Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. A. Ludolph

und

Massachussetts General Hospital
Massachussetts Institute for Neurodegenerative Disease
Administration: Anne B. Young, M.D., Ph.D.

Transmission von α-Synuclein im Morbus Parkinson

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Universität Ulm

vorgelegt von

Wolfgang Ruf

aus Biberach/Riß

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Otto

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Böckers

Tag der Promotion: 04.07.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Die Parkinson Krankheit 1
1.1.1 Pathophysiologie der Parkinson Krankheit 1
1.1.2 Diagnose der Parkinson Krankheit 2
1.1.3 Therapie der Parkinson Krankheit 2
1.1.4 Familiäre Formen der Parkinson Krankheit 3
1.1.5 Histopathologie der Parkinson Krankheit 4
1.2 Die Braak Hypothese 4
1.3 α-Synuclein 6
1.3.1 Struktur von α-Synuclein 7
1.3.1.1 Aminoterminale Domäne 7
1.3.1.2 NAC Domäne 8
1.3.1.3 C-terminale Domäne 8
1.3.2 Physiologische Funktion von α-Synuclein 9
1.3.3 Pathophysiologische Rolle von α-Synuclein 11
1.3.4 α-Synuclein Oligomere und Fibrillen 13
1.3.5 Extrazelluläres α-Synuclein 14
1.4 Fragestellung 15
2 Material und Methoden 17
3 Ergebnisse 25
3.1 Nachweis der Oligomerisierung von α-Synuclein mit Hilfe des Luciferase Versuches 25
3.2 Nachweis von α-Synuclein im Extrazellularraum mittels DotBlot und WesternBlot 28
3.3 Quantifizierung von α-Synuclein in konditionierten Medien mittels ELISA 31
3.4 Freisetzung von α-Synuclein durch primäre Neuronen an axonalen Endigungen und über den Zellkörper 33
3.5 Charakterisierung der α-Synuclein Spezies mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie 35
3.6 Aufnahme von sekretiertem α-Synuclein in verschiedenen Zellarten 37

3.7 Etablierung von zellulären Ko-Kulturen zur Untersuchung einer Transmission von α-Synuclein 40
3.8 Sekretierte α-Synuclein haben eine toxische Wirkung auf Nachbarzellen .. 47
4 Diskussion 51
4.1 α-Synuclein Oligomere werden in den Extrazellularraum sekretiert 51
4.2 α-Synuclein Oligomere werden aus dem Extrazellularraum aufgenommen 52
4.3 α-Synuclein Oligomere werden interzellulär transmittiert 54
4.4 Die Transmission von α-Synuclein erfolgt in Oligomerform..... 56
4.5 Extrazelluläre α-Synuclein Oligomere sind zytotoxisch 56
4.6 Schlussfolgerung..... 57
5 Zusammenfassung..... 58
6 Literaturverzeichnis 60
Danksagung..... 77
Lebenslauf 78

Abkürzungsverzeichnis

3' oder 5'	Bezeichnung des DNA-Strangendes, das die 3'- bzw. 5'-Hydroxylgruppe des Zuckers des DNA-Rückgrats trägt.
14-3-3 Protein	Konserviertes Regluationsprotein, welches zahlreiche Interaktionspartner aufweist. Erhöhte 14-3-3 Proteinlevel finden sich im Liquor cerebrospinalis von Creutzfeldt-Jakob-Patienten.
18F-DOPA	^{18}Fluor-L-3,4-Dihydroxyphenylalanin; 18F-DOPA sind radioaktiv markierte L-Dopa Moleküle, welche im Rahmen einer Positronen-Emissions-Tomographie verwendet werden, um Dopaminrezeptoren sichtbar zu machen.
AAV	Adeno-assoziierte Viren; die AAV sind von einem Adenovirus abhängig. Das Helfervirus liefert Proteine, die vom AAV für die Replikation in der Zelle benötigt werden.
Abb.	Abbildung
Aβ	Beta-Amyloid Peptid; Aβ ist ein Peptid, welches aus dem Amyloid precursor protein entsteht. Es bildet eine der Hauptkomponenten von amyloiden Plaques in der Alzheimer Erkrankung.
Aβ-luc 1	β-Amyloid-humane-Gaussia-Luciferase; Fusionsprotein zwischen humanem β-Amyloid und den Aminosäuren 1-93 der humanen Gaussia Luciferase.
Aβ-luc2	β-Amyloid-humane-Gaussia-Luciferase; Fusionsprotein zwischen humanem β-Amyloid und den Aminosäuren 94-185 der humanen Gaussia Luciferase.
Alexa 488	Alexa Fluor™ 488; Succinimidylester, der als Fluoreszenzfarbstoff agiert.
α-Syn	α-Synuclein; wildtypisches Volllängen-α-Synuclein.

α-Syn[A30P]	familiäre Punktmutation an Position 30 von α-Synuclein, Austausch von Alanin nach Prolin.
α -Syn[E46K]	familiäre Punktmutation an Position 46 von α-Synuclein, Austausch von Glutaminsäure nach Lysin.
α -Syn[A53T]	familiäre Punktmutation an Position 53 von α-Synuclein, Austausch von Alanin nach Threonin.
APP	Amyloid precursor protein; das Amyloid-Vorläuferprotein ist ein integrales Membranprotein, welches eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung spielt.
BioMEMS	Bio Micro Electro Mechano Systems; Abteilung des Massachussetts Institute for Neurodegenerative Disease, welches auf die Entwicklung von mikroelektromechanischen Systemen spezialisiert ist.
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan; Bis-Tris ist eine Puffersubstanz, die in der Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet wird.
CBA	Chicken Beta-Actin Promotor; hocheffizienter Promotor, welcher bei der Expression von Transgenen eingesetzt wird.
CSPα	Cystein String Protein α; CSPα fungiert als synaptisches Vesikelprotein und zeigt anti-neurodegenerative Eigenschaften.
C-terminal	am Carboxy-Ende eines Proteins gelegen.
cDNA	komplementäre DNA, die durch revers transkribierte mRNA erhalten wird.
CPS	Counts per Second; Maßeinheit in der die Biolumineszenz des Luciferasesystems gemessen wird.
DLB	Dementia with Lewy Bodies; zweithäufigste neurodegenerative Demenz, die sowohl sekundär im

	Rahmen der Parkinson Krankheit als auch als eigenständige Erkrankung auftritt.
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäuren fungieren als Träger der Erbinformation
DotBlot	Technik zur Detektion von Biomolekülen ohne vorherige Auftrennung mittels Chromatographie oder Gelelektrophorese.
E14-16	14-16 Tage alte Mäuseembryonen
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) antikörperbasiertes Nachweisverfahren für Proteine.
g	g-Kraft; als g-Kraft bezeichnet man die Belastung eines Körpers während einer Beschleunigung.
gc	genome copies; Maßeinheit zur Beschreibung des Virustiters. Es beinhaltet Partikel, die das virale Genom enthalten, und somit funktionstüchtige Vektoren darstellen, welche Zellen infizieren können.
GFP	Grün fluoreszierendes Protein; GFP ist ein Fluoreszenzprotein, welches nach Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Es kann leicht mit anderen Proteinen fusioniert werden und kann somit als Fluoreszenzmarkierung dienen.
H4	humane Neurogliomzellen
hGluc	humane-Gaussia-Luciferase; Enzym, welches die Oxidation von Coelenterate-Luciferin katalysiert. Hierbei wird blaues Licht um 480nm emittiert.
HSP	Hitzeschockproteine; HSP sind Teile des Chaperonsystems und sind beteiligt an der zellulären Stressantwort.

HSP 27	Hitzeschockprotein 27; fungiert *in vitro* als ATP-unabhängiges Chaperon, welches die Proteinaggregation inhibiert und denaturierte Proteine stabilisieren kann.
HSP 70	Hitzeschockprotein 70; Hsp70 hilft beim Transport von Proteinen über Membranen, es wirkt anti-aggregatorisch und schützt Zellen vor oxidativem und thermischen Stress.
kDa	Kilodalton; Maßeinheit der Masse.
IRES	Interne ribsosomale Eintrittsstelle; die IRES stellt eine Sekundärstruktur der messenger-RNA dar, die ohne Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an Ribsomen vermittelt.
L	Linker; wenige Basenpaare großes Verbindungsstück zwischen Protein und Proteinmarkierung kodierender Region.
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin; L-DOPA ist eine nicht-proteinogene α-Aminosäure, die aus Tyrosin gebildet wird und den Vorläufer von Dopamin darstellt.
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate; anionisches Detergens, welches welches Sekundär- und Tertiärstrukturen denaturiert, und Proteine negativ lädt.
Luc	rekonstituierte humane-Gaussia-Luciferase; humanes-Gaussia-Luciferase Protein, welches durch Rekonstitution der beiden beschriebenen Luciferasehälften entsteht.
mRNA	messenger Ribonucleic Acid; Boten-Ribonucleinsäure. Als mRNA wird das RNA Produkt eines zu einem Gen gehörigen Teilabschnitts der DNA bezeichnet.
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid; dient als Puffer bei der Polyacrylamidgelelektrophorese.

MSA	Multisystematrophie; zu den Synucleinopathien zählende neurodegenerative Erkrankung, die mehrere neuronale Systeme betrifft. Histopathologisches Charakteristikum sind oligodendrogliale Einschlusskörperchen.
MWCO	Molecular Weight Cut Off; beschreibt die maximale Größe eines Moleküls, die einen Filter passieren kann.
NAC	Non Amyloid Component, die nicht amyloide Komponente stellt eine zentrale Region des α-Synuclein Proteins dar. Fragmente dieser Proteinregion finden sich in amyloiden Plaques der Alzheimer Erkrankung.
N-terminal	am Aminoende eines Proteins gelegen
pAAV	plasmid Adeno-associated-Virus; Plasmid der Adeno-assoziierten-Viren.
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese; Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld.
PBS	Phosphate-Buffered Saline; phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung.
PCR	Polymerase Chain Reaction; die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA.
PET	Positronen-Emissions-Tomographie; die PET ist ein bildgebendes Verfahren in der Nuklearmedizin. Es handelt sich um eine funktionelle Schnittbildgebung, welche ein schwach radioaktives Radiopharmakon im Körper sichtbar macht.
PK	Parkinson Krankheit; neurodegenerative Erkrankung, welche mehrere neuronale Systeme befällt. Die Hauptsymptome der PK werden durch den Untergang von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra ausgelöst.
RT	Raumtemperatur

S1	α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); Fusionsprotein bestehend aus wildtypischem α-Synuclein und den Aminosäuren 1-93 der humanen-Gaussia-Luciferase.
S2	α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); Fusionsprotein bestehend aus wildtypischem α-Synuclein und den Aminosäuren 94-185 der humanen-Gaussia-Luciferase.
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate; SDS ist ein anionisches Detergens, welches Sekundär- und Tertiärstrukturen denaturiert, und Proteine proportional zu ihrer Maße negativ lädt.
SV2	α-Synuclein-Venus-YFP (159-238); Fusionsprotein bestehend aus wildtypischem α-Synuclein und den Aminosäuren 159-238 des Yellow Fluorescent Protein.
SynGFP	α-Synuclein-Green-Fluorescent-Protein; Fusionsprotein bestehend aus wildtypischem α-Synuclein und dem Green-Fluorescent-Protein.
TBS-T	Tris-buffered-Saline-Tween 20; TBS-T ist eine Mischung aus trisgepufferter Kochsalzlösung mit Zugabe von Tween 20.
TNT	Tunneling Nanotubes; TNT sind dünne Membrankanäle, welche Zellen zu Netzwerken verknüpfen. Sie ermöglichen den Transfer von verschiedenen Biomolekülen.
V1S	α-Synuclein-Venus-YFP (1-158); Fusionsprotein bestehend aus wildtypischem α-Synuclein und den Aminosäuren 1-158 des Yellow Fluorescent Protein.
YFP	Yellow Fluorescent Protein. Abwandlung des Fluoreszenzproteins Green Fluorescent Protein mit anderen Anregungs- und Emissionsspektren.

SNARE-Proteine	soluble NSF attachment receptor; SNARE-Proteine sind Schlüsselfaktoren in der Fusion von biologischen Membranen. Diese Transmembranproteine bilden stabile Komplexe, welche jeweils aus vier SNARE-Proteinen bestehen. NSF steht hiebei für N-Ethylmaleinimid-sensitiver Faktor.
WesternBlot	durch ein elektrisches Feld erzielter Protein-Transfer von Gelen auf Membranen.
WPRE	Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element; das WPRE ist eine Regulationseinheit des Woodchuck Hepatitis Virus und erhöht die Expression eines Transgens in einem viralen Vektor.
wt	Wildtyp; wt bezeichnet ein Gen oder ein Genom, welches in einem Zustand vorliegt, das natürlicherweise durch die Evolution entstanden ist.
ZNS	Zentrales Nervensystem; das ZNS stellt ein Teilsystem des Nervensystems dar und beinhaltet Nervenstrukturen, die im Gehirn oder im Rückenmark liegen.

Bezeichnung	Abkürzung	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E

Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

1.1 Die Parkinson Krankheit

Die Parkinson Krankheit (PK) wurde erstmals 1817 von James Parkinson als sogenannte „shaking palsy“ (Abhandlung über die Schüttellähmung) beschrieben. James Parkinson beschrieb hier einen Patienten, der die typischen motorischen Störungen der PK aufwies. Die Leitsymptome der PK sind demnach: Bradykinese/Akinese (langsame/fehlende Bewegung), Rigor (Muskelsteifheit), Ruhetremor (unwillkürliches, regelmäßiges Zittern einer Extremität, des Kopfes oder des ganzen Körpers) und posturale Instabilität (Gang- und Gleichgewichtsstörungen). Die PK beschränkt sich jedoch keineswegs auf das motorische System. Sie stellt eine Multisystemerkrankung dar, welche auch sensorische, vegetative, psychische und kognitive Symptome haben kann. Deshalb können bei der PK neben den klassischen motorischen Symptomen auch Symptome wie z.B. Anosmien, Schlafstörungen, Depressionen und Demenzen dazukommen (Giladi et al., 2000). Es wird vermutet, dass diese Störungen den klassischen motorischen Symptomen teilweise Jahre vorausgehen und somit die frühzeitige Diagnose einer PK deutlich erschweren (Becker et al., 2002). Ein hohes Lebensalter wird als Hauptrisikofaktor der PK angesehen, vermutlich liegt diesem ein steigender oxidativer Stress im höheren Alter zu Grunde. Dabei könnten verschiedene Umweltfaktoren und Umweltgifte eine Rolle spielen, jedoch ist deren Relevanz noch nicht vollständig geklärt (Betarbet et al., 2000; Chade et al., 2006; Langston, 1998). Die Prävalenz der Erkrankung nimmt mit zunehmendem Alter erheblich zu und steigt von 0,2% bei 60 Jährigen auf bis zu 2% bei 80 Jährigen an. Der Altersgipfel der Erstmanifestation liegt bei 55 Jahren. Sie ist damit die häufigste neurologische Erkrankung im Bereich der Bewegungsstörungen und nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit (Muangpaisan et al., 2009).

1.1.1 Pathophysiologie der Parkinson Krankheit

Im Zentrum der Pathophysiologie steht eine zunehmende Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra, welche zu einer Minderinnervation des Striatums führt. Hierdurch entsteht ein Dopaminmangel an striatalen Rezeptoren. Neben der Substantia Nigra sind auch andere Hirnareale wie der cholinerge dorsale Vaguskern und Nucleus basalis Meynert, der

noradrenerge Locus coeruleus und der serotonerge Nucleus raphe dorsalis betroffen. Die PK ist also keineswegs auf die Substantia Nigra begrenzt. Die Pathologie außerhalb der Substantia Nigra ist unter anderem für die nicht motorischen Defizite verantwortlich.

1.1.2 Diagnose der Parkinson Krankheit

Primär wird die Diagnose Parkinson anhand der oben genannten Leitsymptome gestellt. Zur Erhärtung der Verdachtsdiagnose PK kann klinisch ein sogenannter L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) Test durchgeführt werden. L-DOPA, welches eine Vorstufe in der Biosynthese von Dopamin darstellt, kann nach seiner Umwandlung zu Dopamin die Konzentration von Dopamin an den Synapsen im Striatum erhöhen. Die motorischen Symptome der PK sind deshalb in der Regel durch L-DOPA positiv beeinflussbar, was sich zur Diagnosestellung nutzbar machen lässt. Die Schwere der motorischen Symptome wird mittels eines standardisierten Tests erfasst und nach Gabe einer definierten Menge L-DOPA erneut bestimmt. Kommt es zu einer signifikanten Besserung der motorischen Symptome, so kann die klinische Verdachtsdiagnose erhärtet werden. Eine weitere, klinisch jedoch weniger relevante, Diagnoseoption ist die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Mit Hilfe der PET kann der progressive Untergang von Neuronen in der Substantia Nigra dargestellt werden. Hierbei wird die Dopamintransporterdichte durch die Bindung von ^{18}F-DOPA an den Dopaminrezeptor gemessen. Bei PK Patienten wird ein deutlich schwächeres Signal gemessen. Mit der PET können klinisch noch wenig auffällige Patienten detektiert werden. Dies ist insofern äußerst relevant, als dass die motorischen Symptome erst bei einer Dopaminreduktion um 80% oder einem neuronalen Verlust von 60% voll ausgeprägt sind. Insgesamt wird ein präklinisches Stadium von drei bis sechs Jahren vermutet. Gerade in dieser präklinischen Phase wären effektive Therapien äußerst sinnvoll.

1.1.3 Therapie der Parkinson Krankheit

Leider sind nach wie vor keine kausalen Therapien klinisch ausgereift, weshalb momentan hauptsächlich symptomatisch behandelt wird. Im Mittelpunkt der Behandlung stehen zum einen Dopaminagonisten und zum anderen L-DOPA. Um Nebenwirkungen in der Körperperipherie zu minimieren und die Verfügbarkeit von L-DOPA im zentralen Nervensystem (ZNS) zu erhöhen, wird die Therapie mit

einem DOPA-Decarboxylase-Inhibitor ergänzt. Ein weiteres effektives Verfahren zur Besserung der motorischen Symptome stellt die Tiefenhirnstimulation dar. Kausale Therapien wie z.B. Stammzelltransplantationen sind bislang klinisch noch nicht ausgereift.

1.1.4 Familiäre Formen der Parkinson Krankheit

Die idiopathische Parkinson Erkrankung macht bis zu 90% der Erkrankten aus. Etwa 10% der Krankheitsfälle werden familiären Formen zugeordnet, bei denen Mutationen bestimmter Gene zugrunde liegen (Gasser, 2001).

Tabelle 1: Gen Loci die mit der Parkinson Krankheit assoziiert sind und deren möglichen Funktionen (Thomas et al., 2011).

Locus	Gen	Chromosom	Vererbung	Proteinfunktion
PARK 1 & Park 4	α-Synuclein	4q21	Dominant	Präsynaptisches Protein, Lewy Body Vesikelhomöstase Interaktionen mit Membranen
PARK 2	Parkin	6q25.2-27	Rezessiv	Ubiquitin E3 Ligase Mitophagie
PARK 3	Unbekannt	2q13	Dominant	Unbekannt
PARK 5	UCHL 1	4q14	Dominant	C-terminale Ubiquitin Hydrolase
PARK 6	PINK 1	1p35-36	Rezessiv	Mitochondriale Kinase
PARK 7	DJ-1	1p36	Rezessiv	Oxidativer Stress
PARK 8	LRRK 2	12p11.2	Dominant	Signaltransduktion Zytoskelettdynamik Proteintranslation
PARK 9	ATP13A2	1p36	Rezessiv	Unbekannt
PARK 10	Unbekannt	1p32	Dominant	Unbekannt
PARK 11	GIGYF2	2p37	Dominant	IGF-I Signal-transduktion
PARK 12	Unbekannt	Xq21-q25	X-chromosomal	Unbekannt
PARK 13	Omi/HtrA2	2p13	Unbekannt	Mitochondriale Serinprotease
PARK 14	PLA2G6	22q13	Rezessiv	Phospholipase Enzym
PARK 15	FBX07	22q11	Rezessiv	Ubiquitin E3 Ligase
PARK 16	Unbekannt	1q32	Unbekannt	Unbekannt

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden 16 Genloci und Gene identifiziert, welche mit familiären Formen der PK assoziiert sind (Tabelle 1). Diese Gene werden als PARK Gene bezeichnet. Obwohl sie nur sehr selten auftreten, so haben sie doch stark zum Verständnis der Erkrankung beigetragen.

1.1.5 Histopathologie der Parkinson Krankheit

Das histopathologische Charakteristikum der PK ist das Auftreten von eosinophilen fibrillären intrazellulären Einschlusskörperchen, die so genannten Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten in überlebenden Neuronen (Lewy et al., 1912). Sie können lichtmikroskopisch in ein dichtes eosinophiles Zentrum und in einen helleren äußeren Ring unterteilt werden. Das elektronenmikroskopische Äquivalent des elektronendichten Zentrums ist ein filamentartiges granuläres Material mit sich kreisförmig anschließenden Filamenten, die den äußeren Ring darstellen (Forno, 1996). Die Ablagerungen bestehen hauptsächlich aus aggregiertem α-Synuclein. Weitere Bestandteile sind phosphorylierte Neurofilamente, Ubiquitin und Hitzeschockproteine (HSP). Bemerkenswerterweise tritt die Lewy-Körperchen Pathologie häufig zusammen mit den, für die Alzheimer Krankheit bekannten, extrazellulären Amyloid-Beta-Peptid Plaques und mit intraneuralen Tau-Protein Tangles auf (Galpern et al., 2006). Hierbei konnten in bis zu 60% der histologisch untersuchten Fälle, sowohl von sporadischer, als auch von familiärer Alzheimer Krankheit zusätzlich Lewy-Körperchen detektiert werden (Kotzbauer et al., 2001). Weiterhin konnte in manchen Fällen eine Ko-Lokalisation zwischen α-Synuclein in Lewy-Körperchen und dem Tau Protein gezeigt werden (Ishizawa et al., 2003).

1.2 Die Braak Hypothese

Basierend auf post mortem Analysen konnte gezeigt werden, dass neuronale Zellverluste in der Substantia Nigra, welche die Parkinson Erkrankung kennzeichnen, immer zusätzlich mit extranigralen Schäden in anderen Kerngebieten einhergehen (Braak et al., 2003). Die Autoren gehen davon aus, dass die PK in nicht dopaminergen kaudalen Strukturen beginnt ,unter anderem in vagalen und glossopharyngealen Kerngebieten und in der Formatio Reticularis, und sich von dort aus progredient rostral bis hin zum Neocortex ausbreitet. Die Autoren versuchen mit ihrer post mortem Studie die örtliche und zeitliche Ausbreitung der Lewy Körperchen Pathologie mit der klinischen Symptomatik des Patienten zu korrelieren.

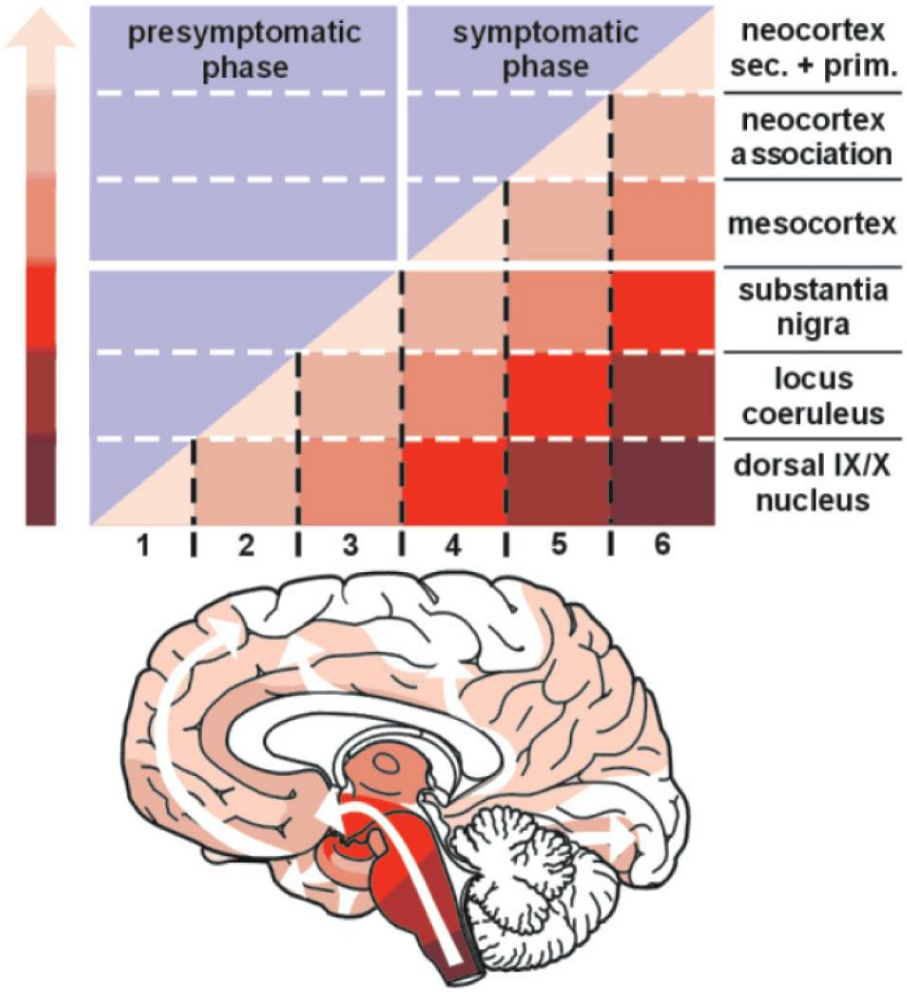


Abbildung 1: Einteilung der Parkinson Erkrankung in 6 Stadien durch Analyse der topographische Ausbreitung der Läsionen (Braak et al., 2003).

Nach Braak et al. wird die Krankheit insgesamt in sechs Stadien unterteilt, welche einem relativ konstanten histopathologischen Muster in bestimmten Hirnarealen entsprechen (Braak et al., 2003). Hierbei treten beim Stadium 1 in den dorsalen motorischen Kernen des Nervus glossopharyngealis und des Nervus vagus und im mittleren Teil der Formatio Reticularis Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten auf. Im Stadium 2 beschreiben Braak et al. zusätzlich Lewy-Körperchen Pathologien im kaudalen Teil des Raphe Kerns, im gigantozellulären Kern der Formatio Reticularis und im Coeruleus-Subcoeruleus Komplex. Die Stadien 1 und 2 präsentieren sich als klinisch wenig symptomatische bis asymptomatische Phänotypen und entsprechen eher einer zufällig auftretenden Lewy-Körperchen Pathologie. Dennoch werden diese beiden Stadien bereits als eine frühe Form der PK angesehen. Interessanterweise treten in diesen frühen Stadien gehäuft

autonome Dysfunktionen auf, welche Schädigungen z.B. im vagalen Kernsystem entsprechen könnten. Die Stadien 3 und 4 zeigen die für die PK charakteristischen motorischen Symptome. Bei Stadium 3 ist eine Ausbreitung der Schädigung auf das Mittelhirn, insbesondere auf die Pars Compacta der Substantia Nigra, zu beobachten. Beim Stadium 4 sind des Weiteren prosencephale, temporal mesokortikale und allokortikale Schädigungen zu finden. Aufgrund einer beginnenden Schädigung des Neokortex sind die Stadien 5 und 6 häufig mit kognitiven Beeinträchtigungen wie Demenzen assoziiert. Hierbei treten im Stadium 5 Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten in sensorischen Assoziationsgebieten des Neocortex und des präfrontalen Neocortex auf. Beim Stadium 6 sind zudem primär sensorische Assoziationsgebiete des Neocortex und prämotorische Gebiete, sowie teilweise auch in weniger stark ausgeprägter Form primär sensorische und primär motorische Gebiete betroffen. Zusammenfassend beschreibt die Braak Hypothese eine vom Hirnstamm beginnende, sich in den Neocortex ausbreitende neuronale Degeneration mit Lewy-Körperchen Ablagerungen ohne starke interindividuelle Unterschiede. Hierbei kommt es nach einem initialen Krankheitsereignis in progressivem Verlauf zu einer sogenannten „Terminalphase“ ohne Möglichkeit einer Remission. Eine weitere Hypothese von Braak et al. deutet auf ein noch unbekanntes Pathogen im Verdauungstrakt, welches retrograd in den Hirnstamm gelangt und hier die initiale Schädigung hervorruft und sich progressiv ausbreitet (Braak et al., 2003). Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte jedoch kein entsprechendes Pathogen identifiziert werden, weshalb dieser Ansatz zur Entstehung der PK ausschließlich als Hypothese angesehen werden muss.

1.3 α-Synuclein

Die erste Synuclein Sequenz wurde im Zitterrochen Torpedo californica durch Maroteaux et al. beschrieben (Maroteaux et al., 1988). Synucleine sind kleine hoch lösliche Proteine, die primär in neuronalem Gewebe exprimiert werden. Im nativen Zustand sind Synucleine ungefaltete Proteine mit nur gering ausgeprägter Sekundärstruktur (el-Agnaf et al., 2002). Die Familie der Synucleine beinhaltet drei Proteine: α-, β- und γ-Synuclein (Lavedan et al., 1998). Die drei Isoformen sind zwischen 127 und 140 Aminosäuren lang und zu circa 60 % identisch. Die Lokalisation der Proteine innerhalb des Gehirns unterscheidet sich nur geringfügig

(Iwai et al., 1995). Alle Synucleine werden im gesamten Gehirn exprimiert. α-Synuclein wird besonders stark im Bulbus Olfactorius, im cerebralen Cortex, im Striatum und im Hippocampus exprimiert (Iwai et al., 1995). Des Weiteren wird α-Synuclein auch in anderen Zellarten wie Thrombozyten und Neuronen des Plexus Cardiacus exprimiert. β-Synucleine werden zusätzlich zum zentralen Nervensystem auch im peripheren Nervensystem und im Skelettmuskel exprimiert (Jakes et al., 1994). γ-Synuclein wird besonders stark im Hirnstamm exprimiert. Zusätzlich wird es im Pankreas, den Nieren, den Lungen und in peripheren Nerven exprimiert. Aufgrund seiner ubiquitären Expression im ZNS stellt α-Synuclein insgesamt circa 1% der löslichen Proteine im Gehirn dar (Iwai et al., 1995). α-Synuclein erhielt seinen Namen in seiner Erstbeschreibung aufgrund seiner Lokalisation in der Synapse (Syn-) und im Nukleus (-nuclein) (Maroteaux et al., 1988). Nachfolgende Studien konnten das Vorkommen von α-Synuclein im Kern jedoch nicht bestätigen und die nukleäre Lokalisation von α-Synuclein ist bis heute umstritten (Jakes et al., 1994; Masliah et al., 1996; Petersen et al., 1999). Bis vor kurzem wurde α-Synuclein als ausschließlich intrazelluläres Protein betrachtet, das vor allem im Zytosol und auch membrangebunden in Vesikelfraktionen präsynaptisch zu finden ist (Clayton et al., 1999; George et al., 1995). Das Konzept des ausschließlich intrazellulären Vorkommens von α-Synuclein wurde jedoch durch dessen Detektion in humanem Liquor cerebrospinalis und im Blutplasma angefochten (Borghi et al., 2000; El-Agnaf et al., 2006). Diese Erkenntnisse ebneten den Weg für Untersuchungen an extrazellulärem α-Synuclein sowohl in Zellkulturmodellen als auch in Tiermodellen.

1.3.1 Struktur von α-Synuclein

1.3.1.1 Aminoterminale Domäne

α-Synuclein besteht aus 140 Aminosäuren und kann grundsätzlich in drei Domänen eingeteilt werden (Abb. 5). Die aminoterminale Region enthält sechs unvollständige Sequenzwiederholungen, wobei es sich um Variationen des KTKEGV Motives handelt (Goedert, 2001). Diese Region ähnelt der lipidbindenden Domäne von Apolipoproteinen, wodurch sich die stattfindenden Interaktionen mit Zellmembranen erklären lassen. Hierbei wurde beobachtet, dass α-Synuclein von einer ungefalteten Struktur in eine α-helikale Konformation übergeht, wenn es mit sauren phospholipidhaltigen Vesikeln interagiert. Diese

Beobachtung wurde durch die Tatsache gestützt, dass die Interaktion von α-Synuclein mit Lipiden gestört wird, wenn das Einbringen von negativ geladenen Resten die Helixformation von α-Synuclein inhibiert (Davidson et al., 1998).

1.3.1.2 NAC Domäne

Die zentrale Domäne von α-Synuclein (Aminosäuren 66-95) ist als NAC Domäne (Non Amyloid Component) bekannt. Diese Domäne wurde bei der Isolierung und Analyse verschiedener Komponenten von Amyloid-Beta Plaques aus Gehirnen von Alzheimer Patienten entdeckt (Uéda et al., 1993). Heute geht man davon aus, dass es sich bei dieser Entdeckung um Lewy-Körperchen Kontaminationen in den Präparaten handelte, da α-Synuclein keine Hauptkomponente von senilen Plaques darstellt (Bayer et al., 1999). Im Laufe der Zeit wurde festgestellt, dass die NAC Domäne in Bezug auf das biochemische und biophysikalische Verhalten von α-Synuclein eine wichtige Rolle spielt. Die NAC Domäne ist äußerst hydrophob und wirkt somit hoch amyloidogen. Insbesondere die Aminosäuren 71-82 sind essentiell für die Aggregation des Proteins zu Fibrillen (Giasson et al., 2001). Diese zentrale Peptidregion hat die Fähigkeit selbständig Fibrillen und β-Faltblatt-Strukturen auszubilden. Erstaunlicherweise ähnelt diese hydrophobe Domäne hydrophober Sequenzen anderer amyloidogener Proteine (El-Agnaf et al., 1998a; Uversky et al., 2002). Abweichungen von dieser Sequenz in der NAC Domäne, wie sie bei β-Synuclein zu finden sind, setzen die Aggregationstendenz stark herab.

1.3.1.3 C-terminale Domäne

Die Aminosäuren 96-140 bilden den C-Terminus von α-Synuclein. Aufgrund einer Fülle an Glutamatresten und einer Vielzahl an sauren hydrophilen Aminosäuren ist dieser stark negativ geladen. Die C-terminale Region schirmt die zur Aggregation neigende NAC Domäne ab und wirkt so aggregationsinhibierend auf α-Synuclein. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass C-Terminal trunkierte α-Synucleine eine höhere Aggregationstendenz aufweisen (Crowther et al., 1998; McLean et al., 2002; Murray et al., 2003). Andererseits zeigen mehrere Arbeiten, dass die C-terminale Region zur metallinduzierten Aggregation von α-Synuclein beiträgt (Golts et al., 2002; Ostrerova-Golts et al., 2000; Paik et al., 1999, 2000). Dieser Aspekt ist im Hinblick auf die hohe Eisenkonzentration in der Substantia Nigra äußerst wichtig, da dieser Teil des zentralen Nervensystems am meisten

von PK induzierter neuronaler Degeneration betroffen ist (Götz et al., 2004; Smith et al., 2005; Zecca et al., 2002, 2003).

1.3.2 Physiologische Funktion von α-Synuclein

Die physiologische Funktion von α-Synuclein ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch wenig verstanden. Schon sehr früh konnte durch Untersuchungen an Zebrafinken gezeigt werden, dass α-Synuclein während der Lernphase von Balzliedern in deutlich erhöhtem Maße in bestimmten Neuronen Populationen präsynaptisch exprimiert wird. Dies legt eine entscheidende Rolle von α-Synuclein in der synaptischen Plastizität nahe (George et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass α-Synuclein die Menge an Dopamintransportern in der Plasmamembran regulieren kann. Die Expression von α-Synuclein hat sowohl die Eigenschaft den Transfer des Dopamintransporters in die Plasmamembran zu steigern, als auch zu vermindern (Wersinger et al., 2003a). Eine direkte Bindung der NAC Region von α-Synuclein an die C-terminale Region des Dopamintransporters wurde durch Ko-Immunoprezipitation nachgewiesen (Lee et al., 2001). α-Synuclein könnte durch seine Fähigkeit den Transfer des Dopamintransporters zur Membran zu kontrollieren als Regulator der Dopamintoxizität wirken, indem es die Menge des Dopamineinstromes beeinflusst. Durch die Steigerung des Transfers des Dopamintransporters in die Plasmamembran konnte die dopamininduzierte Apoptose beschleunigt werden (Lee et al., 2001). Zudem gibt es Hinweise, dass α-Synuclein die Dopaminbiosynthese durch Reduktion der Tyrosinhydroxylase Aktivität inhibiert (Perez et al., 2002). α-Synuclein ist ein potenter *in vitro* Inhibitor der Phospholipase D2 (Jenco et al., 1998). Phospholipase D2 katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylcholin in Phosphatidsäure und Cholin (Morris et al., 1997). Aufgrund der Fähigkeit von α-Synuclein, sich an saure Phospholipide zu binden, ist es möglich, dass es sich in Gebieten anreichert, die viel Phosphatidsäure enthalten. Durch diese Aktivität als Phospholipase D2 Inhibitor wird ein negatives Feedback durch Inhibition der Phosphatidsäureproduktion ausgelöst. α-Synuclein kann somit indirekt über Phosphatidsäuren Einfluss auf die Aktivierung von Kinasen, auf die Regulation von Guanosintriphosphat bindenden Proteinen und auf Vesikelformationen im Trans-Golgi-Netzwerk ausüben (Chuang et al., 1993; Khan et al., 1994). Überdies konnte eine Funktion als negativer Regulator von α-Synuclein in der Neurotransmission von Dopamin gezeigt werden

(Wersinger et al., 2003). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass α-Synuclein mit Hilfe seiner aminoterminalen Domäne mit Plasmamembranen und synaptischen Vesikeln interagieren kann (Davidson et al., 1998). Des Weiteren wurde in Synapsen des Hippocampus eine Störung und folgend auch eine Erschöpfung des Reservevesikelpools in der Präsynapse beobachtet. α-Synuclein könnte somit eine Rolle bei der Aufrechterhaltung dieses Vesikelpools spielen (Murphy et al., 2000). Weitere Einblicke in die physiologischen Eigenschaften von α-Synuclein konnten α-Synuclein Knock-Out-Modelle liefern (Abeliovich et al., 2000). Diese Mäuse zeigen auf bestimmte Reize eine vermehrte Ausschüttung von Dopamin an nigrostriatalen terminalen Endigungen. Des Weiteren kann eine Abschwächung der lokomotorischen Reaktion auf Amphetamine beobachtet werden. Insgesamt zeigen diese α-Synuclein Knock-Out Mäuse jedoch eine normale Gehirnanatomie und insgesamt nur milde neurologische Defizite. Dies könnte durch die Redundanz von α-Synuclein mit den strukturell sehr ähnlichen β- und γ-Synucleinen erklärt werden. Auch der kombinierte Knock-Out von α- und β-Synuclein zeigte keine signifikanten ultrastrukturelle Veränderungen. Erst der Triple-Knock-Out von α-, β- und γ-Synuclein zeigte Veränderungen der synaptischen Struktur und Transmission, eine altersabhängige neuronale Dysfunktion, sowie ein verkürztes Gesamtüberleben der Knock-Out Mäuse (Greten-Harrison et al., 2010). Neuere Hinweise deuten an, dass α-Synuclein eine Chaperonfunktion besitzen könnte. Begründet wurde diese Hypothese zunächst durch Sequenzhomologien zwischen α-Synuclein und verschiedenen Chaperonen (z.B. 14-3-3 Protein oder HSP 27). Des Weiteren ist α-Synuclein im nativen Zustand ungefaltet und kann mit einer großen Anzahl von Liganden und zellulären Proteinen interagieren (Ostrerova et al., 1999; Xu et al., 2002). Es wird vermutet, dass die saure C-terminale Domäne (Aminosäuren 125-140) für die Chaperon-ähnliche Aktivität verantwortlich ist (Souza et al., 2000). Ein unterstützendes Argument für eine Chaperonaktivität von α-Synuclein sind Studien mit Deletionen des Co-Chaperons Cystein-String Protein-α (CSP-α) (Chandra et al., 2005). CSP-α Knock-Out Mäuse zeigen eine sehr schnelle progressive Neurodegeneration, die durch eine signifikante Reduktion an SNARE Komplexen ausgelöst wird. SNARE Proteine vermitteln die Fusion von Vesikeln, spielen eine wichtige Rolle bei der Vesikelverwertung und bei der Aufrechterhaltung der synaptischen Integrität. Interessanterweise konnte

durch Überexpression von α-Synuclein der defekte Zusammenbau von SNARE Komplexen aufgehoben werden und somit auch die Neurodegeneration und der Tod der Mäuse verhindert werden. α-Synuclein konnte hierbei als Hilfschaperon fungieren und die Aufgaben von CSP-α teilweise übernehmen. Im Gegensatz dazu, konnte durch Elimination des endogenen α-Synuclein der Phänotyp der CSP-α Knock-Out Maus sogar noch verschlimmert werden. Dies zeigt eine äußerst wirksame *in vivo* Aktivität von α-Synuclein als Protektor von Synapsen und Neuronen gegenüber schädlichen Stimuli.

1.3.3 Pathophysiologische Rolle von α-Synuclein

1996 wurden erstmalig Mutationen im α-Synuclein Gen entdeckt, welche mit der PK assoziiert sind (Polymeropoulos et al., 1996). Kurze Zeit später, im Jahr 1997, wurde eine Mutation auf dem α-Synuclein Gen (A53T) entdeckt, welche für eine seltene familiäre Form der PK verantwortlich ist (Polymeropoulos et al., 1997). Somit war ein direkter Zusammenhang zwischen α-Synuclein und der Entstehung der PK ersichtlich. Es wurde gezeigt, dass die A53T Mutante eine starke Neigung zur Filamentbildung aufweist. Des Weiteren wurde 1997 α-Synuclein als Hauptkomponente von Lewy-Körperchen identifiziert (Spillantini et al., 1997). Später wurden zwei weitere Punktmutationen A30P (Krüger et al., 1998) und E46K (Zarranz et al., 2004) im α-Synuclein Gen entdeckt, welche eine autosomal dominante Form der Erkrankung verursachen. Ein weiterer wichtiger Schritt zum Verständnis der Entstehung der PK war die Entdeckung von chromosomalen Triplikationen (Singleton et al., 2003) und Duplikationen (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004) im α-Synuclein Gen bei familiären Parkinson Formen. Dabei wurde deutlich, dass Träger einer Triplikation früher an der PK erkranken als Träger einer Duplikation. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die Menge an α-Synuclein sowohl den Krankheitsbeginn als auch den Schweregrad der PK determinieren kann. Es handelt sich hier somit um einen Gen-Dosis-Effekt. Auch Polymorphismen der Promotorregion des α-Synuclein Gens, welche zu einer verstärkten Synthese des Proteins führen, erhöhen das Risiko eine PK zu entwickeln (Maraganore et al., 2006). Damit wird deutlich, dass es keine Mutationen im α-Synuclein Gen bedarf, um die PK auszulösen, sondern dass auch das wildtypische α-Synuclein die Erkrankung induzieren kann. In einer aktuellen Studie wurden die Auswirkungen einer Multiplikation des α-Synuclein Gens auf

den synaptischen Aufbau und die synaptische Neurotransmitterfreisetzung untersucht. Hierbei wurde im Tiermodell die Überexpression von α-Synuclein den Proteinlevels angepasst, wie sie bei familiären Trägern von Multiplikationen vorkommen (Nemani et al., 2010). Die Konzentrationen an α-Synuclein in den Neuronen sind hierbei noch im subtoxischen Bereich. Es konnten folgende Effekte durch die Überexpression von α-Synuclein gezeigt werden. Durch die erhöhten Konzentrationen von α-Synuclein kommt es zur Inhibition der Exozytose von Vesikeln an synaptischen Membranen und dadurch zu einer Reduktion der Transmission von Neurotransmittern innerhalb der Synapsen. Dies betrifft sowohl die zur Exozytose bereiten Vesikeln unmittelbar an der präsynaptischen Membran, als auch die Vesikel des sogenannten Reservepools. Die Reduktion der Transmitterfreisetzung ist linear zur Konzentration von α-Synuclein und zeigt somit einen Dosiseffekt. Des Weiteren kommt es durch die Überexpression zu einer Veränderung der biochemischen Zusammensetzung der Präsynapse. Hier beobachtet man eine deutliche Reduktion von Synapsinen und Komplexinen, was sich durch Abnahme von Vesikelgruppen in der aktiven Zone der Synapse im Elektronenmikroskop ultrastrukturell bemerkbar macht (Nemani et al., 2010). α-Synuclein spielt nicht nur in der PK eine wichtige Rolle, es gibt eine ganze Reihe an neurodegenerativen Erkrankungen, die Ablagerungen bzw. Aggregate von α-Synuclein in Form von Lewy-Körperchen enthalten. Diese werden als Synucleinopathien bezeichnet. Zu ihnen zählen die idiopathische Parkinson Krankheit, Demenz mit Lewy Körperchen (DLB), Multisystematrophie (MSA) und Neurodegeneration mit Eisenablagerung Typ I. Die Parkinson Erkrankung ist die mit Abstand häufigste Synucleinopathie. In Lewy Körperchen liegt α-Synuclein im Gegensatz zu seiner physiologisch löslichen Form in fibrillärer Form vor. Der Vorgang der Fibrillenbildung wird folgendermaßen angenommen. Die Aggregation vom Monomer bis zur Fibrille verläuft schrittweise über verschiedene Stadien. Durch Dimerisierung von partiell gefalteten Monomeren bilden sich verschiedene Formen von Oligomeren, welche weiter zu Protofibrillen polymerisieren. Die Oligomere können weiter zu unlöslichen Fibrillen aggregieren oder auf dem Oligomer-Stadium verbleiben bzw. als amorphe Aggregate enden (Caughey et al., 2003; Hoyer et al., 2002; Munishkina et al., 2003). Durch die Oligomerbildung kommt es zu einer deutlichen Konformationsänderung von einer ungefalteten

Struktur zu einer ß-Faltblatt Konformation. α-Synuclein zeigt also in aggregierter Form Eigenschaften von Amyloid Fasern.

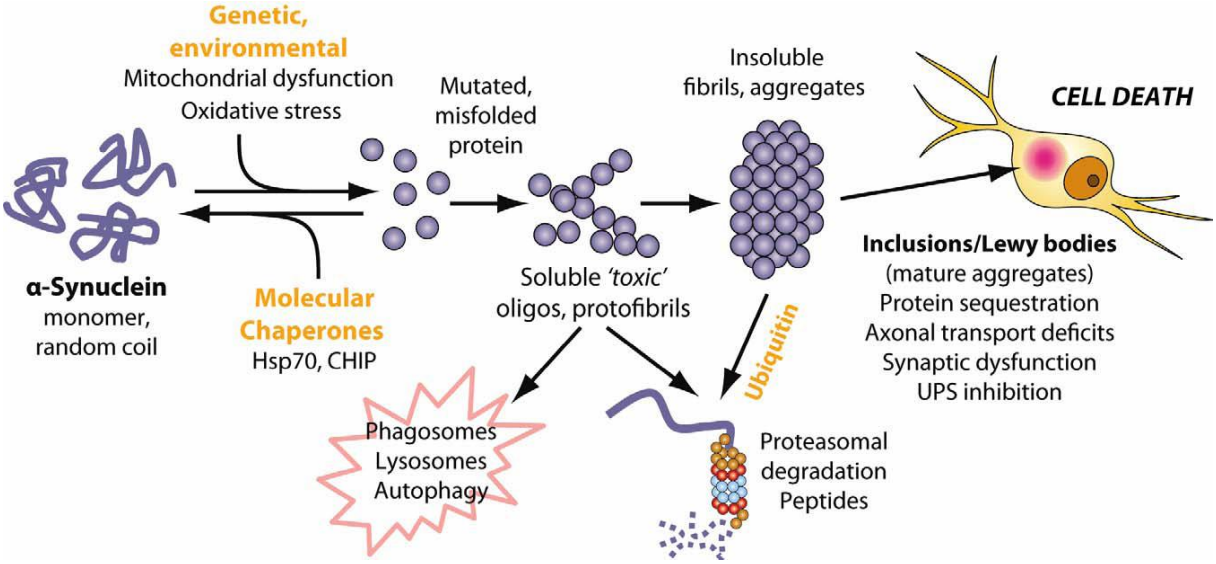


Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher pathophysiologischer Vorgänge bei der Oligomerisierung von α-Synuclein (Forman et al., 2005)

In der β-Faltblatt Konformation kann es mit verschiedenen anderen Proteine interagieren wie z.B. Synphilin-1 und 14-3-3. β- und γ-Synuclein können im Gegensatz zu α-Synuclein nicht zur Bildung von Filamenten gebracht werden. Dies stimmt mit ihrem Fehlen in Lewy Körperchen überein. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass die Aggregation mit einem aggregierten Zentrum beginnt. Dieses Zentrum wirkt als Aggregationskeim an dem sich Monomere anlagern können. Hierbei kommt es zu einer deutlichen Beschleunigung der Aggregation (Conway et al., 2000; Wood et al., 1999). Die mutanten familiären Formen von α-Synuclein A53T, A30P und E46K zeigen eine erhöhte Aggregationstendenz im Vergleich zum wildtypischen α-Synuclein. A53T und E46K Mutationen fördern anscheinend die Ausbildung von Fibrillen, wohingegen die A30P Mutation zu einer Akkumulation von Oligomeren führt (Conway et al., 1998, 2000; Giasson et al., 2002; Greenbaum et al., 2005; Li et al., 2001; Narhi et al., 1999; Pandey et al., 2006; Wood et al., 1999).

1.3.4 α-Synuclein Oligomere und Fibrillen

Bei der Entstehung der PK scheint die Aggregation von α-Synuclein eine zentrale Rolle zu spielen. Sowohl wildtypische, als auch mutierte Aggregate von α-

Synuclein können den apoptotischen Zelltod auslösen (El-Agnaf et al., 1998b). Insgesamt jedoch sind viele Details des Pathomechanismus von α-Synuclein Aggregaten ungeklärt. So wurden zunächst fibrilläre Formen von α-Synuclein in Lewy Körperchen als toxisch angesehen. Präfibrilliäre oligomere Formen wurden zunächst wenig beachtet und untersucht. Neuere Erkenntnisse schreiben aber gerade diesen oligomeren α-Synuclein Formen und α-Synuclein Protofibrillen (Conway et al., 2000; Goldberg et al., 2000; Masliah et al., 2000) toxische Eigenschaften zu. Ein wichtiger Beleg dafür ist, dass eine Überexpression von α-Synuclein in Zellkultursystemen zu Apoptose und Schädigung von Zellorganellen ohne Ausbildung von Fibrillen führt (Gosavi et al., 2002). Zum anderen zeigt eine Co-Expression von HSP70 und α-Synuclein im Gegensatz zur alleinigen α-Synuclein Expression einen verminderten Zelltod, jedoch ohne die Anzahl an Einschlusskörperchen zu verändern (Auluck et al., 2002). Lewy-Körperchen mit α-Synuclein Aggregaten werden vor allem in Neuronen bei einer postmortalen Autopsie von Parkinson Patienten gefunden (Park et al., 2003). Deshalb können Lewy-Körperchen auch als neuroprotektiv angesehen werden. Vor kurzem wurde eine Substanz gefunden, die die Bildung von Einschlusskörperchen in einem Zellkulturmodell der Huntington Krankheit und der Parkinson Krankheit fördert (Bodner et al., 2006). Interessanterweise erniedrigt diese Substanz die toxischen Auswirkungen von Huntingtin und α-Synuclein, während es zu einer Zunahme der Größe und der Anzahl von Einschlusskörperchen kommt. Es ist also möglich, dass bestimmte Substanzen das Äquilibrium von toxischen α-Synuclein Oligomerspezies zu weniger toxischen fibrillären Spezies verlagern.

1.3.5 Extrazelluläres α-Synuclein

Obwohl sich der Hauptfokus der α-Synuclein Forschung bislang auf intrazelluläre Aggregation und Toxizität von α-Synuclein beschränkt hatte, gab es früh Hinweise auf das Vorkommen von α-Synuclein im Extrazellularraum. Sowohl monomeres als auch oligomeres α-Synuclein wurde in humaner Gehirnrückenmarksflüssigkeit und Blutplasma bei an der PK Erkrankten sowie auch an Kontrollpatienten nachgewiesen (Borghi et al., 2000; El-Agnaf et al., 2006; Tokuda et al., 2006). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der α-Synuclein Menge oder Unterschiede in den α-Synuclein Spezies festgestellt werden. Erst durch das Auftreten von Lewy-Körperchen in transplantierten Stammzellen richtete sich das

Augenmerk auf extrazelluläres α-Synuclein. In diesem therapeutischen Ansatz wurden mesenzephale Stammzellen stereotaktisch in das Mittelhirn von PK Patienten transplantiert (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Diese Stammzellen differenzierten sich erfolgreich zu dopaminergen Neuronen, wodurch sich die motorischen Symptome der Patienten signifikant besserten. Durch postmortale histologische Analysen konnte gezeigt werden, dass die gesunden transplantierten Zellen α-Synuclein positive Einschlüsse aufweisen. Diese Einschlüsse ähnelten sehr stark den für die PK charakteristischen Lewy-Körperchen. Hiermit konnte zum ersten Mal eine Ausbreitung der Lewy-Körperchen-Pathologie von krankem auf gesundes Gewebe nachgewiesen werden. Der Mechanismus und die Ursache der Ausbreitung der Lewy-Körperchen bleibt in dieser Studie aber nach wie vor ungeklärt (Li et al., 2008). Es wurde ein nukleationsabhängiger Aggregationsmechanismus von α-Synuclein propagiert, wobei der Aggregationskeim als Vorlage für die Umfaltung anderer Monomere dient. Des Weiteren konnten verschiedene in vitro Studien zeigen, dass exogen applizierte α-Synuclein Oligomere zum einen die Bildung von Lewy-Körperchen ähnlichen Einschlüssen induzieren (Danzer et al., 2009) und zum anderen Oligomerarten den Zelltod hervorrufen können (Danzer et al., 2007). Die Theorie der Ausbreitung von Lewy-Körperchen von krankem auf gesundes Gewebe konnte durch ein Tiermodell weiter untermauert werden. In diesem wurde demonstriert, dass sich α-Synuclein sowohl *in vitro* von neuronalen Zellen, welche α-Synuclein überexprimieren, zu ko-kultivierten Nachbarzellen als auch *in vivo* zu transplantierten embryonalen Stammzellen in α-Synuclein transgenen Mäusen ausbreiten kann (Desplats et al., 2009).

1.4 Fragestellung

Obwohl es immer mehr Hinweise darauf gibt, dass α-Synuclein auch im Extrazellularraum eine wichtige Rolle und eventuell auch eine wichtige pathophysiologische Rolle spielen könnte, wird es bislang unzulänglich verstanden, welche α-Synuclein Formen sich im Extrazellularraum befinden. Das Hauptziel dieser Arbeit ist es daher, die Bedeutung von sekretiertem α-Synuclein

in der Zellkultur zu untersuchen. Dabei soll charakterisiert werden, welche α-Synuclein Formen sich im extrazellulären Milieu befinden und welche Einflüsse diese auf andere Zellen haben könnten. Darüber hinaus gibt es bislang keine Hinweise wie sich die progressive neuronale Degeneration in der PK ausbreiten könnte. Daher sollte anhand eines mikrofluiden Kammersystems untersucht werden, ob α-Synuclein von Neuronen zu Neuronen, von Gliazellen zu Gliazellen und oder von Neuronen zu Gliazellen und umgekehrt transmittiert werden könnte.

2 Material und Methoden

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration von α-Synuclein wurde mittels eines für α-Synuclein spezifischen ELISA bestimmt. Hierbei wurde nach den Richtlinien des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vorgegangen. Ein monoklonaler Antikörper, welcher spezifisch α-Synuclein bindet, wurde auf die Welloberfläche angebracht (Capture-Antikörper). α-Synuclein in der Probe bindet gleichzeitig am immobilisierten Capture-Antikörper und an einem für α-Synuclein spezifischen polyklonalen Detektionsantikörper, welcher sich in einer Flüssigphase befindet. Nach den Waschschritten wurde ein Meerrettich-Peroxidase markierter anti-Hase IgG Antikörper (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hinzugefügt. Dieser bindet an den Detektionsantikörper. Nach den Inkubations- und Waschschritten wurde die Substratlösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Absorption bei 450nm ausgelesen. Die Absorption ist direkt proportional zur α-Synuclein Konzentration in der Probe. Die α-Synuclein Konzentration wurde mit Hilfe von Graph Pad Prism Fitting Software (4 Parameter Algorithmus) bestimmt, indem die Absorptionen der Proben mit Standard Absorptionen korreliert wurden.

WesternBlot Analyse

Die Proteinproben wurden auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2µm (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durch einen feuchten Elektrotransfer übertragen. Das Transfermodul (XCellTM II Blot Module, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde laut Herstellerangaben betrieben (300mA, 100 min, 4C°). Nach dem Transfer wurde die Membran unter kontinuierlichem Schütteln für 1h in einer Blockierlösung bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Die Primärantikörperreaktion wurde bei 3°C für ca. 12h über Nacht durchgeführt. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet: anti-Syn-1 (1:1000) (BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA). Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T (Tris-Buffered Saline mit 0,01% Tween 20) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für jeweils 10min wurde die Sekundärantikörper Reaktion für 1h unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde ein in Ziegen hergestellter anti-Maus Antikörper verwendet (1:1000) (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Nach viermaligem Waschen der

Membran mit TBS-T für jeweils 10min wurde die Membran mit Hilfe des Li-COR IR Imaging Systems (LI-COR, Lincoln, NE, USA) eingelesen.

DotBlot Analyse

Das konditionierte Medium wurde, wie oben beschrieben, gewonnen. 700µl jeder Probe wurde auf eine Nitrocellulose Membran mit einer Porengröße von 0,22µm (Whatman Protran, Sanford, ME, USA) aufgetragen und im Dotblot Modul (Schleicher & Schuell Minifold-I Dot-Blot System, Whatman, Sandord, ME, USA) platziert. Die Proben wurden mit Hilfe eines schwachen Vakuums durch die Membran filtriert. Anschließend wurde die Membran in 10% fettfreier Trockenmilch in TBS-T für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit TBS-T, wurde die Membran mit dem anti-Oligomer Antikörper A11 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) oder dem Syn-1 Antikörper (BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA) über Nacht bei 4°C und unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membranen wurden dann dreimal für 5min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten anti-Hase IgG oder anti-Maus IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, Baltimore, PA, USA) in 5% fettfreier Trockenmilch in TBS-T für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membranen wurden erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und mit dem Pierce ECL Chemiluminescence Kit entwickelt (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Mikrokanalkammern

Die Mikrokanalkammern sind nach Taylor et al. veröffentlichten Grundlage konstruiert (Taylor et al., 2005). Sie wurden am BioMEMS Resource Center des Massachusetts General Hospital hergestellt. Die Kammern bestehen aus 2 Hauptkammern, welche durch 1000µm lange, 3µm hohe und 8µm breite Mikrokanäle verbunden sind. Die Mikrokanalkammern wurden auf ein poly-D-Lysin behandeltes Deckglas (MatTek Cultureware, Ashland, MA, USA) angebracht, welches eine adhärente Zellkultur ermöglicht. Diese Konstruktion ermöglicht das Wachstum von Axonen durch die Mikrokanäle, wobei aufgrund der Ausmaße nur Axone und keine Zellkörper durch die Mikrokanäle wachsen können. Die so hergestellten Mikrokanalkammern wurden mit primären kortikalen Mäuseneuronen in einer ungefähren Dichte von $1x10^5$ Zellen kultiviert, welche aus 14 Tage alten

Mäuseembryonen isoliert wurden. Die Neurone wurden am 7. Tag in Kultur folgendermaßen mit Adeno-assoziierten Viren (AAV) Serotyp 2/8 infiziert:

rAAV2/8 mit Expression von GFP, rAAV2/8 mit Expression von Syn-IRES-GFP, rAAV2/8 mit Expression von V1S oder SV2. Pro Mikrokanalkammer wurden jeweils 0,3ul rAAV2/8 GFP (1,3E13gc/ml), 0,3ul rAAV2/8 Syn-IRES-GFP (1,1E13gc/ml), 0,3ul rAAV2/8 V1S (8,3E12gc/ml) und 0,3ul rAAV2/8 SV2 (8,7E12gc/ml) appliziert.

Die Neuronen wurden 3 Tage nach der Infektion mit den jeweiligen Viren mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss, Jena, TH, Deutschland) mit Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Jena, Deutschland) konfokalem Scankopf mit 488nm Laser in einer 37°C, 5% CO_2 Umgebungskammer untersucht. Alle Bilder wurden mit Hilfe einer 20x Plan Apochromat Linse (Zeiss, Jena, TH, Deutschland), 25x APO-Plan NEOFLU Linse (Zeiss, Jena, TH, Deutschland) oder 63x 1.2 APO-Plan NEOFLU water immersion Linse (Zeiss, Jena, TH, Deutschland) aufgenommen. Das konditionierte Medium der infizierten Neuronen wurde sowohl von der somalen als auch von der axonalen Seite gesammelt und mit Hilfe eines α-Synuclein spezifischen ELISA wurde die Menge an α-Synuclein quantifiziert.

Plasmid Herstellung

Die Fusionskonstrukte α-Synuclein-hGLuc (S1), α-Synuclein-hGLuc2 (S2) , Venus1-α-Synuclein (V1S), α-Synuclein-Venus2 (SV2) wurden durch Subklonierung von α-Synuclein in Not1/Cla1 Restriktionsstellen von humanisierter Gaussia Luciferase und Venus YFP Konstrukten, die von Dr. Stephen Michnick (University of Montreal) bereitgestellt wurden, hergestellt. pAAV-CBA-Synuclein-Luc1-WPRE (S1) und pAAV-CBA-Synuclein-Luc2-WPRE (S2) wurden wie folgt konstruiert. Syn-hGLuc1 (S1) und syn-hGLuc2 (S2) wurden in Not1/Nhe1 Restriktionsstellen des AAV-CBA-WPRE Vektors subkloniert. rAAV-CBA-Venus1-Synuclein-WPRE (V1S) und pAAV-CBA-Synuclein-Venus2-WPRE (SV2) wurden wie folgt konstruiert: das Fragment Venus1-Synuclein und Synuclein-Venus2 wurde in EcoRV und NheI Stellen des pAAV-CBA-WPRE Vektors inseriert. Rekombinantes Virus vom Typ AAV Serotyp 8 wurde durch dreifache Transfektion (AAV-rep/cap exprimierendes Plasmid, Adenovirus Miniplasmid und AAV Vektor Plasmid) von 293A Zellen hergestellt und durch einen Iodixanol Gradient gefolgt

von einer Q Sepharose Säulenchromatographie aufgereinigt (Harvard Gentherapie Initiative, Harvard Medical School). Das aufgereinigte Virus wurde gegen phosphatgepufferte Salzlösung dialysiert, mit einer Amicon Säule(Millipore, Billerica, MA, USA) aufkonzentriert und durch DotBlot Hybridisierung titriert. Die finalen Titer betrugen für S1 (1.5E13gc/ml), für S2 (1.3E13gc/ml), für V1S (8.3E12 gc/ml) und für SV2 (8.7E12gc/ml).

Zellkultur und Transfektionen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die humane H4 Neurogliom Zellen (HTB-148-ATCC, Manassas, VA, USA) in OPTI-MEM Medium mit 10% fetalem Kälberserum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kultiviert und bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 80-90% zum Zeitpunkt der Transfektion kultiviert. Die Transfektion wurde mit Superfect (Qiagen, Chatswort, CA, USA) nach der Anleitung des Herstellers mit äquimolaren Mengen an Plasmiden durchgeführt. Bei Experimenten mit konditioniertem Medium, wurde das Medium für 48 Stunden nach der Transfektion gesammelt und für 5min bei 3000 x g zentrifugiert, um nicht adhärente Zellen zu eliminieren.

Primäre kortikale Neuronen Kultur

Primäre kortikale Neuronen wurden aus zerebralen Kortices aus E14-16 Mausembryonen präpariert. Die Kortices wurden vom Embryogehirn freigelegt und die Meningen entfernt. Die Kortices wurden mit Trypsin für 5min RT aufgeschlossen und in Neurobasal (NB) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Medium mit 10% fetalem Kälberserum (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2mM Glutamax (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100U/ml Penicillin (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und 100 µg/mg Streptomycin (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) resuspendiert und bei 100g für 10min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Neurobasalmedium mit dem Zusatz B27 (2%) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) , 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 2mM/l Glutamin resuspendiert und folgendermaßen ausplattiert: 96w Platten (Costar, Corning, NY, USA) oder 6 Well Platten (Costar, Corning, NY, USA) wurden mit einer Dichte von 1.25×10^5 Zellen/cm^2 ausplattiert. Die Mikrokanalkammern (siehe unten), welche mit 20 µg/ml poly-D-Lysin (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA) beschichtet wurden, erhielten 2,5 x 10^5 Zellen/cm^2. Die Zellen wurden bei 37°C in 5% CO_2 in einem befeuchteten Inkubator aufbewahrt. Jeden dritten Tag fand ein Mediumwechsel statt. Die Neuronen wurden 6-7 Tage in Kultur gehalten und am Tag 4 transient mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach Vorgaben des Herstellers transfiziert, wobei 5 µg Plasmid DNA verwendet wurde.

Gaussia Luciferase Proteinfragmentkomplementierungsansatz

Die Fusionskonstrukte Syn-hGluc1 (S1) und Syn-hGluc2 (S2) wurden wie oben beschrieben, erzeugt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Kulturmedium in eine neue 96 Well Platte (Costar, Corning, NY, USA) transferiert. Die Zellen wurden mit einer phosphatgepufferten Salzlösung gewaschen und es wurde serum- und phenolfreies Medium zu den Zellen hinzugefügt. Die Luciferaseaktivität, die durch die Proteinkomplementierung zustande kommt, wurde in konditioniertem Medium und in lebenden Zellen gemessen. Die Messung erfolgte mit einem automatischen Plattenleser (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) bei 480nm, nachdem eine Injektion des zellpermeablen Substrates Coelenterazine (20mM) (Prolume Ltd, Pinetop, AZ, USA) mit einer Signalintegrationszeit von 2 Sekunden erfolgte.

β-Galactosidase Enzymversuch

48 Stunden nach der Transfektion wurden die H4 Zellen mit magnesium- und kalziumfreien PBS (Phosphate-Buffered Saline) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines passiven Lysepuffers (Promega, Madison, WI, USA) aufgespalten. Ein Volumenteil des zweifach konzentrierten β-Galaktosidase Puffers (Promega, Madison, WI, USA) wurde zu den lysierten Zellen oder zu konditioniertem Medium hinzugefügt und für 30min bei 37°C inkubiert, bis sich eine Gelbfärbung entwickelte. Die Absorption wurde bei 420nm gemessen.

Trennung von monomerem und oligomerem α-Synuclein mittels Gelfiltrationschromatographie

500µl konditioniertes Medium von mit S1/S2 ko-transfizierten H4 Zellen wurde in eine Superose-6 10/300 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Pisctaway, NJ, USA)

injiziert. Die Proben wurden in 1 X PBS mit einer Flussrate von 0,5ml/min von der Superose-6 Säule eluiert. Das Eluat wurde bei 215nm-280nm detektiert und in eine 96 Well Platte mit einem Fraktionsvolumen von 200µl fraktioniert. Nach der Gelfiltrationschromatographie wurden 100µl von jeder Fraktion mit Hilfe des Gaussia Luciferase Proteinkomplementierungsversuch auf Luciferase-Aktivität untersucht.

Ex-vivo Aggregation von α-Synuclein

48 Stunden nach der Transfektion wurde konditioniertes Medium von S1 transfizierten H4 Zellen und von S2 transfizierten H4 Zellen gesammelt. S1 und S2 konditioniertes Medium wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf einem Horizontalschüttler (Model 55, Reliable Scientific, NC, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde konditioniertes Medium von S1/S2 ko-transfizierten Zellen gesammelt und auf demselben Horizontalschüttler inkubiert. Alliquots wurden zu bestimmten Zeiten vom Schüttler entfernt und die Luciferase-Aktivität bestimmt.

Proteinauftrennung durch SDS-PAGE

Die Proteinproben wurden mit einem reduzierenden Agens (Invitrogen, Carlsbad, CA USA) und mit einem LDS Probenpuffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) inkubiert und bei 70°C für 10min denaturiert. Die Proben wurden dann auf ein vorgefertigtes 4-12% Bis-Tris gradienten Gel (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) aufgetragen und mit einem MOPS Laufpuffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bei 200V in einer XCell Sure LockTm MiniCells Kammer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) aufgetrennt. Als molekularer Gewichtsmarker wurde SeeBluePlus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

Apo-ONE Caspase-3/7 Versuch

Um zu untersuchen ob die konditionierten Medien einen toxischen Effekt zeigen wurde konditioniertes Medium von mit S1/S2, mit wildtypischem α-Synuclein und mit Mock transfizierten H4 Zellen wie oben beschrieben gesammelt. Diese Medien wurden auf naive H4 Zellen gegeben, welche 24h zuvor in einer 96 Well Platte ausgesät wurden. Die ursprünglichen Medien der naiven H4 Zellen wurden

komplett durch konditionierte Medien mit den oben beschriebenen unterschiedlichen Transfektionsbedingungen ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurde der Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Immunoabsorption von α-Synuclein aus konditionierten Medien

Die Kulturmedien von mit V1S/SV2 infizierten primären Neuronen, mit wildtypischem α-Synuclein und mit Mock transfizierten humanen H4 Zellen wurden 48h nach der Transfektion gesammelt. Die Medien wurden bei 3000 x g für 5min zentrifugiert, um nicht adhärente Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die verschiedenen Überstände wurden für 1h mit 50µl Protein G Sepharose (Sigma, St. Louis, MO, USA) bei 4°C und unter leichtem Schütteln vorbehandelt und anschließend für 10min bei 4°C mit 15000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 5µg Syn-1 Antikörper (BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA) bei 4°C über Nacht. Danach schloss sich nach der Zugabe von 100µl Protein G Sepharose eine erneute Inkubation über Nacht bei 4°C an. Nach Entfernung der Sepharose Partikel durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 15000 x g konnte der Überstand für die Versuche verwendet werden.

Fluoreszenzmarkierung von α-Synuclein

Die Markierung des Proteins mit dem aminoreaktiven Farbstoff Alexa Fluor-488-O-succinimidylester (Alexa 488, Invitrogen, Eugene, OR, USA) wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die ungebundenen Fluorophore wurden durch mehrere Filtrationsschritte mit PD10 Säulen (Sephadex G25, GE Healthcare, Pisctaway, NJ, USA). , welche zuvor mit 50mM Sodiumphosphat, pH 7,0 äquilibriert wurden, getrennt. Als Qualitätskontrolle dienten eine Massenspektrometrie und eine Fluoreszenzkorrelationsspektrometrie (Evotec Technologies, Hamburg, Germany). Der Markierungsquotient betrug ungefähr zwei Moleküle Farbstoff auf ein Molekül α-Synuclein. Um präformierte Aggregate zu eliminieren wurde erneut eine Gelfiltration durchgeführt (Sephadex 200, GE Healthcare, Pisctaway, NJ, USA).

Typ C Oligomere (Danzer et al., 2007)

Das mit Alexa 488 markierte lyophylisierte α-Synuclein Proteinpulver wurde in einem 50mM Sodiumphosphat Puffer mit 20% Ethanol bei einem pH von 7,0 mit einer finalen Konzentration von 7µM gelöst. Des Weiteren wurden 10µM $FeCl_3$. Es folgte eine Inkubation über Nacht unter kontinuierlichem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gemisch durch Ultrazentrifugation (VivaSpin 500 Säulen, Sartorius Stedim, Landsdale, PA, USA) konzentriert und die Oligomere durch einen 30 kDa MWCO (Molecular Weight Cut Off) Filter von den Monomeren getrennt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Graphpad Prism Software für Windows durchgeführt (Version 5, GraphPad Software Incorporation, La Jolla, CA, USA). Die erhobenen Daten wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Hierbei folgten alle analysierten Datensätze einer Normverteilung. Beim Vergleich zweier Datensätze wurde ein ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur verwendet. Beim Vergleich mehrerer Datensätze wurde eine einfaktorielle ANOVA Analyse mit Post-Hoc Bonferroni-Adjustierung durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha \leq 0{,}05$ festgelegt. In den Abbildungen sind die Standardabweichungen dargestellt. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit Sternen gekennzeichnet. Die Anzahl der Sterne spiegelt die unterschiedlichen P-Werte wider.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Oligomerisierung von α-Synuclein mit Hilfe des Luciferase Versuches

Um die Sekretion von α-Synuclein in den Extrazellularraum genauer zu charakterisieren, wurde ein Proteinfragmentkomplementierungsansatz unter Verwendung von humaner Gaussia-Princeps-Luciferase angewandt (Outeiro et al., 2008). Gaussia-Princeps-Luciferase ist ein monomeres Protein von 185 Aminosäuren, 19,9 Kilodalton (kDa), welches keine Ko-Faktoren benötigt, um aktiv zu sein. Es handelt sich um das hellste und kleinste aller verfügbaren Luciferase Enzyme, welches die Oxidation von Coelenterate-Luciferin (Coelenterazin) katalysiert, wobei blaues Licht um 480nm emittiert wird (Remy et al., 2006). Durch exogene Zugabe penetriert Coelenterazin und diffundiert in alle zellulären Kompartimente. Dadurch wird eine Luciferasequantifikation in lebenden Zellen möglich. In unserem Versuchsansatz wurden nicht-bioluminiszierende N- bzw. C-terminale Fragmente von humanisierter Gaussia-Princeps-Luciferase an je ein α-Synuclein Molekül fusioniert und als S1 bzw. S2 benannt (Abb. 3a). Bei einer Oligomerisierung von α-Synuclein Monomeren kommt es zur Rekonstitution der Luciferase-Fragmente und die Luciferaseaktivität wird messbar. Nur durch Interaktionen von α-Synuclein ist die Luciferase-Rekonstitution möglich, wobei das Luciferase-Signal so semiquantitativ die Oligomerisierung von α-Synuclein widerspiegelt. Humane Neurogliomzellen H4 wurden mit S1 und S2 ko-transfiziert.

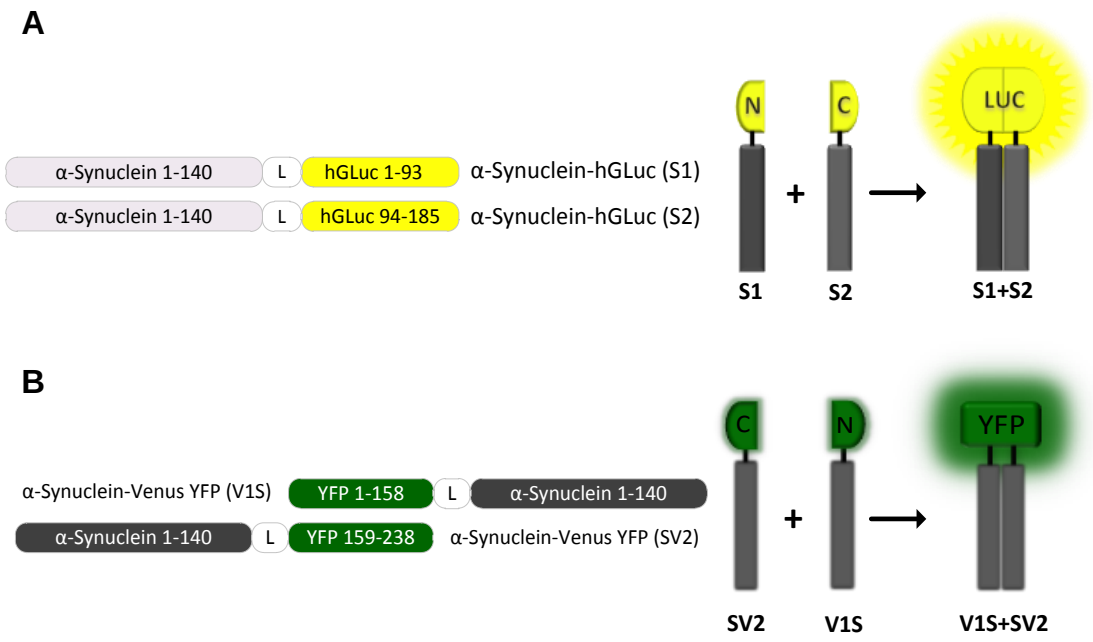


Abbildung 3: Schematische Darstellung der α-Synuclein Fragment-Komplementierungskonstrukte (Danzer et al., 2011). (A) Das 140 Aminosäuren lange humane α-Synuclein Protein wurde mit Hilfe eines Linkers (L) mit nichtlumineszenten Proteinfragmenten der humanen Gaussia-Princeps-Luciferase bestehend aus den Aminosäuren 1-93 bei S1 bzw. aus den Aminosäuren 94-185 bei S2 fusioniert. B) In einem anderen Fragment-Komplementierungskonstrukt wurde das humane 140 Aminosäuren lange α-Synuclein Protein mit Hilfe eines Linkers (L) mit Proteinfragmenten des Yellow-Fluorescent-Protein (YFP) des Typs Venus, bestehend aus den Aminosäuren 1-158 bei V1S bzw. aus den Aminosäuren 159-239 bei SV2, fusioniert. hGLuc: humane Gaussia-Luciferase; LUC: rekonstituierte Luciferase; N: N-terminales Fragment der humanen Gaussia-Luciferase; C: C-terminales Fragment der humanen Gaussia-Luciferase; S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); YFP: Yellow-Fluorescent-Protein; N: N-terminales Fragment des Yellow-Fluorescent-Protein; C: C-terminales Fragment des Yellow-Fluorescent-Protein; V1S: α-Synuclein-Venus-YFP (1-158); SV2: α-Synuclein-Venus-YFP (159-238); L: Linker.

Als Kontrolle diente ein unspezifisches Mock Plasmid. Nach einer Expressionsdauer von 48h wurden sowohl Zellen als auch konditioniertes Medium geerntet und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Intrazellulär wurde ein Anstieg der Luciferase-Aktivität bis um das 6-fache der Kontrolle beobachtet. Interessanterweise konnte im konditionierten Medium eine bis um das 26-fache erhöhte Aktivität gegenüber dem Kontrollmedium gemessen werden (Abb. 4a). Dadurch wird deutlich, dass oligomere α-Synuclein Spezies in großer Menge von H4 Zellen freigesetzt wurden. Um eine unspezifische Freisetzung durch Zelltod und/oder Störungen in der Integrität von Zellmembranen auszuschließen, wurden H4 Zellen mit S1/S2 und einem β-Galactosidase-Plasmid ko-transfiziert und für

48h exprimiert (Abb. 4b). Hierbei konnte keine signifikante β-Galactosidase Aktivität im konditionierten Medium gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass die starke Luciferase-Aktivität im Medium nicht auf eine unspezifische Freisetzung von α-Synuclein Oligomeren zurückzuführen ist und ein aktiver Sekretionsprozess wahrscheinlich ist.

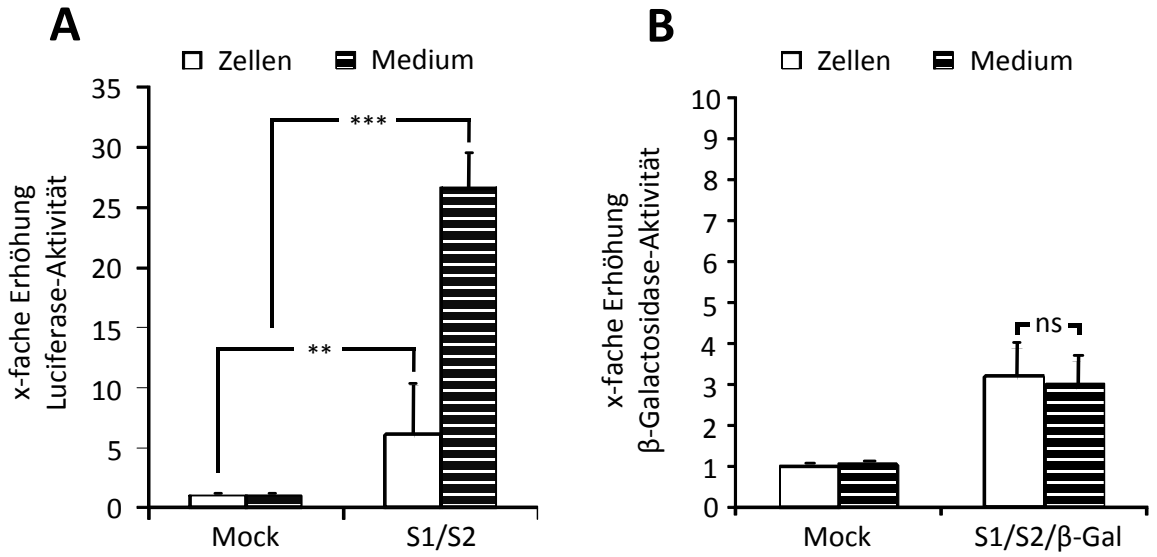


Abbildung 4: Freisetzung von α-Synuclein Oligomeren in den Extrazellularraum.
A) Die α-Synuclein Mengen in Medien und Zellkörpern wurden 48 Stunden nach Transfektion von Glia-ähnlichen H4 Zellen mit S1/S2 bzw. mit Mock Plasmiden mit Hilfe des Luciferasesystems semiquantitativ bestimmt. Es zeigen sich sowohl in den Zellkörpern als auch in den Medien des S1/S2 Ansatzes signifikant erhöhte Mengen von α-Synuclein (n=4). B) Messung der β-Galactosidase-Aktivitäten in Medien und Zellkörpern von mit S1/S2/β-Gal bzw. mit Mock Plasmiden transfizierten H4 Neurogliomzellen. Es zeigen sich keine signifikant unterschiedlichen β-Galactosidase-Aktivitäten zwischen Medien und Zellkörpern. ** bedeutet P<0,01; *** bedeutet P<0,001; ns bedeutet P=0,78; Fehlerindikatoren repräsentieren +/- 1 Standardabweichung S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); β-Gal: β-Galactosidase; Mock: Kontrollplasmid.

Ausschluss unspezifischer Komplementierung

Der nächste Versuch sollte eine unspezifische Komplementierung der Luciferasehälften oder eine durch die Luciferase-Fragmente induzierte Oligomerisierung von α-Synuclein ausschließen. Zu diesem Zweck wurden Aβ-luc1 und das Aβ-luc2 Konstrukt verwendet. Hierbei handelt es sich um das Beta-Amyloid-Peptid (Aβ), welches mit dem N-terminalen Fragment der hGLuc (Aβ-luc1) bzw. mit dem C-terminalen Fragment der hGLuc (Aβ-luc2) fusioniert wurde. Anschließend wurden konditionierte Medien von mit S1, S2, Aβ-luc1 und Aβ-luc2

transfizierten Zellen hergestellt. Diese Medien wurden in verschiedenen Kombinationen für 3 Tage miteinander inkubiert (Abb. 5). Während bei der Inkubation der konditionierten Medien in der Kombination S1/S2 ein starkes Luciferase-Signal von ca. 25.000CPS (counts per second) gemessen werden konnte, zeigten die Kombinationen S1/ Aβ-luc2 und S2/ Aβ-luc1 kein signifikantes Luciferase-Signal. Eine unspezifische Komplementierung der Luciferasehälften kann somit weitgehend ausgeschlossen werden. Das Luciferase-Signal ist auf spezifische Interaktionen der α-Synuclein Moleküle zurückzuführen.

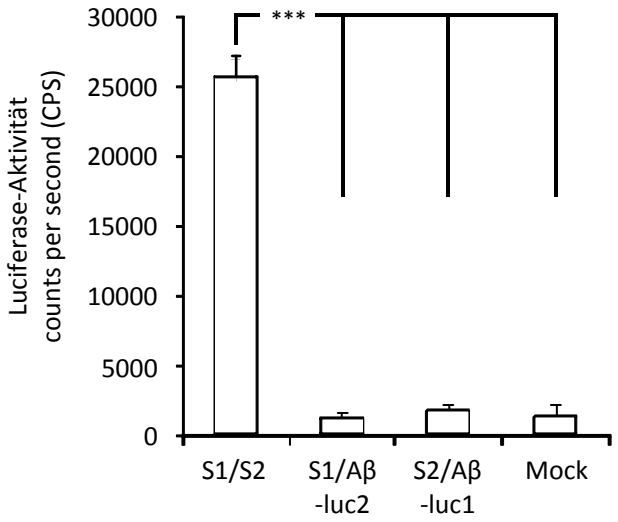


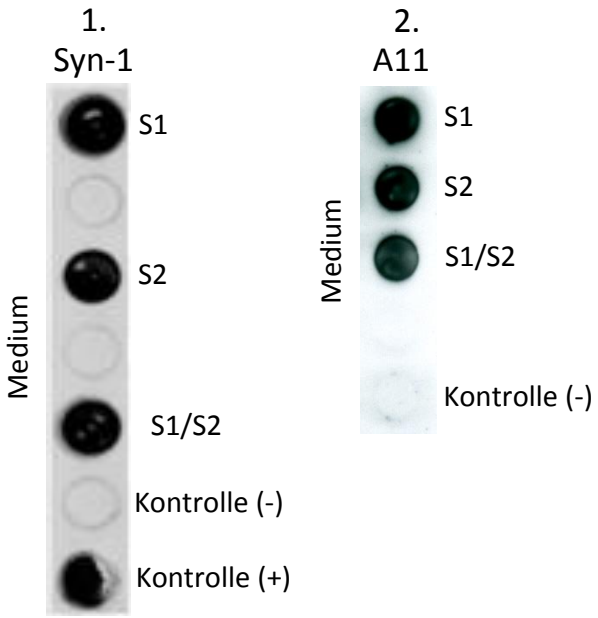
Abbildung 5: Ausschluß unspezifischer Komplementierung der Luciferase-Fragmente.
Messung der Luciferase-Aktivitäten in Medien von mit S1/S2 bzw. S1/Aβ-luc2 bzw. S2/Aβ-luc1 bzw. mit Mock Plasmiden transfizierten Glia-ähnlichen H4 Zellen.
Es zeigen sich signifikant erhöhte Luciferase-Aktivitäten im S1/S2 Ansatz gegenüber nicht signifikant erhöhten Luciferase-Aktivitäten in den S1/Aβ-luc2 bzw. S2/Aβ-luc1 Ansätzen. (n=6).
*** bedeutet P<0,001; Fehlerindikatoren repräsentieren +/- 1 Standardabweichung.
S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); Aβ-luc1: Beta-Amyloid-Peptid-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); Aβ-luc2: Beta-Amyloid-Peptid-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); Mock: Kontrollplasmid.

3.2 Nachweis von α-Synuclein im Extrazellularraum mittels DotBlot und WesternBlot

Um extrazelluläre Oligomere im konditionierten Medium mit einer anderen Methode nachzuweisen, wurde ein DotBlot Verfahren durchgeführt. Hierbei wurde konditioniertes Medium durch Anlegen eines Vakuums auf eine Nitrocellulose Membran mittels einer DotBlot Apparatur aufgebracht. Medien von S1, S2, wildtypischem α-Synuclein und Mock transfizierten Zellen wurden auf diese Weise

untersucht. Mit Hilfe des Syn-1 Antikörpers (BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA) konnte α-Synuclein in den konditionierten Medien der mit S1, S2 und mit wildtypischem α-Synuclein transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Im Medium der mit Mock Plasmid transfizierten Zellen konnte kein Signal detektiert werden. Da der Syn-1 Antikörper keine Aussagen darüber liefert ob α-Synuclein in monomerer oder oligomerer Form vorliegt, wurden in einem zweiten Ansatz die oben beschriebenen Medien mit Hilfe des oligomerspezifischen A11 Antikörpers untersucht. Erneut konnten in den S1, S2 und wildtypischen α-Synuclein konditionierten Medien α-Synuclein detektiert werden. Da der A11 Antikörper nur oligomere Formen erkennt, liefert dies einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich in unseren Versuchsbedingungen um α-Synuclein Oligomere handeln (Abb. 6a). Die Medien und Zelllysate der mit S1/S2 und wildtypischem α-Synuclein transfizierten Zellen wurden anschließend durch einen WesternBlot näher untersucht und die Bandenmuster miteinander verglichen. Die Medien wurden mit Hilfe von Vivaspin 500 Säulen mit einem molekularen Größenausschluss von 5kDa um ca. 30% konzentriert, um das Signal in ausreichender Weise zu verstärken. Das konzentrierte Medium und die Zelllysate wurden mit Hilfe eines vorgefertigtes 4-12% Bis-Tris gradienten Gels aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von α-Synuclein erfolgte mit folgenden primären Antikörpern: Hase anti-α-Synuclein panSynuclein, Maus anti-α-Synuclein Antikörper H3C, Ziege anti-α-Synuclein Antikörper sc7012. Nach der Inkubation mit infrarotgekoppelten jeweiligen Sekundärantikörpern wurden die Membranen mit Hilfe des Li-COR IR Imaging Systems eingelesen. Hier zeigte sich, dass das Bandenmuster der konzentrierten konditionierten Medien dem Bandenmuster der Zelllysate sehr ähnlich ist (Abb. 6b). Dies legt den Schluss nahe, dass die Mehrzahl der α-Synuclein Oligomere sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorkommt. Bei einzelnen anderen Oligomerarten hingegen kann ein exklusiv intrazelluläres oder ein exklusiv extrazelluläres Vorkommen vermutet werden.

A


1.
Syn-1
S1
S2
S1/S2
Kontrolle (-)
Kontrolle (+)
Medium
2.
A11
S1
S2
S1/S2
Kontrolle (-)
Medium

B

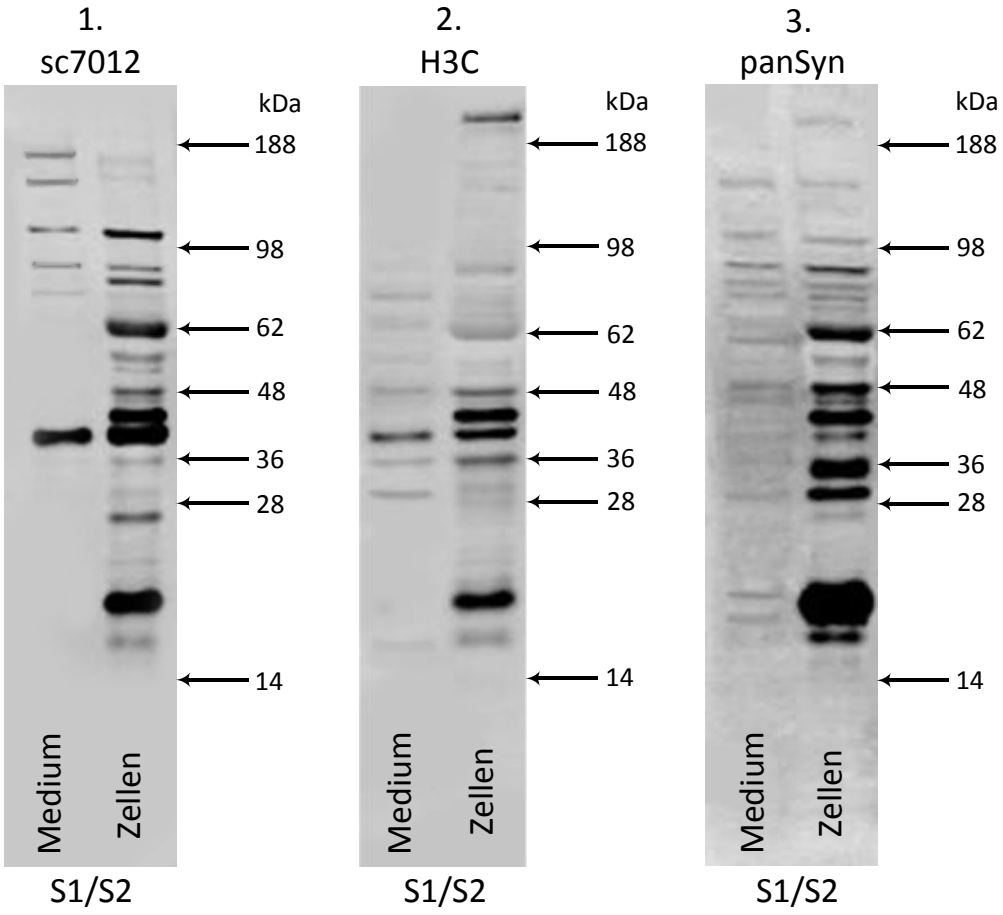

1.
sc7012
2.
H3C
3.
panSyn
kDa
188
98
62
48
36
28
14
Medium
Zellen
S1/S2

Abbildung 6: Charakterisierung von extrazellulärem α-Synuclein.
A) DotBlot der Medien von mit wildtypischem α-Synuclein transfizierten H4 Zellen unter der Verwendung von anti-α-Synuclein Antikörper Syn-1 und oligomerspezifische Antikörper A11. Als Kontrolle wurde Medium von nicht transfizierten Zellen verwendet. Repräsentativer Blot von 4 unabhängigen Experimenten. B) WesternBlot von mit S1/S2 transfizierten H4 Zellen und deren konditionierten Medien unter Verwendung folgender primärer Antikörper: anti-α-Synuclein sc7012 (N-terminales Epitop, Aminosäuren 1-19), anti-α-Synuclein H3C (C-terminales Epitop, Aminosäuren 128-140), anti-α-Synuclein panSyn (N-terminales Epitop, Aminosäuren 11-26). Repräsentative Blots von 5 unabhängigen Experimenten. Es können verschiedene α-Synuclein Oligomerspezies sowohl im Intrazellular- als auch im Extrazellularraum detektiert werden. S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); Kontrolle (+): Positivkontrolle; Kontrolle (-): Negativkontrolle; kDa: Kilodalton; H3C: C-terminaler anti-Synuclein Antikörper; sc7012: N-terminaler anti-Synuclein Antikörper; Syn-1: C-terminaler anti-Synuclein Antikörper; panSyn: N-terminaler anti-Synuclein Antikörper.

3.3 Quantifizierung von α-Synuclein in konditionierten Medien mittels ELISA

Um die Menge an α-Synuclein in konditionierten Medien zu quantifizieren, wurden die α-Synuclein Konzentrationen mit Hilfe eines α-Synuclein spezifischen ELISA bestimmt. Nach Ausführung des ELISA nach Angaben des Herstellers, wurden die α-Synuclein Konzentrationen in den konditionierten Medien von S1/S2, wildtypischem α-Synuclein und Mock transfizierten H4 Zellen gemessen (Abb. 7). Es zeigten sich signifikant erhöhte Mengen an α-Synuclein in den konditionierten Kulturmedien der mit S1/S2 und der mit wildtypischem α-Synuclein transfizierten Zellen. Während im Mock Medium nur eine Konzentration von ca. 1,3pg/µl gemessen werden konnte, zeigten sich Konzentrationen von 14,5pg/µl beim S1/S2 Medium und 14,6pg/µl beim wildtypischem α-Synuclein Medium.

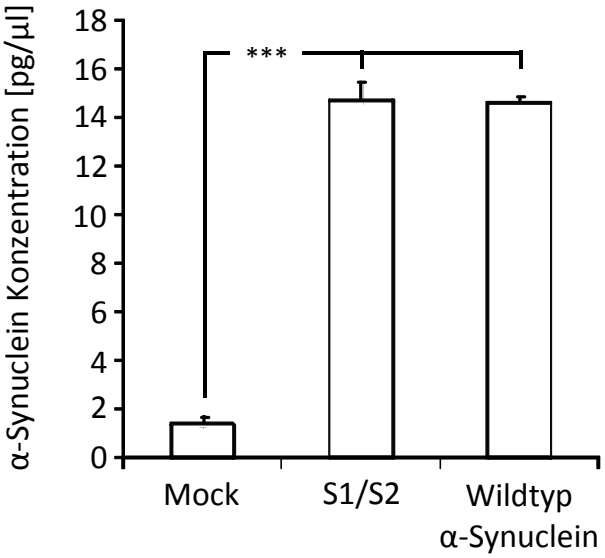


Abbildung 7: Messung der extrazellulären α-Synuclein Konzentration mittels α-Synuclein ELISA. Die Menge an α-Synuclein in konditionierten Medien von S1/S2 bzw. wildtypischem α-Synuclein transfizierten H4 Zellen zeigen signifikant erhöhte α-Synuclein Konzentrationen im Vergleich zu konditioniertem Medium von Mock transfizierten H4 Zellen (n=3). *** bedeutet P<0,0001; Fehlerindikatoren repräsentieren +/- 1 Standardabweichung. S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); wildtypisches α-Synuclein: wildtypisches humanes α-Synuclein Plasmid; Mock: Kontrollplasmid; pg: Picogramm; µl: Mikroliter.

3.4 Freisetzung von α-Synuclein durch primäre Neuronen an axonalen Endigungen und über den Zellkörper

Um den Mechanismus der Freisetzung von α-Synuclein genauer zu untersuchen, wurde ein mikrofluides Kammersystem benutzt, in welchem primäre Neuronen kultiviert werden können. Das Kammersystem besteht aus einem axonalen und einem somalen Kompartiment. Diese sind durch Mikrokanäle miteinander verbunden, wobei kein Flüssigkeitsaustausch zwischen den Kompartimenten möglich ist. Anhand dieses Kammersystems konnte die Lokalisation der α-Synuclein Freisetzung untersucht werden. Nachdem Axone durch die Mikrokanäle ausgesprosst sind, wurden primäre Neuronen im somalen Kompartiment mit AAV2/8 Viren, die zum einen V1S bzw. SV2 (Abb. 3b), oder α-Synuclein-IRES-GFP bzw. GFP exprimieren, infiziert. Nach 3-4 Tagen zeigten sich sowohl im V1S/SV2 Ansatz als auch im α-Synuclein-IRES-GFP deutliche Fluoreszenzsignale (Abb. 8). Neben den Zellkörpern, die erwartungsgemäß durch Komplementierung von α-Synuclein ein grünes Fluoreszenzsignal entwickelt haben, zeigten auch die Axone, die durch die Mikrokanäle reichen, ein grün gepunktetes Muster, welches bis in das axonale Kompartiment reicht. Dies bedeutet, dass sich α-Synuclein Oligomere auch in den Axonen befinden. Um zu überprüfen, ob α-Synuclein auch über die axonalen Endigungen freigesetzt wird, wurde nach 5 Tagen die α-Synuclein Konzentrationen der verschiedenen Medien des somalen und des axonalen Kompartimentes mit Hilfe eines ELISA gemessen. Es konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von α-Synuclein in den somalen Kompartimenten, der mit V1S/SV2 bzw. α-Synuclein-GFP infizierten Neuronen im Vergleich zu den mit GFP infizierten Neuronen gezeigt werden (Abb. 9). Die große Menge an α-Synuclein, welche im somalen Kompartiment detektiert wurde, kann über das Vorhandensein axonaler Endigungen und dendrodentritischer Synapsen in diesem Kompartiment erklärt werden. Des Weiteren konnte bei der Messung der α-Synuclein Konzentrationen in den Medien der axonalen Kompartimenten, eine signifikant erhöhte Menge an α-Synuclein gezeigt werden. Während bei den Medien, der mit AAV2/8 -V1S/SV2 bzw. AAV2/8-α-Synuclein-IRES-GFP infizierten Neuronen 0,42pg/µl bzw. 0,46pg/µl gemessen werden konnten, war in den Medien der mit GFP infizierten Zellen nur eine α-Synuclein Konzentration von 0,35pg/µl messbar. Es scheint also sehr wahrscheinlich, dass α-Synuclein über die kleine Anzahl, der in das axonale Kompartiment reichenden Axonterminalen, freigesetzt

wird. Zusammenfassend kann also behauptet werden, dass α-Synuclein von primären Neuronen über axonale Endigungen freigesetzt wird.

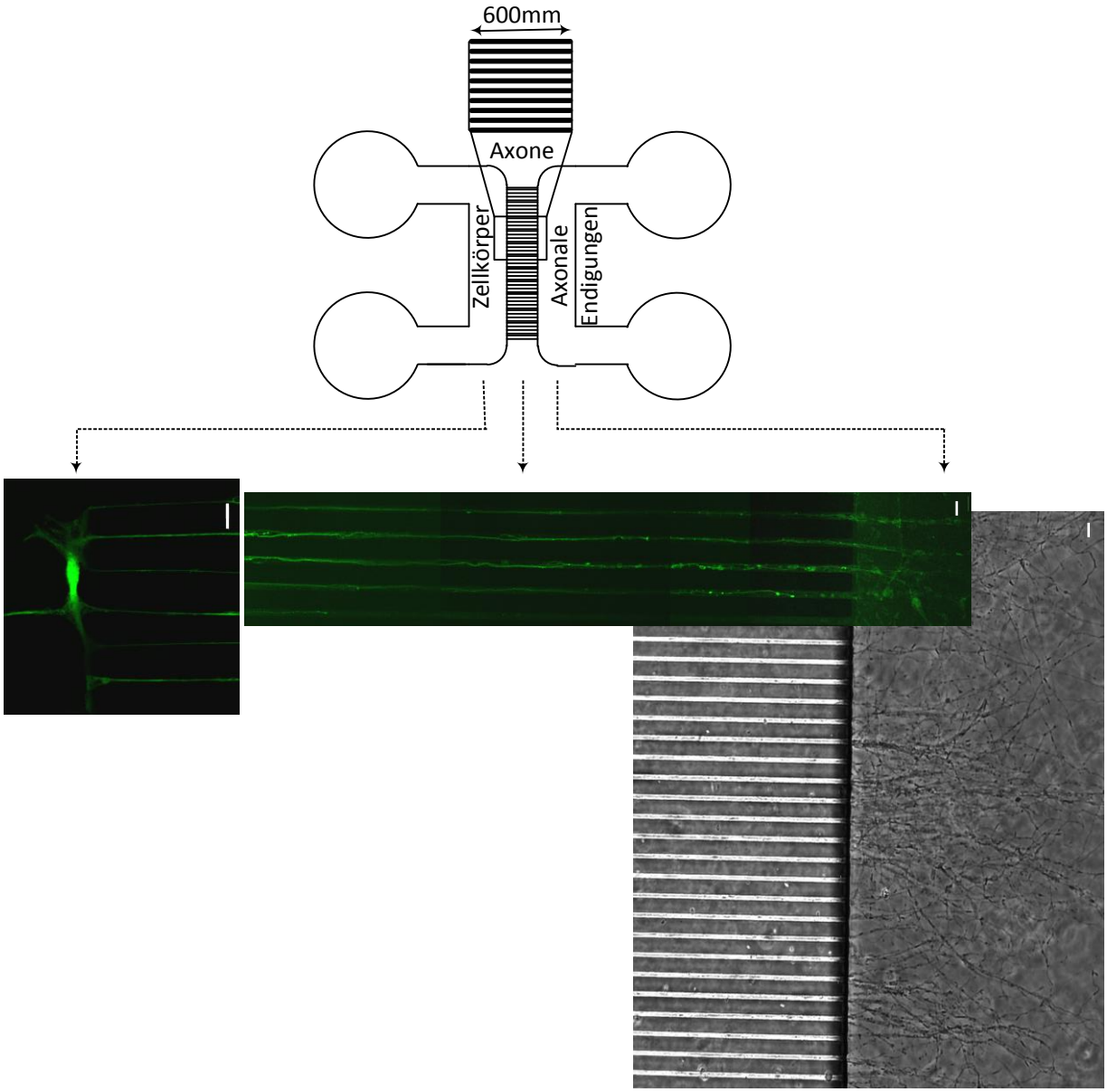


Abbildung 8: Übersicht über den Aufbau des mikrofluiden Kammersystems.Schematische Darstellung des Aufbaus des mikrofluiden Kammersystems im oberen Bildabschnitt. Die konfokale Aufnahme im mittleren Bildabschnitt zeigt links den Zellkörper und rechts durch Mikrokanäle sprossende Axone von Neuronen, die mit AAV2/8 Viren infiziert wurden. Die Viren exprimieren die YFP Komplementierungskonstrukte V1S/SV2, die Expressionsdauer betrug 72h. Die Phasenkontrast-Aufnahme im unteren Bildabschnitt zeigt axonale Endigungen die aus den Mikrokanälen austreten und sich anschließend weiter verzweigen. V1S: α-Synuclein-Venus-1 (1-158); SV2: α-Synuclein-Venus-2 (159-238); YFP: Yellow Fluorescent Protein; µm: Mikrometer; h: hours, (Stunden); Maßstabsbalken=20µm.

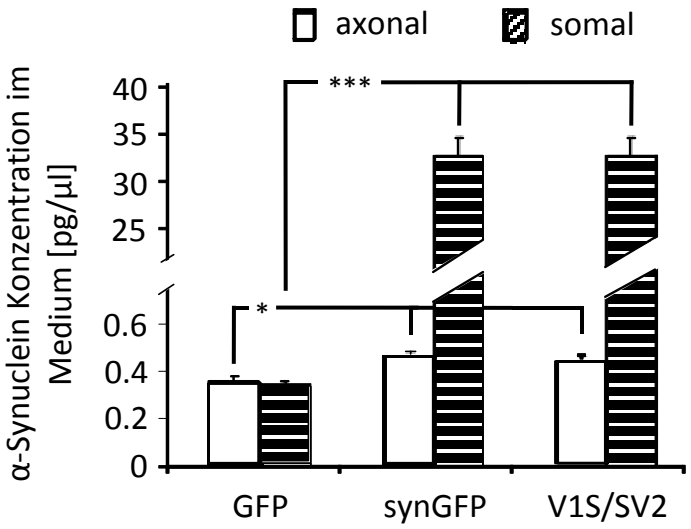


Abbildung 9: Freisetzung von α-Synuclein über axonale Endigungen.
Infektion von primär kortikalen Neuronen in mikrofluiden Kammersystemen mit AAV2/8 Viren, die V1S/SV2 bzw. synGFP bzw. GFP Plasmide exprimieren, an Tag 7 nach Ausplattierung. Nach 3 Tagen zeigen sich erhöhte Konzentrationen von α-Synuclein sowohl in den Zellkörpern als auch in den Axonen von Neuronen, die mit Viren infiziert wurden, die SV1/SV2 bzw. synGFP exprimieren (n=3). *** bedeutet P<0,001; * bedeutet P<0,05; Fehlerindikatoren repräsentieren +/- 1 Standardabweichung.
V1S: α-Synuclein-Venus-1 (1-158); SV2: α-Synuclein-Venus-2 (159-238); synGFP: α-Synuclein-Green-Fluorescent-Protein; GFP: Green-Fluorescent-Protein; pg: Picogramm; µl: Mikroliter; h:hours (Stunden).

3.5 Charakterisierung der α-Synuclein Spezies mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie

Um die im konditionierten Medium vorkommenden α-Synuclein Oligomere näher zu charakterisieren und eine Vorstellung über ihre ungefähre Größe zu bekommen, wurden konditionierte Medien von mit S1, S2 und wildtypischen α-Synuclein transfizierten Zellen über eine Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Hierbei wurden die einzelnen Fraktionen sowohl mit einer DotBlot Analyse als auch mittels des Luciferase Versuches untersucht. Dabei ähnelte das Gelchromatogramm des wildtypischen α-Synuclein (Abb. 10a) sehr dem

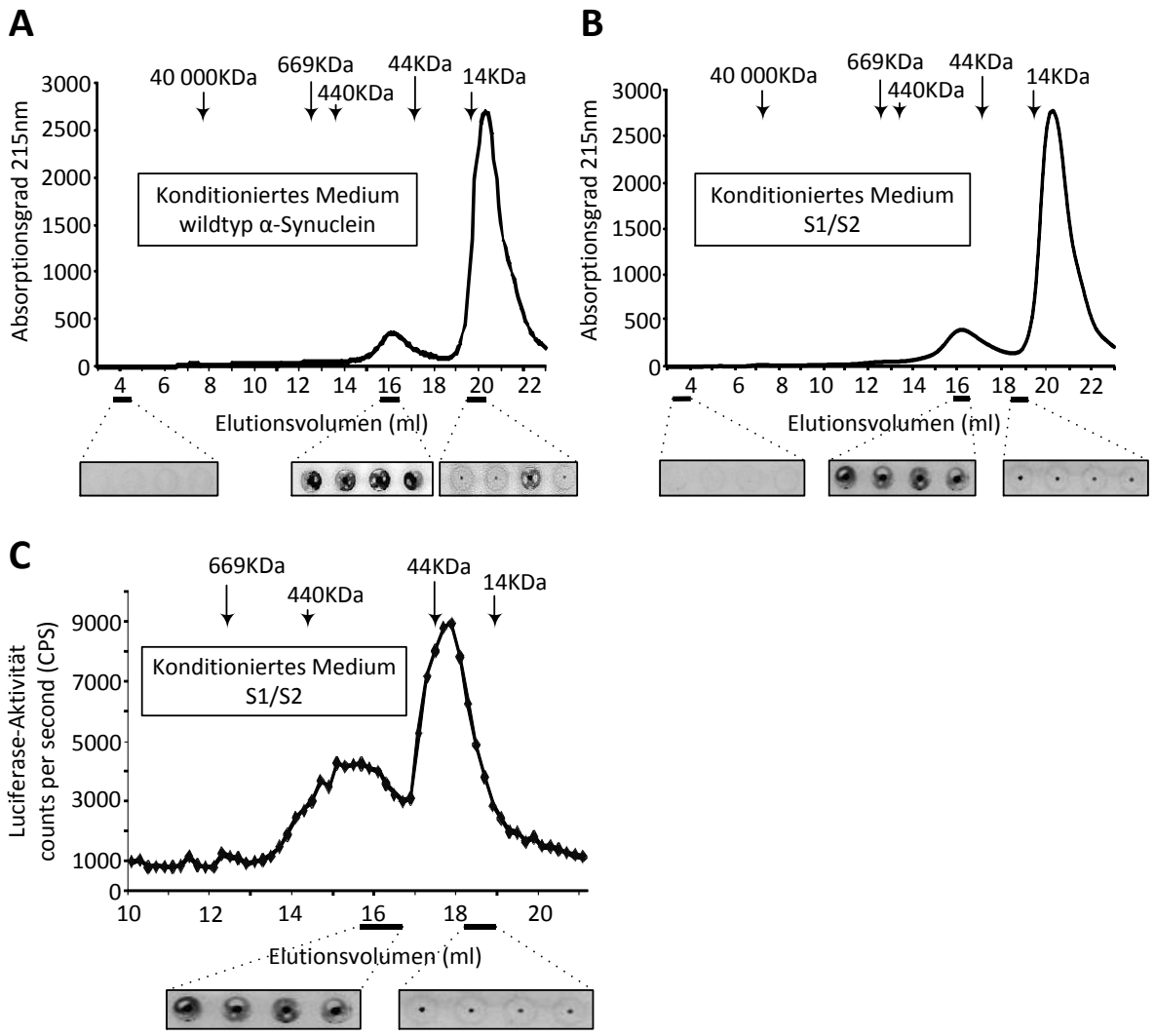


Abbildung 10: Größenausschlusschromatographie von konditionierten Medien. Verschiedene Medien wurden mit einer Superose 6 Säule aufgetrennt. Die molekulare Masse wurde mit Hilfe von Standardproben abgeschätzt: Thyroglobulin (669kDa), Ferritin (440kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Ribonuclease (14kDa). Die resultierenden Fraktionen wurden anschließend mittels DotBlot und dem anti-Synuclein Antikörper Syn-1 analysiert. A) Gelchromatographie von konditioniertem Medium von wildtypischem α-Synuclein transfizierten humanen H4 Zellen (n=3). B) Gelchromatographie von konditioniertem Medium von S1/S2 transfizierten von H4 Zellen (n=3). C) Luciferase Ansatz der einzelnen Fraktionen aus der Gelchromatographie von konditioniertem Medium von S1/S2 transfizierten H4 Zellen (n=3). Es zeigen sich sehr viele unterschiedliche α-Synuclein Spezies mit einer enormen Breite an verschiedenen molekularen Massen.
S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); wildtyp α-Synuclein: wildtypisches humanes α-Synuclein Plasmid; KDa: Kilodalton, ml: Milliliter; nm:Nanometer.

Gelchromatogramm von S1 bzw. S2 (Abb. 10b). Die geringe Verschiebung der Laufprofile lässt sich durch das höhere molekulare Gewicht von S1 bzw. S2 erklären. Die anschließende DotBlot Analyse ergab, dass α-Synuclein im Ansatz mit wildtypischem α-Synuclein einem Laufvolumen von 14,5 ml bis 22 ml, was ca. 440kDa-14kDa entspricht, eluiert. Bei den S1/S2 Medien zeigten sich α-Synuclein Signale bei 12,5 ml bis 21 ml, was ca. 669kDa-20kDa entspricht. Um die Menge an α-Synuclein Oligomeren in den einzelnen Elutionsfraktionen semiquantitativ zu bestimmen, wurden die Fraktionen auf ihre Luciferase-Aktivität hin untersucht (Abb. 10c). Eine besonders hohe Luciferase-Aktivität konnte im Bereich von ca. 40kDa gesehen werden, was der Größe von α-Synuclein Dimeren entspricht. Es konnten zudem höher molekulare Oligomere detektiert werden, welche sich im DotBlot aufgrund der niedrigeren Sensitivität nicht zeigten.

3.6 Aufnahme von sekretiertem α-Synuclein in verschiedenen Zellarten

Um zu untersuchen, ob extrazelluläre α-Synuclein Oligomere auch von Zellen aufgenommen werden können, wurden sowohl naiven H4 Zellen als auch naiven primären Neuronen konditioniertes S1/S2 Medium bzw. Mock Medium angeboten. Im ersten Ansatz wurde das konditionierte Medium durch Transfektion von H4 Zellen mit S1/S2 Plasmiden hergestellt. Als Kontrolle, ob die Transfektion erfolgreich verlaufen ist, wurde anschließend das Medium auf Luciferase-Aktivität untersucht. Das Mock Medium wurde durch Transfektion von H4 Zellen mit einem Mock Plasmid hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass H4 Zellen, welche 3 Tage mit konditioniertem S1/S2 Medium bzw. mit Mock Medium inkubiert wurden, eine erhöhte Luciferase-Aktivität in den Zellen von ca. 850CPS bei den S1/S2 Plasmiden gegenüber ca. 450CPS beim Mock Plasmid aufweisen (Abb. 11a). Dies entspricht einer bis zu 1,89-fachen Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Dieses Ergebnis liefert Hinweise auf die Möglichkeit der Übertragung von α-Synuclein von Glia-ähnlichen Zellen (H4) zu anderen Glia-ähnlichen Zellen (H4). In einem zweiten Ansatz wurden primäre Neurone 5 Tage nach Ausplattierung ebenfalls mit konditioniertem Medium mit S1/S2 und Mock transfizierten H4 Zellen für 4 Tage inkubiert. Es konnte ebenfalls eine erhöhte Luciferase-Aktivität in den primären Neuronen von ca. 5000CPS beim S1/S2 Medium gegenüber ca. 3000CPS beim Mock Medium gemessen werden (Abb. 11b). Dies entspricht einer bis zu 1,67-

fachen Erhöhung. Die Ergebnisse deuten auch hier auf eine Übertragung von α-Synuclein Oligomeren von Glia-ähnlichen Zellen (H4) auf primäre Neuronen hin. Im dritten Versuchsansatz sollte getestet werden, ob auch α-Synuclein Oligomere von Neuronen zu Neuronen transmittiert werden können. Hierbei wurden 5 Tage alte primäre Neuronen Kulturen mit S1/S2 Plasmiden transfiziert. Nach einer Expressionsdauer von 48h wurde das konditionierte Medium gewonnen und in eine naive primär neuronale Schwesterkultur gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurden die Luciferase-Aktivitäten von den mit S1/S2 bzw. Mock Medium behandelten primären Neuronen gemessen. Es zeigten sich Erhöhungen der Luciferase-Aktivität bei den mit S1/S2 konditionierten Medium behandelten Neuronen auf ca. 5200CPS im Vergleich zu ca. 3100CPS bei den mit Mock Medium behandelten primären Neuronen (Abb. 11c). Dies entspricht einer ca. 1,7-fachen Erhöhung. Dieses deutet auf die Möglichkeit einer Ausbreitung von α-Synuclein Oligomeren von Neuronen zu Neuronen hin. Im letzten Versuchsansatz wurde überprüft, ob α-Synuclein Oligomere in primären Neuronen auch über Axone aufgenommen werden können. Hierzu wurden primäre Neurone im mikrofluiden Kammersystem kultiviert. Nach 5 Tagen zeigten sich Axone, die über die Mikrokanäle ins axonale Kompartiment gewachsen waren. Anschließend wurden die axonalen Enden im axonalen Kompartiment mit S1/S2 konditioniertem bzw. mit Mock Medium inkubiert. Die konditionierten Medien wurden durch Transfektion von H4 Zellen mit S1/S2 bzw. mit Mock Plasmiden mit einer Expressionsdauer von 48h gewonnen. Nach 5 Tagen wurden die Zellkörper der primären Neuronen geerntet, um die Luciferase-Aktivität zu bestimmen. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Luciferase-Aktivität von durchschnittlich 6000CPS bei den mit S1/S2 konditionierten Medien inkubierten Neuronen gegenüber durchschnittlich 1650CPS bei den mit Mock Medien inkubierten Neuronen (Abb. 11d). Dies entspricht einer bis zu 3,6-fachen Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Es kann somit von einer axonalen Aufnahme von α-Synuclein Oligomeren, einem anschließenden retrograden Transport und einer Akkumulation der Oligomere im Zellkörper ausgegangen werden.

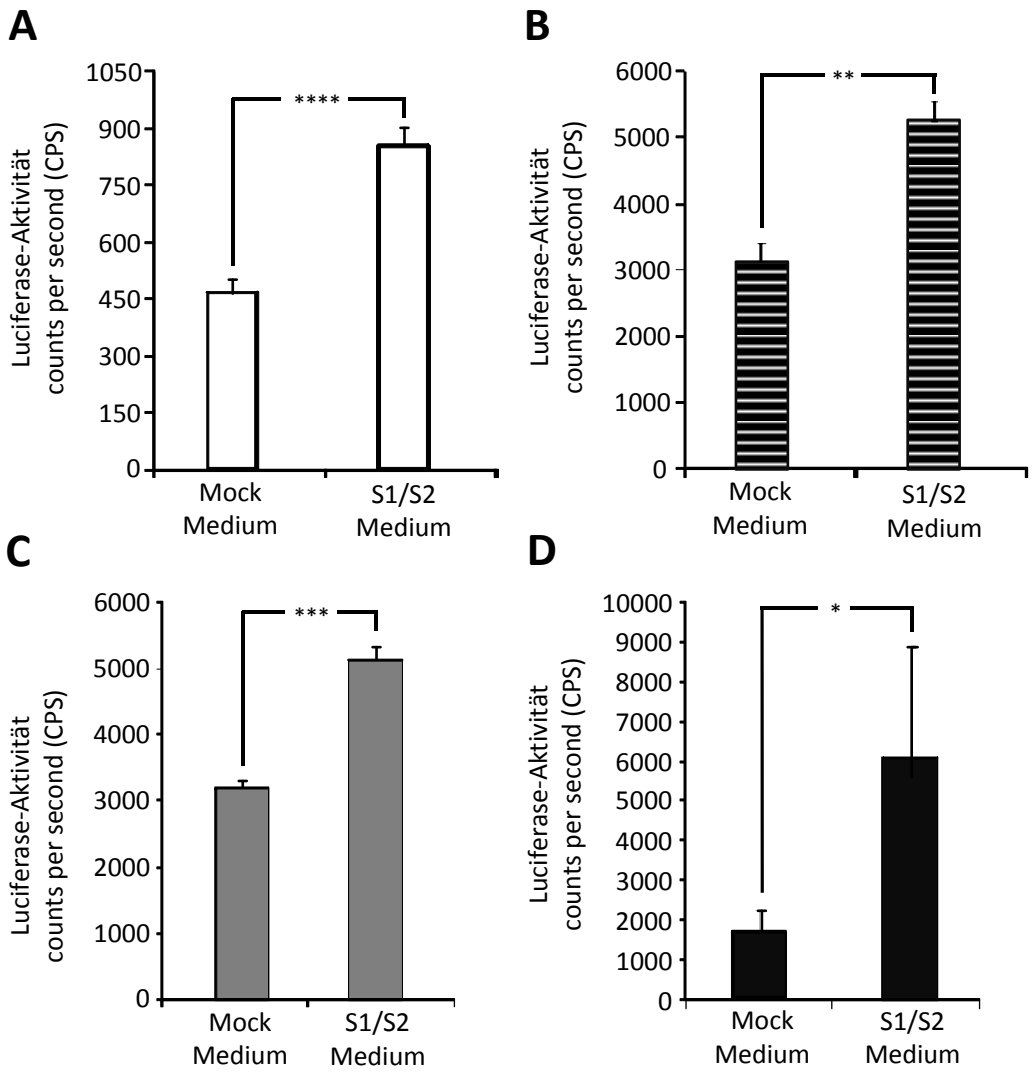


Abbildung 11: Aufnahme von extrazellulärem α-Synuclein durch verschiedene Zellen. A) Messung der Luciferase-Aktivität in Zellkörpern von H4 Neurogliomzellen nach 48h Inkubation mit konditioniertem S1/S2 Medium von H4 Zellen (n=3). B) Messung der Luciferase-Aktivität in Zellkörpern von primären Neuronen (5 Tage in vitro) nach 96h Inkubation mit konditioniertem S1/S2 Medium von H4 Zellen (n=3). C) Messung der Luciferase-Aktivität in Zellkörpern von primären Neuronen (5 Tage in vitro) nach 96h Inkubation mit S1/S2 konditioniertem Medium von primären Neuronen (n=3). D) Kultivierung von primären Neuronen im oben gezeigten mikrofluiden Kammersystem für 5 Tage. Anschließend Inkubation der axonalen Endigungen im axonalen Kompartiment mit S1/S2 konditioniertem Medium von H4 Zellen. Nach 5 Tagen Messung der Luciferase-Aktivität in den Zellkörpern der primären Neuronen. Es zeigen sich erhöhte Luciferase-Aktivitäten in allen Zellen die mit S1/S2 konditioniertem Medium inkubiert wurden (n=3). **** bedeutet P<0,0001; *** bedeutet P<,0,0004; ** bedeutet P<0,078; * bedeutet P<0,05; Fehlerindikatoren repräsentieren +/- 1 Standardabweichung. S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); h: hours (Stunden); Mock: Kontrollplasmid.

Aufnahme von fluoreszenzmarkierten α-Synuclein Oligomeren

Ein weiterer Ansatz bei der Untersuchung der Aufnahme von extrazellulärem α-Synuclein beinhaltete fluoreszenzmarkierte rekombinante α-Synuclein Oligomere vom Typ C (Danzer et al., 2007). Primäre Neuronen wurden im oben bereits beschriebenen mikrofluiden Kammersystem kultiviert. Am Tag 7 *in vitro* wurde das axonale Kompartiment mit 1µM Alexa 488 markierten Typ C Oligomeren behandelt. Nach 3-4 Tagen konnten grüne Oligomere im Zellkörper und in den durch die Mikrokanäle reichenden Axonen detektiert werden (Abb. 12).

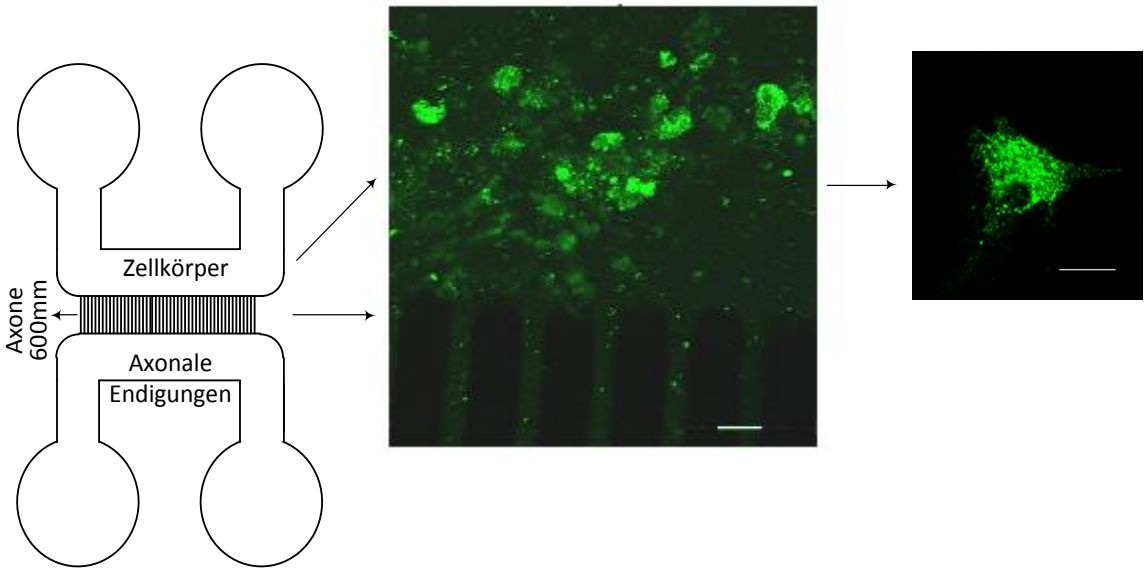


Abbildung 12: Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem rekombinanten α-Synuclein Oligomeren. 3-4 Tage nach der Inkubation des axonalen Kompartimentes eines mikrofluiden Kammersystems können α-Synuclein Oligomere in den Axonen und den Zellkörpern von primären Neuronen (10 Tage *in vitro*) detektiert werden. Maßstabsbalken= 20µm.

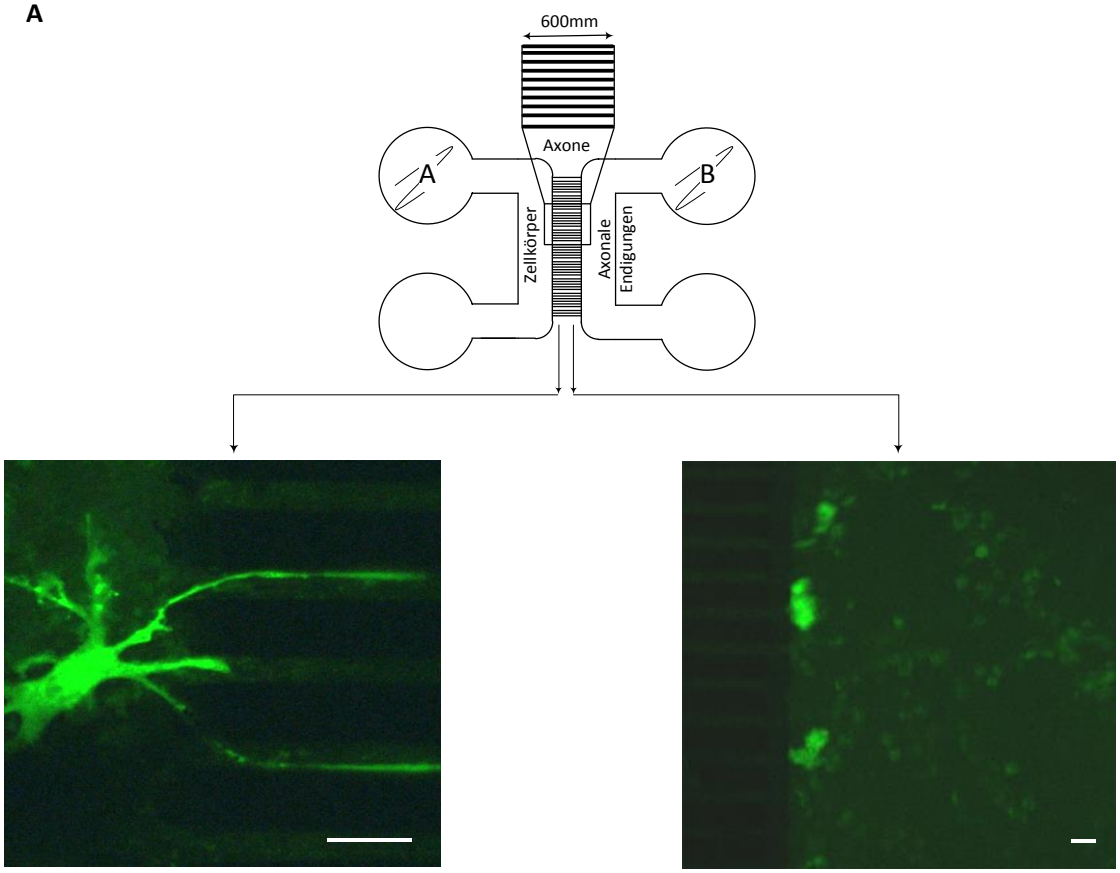
3.7 Etablierung von zellulären Ko-Kulturen zur Untersuchung einer Transmission von α-Synuclein

Um das Verhalten von extrazellulärem α-Synuclein genauer zu untersuchen und dessen biologische Relevanz besser nachvollziehen zu können, wurden Ko-Kulturen zwischen verschiedenen Zellarten angelegt. Durch das oben beschriebene mikrofluide Kammersystem konnten Ko-Kulturen zwischen primären Neuronen und Glia-ähnlichen Zellen in unterschiedlichen Medien etabliert werden. Dies wurde durch die Trennung des Kammersystems in unterschiedliche

Kompartimente möglich, zwischen denen kein Flüssigkeitsaustausch stattfinden kann. Im ersten Ansatz wurden primäre Neuronen, die 7 Tage im Kompartiment A kultiviert wurden, mit AAV2/8 Viren, die V1S exprimieren, infiziert. Zuvor wurde kontrolliert, ob Axone durch die Mikrokanäle in das axonale Kompartiment B eingewachsen waren. Am selben Tag wurden humane H4 Zellen, welche in einer separaten 35 mm Zellkulturschale ausplattiert wurden, mit AAV2/8 Viren, die SV2 exprimieren, infiziert. 14 Stunden nach Infektion, wurden bei den primären Neuronen ein Waschschritt mit PBS und ein Medienwechsel durchgeführt. Die H4 Zellen wurden 3 Waschschritten mit PBS unterzogen und mit Hilfe von Trypsin von der Kulturplatte gelöst und in das axonale Kompartiment B eingepflanzt. Nach 5 Tagen in Ko-Kultur konnte ein starkes Yellow-Fluorescent-Protein (YFP) Signal in den Zellkörpern derjenigen Neuronen detektiert wurden, deren Axone durch die Mikrokanäle gewachsen waren. Des Weiteren konnte ein Fluoreszenzsignal bei H4 Zellen gemessen werden, die in unmittelbarer Nähe der axonalen Endigungen der primären Neuronen lokalisiert waren. Auch konnte bei den Axonen beinahe über deren komplette Länge Fluoreszenzsignale beobachtet werden (Abb. 13a). Diese Ergebnisse lassen auf eine bidirektionale Transmission von α-Synuclein schließen. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Viren durch die Mikrokanäle diffundiert sein könnten, fügten wir in einem Kontrollexperiment Trypanblau dem Medium des axonalen Kompartimentes hinzu. Hierbei konnte über einen Zeitraum von 5 Tagen keine Diffusion von Trypanblau beobachtet werden. Die Flüssigkeitsisolierung zwischen dem axonalen und somalen Kompartiment konnte somit gesichert werden. Um virusspezifische Effekte auszuschließen, wurde in einem ähnlichen Versuchsansatz ein Tausch der YFP-Hälften durchgeführt. Hierbei wurden die primären Neuronen am Tag 7 *in vitro* mit AAV2/8 Viren, die SV2 exprimieren, behandelt. Die H4 Zellen wurden dementsprechend mit AVV2/8 Viren, die SV1 exprimieren, in der separaten 35mm Zellkulturschale infiziert. Nach den oben beschriebenen Waschschritten und dem Transfer der H4 Zellen in das axonale Kompartiment B konnten ebenfalls nach 5 Tagen Venus YFP Signale detektiert werden. Die Verteilung und das Muster der YFP Signale waren nahezu identisch mit denen vom vorigen Ansatz (Abb. 11b). Um zu differenzieren, ob α-Synuclein als Monomer wandert und dann eine in-situ Oligomerisierung stattfindet oder ob α-Synuclein in Oligomerform wandert, wurde ein neuer Versuchsaufbau gewählt. Primäre Neuronen wurden 7 Tage *in vitro* im Kompartiment A kultiviert

und auf eine regelhafte Aussprossung der Axone durch die Mikrokanäle hin untersucht. H4 Zellen wurden in einer separaten 35 mm Kulturschale kultiviert und sowohl mit AAV2/8 Viren, die SV1 exprimieren, als auch mit AAV2/8 Viren, die SV2 exprimieren, infiziert. 14 Stunden nach Infektion wurden die H4 Zellen 3 Waschschritten mit PBS unterzogen und mit Hilfe von Trypsin von der Kulturplatte gelöst und in das axonale Kompartiment B eingepflanzt. Nach 3 Tagen konnte wie erwartet ein Venus YFP Signal in den H4 Zellen im axonalen Kompartiment B detektiert werden. Interessanterweise, zeigten nach 5-6 Tagen auch primäre Neurone, deren Axone durch die Mikrokanäle gewachsen waren, sowohl in den Zellsomata als auch in den Axonen deutliche Venus YFP Signale (Abb. 12). Dies bedeutet, dass eine Freisetzung von α-Synuclein Oligomeren durch H4 Zellen und anschließender Aufnahme der primären Neuronen an den axonalen Endigungen mit retrogradem Transport bis in die Zellkörper stattgefunden haben muss. Das nächste Ziel war die Untersuchung, ob auch zwischen Neuronen eine Transmission von α-Synuclein stattfindet. Zu diesem Zweck wurden in beiden Kompartimenten A und B primäre Neuronen ausplattiert. Nach 4 Tagen konnten neuronale Differenzierungsschritte beobachtet werden, jedoch noch keine Aussprossung von Axonen durch die Mikrokanäle. In diesem Stadium erfolgte eine Infektion der Neuronen in Kompartiment A mit AAV2/8 Viren, die SV1 exprimieren, und eine Infektion der Neuronen in Kompartiment B mit AAV2/8 Viren, die SV2 exprimieren. Nach einer Expressionsdauer von 24 Stunden wurden die Neuronen in beiden Kompartimenten einem Waschschritt mit PBS und einem Medienwechsel unterzogen. Nach 7 Tagen konnte eine beginnende wechselseitige Aussprossung von Axonen in das jeweilige andere Kompartiment beobachtet werden. Am Tag 9 konnten Venus YFP Signale in den Zellkörpern der Neuronen in beiden Kompartimenten und Signale entlang der Axone beider Neuronen Populationen beobachtet werden (Abb. 13). Es kann also von einer transsynaptischen Ausbreitung von α-Synuclein ausgegangen werden, welche sowohl eine antegrade Freisetzung als auch eine retrograde Aufnahme von α-Synuclein beinhaltet.

A


600mm
Axone
A
B
Zellkörper
Axonale Endigungen

B

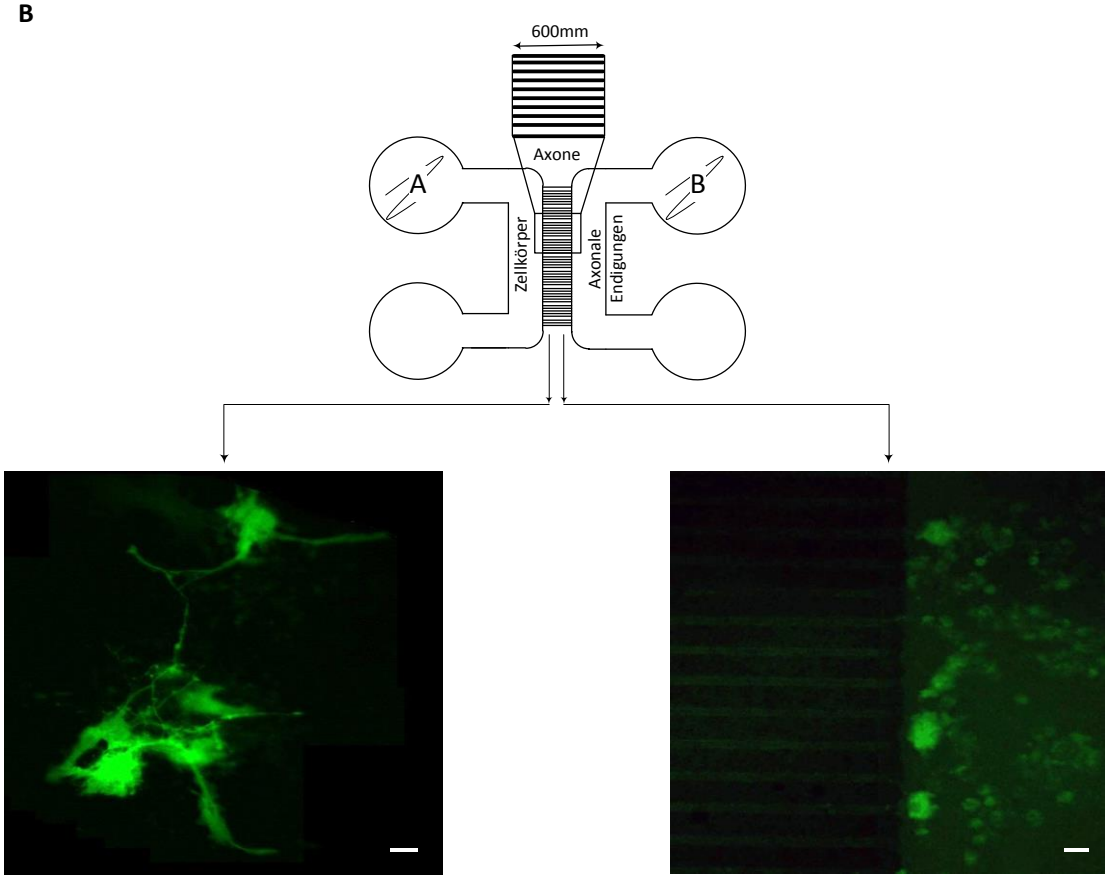

600mm
Axone
A
B
Zellkörper
Axonale Endigungen

Abbildung 13: Transmission von α-Synuclein zwischen Glia-ähnlichen H4 Zellen und Neuronen. A) Kultivierung von primären Neuronen (Tag 7 in vitro) in Kompartiment A des oben genannten mikrofluiden Kammersystems und Infektion mit AAV2/8-SV2 Viren. Kultivierung von H4 Zellen in einer separaten 30 mm Zellkulturschale und Infektion mit AAV2/8-V1S Viren. Nach 48h, 3-faches Waschen der H4 Zellen mit PBS und Umsetzung der Zellen in Kompartiment B. B) Gleicher Versuchsaufbau wie in Abbildung A), mit Wechsel der AAV2/8 Viren und somit Tausch der Venus-Hälften. Infektion der primären Neuronen mit AAV2/8-V1S Viren bzw. Infektion der H4 Zellen mit AAV2/8-SV2. Nach 48h-72h Nachweis von fluoreszierenden α-Synuclein Oligomeren in Zellkörpern und Axonen der primären Neuronen und in den Zellkörpern der H4 Zellen. V1S: α-Synuclein-Venus-1 (1-158); SV2: α-Synuclein-Venus-2 (159-238); h: hours (Stunden); mm: Millimeter, Maßstabsbalken=20µm.

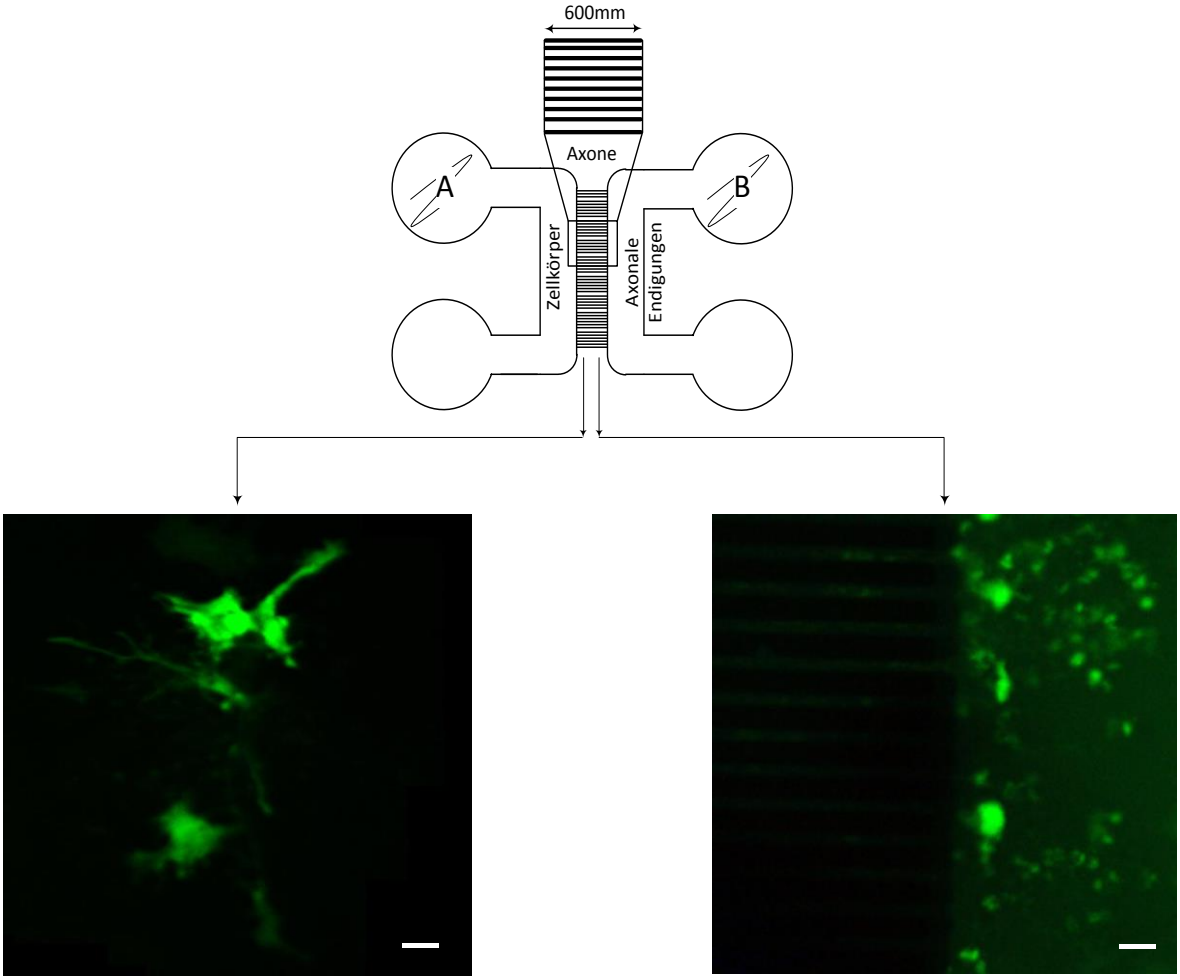


Abbildung 14: Transmission von α -Synuclein in Oligomerform.A) Kultivierung von primären Neuronen in Kompartiment A des mikrofluiden Kammersystems für 7 Tage. Kultivierung von H4 Zellen in einer separaten 30mm Zellkulturschale und Infektion sowohl mit AAV2/8-V1S, als auch mit AAV2/8-SV2 Viren, am Tag 2 nach Ausplattierung. Nach 48h, 3-faches Waschen der H4 Zellen mit PBS und Umsetzung der Zellen in Kompartiment B. Nach 72h-96h Nachweis von fluoreszierenden α-Synuclein in Axonen und Zellkörpern der primären Neuronen. V1S: α-Synuclein-Venus-1 (1-158); SV2: α-Synuclein-Venus-2 (159-238); h: hours (Stunden); mm: Millimeter, Maßstabsbalken=20µm.

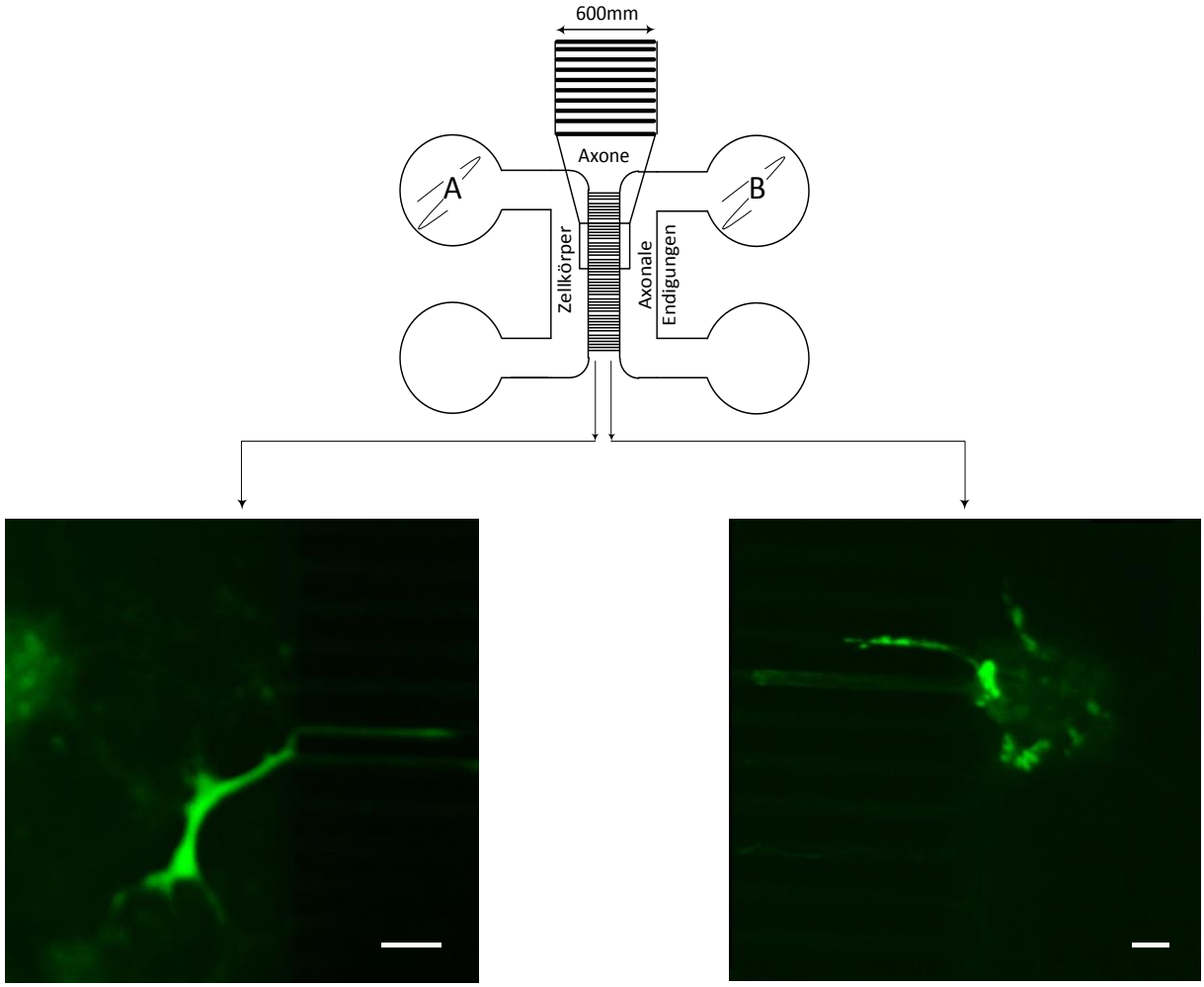


Abbildung 15: Transmission von α -Synuclein von Neuron zu Neuron.Kultivierung von primären Neuronen in den Kompartimenten A und B des mikrofluiden Kammersystems für 4 Tage. Anschließend Infektion der Neuronen in Kompartiment A mit AAV2/8-V1S und Infektion der Neurone in Kompartiment B mit AAV2/8-SV2 Viren. Nach 2 Tagen 3-maliges Waschen der beiden Kompartimente mit PBS und Zellkulturmedium. Am Tag 9 in vitro Nachweis von fluoreszierenden α-Synuclein Oligomeren in Axonen und Zellkörpern von Neuronen des Kompartiments A und des Kompartiments B. V1S: α-Synuclein-Venus-1 (1-158); SV2: α-Synuclein-Venus-2 (159-238); mm: Millimeter, Maßstabsbalken=20µm.

Ausbreitung von α-Synuclein Oligomeren im neuronalen Netzwerk

Ein gemeinsames Phänomen konnte bei allen oben genannten Transmissions-experimenten beobachtet werden. In primären Neuronen, deren Axone durch die Mikrokanäle in das andere Kompartiment ausgesprosst waren, konnten in den Axonen, danach in den Zellkörpern und anschließend in den dendritischen Ausläufern Venus YFP Signale detektiert werden. Die YFP Fluoreszenz Signale in den dendritischen Ausläufern waren zunächst schwach, sie nahmen jedoch in

der Signalintensität kontinuierlich über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden zu (Abb. 14). Nach weiteren ca. 24 Stunden konnten in den ersten peripheren Neuronen Venus YFP Signale gemessen werden, deren Axone nicht durch die Mikrokanäle gewachsen waren. Es handelte sich hier also um Neurone, die in zweiter Linie von der α-Synuclein Aggregation betroffen waren. Auch in diesen Neuronen, kam es zu einer permanenten Steigerung der YFP Signalintensität und im Verlauf zu einer weiteren Ausbreitung in deren dendritische Ausläufer und in andere periphere Neuronen. Dies deutet auf eine progressive Ausbreitung des transmittierten α-Synucleins im neuronalen Netzwerk hin.

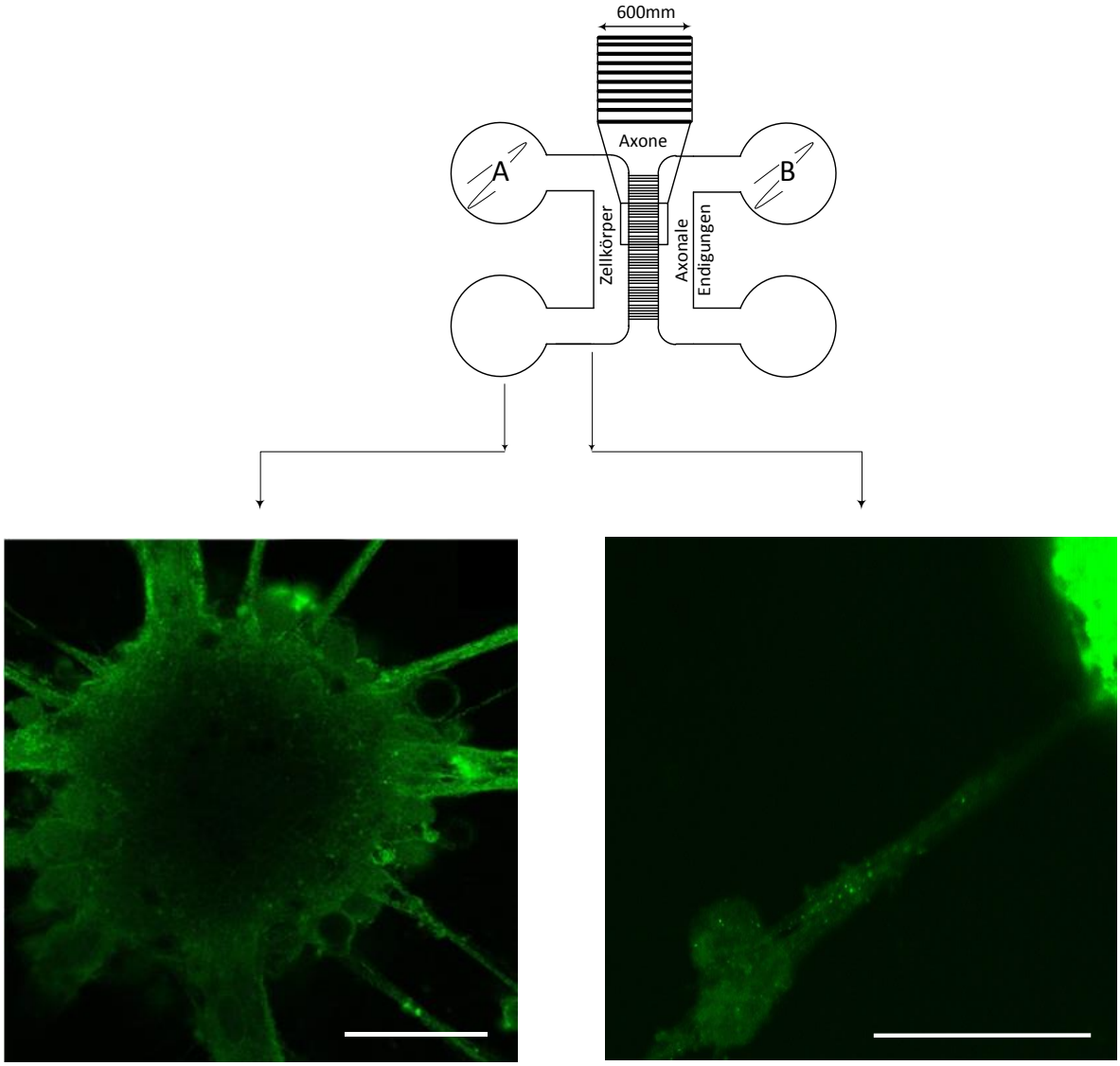


Abbildung 16: Ausbreitung von α-Synuclein Oligomeren im neuronalen Netzwerk.
24-48h nach der Detektion von fluoreszierenden α-Synuclein Oligomeren in den Zellkörpern der wie in Abb. 15 beschriebenen primären Neuronen, Detektion von α-Synuclein Signalen in den Ausläufern dieser Neuronen. Nach weiteren 24-48h Nachweis von fluoreszierenden α-Synuclein Oligomeren in Zellkörpern von primären Neuronen, die über Ausläufer Kontakt zu Neuronen haben, die α-Synuclein Oligomere enthalten, die aber keinen Kontakt zu den Kanälen des mikrofluiden Kammersystems haben. h:hours, Maßstabsbalken=20µm.

3.8 Sekretierte α-Synuclein haben eine toxische Wirkung auf Nachbarzellen

Um zu untersuchen, ob sekretierte α-Synuclein toxische Effekte auf Nachbarzellen haben, wurden naive H4 Zellen mit konditionierte Medien von S1/S2 bzw. Mock transfizierten H4 Zellen 4 Tage lang inkubiert und eine Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivität gemessen. Hierbei zeigten H4 Zellen, welche mit S1/S2 konditionierten Medien inkubiert wurden, ein um das 4,8-fache erhöhte Aktivitäten von Caspase

3/7 Vergleich zu den Zellen, die mit Mock konditionierten Medien inkubiert wurden (Abb. 15a). Dies deutet auf eine progressive zelluläre Degeneration hin. Um zu untersuchen, ob dieser toxische Effekt auf die Zellen spezifisch auf sekretiertes α-Synuclein zurückzuführen ist, wurde eine Immunodepletion mit Hilfe des bekannten Syn-1 Antikörpers (BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt. Hierbei konnte der toxische Effekt von α-Synuclein nach Immunodepletion deutlich reduziert werden. Die Aktivität von Caspase 3/7, welche auf das 4,8-fache angestiegen war, konnte nach Immunodepletion auf das 3,0-fache gesenkt werden. Die Caspase 3/7 Aktivitäten der immunodepletierten Medien waren damit signifikant geringer gegenüber den nicht behandelten konditionierten Medien (Abb. 15a). Um eine erfolgreiche Immunodepletion von α-Synuclein zu bestätigen, wurden die Luciferase-Aktivitäten der konditionierten Medien vor und nach Immunodepletion gemessen. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Luciferase-Aktivität von ca. 116.000CPS vor der Immunodepletion auf ca. 72.000CPS nach Immunodepletion, was auf eine erfolgreiche Immunodepletion von α-Synuclein deutet (Abb. 15b). Des Weiteren wurde auch wildtypisches α-Synuclein auf seine Toxizität überprüft. Auch hier konnten um das 4,2-fache erhöhte Caspase 3/7 Aktivitäten in naiven H4 Zellen, die mit wildtypischem α-Synuclein konditionierten Medien gegenüber mit Mock Medium inkubierten naiven H4 Zellen inkubiert wurden, gemessen werden (Abb. 15c). Erneut konnte die durch α-Synuclein versuchte Toxizität durch Immunodepletion mit dem Syn-1 Antikörper verringert werden. Die Caspase 3/7 Aktivitäten verringerten sich auf das 2,3-fache, gegenüber den mit Mock Medium behandelten H4 Zellen. Um die von α-Synuclein ausgehende Toxizität auch an Neuronen zu untersuchen wurde derselbe Ansatz auch für Kulturen von primären Neuronen gewählt. Primäre Neuronen wurden mit AAV2/8 Viren, welche SV1 bzw. SV2 exprimieren, infiziert oder blieben unbehandelt. Nach einer Expressionsdauer von 48h wurden die so hergestellten konditionierten Medien gesammelt und in naive primäre Neuronen Kulturen transferiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurden die Caspase 3/7 Aktivitäten gemessen. Auch hier konnten um das 5,2-fache erhöhte Caspase 3/7 Aktivitäten im Vergleich zu den unbehandelten Neuronen gemessen werden. Der toxische Effekt war erneut nach Immunodepletion mit dem Syn-1 Antikörper abgeschwächt. Die Caspase 3/7 Aktivitäten nahmen von einer 5,2-fachen Erhöhung auf eine Erhöhung um das

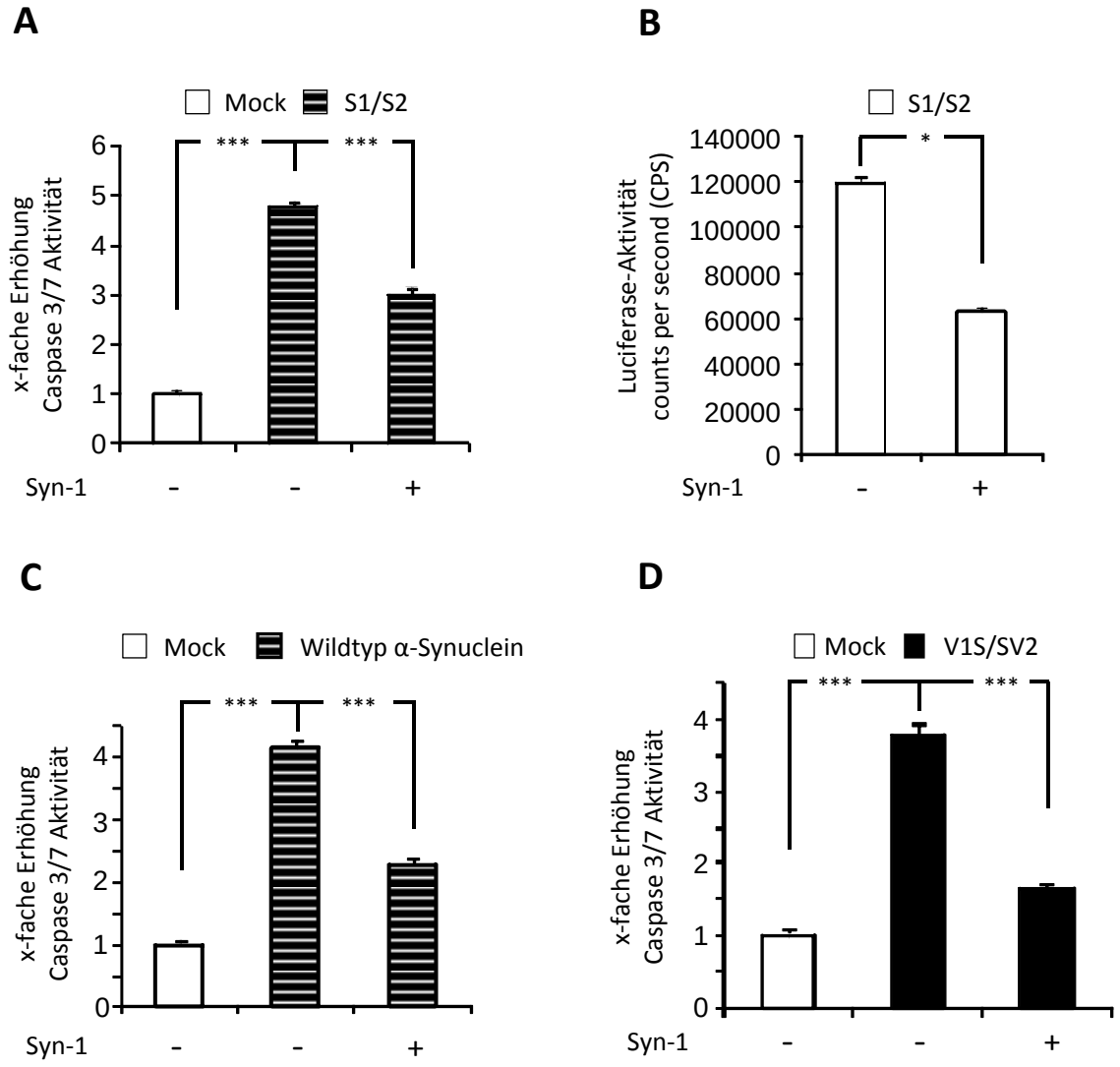


Abbildung 17: Toxizitätsnachweis von sekretierten α-Synuclein Oligomeren.
A) Transfektion von Glia-ähnlichen H4 Zellen mit S1/S2 Plasmiden bzw. mit einem Mock Plasmid und Sammeln der Medien nach einer Expressionsdauer von 48h. Naive H4 Zellen werden mit Mock Medium, S1/S2 konditioniertem Medium bzw. α-Synuclein immunodepletiertem S1/S2 konditioniertem Medium inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 72h Messung der Caspase 3/7 Aktivitäten (n=5). B) Konditioniertes Medium von mit S1/S2 Plasmiden transfizierten H4 Zellen, wird mit Hilfe des Syn-1 Antikörpers immunodepletiert (n=3). C) Transfektion von H4 Zellen mit wildtypischem α-Synuclein Plasmid bzw. mit einem Mock Plasmid und Sammeln der Medien nach einer Expressionsdauer von 48h. Naive H4 Zellen werden mit Mock Medium, wildtypischem Synuclein Medium bzw. α-Synuclein immunodepletiertem wildtypischem Synuclein Medium inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 72h Messung der Caspase 3/7 Aktivitäten (n=5). D) Infektion von primären Neuronen (7 Tage *in vitro*) mit AAV2/8-V1S, AAV2/8-SV2 bzw. AAV2/8 Mock Viren. Nach 48h Sammeln der Medien und Inkubation von naiven primären Neuronen mit Mock Medium bzw. V1S/SV2 konditioniertem Medium oder α-Synuclein immunodepletierten V1S/SV2 Medium. Es zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Caspase 3/7 Aktivitäten in H4 Zellen und primären Neuronen nach Inkubation mit α-Synuclein haltigen konditionierten Medien. Dieser Effekt ist nach Immunodepletion von α-Synuclein deutlich abgeschwächt und ist somit auf α-Synuclein Oligomere zurückzuführen. *** bedeutet P<0,0001; * bedeutet P<0,05; Fehlerindikatoren repräsentieren +/- 1 Standardabweichung. S1: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (1-93); S2: α-Synuclein-humane-Gaussia-Luciferase (94-185); Wildtyp α-Synuclein: wildtypisches humanes α-Synuclein; V1S: α-Synuclein-Venus-1 (1-158); SV2: α-Synuclein-Venus-2 (159-238); Mock: Kontrollplasmid.

3,7-fache ab (Abb. 15d). Zusammenfassend lässt dies die Vermutung zu, dass extrazelluläre α-Synuclein Oligomere toxische Eigenschaften aufweisen und den Zelltod auslösen können. Diese Effekte können durch Immunodepletion von α-Synuclein aus den konditionierten Medien abgeschwächt bzw. verhindert werden.

4 Diskussion

In dieser Doktorarbeit wurden extrazelluläre α-Synuclein Oligomere näher charakterisiert und deren physiologische Eigenschaften erforscht. Dazu wurden ein hochsensitiver biolumineszierender Proteinfragmentkomplementierungsansatz und ein neues mikrofluides Kammersystem etabliert. Das Zellkulturmedium repräsentierte hierbei den Extrazellularraum, murine primäre kortikale Neuronen dienten als neuronales Modell, H4 Neurogliomzellen als gliales Modell. Die Aggregation von α-Synuclein und eine damit verbundene Zytotoxizität spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung der Parkinson Krankheit und anderen Synucleinopathien. Momentan wird davon ausgegangen, dass oligomere und präfibrilläre Formen von α-Synuclein die pathogenen Spezies in der Parkinson Erkrankung darstellen (Bodner et al., 2006; Bucciantini et al., 2004; Park et al., 2003). Fibrilläre Formen von α-Synuclein werden derzeit als weniger pathogen angesehen und haben zum Teil neuroprotektive Eigenschaften (Auluck et al., 2002). Obwohl bisher viele Forschungsvorhaben die Hypothese untersucht haben, dass die neuronale Toxizität und neuronale Degeneration von α-Synuclein durch intrazelluläre α-Synuclein Aggregation zustande kommt, wurde in dieser Arbeit eine alternative Hypothese untersucht: Dass eine durch α-Synuclein vermittelte Toxizität teilweise durch die Sekretion von missgefalteten, oligomeren Formen in den Extrazellularraum und deren nachfolgende Aufnahme in benachbarte Zellen zustande kommt.

4.1 α-Synuclein Oligomere werden in den Extrazellularraum sekretiert

In dieser Arbeit konnten mit Hilfe eines Proteinfragment-komplementierungsansatzes und mittels einer DotBlot Analyse α-Synuclein reproduzierbar im Extrazellularraum nachgewiesen werden. Hierbei muss es sich um di- oder oligomere Formen von α-Synuclein handeln, da erst eine Di- oder Oligomerisierung ein Luciferase-Signal erzeugen kann. Des Weiteren ist der im DotBlot verwendete Antikörper oligomerspezifisch und zeigt nur multimere Formen. Neben der Detektion der Oligomere wurde mittels WesternBlot und Größenausschlusschromatographie eine heterogene Population von extrazellulären α-Synuclein Spezies identifiziert, die in ihrer Größe von Dimeren bis ca. 30-Meren reichen. Eine unspezifische Freisetzung konnte mittels eines β-Galactosidase Versuches ausgeschlossen werden. Einen möglichen Störeinfluss

auf die Freisetzung von α-Synuclein stellt die Luciferase-Markierung dar. Hierbei wurde, wenn möglich, der zusätzliche Nachweis des wildtypischen unmarkierten α-Synuclein mittels ELISA, WesternBlot und DotBlot Analyse durchgeführt. Aufgrund eines gleichen Sekretionsverhaltens zwischen dem wildtypischem und dem Luciferase-markierten α-Synuclein konnten Luciferase-bedingte Artefakte ausgeschlossen werden. Eine unspezifische Komplementierung von α-Synuclein konnte durch Inkubation mit entsprechenden anderen mit Luciferase markierten Proteinen wie Aβ-Luciferase ausgeschlossen werden. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf einen aktiven Sekretionsprozess von verschieden α-Synuclein Spezies durch verschiedene Zellpopulationen in den Extrazellularraum hin. Diese Befunde könnten den in anderen Arbeiten erbrachten Nachweis von α-Synuclein in verschiedenen Körperflüssigkeiten erklären. α-Synuclein konnte im Liquor cerebrospinalis detektiert werden und Veränderungen in der α-Synuclein-Menge wurden bereits mit der Parkinson Krankheit assoziiert (Borghi et al., 2000; Mollenhauer et al., 2008). Auch im humanen Blutplasma konnte α-Synuclein nachgewiesen werden (El-Agnaf et al., 2006).

4.2 α-Synuclein Oligomere werden aus dem Extrazellularraum aufgenommen

Zusätzlich zum Nachweis einer aktiven Sekretion von α-Synuclein in den Extrazellularraum konnte auch die Umkehr, also die Aufnahme von oligomerem α-Synuclein aus dem Extrazellularraum, nachgewiesen werden. In Glia-ähnlichen H4 Zellen konnte die Aufnahme von mit fluoreszierendem Farbstoff markierten rekombinanten α-Synuclein Oligomeren als auch die Aufnahme von α-Synuclein Oligomeren aus konditioniertem Medium gezeigt werden. Auch in primären Neuronen konnten α-Synuclein Oligomere sowohl rekombinanten Ursprungs als auch aus konditioniertem Medium gewonnene Oligomere im Zellkörper nachgewiesen werden. Um den Mechanismus der Aufnahme genauer zu untersuchen, wurde ein neuartiges mikrofluides Kammersystem benutzt, welches aus 3 Kompartimenten besteht. Die Kompartimente bestehen aus kleinen Kanälen, die zwischen 10-100µm groß sind und für die Kultur von einigen Tausend Neuronen geeignet sind. Die Kompartimente sind durch zahlreiche Mikrokanäle verbunden, welche als selektive Barriere wirken, indem zwar das Durchwachsen von Axonen möglich ist, jedoch nicht das von Zellkörpern. Durch einen hydrostatischen Druckunterschied findet kein Übertritt von Flüssigkeit

zwischen den Kompartimenten statt. Im ersten Ansatz konnte mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten rekombinanten Oligomeren und mit Luciferase-markierten Oligomeren eine axonale Aufnahme und ein retrograder Transport bis zum Zellkörper beobachtet werden. Die Aufnahme von α-Synuclein aus dem Extrazellularraum steht im Einklang mit bisher veröffentlichten Arbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass monomeres α-Synuclein und präfibrilläre Aggregate von nicht krankheitsrelevanten Proteinen in Zellen translozieren kann. Der Mechanismus blieb bislang ungeklärt. Es scheint, dass die konservierte Wiederholungssequenz von α-Synuclein eine wichtige Rolle in der Translokation spielt (Ahn et al., 2006; Bucciantini et al., 2004). Während für die Aufnahme von monomerem α-Synuclein wahrscheinlich ein passiver Translokationsmechanismus verantwortlich ist, scheinen für die Aufnahme von höhermolekularen α-Synuclein Aggregaten andere Aufnahmemechanismen eine wichtige Rolle zu spielen (Ahn et al., 2006). Auch die Aufnahme von exogen hinzugefügtem, rekombinanten fibrillären α-Synuclein, durch verschiedene humane Neuroblastom Zelllinien, konnte nachgewiesen werden (Lee et al., 2008). Die Autoren vermuten, dass es sich hier um eine Endozytose vermittelte Aufnahme handelt. Auch andere Arbeitsgruppen (Sung et al., 2001) demonstrierten, dass α-Synuclein in einer Rab5a abhängigen Endozytose aufgenommen werden kann. Interessanterweise führte das aufgenommene α-Synuclein zur Ausbildung von intrazytoplasmatischen Ablagerungen, die Ubiquitin, Synaptophysin und Tau enthalten und somit eine Lewy-Körper ähnliche Zusammensetzung zeigen. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass exogen hinzugegebenes α-Synuclein die Bildung von Lewy-Körper ähnlichen intrazytoplasmatischen Einschlüssen induzieren kann (Luk et al., 2009; Volpicelli-Daley et al., 2011). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass bestimmte rekombinante α-Synuclein Spezies bei Zugabe ins Zellkulturmedium zum Zelltod führen können, wohingegen eine strukturell unterschiedliche α-Synuclein Spezies zur Ausbildung einer Lewy-Körper ähnlichen Struktur führt (Danzer et al., 2007, 2009). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes α-Synuclein auch *in vivo* nach intrakortikaler Injektion durch Neurone aufgenommen wird (Hansen et al., 2011).

4.3 α-Synuclein Oligomere werden interzellulär transmittiert

Der Nachweis der Freisetzung und der Aufnahme von α-Synuclein Oligomeren weisen auf eine interzelluläre Transmission von α-Synuclein hin, da von Glia-ähnlichen H4 Zellen sekretierte α-Synuclein Oligomere von naiven Glia-ähnlichen H4 Schwesterkulturen aufgenommen werden konnten. Dies stellt eine Transmission von α-Synuclein Oligomeren von Gliazellen zu Gliazellen dar. In einem weiteren Ansatz konnte mit Hilfe der flüssigkeitsgetrennten Kompartimente des mikrofluiden Kammersystems eine Ko-Kultur zwischen Glia-ähnlichen Zellen und primären Neuronen, trotz sehr unterschiedlicher Anforderungen der Zellpopulationen, realisiert werden. Hier zeigte sich eine bidirektionale Transmission von α-Synuclein Oligomeren von Neuronen und Gliazellen. Das heißt, es fand sowohl in den primären Neuronen als auch in den Glia-ähnlichen H4 Zellen eine Aufnahme und Freisetzung von α-Synuclein Oligomeren statt. Darüber hinaus konnte durch das langgestreckte axonale Kompartiment des mikrofluiden Kammersystems sowohl ein antegrader als auch ein retrograder axonaler Transport von Oligomeren beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine interneuronale Transmission von α-Synuclein Oligomeren beobachtet werden, indem im mikrofluiden Kammersystem die Glia-ähnlichen H4 Zellen durch primäre Neurone ausgetauscht wurden. Interessanterweise zeigten sich auch α-Synuclein Aggregate in weiter entfernten Neuronen, die keinen direkten axonalen Kontakt mit den Neuronen der anderen Seite hatten. Somit kann von einer Ausbreitung der α-Synuclein Aggregate innerhalb des neuronalen Netzwerkes ausgegangen werden. Insgesamt liefern diese Daten einen Hinweis auf den Transfer von α-Synuclein über Membrangrenzen hinaus, was einer Transmission von α-Synuclein Oligomeren von Neuron zu Neuron, von Gliazellen zu Gliazellen und Neuronen und nicht neuronalen Zellen und umgekehrt entspricht. Der Mechanismus einer transsynaptischen Ausbreitung unterstützt eine neuere Arbeit, die eine Transmission von neuronalen Zellen, welche α-Synuclein überexprimieren, zu transplantierten embryonalen Stammzellen sowohl in Zellkulturen als auch in transgenen Tieren beschrieben haben (Desplats et al., 2009). Die gezeigte transsynaptische α-Synuclein Ausbreitung könnte aktuellen Studien zu Grunde liegen, welche gezeigt haben, dass bei Parkinson Patienten transplantierte gesunde Neurone schrittweise dieselbe Pathologie entwickeln wie das umgebende betroffene Wirtsgewebe (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Die

Befunde dieser Arbeit weisen in dieselbe Richtung wie die pathologischen Befunde von Braak et. al. Da die Lewy-Körper Pathologie in der Parkinson Erkrankung in einer hierarchischen Verteilung auftritt, haben Braak et. al. postuliert, dass sich die Pathologie schrittweise über die Gehirn-Rückenmarks-Achse ausbreitet, wenn die Parkinson-Erkrankung weiter voranschreitet (Braak et al., 2003). Insgesamt zeigt die Transmission von α-Synuclein deutliche Ähnlichkeiten zu Prionerkrankungen (Caughey, 2000). Auch in Alzheimer Modellen konnte gezeigt werden, dass Gehirnextrakte von Alzheimerpatienten oder von Amyloid Precursor Protein (APP) transgenen Mäusen eine Alzheimer ähnliche Erkrankung auslösen können, wenn diese in die Gehirne junger APP transgener Tiere injiziert wurden (Meyer-Luehmann et al., 2006). Ähnliche Eigenschaften in Ausbreitung und Aggregation wiesen auch das Protein Tau und Polyglutamin Proteine auf (Frost et al., 2009; Ren et al., 2009). Deshalb kann der Nachweis der Zell zu Zell Transmission von α-Synuclein auch Hinweise auf die Entstehung anderer neurodegenerativer Erkrankungen liefern. Der genaue Mechanismus der Sekretion und der Aufnahme der zu Aggregation neigenden Proteine, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Jedoch gibt es Hinweise, dass α-Synuclein mit Hilfe von externalisierten Vesikeln sekretiert wird, welche zahlreiche Charakteristika von Exosomen haben (Emmanouilidou et al., 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine lysosomale Dysfunktion die Sekretion von α-Synuclein via Exosomen erhöht (Alvarez-Erviti et al., 2011). Darüber hinaus konnten oligomere Formen von α-Synuclein in exosomalen Präparationen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass α-Synuclein Oligomere assoziiert mit Exosomen von benachbarten Zellen aufgenommen werden und dort zu Zelltod führen können. Eine andere Hypothese der Ausbreitung von α-Synuclein Oligomeren beinhaltet die Ausbildung von Tunneling Nanotubes (TNT). TNT sind aktinhaltige Nanotubes, die den Transport von Vesikeln ermöglichen (Rustom et al., 2004). Aktin-vermittelte Motoren spielen hierbei eine wichtige Rolle im Transportablauf. Insbesondere Prionproteine scheinen über diesen Weg transmittiert zu werden, indem sich Nanotubes zwischen infizierten und naiven neuronalen Zellen ausbilden können. Zudem konnten auch Nanotubes zwischen dendritischen Zellen und Neuronen nachgewiesen werden, was eine zellpopulationsübergreifende Transmission ermöglicht. Bislang konnte den Nanotubes nur in Prionerkrankungen eine klinische Relevanz zugesprochen

werden, jedoch ist der Zusammenhang zwischen Nanotubes und anderen neurodegenerativen Erkrankung Gegenstand intensiver Forschung.

4.4 Die Transmission von α-Synuclein erfolgt in Oligomerform

Die interzelluläre Transmission konnte durch die vorherigen Experimente bewiesen werden, jedoch lieferten sie keine Hinweise in welcher Form α-Synuclein transmittiert wurde. Zu diesem Zweck wurde in einem weiteren Ansatz erneut eine Ko-Kultur zwischen H4 Gilazellen und primären Neuronen im mikrofluiden Kammersystem benutzt. Die H4 Zellen wurden jedoch in diesem Ansatz zuvor mit zwei Viren infiziert, die die jeweiligen komplementären Hälften des Venus-YFP Gens exprimieren. Die Zellkörper der H4 Zellen zeigten frühzeitig starke YFP Fluoreszenzsignale, die auf eine intrazelluläre Oligomerisierung von α-Synuclein deuten. Nach einiger Zeit konnten, zunächst in den axonalen Ausläufern, anschließend aber auch in den Zellkörpern der primären Neuronen zunehmende Signale detektiert werden. Dies spricht für eine Transmission in oligomerer Form und gegen eine Wanderung als Monomer mit anschließender in situ Oligomerisierung, da hier keine Venus YFP Signale zu erwarten wären.

4.5 Extrazelluläre α-Synuclein Oligomere sind zytotoxisch

Um die physiologischen bzw. pathophysiologischen Eigenschaften der sekretierten α-Synuclein Oligomere genauer zu untersuchen, wurden naive Glia-ähnliche H4 Zellen und primäre Neuronen mit S1/S2 konditioniertem Medium inkubiert. Hierbei zeigten sich, sowohl in den H4 Zellen als auch in den primären Neuronen, signifikante Erhöhungen in den Caspase 3/7 Aktivitäten, was für einen zytotoxischen Einfluss der α-Synuclein Oligomere spricht. Diese toxischen Effekte konnten durch Immunodepletion von α-Synuclein deutlich reduziert werden. Es kann also von einer spezifisch durch α-Synuclein Oligomere verursachten Toxizität ausgegangen werden. Dies liegt in Übereinstimmung mit der Literatur, in der durch exogene Zugabe von rekombinanten α-Synuclein Oligomeren zytotoxische Effekte ausgelöst werden konnten, die sich zwischen einzelnen Oligomerarten unterschieden (Danzer et al., 2007, 2009). Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf α-Synuclein als ein sich ausbreitendes pathogenes Agens hin, welches in einer speziellen Konformation in den Extrazellularraum sekretiert und zwischen

Zellen transmittiert werden kann, was dort wiederum in benachbarten Neuronen zu einem beschleunigtem Zelltod führen kann.

4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend liefert diese Arbeit den Nachweis, dass α-Synuclein Oligomere von verschiedenen Zellarten freigesetzt werden und zwischen Zellen transmittiert werden können. Die transmittierten Oligomere scheinen hierbei schädliche Auswirkungen auf benachbarte Zellen zu haben. Der Mechanismus der transsynaptischen und transaxonalen Ausbreitung könnte für die Progression der Parkinson Krankheit entscheidend sein. Es kann daher gefolgert werden, dass die zukünftige Entdeckung neuer Substanzen, die die systematische Ausbreitung toxischer α-Synuclein Spezies über das Gehirn hinweg stoppen, reduzieren oder verlangsamen, zu einer neuen Generation von Therapeutika von Parkinson führen könnten.

5 Zusammenfassung

Die Parkinson Erkrankung ist durch eine progressive neuronale Degeneration im Bereich der Substantia Nigra und in zahlreichen weiteren neuronalen Zellsystemen gekennzeichnet. Als histopathologisches Charakteristikum können Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten nachgewiesen werden. Hauptbestandteil dieser Ablagerungen stellt α-Synuclein dar, dessen physiologische Funktion bis heute noch nicht vollständig geklärt ist. Es scheint jedoch eine wichtige Rolle in der Transmitterfreisetzung und der synaptischen Plastizität zu spielen. α-Synuclein kommt im physiologischen Zustand als lösliches Monomer vor, in Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten jedoch liegt es in aggregierter Form vor. Während bis vor einiger Zeit fibrilläres α-Synuclein im Zentrum intensiver Forschungen stand, wird heute davon ausgegangen, dass deren oligomere Vorstufen die toxischen Spezies in der Parkinson Erkrankung darstellen. Ein Meilenstein im Verständnis der Ausbreitung der Lewy-Körperchen Pathologie war die Tatsache, dass Parkinson Patienten, die mit transplantierten gesunden embryonalen Stammzellen behandelt wurden, Lewy-Körperchen in den Stammzellen entwickelten. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob α-Synuclein von Zellen sekretiert und von anderen Zellen wiederaufgenommen werden kann und somit als mögliches pathogenes Agens wirken könnte. Mit Hilfe eines hochsensitiven Luciferase Proteinfragmentkomplementierungsansatzes wurden zunächst Kulturmedien von Glia-ähnlichen H4 Zellen und primären neuronalen Zellen auf α-Synuclein Oligomere hin untersucht, nachdem sie mit wildtypischen oder markierten α-Synuclein Plasmiden transfiziert wurden. Des Weiteren wurde dasselbe Medium mit einer DotBlot Analyse und einem Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) auf α-Synuclein hin untersucht. Hierbei konnten reproduzierbar α-Synuclein Oligomere im Extrazellularraum nachgewiesen werden. Um die sich im Extrazellularraum befindlichen α-Synuclein Oligomere genauer zu charakterisieren, wurde das konditionierte Medium mittels Größenausschlusschromatographie und mittels WesternBlot Analyse untersucht. Hierbei zeigten sich heterogene α-Synuclein Spezies, die von Monomeren bis zu hochmolekularen multimeren Formen reichen. Um den Umkehrschluß, also die Aufnahme der extrazellulären α-Synuclein Oligomere zu untersuchen, wurden naive Neuronen- und gliale Zellkulturen mit α-Synuclein konditioniertem Medium

inkubiert und die Zellkörper anschließend auf α-Synuclein Oligomere untersucht. Auch hier konnte mit Hilfe des Luciferase Proteinfragment-komplementierungsansatzes gezeigt werden, dass die extrazellulären α-Synuclein Oligomere aufgenommen werden. Mit Hilfe eines mikrofluiden Kammersystems konnte überdies gezeigt werden, dass α-Synuclein Oligomere axonal aufgenommen und retrograd zum Zellkörper hin transportiert werden. Dies konnte sowohl für sekretierte α-Synuclein Oligomere aus konditionierten Medien als auch für fluoreszenzmarkierte rekombinante Oligomere gezeigt werden. Um eine interzelluläre Transmission beweisen zu können, wurden Gliazellen und Neuronen innerhalb des mikrofluiden Kammersystems ko-kultiviert. Hierbei zeigte sich nach separater Infektion mit zwei verschiedenen Adeno-Assoziierten-Viren Typ 8, die zueinander komplementären Venus-Green-Fluorescent-Protein-Hälften exprimieren, eine bidirektionale Transmission zwischen Neuronen und Gliazellen. Dasselbe Ergebnis zeigte sich nach Austausch der Glia Zellen durch Neuronen. Es kann also von einer transaxonalen und transsynaptischen Ausbreitung der α-Synuclein Oligomere ausgegangen werden, die auch zwischen verschiedenen Zellarten stattfinden kann. Dieses Modell gibt Hinweise auf die Ausbreitung der beschriebenen Lewy-Körper Pathologie, die mittels aggregierten α-Synuclein Oligomeren stattfinden könnte. Um mögliche schädigende Einflüsse dieser sich ausbreitenden α-Synuclein Oligomere zu zeigen, wurden die mit α-Synuclein konditionierten Medien behandelten primären Neuronen und Gliazellen auf ihre Caspase 3/7 Aktivität untersucht, die toxische Einflüsse sensitiv anzeigen kann. Hierbei zeigte sich ein reproduzierbarer toxischer Effekt der Oligomere, der nach Immunodepletion von α-Synuclein deutlich abgeschwächt war und somit spezifisch auf α-Synuclein zurückzuführen ist. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit die Freisetzung von α-Synuclein Oligomeren in den Extrazellularraum, die Wiederaufnahme dieser Oligomere und deren weitere transsynaptische und transaxonale Ausbreitung. Diese oligomeren Formen von α-Synuclein haben zytotoxische Eigenschaften unabhängig auf welche Zellpopulationen sie wirken oder von welchen Zellpopulationen sie freigesetzt werden. Diese Mechanismen scheinen eine wichtige Rolle in der Entstehung und im Verlauf von Morbus Parkinson und anderen Synucleinopathien zu haben und bieten somit möglicherweise die Option zu neuen Therapiestrategien oder krankheitsmodifizierenden Substanzen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abeliovich, A; Schmitz, Y; Fariñas, 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.

2. Ahn, K. J.; Paik, S. R.; Chung, K. C.; Kim, J. (2006): Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein.
Journal of Neurochemistry. 97, 265–279.

3. Alvarez-Erviti, Lydia; Seow, Yiqi; Schapira, Anthony H; Gardiner, Chris; Sargent, Ian L; Wood, Matthew J A; Cooper, J Mark (2011): Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission.
Neurobiology of Disease. 42, 360–367.

4. Auluck, P.K.; Chan, H.Y.E.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.-Y.; Bonini, N.M. (2002): Chaperone suppression of a-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease.
Science. 295, 865–868.

5. Bayer, T A; Jäkälä, P; Hartmann, T; Havas, L; McLean, C; Culvenor, J G; Li, Q X; Masters, C L; Falkai, P; Beyreuther, K (1999): Alpha-synuclein accumulates in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies but not in Alzheimer's disease beta-amyloid plaque cores.
Neuroscience Letters. 266, 213–216.

6. Becker, Georg; Müller, Antje; Braune, Stefan; Büttner, Thomas; Benecke, Reiner; Greulich, Wolfgang; Klein, Wolfgang; Mark, Günter; Rieke, Jürgen; Thümler, Reiner (2002): Early diagnosis of Parkinson's disease.
Journal of Neurology. 249, 40–48.

7. Betarbet, R.; Sherer, T. B.; MacKenzie, G.; Garcia-Osuna, M.; Panov, A. V.; Greenamyre, J. T. (2000): Chronic systemic pesticide exposure reproduces

features of Parkinson's disease.
Nature Neuroscience. 3, 1301–1306.

8. Bodner, R. A.; Outeiro, T. F.; Altmann, S.; Maxwell, M. M.; Cho, S. H.; Hyman, B. T.; McLean, P. J.; Young, A. B.; Housman, D. E.; Kazantsev, A. G. (2006): Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103, 4246–4251.

9. Borghi, R.; Marchese, R.; Negro, A.; Marinelli, L.; Forloni, G.; Zaccheo, D.; Abbruzzese, G.; Tabaton, M. (2000): Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects.
Neuroscience Letters. 287, 65–67.

10. Braak, H.; Del Tredici, K.; Rub, 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.

11. Bucciantini, M.; Calloni, G.; Chiti, F.; Formigli, L.; Nosi, D.; Dobson, C. M.; Stefani, M. (2004): Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity.
The Journal of Biological Chemistry. 279, 31374–31382.

12. Caughey, B. (2000): Transmissible spongiform encephalopathies, amyloidoses and yeast prions: common threads?
Nature Medicine. 6, 751–754.

13. Caughey, B; Lansbury, Peter T (2003): Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders.
Annual Review of Neuroscience. 26, 267–298.

14. Chade, A R; Kasten, M; Tanner, C M (2006): Nongenetic causes of Parkinson's disease.
Journal of Neural Transmission. 70, 147–151.

15. Chandra, Sreeganga; Gallardo, Gilbert; Fernández-Chacón, Rafael; Schlüter, Oliver M; Südhof, Thomas C (2005): Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration.
Cell. 123, 383–396.

16. 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.

17. Chuang, T H; Bohl, B P; Bokoch, G M (1993): Biologically active lipids are regulators of Rac.GDI complexation.
The Journal of Biological Chemistry. 268, 26206–26211.

18. Clayton, D.F.; George, J.M. (1999): Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders.
Journal of Neuroscience Research. 58, 120–129.

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

20. Conway, K.A.; Lee, S-J.; Rochet, J-C.; Ding, T.T.; Williamson, R.E.; P.T. Lansbury, Jr. (2000): Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both a-synuclein mutations limked 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.

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

22. Danzer, K. M.; Haasen, D.; Karow, A. R.; Moussaud, S.; Habeck, M.; Giese, A.; Kretzschmar, H.; Hengerer, B.; Kostka, M. (2007): Different species of

alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding.
The Journal of Neuroscience. 27, 9220–9232.

23. Danzer, K. M.; Krebs, S. K.; Wolff, M.; Birk, G.; Hengerer, B. (2009a): Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology.
Journal of Neurochemistry. 111, 192–203.

24. Danzer, K. M.; Ruf, W. P.; Putcha, P.; Joyner, D.; Hashimoto, T.; Glabe, C.; Hyman, B. T.; McLean, P. J. (2011): Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity.
The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 25, 326–336.

25. Danzer, K. M.; Schnack, C.; Sutcliffe, A.; Hengerer, B.; Gillardon, F. (2007): Functional protein kinase arrays reveal inhibition of p-21-activated kinase 4 by alpha-synuclein oligomers.
Journal of Neurochemistry. 103, 2401–2407.

26. Davidson, W.S.; Jonas, A.; Clayton, D.F.; George, J.M. (1998): Stabilization of a-Synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes.
The Journal of Biological Chemistry. 273, 9443–9449.

27. Desplats, P.; Lee, H. J.; Bae, E. J.; Patrick, C.; Rockenstein, E.; Crews, L.; Spencer, B.; Masliah, E.; Lee, S. J. (2009): Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106, 13010–13015.

28. El-Agnaf, O. M.; Irvine, G B (2002): Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides.
Biochemical Society Transactions. 30, 559–565.

29. El-Agnaf, O. M.; Salem, S. A.; Paleologou, K. E.; Curran, M. D.; Gibson, M. J.; Court, J. A.; Schlossmacher, M. G.; Allsop, D. (2006): Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential

biomarker for Parkinson's disease.
The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 20, 419–425.

30. El-Agnaf, O.M.; Jakes, R.; Curran, M.D.; Middleton, D.; Ingenito, R.; Bianchi, E.; Pessi, A.; Neill, D.; Wallace, A. (1998a): Aggregates from mutant and wild-type a-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of b-sheet and amyloid-like filaments.
FEBS Letters. 440, 71–75.

31. El-Agnaf, O.M.; Jakes, R.; Curran, M.D.; Wallace, A. (1998b): Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of a-synuclein protein implicatde in Parkinson's disease.
FEBS Letters. 440, 67–70.

32. Emmanouilidou, E.; Melachroinou, K.; Roumeliotis, T.; Garbis, S. D.; Ntzouni, M.; Margaritis, L. H.; Stefanis, L.; Vekrellis, K. (2010): Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival.
Journal of Neuroscience. 30, 6838–6851.

33. Forman, Mark S; Lee, Virginia M-Y; Trojanowski, John Q (2005): Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quagmire.
Neuron. 47, 479–482.

34. Forno, L S (1996): Neuropathology of Parkinson's disease.
Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 55, 259–272.

35. Frost, B.; Jacks, R. L.; Diamond, M. I. (2009): Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell.
The Journal of Biological Chemistry. 284, 12845–12852.

36. Galpern, Wendy R; Lang, Anthony E (2006): Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins.
Annals of Neurology. 59, 449–458.

37. Gasser, T (2001): Genetics of Parkinson's disease.
Journal of Neurology. 248, 833–840.

38. 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.

39. 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.
The Journal of Biological Chemistry. 276, 2380–2386.

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

41. Giladi, N; Treves, T A; Paleacu, D; Shabtai, H; Orlov, Y; Kandinov, B; Simon, E S; Korczyn, A D (2000): Risk factors for dementia, depression and psychosis in long-standing Parkinson's disease.
Journal of Neural Transmission. 107, 59–71.

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

43. Goldberg, M S; Lansbury, P T, Jr (2000): Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease?
Nature Cell Biology. 2, 115–119.

44. Golts, Natalie; Snyder, Heather; Frasier, Mark; Theisler, Catherine; Choi, Peter; Wolozin, Benjamin (2002): Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of alpha-synuclein.
The Journal of Biological Chemistry. 277, 16116–16123.

45. Gosavi, Nirmal; Lee, He-Jin; Lee, Jun Sung; Patel, Smita; Lee, Seung-Jae (2002): Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-

synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion.
The Journal of Biological Chemistry. 277, 48984–48992.

46. Götz, Mario E; Double, Kay; Gerlach, Manfred; Youdim, Moussa B H; Riederer, Peter (2004): The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease
Annals of the New York Academy of Sciences. 1012, 193–208.

47. Greenbaum, Eric A; Graves, Charles L; Mishizen-Eberz, Amanda J; Lupoli, Michael A; Lynch, David R; Englander, S Walter; Axelsen, Paul H; Giasson, Benoit I (2005): The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation.
The Journal of Biological Chemistry. 280, 7800–7807.

48. Greten-Harrison, Becket; Polydoro, Manuela; Morimoto-Tomita, Megumi; Diao, Ling; Williams, Andrew M; Nie, Esther H; Makani, Sachin; Tian, Ning; Castillo, Pablo E; Buchman, Vladimir L; Chandra, Sreeganga S (2010): αβγ-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 107, 19573–19578.

49. Hansen, Christian; Angot, Elodie; Bergström, Ann-Louise; Steiner, Jennifer A.; Pieri, Laura; Paul, Gesine; Outeiro, Tiago F.; Melki, Ronald; Kallunki, Pekka; Fog, Karina; Li, Jia-Yi; Brundin, Patrik (2011): α-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells.
The Journal of Clinical Investigation. 121, 715–725.

50. Hoyer, Wolfgang; Antony, Thomas; Cherny, Dmitry; Heim, Gudrun; Jovin, Thomas M; Subramaniam, Vinod (2002): Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions.
Journal of Molecular Biology. 322, 383–393.

51. Ibáñez, P; Bonnet, A-M; Débarges, B; Lohmann, E; Tison, F; Pollak, P; Agid, Y; Dürr, A; Brice, A (2004): Causal relation between alpha-synuclein

gene duplication and familial Parkinson's disease.
Lancet. 364, 1169–1171.

52. Ishizawa, Takashi; Mattila, Petri; Davies, Peter; Wang, Dengshun; Dickson, Dennis W (2003): Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies.
Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. 62, 389–397.

53. Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; Silva, H.A.R. de; Kittel, A.; Saitoh, T. (1995): The precursor protein of non-Ab component of alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system.
Neuron. 14, 467–475.

54. Jakes, R.; Spillantini, M.G.; Goedert, M. (1994): Identification of two distinct synucleins from human brain.
FEBS Letters. 345, 27–32.

55. 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.

56. Khan, W A; Blobe, G C; Richards, A L; Hannun, Y A (1994): Identification, partial purification, and characterization of a novel phospholipid-dependent and fatty acid-activated protein kinase from human platelets.
The Journal of Biological Chemistry. 269, 9729–9735.

57. Kordower, J. H.; Chu, Y.; Hauser, R. A.; Freeman, T. B.; Olanow, C. W. (2008): Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease.
Nature Medicine. 14, 504–506.

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

59. Krüger, R.; Kuhn, W.; Müller, T.; Woitalla, D.; Graeber, M.; Kosel, S.; Przuntek, H.; Epplen, J.T.; Schols, L.; Riess, O. (1998): Ala30Pro mutation in the gene encoding a-synuclein in Parkinson's disease.
Nature Genetics. 18, 106–108.

60. Langston, J W (1998): Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate.
Annals of Neurology. 44, 45–52.

61. Lavedan, C. (1998): The synuclein family.
Genome Research. 8, 871–880.

62. Lee, F J; Liu, F; Pristupa, Z B; Niznik, H B (2001): Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis.
The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 15, 916–926.

63. Lee, H. J.; Suk, J. E.; Bae, E. J.; Lee, J. H.; Paik, S. R.; Lee, S. J. (2008): Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein.
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 40, 1835–1849.

64. Lewy F. H.; Lewandowsky M. (1912): Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie.
In: Handbuch der Neurologie, Springer Verlag, Berlin, S. 920–933.

65. 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.

66. Li, J. Y.; Englund, E.; Holton, J. L.; Soulet, D.; Hagell, P.; Lees, A. J.; Lashley, T.; Quinn, N. P.; Rehncrona, S.; Bjorklund, A.; Widner, H.; Revesz, T.; Lindvall, O.; Brundin, P. (2008): Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease

propagation.
Nature Medicine. 14, 501–503.

67. Luk, K. C.; Song, C.; O'Brien, P.; Stieber, A.; Branch, J. R.; Brunden, K. R.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. (2009): Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106, 20051–20056.

68. Maraganore, Demetrius M; de Andrade, Mariza; Elbaz, Alexis; Farrer, Matthew J; Ioannidis, John P; Krüger, Rejko; Rocca, Walter A; Schneider, Nicole K; Lesnick, Timothy G; Lincoln, Sarah J; Hulihan, Mary M; Aasly, Jan O; Ashizawa, Tetsuo; Chartier-Harlin, Marie-Christine; Checkoway, Harvey; Ferrarese, Carlo; Hadjigeorgiou, Georgios; Hattori, Nobutaka; Kawakami, Hideshi; Lambert, Jean-Charles; Lynch, Timothy; Mellick, George D; Papapetropoulos, Spiridon; Parsian, Abbas; Quattrone, Aldo; Riess, Olaf; Tan, Eng-King; Van Broeckhoven, Christine (2006): Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease.
The Journal of the American Medical Association. 296, 661–670.

69. Maroteaux, L.; Campanelli, J.T.; Scheller, R.H. (1988): Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal.
The Journal of Neuroscience. 8, 2804–2815.

70. Masliah, E; Iwai, A; Mallory, M; Uéda, K; Saitoh, T (1996): Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease.
The American Journal of Pathology. 148, 201–210.

71. Masliah, 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 a-synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders.
Science. 287, 1265–1269.

72. McLean, Pamela J; Hyman, Bradley T (2002): An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation.
Neuroscience Letters. 323, 219–223.

73. Meyer-Luehmann, M.; Coomaraswamy, J.; Bolmont, T.; Kaeser, S.; Schaefer, C.; Kilger, E.; Neuenschwander, A.; Abramowski, D.; Frey, P.; Jaton, A. L.; Vigouret, J. M.; Paganetti, P.; Walsh, D. M.; Mathews, P. M.; Ghiso, J.; Staufenbiel, M.; Walker, L. C.; Jucker, M. (2006): Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host.
Science. 313, 1781–1784.

74. Mollenhauer, Brit; Cullen, Valerie; Kahn, Ilana; Krastins, Bryan; Outeiro, Tiago F; Pepivani, Imelda; Ng, Juliana; Schulz-Schaeffer, Walter; Kretzschmar, Hans A; McLean, Pamela J; Trenkwalder, Claudia; Sarracino, David A; Vonsattel, Jean-Paul; Locascio, Joseph J; El-Agnaf, Omar M A; Schlossmacher, Michael G (2008): Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration.
Experimental Neurology. 213, 315–325.

75. Morris, A J; Hammond, S M; Colley, C; Sung, T C; Jenco, J M; Sciorra, V A; Rudge, S A; Frohman, M A (1997): Regulation and functions of phospholipase D.
Biochemical Society Transactions. 25, 1151–1157.

76. Muangpaisan, Weerasak; Hori, Hiroyuki; Brayne, Carol (2009): Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia.
Journal of Epidemiology / Japan Epidemiological Association. 19, 281–293.

77. Munishkina, Larissa A; Phelan, Cassandra; Uversky, Vladimir N; Fink, Anthony L (2003): Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes.
Biochemistry. 42, 2720–2730.

78. 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.
The Journal of Neuroscience. 20, 3214–3220.

79. Murray, Ian V J; Giasson, Benoit I; Quinn, Shawn M; Koppaka, Vishwanath; Axelsen, Paul H; Ischiropoulos, Harry; Trojanowski, John Q; Lee, Virginia M-Y (2003): Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro.
Biochemistry. 42, 8530–8540.

80. Narhi, L; Wood, S J; Steavenson, S; Jiang, Y; 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.
The Journal of Biological Chemistry. 274, 9843–9846.

81. Nemani, Venu M; Lu, Wei; Berge, Victoria; Nakamura, Ken; Onoa, Bibiana; Lee, Michael K; Chaudhry, Farrukh A; Nicoll, Roger A; Edwards, Robert H (2010): Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis.
Neuron. 65, 66–79.

82. 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.
The Journal of Neuroscience 19, 5782–5791.

83. Ostrerova-Golts, N.; Petrucelli, L.; Hardy, J.; Lee, J. M.; Farer, M.; Wolozin, B. (2000): The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity.
The Journal of Neuroscience 20, 6048–6054.

84. Outeiro, T. F.; Putcha, P.; Tetzlaff, J. E.; Spoelgen, R.; Koker, M.; Carvalho, F.; Hyman, B. T.; McLean, P. J. (2008): Formation of toxic oligomeric alpha-

synuclein species in living cells.
PLOS ONE. 3, 1867.

85. Paik, S R; Shin, H J; Lee, J H (2000): Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein in the presence of Copper(II) and hydrogen peroxide.
Archives of Biochemistry and Biophysics. 378, 269–277.

86. Paik, S R; Shin, H J; Lee, J H; Chang, C S; Kim, J (1999): Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein.
The Biochemical Journal. 340, 821–828.

87. Pandey, Neeraj; Schmidt, Robert E; Galvin, James E (2006): The alpha-synuclein mutation E46K promotes aggregation in cultured cells.
Experimental Neurology. 197, 515–520.

88. Park, J. Y.; Lansbury, P. T. (2003): Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease.
Biochemistry. 42, 3696–3700.

89. Perez, Ruth G; Waymire, Jack C; Lin, Eva; Liu, Jen J; Guo, Fengli; Zigmond, Michael J (2002): A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis.
The Journal of Neuroscience. 22, 3090–3099.

90. Petersen, K; Olesen, O F; Mikkelsen, J D (1999): Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex.
Neuroscience. 91, 651–659.

91. Polymeropoulos, M H; Higgins, J J; Golbe, L I; Johnson, W G; Ide, S E; Di Iorio, G; Sanges, G; Stenroos, E S; Pho, L T; Schaffer, A A; Lazzarini, A M; Nussbaum, R L; Duvoisin, R C (1996): Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23.
Science. 274, 1197–1199.

92. Polymeropoulos, M.H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Idle, S.E.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Pike, B.; Root, H.; Rubenstein, J.; Boyer, R.; Stenroos, E.S.;

Chandrasekharappa, S.; Athanassiadou, A.; Papaetropoulos, T.; Johnson, W.G.; Lazzarini, A.M.; Duvoisin, R.C.; Iorio, G. Di; Golbe, L.I.; Nussbaum, R.L. (1997): Mutation in the a-Synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.
Science. 276, 2045–2047.

93. Remy, I.; Michnick, S. W. (2006): A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase.
Nature Methods. 3, 977–979.

94. Ren, P. H.; Lauckner, J. E.; Kachirskaia, I.; Heuser, J. E.; Melki, R.; Kopito, R. R. (2009): Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates.
Nature Cell Biology. 11, 219–225.

95. Rustom, Amin; Saffrich, Rainer; Markovic, Ivanka; Walther, Paul; Gerdes, Hans-Hermann (2004): Nanotubular highways for intercellular organelle transport.
Science. 303, 1007–1010.

96. 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.; Muenter, M.; Baptista, M.; Miller, D.; Blancato, J.; Hardy, J.; Gwinn-Hardy, K. (2003): alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease.
Science. 302, 840-841.

97. Smith, W. W.; Jiang, H.; Pei, Z.; Tanaka, Y.; Morita, H.; Sawa, A.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Ross, C. A. (2005): Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity.
Human Molecular Genetics. 14, 3801–3811.

98. Souza, J M; Giasson, B I; Lee, V M; Ischiropoulos, H (2000): Chaperone-like activity of synucleins.
FEBS Letters. 474, 116–119.

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

100. Sung, J. Y.; Kim, J.; Paik, S. R.; Park, J. H.; Ahn, Y. S.; Chung, K. C. (2001): Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein.
Journal of Biological Chemistry. 276, 27441–27448.

101. Taylor, A. M.; Blurton-Jones, M.; Rhee, S. W.; Cribbs, D. H.; Cotman, C. W.; Jeon, N. L. (2005): A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport.
Nature Methods. 2, 599–605.

102. Thomas, Bobby; Beal, M Flint (2011): Molecular insights into Parkinson's disease.
F1000 Medicine Reports. 3, 7.

103. Tokuda, Takahiko; Salem, Sultan A; Allsop, David; Mizuno, Toshiki; Nakagawa, Masanori; Qureshi, Mohamed M; Locascio, Joseph J; Schlossmacher, Michael G; El-Agnaf, Omar M A (2006): Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 349, 162–166.

104. Uéda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, D.; 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.

105. Uversky, V. N.; Fink, A. L. (2002): Amino acid determinants of alpha-synuclein aggregation: putting together pieces of the puzzle.
FEBS Letters. 522, 9–13.

106. Volpicelli-Daley, Laura A; Luk, Kelvin C; Patel, Tapan P; Tanik, Selcuk A; Riddle, Dawn M; Stieber, Anna; Meaney, David F; Trojanowski, John Q; Lee, Virginia M-Y (2011): Exogenous α-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death.
Neuron. 72, 57–71.

107. Wersinger, Christophe; Prou, Delphine; Vernier, Philippe; Sidhu, Anita (2003a): Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress.
The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 17, 2151–2153.

108. Wersinger, Christophe; Sidhu, Anita (2003b): Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. In: Neuroscience Letters. 340 (3), S. 189–192Wood, S.J.; Wypych, J.; Steavenson, S.; Louis, J.-C.; Citron, M.; Biere, A.L. (1999): α-Synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent: implications for the pathogenesis of Parkinson’s disease.
Journal of Biological Chemistry. 274, 19509–19512.

109. Xu, W.; Marcu, M.; Yuan, X.; Mimnaugh, E.; Patterson, C.; Neckers, L. (2002): Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99, 12847–12852.

110. 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 Tortosa, 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.

111. Zecca, Luigi; Fariello, Ruggero; Riederer, Peter; Sulzer, David; Gatti, Alberto; Tampellini, Davide (2002): The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and isdramatically decreased in Parkinson's disease.
FEBS Letters. 510, 216–220.

112. Zecca, Luigi; Zucca, Fabio A; Wilms, Henrik; Sulzer, David (2003): Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics.
Trends in Neurosciences. 26, 578–580.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Markus Otto danke ich für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit diese experimentelle Arbeit durchzuführen. Herrn Prof. Dr. A. Ludolph danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut zu arbeiten.

Frau Pamela McLean Ph.D., meiner Betreuerin am MIND, danke ich für die Motivation und Inspiration während allen Phasen dieser Arbeit. Bei Herrn Bradley T. Hyman M.D., Ph.D. bedanke ich mich für die Chance große Teile dieser Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Jun. Prof. Dr. Karin Danzer für ihre zahlreichen Ratschläge und für ihr Talent, die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten zu vermitteln, bedanken.

Für ihre exzellente Hilfe sowie die stets freundliche und angenehme Zusammenarbeit bin ich Preeti Putcha, Lisa Kranich, Suneil Kalia, Lorraine Kalia, Nikolaus McFarland, Vivek Unni, Zhanyun Fan und Laura Kibuuka dankbar.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Verantwortlichen des Promotionsprogrammes für experimentelle Medizin für die lehrreichen Seminare und die finanzielle Förderung bedanken. Die wertvollen konstruktiven Vorschläge waren eine große Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Geschwistern und meinen Eltern für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung in allen Bereichen meines Studiums und beim Anfertigen dieser Arbeit danken. Meiner Freundin Petra danke ich für ihre Geduld und ihre großartige Unterstützung.

Wolfgang Ruf,

Ulm, 08. August 2012

Lebenslauf

Persönliche Daten

Wolfgang Ruf
Albert.Einstein Allee 45
89073 Ulm
Tel. 07311775260

Ausbildung

09/1996 - 08/2005	**Pestalozzi Gymnasium Biberach** Abitur
10/2005 – 04/2009	**Universität Ulm** Studium der Humanmedizin 09/2007: 1. ÄP
05/2009 – 10/2009	**Massachussetts General Hospital, Harvard University, Boston, MA, USA** Doktorarbeit am Institut für Neurodegenerative Krankheiten (α-Synuclein Group, Hyman Lab)
10/2009 – 05/2012	**Universität Ulm** Studium der Humanmedizin 05/2012: 2. ÄP
02/2011 – 01/2012	**Oberschwabenklinik Ravensburg** Praktisches Jahr

Praktisches Jahr

02/2011 – 06/2011	**Oberschwabenklinik Ravensburg** Chirurgie
06/2011 – 10/2011	**Oberschwabenklinik Ravensburg** Innere Medizin
10/2011 – 01/2011	**Oberschwabenklinik Ravensburg** Neurologie und Klinische Neurophysiologie

Publikationen

01/2012	Danzer, K. M.; **Ruf, W. P.**; Putcha, P.; Joyner, D.; ashimoto, T.; Glabe, C.; Hyman, B. T.; McLean, P. J. (2011): Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 25, 326–336.

Wolfgang Ruf

Ulm, 08. August 2012