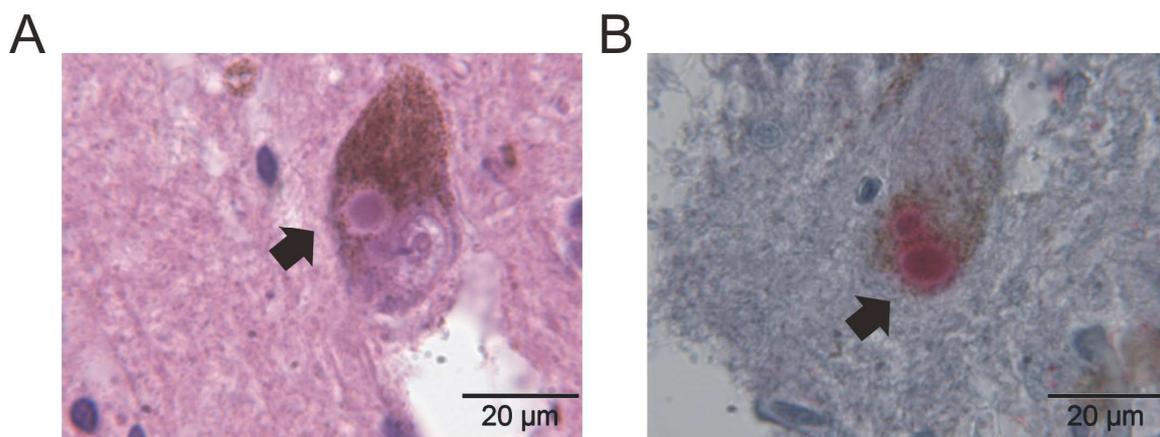


Abb. 1.1 Eine typische pathologische Ablagerungsform von Alpha-Synuclein im histologischen Bild vieler Synucleinopathien sind Lewy-Körperchen (Pfeile), die sich perinukleär im Zytosol neuronaler Zellen finden. Diese stellen sich in der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung mit charakteristischer Erscheinung in Form eines deutlich eosinophilen Kerns (engl. *Core*) mit umgebendem blassen Halo dar (A). Lewy-Körperchen lassen sich mit dem Antikörper 15G7 (APAAP Reaktion) immunhistochemisch detektieren (B). Beide Aufnahmen sind 1000-fach vergrößerte Ausschnitte aus dem Bereich der Substantia nigra eines Patienten mit Lewy-Körperchen-Erkrankung. Man erkennt die bräunlich pigmentierten Neurone der Substantia nigra.

Von sowohl klinischem als auch von wissenschaftlichem Interesse ist die Tatsache, dass eine Lewy-Körperchen-Pathologie häufig assoziiert mit der Formation amyloider Plaques aus Amyloid-Beta-Peptid und der Bildung intraneuronaler Tangles aus Tau-Protein beobachtet wird [Galpern, 2006]. In manchen Regionen der Gehirne von sowohl sporadisch als auch familiär an Alzheimer erkrankten Menschen findet sich in bis zu 60% der autoptisch untersuchten Fälle eine begleitende Bildung von Lewy-Körperchen [Kotzbauer, 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb von Lewy-Körperchen Alpha-Synuclein mit Tau-Protein

kolokalisiert ist [Ishizawa, 2003]. Jüngst erschien ein Fallbericht eines Patienten mit koexistenten Prion-, Beta-Amyloid- und Alpha-Synuclein Ablagerungen [Vital, 2007]. Es ist Gegenstand aktueller Forschung, unter anderem auch dieser Arbeit, weitere Einblicke in den kausalen Zusammenhang der Aggregation von Alpha-Synuclein mit anderen Proteinen wie dem Tau-Protein zu erlangen. Dies könnte helfen die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen und auf dieser Basis neue diagnostische, therapeutische oder präventive Ansätze zu entwickeln.

1.3. Das Alpha-Synuclein Protein

1.3.1. Die Synuclein Proteinfamilie

Zuerst beschrieben wurde die Alpha-Synuclein Sequenz 1988 durch Maroteaux et al. [Maroteaux, 1988] anhand eines Proteins, das im Elektroplax, dem elektrischen Organ des kalifornischen Zitterrochens (lat. *Torpedo californica*), gefunden wurde. In Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen wurde es erst Anfang der neunziger Jahre gebracht, zuerst 1993 durch die Entdeckung eines kurzen 35 Aminosäuren langen Peptides innerhalb von Alzheimer Plaques in menschlichen Gehirnen [Ueda, 1993], das aufgrund seiner Lokalisation als „Nicht-Amyloid-Beta-Komponente“ (engl. *Non-Amyloid-Beta-component*, NAC) bezeichnet wurde. Das Vorläufer-Protein des NAC-Peptides wurde folgerichtig als „Nicht-Amyloid-Beta-Komponente Vorläufer“-Protein (engl. *Non-Amyloid-Beta component Precursor*, NACP) bezeichnet. Ein Jahr später beschrieben Jakes et al. [Jakes, 1994] zwei homologe Proteine des menschlichen Gehirns, die durch Antikörper erkannt wurden, die gegen „*paired helical filaments*“ (PHF) aus Alzheimer Gehirnen gerichtet waren. Ein Protein war identisch mit dem zuvor beschriebenen NACP Protein, das andere entsprach dem menschlichen Homolog des Phosphoneuroproteins-14, das früher bereits aus Rattengehirnen isoliert wurde [Tobe, 1992]. Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem durch Maroteaux beschriebenen Synuclein [Maroteaux, 1988] wurden das NACP-Protein Alpha-Synuclein und das Homolog des Phosphoneuroproteins-14 Beta-Synuclein genannt [Iwai, 1995]. Beide Proteine besitzen 62% Sequenzgleichheit. Dazu gesellt sich noch ein weiteres Protein, das durch Ji et al. [Ji, 1997] als spezifisch für Mammakarzinome beschrieben wurde. Durch die große Ähnlichkeit mit Alpha-Synuclein (55% Sequenzgleichheit) wurde das „Brustkrebs spezifische

Gen-1“-Protein (engl. *Breast cancer specific gene-1*, BCSG-1) in Gamma-Synuclein umbenannt.

1.3.2. Alpha-Synuclein

Das Alpha-Synuclein ist ein verhältnismäßig kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 14 kDa. Man findet es ubiquitär innerhalb verschiedenster Gewebe des menschlichen Körpers. Besonders häufig kommt es mit einem Anteil von ca. 0.1% - 0.2% aller löslichen, zytosolischen Proteine des Gehirns in allen Regionen des zentralen Nervensystems vor [Iwai, 1995]. Inzwischen sind mindestens drei alternative Splice Isomere bekannt [Beyer, 2006], das normale Volllängenprodukt mit 140 Aminosäuren, sowie zwei verkürzte Varianten mit 126 (Deletion Exon 3, Aminosäuren 41-54) bzw. 112 (Deletion Exon 5, Aminosäuren 103-130) Aminosäuren. Obwohl der Name durch den zuerst angenommenen Wirkungsort des Synucleins in Synapse und Nucleus der Nervenzelle herrührt [Maroteaux, 1988], zeigte es sich, dass das Alpha-Synuclein im Wesentlichen im präsynaptischen Terminus zu finden ist [Jakes, 1994]. Im nativen Zustand ist es ungefaltet und bildet keine definierte Sekundärstruktur aus [Weinreb, 1996]. Die N-Terminale Seite des Proteins besitzt sechs unvollständige Wiederholungssequenzen, die durch KTKEGV Aminosäuresequenzen verbunden sind. Der Mittelteil des Alpha-Synucleins im Anschluss an die Wiederholungssequenzen ist durch hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren gekennzeichnet und beinhaltet die NAC Domäne (AS 61 - 95), sowie innerhalb der NAC Domäne das minimale Fibrillen-bildende Partikel (AS 68 - 76) [Bodles, 2001] (Abb. 1.2 A). Die NAC Domäne befindet sich in einem durch hydrophobe Aminosäureseitenketten dominierten Bereich, während der C-Terminus bei physiologischem pH-Wert viele negative Ladungen trägt und auch mehrere Phosphorylierungsstellen besitzt [Okochi, 2000; Pronin, 2000; Negro, 2002]. Aggregationsstudien konnten belegen, dass die Aggregation von Alpha-Synuclein den Mechanismen der keiminduzierten Aggregation folgt, bei der die initiale Keimbildung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt markiert [Jarrett, 1992; Jarrett, 1993; Wood, 1999]. Während dieses Prozesses können intermediäre Zwischenstufen auftreten, die einen erhöhten Anteil an Beta-Faltblatt Struktur und eine größere Neigung zur Fibrillenbildung aufweisen [Uversky, 2001a]. Die im Verlauf entstehenden Alpha-Synuclein Fibrillen weisen eine sogenannte

„*cross-beta*“ Konformation auf, die typisch für amyloide Strukturen ist [Conway, 2000; Serpell, 2000]. Amyloide Alpha-Synuclein Strukturen sind im Gegensatz zur ungefalteten physiologischen Form relativ resistent gegen Proteasespaltung [Conway, 2000]. Trotz großer Gemeinsamkeit in der Primärstruktur zeigen Beta-, und Gamma-Synuclein keine amyloidogenen Eigenschaften [Serpell, 2000], fehlen innerhalb der pathologischen Ablagerungen (z.B. Lewy-Körperchen) [Spillantini, 1998b] und können ihrerseits sogar die Alpha-Synuclein Fibrillation behindern [Uversky, 2002; Giese, 2005]. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die hydrophobe NAC Domäne allein innerhalb des Alpha-Synucleins zu finden ist. Entfernt man die NAC Domäne aus der Alpha-Synuclein Primärstruktur, oder tauscht hydrophobe gegen hydrophile Aminosäuren aus, so geht damit auch die amyloidogene Eigenschaft verloren, bzw. wird nachhaltig behindert [Giasson, 2001]. Andererseits ist die NAC Domäne separat in der Lage Fibrillen zu bilden, oder sogar die Fibrillenbildung des Volllängen-Proteins zu induzieren [Giasson, 2001]. Erstaunlicherweise finden sich deutliche Parallelen unter den Primärsequenzen 66-73 der NAC Domäne des Alpha-Synucleins (VGGAVVTG), dem Bereich zwischen AS 36-42 des Amyloid-Beta-Peptids (VGGVVIAT) und dem Abschnitt 117-124 des Prionproteins (AAGAVVGG) [Tofaris, 2005]. Es sind einige posttranslationale Veränderungen des Alpha-Synuclein mit aggregationssteigernder Wirkung bekannt. Dazu gehören in erster Linie Oxidation und Nitrierung, sowie die Phosphorylierung an Position 129 [Duda, 2000; Giasson, 2000; Fujiwara, 2002; Kahle, 2002b].

Die physiologische Funktion des Alpha-Synuclein ist nach wie vor Gegenstand der Forschung. Es gibt Hinweise, dass es sich an die Oberfläche der präterminalen Vesikel assoziiert ohne sich fest an sie zu binden [Iwai, 1995; Davidson, 1998; Clayton, 1998]. Dies geschieht unter Ausbildung einer Alpha-helikalen Sekundärstruktur im Bereich der N-Terminalen Wiederholungsmotive (Abb. 1.2 B). Diese lagern sich reversibel an saure Membranphospholipide mit besonderer Affinität zu Phosphatidylsäure an und erhöhen so den Alpha-helikalen Anteil des nativ ungefalteten Synucleins [Davidson, 1998]. Daneben wurde berichtet, dass sowohl Alpha-, als auch Beta-Synuclein sehr spezifische Inhibitoren der Phospholipase D2 (PLD2) sind, die Phosphatidylcholin zu Phosphatidylsäure und Cholin hydrolytisch spaltet und sich in Plasmamembranen von Zellen bzw.

submembranösen Vesikeln befindet [Jenco, 1998; Koo, 1999]. Dies sind auch Hinweise darauf, dass Synuclein eine Rolle bei der Biosynthese von synaptischen Membranen spielt, da der Phosphatidylsäurestoffwechsel eine Schlüsselrolle in der Knospung von Vesikeln (engl. *Vesicle budding*) spielt [Siddhanta, 1998]. In genetisch veränderten *knock-out* Mäusen fand sich ein erhöhter Dopaminumsatz in der Substantia nigra aufgrund von elektrischen Reizen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Alpha-Synuclein physiologisch aktivitätsabhängig die Dopaminfreisetzung herunterreguliert [Abeliovich, 2000]. Diese Mäuse zeigen auch eine gewisse Resistenz gegen mitochondriale Inhibitoren, was dafür spricht, dass Alpha-Synuclein als Effektor oxidativer Zellschädigung wirken kann [Klivenyi, 2006]. In Zebrafinken wird während der Lernphase ihres Gesangs die Alpha-Synuclein-Synthese in einigen Neuronen erhöht, [George, 1995], wohingegen die Anzahl an präsynaptischen Vesikeln in primären hippocampalen Neuronen durch Hemmung der Alpha-Synuclein-Synthese vermindert wird [Murphy, 2000], was als Hinweis gewertet wurde, dass Alpha-Synuclein die Plastizität der präterminalen Synapsen erhöht. Studien zeigen weitere Möglichkeiten des Alpha-Synucleins die Katecholaminfreisetzung der synaptischen Vesikel zu regulieren. Eine Übersynthese von Alpha-Synuclein behindert eine Anlagerung synaptischer Vesikel an bestimmte Bindungsstellen bevor eine kalziumgesteuerte Membranfusion stattfinden kann [Larsen, 2006]. Weiter berichten aktuelle Studien über die Eigenschaft des Alpha-Synucleins aus multilamellären unilamelläre Membranen oder kleine vesikuläre Strukturen zu formen [Madine, 2006] sowie Einwirkung auf die Lipidzusammensetzung dieser Membranen zu nehmen [Kamp, 2006]. Es gibt noch etliche andere Proteine, die mit der Funktion von Alpha-Synuclein verbunden werden. Besonders erwähnenswert hierbei ist die Gruppe der Proteine 14-3-3 [Engelender, 1999; Ostrerova, 1999; Dev, 2003]. Die Proteine 14-3-3 stellen eine Gruppe von intrazellulären Chaperonen dar, die in der Liquordiagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle einnehmen und mit denen Alpha-Synuclein Gemeinsamkeiten besitzt [Poser, 2000]. Die Meinungen, ob eine hohe Synthese von Alpha-Synuclein in der Bilanz positive oder negative Effekte auf das Zellüberleben hat, gehen auseinander. Einerseits gibt es Hinweise, dass Alpha-Synuclein durch Inhibition der „Mitogen aktivierten Protein (MAP)“-Kinase den Zelltod beschleunigt [Iwata, 2001], andererseits gibt es Berichte, dass

Synuclein neuronale Zellen durch Entzug von apoptischen Reizen vor dem Zelluntergang bewahrt [da Costa, 2000; Lee, 2001]. Über die Rolle von Alpha-Synuclein als Chaperon im Faltungsprozess synaptischer Proteine existieren ebenfalls eine Reihe von Studien [Chandra, 2005; Mukaetova-Ladinska, 2005]. Neueste Studien deuten auf eine Vielzahl weiterer möglicher Interaktionspartner des Alpha-Synucleins hin [Jin, 2007; Gerard, 2006].

Ein wichtiger Durchbruch, der den Bezug zwischen Alpha-Synuclein und dem Morbus Parkinson herstellte, war die Entdeckung von Parkinson-assoziierten Punktmutationen im Alpha-Synuclein-Gen. Zuerst fand sich innerhalb einer großen amerikanischen Familie italienischer Abstammung, der Contursi Familie, mit autosomal dominantem, früh beginnendem Morbus Parkinson, eine Mutation im 4. Exon an Position 157 des Alpha-Synuclein Gens mit Austausch eines Guanins gegen ein Adenin (157G→A), was dazu führt, dass sich im resultierenden Alpha-Synuclein Protein an Position 53 anstelle der Aminosäure Alanin in Folge der Mutation ein Threonin (A53T) befindet. Erstaunlicherweise entspricht diese Mutation des humanen Alpha-Synuclein an dieser Stelle dem Wildtyp-Alpha-Synuclein von Nagetieren, sowie dem des Zebrafinken [Goedert, 2001]. Im Verlauf wurde eine weitere Mutation in einer deutschen Familie innerhalb des 3. Exons an Position 88 mit dem Austausch eines Guanins gegen ein Cytosin (88G→C) entdeckt. Innerhalb des Alpha-Synucleins zeigt sich dies durch Austausch eines Alanins an Position 30 gegen ein Prolin (A30P) [Kruger, 1998]. In jüngster Vergangenheit fand sich noch eine dritte Mutation in einer spanischen Familie, die sich durch Austausch eines Glutamats an Position 46 gegen ein Lysin manifestiert [Zarranz, 2004]. Durch *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass die Fibrillenbildung durch A53T deutlich und durch A30P nur leicht gesteigert wird [Narhi, 1999]. Es gibt jedoch Hinweise, dass beiden Mutationen die schnellere Bildung der oligomeren Vorstufen der Fibrillen gemein ist [Conway, 2000]. Weiter konnte gezeigt werden, dass durch die A30P-, nicht aber durch die A53T-Mutation, die Fähigkeit zur Assoziation an Vesikelmembranen verloren geht [Jensen, 1998].

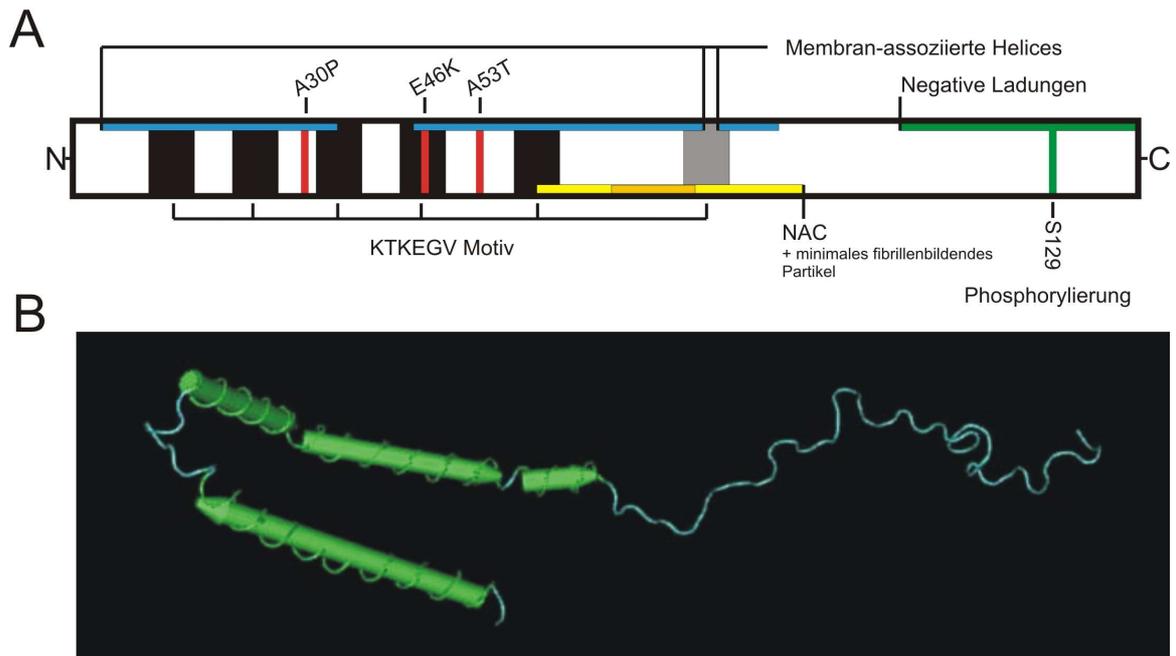


Abb. 1.2 In der schematischen Darstellung der Proteinsequenz sind die KTKEGV-Bindungsmotive in schwarz, bzw. grau (unvollständiges Motiv), die Bereiche der membranassoziierten Helixbildung hellblau, die NAC Domäne, inklusive dem für die Fibrillenbildung minimal notwendigen Partikel, hellgelb und dunkelgelb, die drei bisher bekannten Parkinson-assoziierten Mutationen als rote vertikale Linien, sowie der negativ geladene C-Terminus mit Kalziumbindungsfähigkeit als horizontale grüne Linie, bzw. die wichtigste Phosphorylierungsstelle S129 als vertikale grüne Linie symbolisiert (A). In der dreidimensionalen Darstellung [entnommen der Proteinstrukturdatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) und dargestellt mit dem Cn3D Betrachtungsprogramm] der membranassoziierten Form des Alpha-Synucleins zeigen sich die N-terminalen Alpha-Helix Strukturen grün, sowie die C-terminalen Bereiche ohne definierte Sekundärstruktur in hellblau (B).

Neben Mutationen innerhalb des Genlocus für Alpha-Synuclein stellen Amplifikationen wie Duplikation [Chartier-Harlin, 2004; Ibanez, 2004] oder Triplikation [Singleton, 2003] des Genlokus einen Risikofaktor für die Parkinson-Erkrankung dar.

Viele der bekannten Aggregationsformen und pathologischen Erscheinungsbilder konnten in transgenen Tiermodellen, beispielsweise im Maus- oder *Drosophila melanogaster*-Modell, nachgewiesen werden [Feany, 2000; Masliah, 2000; van der, 2000; Kahle, 2001b; Giasson, 2002; Lee, 2002; Neumann, 2002]. Mit Hilfe dieser Tiermodelle lassen sich die *in vitro* gewonnenen Daten auf ihre biologische Relevanz testen.

1.4. Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Bereits Anfang bis Mitte der Siebziger Jahre wurde das damals noch theoretische Konzept der Einzelpartikelanalyse durch fluoreszenzbasierte Korrelationsspektroskopie entwickelt [Magde, 1972; Magde, 1974; Ehrenberg, 1974; Aragon, 1975]. Die Idee dahinter bestand darin, Signalfluktuations von fluoreszierenden Molekülen in einem Messvolumen zu analysieren und basierend auf Regelmäßigkeiten innerhalb der Signalkette Vorhersagen machen zu können [Elson, 1974; Magde, 1974; Rigler, 1992]. Aufgrund der damals noch fehlenden technischen Möglichkeiten, ließ sich das Konzept allerdings erst in den Neunziger Jahren mit Hilfe der zu diesem Zeitpunkt verfügbar gewordenen Lasertechnologie verwirklichen. Durch die Konstruktion präziser optischer Messaufbauten [Rigler, 1993; Eigen, 1994] gelang es, die Prinzipien der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) umzusetzen, die Fluktuationen einzelner Moleküle zu analysieren [Eigen, 1994] und neue Anwendungsfelder [Palmer, III, 1987; Schwille, 1996; Schwille, 1997b; Schwille, 1999; Thompson, 2002] zu eröffnen. Die besondere Stärke der FCS-Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität und damit der Möglichkeit, Molekülfuktuations bis in den subpicomolaren Bereich zu messen [Schwille, 1997b]. Durch die Einführung der Kreuzkorrelationsanalyse [Schwille, 1997c] und der Messung mit beweglichem Fokus [Bieschke, 2000] eröffnete sich zusätzlich eine Vielzahl an neuen Anwendungsmöglichkeiten.

1.4.1. Theoretische Grundlagen der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie

Die Komponenten eines Systems, das sich im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, unterliegen intrinsischen Fluktuationen. Diese Fluktuationen tragen auch dazu bei das Gleichgewicht als solches überhaupt erst zu erreichen und einzustellen. Viele Messverfahren registrieren die konstant vorherrschenden kleinsten Veränderungen als Störfaktoren einer exakten Zustandsmessung. In der Korrelationsspektroskopie werden aber gerade diese Fluktuationen dazu verwendet, Informationen über die Bestandteile einer Messlösung zu gewinnen, innerhalb der die enthaltenen Teilchen aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung frei durch den zur Verfügung stehenden Raum diffundieren.

Fluktuationen der lokalen Teilchenkonzentration lassen Aussagen über deren Diffusionskoeffizienten zu, der wiederum Rückschlüsse auf die Partikelgröße erlaubt. Durch Arbeiten von Einstein und Smoluchowski wurde dieses Konzept bereits 1905 vorgestellt [Einstein, 1905; Smoluchowski, 1906; Einstein & Smoluchowski, 1997] und erstmals 1911 von Svedberg und Inouye [Svedberg, 1911] zur Bestimmung der Diffusion von Gold-Partikeln durch eine kolloidale Lösung angewandt. Die erwähnten Fluktuationen innerhalb eines Systems fallen umso stärker ins Gewicht, je kleiner das betrachtete Volumen ist.

Die Erwartung an Ereignissen innerhalb eines Systems, das allein durch intrinsische Fluktuationen bestimmt ist, ist durch eine Poissonverteilung gut charakterisiert [Smoluchowski, 1914]. Die Poissonverteilung ist ein Spezialfall der Binominalverteilung von Bernoulli-Ereignissen für eine gegen Unendlich reichende Anzahl an Ereignissen ($n \rightarrow \infty$), bei gleichzeitig gegen Null tendierender Wahrscheinlichkeit ihres Eintretens ($p \rightarrow 0$). Es muss gelten, dass das Produkt aus Ereignisanzahl und Ereigniswahrscheinlichkeit einem konstanten Erwartungswert λ entspricht ($n \cdot p = \lambda = \text{konstant}$). Dadurch lässt sich die Poissonverteilung durch Grenzwertberechnungen aus der Binominalverteilung herleiten (Gleichung 1.1).

$$F_{\lambda}(n) = \sum_{k=0}^n P_{\lambda}(k) = e^{-\lambda} \sum_{k=0}^n \frac{\lambda^k}{k!} \quad \text{Gleichung 1.1}$$

Angewendet auf die Fragestellung der Korrelationsanalyse lässt sich die Wahrscheinlichkeit errechnen, innerhalb eines Messvolumens mit der mittleren Anzahl an Partikeln v während einer Messung N Partikel anzutreffen:

$$W(N) = \frac{e^{-v} v^N}{N!} \quad \text{Gleichung 1.2}$$

Die Korrelationsfunktion vergleicht die Selbstähnlichkeit eines Signals zum Zeitpunkt t mit dem Zeitpunkt $t + \tau$. Die Abweichung des Signals vom Erwartungswert wird multipliziert und die gesamte Funktion normiert. Daraus

ergibt sich die Korrelationsfunktion mit dem Erwartungswert $\langle N \rangle$ der Molekülzahl wie folgt:

$$G(\tau) = \frac{\delta N(t) \delta N(t + \tau)}{\langle N(t) \rangle^2}$$

mit $\delta N(t) = N(t) - \langle N \rangle$

Gleichung 1.3

Für große n gilt eine Annäherung der Poissonverteilung an eine Gauß'sche Normalverteilung. Daher beträgt die Größe der Varianz vom Mittelwert der Größe des Mittelwerts selbst. Daraus folgt, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ die Amplitude der Korrelationsfunktion der normierten Varianz der Molekülzahl entspricht, bzw. deren reziproker Wert der Molekülzahl selbst:

$$G(0) = \frac{\langle \delta N(t)^2 \rangle}{\langle N \rangle^2} = \frac{\langle N \rangle}{\langle N \rangle^2} = \frac{1}{\langle N \rangle}$$

Gleichung 1.4

1.4.2. Konfokaler Versuchsaufbau

Als Basis für die in dieser Arbeit angefertigten Aggregationsmessungen diene ein zweifarbig, konfokaler optischer Aufbau mit einer zusätzlich integrierten, motorisierten Steuerungseinheit (engl. *Beam scanner*) für Messungen nach der SIFT-Methode [Bieschke, 2000; Giese, 2005]. Das theoretische Konzept sowie der praktische Aufbau wurde in der Literatur beschrieben [Schwille, 1997a; Schwille, 1997c]. Laserlicht zweier Laser unterschiedlicher Wellenlänge wird vereinigt und gelangt durch ein Spiegelsystem in ein Objektiv hoher numerischer Apertur. Dadurch werden beide Wellenlängen zu einem annähernd beugungsbegrenztem Fokus zusammengefasst, innerhalb dessen fluoreszierende Strukturen angeregt werden können. Die emittierten Photonen werden mittels geeigneter dichroischer Spiegel vom Anregungslicht separiert und gelangen zum Teil über den entgegengesetzten Weg durch den konfokalen Aufbau auf Avalanche Einzelphotonendetektoren. Dieses Signal wird durch einen Hardwarekorrelator in Echtzeit ausgewertet und für die beiden unterschiedlichen Wellenlängen getrennt an einen PC weitergegeben, der die Daten aufzeichnet und weiter verarbeitet.

Durch hochpräzise Motor-Steuerungssysteme lassen sich die Probenträger, die Position der Laserfoci und der Lochblende (engl. *Pinhole*) des konfokalen Aufbaus einstellen.

Das Prinzip der konfokalen Abbildung wurde bereits früher beschrieben [Wilson, 1990]. Photonen, die innerhalb einer Probenlösung emittiert werden gelangen retrograd dem Weg des Anregungslichts durch die Objektivlinse und werden durch eine zweite Linse wieder gebündelt. Im nachfolgenden Strahlengang ist eine Lochblende (Pinhole) eingearbeitet. Diese Blende können allein Photonen passieren, deren Ursprung genau innerhalb des Messfokus liegt. Andere Photonen werden durch die Lochblende blockiert und nicht durch die Einzelphotonendetektoren registriert (Abb. 1.3).

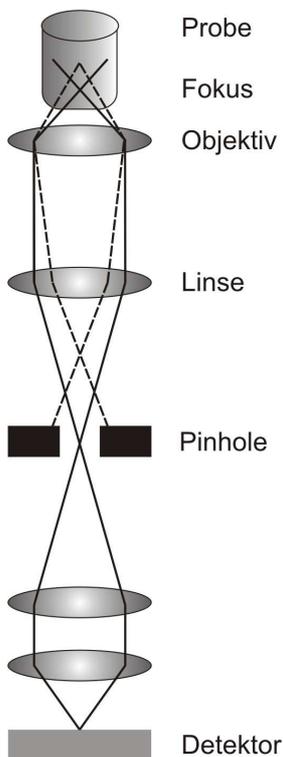


Abb. 1.3 Schematisch sind die Strahlengänge des konfokalen Messaufbaus dargestellt. Nur Photonen, die innerhalb des Messfokus emittiert werden (solide Linie) gelangen durch die Lochblende (Pinhole). Photonen mit Entstehungsort außerhalb des Messfokus (gestrichelte Linie) werden durch das Pinhole blockiert.

Innerhalb des Messaufbaus (Abb. 1.4) wird Laserlicht aus zwei unterschiedlichen Quellen (z.B. Argon- und Helium-Neon-Laser) durch polarisationserhaltende „Single-Mode“ Glasfaserkabel über einen dichroischen Farbteiler-Spiegel zusammengeführt. Die Wahl der Anregungswellenlänge ist vom Absorptionsspektrum der Messprobe abhängig. Anschließend trifft das Licht

wiederum auf einen dichroischen Spiegel, der es diesmal reflektiert und durch eine optional zuschaltbare „Beam Scanner“ Einheit auf ein Mikroskopobjektiv projiziert. Durch dieses Wasserimmersionsobjektiv werden beide Wellenlängen nahezu konzentrisch fokussiert. Da sich die minimale Größe der beiden Foci durch die jeweilige Wellenlänge physikalisch definiert, resultieren Foci mit etwas unterschiedlichen Radien. Beispielsweise beträgt der Durchmesser eines blauen Argon-Laserfokus der 488 nm Isolinie ca. 0,5 μm . Der eines roten Helion-Neon-Lasers der 633 nm Isolinie beträgt ca. 0,65 μm und ist damit in etwa 30% größer als der des Argon-Lasers. Die optische Apparatur bildet den blauen Fokus komplett innerhalb des roten Fokus ab, erzeugt aber keine völlig konzentrische Projektion. Diese Abweichung ist jedoch in der Praxis zu vernachlässigen.

Durch Mikroschrittmotoren kann die Fokushöhe auf eine definierte Position innerhalb der Messprobe gebracht werden und bildet so ein offenes Detektionsvolumen, welches durch die Partikel innerhalb der Messprobe passiert werden kann. Treten Fluorophore durch das Detektionsvolumen können sie bei geeignetem Absorptionsspektrum durch das Laserlicht zur Photonenemission angeregt werden. Ein Anteil der emittierten Photonen gelangt entgegengesetzt dem Anregungslicht durch die optische Apparatur. Mit Hilfe des oben beschriebenen konfokalen Messaufbaus werden die Photonen aus dem Detektionsvolumen über einen weiteren dichroischen Spiegel nach Wellenlängenprofil aufgetrennt, durch wählbare optische Filter „gereinigt“ und getrennt auf zwei Avalanche Einzelphotonendetektoren abgebildet. Dadurch ist es möglich zwei Kanäle getrennt voneinander parallel aufzuzeichnen und nach Intensität und Korrelation auszuwerten.

Eine optional aktivierbare „Beam Scanner“-Einheit ermöglicht es, innerhalb einer Messprobe nicht nur Messungen mit stationärem Fokus durchzuführen, sondern ein größeres Volumen der Probe aktiv zu erfassen. Dies geschieht durch Bewegung des Probenträgers durch Mikroschrittmotoren bei gleichzeitigem Oszillieren eines Spiegelsystems innerhalb der „Beam Scanner“-Einheit senkrecht zur Bewegungsrichtung des Probenträgers. Daraus resultiert eine meanderförmige Wegstrecke des Detektionsvolumens innerhalb der Messprobe. Dies bietet den

Vorteil, seltene große, intensiv leuchtende Partikel innerhalb des Messvolumens in kürzerer Zeit zu erfassen [Bieschke, 2000] und über Intensitäts- und Kreuzkorrelationsanalysen näher zu charakterisieren [Kask, 1999; Schwille, 1997c] (Abb. 1.4). Die Vorteile des mobilen Fokus gehen einher mit dem Verlust der Information der Autokorrelationsdaten, da Größen wie beispielsweise die Diffusionszeit eines Teilchens nicht mehr allein durch die Beschaffenheit des Teilchens an sich bestimmt werden, sondern durch die Geschwindigkeit des Messfokus maßgeblich beeinflusst sind.

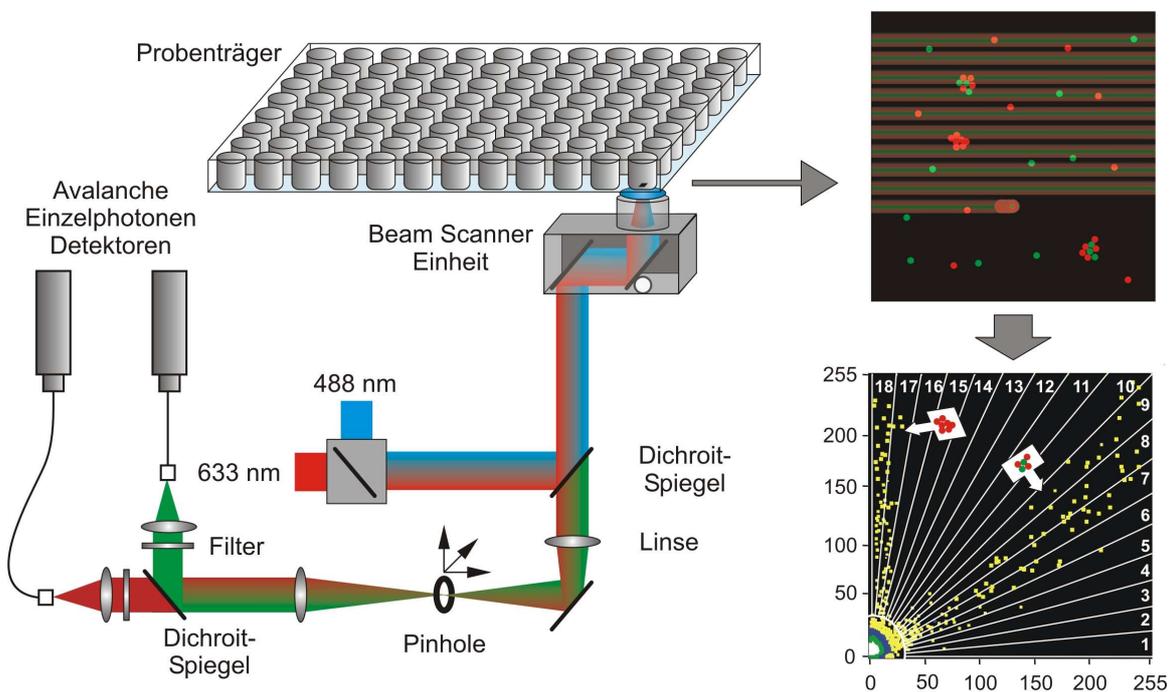


Abb. 1.4 Im konfokalen Messaufbau wird Laserlicht unterschiedlicher Wellenlängen vereinigt und in einem konzentrischen Fokus innerhalb einer Messlösung abgebildet. Anteile der emittierten Photonen gelangen durch einen konfokalen Aufbau wieder nach Wellenlängen getrennt auf Einzelphotonendetektoren. Das Signal beider Detektoren wird korreliert und kann mathematisch analysiert werden. Durch die optionale „Beam Scanner“ Einheit ist es möglich, innerhalb eines Messvolumens nach seltenen fluoreszierenden Aggregaten aktiv zu suchen und diese aufgrund qualitativer Eigenschaften zu unterscheiden.

Die beschriebenen optischen Komponenten müssen hohe Qualitätsmerkmale aufweisen, um verlässliche Daten zu erzeugen. Bei minimalem Anteil an Eigenfluoreszenz ist eine hohe numerische Apertur des Objektivs notwendig, um zum einen eine möglichst hohe Zahl an emittierten Photonen zu erfassen, zum

anderen aber auch das Detektionsvolumen möglichst klein zu fokussieren. Damit wird das besonders bei schwachem Fluoreszenzsignal bedeutende Hintergrundrauschen minimiert, indem sich möglichst wenige Wassermoleküle gleichzeitig mit einem Fluorophor innerhalb des Detektionsvolumens aufhalten. Dies ist bedeutsam, da Wassermoleküle Lichtstrahlen inelastisch streuen (Raman-Linien des Wassers) und somit ein störendes Hintergrundrauschen erzeugen. In dieser Arbeit wurden Laserfoci mit einem Volumen von etwa 1 Femtoliter (1 fl) verwendet, die in etwa dem Volumen eines *E.coli*-Bakteriums entsprechen. Befindet sich im zeitlichen Mittel ein fluoreszierendes Partikel innerhalb dieses Fokus, so liegt eine Konzentration von ca. 1 nM vor. Weiter ist eine möglichst ideale Abberationskorrektur des Objektivs für die Bildmitte erforderlich, um die beiden Laserfoci so genau wie möglich konzentrisch abzubilden.

1.5. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Vorgänge im Rahmen von Aggregationsprozessen des Alpha-Synucleins mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie zu untersuchen. Dazu war es notwendig, einen Versuchsansatz für die Bedingungen der Korrelationsspektroskopie zu schaffen, der für den Einsatz rekombinant hergestellter Proteine geeignet ist. Hierzu konnten Erfahrungen aus den Vorarbeiten von Dr. A. Giese und Dr. J. Bieschke [Bieschke, 2000; Giese, 2000] mit anderen amyloidogenen Proteinen verwendet werden, um diesen Ansatz für die konfokale Einzelmolekülspektroskopie zu entwickeln. Dadurch eröffneten sich deren Vorteile wie die hohe Sensitivität, der zweifarbige Messaufbau und die hochdurchsatzfähige Automatisierbarkeit des Verfahrens. In einer weiteren Phase sollte dieser Ansatz mit herkömmlichen Methoden der Proteinaggregationsanalyse verglichen und validiert werden.

Ein besonderes Augenmerk sollte darauf gerichtet werden, mit Hilfe dieses Ansatzes Interaktionen des Alpha-Synucleins mit unterschiedlichen Reaktionspartnern zu untersuchen. Insbesondere sind hier die molekularen Interaktionen zwischen Wildtyp-Alpha-Synuclein, den Parkinson-assoziierten Mutanten, dem Alpha-Synuclein-Homolog der Maus und dem Tau-Protein direkt relevant. Sie können dazu dienen, die pathologischen Vorgänge *in vivo* besser zu verstehen, wie sie in heterozygoten Mutationsträgern und in gemischten neurodegenerativen Erkrankungen auftreten. Diese Interaktion lässt sich mit Hilfe des zweifarbigen Messaufbaus der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie sehr gut darstellen. Darüber hinaus ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe des FCS/SIFT-Ansatzes Liquorproben von klinisch charakterisierten Patienten näher zu analysieren, um zur Entwicklung neuer diagnostischer Tests für neurodegenerative Erkrankungen beizutragen.

Als weiteren Ausblick sollte das diagnostische Potential der SIFT-Methode auf die Analyse und Typisierung von Influenzaviren angewendet werden. Dazu galt es, einen diagnostischen Test zu entwickeln, der Bestandteile einer Influenza-Impfstoffpräparation näher typisiert, um beispielsweise zukünftig in einem einfachen Verfahren diese Erkenntnisse dazu zu verwenden, in

Hochdurchsatztechnologie eine große Zahl von Influenza-verdächtigen Gewebeproben zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Nachfolgend sind alle verwendeten Chemikalien, Materialien und biologischen Substanzen aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Chemikalien besaßen die höchste erhältliche Reinheit. Soweit möglich wurden die Materialien vor Verwendung autoklaviert. Über die Bezugsquellen von Materialien, die im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationen zur Verfügung gestellt wurden, geben die jeweiligen Abschnitte Auskunft.

Materialien	Firma
15 ml, 50 ml Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Assay Chip 24	Evotec Technologies (Hamburg, Deutschland)
Bioplate-96	Evotec Technologies (Hamburg, Deutschland)
Centriprep Filter Device	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Filterpapier GB 005	Whatman (Dassel, Deutschland)
Kupfernetze (100 x 400)	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Lab-Tek 8 Chamber	Nunc (Naperville, USA)
Microcon-100 Filter	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Microspin Säulen	MoBiTec (Göttingen, Deutschland)
Nanosep 100K Omega	PALL (Dreieich, Deutschland)
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Quarzküvetten	Perkin Elmer (Boston, USA)
Reaktionsgefäß 1500 µl	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
Reaktionsgefäß 200 µl	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
TESAFilm	TESA (Hamburg, Deutschland)

Chemikalien	Firma
Q-Sepharose	Amersham Bioscience (Uppsala, Schweden))
Sephacryl S-200	Amersham Bioscience (Uppsala, Schweden)
Isopropanol	Apotheke Klinikum Innenstadt (München, Deutschland)
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson and Company (Sparks, USA)
NP-40 10%	Calbiochem (Nottingham, UK)
Uranylazetat 2%	ElectronMicroscopySciences (Hatfield, USA)
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Fluka Chemika (Buchs, Schweiz)
PD10 Säulen	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Acrylamid 30%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck
D(+)-Glucose	Merck
Essigsäure 99,9%	Merck
Ethanol pro analysi	Merck
Glycerin	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Methanol 99,9%	Merck
Isopropyl beta-D-1-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	PeQlab (Erlangen, Deutschland)
Sephadex G5, G15, G25	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	Roche (Mannheim, Deutschland)

(BCIP)	
Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roche
Protease Inhibitor mini complete	Roche
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bactotrypton/Pepton aus Casein	Roth
Chloramphenicol	Roth
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Tris Base	Roth
Tween-20	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumpersulfat 10 % (APS)	Sigma Aldrich
Bicinchoninic Acid Solution (BCA)	Sigma Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO, (CH ₃) ₂ SO)	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich
Ethylen-Glycol bis (2-aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA)	Sigma Aldrich
Glycin	Sigma Aldrich
Harnstoff	Sigma Aldrich
Kupfer-II-Sulfat	Sigma Aldrich
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Piperazin-N-N'-bis[2-ethansulfonsäure] (PIPES)	Sigma Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Sigma Aldrich
P11 Phosphocellulose	Whatman (Maidstone, UK)

Biologische Materialien	Herkunft
pET-5a cDNA	Promega (Madison, USA)
Proteinase K	Sigma (St. Louis, USA)
hTau 37, hTau 46 cDNA	Manuela Neumann (ZNP, München, Deutschland), Michel Goedert (Cambridge, UK)
BL21 (DE3) RIL <i>E. coli</i> Kulturen	Brigitte Kraft (ZNP, München, Deutschland)
Monoklonaler Antikörper gegen humane Tau-Proteine (Klon T46)	Zytomed (Berlin, Deutschland)
Monoklonale Antikörper gegen Influenza A und B Hämagglutinin (Tab. 2.7)	Biodesign Int. (Saco, USA)
Influenza Impfstoffpräparationen aus Influenza A/B Stämmen (siehe auch Tab. 2.6)	Baxter Bioscience (Wien, Österreich)

2.1.1. Puffer- und Stammlösungen

Im Folgenden sind alle verwendeten Puffer- und Stammlösungen, sowie die verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Alle Lösungen basieren, soweit nicht anders angegeben, auf der Grundlage von demineralisiertem Wasser, das durch einen 0.22 µm Membranfilter (Millipore, Schwalbach, Germany) sterilfiltriert wurde. Bei der weiteren Herstellung galt der Einhaltung der Sterilität besondere Beachtung. Alle pH Werte wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Salzsäure (rauchend) oder 2 N Natronlauge unter Zuhilfenahme eines MPH120 pH Meters (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz) eingestellt.

Abkürzung	Zusammensetzung Stammlösung	Arbeitsbedingungen	
NaPi	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (8,85 g/100 ml) titrieren mit NaH ₂ PO ₄ (6,9 g/100 ml)	pH 6,9	50 mM
NaPi*	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (8,85 g/100 ml) titrieren mit NaH ₂ PO ₄ (6,9 g/100 ml) 0,1% NP-40	pH 6,9	50 mM
NaPi**	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O (8,85 g/100 ml)	pH 6,9	50 mM

	titrieren mit NaH ₂ PO ₄ (6,9 g/100 ml) 0,01% NP-40		
PBS	100 mM Na ₂ HPO ₄ (wf.) (14,4 g/l) 17,9 mM KH ₂ PO ₄ (2,4 g/l) 1,36 M NaCl (80 g/l) 26,8 mM KCl (2 g/l) ad 1000 ml H ₂ O	pH 7,4	1:10
PBS-Tween	PBS 0,1% Tween20	pH 7,4	
Tris	Tris Base (30 g/l H ₂ O titriert mit HCl)	pH 7,5	50 mM
ThT	Thioflavin T in H ₂ O (sterilfiltriert)		1 mM
LB Medium (Luria Bertani)	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O (autoklaviert)		1x
Rich LB Medium	1 l LB Medium (autoklaviert) + 20 ml Glycerin 50 ml K ₂ HPO ₄ (1 M) 50 ml Glucose (20%) 10 ml MgCl ₂ (1 M) 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) 1 ml Chloramphenicol (34 mg/ml)		1x
EP (Elutionstionspuffer)	50 mM PIPES 1 mM EGTA 1 mM DTT Protease Inhibitor Mini complete nach Volumen (1 Tabl. Pro 10 ml Lösung)	pH 6,8	1x
MT Puffer (Mikrotubulinpuffer)	80 mM PIPES 1 mM EGTA 0,2 mM MgCl ₂ 1 mM DTT	pH 6,8	1x
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris	pH 6,8	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris	pH 8,8	

Laufpuffer	125 mM Tris 960 mM Glycin 0,5 % SDS		1:5
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.1 % SDS 20 % Methanol		1x
AP Puffer (Alkalische Phosphatase)	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris Base	pH 9,0	1x
Laemmli-Puffer	25 mM EDTA 0,75 % SDS 50% Glycerin 1,25 % Bromphenolblau 7,5 % Mercaptoethanol 4 M Harnstoff	low SDS	1:10
Entfärber-Lsg.	25% Ethanol 8% Essigsäure		1x

2.1.2. Synuclein-Proteine

Der folgenden Tabelle können alle verwendeten Synuclein-Proteine und ihre in dieser Arbeit vorkommenden Abkürzungen entnommen werden.

Abkürzung	Protein	g / mol
α -Syn, AS	Wildtyp Alpha-Synuclein <i>homo sapiens</i>	14460
β -Syn, BS	Wildtyp Beta-Synuclein <i>homo sapiens</i>	14288
α -Syn mm	Wildtyp Alpha-Synuclein <i>Mus musculus</i>	14486
A30P	Mutante des humanen Alpha-Synucleins durch Austausch von Alanin an Position 30 durch Prolin	14487
A53T	Mutante des humanen Alpha-Synucleins durch Austausch von Alanin an Position 53 durch Threonin	14491

2.1.3. Fluoreszenzfarbstoffe

Alle verwendeten Farbstoffe und ihre Herkunft finden sich in folgender Tabelle:

Abkürzung	Farbstoff	Firma
Alexa488	Alexa Fluor-488-O-Succinimidylester	Molecular Probes (Eugene, USA)
Alexa647	Alexa Fluor-647-O-Succinimidylester	Molecular Probes (Eugene, USA)
Cy5	Cyanin-5-O-Succinimidylester (Cy5 Labeling Kit)	Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL, USA)
ThT	Thioflavin T	Sigma Aldrich (Deutschland)

FCS/SIFT Farbstoffe Zur Fluoreszenzmarkierung wurden für die FCS/SIFT-Methode die Farbstoffe Alexa488, Alexa647 und Cy5 verwendet. Die Farbstoffe binden an primäre Aminogruppen der im Protein enthaltenen Lysinreste und an die endständige Aminogruppe des N-Terminus. Nur zu einem sehr geringen Maß gehen sie Bindungen mit aromatischen Aminen, Alkohol- und Phenolgruppen ein. Im pH Bereich zwischen 4 – 10 zeigen sie gleichbleibende Farbstoffeigenschaften. Obwohl die Fluorophore sehr gut wasserlöslich sind, muss die Stammlösung durch ein apolares Lösungsmittel, vorzugsweise DMSO, hergestellt werden, um Hydrolyse in eine unreaktive, freie Säure zu vermeiden. Fluorophorstammlösungen, sowie Fluorophorkonjugate, wurden bis unmittelbar vor Gebrauch lichtgeschützt aufbewahrt.

Tab. 2.1 Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe Alexa488, Alexa647 und Cy5 bei Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge; Tripletanteil und Zählrate pro Partikel (engl. *counts per particle*, CPP) bei einer Anregungsintensität von 200 μ W bei 488 nm bzw. 300 μ W bei 633 nm.

	Molekulargewicht [g/mol]	T_{diff} [μ s]	CPP [kHz]	Triplet	Absorption max. [nm]	Emission max. [nm]
Alexa488	643	ca. 170	35	23	495	519
Alexa647	ca. 1300	ca. 220	24	40	650	665
Cy5	792	ca. 220	17	55	649	670

Thioflavin Für den Nachweis des fibrillären Aufbaus der Synucleinaggregate wurde Thioflavin T verwendet, das dafür bekannt ist, eine Bindung mit amyloiden Strukturen einzugehen [Naiki, 1989; Uversky, 2001b; Uversky, 2002; Ban, 2003]. Nach spezifischer Bindung an amyloide Aggregate tritt nach Anregung bei 450 nm ein Emissionsmaximum bei 482 nm auf. Diese Fluoreszenz ist weit intensiver als die des ungebundenen Thioflavins und sowohl abhängig von der Konzentration der amyloiden Strukturen, als auch dem pH Wert des umgebenden Milieus mit maximaler Fluoreszenzeffektivität bei pH 9.0.

2.1.4. Liquorproben

Alle verwendeten Liquorproben stammen von Patienten, die im Rahmen der neurologischen Gedächtnissprechstunde des Klinikums Großhadern zu diagnostischen Zwecken punktiert wurden. Innerhalb der Gedächtnissprechstunde erfolgten auch die genaue klinische Charakterisierung der Symptome, sowie die neuropsychologische Evaluierung. Die Patienten waren mit der wissenschaftlichen Verwendung der Liquorproben einverstanden. Im Anschluss an die Abnahme wurde in den Laboren der psychiatrischen Klinik des Innenstadt Klinikums der Universität München aus einem Teil der Proben die Mengen des Tau-Proteins und des Amyloid-Beta-Peptids bestimmt. Die nicht verwendeten Anteile wurden in Aliquots bei -20°C und später bei -80°C tiefgefroren. Von folgenden Patienten wurden Liquorproben verwendet:

Tab. 2.2 Verwendete Liquorproben. Angegeben ist das Patientenalter bei Liquorabnahme, die klinische Verdachtsdiagnose und die laborchemisch bestimmten Liquorparameter für Gesamteiweiß, Albumin und soweit vorhanden Tau-Protein und amyloid-Beta-Peptid. (MCI = geringe kognitive Beeinträchtigung, engl. *Mild cognitive impairment*; FTD = Frontotemporale Demenz; PPA = Primär progrediente Aphasie; CDB = Corticobasale Degeneration; SDAT = Senile Demenz vom Alzheimer Typ; PSP = Progressive supranukleäre Parese).

	Alter [J]	Diagnose	Total Protein [mg/ml]	Albumin [mg/ml]	Tau [pg/ml]	aBeta [pg/ml]
1	34	Gesund	2.0	1.0	n/a	n/a
2	53	Gesund	3.6	2.4	n/a	n/a
3	70	Gesund	2.9	1.7	n/a	n/a

4	75	MCI	3.8	2.3	856	674
5	66	FTD	6.6	3.6	n/a	n/a
6	76	PPA	6.8	5.0	684	612
7	69	CBD	5.1	3.4	163	1349
8	75	CBD	4.2	2.5	n/a	n/a
9	68	SDAT	5.3	3.0	387	1045
10	51	SDAT	4.0	2.2	n/a	n/a
11	78	MCI	4.5	3.1	n/a	n/a
12	63	Demenz + Parkinson Synd.	4.7	2.5	229	484
13	75	Hypokinet. rigid. Synd.	4.5	2.1	n/a	n/a
14	59	PSP	2.5	1.2	n/a	763
15	74	PSP	3.8	1.7	n/a	n/a

2.2. Proteinsynthese

2.2.1. Synuclein

Alpha-Synuclein Das verwendete Alpha-Synuclein wurde rekombinant in *E. coli* Bakterien erzeugt. Dazu wurden die codierenden Regionen des humanen bzw. mauseigenen Wildtyp Alpha-Synuclein Gens in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern 5'-TTCATTACATATGGATGTATTCATGAAAGG-3' und 5'-GGAATTCCATATGTTAGGCTTCAGGTTTCGTAG-3' vervielfältigt. Die Produkte des Prozesses wurden mittels einer Nde I Schnittstelle in den pET-5a Vektor integriert und dazu verwendet, *E. coli* BL21 (DE3) pLys zu transformieren. Alle Konstrukte wurden sequenziert (Medigenomix, Martinsried, Deutschland). Die Bakterienkultur wurde für 4 Stunden mit IPTG induziert und anschließend durch Gefrieren, Auftauen und Sonifikation lysiert. Nach weiteren 15 Minuten Kochen wurde der hitzestabile Überstand nach Zentrifugation mit 17000 x g auf eine Q-Sepharose Säule aufgetragen und über einen 25 mM – 500 mM Salzgradienten eluiert. Die vereinigten Alpha-Synuclein-Fractionen wurden anschließend mit einer Sephacryl S-200 Gelfiltration von Salzurückständen befreit [Kahle, 2002a].

Beta-Synuclein, A30P und A53T Der Vektor zur Expression von Beta-Synuclein wurde von Jakes, Spillantini und Goedert bereits 1994 beschrieben [Jakes, 1994]. Die weitere Produktion schließt sich dem oben genannten Protokoll an. Die Herstellung der beiden Mutanten des Alpha-Synuclein Proteins folgt ebenfalls analog dem Protokoll zur Synthese von Wildtyp Alpha-Synuclein.

Die Synuclein-Proteine und deren Mutanten wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Philipp Kahle und Prof. Dr. Christian Haass aus dem Labor für Alzheimer- und Parkinsonforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München exprimiert und in lyophilisierter Form freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ein Teil des Wildtyp Alpha-Synucleins wurde durch eine Kooperation mit Dr. Markus Kostka (Boehringer Ingelheim, A CNS Research, Biberach, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung erfolgte ebenfalls analog zu obigem Protokoll.

Herstellen der Protein Stammlösung Nach Auflösen der Lyophilisate in 50 mM NaPi Puffer wurde die Proteinlösung durch einen Nanosept 100K Omega bzw. einen Microcon-100 Filter von eventuellen präformierten Aggregaten befreit und anschließend die Proteinkonzentration des Filtrats photometrisch mit Hilfe der optischen Dichte bei 280 nm (OD 280 Methode, siehe 2.4.) bestimmt.

2.2.2. Tau

Die Synthese der beiden Isoformen htau 37 und htau 46 des humanen Tau-Proteins wurde selbst durchgeführt und erfolgte mit Vektoren, die freundlicherweise von PD Dr. Manuela Neumann (ZNP München) und Dr. Michel Goedert (Cambridge, Großbritannien) zur Verfügung gestellt wurden. Die Transformation der cDNA Vektoren in thermisch kompetente BL21 (DE3) RIL *E. coli* Zellen erfolgte durch Zugabe des Vektors, 10 Minuten Inkubation bei 4°C, erhitzen für 3 Minuten auf 42°C und anschließendes Abkühlen für weitere 2 Minuten bei 4°C. Darauf folgten 60 Minuten Inkubation in LB Medium ohne Antibiotikazusatz bei 37°C und Aggitation. Im Anschluß wurde die Kultur 5 Minuten bei 5000 U/min pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet resuspendiert und auf vorgewärmten, antibiotikahaltigen LB-Medium Agar Platten ausplattiert. Von dieser Übernacht-Kultur ließen sich mehrere Klone in eine weitere Übernachtkultur in antibiotikahaltigem LB-Medium überführen. Damit wurde

anschließend eine 1000 ml *Rich* LB-Medium Expressionskultur angeimpft. Bei Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm zwischen 0,6 und 0,9 erfolgte die Induktion mit IPTG (1 mM). Nach ca. 2,5 Stunden wurde die Bakterienkultur pelletiert, das Pellet unter Zugabe von ausreichend Proteaseinhibitor Mini complete mit EP resuspendiert und mechanisch mit einer French Press Apparatur (ThermoIEC, Needham Heights, USA) lysiert. Das Abtrennen des Zelldetritus erfolgte durch 15 Minuten zentrifugieren bei 27.000 x g und Sterilfiltration des Überstands durch einen 0,45 µm Filtropur-Filter (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Das Filtrat wurde in einer FPLC Anlage (Äkta prime, Amersham) über eine P11 Phosphocellulose Kationentauschersäule gebunden und über einen Salzgradienten 100 - 300 mM NaCl in EP in 2 – 5 ml Fraktionen eluiert. In einem Westernblot mit dem gegen das Tau-Protein gerichteten Primärantikörper T46 (Zytomed, Berlin, Deutschland) wurden die Fraktionen mit hohem Gehalt an Tau-Protein bestimmt und vereinigt. Die zusammengelegten Fraktionen wurden durch eine mehrstufige Ammoniumsulfat-Fällung weiter aufgereinigt, bei 95°C für 3 Minuten denaturiert und über eine mit MT-Puffer äquilibrierte PD-10 Säule umgepuffert. Die Verifizierung der Produktreinheit erfolgte durch eine SDS-PAGE Gelelektrophorese in einem 12% Acrylamid Trenngel mit anschließender Coomassie Brilliant Blue Gesamtproteinfärbung.

2.3. Gelelektrophorese und Westernblot

SDS-PAGE Zur näheren Charakterisierung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit einem Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem (Biorad, München, Deutschland) verwendet. Soweit nicht anders angegeben betrug die Konzentration des Trenngels 12% Acrylamid zur Auftrennung der aufgetragenen Proteine. Diese wurden durch 10-minütiges Erhitzen auf 95°C unter Einwirkung von Laemmli-Puffer denaturiert, auf das Gel aufgetragen und mit Laufpuffer elektrophoretisch getrennt. Hierzu wurden die Proben innerhalb des Sammelgels mit 80 V (fix) und 55 mA/Gel (variabel) ca. 40 Minuten verdichtet. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung durch das Trenngel bei 140 V und 55 mA/Gel für ca. 60 Minuten. Als Proteingewichtsstandard wurde der Protein Marker IV (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

Tab. 2.3 Zusammensetzung des Sammel- und des Trenngels der SDS-PAGE Gele. Die angegebenen Mengen sind ausreichend zur Herstellung von zwei Gelen in einer Biorad Gelapparatur.

	Sammelgel 5%	Trenngel 12%
Acrylamid-Lösung 30%	1,6 ml	8 ml
Sammel-/Trenngelpuffer	2,5 ml	5 ml
SDS Lösung 10%	100 µl	200 µl
H ₂ O	5,7 ml	8,1 ml
TEMED	7 µl	6,7 µl
APS 10%	100 µl	100 µl

Westernblot Bei entsprechender Fragestellung lässt sich im Anschluss an die SDS-PAGE Gelelektrophorese ein Westernblot durchführen. Hierzu werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine mit 100% Methanol aktivierte und mit Transferpuffer äquilibrierte Immobilon PVDF Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Dazu wurde eine Hoefer Semiphor Semidry Blot-Apparatur (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet. Der Proteintransfer erfolgte mit 30 V und ca. 0,8 mA/cm² Gel für ca. 60 Minuten. Nach dem Transferprozess wurden die freien Proteinbindungsstellen der PVDF Membran durch 5% Milchpulver in PBS-Tween (5% Blockingpuffer) geblockt. Die Detektion mit einem geeigneten Primärantikörper in 1% Blockingpuffer erfolgt bei 4°C über Nacht. Die Primärantikörperlösung wurde entfernt, die Membran 3 x mit 1% Blockingpuffer für je 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und einem geeigneten, an alkalische Phosphatase gekoppelten, Sekundärantikörper in 1% Blockingpuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur ausgesetzt. Nach drei Waschzyklen in 1% Blockingpuffer für je 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Membran für 5 Minuten in AP Puffer äquilibriert. Die Visualisierung erfolgte durch eine Reaktion mit 35 µl 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP, 50 mg/ml in 100% Dimethylformamid) und 45 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT, 75 mg/ml in 75% Dimethylformamid) in 10 ml AP Puffer bis Erreichen der gewünschten Bandenintensität.

2.4. Proteinbestimmung

2.4.1. BCA Methode

Die Konzentration der Tau-Proteine nach Synthese wurde mit der BCA-Methode (Bicinchoninic Acid) bestimmt. Dieses Prinzip beruht auf einer Reaktion zwischen Kupferionen und den Proteinen in Form einer Reduktion der zweiwertigen Kupferionen zur einwertigen Form ($\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^{1+}$). Innerhalb des Proteins sind die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin, sowie die Peptidbindung selbst für die Reduktion verantwortlich. Zusammen mit den gebildeten einwertigen Kupferionen formt die bicinchoninische Säure im alkalischen Millieu blau-violette Komplexe. Diese können mit einem geeigneten Photometer durch Bestimmung der Absorption bei 562 nm gemessen werden. Gegenüber anderen Verfahren wie dem Bradford-Ansatz, der Biuret- oder der Lowry-Reaktion, zeichnet sich die BCA- Methode beispielsweise durch stabilere Messwerte und weniger Einfluss durch zugesetzte Detergenzien aus [Smith, 1985]. Für den Ansatz wurde die BCA-Lösung mit Kupfersulfat (konz.) 50:1 vermischt und wiederum 15:1 mit der zu bestimmenden Proteinprobe in einer Multiwellplatte mit Glasboden verdünnt. Als Eichlösung wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe einer bekannten BSA-Lösung von 0 – 1 mg/ml verwendet. Die Proben wurden gemischt und anschließend 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 562 nm wurde auf einem Fluostar Optima (BMG Labtech) ELISA Reader in dreifachen Ansätzen bestimmt und arithmetisch gemittelt.

2.4.2. OD280 Methode

Die Konzentration der Synuclein-Stammlösung wurde mittels der Methode der optischen Dichte bei 280 nm (OD 280) analysiert. Dazu wurde die Extinktion der Proteinlösung bei 280 nm (E_{280}) zusammen mit dem spezifischen Extinktionskoeffizienten von Synuclein bei 280 nm ($\epsilon_{280} = 6400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) verwendet. Der Extinktionskoeffizient ist abhängig vom Gehalt der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, sowie von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken. Das spezifische Molekulargewicht des Alpha-Synuclein beträgt $M_{\text{Syn}} = 14460 \text{ g/mol}$ und die Länge des Extinktionspfades der Küvette (d) liegt bei 1 cm. Daraus ließ sich die Konzentration (c_{Syn}) der Stammlösung nach folgender Formel berechnen:

$$c_{Syn} = \frac{E_{280}}{d \cdot \epsilon_{280}} \cdot M_{Syn} [mg/ml]$$

Gleichung 2.1

2.5. Fluoreszenzmarkierung

2.5.1. Markierungsansatz

Um Proteine mit Fluorophoren zu markieren, wurden wie oben beschrieben freie primäre Aminogruppen im Protein mit den Farbstoffen Alexa488-Succinimidylester und Cy5-Succinimidylester bzw. Alexa647-Succinimidylester konjugiert. Die Zugabe der Farbstofflösung erfolgte je nach zu markierendem Protein und eingesetztem Farbstoff in einem geeigneten molaren Verhältnis zu einer Proteinlösung zusammen mit 10 Vol% Zusatz einer 1 M Na₂CO₃-Lösung (pH 8.3). Die Alkalisierung des Markierungsansatzes durch die 1 M Na₂CO₃-Lösung bewirkt ein geeignetes Reaktionsmilieu für die kovalente Bindung der Succinimidylester (optimal zwischen pH 7.5 – 8.5). Nach einer Reaktionszeit von 10 – 12 Stunden bei 4°C wurde die Bindungsreaktion entweder durch Zugabe von NH₄OH gestoppt, oder es erfolgte eine sofortige Abtrennung des freien Farbstoffes über Sephadex G5 (Synuclein) oder Sephadex G15 (Tau) mit 50 mM NaPi-Puffer pH 7 äquilibriert in Microspin Säulen (Abb. 2.1). Die Zugabe von NH₄OH bewirkt eine Bindung der Succinimidylester an die (primäre) Aminogruppe des Ammoniumions. Zusätzlich entfernt NH₄OH Farbstoffmoleküle, die nicht kovalent an Tyrosin- oder Histidinfunktionen gebunden sind. Die Säulenelution folgte folgendem Schema:

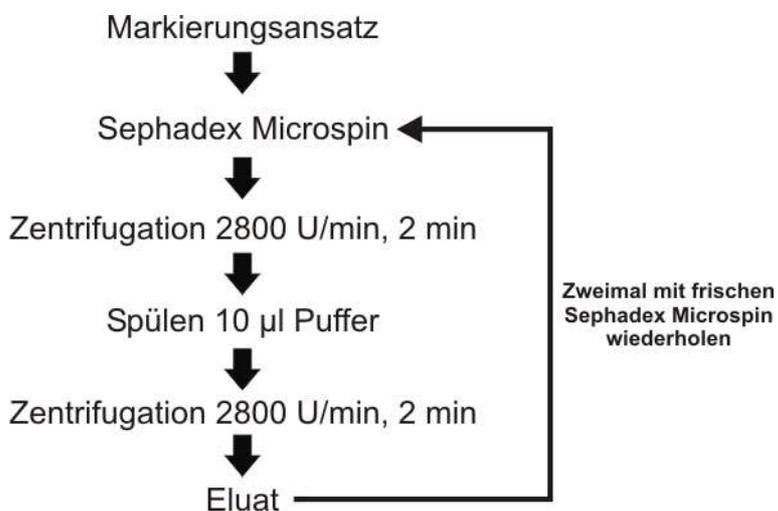


Abb. 2.1 Schema zur Abtrennung freier Succinimidylester-Farbstoffe aus dem Proteinmarkierungsansatz.

Die hergestellten Konjugate wurden zur Qualitätskontrolle mittels FCS hinsichtlich Menge, Reinheit und Diffusionszeit evaluiert (siehe 2.5.2.) und anschließend aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C vor Licht geschützt bis zu ihrer Verwendung gelagert.

2.5.2. Evaluierung der markierten Proteinsonden

Anteil des freien Farbstoffs Mit Hilfe der Autokorrelationsanalyse kann der Anteil der freien Farbstoffe bestimmt werden. Dazu dienen die, in einer Vergleichsmessung bestimmten, Diffusionszeiten (T_{diff}) einer Lösung von reinen Farbstoffmolekülen als Ausgangswerte. Setzt man diese Werte für die erste Komponente in die Gleichung für zwei Komponenten ein, so erhält man die Diffusionszeit und den prozentualen Anteil der zweiten Komponente. Bei entsprechender Diffusionszeit der zweiten Komponente entspricht deren prozentualer Anteil den konjugierten Proteinmolekülen (Tab. 2.4).

Markierungsverhältnis Die Spaltung von spezifischen Peptidbindungen innerhalb der markierten Proteine lässt sich durch Einwirkung einer hohen Konzentration der Serin-Protease Proteinase K (PK) erreichen. Diese spaltet Peptidbindungen an der carboxylischen Seite von aliphatischen, aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren bis zu einer minimalen Peptidgröße des Spaltungsproduktes von vier Aminosäuren [Ebeling, 1974]. Nach der Bestimmung des Anteils an freiem Farbstoff wurden die fluoreszenzmarkierten Proteine mit einer PK Konzentration von $200\ \mu\text{g/ml}$ über mindestens 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Aus der resultierenden Änderung (Erhöhung) der Partikelzahl lässt sich dann die durchschnittliche Anzahl der konjugierten Fluorophore pro Proteinmolekül bestimmen.

Tab. 2.4 Daten der farbstoffmarkierten Proteinsonden; alle Proteine beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die *homo sapiens* Variante (mm = *Mus musculus*, wt = wild Typ, Syn = Synuclein, hTau = humanes Tau-Protein). Farbstoffmoleküle pro Protein bezeichnet die statistische Markierungsrate durch Fluorophore.

	Farbstoff	Farbstoffmoleküle pro Protein	Freier Farbstoff	T _{diff} konjugierte Proteinsonde [µs]
wt α-Syn	Alexa488	1.6	21	ca. 700
wt α-Syn	Alexa647	1.5	5	ca. 1100
wt α-Syn	Cy5	2.6	4	ca. 1000
wt β-Syn	Cy5	4.0	13	ca. 1000
wt α-Syn mm	Cy5	4.0	15	ca. 1000
A30P α-Syn	Alexa488	2.2	3	ca. 700
A30P α-Syn	Cy5	2.0	13	ca. 1000
A53T α-Syn	Alexa488	1.8	6	ca. 700
A53T α-Syn	Cy5	2.0	10	ca. 1000
hTau37	Alexa488	1.8	14	ca. 800
hTau37	Alexa647	1.9	12	ca. 1400
hTau46	Alexa488	1.9	19	ca. 1000
hTau46	Alexa647	3.8	12	ca. 1800

2.6. Aggregationsansatz

Nach Auftauen der Synuclein-Stammlösung wurden eventuelle präformierte Aggregate durch Filtration mit einem Nanosep-100K Omega Filter entfernt um deren Einfluss auf die Kinetik der Aggregation zu eliminieren.

2.6.1. Amyloid Aggregationsansatz

Für einfache Aggregationsanalysen wurden der Proteinlösung farbstoffmarkierte Synucleinsonden in einem festen molaren Verhältnis von ca. 1:1000 (markierte Synucleinmoleküle zu unmarkierten Synucleinmolekülen) zugesetzt. Die Proteinkonzentration von Synuclein im Aggregationsansatz betrug soweit nicht anders angegeben 1 mg/ml (69 µM). Die Inkubation fand unter ständiger Aggitation bei 800 rpm und 37°C statt. Soweit es das Volumen der

Aggregationsansätze zuließ, wurden 200 µl Reaktionsgefäße verwendet. Um bei einem geringen Volumen der Ansätze – vor allem in Aggregationsansätzen die einer Inkubation von mehreren Tagen ausgesetzt waren – Probleme durch Verdunstungseffekte zu vermeiden, wurde in einigen Versuchsreihen auch ein Alternativaufbau für Ansätze mit kleinem Volumen (Ansatzvolumen < 30 µl) verwendet. Dazu wurden die Ansätze in einer Bioplate 96 mit 96 Probenfeldern inkubiert und mit TESA-Klebefilm versiegelt (Abb. 2.2).



Abb. 2.2 Aggregationsansätze in einer Bioplate 96 auf Kreisschüttler im Brutschrank bei 37°C. Dieser Aufbau wurde für die Langzeitaggregationsversuche mit Alpha Synuclein verwendet.

Für Aggregationsanalysen in den Koaggregationsversuchen mit verschiedenen Synucleinproteinen wurden zunächst die Stammlösungen des Wildtyp-Alpha-Synuclein und eines anderen Synucleinproteins im gewünschten molaren Verhältnis gemischt (Abb. 3.8) und auf eine Endkonzentration von insgesamt 1 mg/ml an Proteingehalt mit NaPi*-Puffer verdünnt. Dazu wurde dann eine äquimolare Sondenmischung aus Wildtyp-Alpha-Synucleinsonden markiert mit Alexa488 („grün“) und Sonden des jeweiligen anderen Proteins, markiert mit Cy5 („rot“), zugegeben. Die Ansätze zur Koaggregation wurden anschließend wie oben beschrieben in Mehrfachansätzen inkubiert.

Messbedingungen der Amyloid Aggregationsansätze In den Versuchsreihen wurden drei- bis vierfache Ansätze verwendet und zu den jeweiligen Meßzeitpunkten komplette Versuchsreihen mehrfach durchgeführt. Jede Probe wurde, wie oben beschrieben, fünfmal über 20 s gemessen. Aus den Messdaten

der entsprechenden Proben wurde ein Durchschnittswert (\bar{P}_{well}) gebildet und dieser auf das Durchschnittssignal aller Messwerte einer Versuchsserie (\bar{P}) bezogen um einen normalisierten Wert für jede Probe zu erhalten (Gleichung 2.2).

$$\langle \bar{P}_{well} \rangle = \frac{\bar{P}_{well}}{\bar{P}}$$

Gleichung 2.2

2.6.2. Oligomer-Aggregationsansatz

Die Untersuchung der Aggregationsvorgänge im oligomeren Bereich fanden bei einer Proteinkonzentration mit roten (Alexa647, Cy5) bzw. grünen (Alexa488) Fluorophormarkierungen von jeweils ca. 4 – 8 nM bei Synuclein und von jeweils ca. 2 – 4 nM bei Tau-Proteinen. Es wurde kein weiteres unmarkiertes Protein zugesetzt. Die Aggregation fand *in vitro* in Anwesenheit von 20% Ethanol statt [Munishkina, 2003]. Fakultativ wurde dem Ansatz auch eine Konzentration von 10 μ M Eisen-III-Chlorid zugesetzt. Eine genauere Evaluierung dieses Ansatzes erfolgt im Rahmen der Promotionsarbeit von T. Högen am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung.

Messbedingungen der Oligomer Aggregationsansätze Die Versuchsreihen wurden soweit nicht anders angegeben jeweils 10 Sekunden gemessen. Für Kinetiken wurde jede Probe 15-mal gemessen. Um daraus Daten im Sinne einer Endpunktbestimmung zu erhalten, wurde der Mittelwert über die Messungen 9 – 13 verwendet, da das Maximum der Aggregatsbildung nach dem 5 Messzyklus erreicht ist.

2.7. FCS und SIFT: Messung und Analyse

2.7.1. Messaufbau und Justage

Messaufbau Alle FCS- und SIFT-Messungen wurden auf einem Insight Reader (Evotec-Technologies, Hamburg) durchgeführt, mit der Möglichkeit der zweifarbigen Anregung bei den Wellenlängen 488 nm und 633 nm. Als Objektiv wurde ein 40x 1.2 NA Mikroskopobjektiv (Olympus, Japan) verwendet. Der Durchmesser der Lochblende betrug im FIDA-Strahlengang 70 μ m. Angeregt wurde, soweit nicht anders angegeben, mit 100 μ W bei 488 nm und mit 150 μ W

bei 633 nm bei den Messungen im Rahmen der im Abschnitt 3.1. und 3.2.1. – 3.2.4. dargestellten Versuche, sowie mit 200 μW bei 488 nm bzw. 300 μW bei 633 nm im Rahmen der Versuche 3.2.5., 3.3. und 3.4. Während der SIFT-Messungen (engl. *Scanning for intensely fluorescent targets*) betrug die Länge des „Scan“-Pfades 100 μm , die Frequenz des mobilen Fokus (engl. *Beams scanner*) 50 Hz, die Distanz der Probenverschiebung 2000 μm und jede Probe wurde für jeweils 20 s (3.1. und 3.2.1. – 3.2.4.) bzw. 10 s (3.2.5., 3.3. und 3.4.) gemessen. Daraus resultiert eine Geschwindigkeit mit der sich der Messfokus durch die Probe bewegt von $v_{\text{Scan}} = 2 \cdot 100 \mu\text{m} \cdot 50 \text{ Hz} = 10 \text{ mm/s}$. Die Temperatur für alle Messungen betrug 21°C.

Justage Um eine gleichmäßige Laserleistung zu erhalten, wurden die Lasermodule mindestens 20 Minuten vor Beginn der ersten Messung in Betrieb genommen. Im Anschluss an die Aufwärmphase wurde mit Hilfe eines in den Strahlengang eingeschobenen Detektors die Laserleistung sowohl für den Argon-Laser bei 488 nm, als auch für den Helium-Neon-Laser separat gemessen und mit Hilfe von Filtern innerhalb der optischen Apparatur auf die jeweils gewünschten Anregungsintensitäten eingestellt. Danach erfolgten die Justage des Pinholes sowie die Einstellung des optischen Korrekturrings des Objektivs. Als Referenzwerte für die Justage wurden bekannte farbstoffspezifische Eigenschaften verwendet.

2.7.2. Softwareanalyse der Messdaten

Die Daten der Photodioden während der Fluoreszenzmessung wurden in Zeiteinheiten (engl. *bin*) zu 40 μs (t_{bin}) akkumuliert und durch die Insight Reader Software aufgezeichnet. Die aufgezeichneten Daten liegen in Form zweidimensionaler Intensitätshistogramme ($H_{\text{Ir,Ig}}$) mit einem Wertebereich der Fluoreszenzintensitäten des grünen (Ig) bzw. roten (Ir) Kanals von 0 bis 255 Photonen pro bin vor. In einigen Messungen wurde auch eine Aufzeichnungsbreite der Intensitäten Ig, Ir von 0 bis 2000 Photonen/bin mit $t_{\text{bin}} = 150 \mu\text{s}$ verwendet [Bieschke, 2000]. Die Auswertung der Daten durch Analyse der Autokorrelation erfolgte mit der Software FCS+PlusEvaluation Version 2.0 (Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland). Datenverarbeitung und Analyse eines Teils der SIFT Serienmessungen wurden durch eigene Softwareroutinen vorgenommen (XSM

Manager), ein anderer Teil durch die von der Firma Evotec entwickelte Software SIFT2D, die auf den Grundlagen der XSM-Manager-Routinen basiert. Die H_{I_r, I_g} -Diagramme eines Ansatzes aus einer Serienmessung mit Hilfe der Software Pooling-NTP-2D_FIDA (Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland) vereint um so ein aufsummiertes vollständiges H_{I_r, I_g} Diagramm aller Einzelmessungen des jeweiligen Ansatzes zu erhalten.

2.7.3. Kreuzkorrelation

Das Prinzip der Kreuzkorrelationsanalyse folgt analog dem der Autokorrelation, mit dem Unterschied, dass die Korrelation nicht innerhalb desselben Kanals erfolgt, sondern ein Kanal mit dem anderen (z. B. Kanal 1 gegen Kanal 2) korreliert wird. Das Ergebnis wird wie im Fall der Autokorrelation in einem logarithmischen Diagramm gegen die Korrelationszeit aufgetragen. Dadurch lassen sich Partikel, die z. B. sowohl grüne als auch rote Fluorophore tragen, sehr gut vom Hintergrundsignal separieren. Der Wert der Kreuzkorrelation ergibt sich aus der Amplitude der Kreuzkorrelationskurve und ist bei gleich bleibender Gesamtintensität direkt proportional zur Konzentration der zweifarbigen Partikel. Deren Konzentration (C_{12}) lässt sich bei Kenntnis der Amplitudenhöhe der Autokorrelation beider Kanäle ($G_1(0)$, $G_2(0)$) sowie die der Kreuzkorrelation ($G_x(0)$) und dem effektiven Fokusvolumen (V_{eff}) berechnen (Gleichung 2.3).

$$\langle C_{12} \rangle = \frac{G_x(0)}{G_1(0) \cdot G_2(0) \cdot V_{eff}}$$

Gleichung 2.3

2.7.4. Aggregationsanalyse mit SIFT

Um Aussagen zur Aggregation machen zu können, muss das spezifische Signal der mehrfachmarkierten und damit hochintensiven Partikel (z. B. Proteinaggregate) quantitativ von einem durch ungebundene Sondenmoleküle bedingten fluoreszierenden Hintergrund unterschieden werden. Um das zu erreichen wird das Intensitätssignal beider Einzelphotonendetektoren (Avalanche Photodioden, APD) für den Kanal 1 („grün“, I_g) und den Kanal 2 („rot“, I_r) unabhängig voneinander detektiert und zu Zeiteinheiten (bins), zusammengefasst (Abb. 2.3). Die Zeiteinheiten mit den gepaarten Intensitäten I_g und I_r des zweidimensionalen

Intensitätshistogramms (H_{I_g, I_r}) lassen sich in einem dreidimensionalen Häufigkeitshistogramm auftragen. Zur Datengewinnung im Rahmen der SIFT-Analyse wird ein mobiler Laserfokus verwendet und damit die Sensitivität gegenüber seltenen, großen Aggregaten, die multiple fluoreszierende Markierungen tragen, deutlich erhöht [Bieschke, 2000; Giese, 2000].

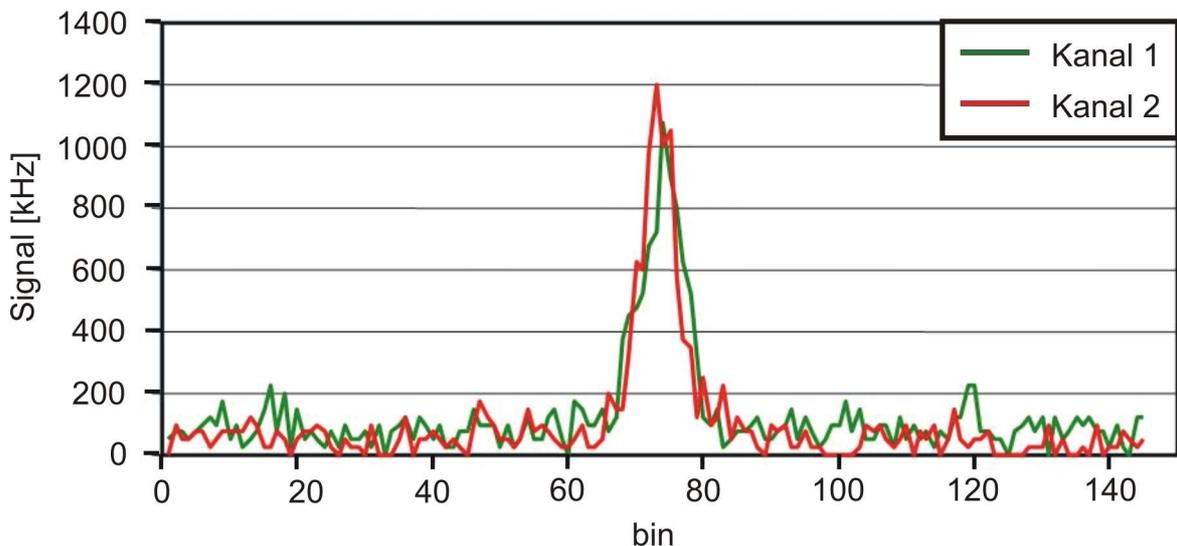


Abb. 2.3 Beispielhafte Darstellung einer SIFT-Rohdatenspur, wie sie von den APD detektiert wird. Angegeben sind simultan die Daten für den Kanal 1 („grün“) und den Kanal 2 („rot“), jeweils nach dem detektierten Signal in kHz pro 40 μ s Zeiteinheit (bin). Deutlich hebt sich zwischen bin 70 und 80 eine detektierte Spitze vom Hintergrundsignal ab, entsprechend einem zweifarbigen und mehrfach markierten Partikel.

Die gewonnenen dreidimensionalen Häufigkeitshistogramme der jeweiligen Messung lassen sich weiter analysieren. Dazu wurde der Signalanteil von I_g und I_r über einem bestimmten Schwellenwert (T) bestimmt. Um daraus die Zahl der Zeitscheiben mit hochintensen Signalen (N) zu berechnen, wurde die Summe aus allen Zeitscheiben von H_{I_g, I_r} mit $(I_g^2 + I_r^2 \geq T^2)$ gebildet. Der jeweilige Schwellenwert (T) wurde zu Beginn jeder Versuchsreihe individuell durch Messung der Proben zu Beginn des Aggregationsprozesses bei $t = 0$ bestimmt und während den folgenden Auswerterroutinen konstant belassen.

2.8. Thioflavin T Messungen

Die Messung der Thioflavin T (ThT) Fluoreszenz wurden in einem LS-55 Lumineszenzspektrometer (Perkin Elmer, Wellesley, USA) mit einer Xenonlampe

durchgeführt. Dazu wurden Quarzküvetten mit einer Exzitationspfadlänge von 1 cm mit 470 μ l NaPi Puffer, 25 μ l Thioflavin T Stammlösung (1 mM) gefüllt und 5 μ l Probenvolumen aus dem Proteinaggregationsansatz zugesetzt. Unter konstantem Rühren und einer Anregung mit 450 nm wurde die Emission bei 490 nm gemessen.

Die in der Probe des Aggregationsansatzes enthaltenen Farbstoffe Alexa488 und Cy5 hatten keinen Einfluss auf die Messergebnisse. Dies wurde vor der Versuchsreihe anhand von Probemessungen mit reinen Farbstofflösungen von Alexa488 und Cy5 in der für FCS/SIFT-Messungen üblichen Konzentration als Zusatz zu Puffer- und ThT-Stammlösung bestätigt.

2.9. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden auf einem Libra 120 Transmissions-Elektronenmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde 5 μ l Probe aus einem Synuclein Amyloid-Aggregationsansatz auf Parafilm aufgetragen und für 60 Sekunden mit einem karbonisierten Kupfernetzchen (300 x 300 Mesh, ECF300-Cu, SCI Science Services, München, Deutschland) überschichtet. Nach Antrocknen der Probe bei Raumluft wurden die Kupfernetzchen für weitere 60 Sekunden auf 5 μ l einer 2%-tigen Uranylacetat-Lösung überschichtet, der Überstand anschließend schonend mit Hilfe von Zellstoff abgenommen und wieder bei Raumluft getrocknet. So aufbereitet wurden die Kupfernetzchen in den Strahlengang des Elektronenmikroskops eingeführt und auf fibrilläre Strukturen untersucht. Die Oberfläche der karbonisierten Kupfernetzchen wurde unmittelbar vor Gebrauch für 60 Sekunden in einer Plasmareinigerröhre (Eigenbau der AG Baumeister, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) elektrostatisch geladen um die Anhaftung der Proteine zu verbessern.

2.10. Gelfiltration von Liquorproben

Zur Fraktionierung von Liquorproben nach Molekulargewicht wurde eine ÄKTAprime Chromatographieanlage (Amersham Biosciences, München, Deutschland) mit einer Superdex G75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences) verwendet. Vor Gebrauch wurden die Trenneigenschaften der Säule

mit Proteinen (Tab. 2.5) des LMW Calibration Kits (Amersham Biosciences) und das Volumen der Gelsäule mit blauem Dextran (Molekulargewicht 250 kDa) desselben Kits kalibriert. Bei einer Fraktionsgröße von 1 ml ließen sich 500 µl Liquorproben in 24 Einzelfraktionen auftrennen. Zur Auftrennung der Liquorproben wurde NaPi Puffer bei pH 7.0 mit 100 mM NaCl verwendet.

Tab. 2.5 Proteine mit jeweiligen Molekulargewichten, die zur Kalibrierung der Superdex G75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule verwendet wurden.

Protein	Größe [kDa]
Albumin	67
Ovalbumin	43
Chymotrypsin A	25
Ribonuclease A	13.7

2.11. Antigen-Antikörper-Reaktionen

Die im Rahmen der Antigen-Antikörper-Reaktionen verwendeten Influenzaantigene und Hämagglutinin-Antikörper wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Baxter Bioscience (Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.

2.11.1. Influenza Antigene

Die verwendeten Influenza Impfviren lagen in Form von inaktivierten, monovalenten oder trivalenten Impfstoffpräparationen bzw. als Stammlösungen für die Impfstoffherstellung vor. Die Präparationen aus der Herstellung der Firma Baxter Bioscience lagen in Medium mit Tris gepufferter Salzlösung (20 mM Tris, ca. 140 mM NaCl und ca. 2.5 mM KCl) vor, die kommerziell erhältlichen Impfstoffe Vaxigrip in PBS bzw. Inflexal in PBS und Lecithin. Folgende Tabelle gibt Auskunft über den Inhalt der verschiedenen Präparationen:

Tab. 2.6 Inhalte der verwendeten Influenza-Antigenpräparationen. Vaxigrip und Inflexal sind zwei kommerziell erhältliche, trivalente Impfstoffpräparationen. Die laufenden Nummern 3 – 12 sind Präparationen aus der Produktion von Baxter Bioscience. In Klammern angegeben ist der Influenzastamm (A oder B) und die Hämagglutinin- (H1, H3) bzw. Neuraminidasedomänen (N1, N2).

Lfd. Nr.	Inhalt	Bindende Antikörper
1	Vaxigrip 04/05	C86304M, C86430M, C86813M
2	Inflexal V 04/05	C86304M, C86430M, C86813M
3	Clinical Lot 03/04 PPI 410303IA	C86304M, C86430M, C86813M
4	1st Clinical Lot 04/05 Bohumil 410504IA	C86304M, C86430M, C86813M
5	Preclinical Lot 05/06 TVB MWV 010805	C86304M, C86430M, C86813M
6	NC MVB 060705 (A/H1N1)	C86304M
7	NY MVB 290605 (A/H3N2)	C86430M
8	JS MVB 280605 (B)	C86813M
9	JS MVB 200705-50K (B)	C86813M
10	NC MVB 220305 (A/H1N1)	C86304M
11	WY MVB 230305 (A/H3N2)	C86430M
12	JS MVB 250105 (B)	C86813M

2.11.2. Hämagglutinin Antikörper

Die verwendeten monoklonalen Antikörper sind gegen die Influenza Subtypen A bzw. B gerichtet. Sie liegen in PBS bei pH 7.4 mit Zusatz von 0.1 % Natriumazid vor. Um die Antikörper für FCS/SIFT-Messungen zu verwenden, wurden sie analog dem obigen Markierungsprotokoll (siehe 2.4.) mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa488-Succinimidylester und Alexa647-Succinimidylester markiert. Die Markierungsrate lag im Mittel bei ca. zwei konjugierten Fluorophoren pro Antikörper.

Tab. 2.7 Verwendete monoklonale Antikörper. Angegeben ist das jeweilige korrespondierende Epitop mit Influenzastamm und der Subtypklasse der Oberflächenproteine Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N).

Monoklonaler Antikörper	Epitop (Stamm, Oberflächenproteine)
C86304M	Influenza A, H1N1
C86430M	Influenza A, H3N2
C86813M	Influenza B

3. Ergebnisse

Um die Vorteile der SIFT-Methode für die Untersuchung von Aggregationsprozessen zu nutzen, wurde ein SIFT basierter Messansatz für die Alpha-Synuclein Aggregation entwickelt und dieser durch den Vergleich mit bereits etablierten Methoden validiert. Zusätzlich wurde der hierbei ausgearbeitete messtechnische Ansatz zur Analyse von Koaggregation in verschiedenen weiteren Systemen angewandt und somit ein Ausblick auf weitere Einsatzmöglichkeiten der SIFT-Methode aufgezeigt.

3.1. *Detektion von Alpha-Synuclein Aggregaten*

Die Alpha-Synuclein Amyloidaggregation wurden nach einem bereits etablierten *in vitro* Protokoll der Arbeitsgruppe von Philipp Kahle (Adolf-Butenandt-Institut, LMU München) durchgeführt [Kahle, 2001b]. Dazu wurde rekombinantes Synuclein in einer Konzentration von 1 mg/ml bei 37°C inkubiert. Nach einer Latenzphase von mehreren Tagen konnten Aggregate sowohl durch die SIFT-Methode, als auch durch die konventionelle Thioflavin T Bindungsreaktion als Hinweis auf deren amyloiden Charakter [Ban, 2003; Naiki, 1989] nachgewiesen werden (Abb. 3.3). Zusätzlich ließen sich die entstandenen Fibrillen direkt in der Elektronenmikroskopie darstellen (Abb. 3.5). Der zeitliche Verlauf der Reaktion entspricht dem Modell der keiminduzierten Aggregation, wie sie bei der Genese amyloider Strukturen zu finden ist [Harper, 1997]. Aufgrund der verhältnismäßig langen Latenzphase von ca. 5 Tagen ist davon auszugehen, dass die initialen Reaktionsansätze im Wesentlichen frei von präformierten Aggregaten waren (siehe 2.6), die als Aggregationskeime dienen könnten. Somit ist bei diesen Aggregationsansätzen von einer *de novo* Aggregation auszugehen.

3.1.1. **Nachweis mit Thioflavin T**

Mit Hilfe der SIFT-Methode lassen sich, wie nachstehend gezeigt ist, Aggregationsprozesse effizient und sehr sensitiv nachweisen. Um die Art der entstandenen Synucleinaggregate zu analysieren, war es notwendig, diese näher zu charakterisieren. Für das Alpha-Synuclein Protein und die Parkinson assoziierten Mutationen A30P und A53T ist eine Tendenz zu fibrillärem Wachstum gezeigt worden [Conway, 1998; Wood, 1999; Li, 2001; Uversky, 2001b].

Wie unter 2.1.3 beschrieben, zeigt der Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T nach Bindung an amyloide, fibrilläre Strukturen ein Emissionsmaximum bei 490 nm. Das Signal bei 490 nm ist proportional zu den im Probenvolumen vorhanden amyloiden Strukturen. Im Gegensatz zur SIFT-Messung lassen sich damit amyloide Strukturen von amorphen Aggregaten ohne fibrillären Aufbau diskriminieren. Es wurden Wildtyp-Alpha-Synuclein und die Parkinson assoziierte Mutation A30P auf ihr Verhalten bezüglich Amyloidbildung untersucht (Abb. 3.1). Deutlich wird, wie auch in Abb. 3.2 A zu sehen ist, der durch Thioflavin nachweisbare amyloide Charakter der entstandenen Aggregate.

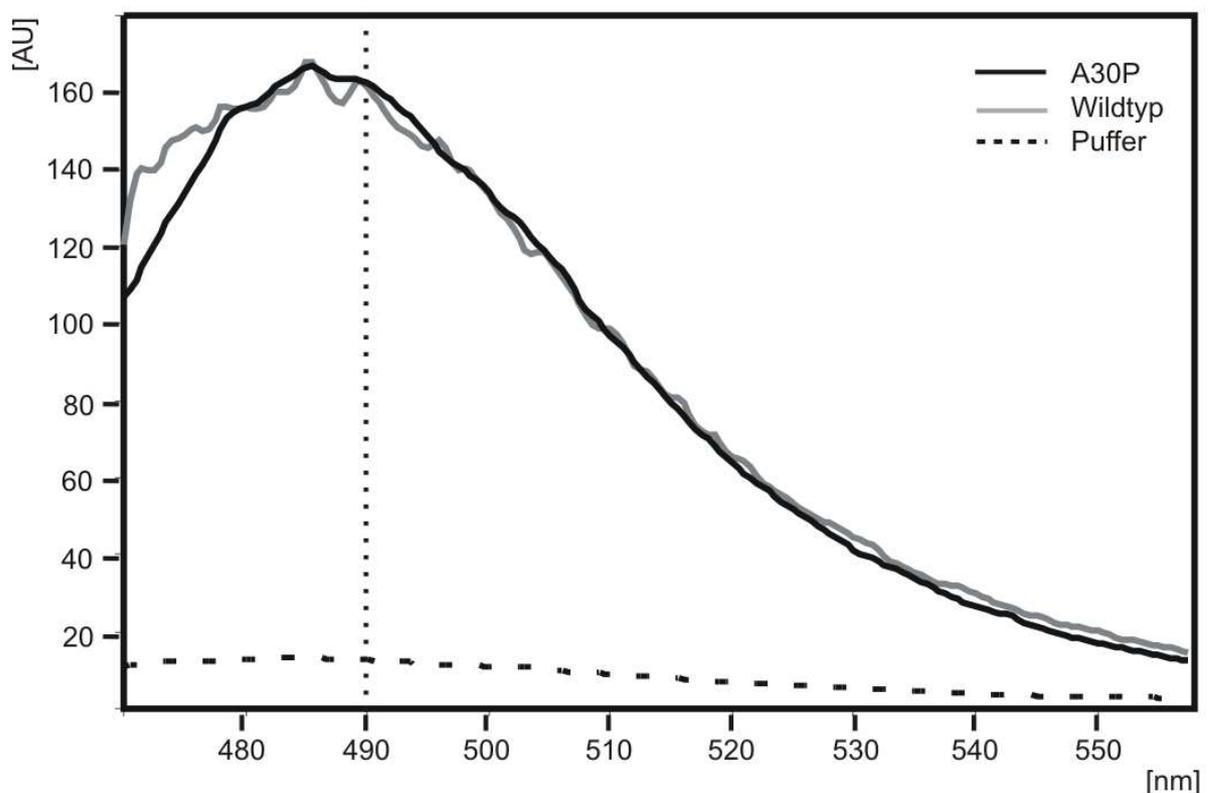


Abb. 3.1 Thioflavin T Analyse des Wildtyps und der A30P Mutation des humanen Alpha-Synucleins. Gezeigt sind die Emissionsspektren bei einer Anregung mit 450 nm der beiden Proteine (1 mg/ml) nach 9 Tagen bei 37°C und konstanter Agitation unter Zusatz von fluoreszenzmarkierten Sondenmolekülen (1:1000 im Verhältnis zu unmarkiertem Protein, siehe 3.1.2). Ausgewertet wurde der Wert bei 490 nm Emission. Kontrollwerte der Emission bei 490 nm bei Reaktionsbeginn (Tag 0): Wildtyp Alpha-Synuclein = 16,3 bzw. A30P Mutation = 11,5.

Thioflavin T Messungen von Versuchsansätzen, die neben unmarkiertem Alpha-Synuclein auch fluoreszenzmarkierte Sondenmoleküle enthielten, zeigten

gleiche Ergebnisse wie reine Ansätze aus unmarkiertem Synuclein. Dies zeigt, dass die Amyloidbildung durch die Fluoreszenzmarkierung nicht wesentlich beeinflusst wird. Darüber hinaus fand sich in Oligomer-Aggregationsansätzen auch Aggregatbildung von ausschließlich fluoreszenzmarkierten Sondenmolekülen, was ebenfalls belegt, dass die für die SIFT- bzw. FCS-Analyse nötige Fluoreszenzmarkierung die Aggregation von Alpha-Synuclein nicht relevant beeinflusst.

3.1.2. Zeitverlaufexperimente

Um mit der SIFT- bzw. FCS-Methode Moleküle und deren Eigenschaften analysieren zu können, wurden, wie bereits beschrieben, Proteinsonden verwendet, die mit einem grün-fluoreszierenden (Alexa488) oder mit einem rot-fluoreszierenden Farbstoff (Cy5 bzw. Alexa647) markiert wurden und dem Amyloid-Aggregationsansatz zugesetzt sind. Dadurch können sie im Aggregationsprozess in die gebildeten Aggregate integriert und diese somit detektiert werden. Die zugesetzten Sondenmoleküle entsprachen annähernd einem Verhältnis zu unmarkiertem Synuclein von 1:1000. Dies ist aus drei Gründen wichtig:

- Eine sehr hohe Anzahl an farbstoffmarkierten Sondenmolekülen würde die Hintergrundfluoreszenzrate im Messfokus deutlich erhöhen und somit den Nachweis von hochintensen Aggregaten behindern.
- Ein niedrigerer Zusatz von fluoreszierenden Markierungssonden würde die Helligkeit der entstehenden Aggregate reduzieren und somit ebenfalls die Detektion eines hochintensen Signals erschweren.
- Eventuelle Einflüsse des konjugierten Farbstoffteils an der Alpha-Synuclein Proteinstruktur auf den Prozess der weiteren Aggregation können minimiert werden.

Die Effizienz der SIFT-Methode und der Kreuzkorrelationsanalyse im Nachweis von Aggregationsvorgängen wurde in Zeitverlaufexperimenten mit der Thioflavin T Fluoreszenz verglichen. In diesen Experimenten finden sich sehr ähnliche Zeitverläufe in der Zunahme des Aggregationsniveaus von Alpha-Synuclein (Abb. 3.2). Mit allen drei Methoden zeigen sich eine Verzögerungsphase von annähernd 5 Tagen und ein ähnlicher Anstieg des Aggregationsniveaus bis Tag 9. Die

typische Verzögerungsphase (engl. *lag phase*) aller drei Ansätze deutet auf deren primäre Freiheit von vorgefertigten Aggregaten und somit auf eine *de novo* Aggregation hin. Dies entspricht den bereits publizierten Modellen für die keiminduzierte Aggregation im Allgemeinen und von Synuclein im Besonderen [Harper, 1997; Wood, 1999].

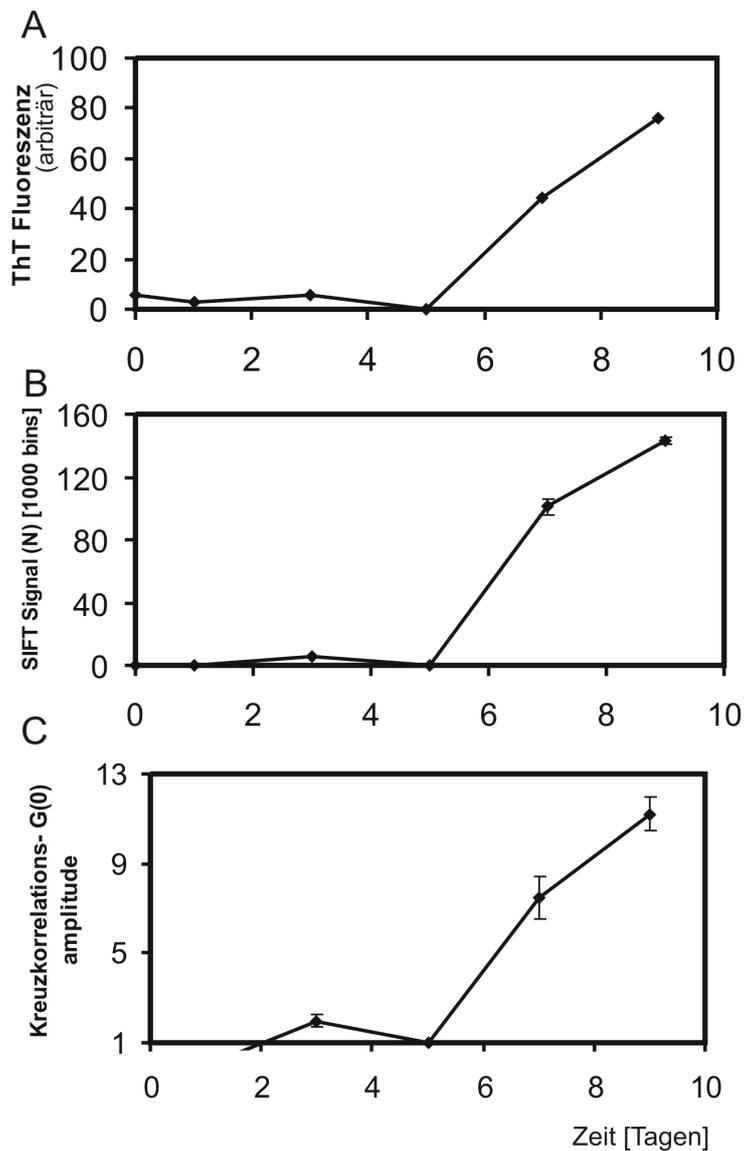


Abb. 3.2 Zeitverlauf der Alpha-Synuclein Aggregation über 9 Tage. Alpha-Synuclein (1 mg/ml) wurde im Amyloid Aggregationsansatz (siehe 2.6.1) inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben aus denselben Ansätzen mit der Thioflavin T Fluoreszenz, der SIFT-Methode und der Kreuzkorrelationsanalyse untersucht. Vergleich der Messergebnisse der Thioflavin T Fluoreszenz (A) mit denen der SIFT-Methode (B) und den Ergebnissen der Kreuzkorrelationsanalyse (C). Aufgetragen sind unter (A) die Mittelwerte aus den Ergebnissen zweier Messungen, unter (B) und (C) die Mittelwerte mit Standardabweichung von fünf Messungen eines Ansatzes.

3.1.3. Hochsensitiver Nachweis mit SIFT

Eine besondere Stärke der SIFT Analyse im Vergleich zu anderen Methoden wie der Thioflavin T Methode liegt in ihrer Sensitivität. Diese besitzt zwar eine hohe Spezifität für amyloide Strukturen, aber weist eine verhältnismäßig geringe Sensitivität auf. Im direkten Vergleich der Empfindlichkeit für Alpha-Synuclein Aggregate zeigte sich eine um etwa zwei Zehnerpotenzen erhöhte Sensitivität der SIFT-Methode gegenüber dem herkömmlichen ThT Verfahren, das bereits ab einer Verdünnung von 1:100 des Ausgangsmaterials nur noch das Niveau der Leerprobe erreicht. Die SIFT-Methode hingegen zeigt bei einer 1:1000 Verdünnung desselben Materials noch ein deutliches Signal (Abb. 3.3).

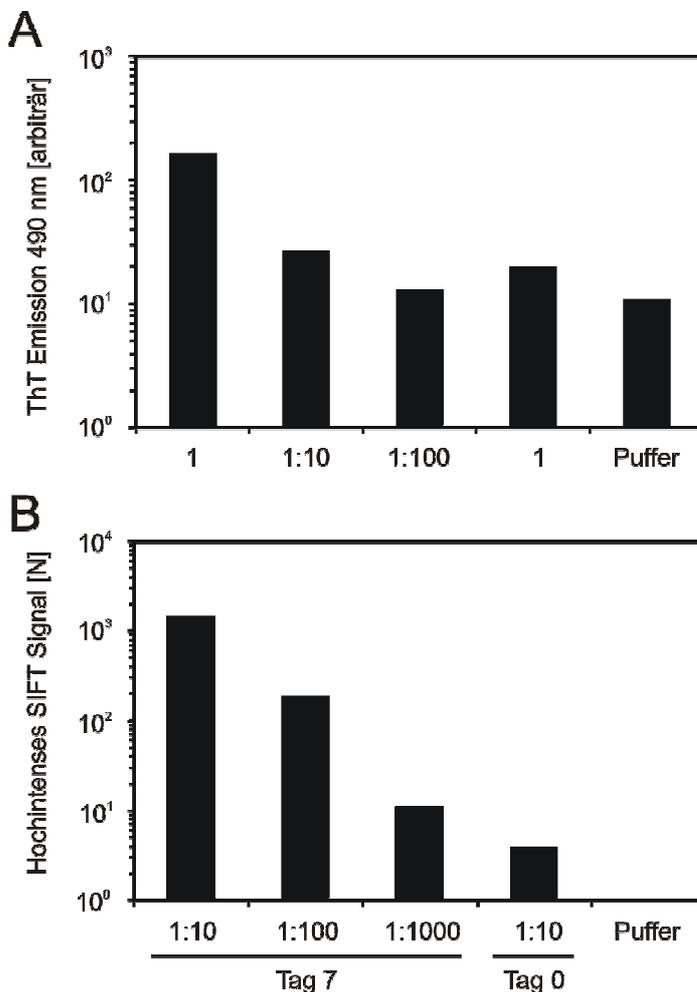


Abb. 3.3 Serienverdünnung von Proben an Tag 7 und an Tag 0 eines Aggregationsansatzes, verglichen mit dem Messwert des Puffers. Aufgetragen sind die Messergebnisse der Thioflavin T Methode (A) mit den Ergebnissen der SIFT Analyse (B). Die Thioflavin Daten entsprechen dem Mittelwert einer Dreifachmessung, die SIFT Daten dem Mittelwert einer Fünffachmessung.

3.1.4. Resistenz gegen Proteinase K

Ein weiteres Merkmal amyloider Aggregate ist ein ineffizienter Abbau durch die zelleigenen Degradationsmechanismen. Dies zeigt sich im biochemischen Ansatz durch eine relative Resistenz der entstehenden fibrillären Strukturen gegen Abbau durch die Serin-Protease Proteinase K (PK) [Kahle, 2001b; Neumann, 2002]. Während das amyloidogene und an der Parkinson-Erkrankung beteiligte Protein Alpha-Synuclein durch Aggregatbildung fibrilläre Strukturen ausbildet, die teilweise resistent gegen Proteinase K-Wirkung sind, zeigt das nicht amyloidogene ähnliche Protein Beta-Synuclein weit weniger Resistenz gegen Einwirkung der Proteinase K (Abb. 3.4).

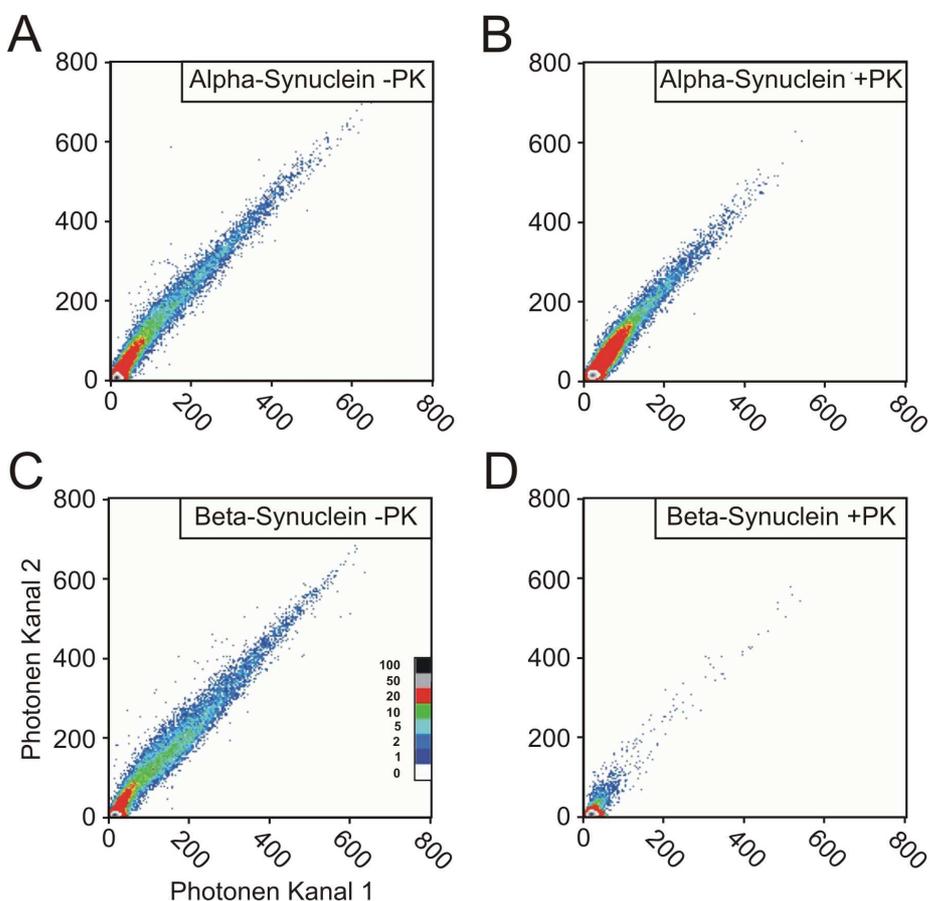


Abb. 3.4 Gezeigt ist die Einwirkung von Proteinase K (PK) auf Aggregate aus Alpha-Synuclein und Beta-Synuclein (A, B). Aufgetragen sind SIFT-Messungen nach einer Inkubation von 7 Tagen bei 37°C unter konstanter Agitation von 1 mg/ml Alpha-Synuclein ohne (A) und nach (B) Zusatz von 1 µg/ml Proteinase K. In der unteren Reihe finden sich zum Vergleich die Ergebnisse von 1 mg/ml Beta-Synuclein ohne (C) und mit (D) PK-Zusatz. Die Proben inkubierten jeweils für 2 Stunden bei

37°C in Gegenwart von 100 µg/ml Proteinase K. Die Häufigkeitshistogramme zeigen die Summe aus jeweils 10 Messungen mit je 30 Sekunden Dauer.

3.1.5. Elektronenmikroskopie

Fibrilläre Strukturen lassen sich von amorphen Aggregaten in der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) unterscheiden. Untersucht man eine vorinkubierte Alpha-Synuclein Lösung, die in der Thioflavin T Fluoreszenz eine Emissionsänderung bei 490 nm aufweist, so lassen sich stäbchenförmige Strukturen darstellen (Abb. 3.5). Diese finden sich in einer Vergleichslösung mit inkubiertem Beta-Synuclein nicht (Daten nicht gezeigt).

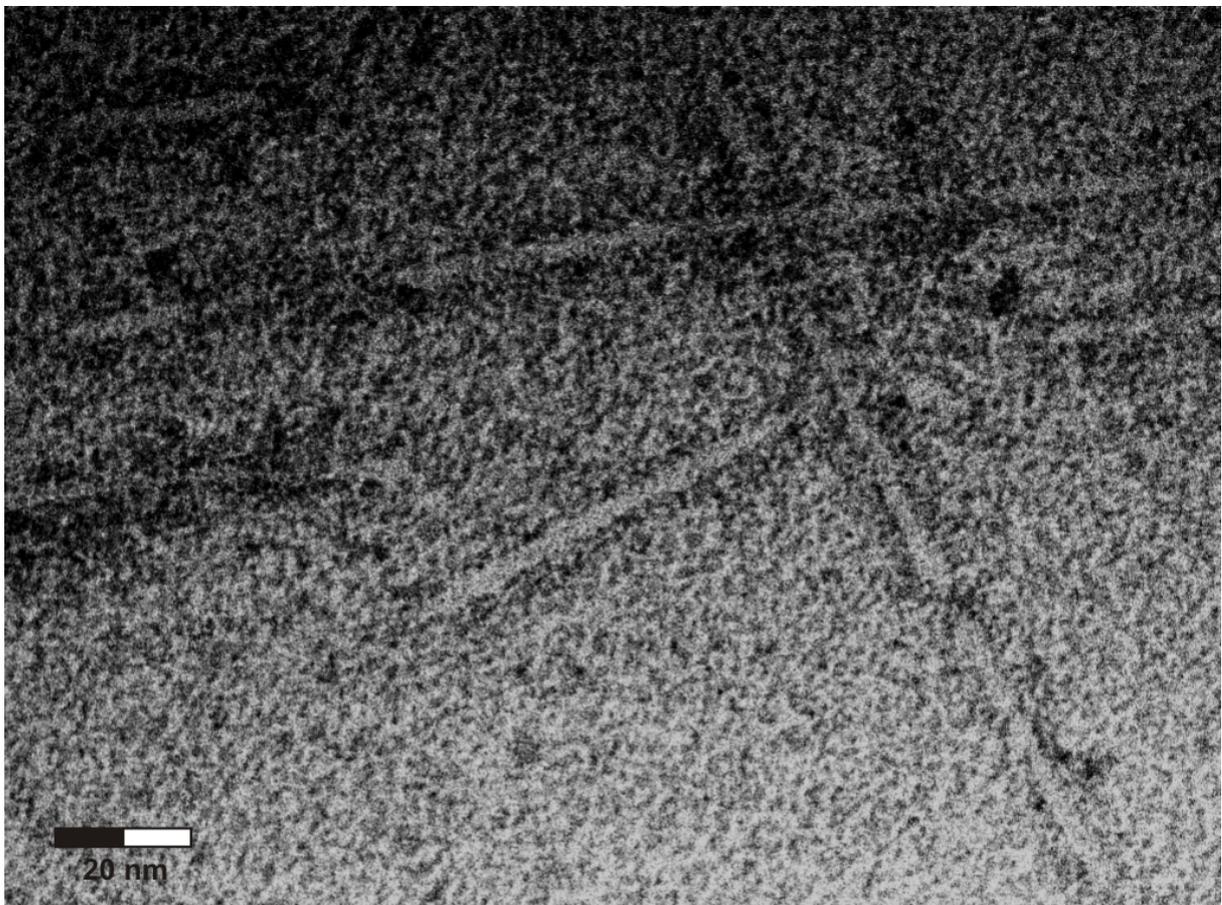
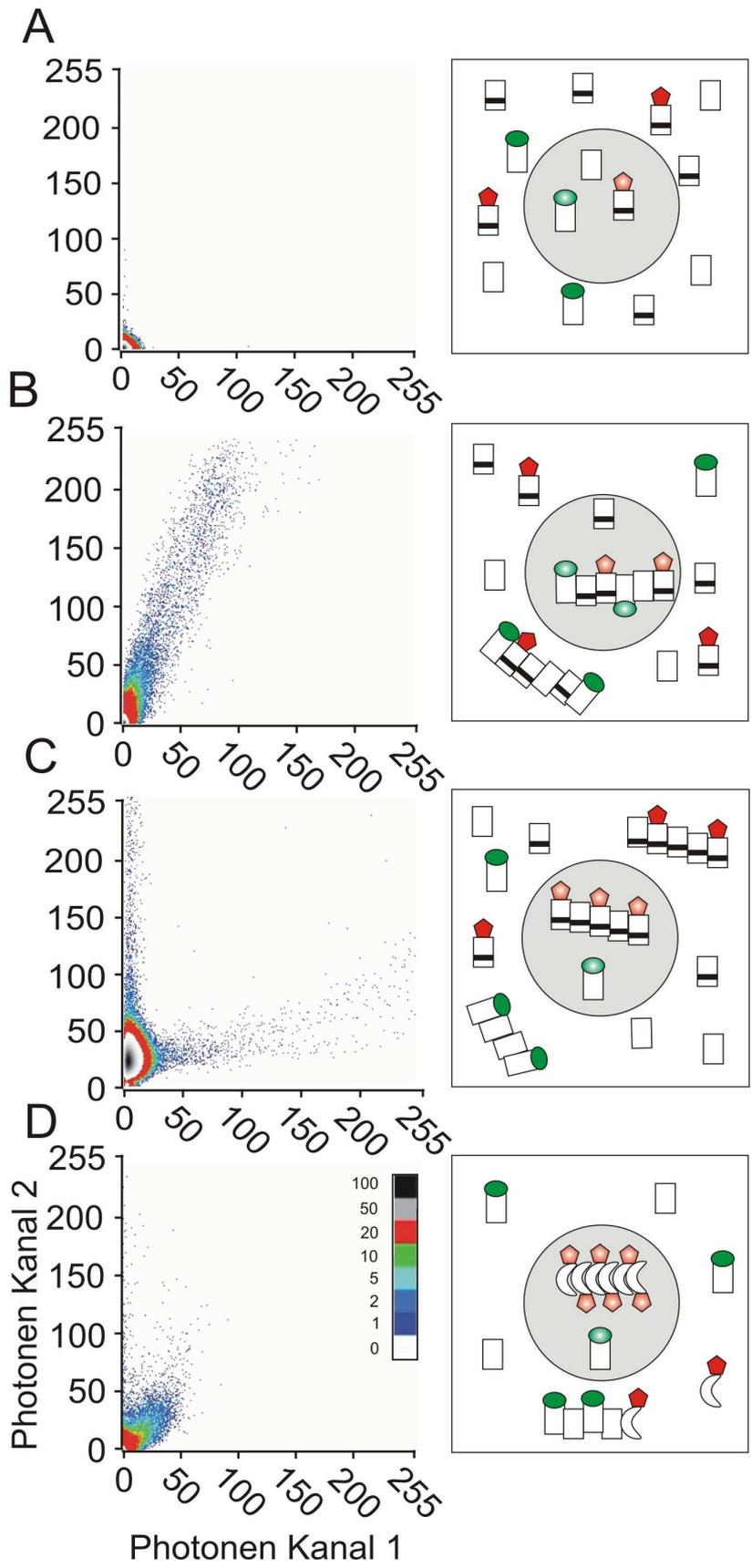


Abb. 3.5 Transmissions-Elektronenmikroskopaufnahme von Alpha-Synuclein-Fibrillen. Die Fibrillen wurden mit einer 2 % Uranylacetatlösung gegengefärbt und auf ein karbonisiertes Kupfernetzchen aufgetragen. Man erkennt deutlich die stäbchenartigen, fibrillären Strukturen, die sich teilweise überkreuzen.

3.2. Koaggregation

Eine besondere Stärke der SIFT-Methode liegt im zweifarbigen Messaufbau. Durch die konfokale Anregung mit zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlängen und die getrennte Aufzeichnung des emittierten Signals in ebenfalls zwei Wellenlängen-Bereichen lässt sich jeder Kanal separat betrachten und auch die Korrelation zwischen beiden Kanälen vergleichen. Dies ist ein bedeutender Vorteil um Koaggregationsvorgänge zu charakterisieren. So lassen sich Versuchsansätze analysieren, in denen eine Komponente eine grüne Markierung (z.B. Alexa488) und eine weitere Komponente eine rote Markierung (z.B. Cy5 bzw. Alexa647) trägt. Dieser Versuchsaufbau wurde im Rahmen der vorhandenen Arbeit genutzt und weiterentwickelt, um die Koaggregation von Wildtyp-Alpha-Synuclein mit den Parkinson assoziierten Mutationen sowie Maus-Alpha-Synuclein, Beta-Synuclein und Tau-Protein zu untersuchen. Dabei ergeben sich grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten der Interaktion beider Komponenten. Sind in der Ansatzlösung keine Aggregate mit mehreren Fluoreszenzmarkierungen vorhanden, zeigt sich kein hochintensives Signal (Abb. 3.6A) und somit im Rahmen der Nachweisgrenzen die Aggregatsfreiheit der *de novo* Aggregationsansätze. Nach Inkubation zwischen beispielsweise dem Wildtyp-Alpha-Synuclein mit einer seiner Parkinson assoziierten Mutationen über mehrere Tage entstehen heterogene, hochintense Aggregate, die beide Markierungen tragen (Abb. 3.6B) und somit aus beiden Proteinen, Wildtyp und Mutation, zu gleichen Teilen aufgebaut sind. Dagegen zeigen Ergebnisse eines Messansatzes, von zuerst separat aggregiertem und erst anschliessend gemischtem Wildtyp-Alpha-Synuclein und einer Mutation, deutlich die homogenen, jeweils einfarbigen Aggregate in grün und rot in Koexistenz ohne heterogene Aggregatsbildung (Abb 3.6C). Darüber hinaus ließ sich zeigen, dass in Ansätzen zwischen Alpha-Synuclein und einem anderen amyloidogenen Protein wie dem Prionprotein neben heterogenen, teilweise auch homogene Aggregate entstehen (Abb. 3.6D).



←

Abb. 3.6 (Seite 54) Exemplarische und schematische Darstellung von Vorgängen in Koaggregationsexperimenten. Dargestellt sind in der linken Spalte Originalhistogramme der SIFT-Messung, in der rechten Spalte die schematische Darstellung der Vorgänge im Versuchsansatz. In den schematischen Versuchsansätzen befinden sich jeweils zwei sowohl markierte als auch unmarkierte Komponenten, die sich außerhalb und innerhalb des Laserfokus (grauer Kreis) aufhalten. Diese sind symbolisiert durch □ für Wildtyp-Alpha-Synuclein; □ für die A30P Mutation; □ für Wildtyp-Alpha-Synuclein mit Alexa488 Markierung; □ für A30 mit Cy5 Markierung; □ für Prionprotein mit Cy5 Markierung. Die *de novo* Bedingungen sind zum Startpunkt der Inkubation exemplarisch an einem gemischten Ansatz zwischen Wildtyp-Alpha-Synuclein und der A30P Mutation gezeigt (A). Nach Inkubation entstehen, im Beispiel in etwa zu gleichen Teilen aufgebaute, heterogene Aggregate (B). Werden beide Proteine getrennt voneinander vorinkubiert, anschließend zusammen gegeben und sofort gemessen zeigen sich hochintense, homogene Aggregate unabhängig voneinander (C). Nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Prionprotein stellen sich neben heterogenen Aggregaten auch teilweise homogene Aggregate des Prionproteins dar (D).

3.2.1. Koaggregation mit Alpha-Synuclein der Maus, A30P und A53T

Im Falle der bekannten familiären Parkinson-Erkrankungen mit Punktmutationen im Alpha-Synuclein finden sich unter den Patienten heterozygote Genotypen für das Wildtyp-Alpha-Synuclein und der Parkinson assoziierten Mutationen. Aus diesem Grund ist die Frage der Koaggregation von Wildtyp und Mutation von möglicher pathologischer Relevanz. Da weiterhin transgene Mausmodelle für die Erforschung der Synucleinopathien ebenfalls eine wichtige Rolle spielen [Kahle, 2001a; Fillon, 2005; Masliah, 2005; Shults, 2005; Yazawa, 2005], ist in diesem Fall die potentielle Koaggregation und Interaktion zwischen humanem Alpha-Synuclein und dem Alpha-Synuclein der Maus von Bedeutung. Die Koaggregation zwischen humanem Wildtyp-Alpha-Synuclein und dem Alpha-Synuclein der Maus, bzw. zwei der drei bekannten humanen Parkinson assoziierten Mutationen, A30P bzw. A53T, wurde untersucht. Als Kontrollansatz diente ein Amyloidaggregationsansatz mit reinem humanem Wildtyp-Alpha-Synuclein (Abb. 3.7 A). Koaggregationsansätze mit Alpha-Synuclein der Maus und den Mutationen A30P bzw. A53T zeigen einen Einbau beider Sonden in die entstehenden Aggregate (Abb. 3.7). Zudem lassen sich anhand der Histogramme zu stöchiometrisch gleichen Teilen aufgebaute Aggregate erkennen.

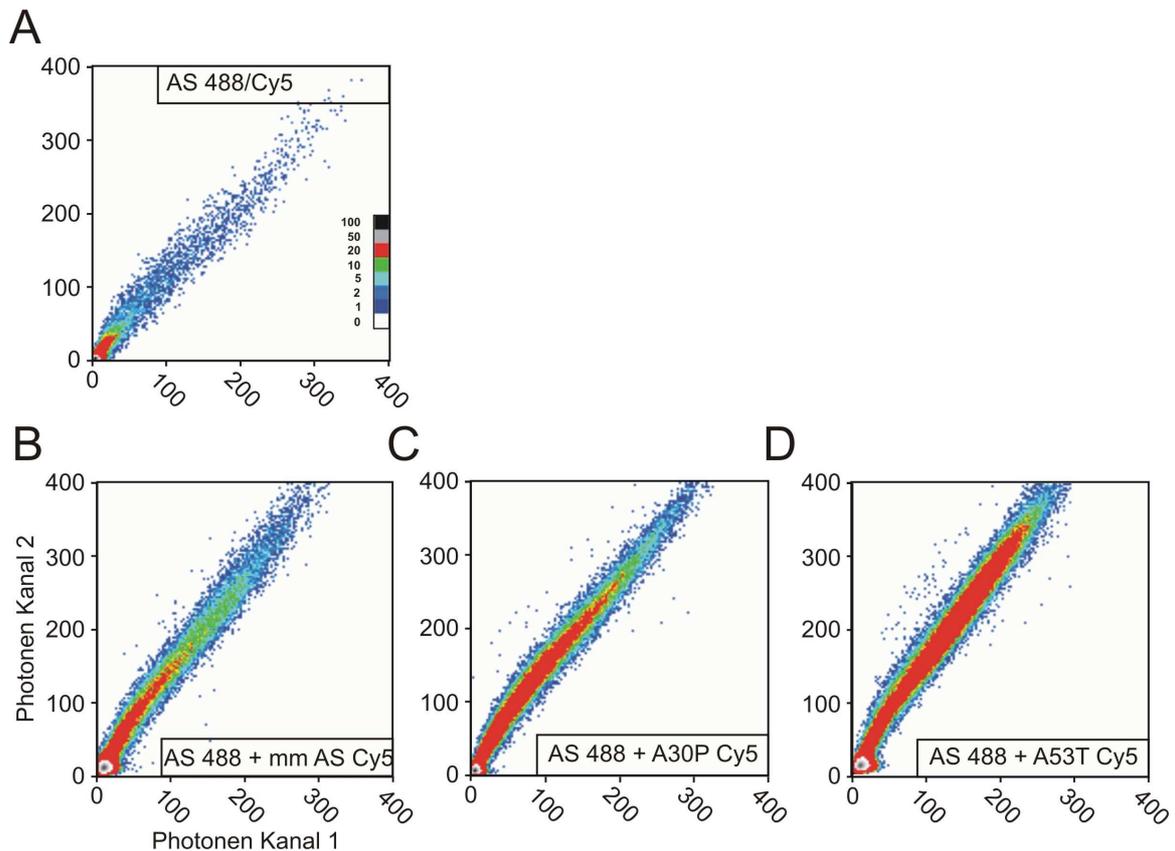


Abb. 3.7 Koaggregation von humanem Wildtyp-Alpha-Synuclein (AS) mit dem Wildtyp-Alpha-Synuclein der Maus (mm AS) (B), sowie den Mutationen A30P (C) bzw. A53T (D). Als Kontrolle diente ein Ansatz, der nur den humanen Wildtyp des Alpha-Synucleins sowohl unmarkiert, als auch als Sondenmolekül enthielt (A). Innerhalb der Amyloidaggregationsansätze wurde ein äquimolares Verhältnis sowohl zwischen den beiden beteiligten unmarkierten Proteinen, als auch zwischen den jeweiligen markierten Sondenmolekülen gewahrt. Die jeweilige Fluorophormarkierung ist angegeben. Das markierte humane Wildtyp-Alpha-Synuclein ist in allen Versuchen mit Alexa 488 (abgebildet in Kanal 1) markiert, während der jeweilige Reaktionspartner eine Markierung mit Cy5 (abgebildet in Kanal 2) trägt. Alle Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt und zeigen vergleichbare Ergebnisse.

3.2.2. Einfluss durch das molare Verhältnis der Monomere

Die Auswirkung von unterschiedlichen molaren Verhältnissen des Wildtyp-Alpha-Synucleins und der A30P Mutation während der Koaggregation wurde untersucht, wie sie in *knock-down* Individuen denkbar sind. In der photonengewichteten SIFT Analyse der hochintensiven Einheiten zeigt sich eine deutliche Zunahme der Aggregationsrate, insbesondere in asymmetrischen, nicht-äquimolaren, Verhältnissen von 1:5 bzw. etwas weniger deutlich bei 1:2. Um nähere Informationen über die Qualität und den amyloiden Aufbau der

entstandenen Aggregate zu bekommen, wurden neben zwei unterschiedlichen SIFT Analysen auch Messungen mit Thioflavin T durchgeführt. Diese zeigten ebenfalls eine Begünstigung der Aggregatsbildung durch nicht-äquimolare Verhältnisse, jedoch hier eher bei einem Verhältnis von 1:2. In beiden Messreihen, sowohl in der SIFT-Methode als auch in der Thioflavin T Fluoreszenz, liegt der durchschnittliche Messwert der reinen A30P Mutation jeweils etwas höher als der Wert des reinen Wildtyp-Alpha-Synucleins.

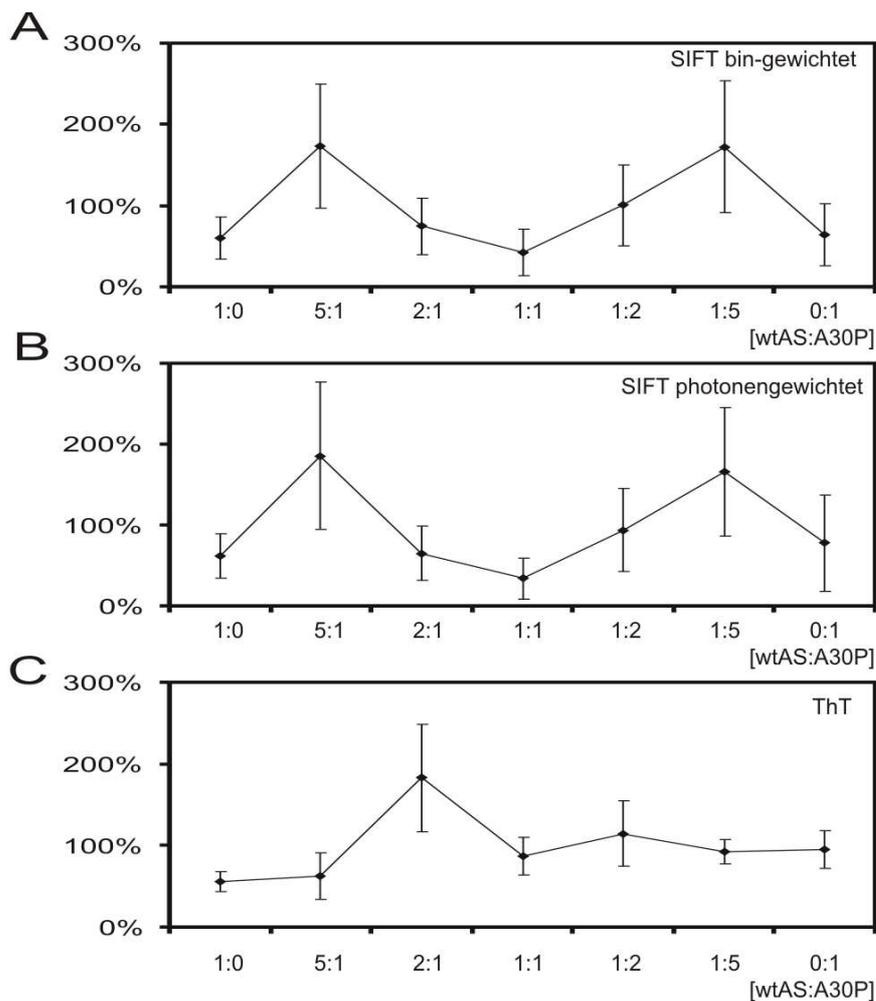


Abb. 3.8 Einfluss des molaren Verhältnisses des Wildtyp-Alpha-Synuclein (wtAS) und der A30P Mutation in der Koaggregation. Man sieht sowohl in der bin-gewichteten (A), als auch in der photonen-gewichteten (überproportional gewichteter Einfluss von höher intensen Aggregaten) SIFT Analyse (B), sowie in der Thioflavin T Fluoreszenz Messung (C) eine Bevorzugung der Aggregation bei nicht äquimolaren Mischungsverhältnissen. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei separaten Versuchen mit jeweils Duplikatmessung, normiert auf den mittleren Wert der SIFT-Messung bzw. der Thioflavin T Fluoreszenz des jeweiligen Versuchs. Angegeben ist der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der vier Messwerte. Die Wichtung nach der Anzahl der

hochintensen Zeiteinheiten (bin-Wichtung) entspricht annähernd der Anzahl der entstandenen Aggregate, während die Photonen-Wichtung annähernd mit der Menge des aggregierten Proteins korreliert.

3.2.3. Einwirkung von Beta-Synuclein

Es existieren Untersuchungen zur Wirkung von Beta-Synuclein auf die Aggregation des Alpha-Synuclein [Hashimoto, 2001]. In den folgenden Versuchen zeigt sich eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Alpha-Synuclein Aggregation durch Anwesenheit von Beta-Synuclein. Diese wird bereits deutlich bei Zusatz von unmarkiertem Beta-Synuclein im Verhältnis 1:10 zu einem zweifarbigem Alpha-Synuclein Amyloid-Aggregationsansatz. Noch ausgeprägter ist die Hemmung bei Zusatz im Verhältnis von 1:1 an unmarkiertem Beta-Synuclein zu beobachten (Abb. 3.9).

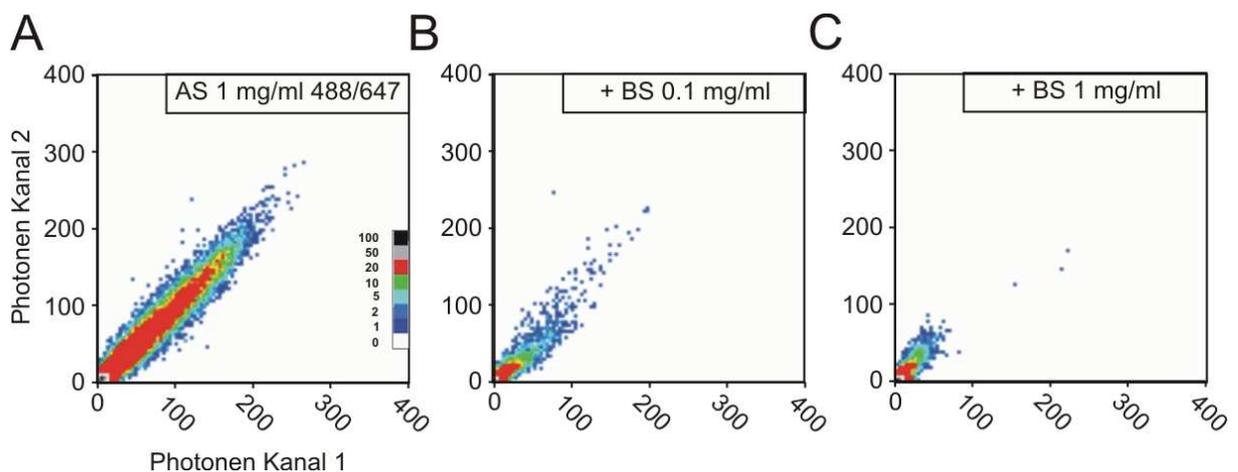


Abb. 3.9 Amyloid-Aggregationsansatz von humanem Alpha-Synuclein (AS) unter Einwirkung von humanem Beta-Synuclein (BS). Als Kontrolle diente ein reiner Alpha-Synuclein Amyloid-Aggregationsansatz (A). Setzt man nun unmarkiertes Beta-Synuclein zu, ergibt sich eine Hemmung der Alpha-Synuclein Aggregation. Diese Hemmung ist bei Zusatz von 0,1 mg/ml (ca. 7 μ M) Beta-Synuclein (B) konzentrationsabhängig weniger deutlich ausgeprägt als bei 1 mg/ml (ca. 70 μ M) Zusatz (C).

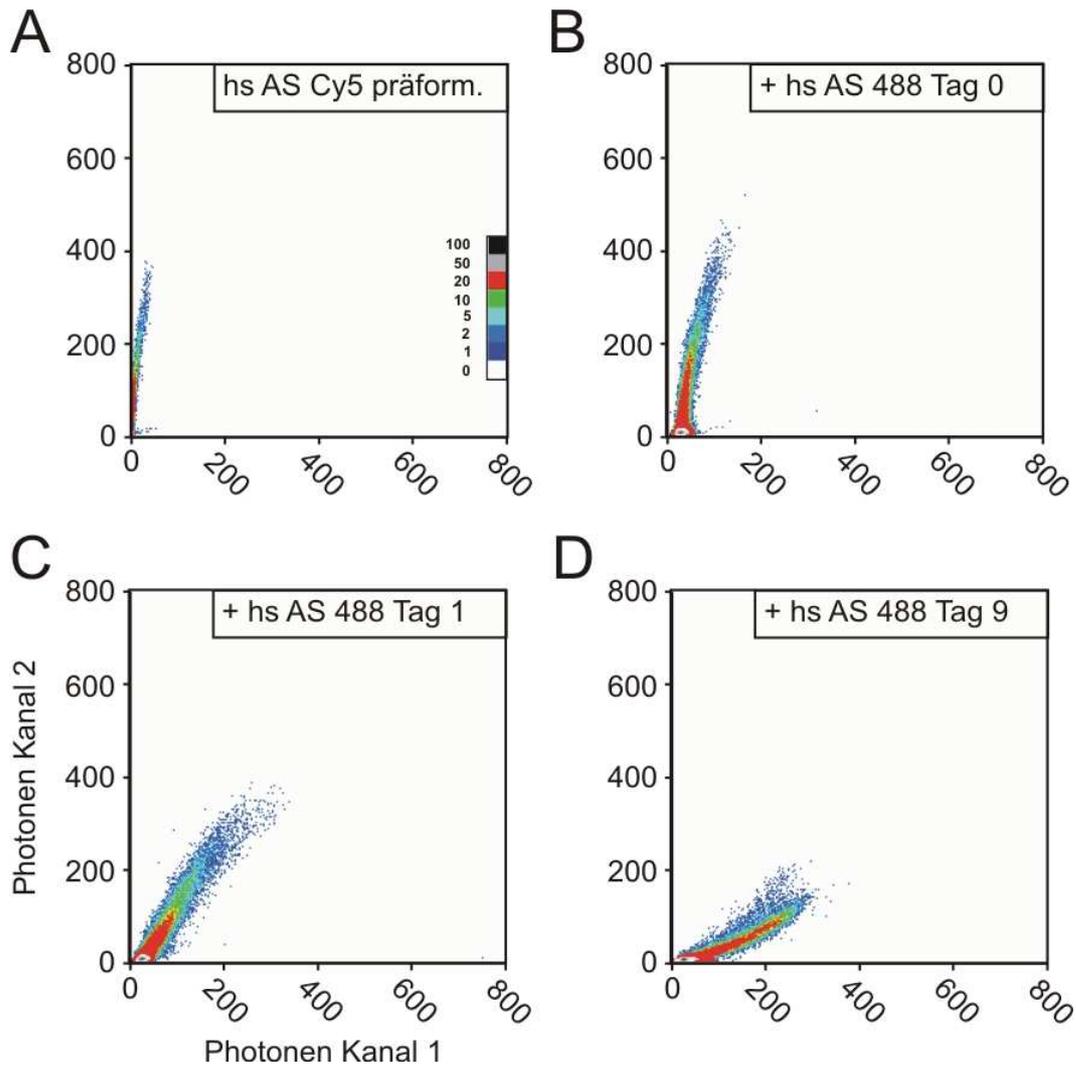
3.2.4. Anlagerung an vorbestehende Aggregate

Im Krankheitsprozess vieler neurodegenerativer Erkrankungen bilden sich amyloide Aggregate, die im Verlauf der Erkrankung an Zahl und Größe zunehmen. Es stellt sich die Frage, ob sich auch im *in vitro* Ansatz die Anlagerung von Monomer an vorbestehende Aggregate nachweisen lässt. Darüber hinaus ist von

Interesse, ob ggf. diese Anlagerung primär dazu führt, dass neue Aggregate entstehen, oder sich die bereits bestehenden in erster Linie vergrößern. Dazu wurden in einem separaten Versuch Alpha-Synuclein Aggregate erzeugt, die neben einem großen Anteil an unmarkierten Alpha-Synuclein Monomeren auch einige rot (Cy5) markierte Alpha-Synuclein Sondenmoleküle tragen (Abb. 3.10A). Zu diesen Aggregaten, wurden nun grün (Alexa 488) markierte Sondenmoleküle von humanem Wildtyp-Alpha-Synuclein gegeben. Die Aggregation über die Zeit von 9 Tagen zeigt, dass sich im Verlauf die Reaktionspartner an die vorbestehenden Aggregate anlagern und in erster Linie zu einer Größenzunahme der präexistenten Aggregate führen. Dies wird durch eine im Zeitverlauf deutliche Verschiebung des Ausgangssignals vom roten Kanal 2 hin zum grünen Kanal 1 dargestellt (Abb. 3.10B-D). Als ein weiterer Hinweis für die Anwendbarkeit des Modells der keiminduzierten Aggregation gilt, dass Anlagerungseffekte bereits einen Tag nach Versuchsbeginn deutlich erkennbar sind, während die oben gezeigte *de novo* Aggregation frühestens ab Tag 5 nach Versuchsbeginn sichtbar wurde.

Abb. 3.10 (siehe Seite 60) Anlagerung an präformierte Aggregate. Zu in separaten Versuchen hergestellten Alpha-Synuclein Aggregaten, die unmarkiertes und Cy5 markiertes Alpha-Synuclein enthalten (A), werden über einen Inkubationszeitraum von 9 Tagen (B–D) grün (Alexa 488) markierte Sondenmoleküle von humanem Alpha-Synuclein (hs AS) gegeben. Es zeigt sich eine Anlagerung der grünen (Kanal 1) Sondenmoleküle an die präformierten, roten (Kanal 2) Aggregate. Die einfarbigen Aggregate wurden in einem Vorversuch hergestellt aus Alpha-Synuclein (ca. 130 μ M) mit Cy5 markierten Alpha-Synuclein Sondenmolekülen im Verhältnis von ca. 1000:1 nach Inkubation über 7 Tage bei 37°C unter konstanter Agitation. Der Zusatz der Alexa 488 markierten Sondenmoleküle erfolgte in äquivalenter Konzentration zu den Cy5 markierten Sonden. Inkubation über weitere 9 Tage bei 37°C unter ebenfalls konstanter Agitation.

→



3.2.5. Interaktion mit Tau-Protein

Kreuzkorrelationsanalyse Mit der Kreuzkorrelationsanalyse lassen sich molekulare Interaktionen auf Oligomerebene besser verfolgen. Der Oligomer-Aggregationsansatz wurde verwendet, um die Bildung der frühen Vorstufen von Alpha-Synuclein-Fibrillen näher verfolgen zu können. Dabei wurde dem Ansatz kein zusätzlich unmarkiertes Synuclein zugefügt und besondere Sorgfalt darauf gelegt, dass die Ansätze ohne präexistente Aggregationskeime *de novo* Aggregation zeigen, die potentiell die Geschwindigkeit, Größe und Anzahl der entstehenden Aggregate beeinflussen kann. Unten stehend zeigt sich anhand der sehr sensitiven Kreuzkorrelationsanalyse die Oligomerformation über die Zeit (Abb. 3.11). Man erkennt einen deutlichen Anstieg der Aggregationsrate ab dem Zeitpunkt 0 Minuten bis sie ein Maximum ab etwa 120 Minuten erreicht. Im

Vergleich dazu führt derselbe Ansatz in Puffermedium ohne Ethanolzusatz zu einem deutlich prolongierten Beginn der Aggregation ab etwa 60 Minuten nach Versuchsbeginn. Zudem wird ein insgesamt niedrigeres Niveau an Aggregatsbildung erreicht. Die Teilchenzahl wurde zu Beginn jedes Versuchs mit Hilfe der FCS Analyse auf 2 – 10 fluoreszierende Teilchen pro Kanal (zusammen ca. 4 – 20 nM markierte Proteinsondenmoleküle) eingestellt. Gezeigt sind in Abb. 3.11 Daten aus einem repräsentativen Experiment. Mehrfach durchgeführte Versuchsreihen dieser Art zeigten je nach anfänglicher Teilchenzahl der eingesetzten Synucleinsonden ein ähnliches Ergebnis. Bei niedrigen initialen Teilchenzahlen (< 5 pro Kanal) unterbleibt die Oligomerbildung ohne Ethanolzusatz teilweise völlig.

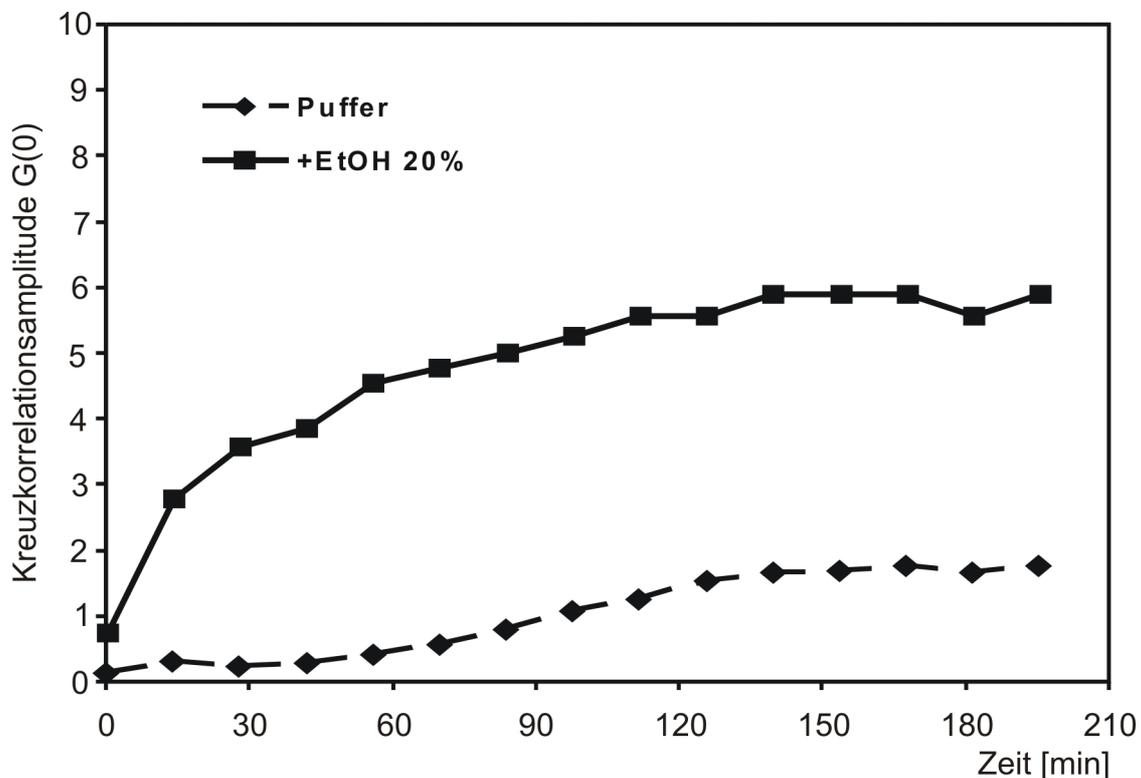


Abb. 3.11 Dargestellt ist die Oligomerbildung von Wildtyp-Alpha-Synuclein über einen Zeitverlauf von mehr als 3 Stunden. Die durchgehende Linie repräsentiert die Datenpunkte eines Ansatzes mit 20% Ethanolzusatz, die gestrichelte dient als Kontrolle in Puffermedium ohne Ethanol.

Alpha-Synuclein und Tau-Protein Aufgrund der häufigen Koinzidenz von neurodegenerativen Erkrankungen verschiedener Ätiologie stellt die Interaktion zwischen verschiedenen amyloidogenen Proteinen eine besondere Situation dar.

Hierbei kommt den Proteinen Tau und Alpha-Synuclein eine herausragende Bedeutung zu. Dies ergibt sich nicht zuletzt aufgrund der zytoplasmatischen Kolokalisation beider Proteine und der damit verbundenen engen räumlichen und funktionellen Beziehung zueinander. Diese pathologische Relevanz zeigt sich beispielweise in der Lewy-Körperchen Sonderform der Alzheimer-Erkrankung [Galpern, 2006]. Um die Vorgänge bei Entstehung und Überlagerung verschiedener Krankheitsformen besser verstehen zu können, wurde die Koaggregation von Tau-Protein und Alpha-Synuclein untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt besonders auf Vorgängen, die auf der Ebene der Oligomerbildung stattfinden. Außerdem wurde das Verhalten beider Proteine im Oligomeraggregationsansatz untersucht. Da alle 6 Isoformen des Tau-Proteins *in vivo* zu gleichen Anteilen exprimiert werden [Goedert, 2005; Galpern, 2006], wurde exemplarisch die Tau Isoform htau 46 mit 412 Aminosäuren, einer N-terminalen Insertionsdomäne und vier C-terminalen Wiederholungssequenzen eingesetzt. In Kontrolleexperimenten zeigt sich eine gute Aggregationsbereitschaft des Tau-Proteins unter den Bedingungen des Alpha-Synuclein Oligomeraggregationsansatzes mit und ohne Zusatz von dreifach positiven Eisenionen (Abb. 3.12A). Hier zeigt sich ein dem Alpha-Synuclein vergleichbares Verhalten. Während Tau in reinem Natriumphosphat-Puffermedium nur schwache Oligomerbildung zeigt, erhöht sich dieser Effekt unter Zugabe von Ethanol deutlich und lässt sich durch zusätzlichen Einfluss von dreiwertigen Eisenionen noch weiter steigern. Diese Beobachtung zeigt sich unter anderen Puffermedien (Daten nicht gezeigt), die von anderen Autoren zu Aggregationsstudien des Tau-Proteins verwendet wurden, wie beispielsweise 30 mM MOPS Puffer (pH 7.4), stellenweise noch deutlicher [Neumann, 2005]. Wie von den Aggregationsstudien mit Alpha-Synuclein bekannt ist [Giese, 2005], zeigt sich auch in der Tau-Protein-Aggregation eine zumindest partielle konzentrationsabhängige Aggregationshemmung durch Zusatz von bovinem Serum Albumin bzw. NP40 Detergenz (Abb. 3.12B, C). Diese Beobachtungen ließen sich in zahlreichen Versuchsreihen bestätigen.

Im Rahmen von Koaggregationsexperimenten zwischen Tau-Protein (Alexa488 markiert, Kanal 1) und Alpha-Synuclein (Alexa647 markiert, Kanal 2) zeigte sich ein wechselseitiger Einbau der Proteinsonden beider Qualitäten in gemeinsame

Aggregate (Abb. 3.13). Dies geschieht nicht, oder nur in einem sehr geringen Maß, in Natriumphosphat-Puffer. Fördert man jedoch die Aggregationsrate durch Zusatz von Ethanol, wird der gegenseitige Einbau in gemeinsame Aggregate deutlich, dargestellt durch doppelfarbiges Signal in beiden Kanälen. Während in NaPi-Puffer unter Ethanolzusatz die Aggregation zugunsten von kleineren Oligomeren beschleunigt wird, zeigt sich unter dem Einfluss von 30 mM MOPS Puffer eine allseits gesteigerte Aggregation mit Tendenz zur Ausbildung von größeren, intensiver fluoreszierenden Aggregaten.

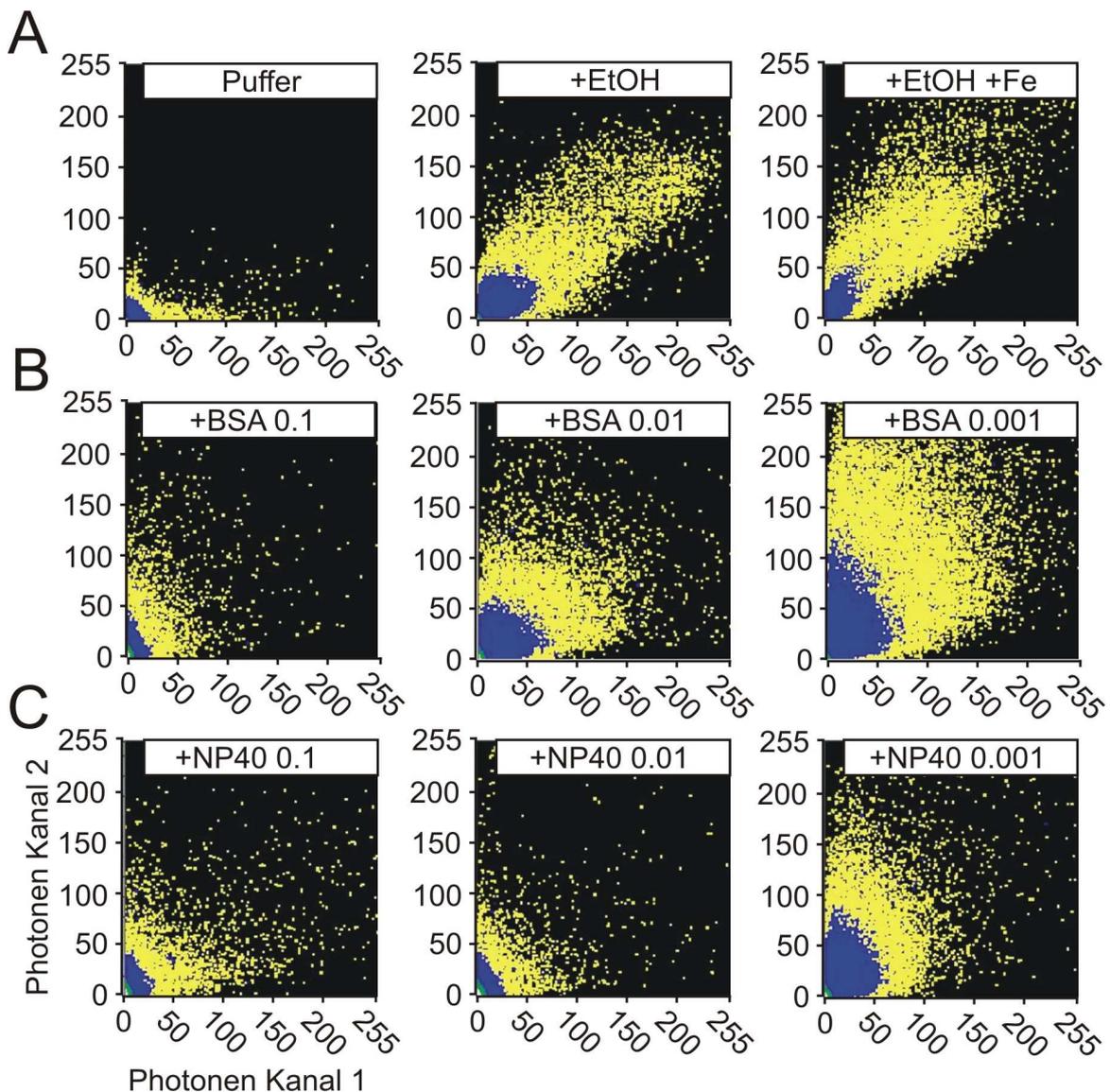


Abb. 3.12 Vergleich der Tau-Protein Aggregation (ca. 10 nM) in Natriumphosphat Puffer (50 mM NaPi, pH 7,4), unter Zusatz von 20 Vol% Ethanol bzw. 20 Vol% Ethanol (EtOH) mit 10 μM Fe^{3+} (A). Es zeigt sich eine Steigerung der Aggregatsformation unter Ethanolzusatz, die sich in Anwesenheit

von Eisenionen noch erhöhen lässt. Die Einwirkung von unterschiedlichen Konzentrationen bovines Serumalbumins (BSA) ergibt eine partielle konzentrationsabhängige Hemmung der Tau Aggregation, die stärker ausfällt, je mehr BSA (Angaben in mg/ml BSA) im Versuchsansatz präsent ist (B). Ein ähnlicher Effekt ergibt sich unter Einfluss des nicht-ionischen Detergenz NP40 (Angaben in Vol% NP40) (C). Die Versuchsreihen B und C fanden jeweils unter Zusatz von 20 Vol% Ethanol statt. Alle Versuche wurden in Mehrfachbestimmung durchgeführt und zeigten ein ähnliches Ergebnis.

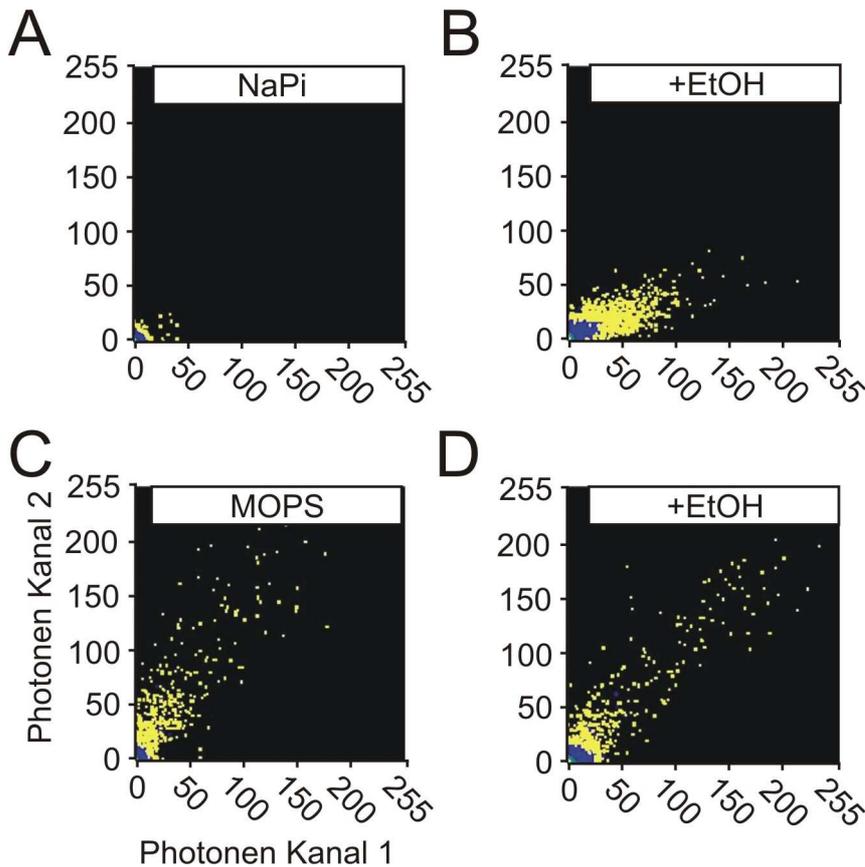


Abb. 3.13 Koaggregation von Tau und Alpha-Synuclein. In NaPi Puffer (50 mM, pH 7) findet keine oder nur wenig Aggregation statt (A). Durch Zusatz von 20 Vol% Ethanol (EtOH) lässt sich die Aggregationsrate deutlich steigern, mit bevorzugter Bildung kleinerer Oligomere (B). In MOPS Puffer (30 mM, pH 7,4) werden sowohl ohne (C), als auch mit 20 Vol% Ethanol Zusatz (D), größere Oligomere gebildet.

3.3. Liquoranalyse

Als umgebendes Medium des zentralen Nervensystems gilt der Liquor cerebrospinalis als wichtiger Mediator von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten. Liquor steht in direktem Kontakt mit den Zellen des zentralen Nervensystems und

ist von diesen nicht durch eine Barriere wie die Blut-Hirn-Schranke getrennt. Daher entspricht die Zusammensetzung des Liquors in guter Näherung der des extrazellulären Milieus des zentralen Nervensystems. Zudem lässt er sich vergleichsweise einfach durch Punktion der äußeren Liquorräume intravital gewinnen. Damit stellt er eine wichtige biologische Substanz in der Diagnostik von Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar. In der Diagnostik der Alzheimer-Erkrankungen spielen die im Liquor bestimmten Parameter Amyloid-beta-Peptid, Tau-Protein und die phosphorylierte Form des Tau-Proteins eine zunehmend wichtige Rolle, um die Alzheimer-Erkrankung bereits in der Frühphase präziser von anderen dementiellen Syndromen unterscheiden zu können [Hansson, 2006]. Daraus ergibt sich die interessante Fragestellung nach dem Einfluss von Liquor cerebrospinalis auf die Oligomer-Bildung des Alpha-Synucleins. Um dies mit Hilfe des Oligomer Aggregationsansatzes zu untersuchen, ist Liquor als Medium exzellent geeignet, da er nur in sehr geringem Maße zelluläre oder autofluoreszierende Bestandteile enthält, die fluoreszenzabhängige Messungen systemisch beeinträchtigen könnten.

3.3.1. Effekt auf die Alpha-Synuclein Aggregation

Durch Zugabe von Liquorproben unterschiedlicher Patienten in den Alpha-Synuclein-Oligomeransatz zeigte, sich eine Abnahme der Oligomerbildung proportional zur zugesetzten Liquorkonzentration. In der Kontrolle zeigte die Zugabe von boviner Serumalbuminlösung ansteigender Konzentrationen einen vergleichbaren Effekt. Dieser wird besonders deutlich, rechnet man die allgemeine Liquormenge auf die im Liquor enthaltene Menge an Albumin um. Diese wurde durch das Institut für klinische Chemie der Universität München bestimmt (Abb. 3.14). Mit zunehmender Albuminkonzentration prägt sich die Hemmung der Aggregation deutlicher aus. Die hemmende Eigenschaft von Liquor setzt mit ca. 10^{-5} mg/ml (ca. 1,5 nM) Albumingehalt schon etwas früher ein als die der reinen Albumin (BSA) Standardlösung bei 10^{-4} mg/ml (ca. 15 nM). Verrechnet mit der eingesetzten Konzentration an Alpha-Synuclein Fluorophorsonden (ca. 4 nM) ergibt sich ein Quotient Synuclein zu Albumin im Fall von Liquorzusatz von ca. 2,5 bei Einsetzen des aggregationshemmenden Effekts. Zugabe von verdünnteren Liquorproben, mit entsprechend niedrigerem Albumingehalt, beeinflusste die Oligomerbildung unwesentlich. Das maximale hemmende Potential wurde bei

einer Albuminkonzentration von etwa 10^{-3} mg/ml (ca. 145 nM) erreicht. Diese Effekte zeigten sich unabhängig der zugrundeliegenden Erkrankung des Patienten. So unterschieden sich Liquorproben von Patienten mit der klinischen Diagnose der Alzheimer-Erkrankung weder signifikant von solchen mit anderen dementiellen Erkrankungen, noch von gesunden Probanden derselben Altersklasse (Abb. 3.14).

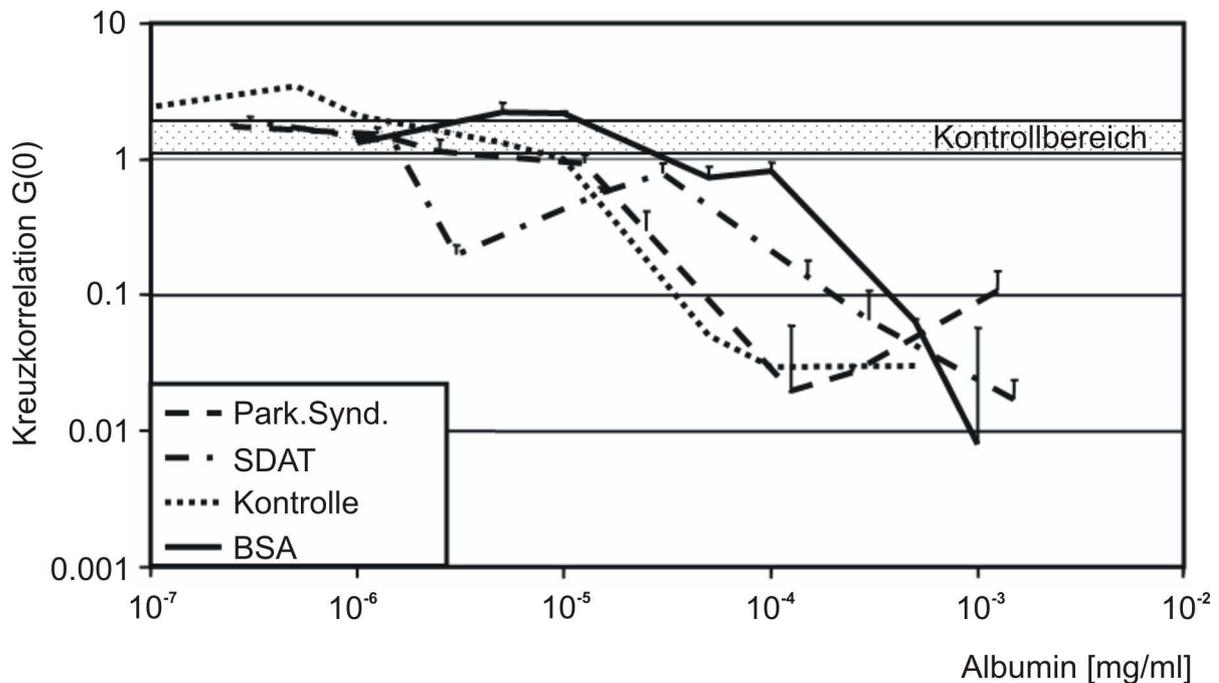


Abb. 3.14 Einfluss von Liquor auf die Alpha-Synuclein Oligomerbildung. Abgebildet sind verschiedene Liquores von klinisch diagnostizierten Patienten (Park.Synd. = Pat. #12; SDAT = Pat. 9; Kontrolle = Pat. #1; siehe 2.1.4), die in verschiedenen Verdünnungstufen in den Alpha-Synuclein Oligomeransatz mit 20 Vol% Ethanol eingesetzt wurden, umgerechnet auf ihren Albumingehalt. Im Vergleich zu Liquor einer gesunden Person der gleichen Altersklasse, sowie zu einer reinen BSA-Lösung, zeigt sich eine allgemeine, konzentrationsabhängige Hemmung der Alpha-Synuclein-Oligomerformation ab einer Albuminkonzentration von ca. 10^{-5} mg/ml (ca. 1.5 nM) in Liquor bzw. 10^{-4} mg/ml in der reinen BSA-Lösung. Maximale Hemmung wird sowohl durch Liquor, als auch durch die BSA-Kontrolllösung bei ca. 10^{-3} mg/ml Albuminkonzentration erreicht. Angegeben ist die Standardabweichung von jeweils fünf Messungen pro Versuchsansatz.

3.3.2. Bedeutung der Liquorgelfraktionierung

Um die Effekte des Liquors auf die Alpha-Synuclein Aggregation weiter zu untersuchen, wurden die Liquorbestandteile mit Hilfe der Gelsäulenchromatographie („Fast Protein Liquid Chromatography“, FPLC)

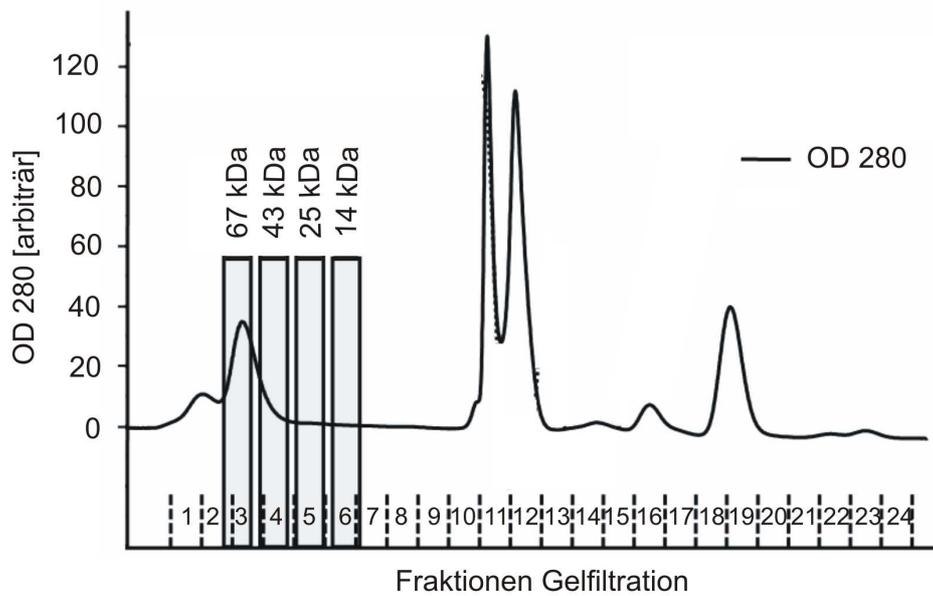
größengewichtet in Einzelfractionen aufgetrennt. Diese Fractionen wurden einzeln im Alpha-Synuclein Oligomeransatz auf ihren Einfluss auf die Oligomerbildung hin untersucht (Abb. 3.15B). Zur besseren Zuordnung der einzelnen Fractionen wurde zu Beginn der Versuchsreihen eine Standardlösung aus Proteinen bekannter Größe gelfiltrationschromatographisch aufgetrennt (Abb. 3.15A). Dabei fanden sich Albumin (67 kDa) in den Fractionen 2 und 3, Ovalbumin (43 kDa) in Fraction 4, Chymotrypsin A (25 kDa) in Fraction 5 und Ribonuclease A (13.7 kDa) in Fraction 6 des Eluats (Abb. 3.15A). Daraus ergibt sich, dass Proteine der Größenordnung des Albumins auf die Fractionen 2–4 der Gelfiltration aufgeteilt werden. Setzt man nun die Fractionen gelfiltrierten Liquors in den Alpha-Synuclein Oligomeransatz ein, so zeigt sich insbesondere in den Fractionen 2-4 eine deutliche Hemmung der Aggregationsrate im Vergleich zu einer Aggregationskontrolle ohne weitere Zusätze. Unfractioniert zugesetzter Liquor desselben Patienten in einer vergleichbaren Verdünnung wie sie durch den Prozess der Gelfiltration erreicht wird, zeigt eine insgesamt schwächere Hemmung der Aggregationsrate. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das hemmende Potential des Liquors vollständig erst durch die Fractionierung demaskiert wird.

Daneben ist auch bemerkenswert, dass nahezu alle übrigen Fractionen (5-24) weder eine nennenswerte Hemmung, noch eine Steigerung der Aggregatsbildung des Alpha-Synucleins über das Niveau der Aggregationskontrolle zeigen. Betrachtet man den Verlauf der optischen Dichte des Filtrats der Liquorproben bei 280 nm, so finden sich große Schwankungen in den Fractionen 10 – 12, sowie 18 und 19. Da diese Fractionen nur Teilchen sehr geringen Molekulargewichts enthalten können, die keinen Einfluss – insbesondere keine Steigerung – auf die Oligomerisierung von Alpha-Synuclein haben, ist es möglich, dass diese Schwankungen der optischen Dichte durch kleinste aromatische Bestandteile wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, sowie durch Disulfid-Brücken zwischen kleinsten Partikeln des Liquors hervorgerufen werden.

Zum besseren Verständnis der Vorgänge ist der Effekt durch Zusatz einer, entsprechend dem Filtrationsprozess verdünnten, BSA-Lösung (1 mg/ml) gezeigt. Alle verwendeten Liquorproben wiesen Albuminwerte ≥ 1 mg/ml auf. Im Liquor enthaltenes Alpha-Synuclein bewegt sich im pikomolaren Bereich

[Georganopoulou, 2005] und wird nahe der Fraktion vermutet, die mit der 14 kDa Fraktion der Eichproteinlösung korrespondiert. Die betreffende Fraktion 6 zeigte keine wesentliche Beeinflussung der Alpha-Synuclein Oligomerbildung. Mehrere Proben von gesunden Patienten, sowie an neurodegenerativen Erkrankungen erkrankten Patienten (siehe Tabelle 2.2) wurden untersucht. In allen Fällen zeigten sich gleichartige Ergebnisse.

A



B

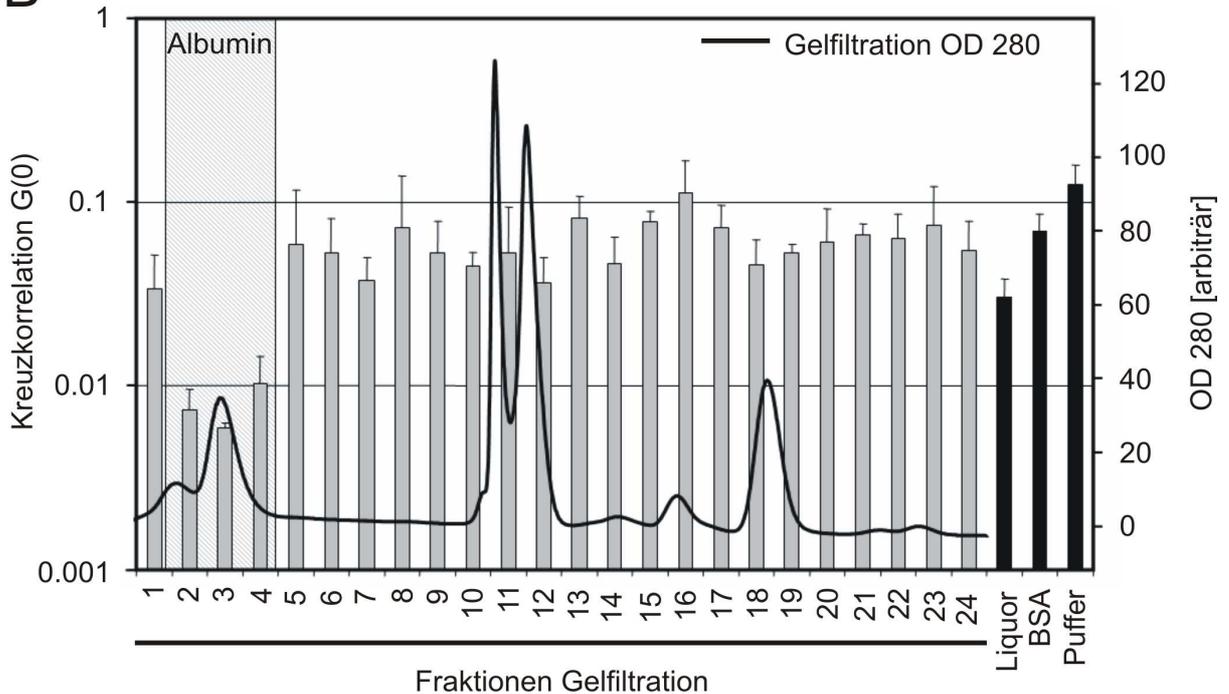




Abb. 3.15 Bedeutung der Gelfraktionierung. Gelfiltrationsdiagramm einer Liquorprobe (500 µl) über eine Superdex Säule (A). Angegeben sind die Fraktionen 1 – 24 mit einer Fraktionsgröße von 1 ml und die optische Dichte des Eluats bei 280 nm Wellenlänge (OD 280). Die vertikalen Balken markieren die korrespondierenden Fraktionen von Eichproteinen der angegebenen Größe. Setzt man die Fraktionen 1-24 in den Alpha-Synuclein Oligomeransatz unter Zusatz von 20 Vol% Ethanol ein (B), so zeigt sich eine maximale Hemmung der Alpha-Synuclein Aggregation durch die Fraktionen 2–4. Die grauen vertikalen Balken beziehen sich auf die Höhe der Kreuzkorrelation. Zur Verdeutlichung ist die Kurve der optischen Dichte der Gelfiltration (schwarze Linie) in das Kreuzkorrelationsdiagramm eingearbeitet und an die jeweiligen Fraktionen angepasst. Der dem Albumin korrespondierende Bereich ist durch den grau unterlegten Bereich gekennzeichnet. Auf der Abszisse sind die Zuordnungen der Gelfiltrationsfraktionen aufgetragen, die Kontrollen (schwarze vertikale Balken) durch verdünnten, unfraktionierten Liquor (Liquor), durch BSA-Lösung (BSA), sowie die Aggregationskontrolle eines Alpha-Synuclein Oligomeransatzes ohne weitere Zusätze (Puffer). Die Fehlerbalken beziehen sich auf Standardabweichungen der Messergebnisse aus fünf aufeinanderfolgende Messungen in der Plateauphase der Aggregation.

3.4. *Typisierung von Influenza Impfstoffpräparationen*

Die Anwendung der SIFT-Methode ist nicht auf den Bereich der grundlegenden Erforschung von Vorgängen der Proteinaggregation beschränkt. Durch ihre hohe Sensitivität, die Möglichkeit das gleichzeitige Vorkommen zweier unterschiedlicher Merkmale durch den zweifarbigen Messaufbau zu differenzieren und die hochdurchsatzfähige Automatisierbarkeit, lässt sie sich sehr gut im diagnostischen Einsatz anwenden. Die SIFT-Methode wurde zur Typisierung verschiedener Impfstoffpräparationen gegen die humanen Influenzastämme A und B in kommerziell erhältlichen Vakzinen und in präklinischen Präparationen von abgetöteten Influenzahüllfragmenten verwendet. Eine verlässliche und hohe Spezifität lässt sich durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Influenzasubtypen bzw. Hüllproteine erreichen.

Bestimmung der Subtypklasse Das Influenza-Virusgenom kodiert für zehn verschiedene Proteine. Zwei an der Außenseite der Virushülle präsentierte Glykoproteine (sog. Spikes), das Hämagglutinin (H) und die Neuraminidase (N), spielen eine wichtige Rolle für die pathologische Potenz der Influenza und sind im Fall der Influenza A (H1-15, N1-9) ein wichtiges Kennzeichen der Subtypklasse,

die im Gegensatz zur Influenza B (H1, N1) nicht nur ein rein humanes Pathogen darstellt. Innerhalb der Subpopulationen sind die beiden Subtypen der Influenza A H1N1 und H3N1 die für den Menschen pathogensten Stämme [Nicholson, 2003]. Eine Reihe von Vakzinen, die gegen die Virusinfektion mit Influenza-Viren eingesetzt werden, ist verfügbar. Um die therapeutische Breite von Vakzinen zu erhöhen, werden multivalente Präparationen hergestellt, die mehrere unterschiedliche, inaktivierte Antigene enthalten. Für die folgenden Versuchsreihen wurden monoklonale Antikörper gegen die Influenza Subtypen A/H1N1, A/H3N2 und B mit sowohl Alexa488 als auch mit Alexa647 Fluorophoren konjugiert. Da die Hüllfragmente innerhalb der Impfstoffpräparationen mehrere (laut Auskunft von Baxter Bioscience, Wien, Österreich, ca. 50) Antigenreplikate tragen, werden mehrere Antikörper durch ein Hüllpartikel gebunden und ergeben so ein deutlich messbares hochintensives Signal. Voraussetzung dafür ist ein relativer Überschuss an markierten Antikörpern gegenüber den vorhandenen Antigenen. Es zeigt sich, dass durch geeignete Mischungen an fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Virusfragmente mit ihrer Typ- und Subtypklasse identifiziert werden können. Ist das komplementäre Antigen zum jeweiligen Antikörper in der Testlösung vorhanden, so resultiert ein hochintensives Partikelsignal im Kanal entsprechend des betreffenden Fluorophorkonjugats, Alexa488 in Kanal 1 bzw. Alexa647 in Kanal 2. Durch die Verwendung von heterogenen Antikörpermischungen aus zwei unterschiedlichen Antikörpern ist eine intrinsische Spezifitätskontrolle in den Versuchsplan integriert, da der jeweilige Antikörper ohne entsprechendes Antigen kein oder nur ein geringes hochintensives Signal erzeugen kann. Wichtig ist, dass sich das resultierende Antigen-Antikörper-Signal gut von eventuellen Antikörperaggregaten unterscheiden lässt. Dies zeigt sich durch die enthaltenen Leerkontrollen und das dort detektierte, im Vergleich zu den Antigen-enthaltenden Ansätzen, sehr geringe überschwellige, hochintense SIFT Signal (Abb. 3.16).

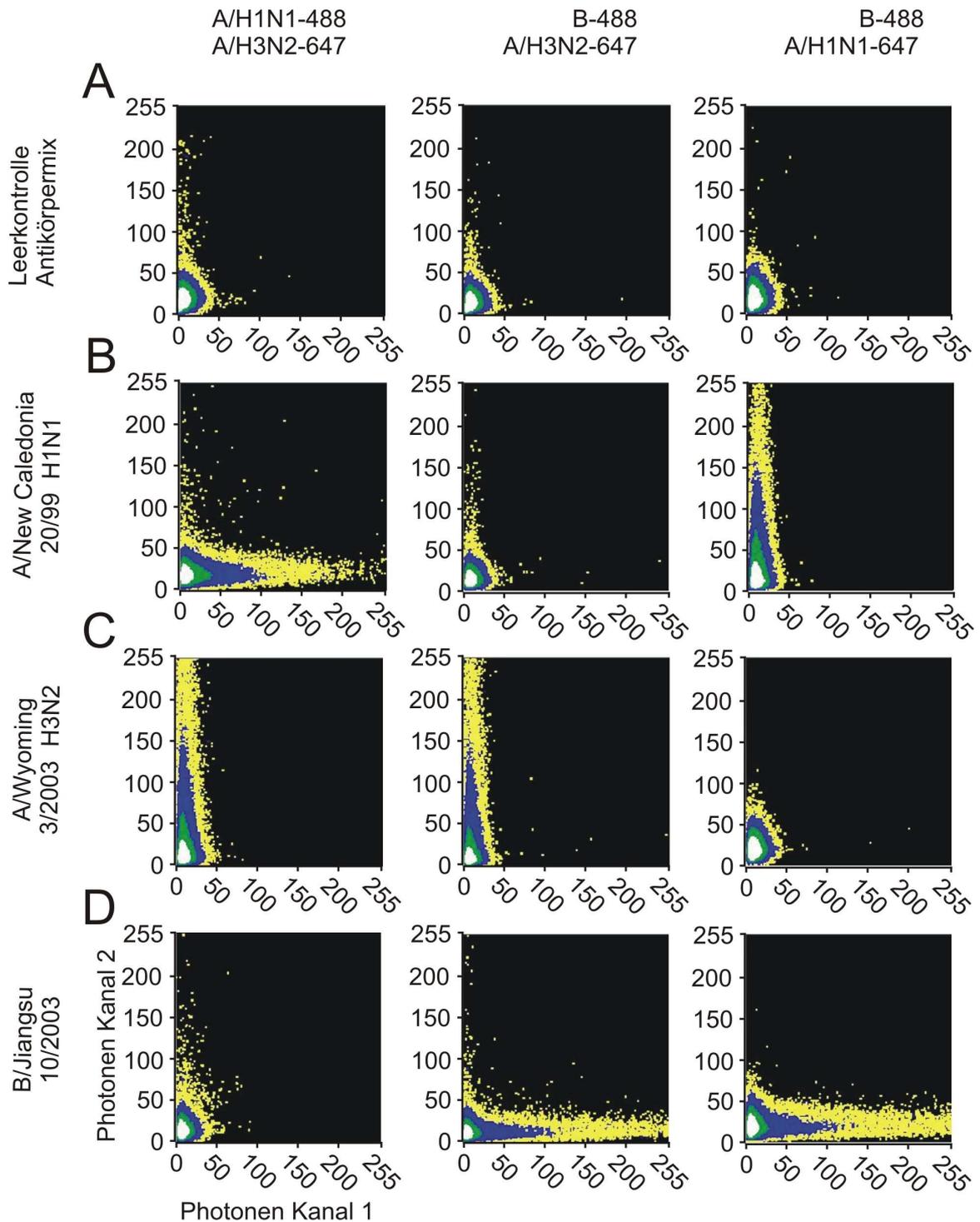


Abb. 3.16 Typisierung von Influenzavakzinen mit Hilfe von unterschiedlichen Antikörperpräparationen. Dazu wurde Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen verwendet. In der Bezeichnung der Antikörper bezieht sich A und B auf den jeweiligen Stamm der Influenza (Influenza A bzw. Influenza B), die Bezeichnungen HxNx auf den jeweiligen Hämagglutinin bzw. Neuraminidase Subtyp. In Reihe A aufgetragen sind die Leerkontrollen der Antikörperlösungen (A/H1N1-Alexa488 und A/H3N2-Alexa647 bzw. B-Alexa488 und A/H3N2-Alexa647 bzw. B-Alexa488 und A/H1N1-Alexa488). Darunter finden sich

Impfstoffpräparationen mit Influenza A Typ New Caledonia/20/99 H1N1 (Reihe B) bzw. Typ Wyoming/3/2003 H3N2 (Reihe C) und Influenza B Typ Jiangsu (Reihe D). Die Impfstoffpräparationen besaßen gleichen Hämagglutiningehalt von 30 µg/ml, die Antikörperlösungen wurden direkt aus einer Stammlösung zugegeben und gemessen. Die 2D FIDA Diagramme stellen jeweils die Summe aus fünf aufeinander folgenden Messungen dar. In drei gleichartigen Versuchen zeigte sich dasselbe Ergebnis.

4. Diskussion

4.1. Methodenentwicklung und Evaluation

4.1.1. Methoden

Um die molekularen Vorgänge innerhalb der Gruppe der Synucleinopathien besser zu charakterisieren, sind neue, innovative und hochempfindliche Verfahren hilfreich. Erkenntnisse, die durch diese neuen Analysemethoden gewonnen werden, können dazu beitragen, den Krankheitsprozess besser zu verstehen, sowie neue diagnostische Möglichkeiten und therapeutische Optionen zu finden. Durch ihre hohe Sensitivität, kombiniert mit einer weitestgehend automatisierbaren Hochempfindlichkeit, bietet die FCS/SIFT-Technologie interessante Chancen und Möglichkeiten für diese Anwendungen.

Als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit existierte bereits eine Implementierung der FCS/SIFT-Technologie, um die Eigenschaften des Prionproteins zu analysieren [Bieschke, 2000; Giese, 2000]. Insbesondere ließ sich damit der Einfluss von Metallionen auf die Aggregation des Prionprotein untersuchen [Giese, 2004; Levin, 2005]. Darüber hinaus wurde durch Dr. Uwe Bertsch und Dr. Armin Giese ein pharmakologisch nutzbares Rasteranalyseverfahren (engl. *Screening*) auf SIFT Basis entwickelt, das sich durch die automatisierbare und hochempfindliche SIFT Technologie eignet, antiaggregative Substanzen zu finden [Bertsch, 2005].

Ein wesentlicher Vorteil, der sich durch die SIFT-Implementierung des Alpha-Synuclein Aggregationsansatzes bietet, ist die Möglichkeit der zweifarbigen Anregung und Detektion. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass sich Mischungen unterschiedlicher Substanzen in ihrem Verhalten untereinander untersuchen lassen. Innerhalb eines zweifarbigen Aggregationsprozesses können unter anderem zweifarbige Aggregate von einfarbigen unterschieden werden. Dies ist beispielsweise von Vorteil, um neu entstandene, heterogene Aggregate von eventuell präformierten und somit homogenen Aggregaten unterscheiden zu können, vorausgesetzt die Mischung beider Komponenten erfolgte erst zum Startzeitpunkt der Aggregation. Um die Stärken der hochempfindlichen FCS/SIFT-

Methodik zu nutzen, ist es notwendig, Versuche detailliert zu planen, um mögliche störende Einflüsse wie Autofluoreszenz der Ansatzkomponenten und hohe Konzentrationen an ungebundenen Farbstoffmolekülen zu eliminieren. Diese erhöhen das Hintergrundsignal und erschweren die mathematische Auswertbarkeit [Rigler, 1993; Maiti, 1997; Kask, 1999; Kask, 2000]. Dies ist insbesondere bei Ansätzen mit multiplen Komponenten wie bei cerebrospinalen Liquor wichtig. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde auf Versuchsansätze ohne Autofluoreszenz, sowie einen Anteil an freien fluoreszierenden Farbstoffmolekülen von maximal 21% (siehe Tabelle 2.4) geachtet. Zudem ist eine Aussage über die Qualität der entstandenen Aggregate nur bedingt möglich. Daher muß bei bestimmten Fragestellungen, wie beispielsweise der Frage nach Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen und Proteinaggregaten, durch andere Methoden näher klassifiziert werden. In dieser Arbeit wurden daher auch Ergebnisse aus Thioflavin Fluoreszenz, Proteinase K Resistenznachweis, sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe 3.1.1, 3.1.4., 3.1.5.) verwendet, um die entstandenen Aggregate näher zu untersuchen.

4.1.2. Evaluation

In der Einzelmolekülspektroskopie ist eine Farbstoffmarkierung der Zielmoleküle durch eine fluoreszierende Gruppe notwendig. Eine vollständige Bindung aller Fluorophore an die Zielmoleküle ist aber nicht Voraussetzung für die Analyse. Das Verhältnis von markierten Zielmolekülen zu ungebundenem Farbstoff lässt sich empirisch bestimmen und sollte so gering wie möglich sein (siehe 4.1.1 und Tabelle 2.4). Durch die Erfahrungen aus Versuchen mit rekombinantem Prionprotein [Bieschke, 2000; Giese, 2000] und den bereits mit anderen Verfahren gewonnenen Informationen über die Alpha-Synuclein Aggregation [Kahle, 2001b; Li, 2001; Uversky, 2001b; Uversky, 2001a; Kahle, 2002a; Uversky, 2002; Munishkina, 2003] konnte ein Ansatz zur Aggregationsanalyse für Alpha-Synuclein durch die SIFT-Methode gefunden werden. Da für die Verwendung in der SIFT-Methode Fluoreszenz innerhalb der zu untersuchenden Probe notwendig ist, muss bedacht werden, dass sich die Eigenschaften des Alpha-Synucleins durch Konjugation mit einer fluoreszierenden Gruppe potentiell verändern können. Um diese Einflüsse zu minimieren, wurden unmarkierte Proteine im Überschuss von

1000:1 zu markierten Proteinen eingesetzt. Die erzielten Ergebnisse (siehe 3.1., 3.2.1., 3.2.3.) waren vergleichbar mit den Informationen aus anderen Methoden [Hashimoto, 2001; Li, 2001]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der Farbstoffmarkierung auf die Eigenschaften des Alpha-Synucleins vernachlässigbar ist.

Durch den Vergleich mit bekannten Daten und Methoden wie der Thioflavin T Fluoreszenz, der partiellen Proteinase K-Resistenz und dem direkten Fibrillennachweis in der Elektronenmikroskopie, ließ sich der Amyloid Aggregationsansatz für Alpha-Synuclein in der SIFT-Methode validieren. So konnte durch die spezifische Fluoreszenz des Thioflavin T die Entstehung von amyloiden Aggregaten qualitativ nachgewiesen werden (siehe 3.1.1.). Diese Aggregate waren sowohl partiell Proteinase K-resistent (siehe 3.1.4.), als auch in der Transmissions-Elektronenmikroskopie als fibrilläre Strukturen darstellbar (siehe 3.1.5.). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der SIFT-Messungen von hochintensiven, aus 10^3 – 10^5 Einzelmolekülen bestehenden Aggregaten (siehe 3.1.4.). Darüber hinaus konnten in SIFT-Messungen die für amyloide Proteine typische Verzögerungsphase gezeigt werden (siehe 3.1.2.) sowie ein sensitiverer Nachweis der entstandenen Aggregate im Vergleich zu Thioflavin T Messungen durchgeführt werden (siehe 3.1.3.). Zusammen sind dies gute Hinweise, dass sich Einzelmolekülspektroskopie basierte Aggregationsansätze analysiert nach der SIFT-Methode und der Kreuzkorrelation eignen, um die Synuclein-Aggregation zu untersuchen. Wie unter 3.1.3. dargestellt, zeigte sich darüber hinaus, dass sich die Alpha-Synuclein-Aggregation durch die SIFT-Methode um mindestens zwei Größenordnungen sensitiver verfolgen lässt, als durch den häufig verwendeten Thioflavin T Ansatz. Als weiteren Vorteil stellte sich heraus, dass im Amyloid-Aggregationsansatz die absolute Menge an rekombinantem Protein, das für die Messungen einzusetzen ist, deutlich reduziert werden konnte (siehe 2.6.1.). Durch die im Verlauf der Arbeit erhältlichen Probenträgerplatten mit 96 oder 384 Probenplätzen ergaben sich neue Möglichkeiten, den experimentellen Durchsatz von Testreihen um ein Vielfaches zu steigern. Dadurch eröffnen sich nicht nur allein Möglichkeiten für neue, sensitive diagnostische Ansätze, sondern gleichzeitig bietet sich auch ein spezifisches und zugleich materialsparendes, wie auch auf die frühen Formen der

Aggregation anwendbares (siehe 2.6.2.), hochdurchsatzfähiges Verfahren für die Grundlagenforschung.

4.2. Anwendungen

4.2.1. Koaggregation und Mutationen

Die zweifarbigen Möglichkeiten der FCS/SIFT-Methode erlauben Koaggregationsstudien durchzuführen [Schwille, 1997c]. Überaus geeignet ist dies, um den Effekt der Interaktion zwischen Alpha-Synuclein und den bekannten Mutationen, sowie anderen amyloidogenen Proteinen genauer zu untersuchen. Wie in der Literatur schon beschrieben unterstützen die beiden Parkinson-assoziierten Mutationen A30P und A53T die Alpha-Synuclein Aggregation auf qualitativ unterschiedlichem Niveau [Narhi, 1999]. Während die A53T Mutation eine Steigerung vor allem der Fibrillenbildung bewirkt, wird der A30P Mutation hier nur ein geringerer Effekt zugeschrieben. Diese Effekte ließen sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche nachvollziehen (siehe 3.2.1). Dies kann Einblicke in die molekularen Mechanismen geben, die in heterozygoten Mutationsträgern stattfinden. Erkenntnisse darüber können helfen mehr über die mögliche Entwicklung der familiären Parkinsonerkrankung vorherzusagen, oder die Wirkung genetisch regulierender Therapiestrategien zu beurteilen [Kahle, 2001a]. In den durchgeführten Versuchsreihen konnten Hinweise gefunden werden, dass humanes Wildtyp-Alpha-Synuclein heterogene Aggregate mit den beiden Mutationen A30P und A53T bildet (siehe 3.2.1.). Dies ist durch andere Methoden wie der Thioflavin T Fluoreszenz nicht möglich. Dass dies kein artefizieller Effekt ist, ließ sich durch Versuche zeigen, in denen humanes Wildtyp-Alpha-Synuclein mit einer Alexa488 Markierung getrennt von der Cy5 markierten A30P Mutation über sieben Tage inkubiert wurde (siehe 3.2.). Nach Mischung der beiden jeweils einfarbig markierten Aggregate und unmittelbarer Analyse der darauffolgenden Vorgänge mittels der SIFT-Methode, zeigen sich zwei getrennte Signale von hochintensen Partikeln jeweils im „grünen“ und „roten“ Kanal, jedoch kein zweifarbiges Signal (siehe Abb. 3.6 C). Im Hinblick auf gentherapeutische Ansätze muss diskutiert werden, dass bei einer ungleichen Penetranz des Wildtyps und der Mutation eines Mutationsträgers, eine unter Umständen noch weiter gesteigerte Neigung zur Aggregation auf Proteinebene resultieren kann. In

der Literatur wurden im Verlauf dieser Arbeit der Effekt einer unterschiedlichen Expression von mRNA des Wildtyps und der Mutation A30P bzw. A53T beschrieben [Lee, 2001; Li, 2001; Kobayashi, 2003]. Es zeigte sich, dass Mitglieder einer Population von A30P bzw. A53T Mutationsträgern im Falle eines äquivalenten Expressionsverhältnisses von Wildtyp zu Mutanten mRNA eine vergleichsweise milde Form der Erkrankung aufwiesen, wohingegen Verhältnisse zwischen 1:2 bis 1:9 einen deutlich ausgeprägteren Krankheitsphänotyp zeigten [Kobayashi, 2003]. Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Beobachtungen auf Proteinebene im *in vitro* Ansatz (siehe 3.2.2.). Eine exakte Erklärung der Unterschiede zwischen Aggregationsphänomenen in gleichen oder ungleichen Verhältnissen von Wildtyp und Mutation ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht zu geben. Es ist denkbar, dass sich kleine oligomere Zwischenstufen hinsichtlich Struktur, Stabilität und der Neigung größere Aggregate zu bilden, unterscheiden [Dusa, 2006]. Dieser Unterschied ist möglicherweise abhängig von den molaren Verhältnissen zwischen Wildtyp und Mutation [Conway, 2000]. Ebenfalls darauf hinweisend sind die Ergebnisse der Messungen im Thioflavin T Ansatz. Auch hier zeigten asymmetrische Verhältnisse zwischen Wildtyp und A30P eine gesteigerte Bildung von fibrillären, amyloiden Aggregaten (siehe 3.2.2.). Während aber die gemessene Aggregatbildung in der SIFT-Methode bevorzugt bei Verhältnissen von 1:5 der Monomere stattfand, zeigte sich im Thioflavin T Ansatz eine gesteigerte Fibrillenbildung bei einem zweifachen Überschuss eines der Monomere. Bei äquimolaren Verhältnissen zwischen Wildtyp und A30P Mutation konnte eine nur allenfalls gering gesteigerte Aggregationsrate beobachtet werden. Dies deckt sich mit bereits in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [Conway, 2000]. Daraus lässt sich annehmen, dass das molare Verhältnis nicht nur Einfluss auf die Quantität der Aggregatbildung nimmt, sondern auch auf die Qualität im Aggregataufbau.

Interessanterweise zeigt das Wildtyp-Alpha-Synuclein der Maus, welches an der Position 53 der Primärsequenz analog zur humanen A53T Mutation ebenfalls ein Threonin im physiologischen Zustand trägt, ebenso eine Zunahme der Aggregatbildung in einem heterogenen Ansatz mit humanem Wildtyp-Alpha-Synuclein (siehe 3.2.1.). Das Homolog der Maus besitzt neben der A53T Abweichung sechs weitere punktuelle Abweichungen (S86N, L99M, N102G,

A106Y, D120G, N121S) bei ansonsten 95% Strukturgleichheit. Von diesen Abweichungen liegt nur eine (S86N) innerhalb der NAC Domäne (AS 61 - 95), jedoch außerhalb des minimal notwendigen Fragments zur Fibrillenbildung (AS 68-76) (siehe Abb. 1.2). Alle übrigen Abweichungen finden sich im negativ geladenen C-Terminus und erhöhen dort den Anteil der hydrophoben gegenüber dem der hydrophilen Aminosäuren, was möglicherweise einen weiteren aggregationssteigernden Effekt haben kann.

Wie in der Einleitung dargestellt, gibt es im Bereich der humanen neurodegenerativen Erkrankungen einige Überschneidungen der zugrundeliegenden pathologischen Vorgänge [Galpern, 2006]. Die Lewy-Körperchen Variante der Alzheimer-Erkrankung bildet ein Bindeglied zwischen den durch das Tau-Protein verursachten Tauopathien und den Synucleinopathien auf dem Boden von pathologischen Prozessen des Alpha-Synucleins [Forstl, 1999]. Eine gemeinsame Pathologie des Tau-Proteins und des Alpha-Synucleins findet sich auch im Parkinson-Demenz-Komplex von Guam [Yamazaki, 2000; Winton, 2006], in der neben fibrillären Tau-Aggregaten auch Alpha-Synuclein Aggregate in der Amygdala gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass im *in vitro* Ansatz das Tau-Protein mit Alpha-Synuclein zu heterogenen Aggregaten aggregieren kann (siehe 3.2.5.). Dies geschieht durch Anpassung der dielektrischen Konstante des Puffermediums mit Hilfe von Ethanolzusatz auf den Bereich nahe an biologischen Membranen [Munishkina, 2003]. Es wird angenommen, dass sich Alpha-Synuclein *in vivo* nahe an diesen Membranen orientiert und dort auch eine Änderung der Sekundärstruktur erfährt [Iwai, 1995; Davidson, 1998]. Ohne Anpassung der dielektrischen Konstante läßt sich in Natriumphosphat-Puffer keine gemeinsame Aggregation von Tau-Protein und Alpha-Synuclein in unserem Ansatz beobachten. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Sekundärstrukturänderung des Alpha-Synucleins in Membrannähe eine Koaggregation mit Tau-Protein entweder beschleunigt oder überhaupt erst möglich macht. Dadurch ist ein weiterer Hinweis gelungen, dass die Aggregation amyloidogener Proteine gegenseitig induziert werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich Alpha-Synuclein Monomere an bestehende Aggregate anlagern können und sich dadurch die *Lag*-Phase des

Amyloid-Aggregationsansatzes von mehreren Tagen durch präformierte Aggregate auf deutlich weniger als 24 Stunden verringern lässt (siehe 3.2.4.). Dies ist ein weiterer Beweis für die Gültigkeit der Hypothese der keiminduzierten Aggregation [Han, 1995; Harper, 1997] und ihre Anwendbarkeit auf die Synucleinopathien. Auch die Hypothese, dass Beta-Synuclein die Aggregation des Alpha-Synucleins zu amyloiden Fibrillen behindern kann [Hashimoto, 2001; Uversky, 2002], ließ sich durch die Versuche dieser Arbeit bestärken (siehe 3.2.3.). Verbunden mit der ubiquitär im Nervengewebe vorhandenen Beta-Synuclein Synthese kann dies als Hinweis auf eine möglicherweise protektive Funktion des Beta-Synuclein gesehen werden [Hashimoto, 2001].

4.2.2. Influenza-Typisierung

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächenepitope der Influenzaviren gelang es zuverlässig Impfstoffpräparationen auf Basis von inaktivierten Influenzaviren auf ihre Präsentation von Hämagglutinin- und Neuraminidaseepitopen zu untersuchen (siehe 3.4.). Die dargestellten Messungen mit monovalenten Präparationen sind auch an trivalenten Präparationen möglich. Es ist denkbar, die Erkenntnisse aus diesen Versuchen in einem auf der SIFT Analyse basierten, sensitiven und zuverlässigen Hochdurchsatz-Screeningverfahrens nahezu vollständig zu automatisieren. Die Auswertung der Ergebnisse ist ebenfalls maschinell durchführbar. Zukünftige Versuche müssen zeigen, ob sich der bisher an aufgereinigten Influenza-Vakzinen erfolgreiche Ansatz auch auf den Bereich der *in vivo* Diagnostik übertragen lässt. Dies ist zu erwarten, da bereits eine geringe Viruslast innerhalb einer untersuchten Probe aufgrund multipler Epitope pro Viruspartikel und somit der eindeutigen Identifizierbarkeit als hochintensives Partikel innerhalb der SIFT-Methode, bereits ein ausreichend differenzierbares Signal ergeben könnte.

Gerade vor dem aktuellen Hintergrund der steigenden Fälle des aviären Influenzavirus H5N1, seiner möglichen Übertragung auf den Menschen und einer denkbaren Pandemie ist zu erwarten, dass zukünftig eine große Anzahl an zu untersuchenden Proben innerhalb kurzer Zeit anfallen könnte [Monto, 2005; Stohr, 2005]. Bisher erfolgt der Nachweis einer Virusinfektion mittels Polymerase Kettenreaktion (rtPCR) oder eines ELISA Tests (engl. *enzyme linked*

immunosorbant assay) [Shafer, 1998; Spackman, 2002]. Ein SIFT basierter Hochdurchsatz-Ansatz als Suchtest ist jedoch ebenfalls denkbar.

Durch die Versuche zur Typisierung von Influenza Vakzinen zeigte sich, dass die SIFT-Methode ebenfalls geeignet ist, den Inhalt von multivalenten Vakzinen näher zu bestimmen (Daten aufgrund Interessenskonflikts nicht gezeigt). Anwenden lässt sich dies sehr gut im Rahmen von Qualitätskontrollen der industriellen Herstellung von Impfstoffpräparationen. Auf diese Weise lässt sich einfach und schnell eine mögliche Steigerung des immunogenen Potentials aufgrund der Bildung von heterogenen Aggregaten der verschiedenen Virusfragmente nachweisen und damit einer möglicherweise höheren Nebenwirkungsrate präventiv begegnen. In diesem Nutzungsbereich bietet die SIFT-Methode Vorteile gegenüber anderen Ansätzen, wie beispielsweise ELISA Verfahren.

4.2.3. Therapieansätze

Zukünftig verspricht vor allem die weitere Verbesserung des Oligomer Aggregationsansatzes ein äußerst nützliches Werkzeug, mit dem sich mehr Informationen über die Entstehung der frühen Formen der Alpha-Synuclein Aggregation gewinnen lassen. Damit können beispielsweise Einflussmöglichkeiten auf die Oligomerbildung im Rahmen von pathologischen Prozessen isoliert werden. Erkenntnisse darüber können helfen, neue pharmakologisch wirksame Substanzen zu finden und für ihren Einsatz innerhalb der Synucleinopathien medizinalchemisch zu optimieren. Als aggregationsfördernd auf Oligomerebene erwies sich der Zusatz von organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol, Propanol [Munishkina, 2003] oder DMSO. Strategien für pharmakologische Screeningverfahren sind bisher erfolgreich auf biochemischer Ebene für das Prionprotein beschrieben worden [Bertsch, 2005]. Mit Hilfe des Oligomer-Aggregationsansatzes ist es möglich, neue pharmakologische Wirkstoffe für den *in vivo* Einsatz zu gewinnen, um die Aggregation in ihrer Frühform hemmend zu beeinflussen und die Krankheitsentstehung in ihrer Anfangsphase wirksam zu verhindern oder im Verlauf aufzuhalten. Dies ist besonders interessant unter dem Aspekt der aktuellen Diskussion, dass die tatsächlich pathologische Spezies im Rahmen von amyloiden, neurodegenerativen Erkrankungen in den Oligomeren des Alpha-Synucleins zu finden ist [Conway, 2000; Volles, 2001; Caughey, 2003].

Diese haben die Fähigkeit beispielsweise Membranporen zu bilden und somit störend auf die Homöostase und die Signaltransduktion der Zelle einzuwirken.

4.2.4. Liquoranalyse

In den unter 3.3. dargestellten Versuchen zeigen die albuminhaltigen Fraktionen der durch die FPLC Fraktionierung aufgetrennten Liquorproben eine insgesamt stärkere Hemmung der Alpha-Synuclein Oligomer Aggregation als eine unfraktionierte Liquorprobe in entsprechender Verdünnung (siehe 3.3.2.). Es ist möglich, dass in der heterogenen Zusammensetzung des cerebrospinalen Liquors die unspezifischen Bindungsareale des enthaltenen Albumins nicht zur Bindung der Alpha-Synuclein Monomere des *in vitro* Oligomer Aggregationsansatzes zur Verfügung stehen. Andererseits ist es möglich, dass in unaufgetrenntem Liquor Faktoren enthalten sind, die dem inhibierenden Effekt des Albumins entgegenwirken. Darüber hinaus kommt ebenfalls ein anderer Faktor als Albumin für den inhibierenden Effekt in Betracht. Die verwendeten Liquorproben enthalten bis zu 0.02 nM Tau-Protein und 0.32 nM Amyloid-Beta-Peptid (siehe Tab. 2.2). Diese beiden amyloidogenen Proteine können potentiell Alpha-Synuclein-Aggregation induzieren [Giasson, 2003; Yagi, 2005]. Daher kommen sie als mögliche aggregationsfördernde Faktoren in Frage, die dem hemmenden Albumineffekt entgegenwirken können. Allerdings betragen die Konzentrationen sowohl des Tau-Proteins als auch des Amyloid-Beta-Peptids weniger als ein Zehntel der Alpha-Synuclein Konzentration innerhalb des Oligomer Aggregationsansatzes von 5 – 10 nM. Somit ist es wahrscheinlicher, dass nur im Liquor enthaltene präformierte größere Tau- oder Amyloid-Beta-Aggregate die Alpha-Synuclein Aggregation induzieren können. Eine der Albumininhibition entgegengesetzte aggregationssteigernde Wirkung ließ sich in den aufgetrennten Liquorfraktionen unterhalb und oberhalb der Größe von Albumin nicht beobachten. Diese wäre nach dem Modell der keiminduzierten Aggregation jedoch zu erwarten. Anzunehmen ist auch, dass in Liquor enthaltenes Alpha-Synuclein an Albumin gebunden ist und somit nicht für die Aggregation zur Verfügung steht. Daraus folgt, dass zukünftige Anstrengungen, den Alpha-Synuclein Gehalt des Liquors als prädiktiven diagnostischen Wert zu bestimmen, auch die möglicherweise an Albumin gebundene Menge an Alpha-Synuclein berücksichtigen sollten und

insbesondere der Einfluss von Albumin auf die Oligomerformation berücksichtigt werden muss.

5. Zusammenfassung

Die Synucleinopathien sind eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die durch pathologische Ablagerungen des Alpha-Synucleins charakterisiert sind. Sie umfassen unter anderem den Morbus Parkinson, die Demenz mit Lewy-Körperchen, die multiple Systematrophie und die Lewy-Körperchen Variante des auch durch Ablagerungen des Tau-Proteins gekennzeichneten Morbus Alzheimer. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse von Aggregationsprozessen des Alpha-Synucleins durch einzelmolekülspektroskopische Verfahren und die Entwicklung neuer Techniken zur Analyse von Koaggregationsprozessen verschiedener Proteine.

Hierzu wurden Synuclein- und Tau-Proteine rekombinant in *E. coli* hergestellt, aufgereinigt, durch Gelelektrophorese und Western Blot charakterisiert und Aggregationsprozesse unter *in vitro* Bedingungen untersucht. Rekombinantes Alpha-Synuclein kann unter bestimmten Bedingungen *in vitro* zu fibrillären, amyloiden Strukturen aggregieren. Diese Aggregate ließen sich durch eine spezifische Änderung der Thioflavin T-Fluoreszenz spektroskopisch nachweisen, mittels Elektronenmikroskopie darstellen, und zeichneten sich durch partielle Resistenz gegen die Einwirkung der Serin-Protease Proteinase K aus. Durch Einbau von homologen Sondenmolekülen, die zuvor mit einer fluoreszenten Gruppe kovalent konjugiert wurden, ließ sich die Fibrillenbildung auch mit einzelmolekülbasierten, konfokalen, fluoreszenzspektroskopischen Analyseverfahren wie der Kreuzkorrelationsanalyse und der SIFT-Methode (engl. *Scanning for Intensely Fluorescent Targets*) darstellen. Der Nachweis der Fibrillenbildung war durch die fluoreszenzspektroskopischen Verfahren 100-fach sensitiver möglich. Im Vergleich mit nicht amyloidogenen Proteinen wie Beta-Synuclein und Serum-Albumin konnte zudem die Spezifität der Aggregation gezeigt werden.

Bei neurodegenerativen Erkrankungen findet sich zum Teil die Beteiligung mehrerer amyloidogener Proteine am pathologischen Prozess. Durch die Möglichkeit der simultanen Anregung verschiedener Fluoreszenzsonden bei verschiedenen Wellenlängen und der Differenzierung des emittierten Fluoreszenzsignals konnten Koaggregationsprozesse in heterogenen Systemen mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie untersucht werden. Es zeigte sich, dass

Alpha-Synuclein sowohl mit seinem Mausomolog, als auch mit den beiden humanen Parkinson-assoziierten Mutanten A30P und A53T gemischte Fibrillen bildet, während Beta-Synuclein einen hemmenden Einfluss auf die Alpha-Synuclein Fibrillenbildung aufwies. Mit Hilfe des zweifarbigen Systems ließ sich auch der Anlagerungsprozeß von Alpha-Synuclein Monomeren an vorbestehende, amyloide Alpha-Synuclein Aggregate darstellen, was einen weiteren Einblick in die molekulare Pathophysiologie der Synucleinopathien bot.

Es wird vermutet, dass bereits Oligomerformationen einen neurotoxischen Effekt besitzen. Die besondere Sensitivität der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie erlaubte ebenfalls die Detektion von frühen oligomeren Aggregaten des Alpha-Synucleins sowie des Tau-Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass Alpha-Synuclein bereits auf Oligomerebene heterogene Aggregate mit dem Tau-Protein bildet, was durch die Tatsache, dass es sich bei beiden um intrazelluläre Proteine handelt, eine potentielle pathophysiologische Relevanz besitzt.

Im Rahmen von Versuchsreihen zum Einfluss von Liquor aus an verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen leidenden Patienten, ließen sich Hinweise auf eine mögliche neuroprotektive Funktion des Liquors gewinnen. Dieser zeigte nach Gelfiltration in bestimmten Fraktionen deutlich aggregationshemmende Eigenschaften. Diese Fraktionen besitzen einen hohen Gehalt an Albumin. Zusammen mit *in vitro* gewonnenen Daten, die einen hemmenden Einfluss von Albumin auf die Aggregation des Alpha-Synucleins zeigen, sind dies Hinweise, dass die protektive Eigenschaft an den Albumingehalt des Liquors gekoppelt ist.

Das diagnostische Potential der entwickelten Messmethode verdeutlicht parallel durchgeführte Analysen von Influenza-Impfstoffpräparationen, in denen gezeigt werden konnte, dass sich Partikel mit unterschiedlichen Oberflächenepitopen auch in Mischungen differenzieren lassen. Durch den Einsatz von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern ließen sich eindeutig bestimmte Influenzastämme anhand der Oberflächenepitop-Konfiguration identifizieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die konfokale Einzelmolekülspektroskopie eine äußerst sensitive und hochdurchsatzfähige Nachweismethode zur Untersuchung der molekularen Vorgänge im Rahmen der Alpha-Synucleinopathien darstellt, deren Potential sich nicht allein auf die Grundlagenforschung beschränkt, sondern auch diagnostische Möglichkeiten

beinhaltet und eine neue Methode zur Suche von bisher noch nicht beschriebenen, pharmakologisch interessanten Strukturen bietet.

6. Abkürzungsverzeichnis

A30P	Mutation des Synuclein an Stelle 30 der Primärsequenz durch Austausch von Alanin gegen Prolin
A53T	Mutation des Synuclein an Stelle 53 der Primärsequenz durch Austausch von Alanin gegen Threonin
Abb.	Abbildung
Alexa488	Alexa Fluor™ 488 Succinimidylester
Alexa647	Alexa Fluor™ 647 Succinimidylester
AS	Alpha-Synuclein
bin	Zeiteinheit innerhalb derer das gemessene Fluoreszenzsignal akkumuliert wird
BS	Beta-Synuclein
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
C1	Kanal 1 („grünes Signal“)
C2	Kanal 2 („rotes Signal“)
Cy5	FluoroLink™ Cyanin5 Succinimidylester
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
ϵ	Extinktionskoeffizient
FCS	engl. <i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>
FIDA	Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (engl. <i>Fluorescence Intensity Distribution Analysis</i>)
fl	Femtoliter
FPLC	engl. <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
hs	lat. <i>Homo sapiens</i>
htau 37	humanes Tau-Protein Klon 37
htau 46	humanes Tau-Protein Klon 46
Ig	Fluoreszenz Intensität des „grünen“ Kanals (Kanal 1)
Ir	Fluoreszenz Intensität des „roten“ Kanals (Kanal 2)

M	Molar
min	Minute, Minuten
mm	lat. <i>Mus musculus</i>
NA	Numerische Apertur
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
P	Photon, Photonen
PK	Proteinase K
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
SIFT	Scannen nach intens fluoreszierenden Partikeln (engl. <i>Scanning for intensely fluorescent targets</i>)
Syn	Synuclein
Std.	Stunde, Stunden
T	Schwellenwert zur Bestimmung des hochintensen Signals der Aggregate in der SIFT Analyse
Tab.	Tabelle
τ , T_{diff}	Mittlere Diffusionszeit
wf	wasserfrei
wt	Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

Aarsland, D., Zaccai, J., Brayne, C. (2005) A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease, *Movement Disorders* 20:1255-1263

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., Rosenthal, A. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system, *Neuron* 25:239-252

Aguzzi, A. und Haass, C. (2003) Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease, *Science* 302:814-818

Aragon, S. R. und Pecora, R. (1975) Fluorescence Correlation Spectroscopy and Brownian Rotational Diffusion, *Biopolymers* 14:119-137

Ban, T., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H., Goto, Y. (2003) Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence, *Journal of Biological Chemistry* 278:16462-16465

Ben Shlomo, Y. (1997) The epidemiology of Parkinson's disease, *Baillieres Clinical Neurology*. 6:55-68

Bertsch, U., Winklhofer, K. F., Hirschberger, T., Bieschke, J., Weber, P., Hartl, F. U., Tavan, P., Tatzelt, J., Kretschmar, H. A., Giese, A. (2005) Systematic Identification of Antiprion Drugs by High-Throughput Screening Based on Scanning for Intensely Fluorescent Targets, *The Journal of Virology* 79:7785-7791

Beyer, K. (2006) Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathologica. (Berl)* 112:237-251

Bieschke, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Poser, S., Eigen, M., Kretschmar, H. (2000) Ultrasensitive detection of pathological prion protein

aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:5468-5473

Bodles, A. M., Guthrie, D. J., Greer, B., Irvine, G. B. (2001) Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity, *Journal of Neurochemistry* 78:384-395

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiology of Aging* 24:197-211

Caughey, B. und Lansbury, P. T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders, *Annual Review of Neuroscience* 26:267-298

Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O. M., Sudhof, T. C. (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration, *Cell* 123:383-396

Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M., Destee, A. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease, *Lancet* 364:1167-1169

Clayton, D. F. und George, J. M. (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease, *Trends in Neuroscience*. 21:249-254

Conway, K. A., Harper, J. D., Lansbury, P. T. (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease, *Nature Medicine* 4:1318-1320

Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., Lansbury, P. T. (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property

of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:571-576

Crowther, R. A., Jakes, R., Spillantini, M. G., Goedert, M. (1998) Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein, *FEBS Letters* 436:309-312

da Costa, C. A., Ancolio, K., Checler, F. (2000) Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 --> Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli, *Journal of Biological Chemistry* 275:24065-24069

Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., George, J. M. (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes, *Journal of Biological Chemistry* 273:9443-9449

Dev, K. K., Hofele, K., Barbieri, S., Buchman, V. L., van der, P. H. (2003) Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease, *Neuropharmacology* 45:14-44

Duda, J. E., Giasson, B. I., Chen, Q., Gur, T. L., Hurtig, H. I., Stern, M. B., Gollomp, S. M., Ischiropoulos, H., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. (2000) Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies, *American Journal of Pathology* 157:1439-1445

Dusa, A., Kaylor, J., Edridge, S., Bodner, N., Hong, D. P., Fink, A. L. (2006) Characterization of Oligomers during alpha-Synuclein Aggregation Using Intrinsic Tryptophan Fluorescence, *Biochemistry* 45:2752-2760

Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., Lang, H. (1974) Proteinase K from *Tritirachium album* Limber, *European Journal of Biochemistry* 47:91-97

Ehrenberg, M. und Rigler, R. (1974) Rotational Brownian-Motion and Fluorescence Intensity Fluctuations, *Chemical Physics* 4:390-401

Eigen, M. und Rigler, R. (1994) Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:5740-5747

Einstein, A. (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Annalen der Physik* (17) 549-560

Einstein, A. und Smoluchowski, M. (1997) Untersuchungen über die Theorie der Brownschen Bewegung/Abhandlung über die Brownsche Bewegung und verwandte Erscheinungen, 3. Auflage, aus der Reihe Ostwalds Klassiker, Band 199, Harri Deutsch Verlag, Frankfurt am Main

Elson, E. L. und Magde, D. (1974) Fluorescence Correlation Spectroscopy. 1. Conceptual Basis and Theory, *Biopolymers* 13:1-27

Engelender, S., Kaminsky, Z., Guo, X., Sharp, A. H., Amaravi, R. K., Kleiderlein, J. J., Margolis, R. L., Troncoso, J. C., Lanahan, A. A., Worley, P. F., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Ross, C. A. (1999) Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions, *Nature Genetics* 22:110-114

Feany, M. B. und Bender, W. W. (2000) A Drosophila model of Parkinson's disease, *Nature* 404:394-398

Fillon, G. und Kahle, P. J. (2005) Alpha-synuclein transgenic mice: Relevance to multiple system atrophy, *Movement Disorders* 20:S64-S66 (Supplement 12)

Forno, L. S. (1996a) Neuropathology of Parkinson's disease, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55:259-272

Forno, L. S., DeLanney, L. E., Irwin, I., Langston, J. W. (1996b) Electron microscopy of Lewy bodies in the amygdala-parahippocampal region. Comparison with inclusion bodies in the MPTP-treated squirrel monkey, *Advances in Neurology* 69:217-228

Forstl, H. (1999) The Lewy body variant of Alzheimer's disease: clinical, pathophysiological and conceptual issues, *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 249:S64-S67 (Supplement 3)

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K., Iwatsubo, T. (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions, *Nature Cell Biology* 4:160-164

Galpern, W. R. und Lang, A. E. (2006) Interface between tauopathies and synucleinopathies: A tale of two proteins, *Annals of Neurology* 59:449-458

Georganopoulou, D. G., Chang, L., Nam, J. M., Thaxton, C. S., Mufson, E. J., Klein, W. L., Mirkin, C. A. (2005) Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:2273-2276

George, J. M., Jin, H., Woods, W. S., Clayton, D. F. (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch, *Neuron* 15:361-372

Gerard, M., Debyser, Z., Desender, L., Kahle, P. J., Baert, J., Baekelandt, V., Engelborghs, Y. (2006) The aggregation of alpha-synuclein is stimulated by FK506 binding proteins as shown by fluorescence correlation spectroscopy, *FASEB Journal* 20:524-526

Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions, *Science* 290:985-989

Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly, *Journal of Biological Chemistry* 276:2380-2386

Giasson, B. I., Duda, J. E., Quinn, S. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. (2002) Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein, *Neuron* 34:521-533

Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kotzbauer, P. T., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. (2003) Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein, *Science* 300:636-640

Giese, A., Bieschke, J., Eigen, M., Kretschmar, H. A. (2000) Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases, *Archives of Virology Supplement* (16) 161-171

Giese, A., Levin, J., Bertsch, U., Kretschmar, H. (2004) Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320:1240-1246

Giese, A., Bader, B., Bieschke, J., Schaffar, G., Odoy, S., Kahle, P. J., Haass, C., Kretschmar, H. (2005) Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333:1202-1210

Goedert, M. und Spillantini, M. G. (1998) Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies, *Molecular Psychiatry* 3:462-465

Goedert, M. (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases, *Nature Reviews Neuroscience* 2:492-501

Goedert, M. und Jakes, R. (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1739:240-250

Han, H., Weinreb, P. H., Lansbury, P. T., Jr. (1995) The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chemistry & Biology* 2:163-169

Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., Minthon, L. (2006) Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study, *Lancet Neurology* 5:228-234

Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297:353-356

Harper, J. D. und Lansbury, P. T., Jr. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins, *Annual Review of Biochemistry* 66:385-407

Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M., Masliah, E. (2001) beta-synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: A possible role as an anti-parkinsonian factor, *Neuron* 32:213-223

Ibanez, P., Bonnet, A. M., Debarges, B., Lohmann, E., Tison, F., Pollak, P., Agid, Y., Durr, A., Brice, A. (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease, *Lancet* 364:1169-1171

Irizarry, M. C., Growdon, W., Gomez-Isla, T., Newell, K., George, J. M., Clayton, D. F., Hyman, B. T. (1998) Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 57:334-337

Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., Dickson, D. W. (2003) Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 62:389-397

Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N. F., Flanagan, L., Desilva, H. A. R., Kittel, A., Saitoh, T. (1995) The Precursor Protein of Non-A-Beta Component of Alzheimers-Disease Amyloid Is A Presynaptic Protein of the Central-Nervous-System, *Neuron* 14:467-475

Iwata, A., Maruyama, M., Kanazawa, I., Nukina, N. (2001) alpha-Synuclein affects the MAPK pathway and accelerates cell death, *Journal of Biological Chemistry* 276:45320-45329

Jakes, R., Spillantini, M. G., Goedert, M. (1994) Identification of 2 Distinct Synucleins from Human Brain, *FEBS Letters* 345:27-32

Jarrett, J. T. und Lansbury, P. T., Jr. (1992) Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB, *Biochemistry* 31:12345-12352

Jarrett, J. T. und Lansbury, P. T., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055-1058

Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B., Morris, A. J. (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins, *Biochemistry* 37:4901-4909

Jensen, P. H., Nielsen, M. S., Jakes, R., Dotti, C. G., Goedert, M. (1998) Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation, *Journal of Biological Chemistry* 273:26292-26294

Ji, H., Liu, Y. E., Jia, T., Wang, M., Liu, J., Xiao, G., Joseph, B. K., Rosen, C., Shi, Y. E. (1997) Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing, *Cancer Research* 57:759-764

Jin, J., Li, G. J., Davis, J., Zhu, D., Wang, Y., Pan, C., Zhang, J. (2007) Identification of novel proteins associated with both alpha-synuclein and DJ-1, *Molecular Cell Proteomics* 6:845-859

Kahle, P. J. und Haass, C. (2001a) The emerging utility of animal models of chronic neurodegenerative diseases, *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 5:125-132

Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoy, S., Okamoto, N., Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N., Riederer, P., Kretschmar, H. A., Haass, C. (2001b) Selective insolubility of alpha-Synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model, *American Journal of Pathology* 159:2215-2225

Kahle, P. J., Haass, C., Kretschmar, H. A., Neumann, M. (2002a) Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases, *Journal of Neurochemistry* 82:449-457

Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Spooren, W., Fuss, B., Mallon, B., Macklin, W. B., Fujiwara, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Kretschmar, H. A., Haass, C. (2002b) Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes, *EMBO Report* 3:583-588

Kamp, F. und Beyer, K. (2006) Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles, *Journal of Biological Chemistry* 281:9251-9259

Kask, P., Palo, K., Ullmann, D., Gall, K. (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13756-13761

Kask, P., Palo, K., Fay, N., Brand, L., Mets, U., Ullmann, D., Jungmann, J., Pschorr, J., Gall, K. (2000) Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications, *Biophysical Journal* 78:1703-1713

Klivenyi, P., Siwek, D., Gardian, G., Yang, L., Starkov, A., Cleren, C., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Abeliovich, A., Beal, M. F. (2006) Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins, *Neurobiology of Disease* 21:541-548

Kobayashi, H., Kruger, R., Markopoulou, K., Wszolek, Z., Chase, B., Taka, H., Mineki, R., Murayama, K., Riess, O., Mizuno, Y., Hattori, N. (2003)

Haploinsufficiency at the alpha-synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease, *Brain* 126:32-42

Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr., Kelly, J. W. (1999) Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:9989-9990

Kotzbauer, P. T., Trojanowsk, J. Q., Lee, V. M. (2001) Lewy body pathology in Alzheimer's disease, *Journal of Molecular Neuroscience* 17:225-232

Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Eppelen, J. T., Schols, L., Riess, O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease, *Nature Genetics* 18:106-108

Larsen, K. E., Schmitz, Y., Troyer, M. D., Mosharov, E., Dietrich, P., Quazi, A. Z., Savalle, M., Nemani, V., Chaudhry, F. A., Edwards, R. H., Stefanis, L., Sulzer, D. (2006) Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis, *Journal of Neuroscience* 26:11915-11922

Lee, M., Hyun, D., Halliwell, B., Jenner, P. (2001) Effect of the overexpression of wild-type or mutant alpha-synuclein on cell susceptibility to insult, *Journal of Neurochemistry* 76:998-1009

Lee, M. K., Stirling, W., Xu, Y. Q., Xu, X. Y., Qui, D., Mandir, A. S., Dawson, T. M., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L. (2002) Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 -> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8968-8973

Levin, J., Bertsch, U., Kretschmar, H., Giese, A. (2005) Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329:1200-1207

Lewy, F. H. (1912) in *Handbuch der Neurologie*, 3. Auflage, Lewandowsky, M. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 920-933

Li, J., Uversky, V. N., Fink, A. L. (2001) Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein, *Biochemistry* 40:11604-11613

Madine, J., Doig, A. J., Middleton, D. A. (2006) A study of the regional effects of alpha-synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers, *Biochemistry* 45:5783-5792

Magde, D., Elson, EL., Webb, WW. (1972) Thermodynamics fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy., *Physical Review Letters* (29) 705-708

Magde, D., Elson, E. L., Webb, W. W. (1974) Fluorescence Correlation Spectroscopy. 2. An experimental realization, *Biopolymers* 13:29-61

Maiti, S., Haupts, U., Webb, W. W. (1997) Fluorescence correlation spectroscopy: diagnostics for sparse molecules, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:11753-11757

Maroteaux, L., Campanelli, J. T., Scheller, R. H. (1988) Synuclein - A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve-Terminal, *Journal of Neuroscience* 8:2804-2815

Maslah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., Mucke, L. (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders, *Science* 287:1265-1269

Maslah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T., Games, D., Schenk, D. (2005) Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease, *Neuron* 46:857-868

Monto, A. S. (2005) The threat of an avian influenza pandemic, *New England Journal of Medicine* 352:323-325

Muchowski, P. J. (2002) Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? *Neuron* 35:9-12

Mukaetova-Ladinska, E. B. und McKeith, I. G. (2005) Pathophysiology of synuclein aggregation in Lewy body disease, *Mechanisms of Ageing and Development* 127:188-202

Munishkina, L. A., Phelan, C., Uversky, V. N., Fink, A. L. (2003) Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: Modeling the effects of membranes, *Biochemistry* 42:2720-2730

Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons, *Journal of Neuroscience* 20:3214-3220

Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., Takeda, T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Analytical Biochemistry* 177:244-249

Narhi, L., Wood, S. J., Steavenson, S., Jiang, Y. J., Wu, G. M., Anafi, D., Kaufman, S. A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., Louis, J. C., Wypych, J., Biere, A. L., Citron, M. (1999) Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation (vol 274, pg 9843, 1999), *Journal of Biological Chemistry* 274:13728-13728

Negro, A., Brunati, A. M., Donella-Deana, A., Massimino, M. L., Pinna, L. A. (2002) Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation, *FASEB Journal* 16:210-212

Neumann, M., Kahle, P. J., Giasson, B. I., Ozmen, L., Borroni, E., Spooen, W., Muller, V., Odoy, S., Fujiwara, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q.,

Kretzschmar, H. A., Haass, C. (2002) Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies, *Journal of Clinical Investigation* 110:1429-1439

Neumann, M., Diekmann, S., Bertsch, U., Vanmassenhove, B., Bogerts, B., Kretzschmar, H. A. (2005) Novel G335V mutation in the tau gene associated with early onset familial frontotemporal dementia, *Neurogenetics*. 6:91-95

Nicholson, K. G., Wood, J. M., Zambon, M. (2003) Influenza, *Lancet* 362:1733-1745

Okochi, M., Walter, J., Koyama, A., Nakajo, S., Baba, M., Iwatsubo, T., Meijer, L., Kahle, P. J., Haass, C. (2000) Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein, *Journal of Biological Chemistry* 275:390-397

Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., Wolozin, B. (1999) alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins, *Journal of Neuroscience* 19:5782-5791

Palmer, A. G., III und Thompson, N. L. (1987) Molecular aggregation characterized by high order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy, *Biophysical Journal* 52:257-270

Parkinson, J. (1817) An essay on the shaking palsy, Verlag Sherwood, Neely and Jones, London

Poser, S., Zerr, I., Schroeter, A., Otto, M., Giese, A., Steinhoff, B. J., Kretzschmar, H. A. (2000) Clinical and differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease, *Archives of Virology Supplement* (16) 153-159

Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A., Benovic, J. L. (2000) Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases, *Journal of Biological Chemistry* 275:26515-26522

Rigler, R., Widengren, J., Mets, U. (1992) Interactions and kinetics of single molecules as observed by fluorescence correlation spectroscopy., *Fluorescence Spectroscopy* 13-24

Rigler, R., Mets, U., Widengren, J., Kask, P. (1993) Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion, *European Biophysics Journal* 22:169-175

Ross, C. A. und Poirier, M. A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nature Medicine* 10:S10-S17 (Supplement)

Schwille, P. (1997a) Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolkekülebene, *Dissertation*

Schwille, P., Bieschke, J., Oehlenschläger, F. (1997b) Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: The analytical and diagnostic potential of diffusion studies, *Biophysical Chemistry* 66:211-228

Schwille, P., Meyer-Almes, F. J., Rigler, R. (1997c) Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution, *Biophysical Journal* 72:1878-1886

Schwille, P., Oehlenschläger, F., Walter, N. G. (1996) Quantitative hybridization kinetics of DNA probes to RNA in solution followed by diffusional fluorescence correlation analysis, *Biochemistry* 35:10182-10193

Schwille, P., Korch, J., Webb, W. W. (1999) Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes, *Cytometry* 36:176-182

Serpell, L. C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., Crowther, R. A. (2000) Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:4897-4902

Shafer, A. L., Katz, J. B., Eernisse, K. A. (1998) Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera, *Avian Diseases* 42:28-34

Shults, C. W., Rockenstein, E., Crews, L., Adame, A., Mante, M., Larrea, G., Hashimoto, M., Song, D., Iwatsubo, T., Tsuboi, K., Masliah, E. (2005) Neurological and neurodegenerative alterations in a transgenic mouse model expressing human alpha-synuclein under oligodendrocyte promoter: implications for multiple system atrophy, *Journal of Neuroscience* 25:10689-10699

Shults, C. W. (2006) Lewy bodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1661-1668

Siddhanta, A. und Shields, D. (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels, *Journal of Biological Chemistry* 273:17995-17998

Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muentert, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K. (2003) alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease, *Science* 302:841-841

Small, D. H., Mok, S. S., Bornstein, J. C. (2001) Alzheimer's disease and AP toxicity: from top to bottom, *Nature Reviews Neuroscience* 2:595-598

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry* 150:76-85

Smoluchowski, M. (1906) Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen, *Annalen der Physik* (21) 756-780

Smoluchowski, M. (1914) Studien über Molekularstatistik der Emulsionen und deren Zusammenhang mit der Brown'schen Bewegung *Sitzungsberichte der Wiener Akademie* (123) 2381-2405

Spackman, E., Senne, D. A., Myers, T. J., Bulaga, L. L., Garber, L. P., Perdue, M. L., Lohman, K., Daum, L. T., Suarez, D. L. (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes, *Journal of Clinical Microbiology* 40:3256-3260

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Goedert, M. (1997) alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature* 388:839-840

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Cairns, N. J., Lantos, P. L., Goedert, M. (1998a) Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Neuroscience Letters* 251:205-208

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M. (1998b) alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6469-6473

Stohr, K. (2005) Avian influenza and pandemics - research needs and opportunities, *New England Journal of Medicine* 352:405-407

Svedberg, T. und Inouye, K. (1911) Observation of gold colloids using an ultra-microscope., *Zeitschrift für Physikalische Chemie* (77) 145-191

Thompson, N. L., Lieto, A. M., Allen, N. W. (2002) Recent advances in fluorescence correlation spectroscopy, *Current Opinion in Structural Biology* 12:634-641

Tobe, T., Nakajo, S., Tanaka, A., Mitoya, A., Omata, K., Nakaya, K., Tomita, M., Nakamura, Y. (1992) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel brain-specific 14-kDa protein, *Journal of Neurochemistry* 59:1624-1629

Tofaris, G. K. und Spillantini, M. G. (2005) Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases, *Movement Disorders* 20:37-44 (Supplement 12)

Trenkwalder, C., Schwarz, J., Gebhard, J., Ruland, D., Trenkwalder, P., Hense, H. W., Oertel, W. H. (1995) Starnberg trial on epidemiology of Parkinsonism and hypertension in the elderly. Prevalence of Parkinson's disease and related disorders assessed by a door-to-door survey of inhabitants older than 65 years, *Archives of Neurology* 52:1017-1022

Tu, P. H., Galvin, J. E., Baba, M., Giasson, B., Tomita, T., Leight, S., Nakajo, S., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (1998) Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein, *Annals of Neurology* 44:415-422

Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y., Saitoh, T. (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11282-11286

Uversky, V. N., Li, J., Fink, A. L. (2001a) Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation, *Journal of Biological Chemistry* 276:10737-10744

Uversky, V. N., Li, J., Fink, A. L. (2001b) Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein - A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure, *Journal of Biological Chemistry* 276:44284-44296

Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., Goedert, M., Fink, A. L. (2002) Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate - Inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins, *Journal of Biological Chemistry* 277:11970-11978

van der Putten, H., Wiederhold, K. H., Probst, A., Barbieri, S., Mistl, C., Danner, S., Kauffmann, S., Hofele, K., Spooren, W. P., Ruegg, M. A., Lin, S., Caroni, P.,

Sommer, B., Tolnay, M., Bilbe, G. (2000) Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein, *Journal of Neuroscience* 20:6021-6029

Vieregge, P., Kleinhenz, J., Fassel, H., Jorg, J., Kompf, D. (1991) Epidemiology and out-patient care in Parkinson's disease--results from a pilot-study in northern Germany (Schleswig-Holstein), *Journal of Neural Transmission Supplement* 33:115-118

Vital, A., Canron, M. H., Gil, R., Hauw, J. J., Vital, C. (2007) A sporadic case of Creutzfeldt-Jakob disease with beta-amyloid deposits and alpha-synuclein inclusions, *Neuropathology* 27:273-277

Volles, M. J., Lee, S. J., Rochet, J. C., Shtilerman, M. D., Ding, T. T., Kessler, J. C., Lansbury, P. T. (2001) Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: Implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease, *Biochemistry* 40:7812-7819

Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., Lansbury, P. T., Jr. (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded, *Biochemistry* 35:13709-13715

Wilson, T. (1990) *Confocal Microscopy*, Academic Press, London

Winton, M. J., Joyce, S., Zhukareva, V., Practico, D., Perl, D. P., Galasko, D., Craig, U., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2006) Characterization of tau pathologies in gray and white matter of Guam parkinsonism-dementia complex, *Acta Neuropathologica (Berlin)* 111:401-412

Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., Biere, A. L. (1999) alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent - Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease, *Journal of Biological Chemistry* 274:19509-19512

Yagi, H., Kusaka, E., Hongo, K., Mizobata, T., Kawata, Y. (2005) Amyloid fibril formation of alpha -synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other

proteins: Implications for the mechanism of transmissible conformational diseases, *Journal of Biological Chemistry* 280:38609-38616

Yamazaki, M., Arai, Y., Baba, M., Iwatsubo, T., Mori, O., Katayama, Y., Oyanagi, K. (2000) Alpha-synuclein inclusions in amygdala in the brains of patients with the parkinsonism-dementia complex of Guam, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 59:585-591

Yazawa, I., Giasson, B. I., Sasaki, R., Zhang, B., Joyce, S., Uryu, K., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2005) Mouse model of multiple system atrophy alpha-synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration, *Neuron* 45:847-859

Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., Llorens, V., Gomez, T. E., del Ser, T., Munoz, D. G., de Yebenes, J. G. (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia, *Annals of Neurology* 55:164-173

Curriculum Vitae Benedikt Bader

Persönliche Daten

Kontakt (beruflich)	Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern Arbeitsgruppe kognitive Neurologie Marchioninstr. 23 81377 München 089-7095-7827 (Büro) 089-2180-78044 (Labor) 089-7095-6671 (Fax) benedikt.bader@med.uni-muenchen.de
Kontakt (privat)	Sommerstr. 23 81377 München 089-33094576 0177-2484739 benedikt.bader@gmx.de
Geboren	12.11.1974 in München
Nationalität	deutsch
Konfession	römisch-katholisch

Schulausbildung

1981 – 1985	Grundschule Hattenhofen
1985 – 1995	Gymnasium Olching, Gymnasium Gröbenzell (Abitur)
1991, 1992	Sprach- und Studienreisen nach Großbritannien

Studium

1995 – 1996	Studium der Informatik, Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU) München
1999 – 2005	Studium der Humanmedizin, LMU München (Staatsexamen und Approbation als Arzt)
Famulaturen	Anästhesie, Neuropathologie, Palliativmedizin, Gynäkologie und Geburtshilfe (Universidad Mathias Delgado, San Salvador, El Salvador, gefördert durch DAAD Stipendium),

	Immunologie und Orthopädie (University of Sydney, Sydney, Australien)
Praktisches Jahr	Neurologie (Städt. Krankenhaus Harlaching, München), Chirurgie (Spitalverbund Oberwallis, Brig, Schweiz), Innere Medizin/Intensivmedizin (Städt. Krankenhaus Harlaching, München)

Berufliche Erfahrungen

1996 – 1998	Zivildienst und Anstellung als Rettungssanitäter , Malteser Hilfsdienst, Gröbenzell und Aicher Ambulanz Union, München
1998 – 1999	Geschäftsführender Gesellschafter bei Bader/Bofinger EDV Services, München
1998 – 2000	Assistenz in der ambulanten Anästhesie, Praxis Dr. Ingrid Hofmann und Ambulatorium im Helios, München
2005 – 2007	Assistenzarzt, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, Prof. Dr. H. Kretzschmar, LMU München
2007 – aktuell	Assistenzarzt, Neurologische Klinik, AG Neurokognitive Neurologie (Prof. Brandt, Prof. Danek), LMU München

Zusätzliches Engagement

2001 – 2004	Fachschaftsvertreter Medizin, LMU München (Fachschafts-sprecher und Mitglied des Fachbereichsrates 2002 – 2003)
2002 – 2004	Leiter der Öffentlichkeitsarbeit des Deutschen Famulantenaustausches (dfa e.V.) und der Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland (BVMD e.V.)
2002	Sprach- und Kulturreise nach Japan durch das Institut für Japanologie der LMU München, gefördert durch ein Stipendium des bayerischen Staatsministeriums für Unterricht und Kultus
2005	Kulturexkursion nach Japan im Auftrag der UNESCO Japan

Publikationsliste Benedikt Bader

Originalarbeiten und Korrespondenz

Giese, A., **Bader, B.**, Bieschke, J., Schaffar, G., Odoy, S., Kahle, P. J., Haass, C., Kretzschmar, H. (2005) Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation, *Biochemical Biophysical Research Communications* 4:1202-1210

Danek, A., **Bader, B.**, Walker, R. H. (2007) Antisocial behaviour and neuroacanthocytosis, *International Journal of Clinical Practice* 8:1419

Krebs, B., **Bader, B.**, Klehmet, J., Grasbon-Frodl, E., Oertel, W. H., Zerr, I., Stricker, S., Zschenderlein, R., Kretzschmar, H. A. (2007) A novel subtype of Creutzfeldt-Jakob disease characterized by a small 6 kDa PrP fragment, *Acta Neuropathologica* 2:195-199 (Erstautorenschaft geteilt)

Walterfang, M., Yucel, M., Walker, R., Evans, A., **Bader, B.**, Ng, A., Danek, A., Mocellin, R., Velakoulis, D. (2007) Adolescent obsessive compulsive disorder heralding chorea-acanthocytosis, *Movement Disorders*, 23:422-425

Danek, A., **Bader, B.**, Walker, R.H. (2008) Neuroacanthocytosis, *Clinics*, 63:135

Boban, M., Grbic, K., Mladinov, M., Hof, P. R., Sussmair, C., Ackl, N., Stanic, G., **Bader, B.**, Danek, A., Simic, G. (2008) Cerebrospinal fluid markers in differential diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia, *Collegium Antropologicum*, 32 Supplement 1:31-36

Kongressbeiträge

Bieschke, J. G., Giese, A., Bertsch, U., Weber, P., Levin, J., **Bader, B.**, Kretzschmar, H. (2003) Single molecule fluorescence detection and characterization of amyloid protein aggregation, *Biophysical Journal* 2:313A

Boban, M., Grbic, K., Hof, P. R., Hamann, C., Ackl, N., **Bader, B.**, Danek, A., Simic, G. (2006) CSF levels of total tau protein, phosphorylated tau epitopes 181, 199 and 231 as markers for early-onset Alzheimer's dementia, *European Journal of Neurology* 13:196-197

Bader, B. (2007) Neuropathology of chorea-acanthocytosis, *Movement Disorders* 3:VI

Nobile, S., **Bader, B.**, Habeck, M., Kretzschmar, H. A., Giese, A. (2007) Co-aggregation of alpha-synuclein and tau protein analysed by confocal single particle spectroscopy, *Journal of Neural Transmission* 3:XI

Bader, B., Arzberger, T., Dobson-Stone, C., Velayos Baeza, A., Monaco, A. P., Kretzschmar, H. A., Danek, A. (2007) Chorein expression in post-mortem brain tissue of Chorea-Acanthocytosis patients and non-affected controls, *Journal of Neural Transmission* 3:XXVIII

Buchbeiträge

Bader, B., Arzberger, T., Heinsen, H., Dobson-Stone, C., Kretzschmar, H. A., Danek, A. (2007) Neuropathology of Chorea-Acanthocytosis, in *Neuroacanthocytosis Syndromes II*, 2. Auflage, 187-196, Herausgeber Walker, R., Saiki, S., Danek, A., Springer, Heidelberg

Betreute Doktorarbeiten

Promotion von Frau Simona Nobile zum Thema:

„Aggregationsanalyse des Tau-Proteins und insbesondere die Interaktion mit Synuclein durch die konfokalen Einzelmolekülspektroskopie“.

Februar 2006 – August 2006 am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (Vorstand Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar) in der Arbeitsgruppe PD Dr. Armin Giese.

Promotion von Frau Anja Mehle zum Thema:

„Aggregations- und Koaggregationsmechanismen des Tau-Proteins und des Alpha-Synucleins und Einflußfaktoren durch die konfokale Einzelmolekülspektroskopie“.

November 2006 – April 2007 am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (Vorstand Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar) in der Arbeitsgruppe PD Dr. Armin Giese.

Promotion von Herrn Georg Nübling zum Thema:

„Entwicklung eines einzelmolekülbasierten Hochdurchsatzverfahrens zur Identifikation von kleinen molekularen Inhibitoren der Tau-Aggregation“.

August 2007 – andauernd am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (Vorstand Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar) in der Arbeitsgruppe PD Dr. Armin Giese.

Lehrveranstaltungen

- | | |
|----------------|---|
| SoSe 2005 | <ul style="list-style-type: none">• Kursus der Pathologie, 7M0802, MeCuM Modul I, 4 SWS, Studiengang Humanmedizin• Makroskopisch-neuropathologische Demonstration, 07785, PJ, 4 SWS, Studiengang Humanmedizin |
| WiSe 2005/2006 | <ul style="list-style-type: none">• Kurs der allgemeinen Pathologie, 7M0802, MeCuM Modul I, 4 SWS, Studiengang Humanmedizin• Makroskopisch-neuropathologische Demonstration, 07633, PJ, 4 SWS, Studiengang Humanmedizin• Klinisch-Pathologische Fallkonferenz, 07635 und 07636, PJ, 1 SWS, Studiengang Humanmedizin• Neurologie und Neurochirurgie 1 und/oder 2, 7M1407 und 7M1408, MeCuM Modul IV, 6 SWS, Studiengang Humanmedizin |
| SoSe 2006 | <ul style="list-style-type: none">• Makroskopisch-neuropathologische Demonstration, 07098, PJ, 4 SWS, Studiengang Humanmedizin• Klinisch-pathologische Fallkonferenz Innere Medizin, 07112, PJ, 2 SWS, Studiengang Humanmedizin |
| WiSe 2006/2007 | <ul style="list-style-type: none">• Kurs der allgemeinen Pathologie, 7M0802, MeCuM Modul 1, 4 SWS, Praktische Übung, Studiengang Humanmedizin• Makroskopisch-neuropathologische Demonstration, 07198, PJ, 4 SWS, Studiengang Humanmedizin• Klinisch-Pathologische Fallkonferenz, Innere Medizin, 07231 und 07236, PJ, 2 SWS, Demonstration, Studiengang Humanmedizin |
| SoSe 2007 | <ul style="list-style-type: none">• Neurologie und Neurochirurgie 1 und/oder 2, 7M1407 und 7M1408, MeCuM Modul IV, 8 SWS, Studiengang Humanmedizin |
| WiSe 2007/2008 | <ul style="list-style-type: none">• Neurologie und Neurochirurgie 1 und/oder 2, 7M1407 und 7M1408, MeCuM Modul 4, 12 SWS, Studiengang Humanmedizin• Gehirnanatomische Grundlagen, 11787, 14 SWS, Studiengang Sprachtherapie (BA), Fakultät für Psychologie und Pädagogik• Klinische Neuropsychologie, 11796, 14 SWS, Studiengang Sprachtherapie (BA), Fakultät für Psychologie und Pädagogik• Neuropsychologische Syndrome bei Schlaganfall, 11791, 14 SWS, Vorlesung, Studiengang Sprachtherapie (BA), Fakultät für Psychologie und Pädagogik |
| SoSe 2008 | <ul style="list-style-type: none">• Neurologie und Neurochirurgie 1 und/oder 2, 7M1407 und 7M1408, MeCuM Modul 4, 8 SWS, Studiengang Humanmedizin |
| Sonstige | <ul style="list-style-type: none">• Intensivkurs Neuroanatomie, 2006/2007/2008 |

- Neuroanatomie und Neuropathologie, 2005/2006, Neuro-Cognitive Psychology (MA), Elitenetzwerk Bayern („TOP 10 International Master's Degree Courses made in Germany" Preis des Stifterverbandes für die Deutsche Wissenschaft und des Deutschen Akademischen Austauschdienstes)

Drittmittel

Projektbezogene Drittmittel

Zusammen mit Prof. Adrian Danek (Principal Investigator) für „Establishment of an international database for neuroacanthocytosis patients, including Western blot diagnosis and the use of human tissue for basic research.", gewährt durch die *Advocacy for Neuroacanthocytosis Patients (AfNAP)*, Förderperiode 2007-2008, 75000 Euro

Stipendien

- 2002 Sprach- und Kulturreise nach Ishibashi, Aufenthaltskostenübernahme durch das bayerische Staatsministerium für Unterricht und Kultus, ca. 1500 Euro
- 2003 Famulatur in Gynäkologie und Geburtshilfe, El Salvador, Übernahme der Studiengebühren und Aufenthaltskosten durch den Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD), ca. 500 Euro
- 2005 Exkursion zur Evaluation der traditionellen Lebensgewohnheiten im südlichen Japan, Reisekostenübernahme durch UNESCO Japan, 4000 Euro
- 2006 Kongressreise 3. Internationales Neuroakanthozytose Symposium, Kyoto, Japan, Reisekostenübernahme durch Advocacy for Neuroacanthocytosis Patients, ca. 2000 Euro
- 2007 Forschungsreise nach Quebec, Reisekostenübernahme durch die Arbeitsgemeinschaft der Bayerischen Forschungsverbände Quebec, 1200 Euro
- 2008 Kongressreise zum 18. Jahreskongress der European Neurological Societies, Sprecherbeitrag, Nizza, Frankreich, Reisekostenübernahme ENS (Young Neurologist Travel Grant), ca. 750 Euro

Danksagung

Prof. Dr. Armin Giese und Dr. Jan Bieschke möchte ich für ihre konstante Motivation und Inspiration während aller Phasen dieser Arbeit danken. Ausdrücklich auch für ihr Talent, die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten zu vermitteln. Für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Institut durchzuführen, danke ich Prof. Hans A. Kretzschmar. Prof. Christian Haass und Prof. Philipp Kahle bin ich dankbar für die Zusammenarbeit und ihre Ideen während der Anfangsphase der Synuclein-aggregation und der Überlassung einiger rekombinant synthetisierter Proteine.

Der Laborkonferenz am Freitagvormittag, insbesondere Dr. Kathrin Dittmar, Dr. Uwe Bertsch, Dipl. biol. Alexander Hepp und Dipl. biol. Jens Wagner, möchte ich für ihren täglichen Rat bei allen anfallenden Herausforderungen der Laborarbeit danken. Für die Überlassung der Expressionsvektoren des verwendeten Tau-Proteins bin ich PD Dr. Manuela Neumann zu Dank verpflichtet.

Für ihre exzellente Hilfe in technischen Dingen, sowie die stets freundliche und angenehme Zusammenarbeit, bin ich Salah Soliman, Stephanie Ochs, Ben Vanmassenhove, Brigitte Kraft, Janina Mielke, Michael Schmidt, Angelika Henn, Ursula Jung, Iryna Pigur und Johannes Lettenbauer dankbar.

Weiterhin dankbar bin ich Johannes Levin und Tobias Högen für ihre Unterstützung in vielen Phasen dieser Arbeit und besonders Antje Schröder für das Korrekturlesen des Textes. Darüber hinaus danke ich Isabella Wagner, Volker Racho und Doro Rieger für eine vergnügliche Zeit und meinen Freunden für ihren nicht müde werdenden Beistand.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Christine Bader und Udo Heimann, sowie meinen Großeltern Vera und Max Heimann und Josefine und Leo Bader für ihr Vorbild, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während der langen Ausbildung und der Anfertigung dieser Arbeit.

Benedikt Bader, München, 01. Mai 2008