

Einfluss der Phosphoinositid-Biosynthese
auf Lokalisation und Toxizität von Alpha-
Synuclein in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Timo Löser

geb. am 29.12.1995 in Heidelberg

Mainz, 2025

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter: 

2. Berichterstatter: 

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2026

To be a scientist is to be naive. We are so focused on our search for truth, we fail to consider how few actually want us to find it. But it is always there, whether we see it or not, whether we choose to or not. The truth doesn't care about our needs or wants. It doesn't care about our governments, our ideologies, our religions.

It will lie in wait, for all time.

– Chernobyl Miniseries (2019) –

Anmerkung zu Publikationen

Ein Teil der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurde bereits im Rahmen einer Publikation veröffentlicht, die während des Promotionsprojekts entstanden ist und auf den erhobenen Originaldaten basiert (Löser et al., 2025). Dies betrifft die Abbildungen 12-20, 22-28 und 30-32 sowie die zugehörigen Auswertungen und die Diskussion. Zudem beruhen die schematischen Abbildungen 2,3, 8, 26A und 36 ebenfalls auf Abbildungen dieser Arbeit sowie einem während des Projekts publizierten Reviews (Löser et al., 2025; Schepers et al., 2024).

Konvention zur Schreibweise von Genen, Proteinen und Stämmen

Saccharomyces cerevisiae

Gene	kursiv und in Großbuchstaben (z.B. <i>ATG1</i>)
Proteine	nicht-kursiv und nur der erste Buchstabe großgeschrieben (z.B. Atg1) Ausnahme: Spezies-fremde Proteine nicht-kursiv in Großbuchstaben (z.B. GFP)
Stämme	Ausgangsstamm am Anfang (z.B. BY4741) Paarungstyp (Mat a/ Mat α) Genunterbrechungen mit „:“ gekennzeichnet Gendelektionen mit „ Δ “ gekennzeichnet (z.B. <i>vps34Δ</i>) Ausgetauschte Gene mit „:“ versehen (z.B. <i>vps34::kanMX4</i>)

höhere Eukaryoten

Gene	kursiv und in Großbuchstaben (z.B. <i>LRRK2</i>)
Proteine	nicht-kursiv und in Großbuchstaben (z.B. RAB3A)

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Einleitung.....	2
1. Neurodegeneration in Morbus Parkinson.....	2
1.1 Parkinson: Klinisches Erscheinungsbild und Pathologie.....	2
1.2 Molekulare Mechanismen der Neurodegeneration bei Parkinson.....	3
1.3 α Syn als Kernelement von Synucleinopathien	5
2. Alpha-Synuclein: Struktur, Funktion und Aggregationsverhalten	6
2.1 Struktur und biochemische Eigenschaften von α Syn	6
2.2 Physiologische Funktionen von α Syn	8
2.3 Aggregationsverhalten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	11
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus für Parkinson	13
3.1 Modellorganismen in der molekularen Neurobiologie	13
3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in der PD-Forschung.....	14
4. Lipidmetabolismus in intrazellulären Transportprozessen	17
4.1 Übersicht und Bedeutung des zellulären Lipidmetabolismus	17
4.2 Rolle von Lipiden im intrazellulären Membrantransport	19
4.3 Die Biosynthese von Phosphoinositiden	21
4.4 Die lokalisierte PIP-Synthese in <i>S. cerevisiae</i>	22
5. Phosphoinositide in vesikulären Transportmechanismen	24
5.1 PIPs in der zellulären Proteinqualitätskontrolle	24
5.2 PIPs in endosomalen Transportprozessen.....	27
5.3 PIPs in der synaptischen Transmission.....	28
Zielsetzung der Arbeit.....	31
Material und Methoden	32
1. Material.....	32
1.1 Geräte	32
1.2 Stoffe und Chemikalien.....	33
1.3 Kommerzielle Puffer	35
1.4 Organismenstämme	35
1.6 Plasmide	37
1.7 Oligonukleotide	38
1.8 Enzyme	39
1.9 Kits	39
1.10 Antikörper.....	40
1.11 Größenstandards	40
1.12 Software	40
1.13 Sonstige Materialien	41

2. Methoden	42
2.1 DNA- und RNA-spezifische Methoden	42
2.2 Protein-spezifische Methoden	45
2.3 Spezifische Methoden für <i>E. coli</i>	51
2.4 Spezifische Methoden für <i>S. cerevisiae</i>	52
2.5 Sonstige Methoden	58
Ergebnisse.....	59
1. Grundlegende Charakterisierung des Hefe-Modells	59
1.1 N-terminale Helizität bestimmt zelluläre α Syn-Lokalisation.....	59
1.2 α Syn-Sensitivität ist dosisabhängig	61
2. Proteostatische Auswirkungen der αSyn-Expression	62
2.1 Der Einfluss von α Syn auf die Proteinqualitätskontrolle	62
2.2 Membranbindende α Syn-Spezies induzieren Proteinaggregation	66
2.3 α Syn wird vor proteolytischem Abbau geschützt.....	68
3. Phosphoinositidsynthese in der αSyn-Lokalisation und -Sensitivität.....	69
3.1 Wachsratenreduktion in ATG-Mutanten ist Autophagie-unabhängig	69
3.2 Wuchshemmung durch α Syn in PI3K-defizienten Stämmen.....	71
3.3 PI3P-Verlust beeinflusst α Syn-Lokalisation und verursacht zelluläre Akkumulationen	75
3.4 α Syn-Akkumulationen in PI3K-Mutanten sind nicht amyloid und membranassoziiert	77
3.5 Endosomale PI3P-Biosynthese ist entscheidend für α Syn-Lokalisation	79
3.6 PI3P und PI3,5P2 beeinflussen PM-Lokalisation von α Syn	83
4. αSyn beeinflusst die zelluläre Sekretionsmaschinerie	87
4.1 α Syn erreicht die PM über den sekretorischen Weg	87
4.2 Membranbindendes α Syn beeinflusst die Morphologie endosomaler Vesikel	89
4.3 WT und A53T α Syn erhöht <i>SEC4</i> -Expression und colokalisiert mit Sec4	90
Diskussion	93
1. N-terminale Helix bestimmt Membranassoziation von αSyn.....	93
2. Autophagie-Regulation durch αSyn in <i>S. cerevisiae</i>	96
3. Proteostase in <i>S. cerevisiae</i> unter αSyn-Expression.....	97
3.1 α Syn-abhängige Veränderungen der 26S-Proteasomaktivität	97
3.2 Aggregation endogener Proteine durch membranbindende α Syn-Spezies	99
3.3 Stabilität von α Syn im Cycloheximid-Assay.....	100
4. Modell eines PI3P- und PI3,5P2-vermittelten αSyn-Transports zur PM	101
4.1 PI3P als Eintrittspunkt für den membranabhängigen Transport von α Syn	102
4.2 Zwei mögliche Wege des α Syn-Weitertransports	103
4.3 PM-Lokalisation von α Syn und funktionale Parallelen zur Säugersynapse	105
4.4 Verteilung von α Syn über die PM	108
Zusammenfassung.....	110
Literaturverzeichnis	112

Anhang.....	139
1. Abbildungsverzeichnis	139
2. Tabellenverzeichnis.....	140
3. Abkürzungsverzeichnis	141
4. Vektorkarten der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide	145
Danksagung.....	166
Erklärung	167
Lebenslauf	168

Abstract

Alpha-Synuclein (α Syn) ist ein kleines, intrinsisch ungeordnetes Protein, das überwiegend neuronal vorkommt und eine Schlüsselrolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Multisystematrophie und Lewy-Körper-Demenz spielt. Trotz intensiver Forschung sind sowohl die physiologische Funktion von α Syn als auch die molekularen Mechanismen seiner Interaktion mit intrazellulären Vesikeltransportprozessen nur unzureichend verstanden. Phosphoinositide (PIPs) sind hochdynamische Signallipide, die die Identität zellulärer Kompartimente bestimmen, endosomale Transportwege regulieren und essenziell für die synaptische Transmission sind. Da Defekte im PIP-Metabolismus als Risikofaktoren für Synucleinopathien gelten, deutet vieles auf eine enge funktionelle Beziehung zwischen α Syn und PIPs hin. Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von humanem α Syn im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* systematisch zu untersuchen, um konservierte Interaktionsmechanismen aufzuklären. Hierfür wurde der Einfluss von α Syn auf zentrale Qualitätskontrollmechanismen wie Autophagie und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) sowie seine Abhängigkeit von PIP-Biosynthese- und Transportwegen analysiert. Zusätzlich wurden die familiären PD-assoziierten Varianten A30P und A53T berücksichtigt, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Lipid-Bindeigenschaften häufig als funktionelle Kontrollen dienen. In Hefe wird heterolog exprimiertes α Syn über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert und beeinflusst dosisabhängig das Zellwachstum. Es zeigte sich, dass α Syn keinen Effekt auf die Stickstoffmangel-induzierte Makroautophagie in teilungsaktiven, glykolytischen Zellen hat, während in alternden, respiratorisch aktiven Zellen selektive Autophagie an Bedeutung gewinnt, was sich in Lebensspannenexperimenten widerspiegelte. Zudem modulierte WT α Syn dosisabhängig die Aktivität des 26S-Proteasoms, und membranbindende α Syn-Spezies führten in hoher Kopienzahl zur Bildung unlöslicher Aggregate zelleigener Proteine. Ein Vergleich des Wachstums Autophagie-assoziiierter Deletionsmutanten ermöglichte erstmals die Identifikation eines direkten Zusammenhangs zwischen dem Verlust der PI3P-Biosynthese und der Akkumulation sowie Zytotoxizität von α Syn. Fluoreszenzmikroskopie und Wachstumskurven belegten, dass insbesondere die Deletion der PI3-Kinase (PI3K) Vps34 zu einer ausgeprägten zytoplasmatischen Mislokalisierung von α Syn führte, begleitet von reduziertem Zellwachstum. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die endosomale PI3P-Biosynthese durch den PI3K-Komplex II sowie teilweise die Fab1-abhängige Synthese von PI3,5P2 essenziell für die Plasmamembran-Lokalisation membranbindender α Syn-Spezies ist, während PI4P und PI4,5P2 deren Verteilung entlang der Membran regulieren. Eine Mislokalisierung führte zur Bildung großer, nicht-amyloider Protein-Lipid-Akkumulationen im Zytosol. Darüber hinaus induzierte α Syn die Hochregulation zentraler Komponenten des sekretorischen Apparats, darunter PI3P-haltige Vesikel und die hochkonservierte Rab GTPase Sec4, wodurch funktionale Parallelen zur Exozytose synaptischer Vesikel in Säugerneuronen sichtbar wurden. Zusammenfassend ließ sich ein hypothetisches Modell formulieren, das den PI3P-abhängigen Eintritt von α Syn in den sekretorischen Weg und dessen hochkonservierten Transport bis zur Plasmamembran beschreibt. Die hier gewonnenen Erkenntnisse vertiefen das Verständnis der molekularen Interaktionen von α Syn und eröffnen neue Perspektiven für die Übertragung dieser Befunde auf komplexere Modelle neurodegenerativer Erkrankungen.

Einleitung

1. Neurodegeneration in Morbus Parkinson

1.1 Parkinson: Klinisches Erscheinungsbild und Pathologie

Neurodegeneration bezeichnet den (Funktions-)Verlust von Nervenzellen, welchem diverse pathologische Mechanismen zugrunde liegen. Neurodegeneration findet primär im zentralen Nervensystem statt, kann aber ebenso im peripheren Nervensystem des gesamten Körpers auftreten. Im Jahr 2021 waren weltweit über 3 Milliarden Menschen von einer neurologischen Erkrankung betroffen, davon mehr als 50 Millionen mit Neurodegeneration (Steinmetz et al., 2024).

Morbus Parkinson (PD) ist dabei die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit einer geschätzten weltweiten Prävalenz von über 11 Millionen Betroffenen (Steinmetz et al., 2024). Erstmals beschrieben wurde die Krankheit im Jahr 1817 von James Parkinson, der sie aufgrund der stark ausgeprägten motorischen Symptome als „shaking palsy“ (dt. Schüttellähmung) bezeichnete (Parkinson, 2002 [1817]). PD kann sowohl familiär bedingt als auch sporadisch auftreten, wobei nur 10-15% aller PD-Fälle vererbt sind und die sporadische Entwicklung im Laufe des Alterns deutlich überwiegt (Pankratz & Foroud, 2007; Tran et al., 2020).

Die klinische Progression von PD verläuft typischerweise langsam und erstreckt sich über mehrere Jahrzehnte. Heute werden die klinischen Symptomatiken in motorisch und nicht-motorisch untergliedert (Kalia & Lang, 2015). Zu den motorischen Symptomen zählen insbesondere eine Bewegungsverlangsamung (Bradykinese), ein Ruhetremor und Muskelversteifungen (Rigor) (Goetz, 2011; Parkinson, 2002 [1817]). Nicht-motorische Symptome treten in der Regel in frühen Phasen der Krankheit auf und werden daher auch als prä-motorische oder prodromale Symptome bezeichnet. Dazu zählen unter anderem demenzähnliche kognitive Beeinträchtigungen, Depressionen, Schlafstörungen und der Verlust des Geruchsinns (Hyposmie) (Postuma et al., 2012).

Als primärer Grund für die oben genannten Symptome gilt der für Parkinson charakteristische Verlust dopaminergener Neuronen in der *pars compacta* der *Substantia nigra* (SNpc) (Dauer & Przedborski, 2003; Surmeier, 2018). Die SNpc ist Teil des Mesencephalons und reich an Neuromelanin-haltigen dopaminergen Neuronen. Diese projizieren als Teil der Basalganglienschleife in das Striatum, um feinmotorische Muskelfunktionen zu koordinieren. Daher erfolgt die Diagnose von Morbus Parkinson nicht nur anhand der klinischen Symptome, sondern außerdem gemessen am therapeutischen Erfolg dopaminergener Medikamente wie L-Dopa (3,4-Dihydroxy-Phenylalanin) und MAOI (Monoaminoxidase-Inhibitor), welche die Dopaminsynthese anregen oder den Dopaminabbau stoppen sollen (Nagatsu & Sawada,

2009; Riederer & Laux, 2011). In Patient:innen mit funktionalen dopaminergen Neuronen werden folglich keine positiven Effekte nach Verabreichung dieser Medikamente erwartet. Der zukünftige Erfolg in der Behandlung und/oder Prävention von PD erfordert zunächst ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen, welche dieser Erkrankung zugrunde liegen.

1.2 Molekulare Mechanismen der Neurodegeneration bei Parkinson

Der Verlust dopaminerger Neurone in der SNpc ist die Folge vielfältiger pathologischer Mechanismen. Dazu zählen unter anderem eine gestörte Proteostase durch (zumeist) altersbedingte Beeinträchtigungen der zellulären Qualitätskontrollsysteme, Autophagie und das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (Lindersson et al., 2004; Malkus & Ischiropoulos, 2012; Winslow et al., 2010). Diese Dysbalance induziert die Akkumulation fehlgefalteter oder geschädigter Proteine und fördert zytotoxische Mechanismen. PD-Risikogene, welche in Zusammenhang mit diesen Mechanismen beschrieben werden, kodieren unter anderem für die Ubiquitin-Hydrolasen „ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1“ UCHL1, die lysosomale Hydrolase Glucocerebrosidase 1 (GBA1) und ATPase ATP13A2 (Day & Mullin, 2021). Einen weiteren PD-Risikofaktor stellt die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere an Komplex I der mitochondrialen Atmungskette dar (Janetzky et al., 1994; Mann et al., 1992; Mortiboys et al., 2008). ROS wie das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$ sind in der Lage DNA, Proteine und Lipide in der gesamten Zelle zu oxidieren und damit nachhaltig zu schädigen. Zudem ist die Aktivität genereller antioxidativer Mechanismen wie die Detoxifizierung über Glutathion- bzw. Superoxiddismutase-vermittelte Mechanismen in PD häufig reduziert (Pearce et al., 1997; Trépanier et al., 1996; Yang et al., 2020).

In Bezug auf mitochondriale Risikofaktoren ist nicht nur ROS-Entstehung ein zentraler Bestandteil der PD-Pathologie. In familiären Formen von PD, aber auch in PD-Modellen wurde zudem eine gestörte mitochondriale Funktion oder eine Beeinträchtigung des Abbaus geschädigter mitochondrialer Bestandteile durch Mitophagie beschrieben. Dies hat unter anderem zur Folge, dass die mitochondriale Respiration beeinträchtigt wird, was alle ATP-abhängigen Prozesse der Zelle betrifft, das Redoxgleichgewicht und die Calciumhomöostase stört und Apoptose-induzierend wirkt (Burns et al., 1985; Langston et al., 1983; Pickrell & Youle, 2015; Zhang et al., 2022).

Als weitere entscheidende PD-Risikofaktoren gelten die chronische Entzündung des zentralen Nervensystems (Neuroinflammation) und allgemeine Störungen des Immunsystems (Mogi et al., 1996; Qin et al., 2016). Sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem zeigen signifikante Veränderungen in PD-Patienten, welche schon Jahrzehnte vor Diagnose der Krankheit beobachtet werden können. In *post mortem* Untersuchungen von PD-Patienten wurde unter anderem eine erhöhte Menge aktivierter Mikroglia und Astrozyten gefunden, welche für die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine verantwortlich sind (Johansson et al., 2025; Pike et al., 2024; Tian et al., 2022).

Dysregulationen im gesamten Endomembransystem sowie eine gestörte Phospholipidhomöostase rücken zunehmend in den Fokus der Neurodegenerationsforschung, da viele putativ PD-relevante Risikogene für Proteine kodieren, welche direkt oder indirekt am Lipidmetabolismus und insbesondere an endozytotischen Mechanismen beteiligt sind. Dazu zählen die Retromerkomponente „vacuolar protein sorting 35“ (VPS35), die Phosphoinositid-Phosphatasen Synaptojanin 1 (SYNJ1) und Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase F (INPP5F) sowie die Co-Chaperone Auxilin (DNAJC6) und „DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13“ (DNAJC13) (Köroğlu et al., 2013; Krebs et al., 2013; Nalls et al., 2014; Vilariño-Güell et al., 2013; Zimprich et al., 2011). Zudem wurden durch Lipidomanalysen signifikante Unterschiede in der Lipidzusammensetzung in *post mortem* Proben von PD-Gehirnen festgestellt. So liegen insbesondere Triacylglycerole (TAGs) und Sphingolipide wie Ceramide in deutlich erhöhter Menge vor, während unter anderem Phosphatidylinositol-Spezies reduziert sind (Cheng et al., 2011; Mielke et al., 2013; Yilmaz et al., 2025).

Genetische Risikofaktoren sowie Störungen der Proteinqualitätskontrolle, der mitochondrialen Homöostase, des vesikulären Transports, des Lipidstoffwechsels und verstärkte proinflammatorische Prozesse stehen direkt oder indirekt im Zusammenhang mit der heute weithin anerkannten Hauptursache des motorischen Funktionsverlusts bei Morbus Parkinson: die Fehlfaltung und zytotoxischen Aggregation des neuronalen Proteins α -Synuclein (α Syn) (Abbildung 1). Dies äußert sich insbesondere in der Bildung toxischer Oligomere sowie fibrillärer Strukturen, die sich in charakteristischen Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten manifestieren (Danzer et al., 2009; Li et al., 2008; Spillantini et al., 1997). Die Präsenz zytoplasmatischer α Syn-Ansammlungen gilt dabei nicht nur als Kernmerkmal von PD, sondern auch der pathologisch und klinisch überlappenden Synucleinopathien Lewy-Körper Demenz (DLB) und Multisystematrophie (MSA) (Arias-Carrión et al., 2025).

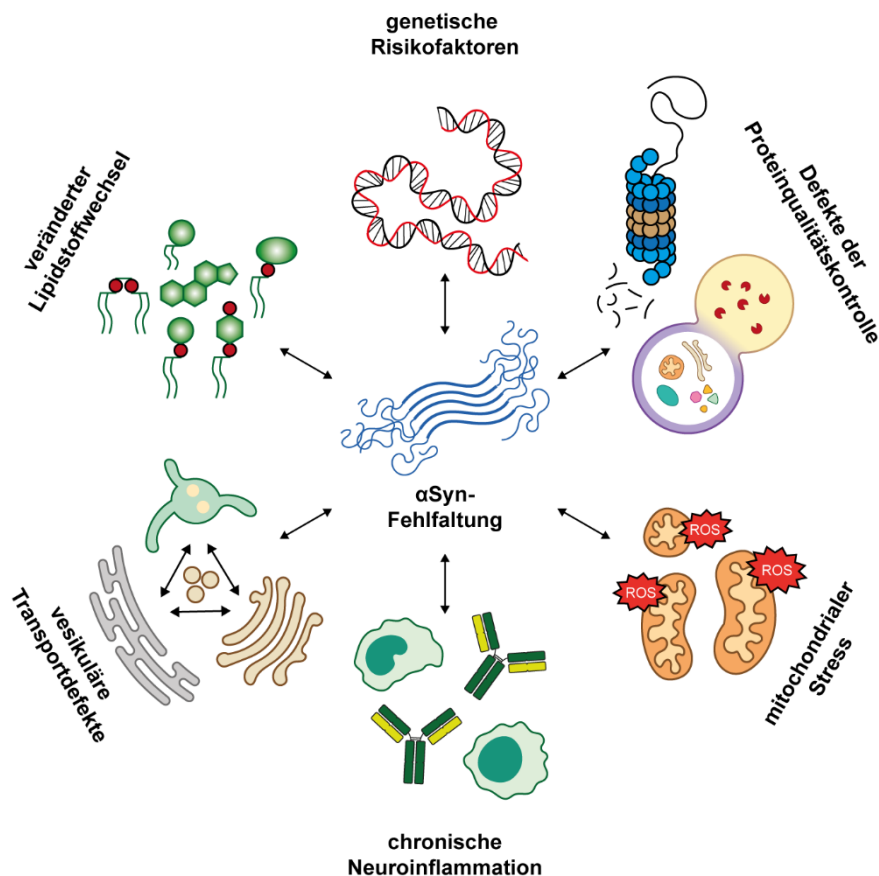


Abbildung 1: Verschiedene Risikofaktoren beeinflussen die Fehlfaltung des α Syn-Proteins. Schematische Darstellung unterschiedlicher Risikofaktoren, die die Fehlfaltung und Aggregation des Parkinson-relevanten Proteins α Syn fördern. Dazu zählen genetische Risikofaktoren, Defekte der Proteinqualitätskontrolle, mitochondrialer Stress, chronische Neuroinflammation, vesikuläre Transportdefekte sowie Veränderungen im Lipidstoffwechsel.

1.3 α Syn als Kernelement von Synucleinopathien

Ein zentrales gemeinsames Merkmal von Synucleinopathien ist die Akkumulation fehlgefalteter α Syn-Spezies. Während diese bei PD und DLB vor allem als Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten in Neuronen auftreten, finden sich bei MSA charakteristische „glial cytoplasmic inclusions“ in Oligodendrozyten (Gai et al., 2003).

Die Schlüsselrolle von α Syn in diesen Erkrankungen zeigt sich insbesondere daran, dass verschiedene Punktmutationen sowie Gen-Duplikationen und -Triplikationen des α Syn-kodierenden Synuclein Alpha- (*SNCA*-)Gens ausreichen, um die meist sporadisch auftretenden Synucleinopathien stattdessen autosomal-dominant mit hoher Penetranz auszulösen (Schulte & Gasser, 2011). Obwohl bis heute insbesondere für PD mindestens 20 weitere Risikogene beschrieben wurden, gehört *SNCA* zu den wenigen Genen, die eindeutig als monogene Auslöser von PD und als Risikofaktor für DLB gelten (Jia et al., 2022). Zu diesen krankheitsauslösenden Genvarianten zählen neben den lange bekannten Missense-Mutationen A30P, A53T, E46K, H50Q und G51D auch neuere bestätigte Varianten A30G und V15A (Diaw et al., 2023; Guo et al., 2021; H. Liu et al., 2021). Interessanterweise ist jede dieser Mutationen im N-Terminus lokalisiert und beeinflusst entweder die Sekundärstruktur

oder das generelle Aggregationsverhalten von α Syn (Bodner et al., 2010; Brás et al., 2021; Dehay et al., 2015).

Gemeinsamkeiten der beschriebenen SNCA-Mutationen sind damit verbundene direkte oder indirekte „loss-of-function“-Phänotypen. Direkte Effekte entstehen beispielsweise bei der A30P-Mutation, bei der ein Verlust der nativen α Syn-Funktion vermutet wird (Zhang et al., 2019). Indirekte Effekte entstehen bei Mutationen wie A53T, deren Aggregate andere zelluläre Mechanismen nachhaltig schädigen und so den Verlust wichtiger Funktionen hervorrufen (Mohite et al., 2018). Außerdem stellen solche Aggregate eine räumliche Behinderung intrazellulärer Transportwege dar und stören den axonalen Transport und die Erregungsleitung (Yang et al., 2025).

Trotz des eindeutigen Nachweises dieser Mutationen als Ursache für PD, wurden in allen bekannten PD-Kohorten zudem diverse Co-Pathologien beschrieben, welche durch unabhängige Mutationen ausgelöst werden (Dugger et al., 2014; Tran et al., 2020). Zu bekannten Vertretern zählen die bereits beschriebenen Risikogene, darunter „leucine-rich repeat kinase 2“ (*LRRK2*), „PTEN-induced kinase 1“ (*PINK1*) und Parkin (*PRKN*) sowie *UCHL1*, „Parkinsonism-associated deglycase“ (*DJ-1*) und „microtubule-associated protein tau“ (*MAPT*). Mutationen dieser Gene können die Aggregation unterschiedlicher α Syn-Spezies begünstigen und tragen unter anderem zu den erheblichen Unterschieden in der klinischen Ausprägung der jeweiligen Erkrankung innerhalb sowie zwischen verschiedenen PD-Kohorten bei (Guadagnolo et al., 2021; Tran et al., 2020). Auch DLB und MSA werden generell von diversen Co-Pathologien begleitet. So begünstigen beispielsweise Mutationen im *GBA1*-Gen eher DLB als PD (Lee et al., 2021; Nalls et al., 2013). Die Unterschiede innerhalb und zwischen Synucleinopathien lassen sich demnach nicht allein durch die Lokalisation von α Syn-Ablagerungen erklären, sondern sind maßgeblich durch das Zusammenwirken mit Co-Pathologien und durch die Modulation der nativen α Syn-Funktion bestimmt.

2. Alpha-Synuclein: Struktur, Funktion und Aggregationsverhalten

2.1 Struktur und biochemische Eigenschaften von α Syn

Das Kernelement der Synucleinopathien, α Syn, ist ein hochkonserviertes, wirbeltier-spezifisches Protein mit 140 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 14,5 kDa (Abbildung 2A). Isoliert und vollständig sequenziert wurde α Syn erstmals im Jahr 1988 aus der Zitterrochen-Spezies *Tetronarce californica* (Maroteaux et al., 1988; Zhu & Fink, 2003). Zusammen mit den Proteinen β -Synuclein und γ -Synuclein gehört α Syn der Synuclein-Familie an, welche sich durch hoch konservierte Lipidbindungsmotive mit Ähnlichkeit zu den Klasse-A2-Lipidbindungsdomänen der „austauschbaren Apolipoproteine“ auszeichnen (George et al., 1995; Segrest et al., 1990).

Strukturell umfasst das Protein drei charakterisierte Domänen (Abbildung 2A und B) (Emamzadeh, 2016). Die ersten 60 Aminosäuren bilden den positiv geladenen N-Terminus, welcher sich durch eine hohe Anzahl basischer Lysinreste und einer daraus resultierenden positiven Nettoladung auszeichnet. Diese Lysine sind Bestandteil von sechs imperfekten KTKEGV-Motiven, die bei Kontakt mit negativ geladenen Phospholipiden (insbesondere Phosphatidsäure, Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositol-Phosphate) die Ausbildung einer diskontinuierlichen Protein- α -Helix hervorrufen (Bartels et al., 2010; Pirc & Ulrih, 2015).

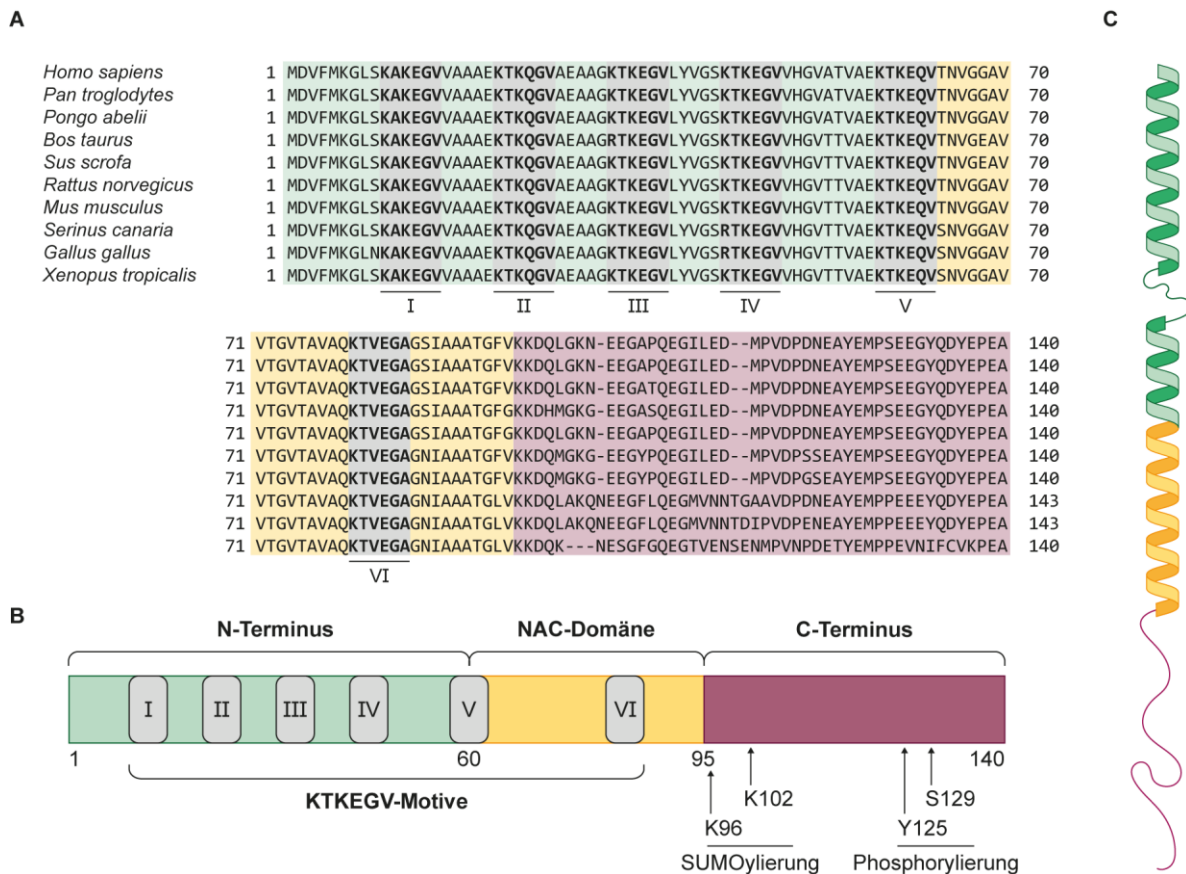


Abbildung 2: Evolutionäre Konservierung und Struktur von α Syn. **A:** Proteinsequenz-Vergleich von α Syn in den Wirbeltieren *Homo sapiens* (Mensch), *Pan troglodytes* (Schimpanse), *Pongo abelii* (Sumatra-Orang-Utan), *Bos taurus* (Rind), *Sus scrofa* (Wildschwein), *Rattus norvegicus* (Wanderratte), *Mus musculus* (Hausmaus), *Serinus canaria* (Kanarienvogel), *Gallus gallus* (Huhn) und *Xenopus tropicalis* (Krallenfrosch). Die Sequenzanalyse zeigt eine hohe Konservierung des Proteins zwischen allen gelisteten Arten, insbesondere im amphipathischen N-Terminus (grün) und der NAC-Domäne (gelb). Die sechs KTKEGV-Motive (graue Kästen) sind mit I–VI nummeriert und sind fast identisch zwischen allen Spezies. In Rindern ist der Lysinrest im dritten Motiv (III) durch das chemisch sehr ähnliche Arginin ersetzt. Das Gleiche wird für die erste Aminosäure des vierten KTKEGV-Motivs (IV) in beiden Vogelarten beobachtet. Zudem ist α Syn bei Vogelartenspezies drei Aminosäuren länger als bei den übrigen dargestellten Arten. **B:** α Syn lässt sich strukturell in drei Abschnitte unterteilen: den amphipathischen N-Terminus (grün, Aminosäuren AS1–60), die aggregationsfördernde NAC-Domäne (gelb, AS61–95) und den chemisch sauren C-Terminus (rot, AA96–140), der für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Die grauen Kästen markieren KTKEGV-Motive wie in **A**. Am C-Terminus sind zwei posttranslationale SUMOylierungen an K96 und K102 sowie Phosphorylierungen an Y125 und S129 dargestellt. **C:** Darstellung der angenommenen Sekundärstruktur von α Syn in Anwesenheit von biologischen Membranen. Der N-Terminus und die NAC-Domäne bilden eine diskontinuierliche α -Helix, die an den Kopfgruppen stark gekrümmter Membranen bindet. Der prolinreiche C-Terminus gilt als intrinsisch ungeordnet und flexibel. Abbildung angelehnt an (Scheepers et al., 2024).

Zwei dieser Membran-Bindemotive, wie auch die helikale Struktur reichen bis in die sogenannte „non-amyloid- β component“ (NAC)-Domäne, welche die Aminosäuren 61 bis 95 umfasst. Diese Domäne wurde erstmals als Bestandteil von Lewy-Körperchen identifiziert und weist eine starke Aggregationstendenz auf, insbesondere aufgrund einer aus 11 Aminosäuren bestehenden Kernregion, dem „NACore“ (⁶⁸GAVVTGVTAVA⁷⁸) (Rodriguez et al., 2015; Tuttle et al., 2016; L. Xu et al., 2016). Die ausgeprägte Hydrophobizität dieser Region begünstigt die Formation von β -Faltblättern, welche mit den NAC-Regionen anderer α Syn-Spezies oligomerisieren und amyloide Aggregation hervorrufen können.

Die Form der α Syn-Aggregation kann durch unterschiedliche Bedingungen induziert werden. Dazu zählen unter anderem endogene Faktoren, wie Proteinmodifikationen und die proteolytische Abspaltung des N-Terminus (Anderson et al., 2006; Liu et al., 2005). Exogene (Umwelt-)Faktoren wie Schwermetalle, Pestizide, Temperatur- und pH-Wert-Schwankungen wurden in *in vitro*-Studien ebenfalls mit amyloider Fibrillierung in Verbindung gebracht (Ghosh et al., 2017; Morris & Finke, 2009).

Der C-Terminus wird von den Aminosäuren 96-140 gebildet und ist durch zahlreiche Prolinreste und eine daraus resultierende intrinsische Unordnung charakterisiert (Abbildung 2C). Eine hohe Anzahl saurer Aminosäuren (etwa $\frac{1}{3}$) trägt zudem zu einer negativen Nettoladung bei, welche die Interaktion mit positiven Resten spezifischer Proteine begünstigt (Cole et al., 2002). Zu diesen Interaktionspartnern zählen z.B. „soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors (SNAREs) in der Vesikel-Fusion (Burré et al., 2010; Sun et al., 2019). Spezifische Tyrosin- und Serinreste erlauben außerdem post-translationale Phosphorylierung (Y125, S129), die unter anderem Proteininteraktionen unterstützen (Manzanza et al., 2021; Oueslati et al., 2010). Um den Einfluss von α Syn auf die Entstehung von Synucleinopathien wie PD zu verstehen, ist es zunächst notwendig, das Protein im physiologischen Kontext näher zu betrachten.

2.2 Physiologische Funktionen von α Syn

Physiologisches (lösliches) α Syn wurde in verschiedenen Kompartimenten neuronaler Zellen lokalisiert und zahlreiche Studien konnten bereits putative Funktionen beschreiben (Abbildung 3). Im neuronalen Soma interagiert α Syn mit unterschiedlichen Organellen, unter anderem dem Nukleus. Der Eintritt in den Zellkern erfolgt hierbei entweder aktiv über C-terminale SUMOylierung (K96 und K102) und anschließenden Transport durch Karyopherin α 6, oder über passive Diffusion entlang der Kernporen (Ryu et al., 2019; Timney et al., 2016). Im Nukleus hat α Syn einen Einfluss auf die Chromatinstruktur der DNA und kann die Expression von Genen regulieren. Dies erfolgt sowohl direkt über elektrostatische Bindung an das DNA-Rückgrat als auch indirekt über Wechselwirkungen mit epigenetisch wirkenden Enzymen (z.B. Histon-modifizierende Enzyme) (Desplats et al., 2011; Jiang et al., 2018; Surguchov, 2023).

Dabei wurden insbesondere Veränderungen der H3K9-Methylierung und der generellen Histonacetylierung beobachtet (Kontopoulos et al., 2006; Sugeno et al., 2016).

Außerhalb des Zellkerns ist α Syn außerdem an der inneren und äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Cole et al., 2008; Devi et al., 2008; Menges et al., 2017). An der äußeren Membran kann α Syn die Mitochondrienfusion modulieren und damit den axonalen Organelltransport beeinflussen (Bernal-Conde et al., 2020; Nakamura et al., 2011; Saxton & Hollenbeck, 2012). An der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert α Syn vornehmlich in Cardiolipin-reichen Regionen der Cristae, welche eine hohe Dichte an Atmungskettenkomplexen aufweisen. Es wird vermutet, dass α Syn eine stabilisierende Funktion im Elektronentransfer von Komplex I auf III ausübt (Devi et al., 2008; Ellis et al., 2005; Paradies et al., 2014).

Ein zentraler Prozess, in den α Syn verwickelt ist, ist der vesikuläre Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat und dem endosomalen Transportnetzwerk (Teixeira et al., 2021; Thayanidhi et al., 2010). In PD-Modellsystemen interagiert α Syn unter anderem mit „Ras-related in brain“ (Rab) GTPasen wie Rab1 und verschiedenen SNAREs, möglicherweise zur Unterstützung von Membranfusion (Burré et al., 2010; Cooper et al., 2006; Yoo et al., 2023). In *Saccharomyces cerevisiae* colokalisiert humanes α Syn mit den GTP-bindenden Proteinen „yeast protein two 1“ (Ypt1), Ypt6, Ypt31 und Ypt32 (Soper et al., 2011). Zudem wurde α Syn im Zusammenhang mit humanen endosomalen Transportvesikeln und -enzymen wie RAB5, RAB7 und RAB11A gebracht (Hasegawa et al., 2011).

Die am längsten bekannte Funktion von α Syn ist im Bereich der Präsynapse bzw. der Axonterminale lokalisiert, wo die gemessene α Syn-Konzentration am höchsten ist (Hsu et al., 1998; Maroteaux et al., 1988; Nordengen & Morland, 2024; Sharma & Burré, 2023). Die meisten präsynaptischen Proteine werden im neuronalen Soma synthetisiert und entlang des Axons transportiert (Horton et al., 2005). Dabei gibt es verschiedene Transportmechanismen, die das jeweilige Cargo mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten anterograd transportieren. Membranreiche Organellen und Transportvesikel werden schnell befördert (200-400 mm/Tag) während Komponenten des Zytoskeletts über „slow component a“ (SCa) und zytosolische Proteine über SCb transportiert werden (0.2-8 mm/Tag) (Roy et al., 2007). Der Transport von α Syn erfolgt über die SCb und setzt die Bindung von α Syn an „lipid rafts“ voraus (Fortin et al., 2004; Tang et al., 2012).

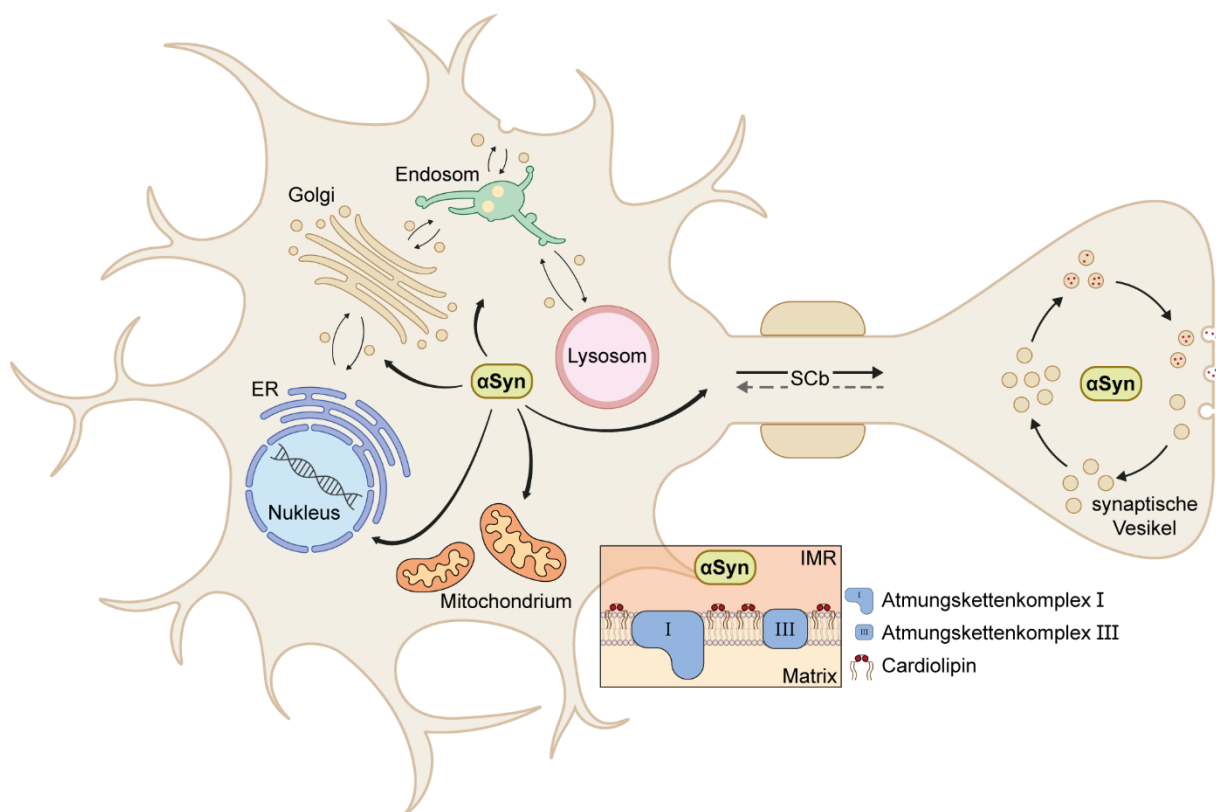


Abbildung 3: Vorgeschlagene physiologische Interaktionen von α Syn im Neuron. α Syn wurde in verschiedenen Kompartimenten neuronaler Zellen lokalisiert. Dazu zählen der Nucleus, das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat (Golgi), endosomale Strukturen, Lysosome und Mitochondrien. In den Mitochondrien liegt α Syn insbesondere im Intermembranraum (IMR) in unmittelbarer Nähe der Atmungskettenkomplexe I und II und des negativ geladenen Phospholipids Cardiolipin vor. Der Transport von α Syn an die Synapse erfolgt entlang des langsamen axonalen Transportwegs, der „slow component b“ (SCb). An der Präsynapse wirkt α Syn im gesamten Lebenszyklus synaptischer Vesikel. Abbildung angelehnt an (Schepers et al., 2024).

An der Synapse ist α Syn am gesamten Lebenszyklus synaptischer Vesikel beteiligt. Dies beinhaltet die Beladung der Vesikel mit Monoamin-Neurotransmittern (z.B. Dopamin), Vesikel-„docking“ und -„priming“ (Huang et al., 2019; Nordengen & Morland, 2024; Pifl et al., 2014). Für letzteres interagiert α Syn mit SNARE-Proteinen, um die Fusion mit der Plasmamembran (PM) zu ermöglichen (Burré et al., 2010; Hawk et al., 2019; Lou et al., 2017; Sun et al., 2019). Essenziell für diese Prozesse ist die N-terminale Bindung von α Syn an negativ geladenen Phospholipiden der synaptischen Vesikel. Die Lipidbindung von α Syn wird insbesondere durch starke Krümmungseffekte der Membran sowie phosphorylierte Phosphoinositide (PIPs) vermittelt (Jacob et al., 2021; Middleton & Rhoades, 2010). So wurde in unterschiedlichen Zelltypen beobachtet, dass die Lokalisation von α Syn an der PM PIP2- bzw. PIP3-abhängig ist (Jacob et al., 2021). Nach Fusion der synaptischen Vesikel mit der PM soll eine durch α Syn induzierte Krümmung der PM die Wiederaufnahme der Vesikel durch Endozytose unterstützen (Westphal & Chandra, 2013).

Die Vielzahl zellulärer Lokalisationen und putativen Interaktionen von α Syn deutet auf eine übergeordnete Rolle in der Regulation vesikulärer Transportprozesse und Membranfusionen hin. Besonders auffallend ist dabei die hohe Affinität zu stark gekrümmten, anionischen Membranen wie denen synaptischer Vesikel, Endosomen und mitochondrialer Cristae. In der Pathogenese von PD befinden sich aggregierte Formen von α Syn in unmittelbarer Nähe zu diesen Zellkompartimenten und colokalisieren in Lewy-Körperchen (Miraglia et al., 2018; Moors et al., 2021). Aktuelle Studien belegen, dass die Präsenz diverser Lipide den pathologischen Aggregationsprozess von α Syn unterbinden oder sogar beschleunigen kann (Auluck et al., 2010; Galvagnion et al., 2015; Martinez et al., 2007; Zhu & Fink, 2003).

2.3 Aggregationsverhalten *in vivo* und *in vitro*

In seiner nativen, membranassoziierten Form liegt α Syn in der Regel als N-terminal helikales Protein vor und bildet funktionale Monomere oder Tetramere (Bartels et al., 2011; Davidson et al., 1998). Im Zentrum der Synucleinopathien steht die pathologische Aggregation dieses eigentlich löslichen Proteins und daraus resultierende Zytotoxizität. Der klassische Aggregationsprozess von α Syn umfasst die paarweise Aneinanderlagerung von α Syn-Monomeren über die im Proteinkern lokalisierte NAC-Domäne zu toxischen Oligomeren (primäre Nukleation), deren Zusammenschluss zu sogenannten Protofibrillen und letztlich die Elongation zu amyloiden Fibrillen (Abbildung 4) (de Oliveira & Silva, 2019). Dieser Prozess konnte bereits mithilfe von *in vitro*-Studien experimentell reproduziert werden (Cascella et al., 2019; Concha-Marambio et al., 2023; Srivastava et al., 2020). Dabei wurde gezeigt, dass die primäre Nukleation, also die initiale Oligomerisierung von α Syn, mittels verschiedener Methoden beschleunigt werden kann. Dazu zählen die schrittweise Erhöhung der α Syn-Monomerkonzentration, die Zugabe präformierter α Syn-Aggregate (engl. „Seeds“) sowie Kupferionen und bestimmter Lipid- bzw. Membranspezies (Bluhm et al., 2025; Galvagnion et al., 2015; Srivastava et al., 2020; Walke et al., 2024). Amyloide Fibrillen, d.h. Zusammenlagerungen mit charakteristischer β -Faltblatt-Struktur, welche wiederum neue Aggregationsprozesse durch sekundäre Nukleation initiieren können, lagern sich in einem letzten Schritt in intrazellulären Einschlüssen – Lewy-Körperchen bzw. Lewy-Neuriten zusammen (Jellinger, 2009).

Obwohl diese fibrillären Endprodukte einen hohen Stellenwert in der PD-Pathologie einnehmen, rücken nicht-amyloide Aggregationsformen von α Syn zunehmend in den Vordergrund. Dazu zählen unter anderem die Intermediärstrukturen der klassischen Aggregation, nämlich Oligomere und Protofibrillen (Winner et al., 2011; Xu et al., 2024). Diese toxischen α Syn-Formen sind in der Lage, Membranen zu penetrieren, sich innerhalb des Nervensystems auszubreiten und andere Proteine prionenähnlich zur Aggregation zu bringen (Tsigelny et al., 2012).

Viele α Syn-Oligomere entstehen oder wirken an Membranen, weshalb der Forschungsfokus auf eine weitere Aggregationsform von α Syn gelenkt wurde: membranassoziierte α Syn-Cluster. Wie bereits erwähnt, kann die Zugabe spezifischer Lipide das Aggregationsverhalten von α Syn *in vitro* beeinflussen. So wurde experimentell nachgewiesen, dass anionische „small unilamellar vesicles“ (SUVs) die Bildung gemischter Protein-Lipid-Aggregate fördern (Dear et al., 2024; Fusco et al., 2016). Von besonderer Bedeutung sind dabei Lipid-Wasser-Grenzflächen (Biswas et al., 2020). Auch das Vorhandensein stark negativ geladener PIPs wie PIP3 sowie mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) sind in der Lage, (nicht-)amyloide Aggregationsprozesse von α Syn an diesen Grenzflächen zu fördern (Assayag et al., 2007; Choong et al., 2023).

Interessanterweise bestimmt neben den Lipidspezies auch die Menge an Lipiden den primären Nukleationsprozess. Je höher das Lipid/ α Syn-Verhältnis ist, desto mehr Vesikel stehen zur Verfügung, um von α Syn an der Oberfläche gebunden zu werden (Galvagnion et al., 2015; Makasewicz et al., 2024). Die daraus resultierende Reduktion freier α Syn-Monomere hat zur Folge, dass keine bzw. signifikant weniger Aggregationsinitiationen stattfinden können. Wird die Lipidkonzentration hingegen reduziert, sättigen die vorhandenen α Syn-Moleküle die verfügbaren Vesikel, sodass die restlichen freien Monomere an der Vesikeloberfläche aggregiert werden. Die Aggregationsrate ist in diesem Fall nicht nur höher als bei einem hohen Lipid/ α Syn-Verhältnis, sondern übersteigt auch jene, die in einer lipidfreien Umgebung beobachtet wird. Lipidassoziierte α Syn-Aggregate können wiederum „Seeds“ für weitere Oligomerisierungsprozesse darstellen oder die Formation großer α Syn-Vesikelcluster hervorrufen (Kiechle et al., 2020).

Dieses Aggregationsverhalten beschränkt sich nicht ausschließlich auf *in vitro*-Experimente, vielmehr wurden in der Pathologie von PD spezifische nicht-amyloide Strukturen beschrieben, die vergleichbare Cluster beinhalten. Eine Form dieser Strukturen sind sogenannte „pale bodies“ (dt. blasse Körper). Dabei handelt es sich um Lewy-Körperchen-ähnliche Anlagerungen, welche aufgrund des hohen Membrananteils und der vergleichsweise geringeren Proteindichte „blass“ (engl. „pale“) wirken (Dale et al., 1992). Zu den Membranbestandteilen zählen vor allem endosomale und synaptische Vesikel, aber auch fragmentierte Organellen wie z.B. Mitochondrien (Shahmoradian et al., 2019).

Angesichts der engen Verbindung zwischen Lipiden und der Zytotoxizität von α Syn ist es besonders relevant, Veränderungen im Lipidom und deren Einfluss auf die pathobiochemischen Mechanismen der Parkinson-Krankheit zu erfassen. Um diese komplexen Zusammenhänge sowie das Aggregationsverhalten von α Syn unter physiologischen und pathologischen Bedingungen besser zu verstehen, werden unterschiedliche Modellorganismen eingesetzt.

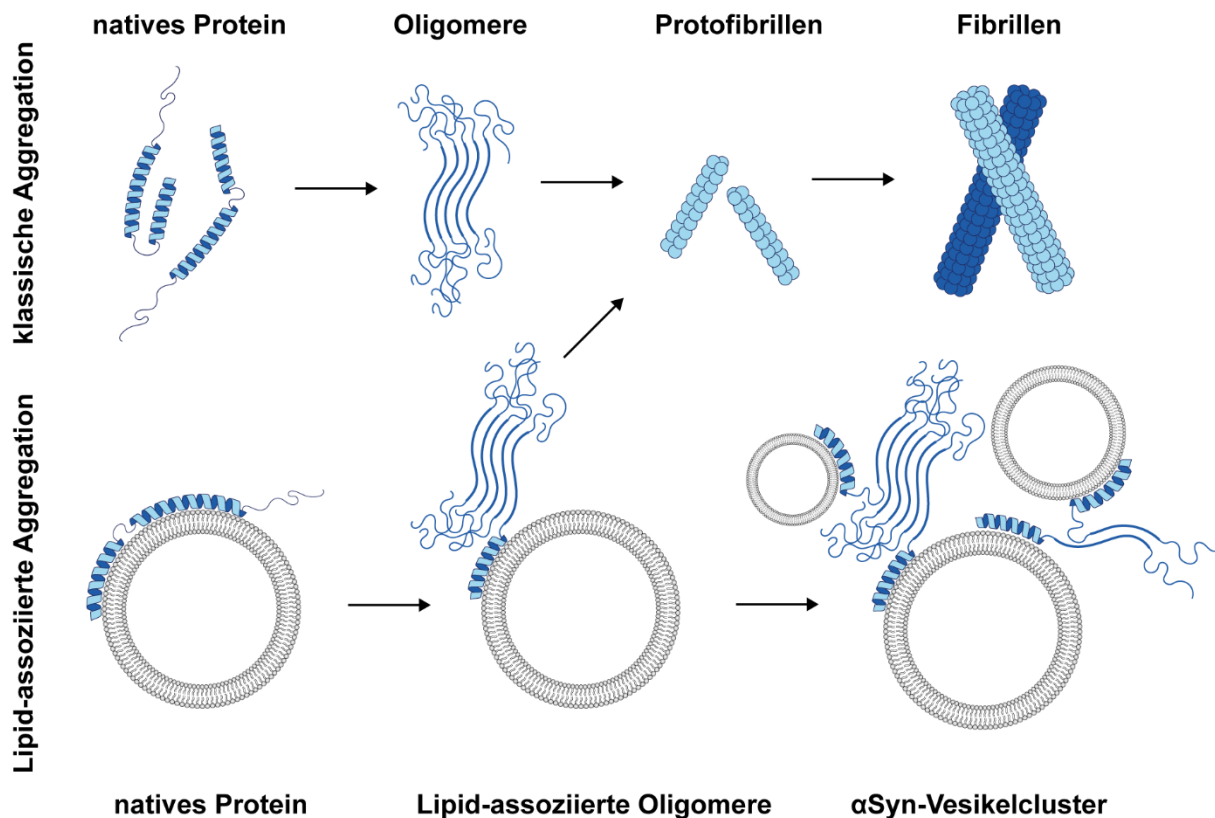


Abbildung 4: Aggregationsverhalten und -prozess von α Syn Darstellung der unterschiedlichen Aggregationsmechanismen für α Syn. Im klassischen Aggregationsprozess lagern sich fehlgefaltete α Syn-Monomere an der NAC-Region zu toxischen Oligomeren zusammen, welche Protofibrillen und schließlich Fibrillen ausbilden können. In der Lipid-assoziierten Aggregation wird die primäre Nukleation durch membrangebundenes α Syn ausgelöst, wodurch unter anderem weitere membrangebundene α Syn-Spezies zur Aggregation gebracht werden können. Dies führt zur Zusammenlagerung vesikulärer Cluster. Abbildung angelehnt an (Fanning et al., 2020).

3. *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus für Parkinson

3.1 Modellorganismen in der molekularen Neurobiologie

In der molekularen Neurobiologie ist die Verwendung geeigneter Modellsysteme unerlässlich, da das Gehirn und folglich neuronale Prozesse experimentell schwer zugänglich sind und sich die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen über Jahrzehnte erstrecken kann. Untersuchungen am menschlichen System beschränken sich daher insbesondere auf differenzierte pluripotente Stammzellen aus Haut- oder Blutzellen sowie neuronale Primärkulturen, welche aus Biopsieproben gewonnen werden können. Groß angelegte humane Studien hingegen konzentrieren sich in der Regel auf Biomarker aus Cerebrospinalflüssigkeit, dem Blutplasma oder postmortalen Gewebeproben. Auch gewebeunspezifische genomweite Assoziationsstudien (GWAS) und nicht-invasive Bildgebungsverfahren, wie Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT) sind gängige Verfahren (Lehner et al., 2023).

Für das Verständnis grundlegender molekularbiologischer Mechanismen wurden daher zahlreiche experimentelle Modelle etabliert. Säugermodelle eignen sich aufgrund ihrer

genetischen Nähe zum Menschen, neuronaler Strukturen und der Möglichkeit verhaltensbasierter Analysen besonders gut, sind jedoch unter anderem durch lange Generationszeiten limitiert. Zebrafische (*Danio rerio*) ermöglichen entwicklungsbiologische Studien, während *Drosophila melanogaster* durch die Vielzahl verfügbarer Mutantenstämme in der Neurogenetik breit eingesetzt wird. Auch humane Zelllinien wie LUHMES-Zellen („Lund human mesencephalic“), die sich in dopaminerge Neuronen differenzieren lassen, dienen als gängiges System.

Seit den frühen 2000er Jahren wird zudem *S. cerevisiae* als Modellsystem für neurodegenerative Erkrankungen verwendet (Krobitsch & Lindquist, 2000; Outeiro & Lindquist, 2003; Willingham et al., 2003). Hierfür wurden sogenannte „humanisierte“ Hefestämme entwickelt, die humane krankheitsassoziierte Proteine heterolog exprimieren. Dazu zählen unter anderem Polyglutamin-Proteine wie Huntingtin, Amyotrophe Lateralsklerose-auslösende Proteine TDP-43, FUS und SOD1, Alzheimer-assoziierte Proteine Amyloid-beta und Tau sowie diverse Prionenproteine und insbesondere seit 2003 auch α Syn in der PD-Forschung (Caine et al., 2007; Ju et al., 2011; Willingham et al., 2003).

Viele dieser Untersuchungen beschäftigen sich mit den Aggregationseigenschaften pathologischer Proteine einschließlich krankheitsrelevanter Mutationen, da die Mechanismen der zellulären Proteinqualitätskontrolle in Hefe hoch konserviert sind. Dies gilt beispielsweise für das Huntingtin-Protein und das Alzheimer-relevante Protein Tau (Krobitsch & Lindquist, 2000; Noble et al., 2003; Vandebroek et al., 2005). Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung der räumlichen Segregation fehlgefalteter Proteine. Unter Stressbedingungen bilden sich in *S. cerevisiae* Inklusionskörper wie „insoluble protein deposit-“ (IPOD-) und „juxtannuclear quality control-“ (JUNQ-)Kompartimente, die funktionelle Parallelen zu Aggresomen in Säugerzellen aufweisen (Bagola & Sommer, 2008; Kaganovich et al., 2008; Wang et al., 2009).

Als Modellsystem bietet Hefe damit eine stark vereinfachte Plattform, die zwar keine neuronalen Strukturen und Funktionen abbildet, aber genetische Screenings ermöglicht und Einblicke in konservierte Mechanismen wie Vesikeltransport, Proteinhomöostase oder Lipidstoffwechsel erlaubt. Daher fokussiert sich auch die Untersuchung des 2003 etablierten Hefe-PD-Modells insbesondere auf grundlegende Fragestellungen, wie die zelluläre Lokalisation des humanen α Syn-Proteins sowie dessen dosisabhängigen Einfluss auf die Proteinqualitätskontrolle, vesikuläre Transportmechanismen und unter anderem mitochondriale Funktion (Büttner et al., 2008; Galka et al., 2024; Outeiro & Lindquist, 2003).

3.2 *Saccharomyces cerevisiae* in der PD-Forschung

Da es sich bei α Syn um ein wirbeltierspezifisches Protein handelt, welches außerdem primär in neuronalem Gewebe vorkommt, existiert kein strukturelles oder funktionales Homolog in *S. cerevisiae*. Die erste Verwendung von Hefe als PD-Modell erfolgte in einer Studie aus dem

Jahr 2003 durch Tiago Outeiro und Susan Lindquist (Outeiro & Lindquist, 2003). In dieser Studie wurde humanes α Syn mit einem C-terminalen GFP-Epitop fusioniert und heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert. Dies erfolgte einerseits durch direkte Integration des Gens in das Hefegenom, andererseits über die Verwendung episomaler Plasmide.

Seitdem erschienen zahlreiche Studien, insbesondere genetische Hochdurchsatz-Screenings, die bereits vielfältige Einblicke in Eigenschaften und Interaktionen von α Syn gewähren konnten (Menezes et al., 2015). Humanes α Syn, das heterolog in Hefe exprimiert wird, wird entlang der sekretorischen Maschinerie zu Knospungsstellen an der PM befördert, wo Tochterzellen der asexuellen Fortpflanzung entstehen (Dixon et al., 2005; Outeiro & Lindquist, 2003). Temperaturabhängige Inaktivierung wichtiger sekretorischer Rab GTPasen, wie „secretory protein 4“ (Sec4), Sec9 (PM-Fusion) und Sec14 (Golgi-Transport) resultieren in einer zytoplasmatischen α Syn-Lokalisation (Dixon et al., 2005).

Studien zeigen zudem, dass die Erhöhung des Expressionslevels von α Syn, beispielsweise durch multiple genomische Integration, die Wachstumsrate und chronologische Lebensspanne signifikant reduziert und membranständige α Syn-Inklusionen hervorruft (Petroi et al., 2012; Sampaio-Marques et al., 2012). In Menschen wurde ebenfalls beschrieben, dass SNCA-Duplikationen und -Triplikationen zu einer verstärkten Toxizität von α Syn führen (Oliveira et al., 2015). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten dabei, dass α Syn in Wildtyp-Hefen nicht amyloid, sondern überwiegend in großen vesikelassoziierten Clustern akkumuliert (Gitler et al., 2008; Soper et al., 2008).

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang ein großangelegtes genetisches Screening, das zeigte, dass die Expression von α Syn in Deletionsstämmen mit Defekten in der Lipidbiosynthese, im intrazellulären Transport und im Vesikeltransport, häufig zu synthetischer Letalität führt. Zu den relevanten Proteinen gehören unter anderem der Inositol-abhängige Transkriptionsfaktor „inositol requiring 4“ (Ino4), der Rab GTPase-Aktivator „multicopy suppressor of bud emergence 3“ (Msb3), die endosomale Recyclingkomponente Vps52 (Endosom-Golgi-Transport), das Syntaxin 16-Homolog „t-SNARE affecting a late Golgi compartment 2“ (Tlg2) (t-SNARE-Protein) und der spät-endosomale Marker Vps24 (Willingham et al., 2003). Gleichzeitig konnte ein Screening überexprimierter Proteine zeigen, dass unter anderem Faktoren des Vesikeltransports wie Ypt1, Ykt6 und Sec21 ebenfalls die α Syn-Toxizität modulieren können. Wie auch in Säugerzellen beobachtet, koloalisiert humanes α Syn mit diversen endosomalen Rab GTPasen, wie Ypt6, Ypt31 und Ypt32. Die gleiche Studie konnte zudem zeigen, dass die Expression von α Syn endosomale Transportdefekte hervorruft und die Überexpression der Endosom-Golgi-Rab GTPase Ypt6 der Bildung zellulärer α Syn-Akkumulationen entgegenwirkt (Soper et al., 2011).

Auch in Bezug auf die Proteinqualitätskontrolle konnten im Hefemodell bereits einige PD-relevante Phänotypen beobachtet werden. So inhibiert die Expression von α Syn das UPS und

es kommt zu einer Anreicherung ubiquitiniertes Proteine (Galka et al., 2024; Outeiro & Lindquist, 2003; Popova et al., 2021). Auch die Überexpression UPS-relevanter Proteine wie „HMG-CoA reductase degradation protein 1“ (Hrd1), „Ubiquitin-specific-processing protease 7“ (Ubp7) und Upb11 moduliert die α Syn-Toxizität in *S. cerevisiae* (Yeger-Lotem et al., 2009). Studien konnten zudem zeigen, dass α Syn-reiche Inklusionen primär durch Autophagie abgebaut werden und die α Syn-Expression eine Anreicherung des Autophagie-Markers „autophagy-related protein 8“ Atg8 induziert (Sampaio-Marques et al., 2012; Tenreiro et al., 2014). Dieser Prozess läuft verlangsamt ab, wenn α Syn mit einer post-translationalen Phosphorylierung an S129 – einem bekannten PD-Marker – versehen ist (Tenreiro et al., 2014).

In alternden postmitotischen Zellen resultiert die Expression von α Syn zudem in einem Wiedereintritt in den Zellzyklus und einem erhöhten autophagischen Zelltod (Sampaio-Marques et al., 2019). Ein ähnlicher Effekt wurde in H4 Neurogliomzellen beobachtet und wird auch in Neuronen von Patienten neurodegenerativer Erkrankungen vermutet (Wu et al., 2024).

Interessanterweise hängt eine Vielzahl der beobachteten Effekte – einschließlich Lokalisation, Wachstumsrate, Lebensspanne, Proteinqualitätskontrolle und Rab-Interaktionen – vom Vorhandensein des lipidbindenden N-Terminus von α Syn ab (Dixon et al., 2005; Outeiro & Lindquist, 2003; Vamvaca et al., 2009). N-terminale Deletionen oder die Einführung der PD-assoziierten A30P-Mutation, die eine signifikante Verringerung der Membranbindung hervorruft, resultieren in einer zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins und weitestgehend schwächeren zytotoxischen Effekten. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Lipid-Bindeeigenschaften haben sich die mutierten A30P- und A53T-Varianten als gängige Kontrollen für α Syn-Untersuchungen in *S. cerevisiae* etabliert (Dixon et al., 2005; Outeiro & Lindquist, 2003).

Diese Befunde verdeutlichen, dass die Interaktion von α Syn mit Lipidmembranen nicht nur die subzelluläre Lokalisation, sondern auch maßgeblich die Zytotoxizität bestimmt. Besonders der N-Terminus, mit seiner hohen Affinität zu anionischen Phospholipiden, erweist sich dabei als zentraler Modulator zellulärer Effekte (Bartels et al., 2010; Pirc & Ulrih, 2015). Damit rücken Lipid- α Syn-Interaktionen zunehmend in den Fokus, insbesondere im Kontext vesikulärer Transportprozesse und der Proteinqualitätskontrolle. Um diese Zusammenhänge zu verstehen, ist ein grundlegender Überblick über den zellulären Lipidmetabolismus notwendig, der im Folgenden dargestellt wird.

4. Lipidmetabolismus in intrazellulären Transportprozessen

4.1 Übersicht und Bedeutung des zellulären Lipidmetabolismus

Lipide sind eine essenzielle Stoffklasse, die etwa 10% aller Makromoleküle in eukaryotischen Zellen ausmacht (van Meer et al., 2008). Neben ihrer Rolle als Energiespeicher und Signalmoleküle, sind sie vor allem als strukturelle Komponenten biologischer Membranen von grundlegender Bedeutung. Zu den häufigsten zellulär vorkommenden Lipiden gehören Cholesterine bzw. Ergosterole in *S. cerevisiae*, Sphingolipide und Glycerolipide. Während Ergosterole und Sphingolipide insbesondere für die Stabilität und Fluidität von Biomembranen verantwortlich sind und „Lipid rafts“ ausbilden, um zelluläre Funktionen zu regulieren, bilden Glycerolipide das Fundament aller eukaryotischen Membranen (Simons & Ikonen, 1997). Glycerolipide bestehen aus einem zentralen Glycerin-Molekül, welches ein- bis dreifach mit Fettsäureketten verestert werden kann. Dreifach veresterte Glycerine bilden TAGs, welche wiederum eine Speicherform darstellen und zusammen mit Sterolestern (z.B. Ergosterol) in sogenannten „Lipid droplets“ gelagert werden.

Strukturelle Glycerolipide basieren auf zweifach veresterten Diacylglyceriden (DAG) und können an der dritten Position phosphoryliert (Glycerophospholipide) oder selten glykosyliert (Glykoglycerolipide) werden. Glycerophospholipide (im Folgenden Phospholipide) sind amphiphile Moleküle, das heißt sie bestehen aus einem hydrophilen und einem lipophilen Teil. Diese besondere chemische Eigenschaft begünstigt die Ausbildung von Mizellen und Lipiddoppelschichten (Biomembranen) in polarer Umgebung, da sich die hydrophilen Kopfgruppen unter entropischem Druck in Richtung des wässrigen Milieus ausrichten und die unpolaren Fettsäurereste einen hydrophoben Kern bilden. Die Länge und Sättigung der veresterten Fettsäuren bestimmt dabei die Fluidität bzw. Rigidität der Membran, wohingegen eine Vielzahl kovalent gebundener Kopfgruppen insbesondere Ladung und Krümmung der Membranoberfläche beeinflusst (Seddon, 1990; van den Brink-van der Laan et al., 2001).

Im Laufe der eukaryotischen Evolution haben sich zelluläre Kompartimente ausgebildet, welche von Membranen mit definierten Lipidkompositionen umschlossen werden. Die Zusammensetzung dieser Membranen ist essenziell für die Funktionalität aller zellulären Prozesse, insbesondere innerhalb der jeweiligen Kompartimente (Sarmiento et al., 2023). Dabei spielt die zelltyp- und kompartimentspezifische Synthese und Verteilung der Lipide eine entscheidende Rolle. Die Synthese der am häufigsten vorkommenden Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol (PI) findet hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, wobei PC und PE unter Cholin- bzw. Ethanolamin-reichen Bedingungen direkt aus DAG über den „Kennedy-Weg“ synthetisiert werden können (Abbildung 5) (Gibellini & Smith, 2010). PI hingegen wird aus dem Vorläuferlipid Phosphatidsäure (PA) gewonnen, indem es durch Cytidintriphosphat (CTP) zu

CDP-DAG umgesetzt wird und auf ein freies Inositol übertragen wird (Klug & Daum, 2014). Unter Cholin- bzw. Ethanolamin-Mangelbedingungen kann der sogenannte „CDP-DAG-Weg“ auch zur Synthese von PE und PC genutzt werden (Carman & Han, 2011).

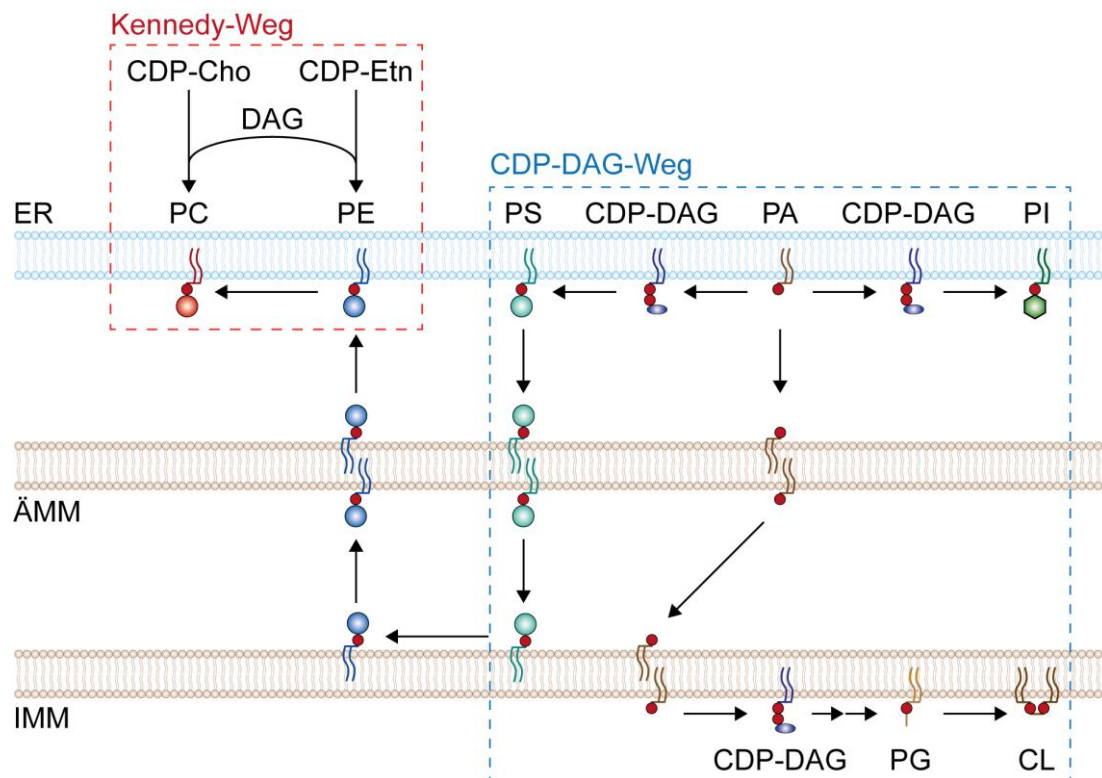


Abbildung 5: Überblick über die zelluläre Phospholipid-Biosynthese. In Eukaryoten erfolgt die Biosynthese von Phospholipiden (PL) in zwei unterschiedlichen Prozessen. Die Synthese von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin erfolgt primär über den Kennedy-Weg am ER (roter Kasten). Cytidindiphosphat (CDP)-aktiviertes Cholin (CDP-Cho) bzw. Ethanolamin (CDP-Etn) wird dabei auf ein Diacylglycerol (DAG) übertragen. Ein alternativer Syntheseweg, welcher zudem alle anderen Klassen der Glycerophospholipide synthetisiert ist der sogenannte CDP-DAG-Weg (blauer Kasten). Dieser Syntheseweg erstreckt sich über das ER sowie die innere und äußere Mitochondrienmembran (IMM und ÄMM) und ist neben PE und PC für die Synthese der Phospholipide Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) verantwortlich.

Hierbei wird aktiviertes CDP-DAG zunächst zu Phosphatidylserin (PS) umgesetzt und in das Mitochondrium transportiert. An der inneren wie auch der äußeren Mitochondrienmembran wird PS zu PE umgesetzt und zurück ins ER transportiert (Aaltonen et al., 2016; Trotter et al., 1993). Durch dreifache Methylierung der Kopfgruppe kann schließlich PC gebildet werden. Unter Normalbedingungen trägt der CDP-DAG-Weg nur zu einem Bruchteil der gesamten PC und PE-Synthese bei (Gibellini & Smith, 2010). Neben der PE-Synthese ist das Mitochondrium als einziges Kompartiment außerdem in der Lage, Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) aus internalisiertem PA zu synthetisieren (Chang et al., 1998). Aus diesem Grund liegen sowohl PG als auch CL fast ausschließlich mitochondrial vor. PA, PC, PE, PI und PS hingegen können ausgehend vom ER in alle Bereiche der Zelle transportiert werden. Da Lipide nicht in der Lage sind, frei im Zytoplasma zu diffundieren, sind spezialisierte Lipid-Transportprozesse für diese Verteilung notwendig.

4.2 Rolle von Lipiden im intrazellulären Membrantransport

Der intrazelluläre Lipidtransport ist ein essenzieller Bestandteil der zellulären Homöostase. Membranlipide können durch unterschiedliche Mechanismen innerhalb der Zelle transportiert werden. Dazu zählen die freie Diffusion innerhalb der Membran, der Transport über Lipidtransportproteine und vesikulärer Transport entlang des Zytoskeletts. Die ersten beiden Transportprozesse werden durch Membrankontaktstellen gewährleistet, welche Membranen unterschiedlicher Kompartimente in räumliche Nähe bringen. Beispielsweise finden sich Kontaktstellen des ER mit allen zellulären Organellen, um sowohl dem Transfer von Proteinen und Metaboliten als auch dem direkten Lipidtransfer zu gewährleisten (Phillips & Voeltz, 2016). Bei der direkten Diffusion werden beide Membranen in räumliche Nähe gebracht, wo sie einer morphologischen Veränderung unterliegen. So verschiebt sich die Membranstruktur von der klassischen Lipiddoppelschicht zum sogenannten „fusion stalk“ (dt. Fusions-Stängel), in dem die Lipide der Kontaktstellen in einer invertiert hexagonalen Phase (H_{II}) vorliegen (Abbildung 6) (Chernomordik et al., 1987; Siegel, 1999). In dieser intermediären Phase können sich Lipide nach dem „Fluid-Mosaik-Modell“ frei entlang des Konzentrationsgradienten bewegen (Pagano & Sleight, 1985; Struck et al., 1981). Findet der Transport über Lipidtransporter statt, binden spezifische Transportproteine an die Lipidkopfgruppen und schirmen den hydrophoben Schwanz mithilfe von Lipid-Bindetaschen vom wässrigen Milieu ab (Wong et al., 2019). An der Zielmembran kann das entsprechende Lipid wiederum in die Doppelschicht integriert werden. Der intrazelluläre Lipidtransfer erfolgt überwiegend über diesen Mechanismus, da er auf verschiedenen Ebenen reguliert werden kann und so eine schnelle Anpassung des zellulären Lipidoms an wechselnde Umweltbedingungen ermöglicht wird (Reinisch & Prinz, 2021).

Obwohl der vesikuläre Lipidtransport einen deutlich geringeren Anteil am Gesamttransport hat, handelt es sich um einen essenziellen Mechanismus für vielfältige zelluläre Prozesse. So hat er einen bedeutenden Einfluss auf das Membranwachstum mitotischer Zellen, die Proteinqualitätskontrolle, die zelluläre Sekretionsmaschinerie, Endozytose und Membranrecycling, die Kommunikation zwischen Organellen und die Signaltransduktion. In neuronalem Gewebe ist vesikulärer Transport zudem notwendig, um die synaptische Transmission zu gewährleisten (Watson et al., 2023).

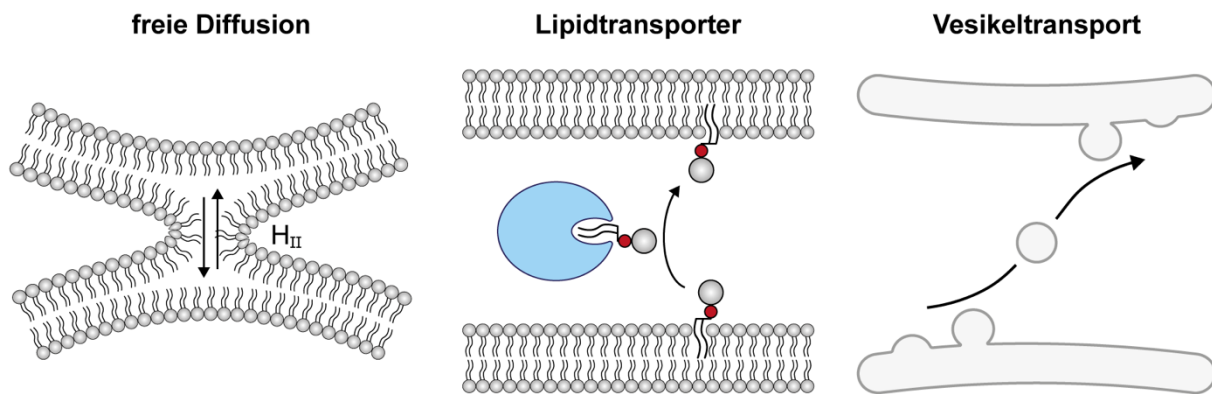


Abbildung 6: Möglichkeiten des zellulären Lipidtransfers. Darstellung der hauptsächlichsten Transportmechanismen in zellulären Systemen. In der freien Diffusion können sich Lipide durch temporäre Membranfusion lateral entlang der Membran bewegen oder transversal durch sogenannte „flip-flops“ zwischen den Doppelschichten springen. Lipidtransporter sind Proteine, welche Lipide auch ohne direkte Membrankontaktstellen zwischen unterschiedlichen Membranen transportieren können. Um diesen Transport zu ermöglichen, schirmen sie die hydrophoben Acylgruppen durch eine Lipid-Bindetasche vom wässrigen Milieu ab. Der Vesikeltransport ermöglicht den Membrantransfer über weite Distanzen (z.B. neuronale Axone). Hierfür wird das Donorvesikel zunächst aus dem Ursprungsorganell abgeschnürt und entlang des Zytoskeletts transportiert. An der Akzeptormembran findet eine zumindest partielle Fusion des Vesikels mit der Organellmembran statt. Der Lipidtransfer erfolgt entweder durch vollständige Verschmelzung des Vesikels mit der Akzeptormembran oder durch freie Diffusion einzelner Lipide entlang des Konzentrationsgradienten.

Im Zentrum des vesikulären Membrantransports stehen oft Phosphoinositide (PIPs), die als membranbildende Signallipide fungieren, indem sie bestimmte Rab GTPasen und deren Effektoren binden bzw. rekrutieren können (Koike & Jahn, 2024).

Rab GTPasen sind eine Familie kleiner GTPasen, welche als molekulare „Schalter“ agieren, um vesikuläre Transportprozesse zu regulieren (Pereira-Leal & Seabra, 2001). Sie kommen in zahlreichen vesikulären Transportprozessen vor und sind in allen Eukaryoten hoch konserviert. Rab GTPasen haben spezifische Lokalisationen und Funktionen, die unter anderem durch die Bindung an bestimmte membranständige Proteine, sogenannte „GDP-dissociation inhibitor (GDI) displacement factors“ (GDF) determiniert werden (Stenmark, 2009). Aktivierte, GTP-beladene Rab GTPasen interagieren mit Effektoren (z.B. SNARE-Proteinen), um beispielsweise die Fusion zweier Membranen zu induzieren. Anschließend werden sie durch GTP-Hydrolyse und der Bindung eines GDIs wieder in den inaktiven Zustand überführt.

PIPs und Rab GTPasen bilden ein gekoppeltes System, das die Identität von Membrankompartimenten definiert und den Transport reguliert. Es existieren sieben unterschiedliche PIP-Spezies, die durch ein- bis dreifache Phosphorylierung der drei freien Hydroxylgruppen an der PI-Kopfgruppe synthetisiert werden und durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung ineinander umgewandelt werden können (Abbildung 7A) (Tolias & Cantley, 1999).

4.3 Die Biosynthese von Phosphoinositiden

Bei der PIP-Biosynthese handelt es sich um einen hochkonservierten Prozess eukaryotischer Organismen, mit ausgeprägten Homologien zwischen unterschiedlichen Spezies. So wurden für jede säugerspezifische PI-Kinase-Familie Homologe in Hefen und anderen niederen Eukaryoten gefunden. Die Grundlage der PIP-Synthese bildet das am ER synthetisierte PI, welches aus CDP-aktiviertem DAG gebildet wird (Nikawa & Yamashita, 1984). PI kann anschließend durch einfache Phosphorylierung zu PI3P und PI4P umgesetzt werden (Abbildung 7B). Die Synthese von PI3P erfolgt dabei durch Klasse II PI3-Kinasen (PI3K) PI3KC2 α/β und die Klasse III PI3K VPS34 (Vps34 in Hefen) (Foster et al., 2003). PI4P entsteht durch die Enzyme PI4K α [„staurosporine and temperature sensitive 4“ (Stt4) in Hefen], PI4K β (Pik1 in Hefen) sowie die Klasse II PI4Ks PI4K2 α/β [„Las seventeen binding protein 6“ (Lsb6) in Hefen] (Tolias & Cantley, 1999).

Die Synthese von PI5P ist noch nicht vollständig geklärt, da die 5-phosphorylierenden Kinasen PIP5K $\alpha/\beta/\gamma$ vornehmlich PI4P als Substrat verwenden um PI4,5P2 zu synthetisieren (Boronenkov & Anderson, 1995; Loijens & Anderson, 1996; Tolias & Cantley, 1999). Daher erfolgt die PI5P-Synthese vermutlich über 3-Dephosphorylierung von PI3,5P2 durch „myotubularin-related-“ (MTMR-)Phosphatasen (Zolov et al., 2012).

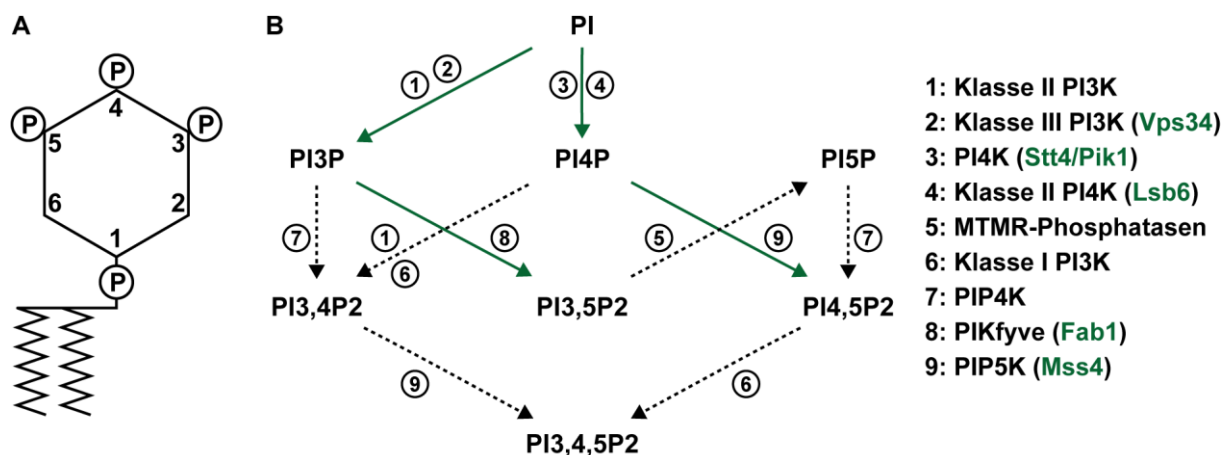


Abbildung 7: Überblick über die Enzyme der PIP-Biosynthese.A: Darstellung des Inositolrings von PI und die möglichen Phosphorylierungspositionen an den Kohlenstoffen C3, C4 und C5 zur Synthese von Phosphoinositiden. B: Darstellung der Synthese aller PIP-Spezies in Säugern und *S. cerevisiae*. Enzyme, welche die jeweiligen Schritte katalysieren, sind mit Nummern dargestellt und rechts aufgeführt. Die Hefe-Homologe der jeweiligen Enzyme sind in Klammern beigefügt. Synthesewege, die sowohl in Säugern, als auch in *S. cerevisiae* existieren, sind als durchgängige grüne Pfeile markiert, säugerspezifische Wege sind als gepunktete Pfeile gekennzeichnet. Die Abbildung ist angelehnt an (Rusten & Stenmark, 2006; Tolias & Cantley, 1999).

Die einfach phosphorylierten PIP-Spezies können anschließend in PI_{3,4}P₂, PI_{3,5}P₂ und PI_{4,5}P₂ umgewandelt werden. PI_{3,4}P₂ wird dabei entweder aus PI₄P durch die Klasse I PI3Ks p110 α / β / δ / γ und Klasse II PI3Ks PI3KC2 α / β oder durch die 4-Kinasen PIP4K α / β / γ aus PI₃P synthetisiert (Ray et al., 2024; Tolia & Cantley, 1999). Zudem ist die PI_{3,4}P₂-Synthese durch 5-Dephosphorylierung von PI_{3,4,5}P₃ möglich (Goulden et al., 2018). Da in *S. cerevisiae* weder Klasse II PI3Ks noch PI_{3,4,5}P₃ vorkommen, konnte PI_{3,4}P₂ dort bisher nicht nachgewiesen werden. PI_{3,5}P₂ wird aus PI₃P durch die Aktivität der konservierten PI₃P-5-Kinase PIKfyve [„formation of aploid and binucleate cells protein 1“ (Fab1) in Hefen] gebildet (Cabezas et al., 2006). PI_{4,5}P₂ entsteht entweder aus PI₄P durch die 5-Kinasen PIP5K α / β / γ [„multicopy suppressor of Stt4 mutation 4“ (Mss4) in Hefen] oder aus PI₅P durch die 4-Kinasen PIP4K α / β / γ (Boronenkov & Anderson, 1995; Loijens & Anderson, 1996; Tolia & Cantley, 1999). Die dreifach phosphorylierte PIP-Spezies PI_{3,4,5}P₃ wird schließlich von vier unterschiedlichen Klasse I PI3Ks (p110 α , p110 β , p110 δ und p110 γ) gebildet (Auger et al., 1989; Rusten & Stenmark, 2006; Tolia & Cantley, 1999; Traynor-Kaplan et al., 1989).

4.4 Die lokalisierte PIP-Synthese in *S. cerevisiae*

Wie bereits beschrieben existieren in *S. cerevisiae* sechs bekannte PI-Kinasen, welche für die Synthese der vier PIP-Spezies PI₃P, PI₄P, PI_{3,5}P₂ und PI_{4,5}P₂ verantwortlich sind (Strahl & Thorner, 2007). Die PI₃-Kinase (PI3K) Vps34 bildet die katalytische Untereinheit des PI3K-Komplexes und ist im Gegensatz zu den vier bekannten PI₃P-synthetisierenden Enzymen in Säugern die einzige PI3K in *S. cerevisiae* (Gillooly et al., 2000). Der Hefe-Komplex besteht aus den Kern-Untereinheiten Vps34, Vps15 und Atg6 (Kihara et al., 2001). Die zusätzliche Rekrutierung von Atg14 und einem Atg38-Homodimer bildet den gesamten PI3K-Komplex I, welcher die PI₃P-Synthese an reifenden Autophagosomen katalysiert. Komplex II wird hingegen durch Bindung der Untereinheit Vps38 gebildet, welcher an Endosomen rekrutiert wird (Ohashi et al., 2019; Rostislavleva et al., 2015). Die Deletion von Vps34 resultiert in schwerwiegenden Phänotypen, wie einer defekten autophagischen Maschinerie und gestörten vakuolären Sortierprozessen sowie erhöhter Osmo- und Temperatursensitivität und einer deutlich verlängerten Generationszeit (Herman & Emr, 1990; Kihara et al., 2001). Die Umwandlung von PI₃P in PI_{3,5}P₂ durch Fab1 erfolgt sowohl an endosomalen Strukturen als auch an der Zellvakuole (Gary et al., 1998). Die Deletion von Fab1 ist nicht letal und verursacht weniger ausgeprägte Defekte als der Verlust von Vps34, resultiert jedoch ebenfalls in einer abnormalen Vakuolenmorphologie sowie reduzierter Stresstoleranz (Yamamoto et al., 1995).

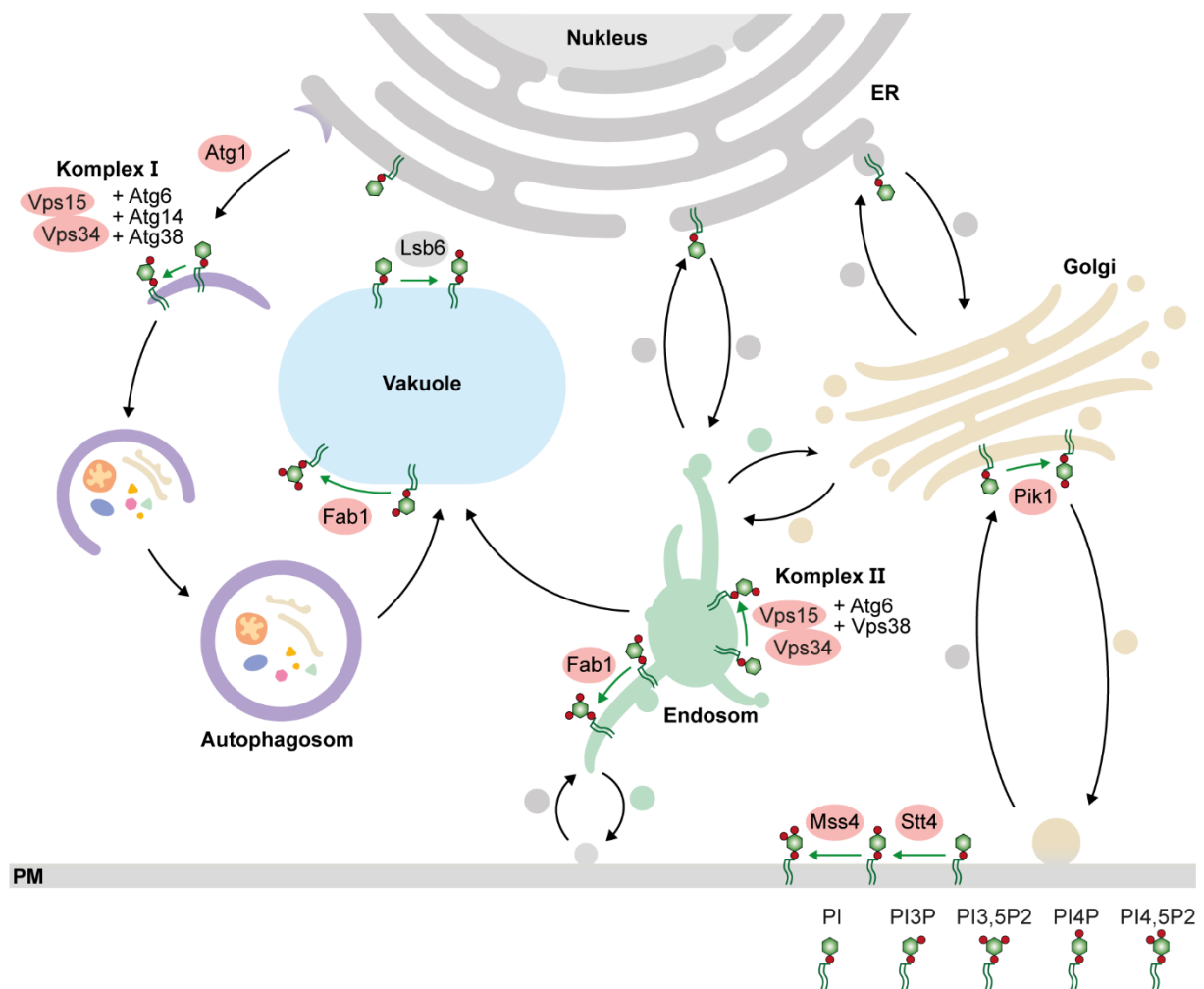


Abbildung 8: Phosphoinositid-Biosynthese in *Saccharomyces cerevisiae*. Die Synthese der Phosphoinositide aus Phosphatidylinositol erfolgt in verschiedenen zellulären Kompartimenten von *S. cerevisiae*. PI3P wird sowohl an reifenden Autophagosomen durch den PI3-Kinasekomplex I (Komplex I), als auch an Endosomen durch Komplex II synthetisiert. Die Kernkomponenten beider Komplexe sind Vps34 und Vps15. Die Synthese von PI3,5P2 aus PI3P erfolgt an der Vakuole oder endosomalen Strukturen durch Fab1. PI4P wird durch unterschiedliche Enzyme an jeweils unterschiedlichen Membranen synthetisiert. Lsb6 generiert PI4P an der Vakuole, Pik1 wirkt am trans-Golgi-Apparat und die PI4P-Synthese durch Stt4 erfolgt an der Plasmamembran (PM). PI4,5P2 wird ebenfalls an der PM durch Mss4 synthetisiert. Abbildung angepasst aus (Löser et al., 2025).

Für die PI4P-Synthese existieren in *S. cerevisiae* drei unterschiedliche Kinasen, welche die 4-Phosphorylierung von PI in unterschiedlichen Kompartimenten katalysieren. Lsb6 ist hauptsächlich an der Vakuole lokalisiert, Pik1 synthetisiert PI4P an trans-Golgi-Membranen und Stt4 ist eine PM-lokalisierte PI4K (Audhya & Emr, 2002; Natarajan et al., 2009; Shelton et al., 2003). Die Synthese von PI4,5P2 erfolgt an der PM und wird durch die einzige PI4P 5-Kinase Mss4 katalysiert (Ling et al., 2012). Im Gegensatz zu Vps34, Fab1 und Lsb6 handelt es sich bei Pik1, Stt4 und Mss4 um essenzielle Proteine, weshalb eine vollständige Deletion dieser Gene nicht möglich ist (Engel et al., 2025). In früheren Studien wurden daher temperatursensitive Allele eingesetzt, die bereits bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C zu einer reduzierten Synthese spezifischer PIP-Spezies führen; ein Effekt, der durch eine Temperaturerhöhung auf 37 °C zusätzlich verstärkt wird (Audhya & Emr, 2002; Audhya & Emr,

2003; Shin et al., 2020). Eine Vollständige Deletion von Stt4 kann zudem teilweise durch die Überexpression von Lsb6 komplementiert werden (Han et al., 2002).

Damit stellen PIPs ein zentrales Bindeglied zwischen Membranorganisation, intrazellulärem Transport und zellulärer Signaltransduktion dar – Prozesse, die auch für die Proteinqualitätskontrolle, den endosomalen Transport und insbesondere die Pathogenese der Parkinson-Krankheit von entscheidender Bedeutung sind.

5. Phosphoinositide in vesikulären Transportmechanismen

5.1 PIPs in der zellulären Proteinqualitätskontrolle

Die zelluläre Proteinqualitätskontrolle dient der Identifizierung fehlgefalteter oder denaturierter Proteine, welche entweder durch Chaperon-medierte Neufaltung in den nativen Zustand zurückgeführt oder gezielt abgebaut werden (Chen et al., 2011). Dieser Abbau kann durch Ubiquitinierung des Zielproteins und anschließende Degradation mithilfe des Proteasoms erfolgen. Aufgrund der hohen Spezifität und Reaktionsgeschwindigkeit wird ein Großteil der fehlgefalteten Proteine über das UPS abgebaut (Hochstrasser, 1995).

Wird die Last fehlgefalteter Proteine zu groß oder lagern sich diese Proteine zu größeren, unlöslichen Aggregaten zusammen, ist das Proteasom in der Regel nicht mehr in der Lage, diese Proteine effizient abzubauen. Dieses Defizit kann von der Autophagie-Maschinerie kompensiert werden (Verhoef et al., 2002; Zheng et al., 2011). Bei Autophagie (altgr. „autóphagos“ – sich selbst verzehrend) handelt es sich um einen weiteren evolutionär hochkonservierten Prozess, bei dem geschädigte Proteine und ganze zelluläre Kompartimente wie auch eingedrungene Pathogene gezielt abgebaut werden; gleichzeitig dient sie unter Nährstoffmangelbedingungen der Energiegewinnung. Die autophagische Maschinerie lässt sich grob in Mikro- und Makroautophagie unterteilen. In der Mikroautophagie werden zur Degradation determinierte Moleküle direkt im Lysosom eingeschlossen, während die Makroautophagie die Ausbildung eines Phagophors voraussetzt (Suzuki et al., 2007). In der Chaperon-vermittelten Autophagie, welche nicht in *S. cerevisiae* identifiziert wurde, werden spezifische Proteine anhand eines Signalpeptids (KFERQ) erkannt und selektiv zum lysosomalen Rezeptorprotein „Lysosome-associated membrane protein 2A“ (LAMP2A) transportiert (Chiang et al., 1989; Orenstein & Cuervo, 2010).

Die Makroautophagie, also der Abbau größerer zellulärer Bestandteile ist auf die Bildung eines Autophagosoms angewiesen. Dabei handelt es sich um eine vesikuläre Doppelmembranstruktur, welche zu degradierendes Cargo umschließt und entlang des Zytoskeletts zur Vakuole bzw. dem Lysosom befördert. Im Gegensatz zum UPS ist die Autophagie daher auf die Neusynthese und den Transport spezifischer Lipide angewiesen, insbesondere PIPs aufgrund ihrer Signalwirkung (Dall'Armi et al., 2013).

Die Initiation der Autophagie erfolgt in *S. cerevisiae* und Säugerzellen unter Stressbedingungen wie Nährstoffmangel oder Faltungsstress zunächst durch die „AMP-activated protein kinase“ (AMPK)- und „target of rapamycin kinase complex 1 (TORC1)-abhängige Aktivierung des Atg1-/ „Unc-51-like kinase 1-“ (ULK1-)Komplexes am ER (Jung et al., 2009). Die Aktivierung dieses Initiationskomplexes erfolgt unter anderem konserviert durch Dephosphorylierung des indirekten Autophagie-Inhibitors PI3,5P2 sowie PI3,4,5P3 in Säugern (Abbildung 9) (Arico et al., 2001; Jin et al., 2014; Sarbassov et al., 2005). Anschließend erfolgt die konservierte Bildung von PI3P durch die PI-Kinase Vps34 (VPS34), welche von der Proteinkinase Vps15 (VPS15) aktiviert wird. Durch die Anreicherung von PI3P am ER und die Anlagerung weiterer PI3P-bindender Proteine entsteht an der „phagophore assembly site“ (PAS) der Phagophor, der zum Autophagosom heranreift (Axe et al., 2008). In Hefen spielt darüber hinaus die 1-Phosphatidylinositol 4-Kinase- (Pik1-)abhängige Synthese von PI4P eine wichtige Rolle bei der Phagophor-Entstehung (Kurokawa et al., 2019).

Zur Reifung des Phagophors ist auch das Phospholipid PE von großer Bedeutung. PE wird kovalent an das autophagische Adapterprotein Atg8 [„microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)] gebunden, wodurch es als Lipid-Protein-Komplex in die Phagophormembran eingebaut werden kann (Polson et al., 2010; Xie et al., 2008). Die konische Form von PE begünstigt eine positive Membrankrümmung und die Atg8/LC3-induzierte Membranasymmetrie trägt so zur Reifung des Phagophors zum reifen Autophagosom bei (Knorr et al., 2012). Da Phospholipide in der Regel am ER synthetisiert werden, und das Autophagosom seinen Ursprung am ER hat, findet die Bereitstellung neuer Lipide zur Elongation des Phagophors am ER statt (Kotani et al., 2018). Dies erfolgt insbesondere durch den Lipidtransporter Atg2 im konservierten Atg9-Atg2-Atg18-Komplex, durch die Bindung an autophagosomalen PI3P-Pools (Gómez-Sánchez et al., 2018; Krick et al., 2006).

Ein wichtiger Schritt der finalen Autophagosom-Reifung ist die Reduktion des autophagosomalen PI3P-Spiegels. In *S. cerevisiae* geschieht dies entweder durch 3-Dephosphorylierung von PI3P durch die Phosphatase „yeast myotubularin-related protein 1“ (Ymr1), oder durch die Umwandlung von PI3P zu PI3,5P2 durch Fab1 unmittelbar vor der Fusion mit der Vakuole (Cebollero et al., 2012; Rusten et al., 2007). In Säugern werden sowohl PI3P und PI3,5P2 durch MTMR-Proteine oder SYNJ1 dephosphoryliert (George et al., 2016; Taguchi-Atarashi et al., 2010). Die Reduktion des autophagosomalen PI3P-Spiegels erfolgt nach der Umschließung des Cargos und hat die Dissoziation der membrangebundenen ATG-Proteine zur Folge.

Das gereifte Autophagosom kann anschließend mit dem Lysosom bzw. der Vakuole verschmelzen, wo das Cargo lytisch degradiert wird (Fader et al., 2008). Auch diese Membranfusion ist auf das Vorhandensein von PIPs angewiesen. So zeigen Studien, dass die Inhibition der Autophagosom-lokalisierten PI4P-Synthese einen negativen Einfluss auf die Bildung von Autolysosomen in Säugern hat (Wang et al., 2015). Auch die Regulation der zellulären PI3,5P2- und PI4,5P2-Level werden für eine effiziente Verschmelzung von Autophagosom und Vakuole bzw. Lysosom benötigt (Baba et al., 2019; Rusten et al., 2007).

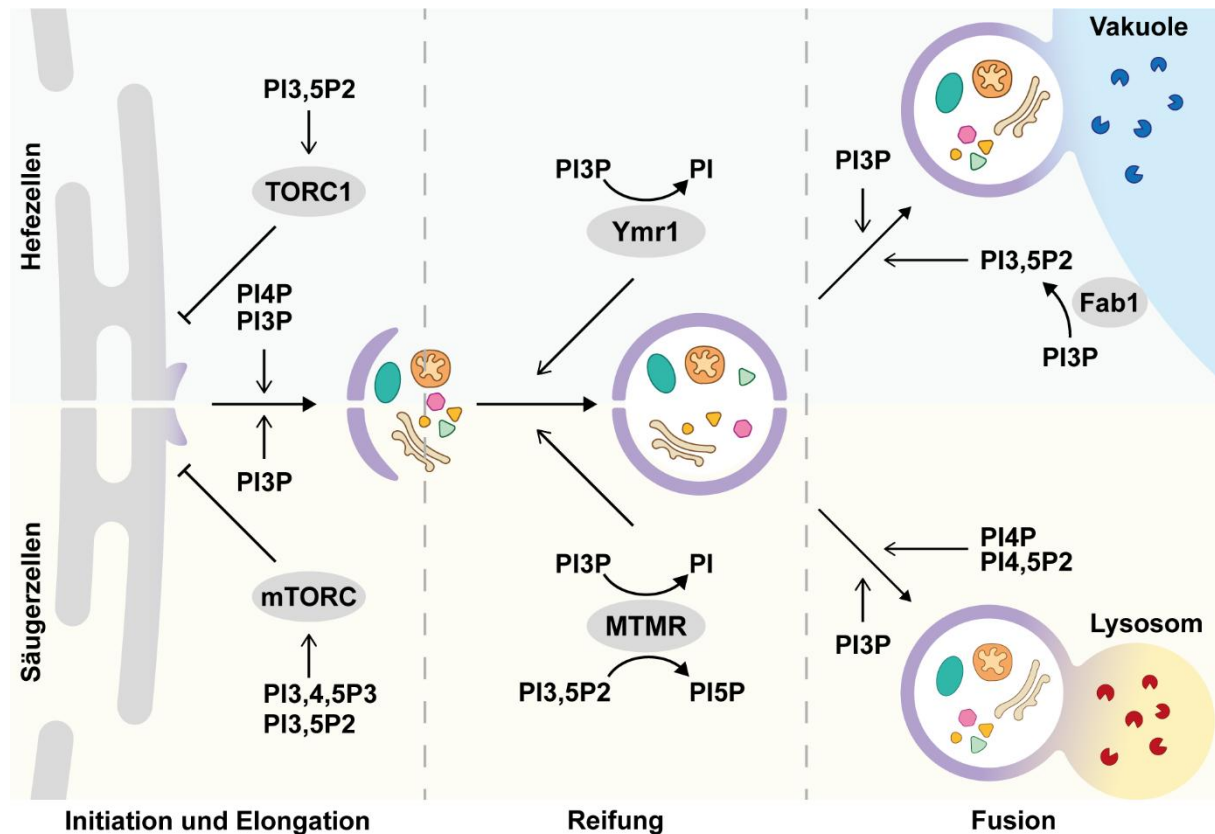


Abbildung 9: Signalfunktionen von PIPs in der Autophagie. Der gesamte autophagische Prozess wird direkt und indirekt von verschiedenen PIP-Spezies reguliert, teilweise konserviert von *S. cerevisiae* zu Säugern. PI3,5P2 und in Säugern zusätzlich PI3,4,5P2 aktivieren unter nährstoffreichen Bedingungen den TOR-Komplex (TORC1/mTORC), welcher Autophagie inhibiert. Die ortsspezifische Dephosphorylierung dieser Spezies und die Synthese von PI3P aktivieren die Initiation der autophagischen Maschinerie am ER und den Elongationsprozess des Phagophors. In *S. cerevisiae* trägt außerdem PI4P zur Elongation des Phagophors bei. Das Reifen der Doppelmembran zum geschlossenen Autophagosom erfordert die 3-Dephosphorylierung von PI3P sowie PI3,5P2 in Säugern durch Ymr1 bzw. MTMR-Phosphatasen. Die Fusion von Autophagosom und dem lytischen Kompartiment erfordert wiederum die Synthese von PI3P. In Hefen wird zudem vakuoläres PI3,5P2 benötigt, welches durch Fab1 synthetisiert wird. PI4P und PI4,5P2 wurden insbesondere mit der Fusion von Autophagosom und Lysosom in Säugerzellen in Verbindung gebracht.

5.2 PIPs in endosomalen Transportprozessen

Endosomale Prozesse sind entscheidend für den Transport zellulärer Materialien zwischen räumlich getrennten Kompartimenten, die keine direkten Kontaktstellen ausbilden. Im Zentrum steht das Endosom als sortierendes Kompartiment, welches sowohl endozytotisch internalisiertes Cargo als auch neusynthetisierte Moleküle in der Zelle verteilen, für die Degradation in der Vakuole bzw. dem Lysosom determinieren, oder für die Sekretion vorbereiten kann (Naslavsky & Caplan, 2018). Da es sich hierbei primär um Vesikel-vermittelte Transportprozesse handelt, steht neben dem Transport eingeschlossener zytosolischer und membranständiger Proteine insbesondere der gezielte Austausch von Lipiden im Mittelpunkt.

Das sogenannte frühe Endosom ist der Ausgangspunkt für endosomales „sorting“. Es handelt sich dabei um ein dynamisches Organell, welches ständigen Fusions- und Fissionsereignissen unterliegt und tubulär-vesikuläre Strukturen ausbildet. Eine bedeutende Charakteristik des sortierenden Endosoms ist das hohe Level an PI3P, welches sowohl in Hefen, als auch Säugern primär durch den Komplex II der PI3K Vps34 generiert wird (Gillooly et al., 2000). PI3P rekrutiert am Endosom Effektorproteine, welche das Lipid durch spezifische Zink-Finger- (FYVE-) und Phox-Homologie- (PX-) Bindedomänen erkennen (Lemmon, 2003). Effektorproteine wie das Säugerprotein „early endosomal antigen 1“ (EAA1) binden an PI3P-haltige Membranen, wie auch Rab GTPasen und interagieren unter anderem mit SNARE-Proteinen zur Membranfusion (Simonsen et al., 1999; Simonsen et al., 1998). Weitere hoch konservierte PIP-Bindeproteine sind sogenannte sortierende Nexine (SNX-Proteine), eine große Familie Lipid-bindender Transportproteine, welche insbesondere für endosomale Sortierungsprozesse verantwortlich sind (Zhong et al., 2002). Im endo-lysosomalen Weg höherer Eukaryoten reguliert unter anderem die Interaktion von SNX11 und PI3,5P2 die Transportprozesse vom frühen Endosom bis zum Endolysosom (Xu et al., 2020). Proteine und Lipide, die nicht zur Degradation determiniert sind, können im endosomalen System über unterschiedliche Recycling-Systeme in der Zelle verteilt werden.

In Hefen und Säugern dient der hoch konservierte Retromerkomplex dem endosomalen Recycling in Richtung des Golgi-Apparats und der PM (Liu, 2016). Der Retromer ist ein Heterotrimer bestehend aus den Proteinen Vps26, Vps29 und Vps35 (VPS26, VPS29 und VPS35 in Säugern) und wird unter anderem durch Interaktion mit SNX-Bin-Amphiphysin-Rvs- (SNX-BAR-) Proteinen wie Vps5 (SNX1/2) und Vps17 (SNX5/6) sowie dem SNX-PX-Protein Snx3 (SNX3) an PI3P-haltige Regionen des Endosoms rekrutiert (Harterink et al., 2011; Strohlic et al., 2007; Temkin et al., 2011; Xu et al., 2001). Durch die Interaktion mit Rab GTPasen (z.B. Rab7) und anschließende Aktin-Polymerisierung werden Retromervesikel letztlich vom Endosom abgeschnürt und in Richtung des Golgi-Apparates oder der PM transportiert (Gomez & Billadeau, 2009). Auch PI3P-bindende SNX-Proteine wie Atg24 (SNX4) sind am Transport endosomaler Vesikel zum Golgi-Netzwerk beteiligt (Hettema et al.,

2003). Die Bedeutung des Retromerkomplexes für die PD-Pathologie wird dadurch unterstrichen, dass beispielsweise die D620N-Mutation der Retromer-Untereinheit VPS35 als gesicherter Risikofaktor für autosomal-dominant vererbte PD identifiziert wurde (Vilariño-Güell et al., 2011).

Der evolutionär verwandte Retrieverkomplex, welcher erst im Jahr 2017 von McNally et al. entdeckt und bislang nicht in Hefen identifiziert wurde, dient primär der Rückführung endosomaler Cargos (z.B. Integrine) an die Zelloberfläche (McNally et al., 2017). Auch diesem Prozess steht initiale Rekrutierung eines Retromer-ähnlichen Komplexes (VPS26C, VPS29 und VPS35L) an das Endosom voran. Dies erfolgt unter anderem mit SNX17, welches mit unterschiedlichen PIP-Spezies, aber insbesondere PI3P interagiert (Stockinger et al., 2002). Die Stabilisierung des Retrieverkomplexes erfolgt durch Interaktion mit dem COMMD-CCDC22-CCDC93- (CCC-)Komplex, dessen Stabilität durch PI3,5P2 und PI5P gewährleistet wird (Giridharan et al., 2022; McNally et al., 2017).

Die Rekrutierung und Stabilisierung von Retromer und Retriever durch endosomale PIPs – insbesondere PI3P und PI3,5P2 – ist entscheidend für das Recycling endosomalen Cargos und hat somit auch einen direkten Einfluss auf die sekretorische Maschinerie. Besonders Moleküle, welche PI3P-abhängig zum Golgi transportiert werden, können so direkt in den kanonischen sekretorischen Weg zur PM eintreten. Dies dient der Exozytose von Botenstoffen, extrazellulären Enzymen oder Toxinen, aber insbesondere im Falle der Knospungshefen auch dem Wachstum der Zelle und der Regulation der PM-Protein- und Lipidkomposition (Vázquez-Martínez et al., 2012). Cargo, das zum Golgi gelangt, wird von PI4P haltigen sekretorischen Vesikeln umschlossen und zur PM transportiert (Wang et al., 2003). Auch dieser Prozess wird durch Rab GTPasen wie Rab8 und Rab10 reguliert (Santiago-Tirado & Bretscher, 2011; Santiago-Tirado et al., 2011). Die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der PM erfolgt am hochkonservierten Exocyst-Komplex, welcher an PI4,5P2-Pools der PM verankert wird und beide Membranen in räumliche Nähe bringt (Zhang et al., 2008).

5.3 PIPs in der synaptischen Transmission

Der Lebenszyklus synaptischer Vesikel stellt eine besonders spezialisierte Form des vesikulären Membrantransports in neuronalen Zellen dar und ist eng mit dem endosomalen Transportsystem und der sekretorischen Maschinerie verknüpft (Hoopmann et al., 2010). Im Mittelpunkt steht der Transport von Neurotransmittern, also chemischen Botenstoffen, die an der präsynaptischen Membran exocytiert werden und anschließend mit spezifischen Rezeptoren an der Postsynapse interagieren. Synaptische Vesikel fungieren hierbei als zentrale Transportvehikel, die nach erfolgter Fusion mit der PM und Transmitterfreisetzung endozytotisch in den intrazellulären Vesikelpool reintegriert werden (Heuser & Reese 1973;

Matteoli et al., 1992). Die Aufrechterhaltung dieses Zyklus ist essenziell für eine intakte Erregungsleitung an chemischen Synapsen. Dysregulationen der vesikulären Transmitterfreisetzung stehen nachweislich in engem Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder PD (Cirrito et al., 2008; Handley et al., 2016; Voelzmann et al., 2016; J. Xu et al., 2016).

Die Vorläufer synaptischer Vesikel werden im neuronalen Zellsoma in einem noch nicht gänzlich aufgeklärten Prozess synthetisiert und entlang des Axons anterograd transportiert (De Pace et al., 2020). Dieser Transport ist unter anderem abhängig von der Funktion von PIKfyve, und dementsprechend der PI3,5P2-Synthese (Abbildung 10) (Rizalar et al., 2023). In voll entwickelten Präsynapsen liegen gereifte synaptische Vesikel in unterschiedlichen Pools vor, welche je nach Intensität und Anzahl der Stimuli ausgeschöpft werden können (Delgado et al., 2000; Elmqvist & Quastel, 1965; Harata et al., 2001; Richards et al., 2003; Zucker & Regehr, 2002).

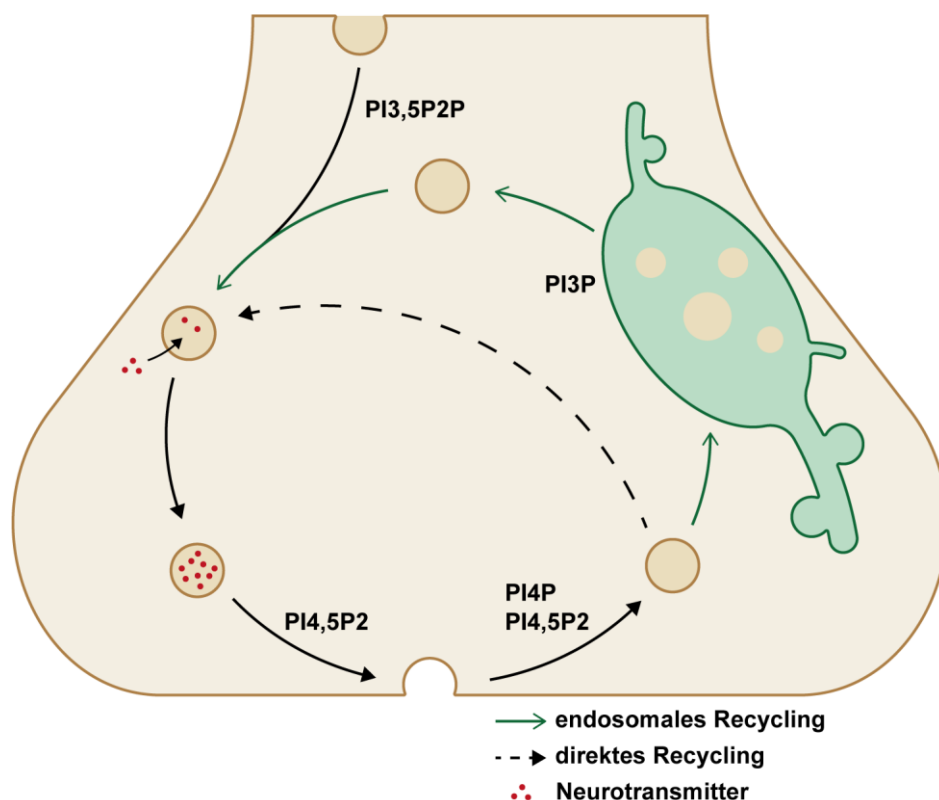


Abbildung 10: Die Rolle von PIPs im Recycling synaptischer Vesikel. Synaptische Vesikel (SV) werden PI3,5P2 abhängig entlang des Axons zur Präsynapse transportiert. Dort werden sie mit Neurotransmittern beladen und in Richtung der PM befördert. Die Exozytose von SV wird durch PI4,5P2 begünstigt. Auch die Re-Endozytose der fusionierten SV erfordert die Neusynthese von PI4P und PI4,5P2. Das Recycling endocytierter SV kann entweder direkt erfolgen (gestrichelter Pfeil) oder über synaptische Endosomen (SE). Dieser Prozess erfordert die Synthese von PI3P.

Mit Neurotransmitter beladene Vesikel werden entlang des Zytoskeletts in Richtung der PM transportiert, wo Rab GTPasen wie RAB3A durch Interaktion mit den SNARE-Proteinen „vesicle-associated membrane protein 2“ (VAMP2), Syntaxin-1 und „synaptosomal-associated protein of 25 kDa“ (SNAP-25), aber auch α Syn „Priming“, „Docking“ und letztlich die Membranfusion induzieren (Gitler et al., 2008; Leenders et al., 2001). Diese Schritte basieren auf evolutionär konservierten Mechanismen, die sogar in nicht-neuronalen Systemen wie *S. cerevisiae* durch die funktionellen Homologe Sec4 (RAB3A), Sec9 (SNAP-25), Snc2 (VAMP2) und „supressor of Sec one“ (Sso1/2; Syntaxine) vermittelt werden.

Der gesamte Fusionsprozess, aber insbesondere das „Docking“ synaptischer Vesikel, ist zudem auf die Interaktion des vesikulären Proteins Synaptotagmin-1 mit PI4,5P2 angewiesen (Y. Chen et al., 2021). Es wurde zudem beschrieben, dass die Neusynthese von PI4P und PI4,5P2 entscheidend für das Recycling exocytierter synaptischer Vesikel ist (Yoshida et al., 2025). Eines der vergleichsweise weniger untersuchten Organellen am Axonterminus ist das synaptische Endosom. Zahlreiche Studien weisen jedoch darauf hin, dass das Recycling synaptischer Vesikel nach der Endozytose unter anderem über die Fusion mit endosomalen Strukturen erfolgt (Holroyd et al., 1999; Liu et al., 2022). So wurde beschrieben, dass Aktionspotentiale die Morphologie synaptischer Endosomen beeinflussen und die Inhibition der PI3P-Synthese durch Wortmannin und VPS34IN1 den Vesikelzyklus unterbricht (Birdsall et al., 2022; Liu et al., 2022). Zudem wurde der endosomale Marker RAB5 auf synaptischen Vesikeln gefunden (Fischer von Mollard et al., 1994). RAB5 ist ein VPS34-Effektor und rekrutiert PI3P-bindende Proteine zu endosomalen Membranen (Christoforidis et al., 1999).

Zielsetzung der Arbeit

Die Synucleinopathien, PD, LBD und MSA bilden eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, deren gemeinsamer Kern in der pathologischen Fehlfaltung und Aggregation von α Syn liegt (Arias-Carrión et al., 2025; Schulte & Gasser, 2011). α Syn ist ein kleines, intrinsisch ungeordnetes Protein, das überwiegend neuronal vorkommt und dort über den N-Terminus mit anionischen Membranlipiden sowie über den C-Terminus mit Rab-GTPasen und SNARE-Proteinen interagiert (Emamzadeh, 2016).

Trotz intensiver Forschung sind sowohl die physiologische Funktion von α Syn als auch die Mechanismen, über die es mit spezifischen intrazellulären Vesikeltransportprozessen interagiert und diese im pathologischen Kontext beeinflusst, bislang nur unzureichend erforscht. Zahlreiche Daten weisen auf eine enge funktionelle Beziehung zwischen α Syn und PIPs hin (Jacob et al., 2021; Middleton & Rhoades, 2010). Diese hochdynamischen Signallipide bestimmen die Identität zellulärer Kompartimente, steuern endosomale Transportprozesse und sind essenziell für die synaptische Transmission (Tariq & Luikart, 2021). Es wurde bereits gezeigt, dass α Syn mit spezifischen PIPs wie PI4,5P2 und PI3,4,5P3 interagiert (Jacob et al., 2021). Darüber hinaus sind Defekte im PIP-Metabolismus, etwa durch *SYNJ1*- und *INPP5F*-Mutationen, als genetische PD-Risikofaktoren identifiziert worden (Krebs et al., 2013; Nalls et al., 2014).

Ziel dieser Arbeit war es, die hohe Konservierung grundlegender zellulärer Prozesse zu nutzen, um das Verhalten von humanem α Syn in der vereinfachten zellulären Umgebung von *S. cerevisiae* systematisch zu untersuchen. Zunächst wurde der Einfluss von α Syn auf zentrale Qualitätskontrollmechanismen – Autophagie und das UPS – analysiert. Darauf aufbauend erfolgte ein genetisches Screening α Syn-exprimierender ATG-Deletionsstämme, um Auswirkungen auf das Wuchsverhalten zu erfassen und eine Verbindung zur typischen PM-Lokalisation von α Syn in Hefe zu prüfen. Dieses Screening zeigte erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen dem Verlust der PI3P-Biosynthese und der Akkumulation sowie Zytotoxizität von α Syn. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, welche weiteren Komponenten des PIP-Metabolismus die subzelluläre Verteilung von α Syn beeinflussen und inwiefern α Syn in die hochkonservierten Transportwege der sekretorischen Maschinerie eingreift. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein hypothetisches Modell entwickelt, das den Transport von α Syn zur PM beschreibt.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten Laborgeräte. Die Tabelle beinhaltet die jeweiligen Gerätebezeichnungen, Modellnummern und Hersteller.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Autoklav	3870ELV	Tuttnauer
Bunsenbrenner	Labogaz 206	Campingaz
Chemilumineszenz-Detektor	Imager 600	Amersham
Eismaschine	AF 80	Scotsman
Elektrophoresekammer DNA	40-0708	Peqlab
	40-1515	Peqlab
Elektrophoresekammer Protein	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Konfokales Laserscan Mikroskop	LSM 710	Zeiss
Gefrierschränke	Herafreeze Basic	Thermo Fisher
	Premium NoFrost	Liebherr
Heizblöcke	Thermomixer compact	Eppendorf
	Thermomixer F1.5	Eppendorf
Homogenisator	Disruptor Genie SI-D258	Scientific Industries
Inkubatoren	Certomat HK	Sartorius
	INCU-Line	VWR
	MaxQ6000	Thermo Fisher
Kühlschränke	Profiline	Liebherr
	Premium	Liebherr
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph
Mikrowelle	KMWC 2524 DS	KOENIC
Netzgeräte (Elektrophorese)	Bio105-LVD	Biometra
	PowerPac Basic	Bio-Rad
PCR-Geräte	TProfessional basic Thermocycler Gradient	Biometra
	TGradient	Biometra
	CFX Connect Real-Time System	Bio-Rad
pH-Elektrode	BlueLine 11 pH	SI Analytics
pH-Meter	CG 820	Schott
Pipetten	ErgoOne (P10)	StarLab
	Research (P200)	Eppendorf
	Research Plus (P20/P1000)	Eppendorf
	Research Plus 8-Kanal (P50)	Eppendorf
Pipettierhilfen	accu-jet	BRAND
Protein-Transfersystem	Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Reaktionsgefäß-Rotierer	Test-tube-rotator 34528	Snijders Scientific
Schallgerät	UP50H	Hielscher
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph
	Rocking Shaker	StarLab
Spektralphotometer	DU 80	Beckman Coulter
	NanoDrop 1000	Peqlab
	Varioskan Lux	Thermo Fisher
UV-Transilluminator	Gel iX imager	Intas
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waagen	PL 1200	Mettler
	BL6100	Sartorius
	Quintix124-1S	Sartorius
Wasseraufbereitung	Milli-Q	Millipore
Wasserbad	CORIO C	Julaba
Zentrifugen	Universal 32	Hettich
	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher

1.2 Stoffe und Chemikalien

Tabelle 2: Auflistung aller Stoffe und Chemikalien. Aufgelistet sind die Bezeichnungen der verwendeten Chemikalien mit Hersteller und Bestellnummer.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
2-Mercaptoethanol	Roth	4227.3
Aceton	Roth	5025.1
Acrylamid/Bisacrylamid 40% (29:1)	Sigma-Aldrich	A7802
Adenosintriphosphat (ATP) Dinatrium-Salz	Sigma-Aldrich	A1852
Agar	Roth	5210.2
Agarose	Sigma-Aldrich	A9539
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich	A3678
Ampicillin	Sigma-Aldrich	A9518
Bacto™ Trypton	Gibco	211705
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Fisher	23228
BCA Protein Assay Reagent B	Thermo Fisher	23224
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	Roth	9140
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A7906
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	B-6131
c0mplete Protease Inhibitor (cPI)	Sigma-Aldrich	5056489001
Concanavalin A	Sigma-Aldrich	C2010
Cycloheximid (CHX)	Roth	8682.1
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth	6878.1

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	7029.2
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth	4984.1
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	10708984001
Essigsäure	Roth	3738
Ethanol p.A.	Roth	9065.2
Ethidiumbromid, 0,07%	AppliChem	A2273
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth	1.084.181.000
FM4-64	Thermo Fisher	T13320
Galactose	Sigma-Aldrich	G0750
Glucose-Monohydrat	Roth	6780.2
Glycerin	Roth	3783
Glycin	Roth	3790.2
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich	Y1625
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich	I3021
Immersol	Zeiss	433802-9000-000
Isopropanol	Roth	6752.4
Kaliumacetat	Roth	6781.1
Kaliumchlorid	Roth	6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	3904.1
Lachsperma-DNA	Thermo Fisher	10249194
L-Histidin	Sigma-Aldrich	H-8000
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich	517992
L-Leucin	Sigma-Aldrich	L-8000
L-Methionin	Sigma-Aldrich	M-9625
Luminol	Sigma-Aldrich	123072
Uracil	Sigma-Aldrich	U-1128
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich	230391
MG132	Sigma-Aldrich	474790
Milchpulver (fettfrei)	Roth	T145.4
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad	1610801
Natriumacetat Trihydrat	Roth	3856.1
Natriumazid	Roth	E2-500
Natriumchlorid	Roth	3957.4
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad	161-0302
Natriumhydroxid	Roth	6771.3
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich	C9008
Pepton	BD	211677
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich	P7626
Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma-Aldrich	P2949
p-Nitrophenylphosphat (Sigmafast™)	Sigma-Aldrich	N1891

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Polyethylenglycol (PEG) 3350	Sigma-Aldrich	88276
Ponceau S	AppliChem	A2935
Raffinose-Pentahydrat	Sigma-Aldrich	R0250
Salzsäure (32%)	Merck	100319
Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-AMC)	Enzo	BML-P802-0005
Trichloressigsäure	Roth	8789.2
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth	4855.3
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (Tris/HCl)	Roth	909.4
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T9284
Tween 20	Roth	9127
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma-Aldrich	95302
Wortmannin	Sigma-Aldrich	W1628
Yeast Nitrogen Base (YNB) w/o AA, w/o Ammonium Sulfate	Thermo Fisher	11743014
Yeast Nitrogen Base (YNB) w/o AA	Thermo Fisher	11753573
Zinksulfat	Sigma-Aldrich	Z0251

1.3 Kommerzielle Puffer

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten kommerziellen Puffersysteme. Die Tabelle beinhaltet die Pufferbezeichnungen, deren Hersteller und Bestellnummer.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
MassRuler DNA Loading Dye (6X)	Thermo Fisher	R0621
NuPAGE™ MES SDS-Laufpuffer (20x)	Invitrogen	NP0002
Phusion™ HF Buffer (10x)	NEB	B0518S
rCutSmart™ Buffer (10x)	NEB	B6004S
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)	NEB	B0202S
Trans-Blot Turbo Transfer Buffer (5x)	Bio-Rad	10026938

1.4 Organismenstämme

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten *Escherichia coli*-Stämme. Dargestellt sind die kommerziellen Kurznamen der Stämme sowie deren vollständiger Genotyp nach Herstellerangaben und der jeweilige Hersteller.

Kurzname	Genotyp	Referenz
NEB® 5-alpha	fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	NEB
XL10-Gold	TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Agilent

Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme. Die Genotypen aller verwendeten Stämme sowie deren Herkunft sind aufgeführt.

Kurzname	Genotyp	Referenz
Wildtyp	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	Euroscarf
<i>atg1Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YGL180W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg2Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YNL242W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg3Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YNR007C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg4Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YNL223W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg5Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL149W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg6Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL120W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg7Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YHR171W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg8Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBL078C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg9Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDL149W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg10Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLL042C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg11Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPR049C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg12Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR217W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg14Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR128C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg16Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR159C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg17Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR423C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg18Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YFR021W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg20Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDL113C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg21Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL100W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg22Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YCL038C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg23Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR431C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg24Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YJL036W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg26Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR189C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg27Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YJL178C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg29Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL166W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg31Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR022C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg32Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YIL146C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg33Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR356W::kanMX4	Euroscarf
<i>atg36Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YJL185C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg38Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR211C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg40Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YOR152C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg41Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL250C::kanMX4	Euroscarf
<i>atg42Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR139W::kanMX4	Euroscarf
<i>fab1Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YFR019W::kanMX4	Euroscarf
<i>lsb6Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YJL100W::kanMX4	Euroscarf
<i>mss4-103</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; mss4-103:kanMX	Euroscarf
<i>pik1-104</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pik1-104:kanMX	Euroscarf
<i>stt4-4</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; stt4-4:kanMX	Euroscarf
<i>vps15Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YBR097W::kanMX4	Euroscarf
<i>vps34Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR240W::kanMX4	Euroscarf
<i>vps38Δ</i>	BY4741; MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR360W::kanMX4	Euroscarf

1.6 Plasmide

Tabelle 6: Darstellung aller verwendeten Plasmide. Die jeweilige Plasmidbezeichnung sowie deren Replikationstyp und Quelle bzw. Referenz sind aufgeführt. Alle dargestellten Plasmide sind selbstreplizierend und werden für die Expression in *S. cerevisiae* genutzt (Buchanan et al., 2016; Krick et al., 2008; Outeiro & Lindquist, 2003; Schiestl & Gietz, 1989).

Plasmid	Typ	Quelle oder Referenz
p426GPD	2 μ	Outeiro und Lindquist (2003)
p426GPD-WT α Syn-GFP	2 μ	Outeiro und Lindquist (2003)
p426GPD-A30P α Syn-GFP	2 μ	Outeiro und Lindquist (2003)
p426GPD-A53T α Syn-GFP	2 μ	Outeiro und Lindquist (2003)
pRS316	CEN/ARS	Schiestl und Gietz (1989)
pRS316GPD-WT α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pRS316GPD-A30P α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pRS316GPD-A53T α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pRS316GPD- Δ 38 α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pRS316GPD- Δ 53 α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pRS416-PMET25-Deg1-Flag-Sec62-2xProtA	CEN/ARS	Buchanan et al. (2016)
pRS315TEF-mRFP-2xFYVE	CEN/ARS	Krick et al. (2008)
p413GPD	CEN/ARS	Schiestl und Gietz (1989)
p413GPD-Vps15-mRUBY	CEN/ARS	Diese Arbeit
p413GPD-Vps34-mRUBY	CEN/ARS	Diese Arbeit
p413GPD-mRUBY-Sec4	CEN/ARS	Diese Arbeit
p413GPD-mRUBY-Sec9	CEN/ARS	Diese Arbeit
p413GPD-mRUBY-Sec14	CEN/ARS	Diese Arbeit
p413GPD-WT α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
p413GPD-A30P α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
p413GPD-A53T α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pYCPlac33-GAL-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pYCPlac33-GAL-WT α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pYCPlac33-GAL-A30P α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit
pYCPlac33-GAL-A53T α Syn-GFP	CEN/ARS	Diese Arbeit

1.7 Oligonukleotide

Tabelle 7: Darstellung aller verwendeten Oligonukleotide. Die verwendeten Oligonukleotide sowie deren Sequenz, Schmelztemperatur und Verwendung sind in der Tabelle dargestellt. Die Schmelztemperatur (T_m) wurde mithilfe des NEB T_m Calculators (NEB) berechnet.

Bezeichnung	Sequenz	T _m (C°)	Verwendung
ScVps15_fwd	TGATGTTCCAGATTACGCTGATGGGGGCACAATTATCAC	73	Vps15-mRuby
ScVps15-Linker_rev2	GTTAATTAAGGATCCACCGTCACCGATTGGGAAGATTCCAATAAGCC	73	Vps15-mRuby
ScVps34_fwd	TGATGTTCCAGATTACGCTGATGTCCTACTGAACAACATAACATTCTG	72	Vps34-mRuby
ScVps34-Linker_rev2	GTTAATTAAGGATCCACCGTCACCGATGGTCCGCCAGTA TTGTGC	76	Vps34-mRuby
Linker-mRuby_fwd2	ATCGGTGACGGTGGATCCTTAATTAACATGGTGTCCAAA GGAGAG	75	Vps15/34-mRuby
mRuby_Notl_rev	GACATAACTAATTACATGACGCGGCCCTACTTATACA ATTCATCCATACC	73	Vps15/34-mRuby
Linker-Sec4_fwd	GTCGACATCGATATGTCAGGCTTGAGAAC	66	mRuby-Sec4
Xho-Sec4-rev	CGTCTCGAGTCAACAGCAATTTGATTTAGAAC	66	mRuby-Sec4
Linker-Sec9_fwd	GGATCGATATGGGATTAAGAAATTTTTAAG	60	mRuby-Sec9
Xho-Sec9-rev	GACTCGAGCTATCTGATACCTGCCAAC	66	mRuby-Sec9
Linker-Sec14_fwd	GGATCGATATGGTTACACAACAAGAAAAGGAATTT	66	mRuby-Sec14
Xho-Sec14-rev	GACTCGAGTCAATTCATCGAAAAGGCTTCCGG	70	mRuby-Sec14
SpeI-mRuby_fwd	GTAAC TAGTATGGTGTCCAAAGGAGAG	62	mRuby-Sec4/Sec9/Sec14
Linker-mRuby_rev2	CCATCGATGTCGACCTTATACAATTCATCCATACCAC	69	mRuby-Sec4/Sec9/Sec14
PstI_Gfp_rev	GGCTGCAGCTCGAGTTACTTGTACAGCTC	70	pYCPlac33-GAL-αSyn-GFP
SpeI_aSyn(d10-48)_fwd	TCTAGAACTAGTATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCA GTGCATGGTGTGGCAACAG	75	aSyn-Trunkierung
SpeI_aSyn(d10-63)_fwd	TCTAGAACTAGTATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCA ACAAATGTTGGAGGAGCAGTGG	75	aSyn-Trunkierung
GPD_fwd	CGGTAGGTATTGATTGTAATTCG	57	Nachweisreaktion
CYC1_rev	GCGTGAATGTAAGCGTGAC	59	Nachweisreaktion
GAL1P_fwd	AATATACTCTATACTTTAACGTC	53	Nachweisreaktion
ADH1T_rev	GAGTCACTTTAAAATTTGTATACAC	54	Nachweisreaktion
SNCA-1	CACCGGCTTCGTGAAGAAGG	63	Nachweisreaktion
GFP-1	CCTTCGGGCATGGC	56	Nachweisreaktion
qSec4_fwd	GTCCAGTGCTAAGAACGATGAC	60	qPCR
qSec4_rev	TGTTCCGCTCCCACTATTG	60	qPCR
qSec9_fwd	CTGGGTGAATGCGAATGG	58	qPCR
qSec9_rev	GCATCGGGTTTGCTAAGG	58	qPCR
qSec14_fwd	GCTGGTCACCTAGTGGAAC	60	qPCR
qSec14_rev	GCGGTAGAGAAACCGAATGG	60	qPCR

1.8 Enzyme

Tabelle 8: Auflistung aller genutzten Enzyme. Die in dieser Arbeit genutzten Enzyme sind zusammen mit deren Hersteller und der jeweiligen Bestellnummer aufgeführt.

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
BamHI-HF	NEB	R3136
Clal	NEB	R0197
DNase	Agilent	600032
HindIII-HF	NEB	R3104
KpnI-HF	NEB	R3142
Lyticase	Sigma-Aldrich	4963
NotI-HF	NEB	R3189
Phusion-Polymerase	NEB	M0530
PstI-HF	NEB	R3140
RNase A	Macherey Nagel	740505
SacI-HF	NEB	R3156
SpeI-HF	NEB	R3133
T4-DNA-Ligase	NEB	M0202
XbaI	NEB	R0145
XhoI	NEB	R0146

1.9 Kits

Tabelle 9: Liste aller genutzten kommerziellen Kits. Die Tabelle beinhaltet die Bezeichnungen der verwendeten Kits sowie deren Hersteller und die jeweilige Bestellnummer.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Gibson Assembly® Cloning Kit	NEB	E5510S
NucleoSpin Plasmid Kit	740.588.250	Macherey Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	28104	Qiagen
Quick change lightning site directed mutagenesis	210518	Agilent
SilverXpress™ Silver Staining Kit	LC6100	Thermo Fischer
MyTaq™ Red Mix	BIO-25043-BL	Meridian Bioscience
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23225	Invitrogen
SensiFAST SYBR® & Fluorescein Kit	BIO-96020	Meridian Bioscience
Omniscript Reverse Transcription Kit	205113	Qiagen

1.10 Antikörper

Tabelle 10: Darstellung der verwendeten Antikörper. Die verwendeten Antikörper, deren Nutzung und Spenderorganismus (in Klammern) sowie die verwendete Verdünnung für alle Experimente sind aufgeführt. Außerdem sind die Hersteller und spezifischen Bestellnummern gelistet.

Antikörper	Anmerkung	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-GFP	Primärantikörper (Maus)	1:2000	Sigma-Aldrich	SAB5300167
Anti-PGK1	Primärantikörper (Maus)	1:2000	Thermo Fisher	459250
Anti-Maus-HRP	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (Esel)	1:2000	Li-Cor	715-035-151

1.11 Größenstandards

Tabelle 11: Darstellung der genutzten Größenstandards. Die Größenstandards sowie deren Hersteller und individuelle Bestellnummer sind in der Tabelle gelistet.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
MassRuler DNA Ladder	Thermo Fisher	SM0403
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher	26620

1.12 Software

Tab. 1: Auflistung aller verwendeten Computerprogramme. Die verwendete Software, der jeweilige Hersteller und Verwendungszweck sind aufgeführt (Madeira et al., 2024; Mirdita et al., 2022; Schindelin et al., 2012).

Anwendung	Hersteller	Verwendung
Adobe Creative Cloud	Adobe	Bildbearbeitung, Illustration
Clone Manager Professional 9	Sci-Ed Software	<i>in silico</i> Klonierung
Clustal Omega	Madeira et al. (2024)	Protein-Homologievergleich
ColabFold v1.5.5	Mirdita et al. (2022)	Proteinstruktur-Vorhersage
ImageJ FIJI	Schindelin et al. (2012)	Mikroskopie-Auswertung
Image Studio™	Li-Cor	Quantitative Western Blot-Auswertung
Microsoft Office	Microsoft	Tabellenkalkulation, Texterstellung
GraphPad Prism 10.5	GraphPad	Graphische Darstellung, statistische Analyse
PyMOL	Schrödinger, LLC	3D-Darstellung von Proteinstrukturen

1.13 Sonstige Materialien

Tabelle 12: Zusätzliche verwendete Materialien. Die Tabelle beinhaltet alle bisher nicht gelisteten Materialien, welche im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, inklusive genauerer Spezifizierungen und dem jeweiligen Hersteller.

Material	Spezifizierung	Hersteller
Cellstar® Tubes (15 ml)	188-271-N	Greiner
Cellstar® Tubes (50 ml)	227 261	Greiner
"Quickstart" Röhrchen (30 ml)	128C	Thermo Fisher
96-Well Mikrotiterplatten	I1402-9700	Starlab
Glasperlen (1 mm)	GP-1	Hartenstein
Kryoröhrchen (1 ml)	123263	Greiner
Küvetten (Halb-Mikro)	XK20.1	Roth
Mikrotestplatte 96 Well	821.581	Sarstedt
Nitocellulose-Membran	GE10600001	Merck
Petrischalen (10 cm)	633180	Greiner
Pipettenspitzen (10 µl)	S1111-3000	Starlab
Pipettenspitzen (200 µl)	703.030.020	Sarstedt
Pipettenspitzen (1000 µl)	S1111-6001	Starlab
Reaktionsgefäße (100 µl)	I1402-3800	Starlab
Reaktionsgefäße (1 ml)	S1615-5500	Starlab
Serologische Pipetten (5 ml)	606180	Greiner
Serologische Pipetten (10 ml)	607107	Greiner
Serologische Pipetten (25 ml)	760107	Greiner

2. Methoden

2.1 DNA- und RNA-spezifische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, wurden die Proben mit 1x DNA-Ladepuffer (hergestellt aus 6x MassRuler™ DNA Loading Dye, Thermo Fisher) versetzt und anschließend auf ein 1-2%iges, Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe und Konzentration der DNA wurde zusätzlich ein MassRuler™ DNA Ladder-Größenstandard (Thermo Fisher) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über 90 min bei 100 V in 1x TAE-Puffer statt. Die Dokumentation der Banden wurde mithilfe eines UV-Transilluminators durchgeführt.

Tabelle 13: Verwendeter Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.

Puffer	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	2 M Tris 50 mM EDTA 1 M Essigsäure
Agarosegel	1-2 % Agarose in 1x TAE 1 Tropfen 0,07% Ethidiumbromid / 50 ml Gel

DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie enzymatisch geschnittenen DNA-Fragmenten erfolgte mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen, wie beispielsweise der PCR-Matrize, wurde zuvor eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten. Die anschließende Aufreinigung der Gelstücke erfolgte über das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aufgereinigte DNA-Fragmente wurden entweder weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Molekülen in wässriger Lösung wurde mit dem Spektralphotometer Nanodrop 1000 (Peachlab) anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dafür wurden 1,5 µl der jeweiligen DNA-Probe verwendet und drei technische Replikate gemessen. Für die Hintergrundmessung wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet. Bei doppelsträngiger DNA entspricht ein Absorptionswert von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit der untersuchten Proben wurde über den Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} bestimmt, der idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

Enzymatische Restriktion

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide wurden Plasmide sowie PCR-amplifizierte DNA-Fragmente mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Enzymherstellers New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Dabei wurde die gewünschte DNA-Menge mit maximal 10% (v/v) der jeweiligen Restriktionsenzyme in 1x rCutSmart™-Puffer (hergestellt aus 10x rCutSmart™-Puffer, NEB) für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Um unspezifisches Schneiden zu verhindern, wurde die Reaktion entweder durch Zugabe von 1x DNA-Ladepuffer (hergestellt aus 6x MassRuler™ DNA Loading Dye, Thermo Fisher) oder durch sofortige Aufreinigung mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) abgestoppt. Um eine spontane Religation linearisierter Plasmide zu vermeiden, wurden diese mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten.

Ligation

Die Insertion enzymatisch geschnittener DNA-Fragmente in linearisierte Plasmide erfolgte mithilfe der T4 DNA-Ligase (NEB) gemäß den Herstellerangaben. Hierfür wurden die Insertionsfragmente mit 50-100 ng des geschnittenen Plasmids in einem molaren Verhältnis von 3:1 vermischt und zusammen mit 5% (v/v) T4 DNA-Ligase in 1x T4 DNA-Ligase Puffer (hergestellt aus 10x T4 DNA-Ligase Puffer, NEB) über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 10 min bei 65 °C abgestoppt. Ligationsprodukte wurden anschließend unmittelbar für eine Transformation von *Escherichia coli* eingesetzt.

Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Regionen aus dem Hefegenom oder aus Plasmiden wurden Polymerasekettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Die spezifisch bindenden einzelsträngigen Starter-Oligonukleotide (im Folgenden Primer genannt) wurden zuvor *in silico* erstellt (Clone Manager Professional 9, Sci Ed Software) und von Eurofins Genomics synthetisiert.

Die Amplifikation zu klonierender DNA-Elemente erfolgte mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) nach den Angaben des Herstellers. Bei Bedarf wurde dem Reaktionsansatz 2% DMSO zugesetzt. Der Nachweis erfolgreicher DNA-Insertionen in Expressionsplasmide erfolgte mittels Kolonie-PCR. Hierfür wurden geringe Mengen Zellmaterial transformierter *E. coli*-Stämme in 1x MyTaq™ Red Mix (hergestellt aus 2x MyTaq™ Red Mix, Meridian Bioscience) resuspendiert, mit spezifischen Primern vermischt und die Amplifikation ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die grundlegenden PCR-Programme der verwendeten Thermocycler sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: PCR-Protokolle für Phusion- bzw. MyTaq™-DNA-Polymerase. Die Anlagerungstemperatur und Elongationszeit wurden je nach Schmelztemperatur der verwendeten Primer-Paare und Größe bzw. Komplexität der Matrize angepasst.

Phusion-DNA-Polymerase:

Phase	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	0:30	1
Denaturierung	98	0:10	
Anlagerung	variabel	0:30	35
Elongation	72	0:15-0:30 pro kBp	
Finale Elongation	72	6:00	1
Pause	4	∞	

MyTaq™-DNA-Polymerase:

Phase	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5:00	1
Denaturierung	95	0:15	
Anlagerung	variabel	0:15	35
Elongation	72	0:15-0:30 pro kBp	
Finale Elongation	72	6:00	1
Pause	4	∞	

Gibson-Klonierung

Als alternative Klonierungsstrategie wurde die PCR-basierte Gibson-Klonierung nach Gibson et al. (2009) durchgeführt (Gibson et al., 2009). Dafür wurde das Gibson Assembly® Cloning Kit von NEB verwendet und die Reaktionen wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Pro Ansatz wurden Insertionsfragment und Plasmid in einem molaren Verhältnis von 1:1 bei einer maximalen gesamten Stoffmenge von 0,5 pmol eingesetzt. Die klonierten Ansätze wurden nicht gelagert, sondern direkt für die Transformation von *E. coli* verwendet.

Quantitative „real-time“ PCR (qPCR)

Für Genexpressions-Analysen wurden zelluläre mRNA-Level indirekt mittels quantitativer „real-time“ PCR (qPCR) bestimmt. Dazu wurde extrahierte RNA zunächst für 1 h mit DNase (1 U/μg RNA) bei 37 °C inkubiert und anschließend mithilfe des Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben.

Die Amplifikation spezifischer cDNA-Regionen erfolgte mit dem SensiFAST SYBR® & Fluorescein Kit (Meridian Bioscience) im CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad). Die C_T-Werte der jeweiligen Proben wurden auf die C_T-Werte der Actin-Kontrolle normiert und die relativen Expressionslevel wurden mithilfe der ΔΔC_T-Methode berechnet (Livak & Schmittgen, 2001). Für jedes biologische Replikat wurden drei technische Replikate angefertigt. Zusätzlich

wurde eine Negativkontrolle eingesetzt, in der RNA statt cDNA verwendet wurde. Alle verwendeten Primer wurden *in silico* entworfen und vor der qPCR auf optimale Konzentration sowie Anlagerungstemperatur getestet. Dabei wurde sichergestellt, dass jeweils nur ein spezifisches Produkt mit einer Länge von weniger als 200 Bp entsteht und die Verdopplungseffizienz zwischen 1,8 und 2,2 liegt (Pfaffl, 2001). Zur Überprüfung der Spezifität wurde am Ende jeder qPCR eine Schmelzkurve erstellt.

2.2 Protein-spezifische Methoden

Protein-Konzentrationsbestimmung durch BCA-Assay

Die Proteinkonzentration zellulärer Lysate wurde photometrisch mithilfe des Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assay) bestimmt (Smith et al., 1985). Dazu wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden Standardlösungen mit 0, 4, 8, 12, 16 und 20 µg Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Für Standards und Proben wurden jeweils zwei technische Replikate gemessen und das arithmetische Mittel wurde berechnet. Die Absorption des BCA-Reagenzes wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte bei 562 nm am Varioskan Lux-Spektralphotometer (Thermo Fisher) gemessen.

Die eingesetzten Proteinmengen der Proben wurden anschließend über die Regressionsfunktion der Eichgeraden berechnet. Die Genauigkeit der Messungen wurde anhand des Bestimmtheitsmaßes (R^2) der Eichgeraden überprüft.

Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die größenabhängige Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dazu wurden die Proben mit 1x SDS-Ladepuffer (+ β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden sie auf ein diskontinuierliches Bis-Tris-Gel aufgetragen, bestehend aus einem 4%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel.

Als Laufpuffer wurde 1x MES-Puffer (aus 20x MES SDS-Laufpuffer, Invitrogen) verwendet. Die Proben wurden zunächst bei 80 V in das Gel einlaufen gelassen und anschließend bei 120 V für etwa 1,5 h aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Lauffront die Unterkante des Gels vollständig verlassen hatte.

Tabelle 14: Verwendete Puffer für die SDS-PAGE.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
5x SDS-Ladepuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,5 M DTT 10% (w/v) SDS 50% (w/v) Glycerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau → 25% (v/v) β -Mercaptoethanol frisch zugeben
3,5x Bis-Tris-Puffer	1,25 M Bis-Tris (pH 6,5-6,8)
Sammelgel für SDS-PAGE (4%)	1x Bis-Tris Puffer 4% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
Trenngel für SDS-PAGE (12%)	1x Bis-Tris Puffer 12% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED

Western Blot-Analyse

Der Nachweis spezifischer Proteine, die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, erfolgte durch immunologische Detektion mit bindungsspezifischen Antikörpern. Hierfür wurden die Proteine mithilfe der Trans-Blot® Turbo™ Transferapparatur (Bio-Rad) im „semi-dry“-Verfahren nach Herstellerangaben vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Als Puffersystem wurde 1x Trans-Blot®-Transferpuffer verwendet (hergestellt aus 5x Trans-Blot®-Transferpuffer, Bio-Rad). Der Transfer erfolgte über 11 min bei einer konstanten Stromstärke von 1,3 A (ein Gel) bzw. 2,5 A (zwei Gele) pro Kammer.

Nach dem Transfer wurde die Membran getrocknet und entweder lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) gelagert oder in 1x PBS überführt. Vor der immunologischen Detektion der Proteine erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindestellen durch einstündige Inkubation in 1x PBST mit 5% Milchpulver. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper, verdünnt in 1x PBST mit 5% Milchpulver, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Überschüssiger Primärantikörper wurde entfernt und die Membran dreimal für je 10 min mit 1x PBST bei RT gewaschen.

Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 1x PBST mit 5% Milchpulver verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde der überschüssige Antikörper entfernt und erneut dreimal für je 10 min mit 1x PBST gewaschen. Die Membran wurde in 1x PBS überführt und mit einer Chemilumineszenz-Detektionslösung überlagert. Die Detektion der HRP-Aktivität erfolgte mit dem Imager 600 Chemilumineszenz-Detektor (Intas).

Die videodensitometrische Auswertung der Signale erfolgte mithilfe der Software Image Studio™ (Li-Cor).

Tabelle 15: Verwendete Puffer für die Western Blot-Detektion.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x PBS	1,37 M Natriumchlorid 27 mM Kaliumchlorid 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat 18 mM Kaliumdihydrogenphosphat
1x PBST	10% (v/v) 10x PBS 0,1% (v/v) Tween 20
Chemilumineszenz-Detektionslösung	90,83% (v/v) ECL-Lösung A 9,08% (v/v) ECL-Lösung B 0,03% (v/v) Wasserstoffperoxid
ECL-Lösung A	0,1 M Tris/HCl (pH 8,6) 0,025% (w/v) Luminol
ECL-Lösung B	0,11% (w/v) p-Cumarsäure in DMSO

Proteinaggregations-Assay

Die Untersuchung der Bildung unlöslicher Proteinaggregate wurde nach dem angepassten Protokoll von Rand und Grant (2006) durchgeführt (Rand & Grant, 2006; Weids & Grant, 2014). Hierfür wurden 20 ODs exponentiell wachsender Hefestämme für 6 min bei 4000 U/min (RT) zentrifugiert und in eiskaltem Aggregations-Lysispuffer (ALP) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 3000 U/min (4 °C) erneut zentrifugiert und in frischem ALP aufgenommen, um Restmedium zu entfernen. Zur Zellyse wurden 5 U Lyticase (50 U/ml in ALP) zugegeben und die Proben 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend achtmal für je 5 s sonifiziert und dazwischen kurz auf Eis gehalten. Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 U/min für 15 min (4°C). Der Überstand wurde gesammelt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt.

Die Proben wurden auf eine Proteinkonzentration von 2 µg/µl eingestellt und ein Teilmengen als **Lysat**-Fraktion auf Eis gelagert. Der verbleibende Anteil wurde bei 13300 U/min für 20 min (4 °C) zentrifugiert und der Überstand als **Überstand**-Fraktion aufbewahrt. Das **Pellet** wurde zunächst mit ALP (+ 2% Igepal CA-630) gewaschen, viermal für je 5 s sonifiziert und erneut 20 min bei 13300 U/min (4 °C) zentrifugiert. Danach folgte ein weiteres Waschen und Sonifizieren mit ALP (+ 2% Igepal CA-630). Anschließend wurden die Waschschrte mit ALP ohne Igepal wiederholt. Im letzten Schritt wurde das sedimentierte Pellet in ALP aufgenommen und einmal für 5 s sonifiziert.

Alle Fraktionen wurden mit 1x SDS-Ladepuffer (+ β -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Fraktionen **Lysat**, **Überstand** und **Pellet** wurden für Western Blot-Analysen weiterverwendet. Zusätzlich wurde die **Pellet**-Fraktion über eine separate SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung nachgewiesen. Die Silberfärbung erfolgte mit dem SilverXpress™ Silver Staining Kit von Thermo Fisher nach Herstellerangaben.

Tabelle 16: Verwendete Puffer für den Proteinaggregations-Assay.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Aggregations-Lysispuffer (ALP)	50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) 1 mM EDTA 5% (m/v) Glycerin 1 cPI-Tablette / 50 ml Puffer → 1 mM PMSF frisch zugeben
5x SDS-Ladepuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,5 M DTT 10% (w/v) SDS 50% (w/v) Glycerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau → 25% (v/v) β -Mercaptoethanol frisch zugeben

Cycloheximid-Assay

Zur Untersuchung der Proteininstabilität wurde der Translationsinhibitor Cycloheximid eingesetzt und die Proteinmengen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (Buchanan et al., 2016). Dafür wurden für jeden Zeitpunkt 2,5 ODs exponentiell wachsender Hefezellen entnommen und in frisches Wachstumsmedium überführt. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 30 °C wurde Cycloheximid in einer Endkonzentration von 250 μ g/ml zugegeben. Die Proben wurden kurz gemischt und bei 30 °C weiter inkubiert.

Zu jedem definierten Zeitpunkt wurde 1x Stopp-Mix zugegeben, die Proben kurz gemischt und anschließend auf Eis gelagert. Nachdem die letzte Probe gestoppt war, wurden alle Ansätze kurz bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, mit 10% TCA gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 10% TCA aufgenommen. Es folgte eine denaturierende Proteinisolation mit TCA (siehe Material und Methoden 2.6).

Die isolierten Proteine wurden mit 1x SDS-Ladepuffer versetzt und anschließend über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Der immunologische Proteinnachweis erfolgte durch Western Blot-Analyse.

Tabelle 17: Zusammensetzung der für den Cycloheximid-Assay verwendeten Puffer.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
20x Stopp-Mix	200 mM Natriumazid 5 mg/ml BSA
Aggregations-Lysispuffer (ALP)	100 mM Tris/HCl (pH 8) 1% (w/v) SDS 1 mM EDTA 1 cPI-Tablette / 50 ml Puffer → 1 mM PMSF frisch zugeben
5x SDS-Ladepuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,5 M DTT 10% (w/v) SDS 50% (w/v) Glycerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau → 25% (v/v) β -Mercaptoethanol frisch zugeben

Autophagie-Assays

Die Untersuchung der autophagischen Aktivität erfolgte mittels immunologischem GFP-Atg8-Assay sowie spektralphotometrischem Pho8 Δ 60-Assay (Kim et al., 2001; Klionsky, 2007). Für beide Verfahren wurden 2-5 ODs exponentiell wachsender Hefestämme verwendet, welche zuvor 16 h unter stickstoffreichen bzw. stickstoffarmen Bedingungen angezogen worden waren.

Im GFP-Atg8 Assay wurde aus den Stämmen Gesamtprotein über eine denaturierende TCA-Fällung isoliert, über eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Western Blot-Verfahren analysiert.

Der Pho8 Δ 60-Assay wurde nach dem Protokoll von Klionsky (2007) durchgeführt (Klionsky, 2007). Dazu wurden ebenfalls 2-5 ODs der jeweiligen Stämme entnommen, in Wasser aufgenommen und 5 min bei 1000 U/min (4 °C) zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 2 ml eiskaltem 0,85% NaCl (+ 1 mM PMSF) und erneuter Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min (4 °C) wurde das Pellet in 100 μ l eiskaltem Lysispuffer pro 1 OD resuspendiert. Anschließend wurde ein halbes Volumen Glaskugeln hinzugefügt und die Proben 2 min bei 4 °C homogenisiert. Zellreste und Glaskugeln wurden durch Zentrifugation bei 13300 U/min für 5 min (4 °C) vom Lysat getrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde photometrisch am Varioskan Lux-Spektralphotometer (Thermo Fisher) bestimmt. Hierzu wurde zu den Lysaten ein vierfaches Volumen der vorgewärmten pNPP-Substratlösung gegeben und die Proben 5-20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 1x Stopplösung beendet, sobald die ersten Proben

eine intensive Gelbfärbung aufwiesen oder 20 min überschritten wurden. Zusätzlich wurden Kontrollansätze ohne Lysat bzw. ohne Substrat angesetzt. Die Proben wurden zentrifugiert und die Absorption des Überstands bei 400 nm gemessen. Parallel wurde eine Standardkurve mit definierten Mengen p-Nitrophenol erstellt. Der Substratumsatz wurde anschließend auf Proteinmasse und Inkubationszeit normiert.

Tabelle 18: Verwendete Puffer für die Autophagie-Assays.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer	20 mM PIPES 0,5% Triton X-100 50 mM Kaliumchlorid 100 mM Kaliumacetat 10 mM Magnesiumsulfat 10 µM Zinksulfat → 1 mM PMSF frisch zugeben
Reaktionspuffer	250 mM Tris/HCl (pH 8) 0,4% Triton X-100 10 mM Magnesiumsulfat 10 µM Zinksulfat
pNPP-Substratlösung	625 µg/ml pNPP in Reaktionspuffer
2x Stopplösung	1 M Glycin/KOH (pH 11)
5x SDS-Ladepuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,5 M DTT 10% (w/v) SDS 50% (w/v) Glycerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau → 25% (v/v) β-Mercaptoethanol frisch zugeben

26S-Proteasom-Assay

Die Bestimmung der 26S-Proteasomaktivität erfolgte photometrisch anhand der Spaltung des fluorogenen Substrats Suc-LLVY-AMC und die Durchführung erfolgte gemäß der Literatur (Galka et al., 2024). Hierfür wurde das Gesamtprotein der jeweiligen Stämme zunächst nicht-denaturierend mit einem geeigneten Lysispuffer isoliert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay ermittelt.

Für den Assay wurden 60 µg Protein sowie eine Wasserprobe mit Assay-Puffer (+ 100 µM Suc-LLVY-AMC) versetzt und über 1 h bei 37 °C im Spektralphotometer Varioskan Lux (Thermo Fisher) inkubiert. Dabei wurde die Probe jede Minute bei 380 nm angeregt und die Emission bei 460 nm gemessen.

Zur Überprüfung der Spezifität des Assays wurde parallel zu jeder Messung eine Proteasom-Inhibitionskontrolle mit 100 μ M MG132 angesetzt. Jedes biologische Replikat wurde in zwei technischen Replikaten gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde eine Funktion der Fluoreszenz-Intensität gegen die Zeit erstellt. Die maximale Steigung der entstehenden Kurve diente als Maß für die Proteasom-Aktivität.

Tabelle 19: Verwendete Puffer für den 26S-Proteasom-Assay.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM Natriumchlorid 5 mM Magnesiumchlorid 2 mM DTT 2 mM ATP
Assay-Puffer	20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 50 mM Natriumchlorid 2 mM DTT → 100 μ M Suc-LLVY-AMC frisch zugeben

2.3 Spezifische Methoden für *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht aller *E. coli* Stämme erfolgte auf LB-Festmedium sowie in LB-Flüssigmedium bei 37 °C. Zur Selektion positiver Transformanten wurde Ampicillin (50 μ g/ml) hinzugegeben.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Anzuchtmediums von *E. coli*.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
LB-Medium („lysogeny broth“)	1% (w/v) Trypton 1% (w/v) Natriumchlorid (s) 0,5% (w/v) Hefeextrakt → pH 7,2 (NaOH) für Festmedium 2% (w/v) Agar

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme

Die Transformation von *E. coli* mit neu generierten Plasmiden erfolgte nach dem High Efficiency Transformation Protocol von NEB. Dafür wurden chemisch kompetente NEB® 5-alpha (NEB) oder XL10-Gold (Agilent) Stämme 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 μ l des jeweiligen Plasmids, Ligations- oder Gibson-Ansatzes zugegeben.

Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 s bei 42 °C erhitzt und erneut 2-5 min auf Eis gehalten. Danach wurden die Proben mit vorgewärmtem LB-Medium

vermischt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um die Expression des Resistenzgens zu ermöglichen. Schließlich wurden 100 µl der Zellsuspension auf vorgewärmte LB-Agar-Platten (+ 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden gewachsene Kolonien gesichert und per Kolonie-PCR überprüft.

Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgte durch das NucleoSpin Plasmid Kit von Macherey-Nagel und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Isolierte Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

2.4 Spezifische Methoden für *S. cerevisiae*

Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefestämmen wurden – sofern nicht anders angegeben – entweder in SD-Minimalmedium bei 30 °C unter Schütteln kultiviert oder auf dem entsprechenden Festmedium ausgestrichen. Da es sich bei dem verwendeten Wildtyp BY4741 um einen L-Histidin-, L-Leucin-, L-Methionin- und Uracil-auxotrophen Stamm handelt, wurde dem Wachstumsmedium ein 1x Aminosäure-/Nukleinbasen-Mix zugesetzt.

Für Hefetransformationen wurden die Stämme in der Regel auf YPD-Festmedium ausgestrichen und in YPD-Flüssigmedium angezogen. Zur Untersuchung der Autophagie-Induktion unter Stickstoffmangelbedingungen wurde SD-N-Medium verwendet. Für Galactose-abhängige Genexpression über den *GAL 1*-Promotor wurden die Hefestämmen zunächst in SD-C-Medium mit 2% Raffinose angezogen. Zur Induktion der Genexpression wurde anschließend 2% Galactose in das Flüssigmedium gegeben.

Tabelle 21: Zusammensetzung der für die Kultivierung von *S. cerevisiae* verwendeten Medien.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
SD-Medium	0,67% (w/v) YNB w/o AA 2% (w/v) Glucose für Festmedium 2% (w/v) Agar
SD-C-Medium	0,67% (w/v) YNB w/o AA
SD-N-Medium	0,17% (w/v) YNB w/o AA, w/o Ammonium Sulfate 2% (w/v) Glucose
YPD-Medium	1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Pepton 2% (w/v) Glucose für Festmedium 2% (w/v) Agar

Tabelle 22: Verwendete Lösungen für die Kultivierung von *S. cerevisiae*. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks auf plasmidtragende prototrophe Hefestämme wurde die entsprechende Aminosäure bzw. Nukleinbase aus dem Mix entfernt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
100x Aminosäure-/Nukleinbase-Mix	100 mM L-Histidin 100 mM L-Leucin 50 mM L-Methionin 20 mM Uracil

Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* mit Expressionsplasmiden erfolgte nach dem Verfahren von Schiestl und Gietz (1989) (Schiestl & Gietz, 1989). Hierfür wurden 10-20 ODs exponentiell wachsender Hefestämme 6 min bei 4000 U/min (RT) zentrifugiert und in 1x LATE-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen einmal durch Zugabe von 1x LATE-Puffer und kurzer Zentrifugation bei maximaler Drehzahl gewaschen und erneut in 1x LATE-Puffer aufgenommen.

Die vorbereiteten Stämme wurden in Reaktionsgefäße mit PLATE-Puffer (+1 µg einzelsträngige Lachssperma-DNA) überführt und gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 30 °C, gefolgt von einem Hitzeschock für 15 min bei 42 °C. Die Zellen wurden kurz bei maximaler Drehzahl sedimentiert, in 1x TE-Puffer resuspendiert und auf Selektions-Festmedium ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bis erste Kolonien erkennbar waren.

Tabelle 23: Zusammensetzung der für die Transformation von *S. cerevisiae* verwendeten Puffer.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x TE-Puffer	100 mM Tris/HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA
10x LATE-Puffer	1 M Lithiumacetat 1x TE-Puffer
PLATE-Puffer	40% PEG 3350 1x LATE-Puffer

DNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

Die Extraktion genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurde nach dem Protokoll von Lööke et al. 2011 durchgeführt (Lööke et al., 2011). Dazu wurde eine Zellkolonie von Festmedium entnommen und in 0,2 M Lithiumacetat (+ 1% SDS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 70 °C erhitzt und anschließend mit dem dreifachen Volumen 96% Ethanol versetzt.

Die Proben wurden für 3 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in Wasser aufgenommen und für 15 s bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend als DNA-Matrize für PCR-Reaktionen verwendet. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei -20 °C.

Denaturierende Proteinisolation aus *S. cerevisiae*

Die denaturierende Isolation von Hefe-Gesamtprotein erfolgte durch eine TCA-Präzipitation (Wright et al., 1989). Hierfür wurden 10-20 ODs exponentiell wachsender Hefezellen zunächst durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 5 min (RT) sedimentiert und in 10% TCA resuspendiert. Anschließend wurde ein halbes Volumen Glaskugeln zugegeben und die Suspension für 10 min bei 4 °C im Disruptor Genie SI-D258 (Scientific Industries) homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 13300 U/min (4 °C) zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das ausgefällte Protein zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation bei 13300 U/min für 5 min (4 °C). Anschließend wurde überschüssiges Aceton vollständig entfernt und die Proben bei 37 °C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in Resuspensionspuffer aufgenommen und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln gelöst.

Die Proben wurden mit 1x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden sie 1 min bei 13300 U/min (RT) zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die isolierten Proteine wurden entweder bei -20 °C gelagert oder unmittelbar über SDS-PAGE aufgetrennt.

Tabelle 24: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die denaturierende Proteinisolation aus *S. cerevisiae*.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	100 mM Tris/HCl (pH 8) 1% (w/v) SDS 1 mM EDTA 1 cPI-Tablette / 50 ml Puffer → frisch 1 mM PMSF zugeben
5x SDS-Ladepuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,5 M DTT 10% (w/v) SDS 50% (w/v) Glycerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau → 25% β -Mercaptoethanol frisch zugeben

Nicht-denaturierende Proteinisolation aus *S. cerevisiae*

Für die nicht-denaturierende Proteinisolation wurden 10-20 ODs teilungsaktiver Hefezellen durch Zentrifugation bei 4000 U/min, 5 min (RT) gesammelt. Das Zellpellet wurde anschließend in eiskaltem Proteinisolutions-Puffer aufgenommen und 20 s bei 13300 U/min (4 °C) zentrifugiert. Die Proben wurden zweimal mit demselben Puffer gewaschen, jeweils für 20 s bei 13300 U/min (4 °C).

Das Zellpellet wurde erneut in Proteinisolutionspuffer resuspendiert, mit einem halben Volumen Glaskugeln versetzt und in einem Disruptor Genie SI-D258-Homogenisator (Scientific Industries) für 2 min bei 4 °C mechanisch aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13300 U/min (4 °C), um Zelldebris und Glaskugeln vom Zelllysat zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mithilfe eines BCA-Assays bestimmt.

Tabelle 25: Verwendete Puffer für die nicht-denaturierende Proteinisolation aus *S. cerevisiae*

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Proteinisolutions-Puffer	1x PBS 1 cPI-Tablette / 50 ml Puffer

RNA-Isolation aus *S. cerevisiae*

Die RNA-Isolation aus *S. cerevisiae* erfolgte durch eine saure Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des TRIzol™-Reagenzes (Thermo Fisher) (Chomczynski & Sacchi, 1987). Hierfür wurden 20 ODs exponentiell wachsender Zellen für 5 min bei 4000 U/min sedimentiert und in TRIzol™ resuspendiert. Anschließend wurde ein halbes Volumen Glaskugeln zugegeben und die Proben wurden fünfmal für jeweils 20 s auf einem Vortex-Mischer homogenisiert. Zwischen den Homogenisationsschritten wurden die Proben jeweils 40 s auf Eis gehalten.

Daraufhin wurde ¼ Volumen Chloroform zugegeben, die Probe kurz gemischt, 3 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 13000 U/min (4 °C) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIzol™ gemischt. Das Gemisch wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 13000 U/min (RT) zentrifugiert.

Die ausgefällte RNA wurde mit 75% Ethanol gewaschen und 5 min bei 6000 U/min (RT) pelletiert. Die Ethanolreste wurden vollständig entfernt und das Pellet wurde für etwa 10 min getrocknet. Die getrocknete RNA wurde anschließend in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert. An einem Nanodrop 1000-Spektralphotometer (Peqlab) wurde anhand des A_{260}/A_{280} - sowie A_{260}/A_{230} -Quotienten die Qualität der RNA überprüft.

Wuchskurven

Das zelluläre Wachstum bzw. die Teilungsaktivität von Hefestämmen wurde photometrisch durch zeitabhängige Messung der optischen Zelldichte bestimmt. Dafür wurden Hefekulturen bis zur stationären Phase in Flüssigmedium kultiviert und in frischem Medium auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,1 verdünnt und auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Hintergrundmessung wurde frisches Medium ohne Zellmaterial verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 15 h bei 30 °C im Varioskan Lux-Spektralphotometer (Thermo Fisher) schüttelnd (180 U/min) inkubiert. Die OD_{600} aller Proben wurde in Intervallen von 10 min gemessen. Für jedes biologische Replikat wurden drei technische Replikate angefertigt.

Spot Tests

Als alternatives Verfahren zur Ermittlung des zellulären Wachstums von *S. cerevisiae* wurden sogenannte Spot Tests auf Festmedium durchgeführt. Stationäre Hefestämme in Flüssigkultur wurden auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und in separaten Ansätzen 10-fach bzw. 100-fach verdünnt. Für die Wuchsanalyse wurden je 5 µl der unverdünnten Kultur sowie der Verdünnungen (1:10, 1:100) nebeneinander auf SD-Festmedium aufgetragen und 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert. Zu vergleichende Stämme wurden auf derselben Platte in parallelen Reihen untereinander aufgetragen, um direkte Wuchsunterschiede sichtbar zu machen. Die fotografische Dokumentation der Platten erfolgte mit der Kamera eines iPhone 12 (Apple) unter gleichmäßiger Belichtung.

Chronologische Lebensspannen

Zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit postmitotischer Hefestämme wurden chronologische Lebensspannen nach Hu et al (2013) angefertigt (Hu et al., 2013). Hierfür wurden frisch kultivierte, stationäre Hefekulturen in frischem Selektionsmedium auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt und bis zum Ende des Experiments schüttelnd bei 30 °C inkubiert.

Nach drei Tagen Inkubation wurden zwei Proben aus jeder Flüssigkultur entnommen, 10000-fach verdünnt und auf zwei Platten mit YPD-Festmedium ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die lebensfähigen Kolonien gezählt. Dieser Wert wurde als 100% Überlebende an Tag 0 festgelegt. Die Probenentnahme wurde – je nach Stamm – in Abständen von 1-2 Tagen wiederholt, bis nur noch etwa 10% lebensfähige Kolonien beobachtet wurden. Die Verdünnungen wurden jeweils an die erwartete Anzahl koloniebildender Einheiten angepasst. Es wurden drei biologische Replikate für jeden Stamm verwendet.

Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden exponentiell wachsende Zellen durch kurze Zentrifugation bei maximaler Drehzahl gesammelt und in 1x PBS gewaschen. Die Zellsuspensionen wurden anschließend auf Glasobjektträger pipettiert, die zuvor mit 1 mg/ml Concanavalin A beschichtet worden waren. Danach wurden die Proben mit Deckgläsern überdeckt und die Ränder mit Nagellack luftdicht versiegelt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x PBS	1,37 M Natriumchlorid 27 mM Kaliumchlorid 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat 18 mM Kaliumdihydrogenphosphat

Die Fluoreszenzbildgebung erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 von Zeiss. Thioflavin T wurde bei einer Wellenlänge von 458 nm angeregt, GFP-Signale bei 488 nm sowie FM4-64, mRFP und mRUBY2 bei 543 nm angeregt. Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mithilfe des Bildbearbeitungspakets Fiji von ImageJ (Schindelin et al., 2012). Für quantitative Auswertungen wurden je biologischem Replikat mindestens 100 Zellen ausgewertet.

FM4-64-Färbung

Die Anfärbung von Vakuolen bzw. endozytotischen Membranen erfolgte mit dem Farbstoff FM4-64 (Thermo Fisher). Dazu wurden exponentiell wachsende Hefekulturen mit 20 μ M FM4-64 (in DMSO) behandelt und unter Lichtausschluss 30 min schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und in frischem Anzuchtmedium resuspendiert. Es folgte eine weitere abgedunkelte Inkubation für 60 min bei 30 °C unter Schütteln. Nach Abschluss der Färbung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für die Mikroskopie vorbereitet.

Thioflavin T-Färbung

Um amyloide Aggregate in Zellen von *S. cerevisiae* anzufärben, wurden exponentiell wachsende Zellen zunächst 1 h in ROTI[®]Histofix 4% (Roth) fixiert und anschließend durch Zentrifugation und Resuspension in 1x PBS gewaschen (Summers & Cyr, 2011). Darauf folgend wurden die Zellen 30 min mit 30 μ M Thioflavin T in PBS (+ 0,1% Triton X-100) bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgten 3-4 Waschschrte durch kurze Zentrifugation bei maximaler Drehzahl und Resuspension in 1x PBS. Die Proben wurden daraufhin für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

Wortmannin-Behandlung

Die Wortmannin-abhängige Inhibition von Stt4 erfolgte durch Zugabe von 5 μM Wortmannin (in DMSO) zu exponentiell wachsenden Zellen. Unmittelbar nach der Zugabe sowie in stündlichen Abständen wurden Proben aus den jeweiligen Kulturen entnommen und für die Mikroskopie vorbereitet. Als Kontrolle wurde DMSO ohne Wortmannin zu den Stämmen gegeben.

2.5 Sonstige Methoden

3D-Modellierung von Proteinstrukturen

Die dreidimensionale Modellierung von Proteinstrukturen erfolgte zunächst durch eine unvoreingenommene Strukturvorhersage mit ColabFold v1.5.5 (Mirdita et al., 2022). Dafür wurde die jeweilige Aminosäuresequenz eingegeben ohne auf eine Vorlage aus der „Protein Data Bank“ zurückzugreifen (Berman et al., 2000). Die berechneten Proteinmodelle wurden anschließend mit PyMOL (Schrödinger, LLC) bearbeitet und exportiert.

Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 10.5 (GraphPad). Alle Daten wurden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Wenn möglich, wurden zudem die einzelnen Datenpunkte in die grafische Darstellung eingefügt.

Zur Analyse statistisch signifikanter Unterschiede wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Bei signifikanten Gesamteffekten wurden Post-hoc-Analysen angewendet, um Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen zu bestimmen. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Signifikanzen sind wie folgt gekennzeichnet:

- $p < 0,05$ (*)
- $p < 0,01$ (**)
- $p < 0,001$ (***)

Nutzung von KI-Tools

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „Large Language Model“ ChatGPT (OpenAI) zur Unterstützung der Literatursuche sowie zur Rechtschreib- und Grammatikprüfung genutzt.

Ergebnisse

1. Grundlegende Charakterisierung des Hefe-Modells

1.1 N-terminale Helizität bestimmt zelluläre α Syn-Lokalisation

Erste Studien am Hefe-Modell konnten zeigen, dass α Syn über den sekretorischen Weg an die PM transportiert wird und dort verbleibt (Dixon et al., 2005; Outeiro & Lindquist, 2003). Zudem wurde untersucht, dass *S. cerevisiae* eine dosisabhängige Sensitivität gegenüber α Syn aufweist (Outeiro & Lindquist, 2003). Ziel dieses Abschnitts war die Verifizierung der verwendeten α Syn-Konstrukte anhand der aktuellen Literatur. Daher wurden in dieser und nachfolgenden Untersuchungen neben der kanonischen Wildtyp-Variante (WT α Syn) zudem die α Syn-Mutationen A30P und A53T verwendet, die mit familiärer PD assoziiert sind (Krüger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997). Insbesondere A30P α Syn ist von großem Interesse für die Untersuchungen α Syn-abhängiger molekularer Mechanismen, da in dieser Mutante keine PM-Bindung beobachtet wurde (Outeiro & Lindquist, 2003; Ruf et al., 2019). Durch die Inklusion beider Mutanten können so unterschiedliche Effekte auf die Lipidbindeeigenschaften des Proteins zurückgeführt und damit möglicherweise ein Bezug zu PD-relevanten Auswirkungen hergestellt werden.

Um die strukturellen Auswirkungen der jeweiligen Mutationen näher zu beleuchten, wurde die Tertiärstruktur der jeweiligen Spezies zunächst *in silico* modelliert. Die Modellierung erfolgte mithilfe von ColabFold (v1.5.5) (Mirdita et al., 2022). Um einen unvoreingenommenen „unbiased“ Ansatz zu verfolgen, wurde darauf verzichtet, die bereits aufgeklärte 3D-Struktur von WT α Syn (Ulmer et al., 2005) als Vorlage zu verwenden. Die hier aufgeführten Modellierungen des gesamten Proteins zeigen deutlich, dass die Aminosäurereste des N-Terminus (grün) und der NAC-Domäne (gelb) eine kontinuierliche α -Helix ausbilden, die alle Lysinreste der sechs KTKEGV-Motive einschließt (Abbildung 11A). Dies widerspricht zwar Strukturanalysen, welche eine unterbrochene Helix mit einer Linkerregion zwischen den Aminosäuren L38 und T44 demonstrieren (Ulmer & Bax, 2005); unterschiedliche Analysen konnten jedoch zeigen, dass eine kontinuierliche, sogenannte *extended* Helix unter physiologischen Bedingungen ebenfalls sehr wahrscheinlich ist (Trexler & Rhoades, 2009). Interessanterweise zeigt ausschließlich A30P α Syn einen Bruch in der N-terminalen Helix, der sich an Position 30 befindet und über ca. 1,5 Windungen erstreckt. Eine nähere Analyse dieser Region zeigt, dass die Wildtyp-Aminosäure Alanin an Position 30 die Ausbildung von Wasserstoffbrücken am Peptidrückgrat ermöglicht (Abbildung 11B). In der A30P-Mutation werden diese Wechselwirkungen durch die Einführung des Prolin-Restes destabilisiert, was zu einem regionalen Bruch der α -Helix führt. Dieser Bruch wird in der A53T-Mutation nicht beobachtet, da Alanin und Threonin zwar eine unterschiedliche Polarität aufweisen, strukturell

jedoch sehr ähnlich sind (Abbildung 11C). Dies ermöglicht die Ausbildung der nötigen Wasserstoffbrücken, um die Helixformation zu gewährleisten.

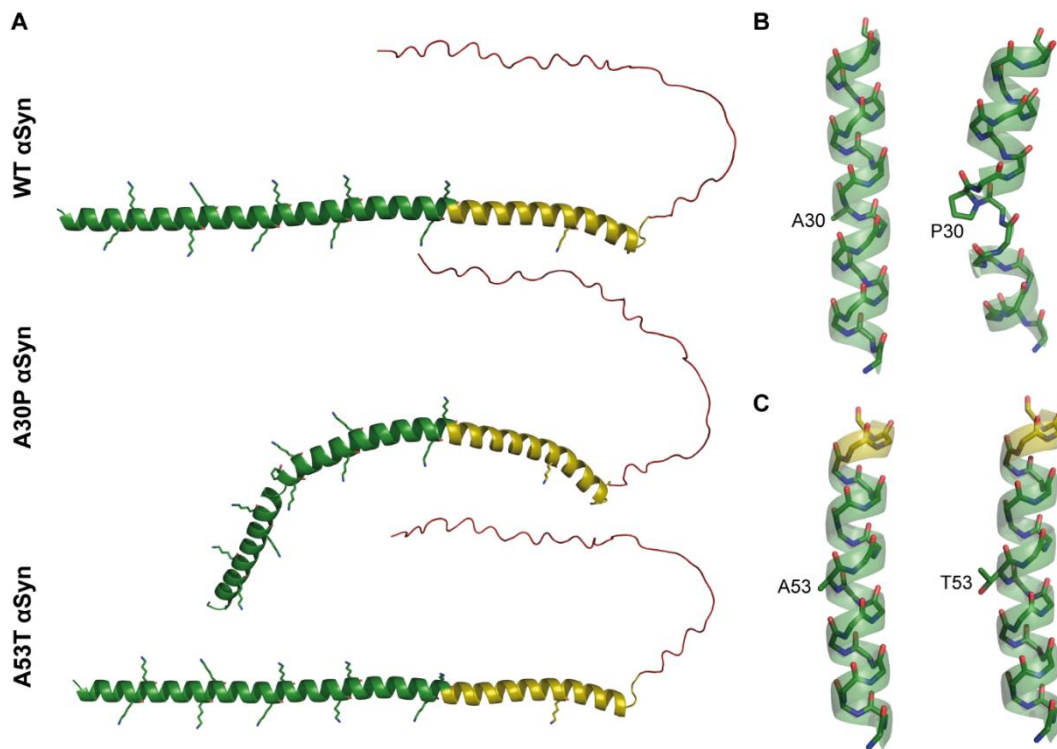


Abbildung 11: *In silico*-Strukturanalyse von WT αSyn und PD-relevanten Mutanten A30P und A53T. **A:** Strukturvergleich der WT αSyn-Isoform mit den A30P- und A53T-Mutanten. Die jeweiligen Proteine sind graphisch dargestellt und farblich in die drei charakteristischen Domänen N-Terminus (grün), NAC-Domäne (gelb) und C-Terminus (rot) unterteilt. Die Lysinreste der KTKEGV-Motive sind detailliert dargestellt. **B:** Detailansicht der A30-Region von αSyn. Der Tausch von A30 durch einen Prolinrest erzeugt eine Krümmung der Proteinstruktur und destabilisiert die Helix in mindestens einer Umdrehung. **C:** Detailansicht der A53-Region von αSyn. Die Aminosäuren Alanin und Threonin haben eine ähnliche räumliche Struktur und die A53T-Mutation hat keinen erkennbaren Effekt auf die Integrität der Proteinhelix.

Um die Lipidbindeigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte zu untersuchen, wurden die drei αSyn-Spezies (WT, A30P und A53T) C-terminal mit „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP; im Folgenden GFP) fusioniert und mithilfe eines „one-copy“ (im Folgenden one-copy) Plasmids konstitutiv in *S. cerevisiae* exprimiert. One-copy-Plasmide sind episomale Hefektoren, welche autonom-replizierbar sind und über eine Centromerregion (*CEN/ARS*) bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzelle übertragen werden (Sikorski & Hieter, 1989). Als zusätzliche Kontrolle wurden zudem zwei künstliche αSyn-Varianten generiert – Δ38 αSyn-GFP und Δ53 αSyn-GFP – bei denen die ersten drei bzw. vier lipidbindenden KTKEGV-Motive deletiert wurden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dieser Stämme zeigen deutlich, dass ausschließlich WT und A53T αSyn-GFP an der PM lokalisiert sind, während die A30P-Mutante sowie die beiden N-terminalen Deletionen eine zytoplasmatische Lokalisation aufweisen (Abbildung 12).

Da diese Beobachtungen der Literatur entsprechen (Outeiro & Lindquist, 2003), wurden die Stämme, die WT, A30P und A53T α Syn-GFP exprimieren, für die weiteren Untersuchungen der dosisabhängigen Toxizität bzw. Sensitivität verwendet.

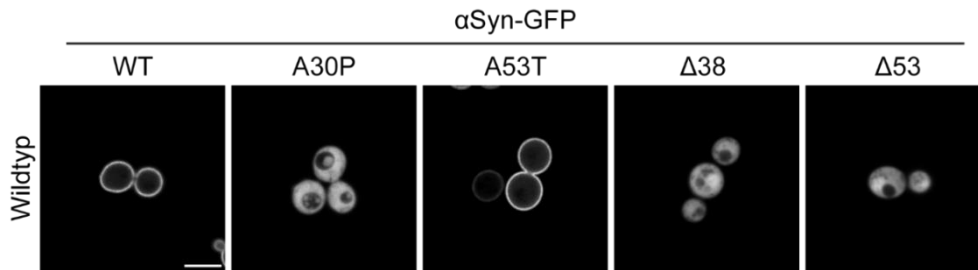


Abbildung 12: α Syn-Lokalisation setzt eine intakte N-terminale α -Helix voraus. Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation von unterschiedlichen α Syn-GFP-Spezies in *S. cerevisiae*. Die Lokalisation von α Syn-GFP zur PM setzt einen intakten N-Terminus voraus und wird von der Helixbrechenden A30P-Mutation verhindert. Maßstab: 5 μ m.

1.2 α Syn-Sensitivität ist dosisabhängig

Eine charakteristische Eigenschaft von α Syn ist dessen dosisabhängige Wachsinhibition in *S. cerevisiae*. Um Expressionslevel zu erreichen, welche die Wachsratesignifikant beeinflussen, wurde ein „high-copy“ (im Folgenden high-copy) 2-micron (2μ) Plasmid verwendet. Das selbstreplizierende 2μ Plasmid wurde ursprünglich aus wilden Hefestämmen isoliert und liegt etwa 40 bis 60-fach in haploiden Hefestämmen vor (Chan et al., 2013; Yang et al., 2021).

Zur Untersuchung des Wachsverhaltens wurden sogenannte „spot“-Tests (im Folgenden Spot-Tests) durchgeführt. Es ist erkennbar, dass die one-copy-Expression von α Syn-GFP keinen Einfluss auf das Wachstum im Vergleich zur Leervektorkontrolle [„empty vector“ (EV)] hat. Alle untersuchten Stämme erreichen innerhalb von 2 Tagen eine vergleichbare Zelldichte in allen Verdünnungen, 1, 1:10 und 1:100 (Abbildung 13A). Bei einer erhöhten Expression von α Syn-GFP durch 2μ -Plasmide wird hingegen deutlich, dass WT und A53T α Syn-GFP einen signifikanten Einfluss auf die Wachsrates haben. So ist die Wachsdichte der EV-Kontrolle und der A30P α Syn-GFP-exprimierenden Stämme vergleichbar, wohingegen die Expression der membranbindenden α Syn-GFP-Spezies ein deutlich geringeres Wachstum und insbesondere kleinere Zellkolonien zur Folge hat (Abbildung 13B). Interessanterweise geht die signifikante Wachsrereduktion aufgrund der membranbindenden α Syn-GFP-Spezies zudem mit einer Reduktion der Proteinmenge einher. Während in den one-copy-Konstrukten die Proteinlevel vergleichbar sind, liegen WT und A53T α Syn-GFP in deutlich reduzierter Menge vor (Abbildung 13C-F). Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Outeiro und Lindquist (2003) und basiert vermutlich auf einer Zellstress-induzierten Reduktion der Plasmidkopienzahl oder der Genexpression über den GPD-Promotor (Karim et al., 2013; Outeiro & Lindquist, 2003; Xiong et al., 2018).

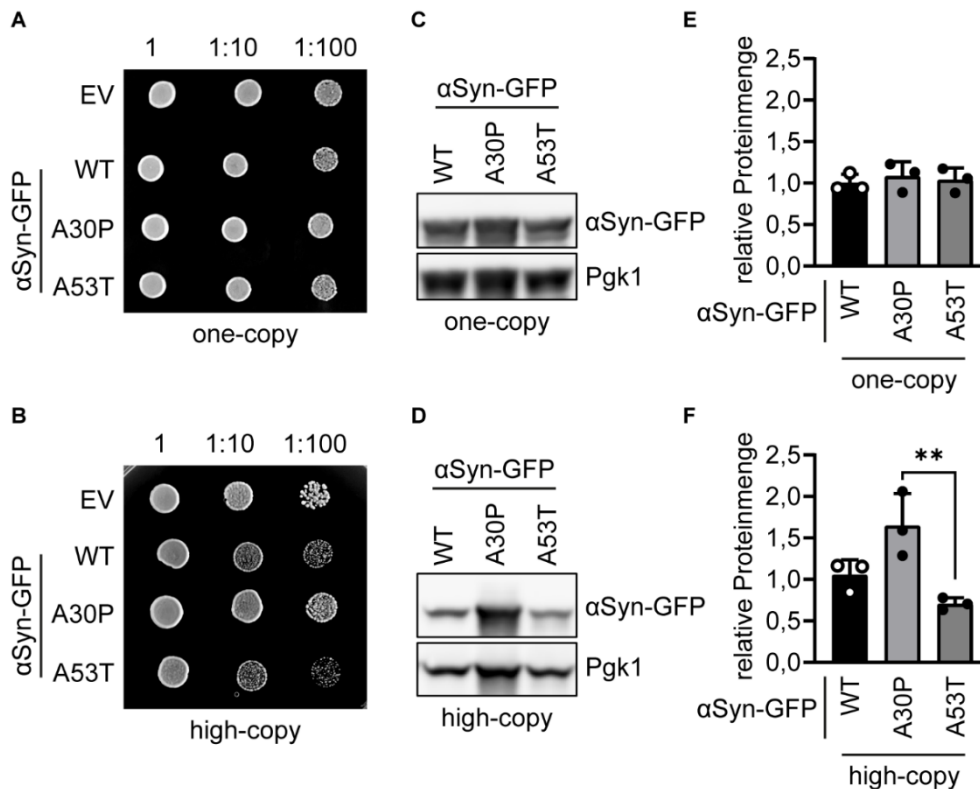


Abbildung 13: Membranbindende αSyn-Spezies haben einen größeren Einfluss auf die Zellvitalität. A-B: Spot-Tests zur Untersuchung der zellulären Sensitivität gegenüber αSyn-GFP-Expression. Die high-copy-Expression von WT und A53T αSyn-GFP reduziert das zelluläre Wachstum des *S. cerevisiae* Wildtyps. C-D: Western Blot-Analyse und E-F: Quantifizierung der αSyn-GFP-Mengen bei Expression von one-copy und high-copy Plasmiden. Die Proteinlevel sind vergleichbar bei one-copy-Expression, während die Proteinlevel von WT und A53T αSyn-GFP bei high-copy-Expression herunterreguliert werden. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte (n = 3) und der Mittelwert + Standardabweichung. **p < 0,01.

2. Proteostatische Auswirkungen der αSyn-Expression

2.1 Der Einfluss von αSyn auf die Proteinqualitätskontrolle

In eukaryotischen Zellen existieren zwei zentrale Mechanismen der degradativen Proteinhomeostase: das UPS und die Autophagie (Y. Li et al., 2022). Diese zellulären Qualitätskontrollsysteme dienen dem Abbau fehlgefalteter Proteine und im Falle der Autophagie zudem geschädigter Organellen und eingedrungener Pathogene (Vargas et al., 2023). Beide Abbauewege können parallel zueinander ablaufen und kompensieren Defizite des jeweils anderen Mechanismus (Pandey et al., 2007).

Die Expression von WT αSyn-GFP hat neben einer reduzierten Wachsrate zudem die Anreicherung des Autophagie-Adapterproteins Atg8 zur Folge (Tenreiro et al., 2014). Es sollte zunächst überprüft werden, ob die Expression von αSyn-GFP einen verstärkten Wuchseffekt auf den Autophagie-defizienten *atg1Δ*-Stamm hat. Hierfür wurden, wie zuvor im Wildtyp-Stamm, die Lokalisation, das Zellwachstum und die Proteinlevel von WT, A30P und A53T αSyn-GFP untersucht (Abbildung 14). Überraschenderweise werden in den *atg1Δ*-Stämmen sehr ähnliche Effekte beobachtet wie zuvor im Wildtyp. So lokalisieren die membranbindenden

α Syn-GFP-Spezies an der PM (Abbildung 14A) und zeigen bei erhöhtem Expressionslevel eine stärker ausgeprägte Wuchsreduktion als durch die Expression der A30P-Mutante. Die Koloniedichte der unverdünnten WT und A53T α Syn-GFP-exprimierenden Zellen nach 2 Tagen entspricht in etwa der Dichte der 10-fachen Verdünnung (1:10) der EV-Kontrolle (Abbildung 14B und C). Auch die Expression von high-copy A30P α Syn-GFP hat einen sichtbaren Einfluss auf das Zellwachstum, der jedoch weniger ausgeprägt ist. Wie im Wildtyp sind die Proteinlevel der jeweiligen α Syn-GFP-Isoformen bei one-copy-Expression vergleichbar, wohingegen sie bei high-copy-Expression in unterschiedlichen Mengen vorliegen (Abbildung 14D-G).

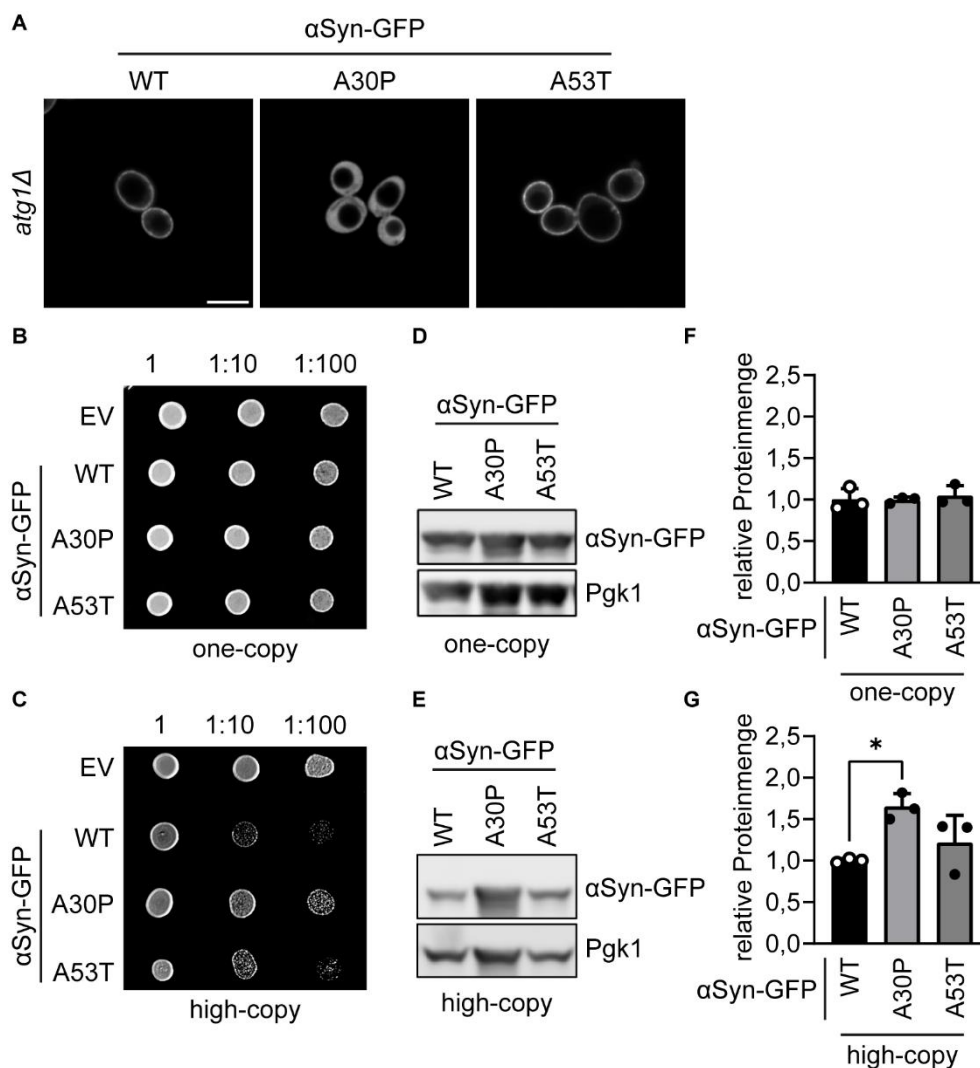


Abbildung 14: Der Verlust der autophagischen Maschinerie hat keinen Einfluss auf Lokalisation, Toxizität und Proteinlevel der α Syn-GFP-Spezies. **A:** Zelluläre Lokalisation von WT, A30P und A53T α Syn-GFP im *atg1 Δ* -Stamm. Die Lokalisation der jeweiligen α Syn-GFP-Isoformen ist vergleichbar zu der des Wildtyps. Maßstab: 5 μ M. **B-C:** Spot-Tests zur Analyse der Zytotoxizität durch α Syn-GFP-Expression. Die high-copy-Expression von WT und A53T α Syn-GFP führt zu einem reduzierten Wachstum der Autophagie-defizienten *atg1 Δ* -Mutante. **D-E:** Western Blot-Analyse zur Bestimmung der α Syn-GFP-Proteinlevel bei one-copy- und high-copy-Expression. **F-G:** Quantifizierung der α Syn-GFP-Mengen zeigt vergleichbare Proteinlevel bei one-copy-Expression. Bei high-copy-Expression hingegen werden die Proteinlevel von WT- und A53T- α Syn-GFP deutlich reduziert. Aufgeführt sind die einzelnen Datenpunkte (n = 3) und der Mittelwert + Standardabweichung *p < 0,05.

Da der Verlust der generellen Makroautophagie keinen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber der α Syn-GFP-Expression hat, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Expression von α Syn-GFP eine Inhibition der autophagischen Maschinerie zur Folge hat. Dies war insbesondere relevant, da der Anstieg der zellulären Atg8-Level in der Arbeit von Tenreiro et al. (2014) nicht mit einem erhöhten autophagischen Flux einherging (Tenreiro et al., 2014). Dies kann mit einer α Syn-GFP-vermittelten Reduktion der Degradationseffizienz zusammenhängen, was sich unter Autophagie-induzierenden Bedingungen zeigen würde. Die autophagische Aktivität wurde mithilfe des Pho8 Δ 60-Assays unter Stickstoffmangel untersucht, da Stickstoffmangel nachweislich Autophagie induziert (Klionsky, 2007). Als Negativkontrolle wurde erneut der *atg1 Δ* -Stamm verwendet. In der EV-Kontrolle des Wildtyps steigt die Pho8-Aktivität nach 16 h Stickstoffmangel etwa um das 4-fache. Dieser Effekt ist zudem bei der one-copy-Expression von WT α Syn-GFP zu beobachten (Abbildung 15A).

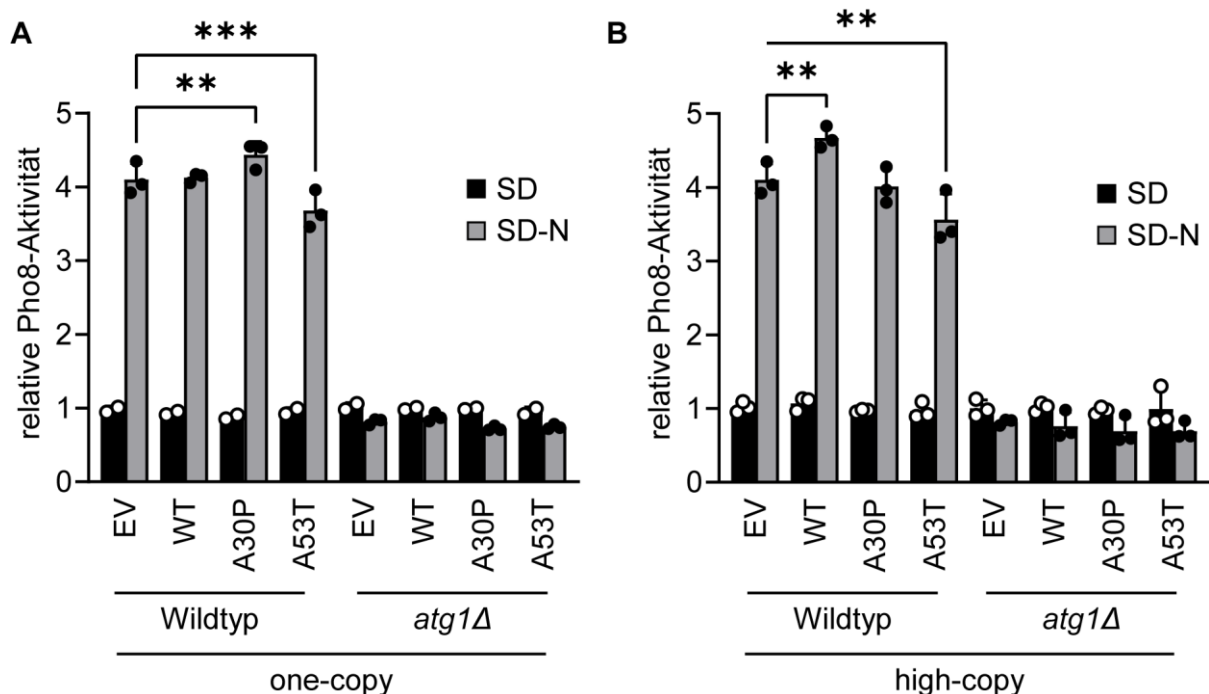


Abbildung 15: Die autophagische Aktivität wird nicht durch die Expression von α Syn-GFP beeinflusst. Pho8-Assay zur Bestimmung der autophagischen Aktivität in **A**: one-copy und **B**: high-copy α Syn-GFP-exprimierenden Wildtyp- und *atg1 Δ* -Stämmen sowie der Leervektor-Kontrolle (EV) nach 16 h mit (SD) und ohne Stickstoff im Wachstumsmedium (SD-N). Ein N-Mangel erzeugt in allen Autophagie-befähigten Stämmen einen Anstieg der autophagischen Aktivität. Diese Induktion wird nicht durch die Expression von α Syn-GFP beeinflusst. Die Autophagie-defiziente *atg1 Δ* -Mutante zeigt keinen Anstieg der Pho8-Aktivität nach N-Mangel. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte (n = 3) und der Mittelwert + Standardabweichung. **p < 0,01; ***p < 0,001.

Die Expression von A30P und A53T α Syn-GFP hat zwar signifikant unterschiedliche, aber keine substantiellen Effekte auf die Autophagie-Induktion. So steigt die Pho8-Aktivität in A30P-exprimierenden Stämmen auf das 4,4-fache an und in A53T auf das 3,7-fache. Wie zu erwarten kann in den Autophagie-defizienten *atg1 Δ* -Stämmen keine Erhöhung der Pho8-Aktivität beobachtet werden. Auch die high-copy-Expression von α Syn-GFP hat nur geringe Effekte auf die Stickstoffmangel-induzierte Autophagie. So bewirkt WT α Syn-GFP einen

Anstieg auf das 4,7-fache wohingegen A30P wie die EV-Kontrolle eine 4-fache Erhöhung und A53T nur eine 3,6-fache Erhöhung nach 16 h aufweist (Abbildung 15B). Auch hier kann keine Autophagie-Induktion in der *atg1Δ*-Kontrolle beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Autophagie eine untergeordnete Rolle in der dosisabhängigen α Syn-Sensitivität einnimmt. Diese Beobachtung passt zu einer Studie aus dem Jahr 2012, die zeigt, dass Autophagie in α Syn-exprimierenden Hefezellen erst in der postmitotischen stationären Wachstumsphase induziert wird (Sampaio-Marques et al., 2012).

Im nächsten Schritt sollte auch die 26S-Proteasom-Aktivität untersucht werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass WT α Syn-GFP die 26S-Aktivität in Wildtyp-Stämmen reduziert (Galka et al., 2024), sollten in dieser Arbeit zudem die A30P- und A53T-Varianten berücksichtigt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Proteinqualitätskontrolle im *atg1Δ* Stamm vornehmlich auf Proteasom-Aktivität beruht (Athané et al., 2015). Daher sollte außerdem untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen der Proteasom-Aktivität im Wildtyp und dem Autophagie-defizienten Stamm gibt. Die Spezifität des Assays wurde mithilfe des Proteasom-Inhibitors MG132 nachgewiesen. Die 26S-Aktivität aller untersuchten Stämme wurde auf die EV-Kontrolle des Wildtyps normiert. Zunächst ist erkennbar, dass Wildtyp- und *atg1Δ*-Stämme eine ca. 20%ige Aktivitätserhöhung bei one-copy-Expression von WT α Syn-GFP zeigen wohingegen A30P und A53T α Syn-GFP keine signifikante Änderung hervorrufen (Abbildung 16A). Wie bereits in der Literatur beschrieben, ruft die high-copy-Expression von WT α Syn-GFP eine etwa 25%ige Reduktion der Aktivität hervor; dieser Effekt wird ebenfalls im *atg1Δ*-Stamm beobachtet (Abbildung 16B). Da auch hier keine signifikante Änderung in A30P und A53T α Syn-GFP-exprimierenden Zellen beobachtet werden kann, ist davon auszugehen, dass die dosisabhängige Inhibition der 26S-Untereinheit nicht auf membranbindende Eigenschaften von α Syn-GFP zurückzuführen ist. Zudem hat die Funktionalität der autophagischen Maschinerie keinen Einfluss auf die beobachteten Effekte.

Während die high-copy-Expression von α Syn-GFP die autophagische Aktivität nicht beeinflusst, zeigt sich bei WT α Syn-GFP ein signifikanter Effekt auf die 26S-Proteasomaktivität. Im nächsten Schritt sollte daher geprüft werden, ob die beobachtete Wuchsreduktion durch membranbindende α Syn-GFP-Spezies zumindest in WT α Syn-GFP-exprimierenden Zellen mit einer generellen Proteinaggregation im Zusammenhang steht.

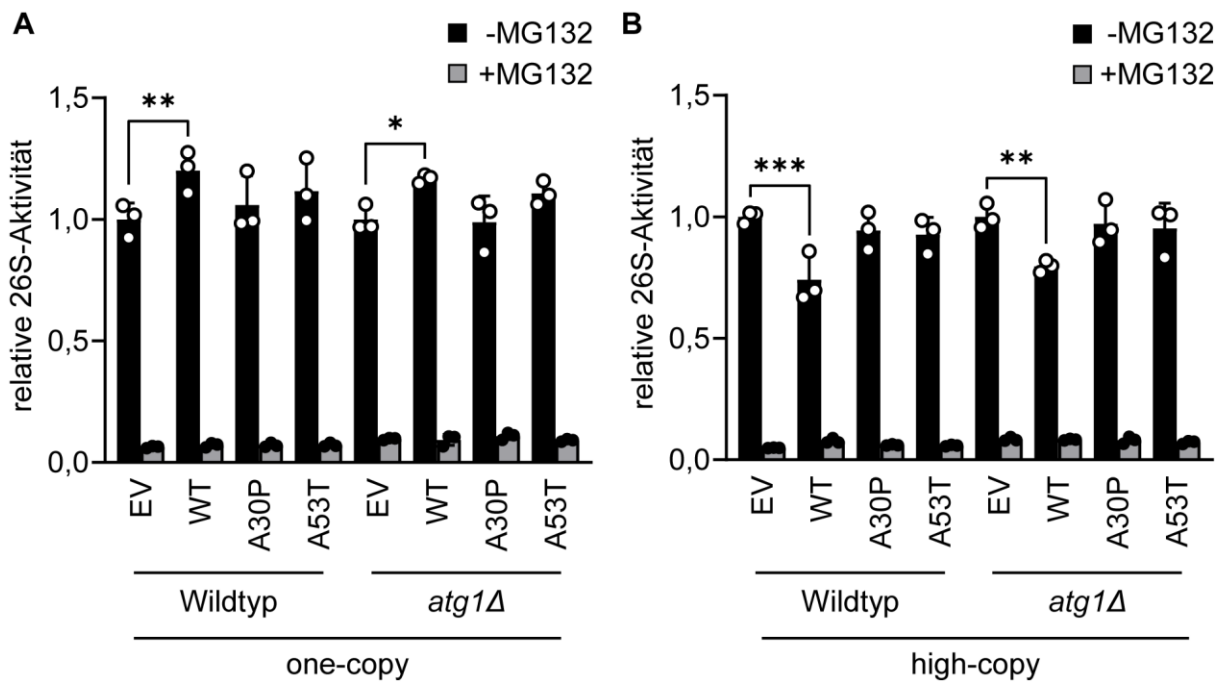


Abbildung 16: WT α Syn-GFP beeinflusst die 26S-Aktivität dosisabhängig. Vergleichende photometrische Analyse der 26S-Proteasomaktivität bei Expression von **A**: one-copy und **B**: high-copy α Syn-GFP-Spezies und der EV-Kontrolle. Die Proteasomaktivität wird im Wildtyp und *atg1Δ* durch one-copy WT α Syn-GFP zunächst induziert, und wird bei one-copy-Expression signifikant reduziert. Die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 inhibiert jegliche 26S-Aktivität und belegt damit die Spezifität des Assays. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte ($n = 3$) und der Mittelwert + Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2 Membranbindende α Syn-Spezies induzieren Proteinaggregation

Um die Proteinaggregation in Wildtyp und *atg1Δ* zu untersuchen, wurden Zellysate in lösliche und aggregierte Proteinfractionen aufgeteilt und diese zunächst immunologisch auf die Anwesenheit von α Syn-GFP überprüft (Abbildung 17A). Wie zu erwarten können alle α Syn-GFP-Spezies im Gesamtlisat der Proben detektiert werden. Dabei sind die Proteinmengen bei one-copy-Expression von α Syn-GFP nahezu identisch. Wie bereits beschrieben liegen die membranbindenden WT- und A53T-Varianten bei high-copy-Expression in geringerer Menge vor als A30P α Syn-GFP. Bei Überprüfung der aufgeteilten Fraktionen wird deutlich, dass α Syn-GFP fast ausschließlich in der löslichen Proteinfraction vorliegt. Ausschließlich in *atg1Δ*-Stämmen, welche high-copy- α Syn-GFP exprimieren, kann eine geringe Menge WT und A30P α Syn-GFP in der aggregierten Fraktion detektiert werden. Da α Syn-GFP nicht, oder nur in sehr geringen Mengen in der Form unlöslicher Aggregate vorliegt, wurde im nächsten Schritt ein In-Gel-Proteinaggregations-Assay durchgeführt. Hierfür wurden ausschließlich aggregierte Fraktionen über das Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Sowohl im Wildtyp als auch im *atg1Δ*-Stamm hat die one-copy-Expression von α Syn-GFP keinen Einfluss auf die Proteinaggregation (Abbildung 17B). So weisen alle Fraktionen eine ähnliche Färbeintensität auf. Bei einer Erhöhung der Expressionslevel kann hingegen beobachtet werden, dass die membranbindenden Varianten WT und A53T α Syn-GFP eine deutlich erhöhte Menge

aggregierter endogener Proteine hervorrufen. Die Aggregationslevel der A30P α Syn-GFP-exprimierenden Stämme ist in beiden Fällen vergleichbar mit der EV-Kontrolle.

Membranbindende α Syn-GFP-Varianten in Wildtyp und *atg1 Δ* neigen zwar selbst nicht zur Aggregation, high-copy-Expressionslevel fördern jedoch die Aggregation anderer, hefeeigener Proteine. Dies gilt nicht nur für die Proteasom-inhibierende WT α Syn-GFP-Isoform, sondern auch für die A53T-Variante. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie schnell bzw. ob α Syn-GFP unter Translations-inhibierten Bedingungen in Hefen abgebaut wird.

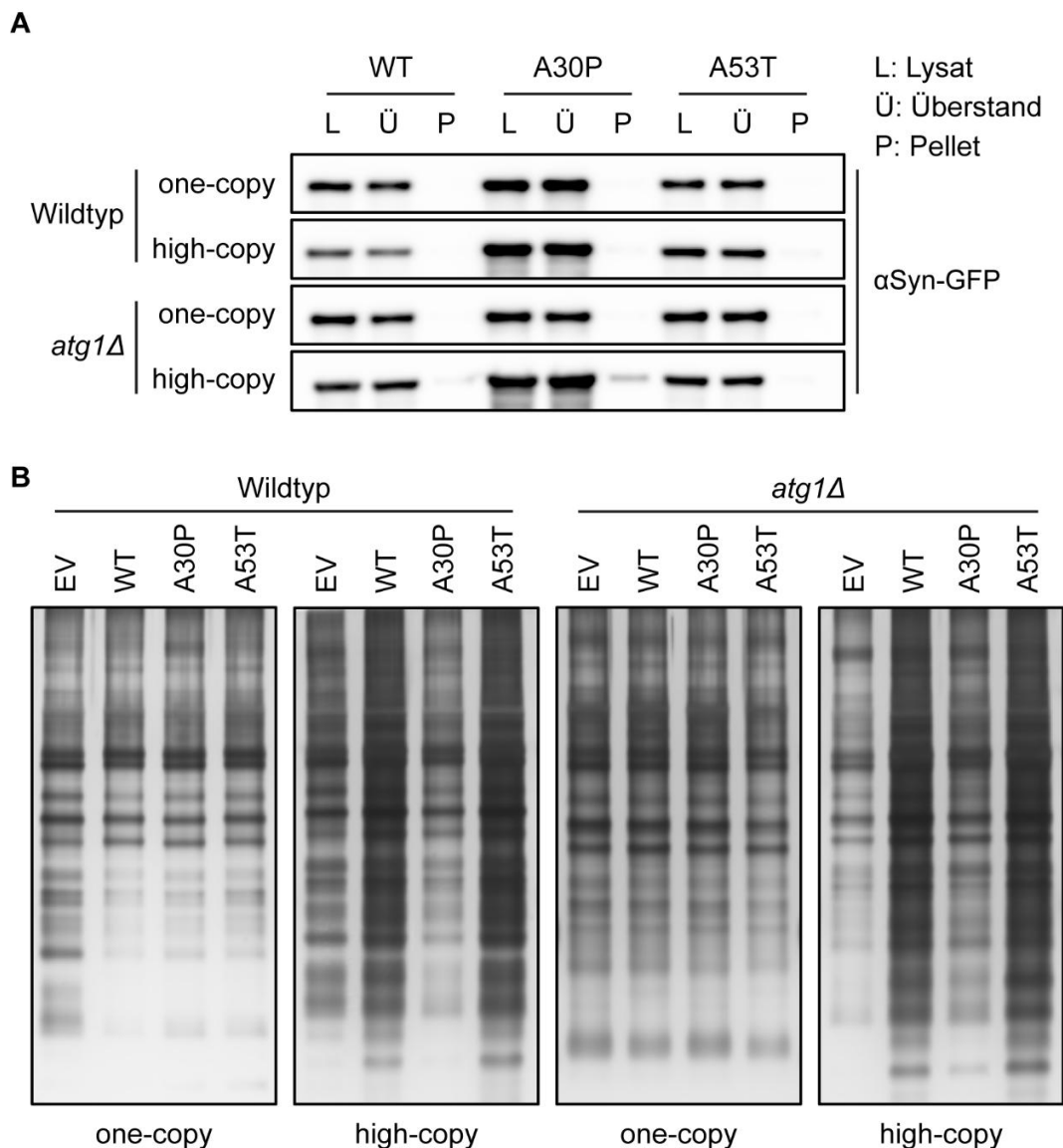


Abbildung 17: Die high-copy-Expression membranbindender α Syn-GFP-Spezies induziert die Aggregation endogener Proteine. A: Western Blot-Analyse der α Syn-GFP-Level im Gesamtlysate (L), der löslichen Proteinfraction (Ü) sowie der aggregierten Fraction (P) von Wildtyp und *atg1 Δ* . Im Gegensatz zu endogenen Proteinen liegt kein substantiell erhöhtes Maß an aggregierten α Syn-GFP-Spezies vor. **B:** Proteinaggregations-Assay in WT, A30P und A53T α Syn-GFP-exprimierenden Wildtyp- und *atg1 Δ* -Stämmen. Die high-copy-Expression von WT und A53T- α Syn-GFP induziert die Bildung von hefeeigenen Proteinaggregaten aller molekularen Massen im Vergleich zur EV-Kontrolle und der A30P-Isoform.

2.3 α Syn wird vor proteolytischem Abbau geschützt

Zur Untersuchung der zellulären Stabilität von α Syn-GFP wurden die Proteinspiegel der WT-, A30P- und A53T-Varianten zeitabhängig nach Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid bestimmt. Dabei wurden ausschließlich die one-copy-exprimierenden Konstrukte verwendet, da sich die Proteinlevel der verschiedenen α Syn-GFP-Spezies nicht voneinander unterscheiden. Um die Wirksamkeit des Assays zu verifizieren, wurde das intrinsisch instabile Reporterprotein Deg1-Sec62 als Kontrolle verwendet (Buchanan et al., 2016). Bei Deg1-Sec62 handelt es sich um ein Fusionsprotein aus den ersten 67 Aminosäuren des Hefe-Transkriptionsrepressors MAT α 2 (Deg1), die eine Degron-Sequenz für Doa10-abhängigen Abbau darstellen und das ER-Transmembranprotein Sec62. Zum immunologischen Nachweis beinhaltet das Protein zudem ein Flag-Epitop sowie zwei Protein-A-Kopien.

Es wird deutlich, dass das Reporterprotein bereits nach 30 min Inkubation mit Cycloheximid in substantiell verringerter Menge vorliegt (Abbildung 18A). Nach 1 h ist nahezu kein Deg1-Sec62 mehr detektierbar, während das Referenzprotein P_{gk1} während des gesamten Assays stabil in der Zelle bleibt. Auch in *atg1 Δ* wird das Reporterprotein innerhalb einer Stunde zu mehr als 90% abgebaut. Dies ist nicht überraschend, da die Deg1-Sequenz ein spezifisches Signalpeptid für den Abbau durch das „ER-associated protein degradation“ (ERAD)-System darstellt und daher unabhängig von autophagischen Prozessen abläuft (Habeck et al., 2015). Interessanterweise wird keine der drei α Syn-GFP-Varianten proteolytisch abgebaut (Abbildung 18B). Selbst nach 24 h Inkubation mit Cycloheximid verbleiben alle α Syn-GFP-Varianten stabil in der Zelle (Abbildung 18C). Die vorhergehenden Experimente konnten zeigen, dass die one-copy-Expression von α Syn-GFP keinen der untersuchten Proteinqualitätskontrollmechanismen inhibiert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei α Syn entweder um ein Protein mit ausgeprägter intrinsischer Stabilität handelt oder es durch spezifische Interaktionen anderweitig vor der Proteolyse geschützt wird.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass ein Verlust der autophagischen Maschinerie die α Syn-GFP vermittelten Wuchseffekte bei high-copy-Expression nicht verstärkt. Ebenso führt die Expression von α Syn-GFP nicht zu einer generellen Erhöhung des autophagischen Abbaus. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete α Syn-Sensitivität in exponentiell wachsenden Hefezellen unabhängig von Makroautophagie auftritt. Darüber hinaus führt die high-copy-Expression sowohl von WT als auch A53T α Syn-GFP zu einer verstärkten Proteinaggregation, wobei ausschließlich WT α Syn-GFP die proteasomale Aktivität verringert. Dies legt nahe, dass WT und A53T α Syn-GFP den Abbau zellulärer Aggregate über andere Mechanismen – vermutlich in Zusammenhang mit den membranbindenden Eigenschaften – und nicht ausschließlich über die Beeinträchtigung des 26S-Proteasoms inhibieren.

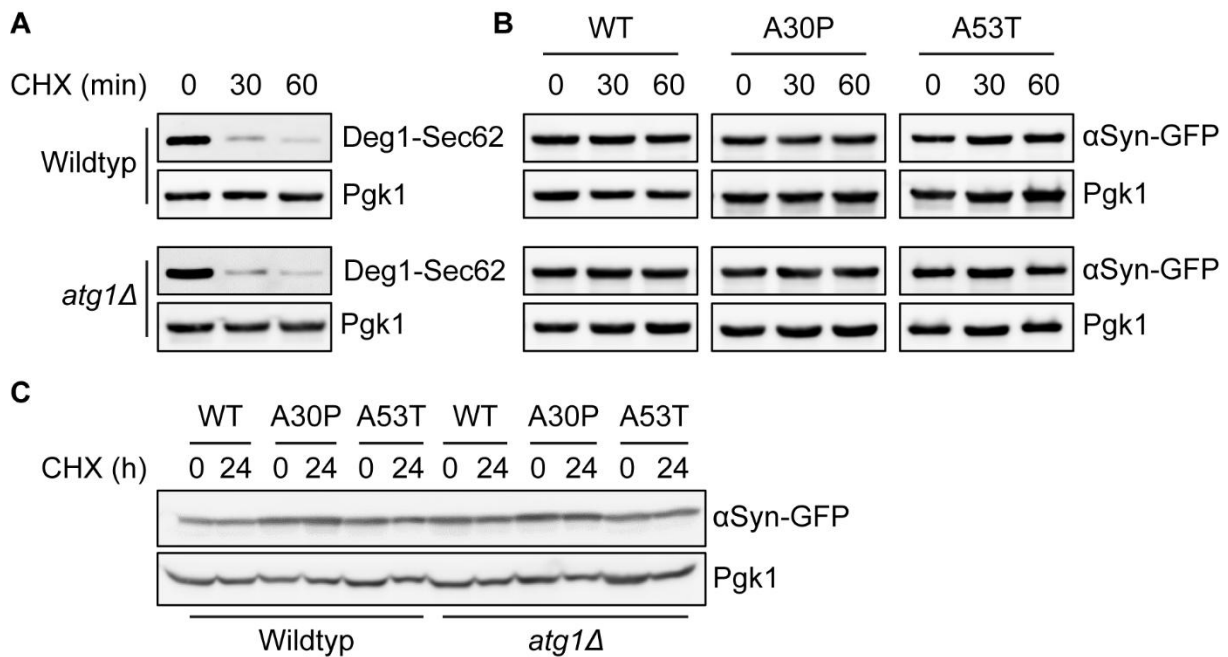


Abbildung 18: αSyn-GFP liegt stabil in *S. cerevisiae* vor und wird auch nach Translationsstopp nicht in der Zelle abgebaut. Cycloheximid-Assay zur Untersuchung des Protein-Abbaus nach Translations-Inhibition durch Cycloheximid (CHX; 250 µg/ml). Immunologische Untersuchung des Abbaus **A**: des Degradationsreporters Deg1-Sec62 sowie **B**: der drei αSyn-GFP Spezies (WT, A30P und A53T) 0, 30 und 60 min nach Zugabe von CHX. Während Deg1-Sec62 schon nach 30 min in deutlich reduzierter Menge vorliegt, bleiben alle αSyn-GFP-Spezies nach 60 min und auch **C**: nach 24 h stabil in der Zelle. Als Ladekontrolle wurde Pgk1 verwendet.

3. Phosphoinositidsynthese in der αSyn-Lokalisation und -Sensitivität

3.1 Wuchsratenreduktion in ATG-Mutanten ist Autophagie-unabhängig

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Autophagiedefizienz in *atg1Δ*-Stämmen keinen zusätzlichen Einfluss auf die durch high-copy-Expression von αSyn-GFP-verursachten Wuchsdefizite hat. Allerdings handelt es sich bei Autophagie um einen komplexen Mechanismus, welcher unter anderem vom Lipidstoffwechsel sowie einem Zusammenspiel vesikulärer Transportprozesse abhängt (Amaya et al., 2015; Longatti & Tooze, 2009; Schepers & Behl, 2021). Frühe Untersuchungen am Hefe-Modell konnten zeigen, dass die high-copy-Expression von WT αSyn-GFP in zahlreichen Deletionsstämmen mit Defekten in der Lipidbiosynthese und in vesikulären Transportmechanismen synthetische Letalität hervorruft (Willingham et al., 2003). Daher sollte untersucht werden, ob die one-copy-Expression von αSyn-GFP einen Einfluss auf die Wachstumsrate bestimmter Deletionsmutanten der autophagischen Maschinerie hat.

Für dieses „Screening“-Experiment wurden neben dem Wildtyp und *atg1Δ* 34 Autophagie-relevante Deletionsmutanten mit one-copy WT αSyn-GFP transformiert und in jeweils einem biologischen Replikat die maximale Wachstumsrate der Mutanten in Flüssigkultur auf die jeweilige EV-Kontrolle normiert. Wie auch der Wildtyp und der *atg1Δ*-Stamm zeigen die meisten

Deletionsstämme keine zusätzlichen Wuchsdefizite durch die Expression von WT α Syn-GFP (Abbildung 19A). Fünf der insgesamt 36 Stämme zeigen jedoch eine deutliche Wuchsreduktion um mehr als 20%. Dazu zählen Deletionsmutanten des PI3P-bindenden PAS-Lipidtransporters Atg2, des SNX-Proteins und Atg24-Interaktionspartners Atg20, des Autophagie-Adapterproteins Atg11 und der PI3K Kernuntereinheiten Vps15 und Vps34. Die *atg2 Δ* - und *atg11 Δ* -Stämme haben dabei eine um etwa 40% reduzierte Wachstumsrate im Vergleich zur EV-Kontrolle, während die Wachstumsrate des *atg20 Δ* -Stamms um ca. 20% abnimmt. Die stärkste Wachstumsratenreduktion wird in den *vps15 Δ* - und *vps34 Δ* -Stämmen beobachtet, welche durch WT α Syn-GFP auf 40% in *vps15 Δ* bzw. 20% in *vps34 Δ* verglichen zur EV-Kontrolle reduziert wird. Die deutlichen Unterschiede zur Wachstumsrate der *atg1 Δ* -Mutante verdeutlichen, dass es sich hierbei vermutlich um einen Autophagie-unabhängigen Effekt handelt.

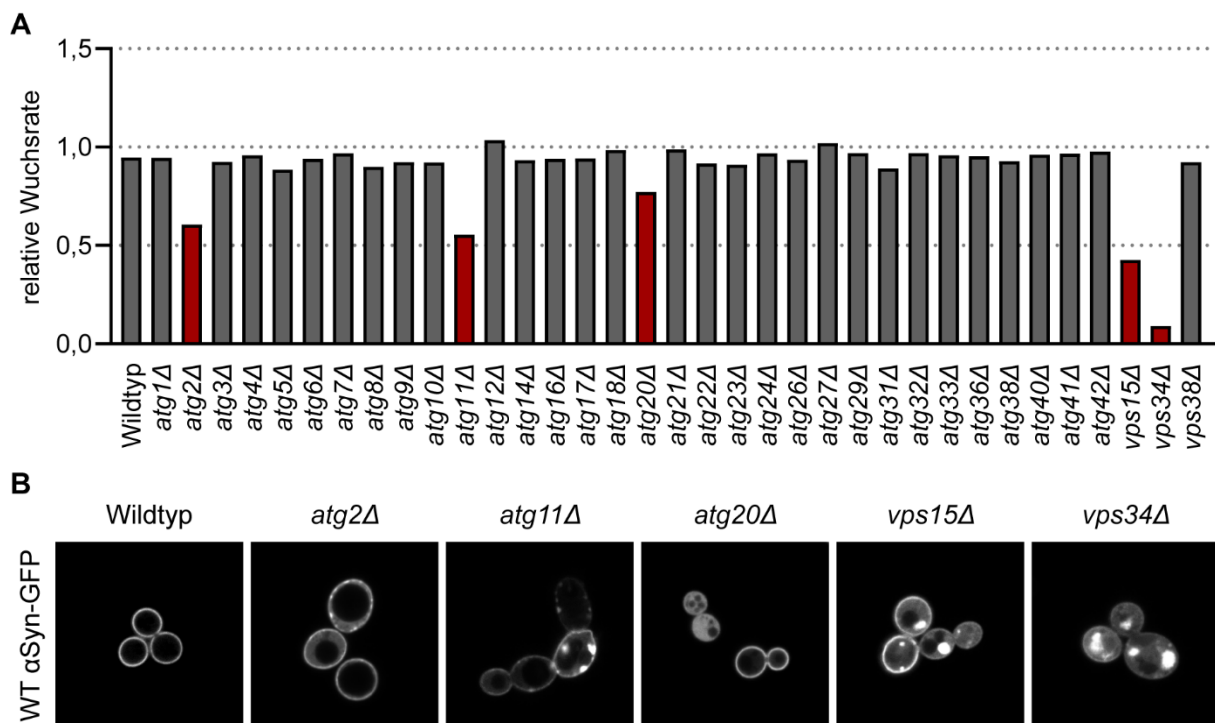


Abbildung 19: One-copy-Expression von WT α Syn-GFP hemmt das Wachstum bestimmter Autophagie-spezifischer Deletionsstämme. **A:** Vergleichende Analyse der Wachstumsraten Autophagie-relevanter Deletionsstämme bei one-copy-Expression von WT α Syn-GFP. Die maximale Wachstumsrate exponentiell wachsender Zellen wurde relativ zur jeweiligen EV-Kontrolle dargestellt ($n = 1$). Die Wachstumsraten der Stämme *atg2 Δ* , *atg11 Δ* , *atg20 Δ* , *vps15 Δ* und *vps34 Δ* sind deutlich reduziert, wohingegen die Wachstumsrate des Autophagie-defizienten *atg1 Δ* -Stamms nicht beeinflusst ist. **B:** Mikroskopische Lokalisation von WT α Syn-GFP in den betroffenen Deletionsstämmen aus **A**. Die betroffenen Stämme zeigen eine mindestens partielle zytoplasmatische Lokalisation des Proteins und in *atg11 Δ* , *vps15 Δ* und *vps34 Δ* können große GFP-positive Akkumulationen beobachtet werden. Maßstab: 5 μ m.

Im nächsten Schritt sollte die zelluläre Lokalisation von WT α Syn-GFP in den betroffenen Stämmen untersucht werden (Abbildung 19B). Die Lokalisation von WT α Syn-GFP stimmt, wie bereits beschrieben, mit der Literatur überein (Outeiro & Lindquist, 2003). Im Gegensatz dazu weisen die neu analysierten Deletionsstämme, in denen eine Reduktion der Wachstumsrate

beobachtet wurde, eine teilweise zytoplasmatische Lokalisation des Proteins auf. So lokalisiert WT α Syn-GFP in *atg20 Δ* nur in etwa 50% der Zellen an der PM. Auch in *atg11 Δ* kann α Syn-GFP nicht ausschließlich der PM zugeordnet werden. Im *atg11 Δ* -Stamm, wie auch in den PI3K-Mutantenstämmen *vps15 Δ* und *vps34 Δ* liegen zudem große GFP-positive Akkumulationen vor. In *vps15 Δ* und *vps34 Δ* lokalisieren diese primär zytoplasmatisch, während sie in *atg11 Δ* insbesondere nahe der PM akkumulieren. Vergleichbare GFP-reiche Akkumulationen wurden im Wildtyp erst bei hohen α Syn-GFP-Expressionslevels aufgrund doppelter genomischer Integration beobachtet (Petroi et al., 2012).

Eine beachtenswerte Gemeinsamkeit der Deletionsstämme *atg2 Δ* , *atg11 Δ* , *atg20 Δ* , *vps15 Δ* und *vps34 Δ* ist die Beteiligung der jeweiligen Proteine am Metabolismus bzw. dem intrazellulären Transfer von PIPs, insbesondere PI3P (Baskaran et al., 2012; Nice et al., 2002; Reidick et al., 2017; Reinhart et al., 2022; Yorimitsu & Klionsky, 2005). Dies könnte darauf hindeuten, dass Veränderungen am PI3P-Metabolismus einen direkten Einfluss auf die Lokalisation und Zytotoxizität von α Syn-GFP hat.

Im weiteren Verlauf wurde der Fokus auf die PI3K-Komplex-Mutantenstämme *vps15 Δ* und *vps34 Δ* gelegt, da in diesen Stämmen sowohl das Wuchsdefizit als auch die Ausprägung der GFP-Akkumulationen am deutlichsten waren. In die Analysen wurden zudem die PD-relevanten α Syn-Isoformen einbezogen, wobei zunächst zelluläre Lokalisation und der Einfluss auf das Zellwachstum näher untersucht wurden.

3.2 Wuchshemmung durch α Syn in PI3K-defizienten Stämmen

Die Proteine Vps15 und Vps34 bilden den Kern des PI3K-Komplexes. Vps34 ist die einzige bislang bekannte PI3K in *S. cerevisiae* und Vps15, eine Serin-/Threonin-Kinase, fungiert als Vps34-Aktivator. Während in *vps15 Δ* -Stämmen eine geringe Menge an PI3P detektierbar ist, führt der Verlust von Vps34 zu einer fast vollständigen Reduktion von PI3P (Stack et al., 1993).

Der Verlust dieser PI3K-Komplex-Untereinheiten in Kombination mit one-copy WT α Syn-GFP hat den deutlichsten Einfluss auf die Wachsrate. Daher wurde anschließend untersucht, welchen Effekt A30P und A53T α Syn-GFP auf das Wachstum der jeweiligen Stämme haben (Abbildung 20A). Hierfür wurden Wuchskurven in Flüssigkultur erstellt und der Wildtyp sowie der *atg1 Δ* -Stamm als Kontrolle genutzt. Wie bereits in den Spot-Tests beobachtet wurde, hat die one-copy-Expression von α Syn-GFP keinen Einfluss auf die Wachsrate des Wildtyps im Vergleich zur EV-Kontrolle. Alle Wildtyp-Stämme erreichen in Flüssigkultur die stationäre Phase nach etwa 15 h bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ca. 0,8. Das Gleiche gilt für den *atg1 Δ* -Stamm, bei dem alle untersuchten Stämme nach 15 h eine OD₆₀₀ von etwa 0,9 erreichen. Bei *vps15 Δ* und *vps34 Δ* kommt es hingegen zu einer deutlichen Inhibition des Wachstums. Wie bereits beschrieben, hat WT α Syn-GFP einen signifikanten Effekt auf die Wachsrate beider Deletionsstämme. So erreichen die EV-Kontrollen jeweils nach 16 h eine

OD₆₀₀ von etwa 0,4, welche durch die Expression von WT α Syn-GFP auf weniger als 0,2 reduziert wird. Auch die anderen α Syn-GFP-Varianten haben einen deutlichen Einfluss auf die Wachstumsrate. Diese Wachstumskurven lassen vermuten, dass *vps15* Δ und *vps34* Δ gleichermaßen von der α Syn-Expression betroffen sind. Bei Untersuchung der maximal erreichbaren OD₆₀₀ wird hingegen deutlich, dass der Effekt in *vps34* Δ -Stämmen vielfach ausgeprägter ist (Abbildung 20B). Während die maximale OD₆₀₀ in Wildtyp, *atg1* Δ und *vps15* Δ bei allen α Syn-GFP-Spezies unverändert zur EV-Kontrolle bei etwa 0,8, 0,9 bzw. 0,8 vorliegt, wird sie in *vps34* Δ durch die Expression von WT α Syn-GFP um 49% und durch die A30P- und A53T-Varianten um etwa 41% reduziert.

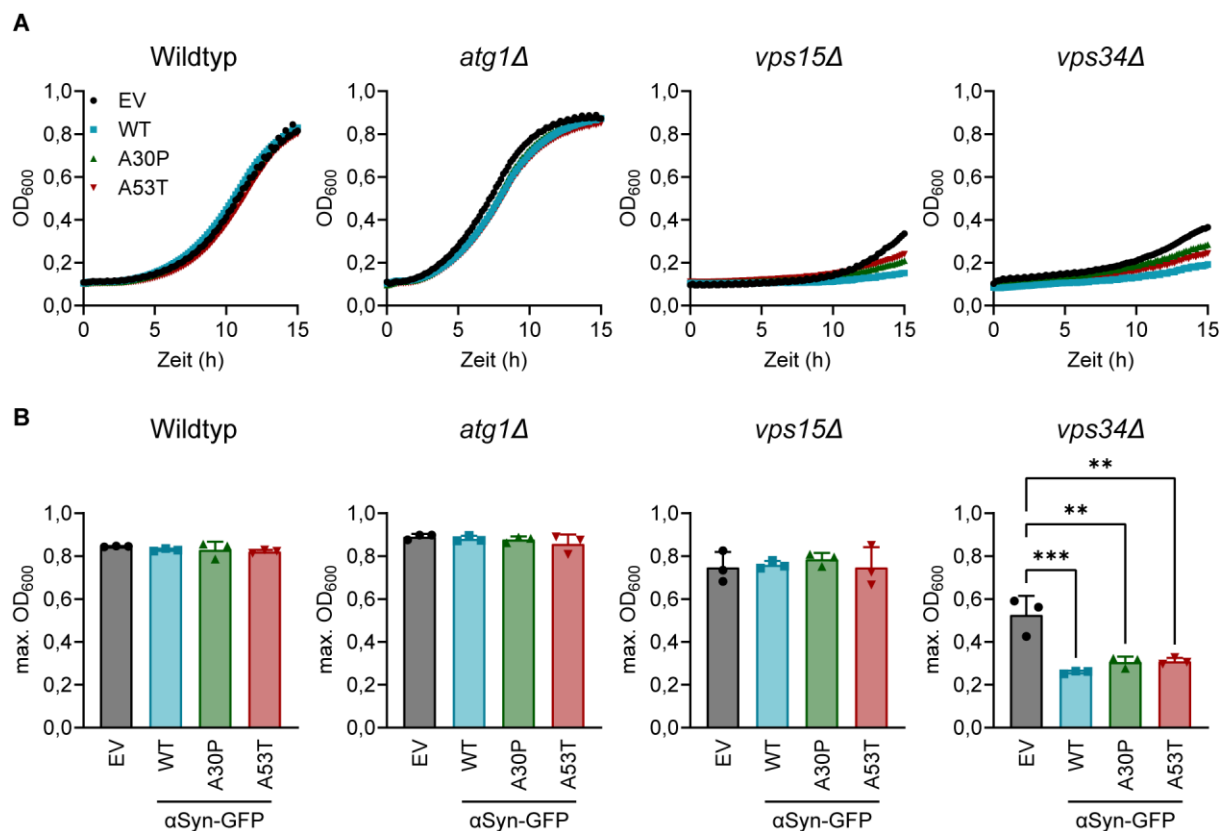


Abbildung 20: One-copy α Syn-GFP reduziert die Wachstumsrate der PI3K-Deletionsstämme. **A:** Photometrische Wachstumskurven (OD₆₀₀) von α Syn-GFP-exprimierenden Wildtyp-, *atg1* Δ -, *vps15* Δ - und *vps34* Δ -Stämmen sowie den jeweiligen EV-Kontrollen über 15 h in Flüssigkultur. Die Wachstumsraten der PI3K-Deletionsstämme sind deutlich reduziert und werden durch die α Syn-GFP-Expression weiter gesenkt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der OD₆₀₀ aus n = 3, die für 15 h alle 10 min gemessen wurde. **B:** Vergleichende Analyse der maximal erreichbaren OD₆₀₀ in den Stämmen aus **A**. Ausschließlich die maximale OD₆₀₀ von *vps34* Δ wird durch die α Syn-GFP-Expression signifikant reduziert. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte (n = 3) und der Mittelwert + Standardabweichung. **p < 0,01; ***p < 0,001

Es ist bekannt, dass high-copy WT und A53T α Syn-GFP einen negativen Einfluss auf die Lebensspanne des Wildtyps haben (Sampaio-Marques et al., 2012). Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob eine one-copy-Expression dieser α Syn-GFP-Isoformen auch einen Einfluss auf die chronologische Lebensspanne von *vps15Δ* und *vps34Δ* hat. Auch hier wurden der Wildtyp und *atg1Δ* als Kontrollen verwendet. Ein Stamm wurde für „tot“ erklärt, wenn der Anteil der kolonieformenden Einheiten unter 10% beträgt. Im Wildtyp hat die one-copy-Expression von WT, A30P wie auch A53T α Syn-GFP keinen signifikanten Effekt auf die Lebensspanne. Alle Stämme haben eine mit dem EV vergleichbare maximale Lebensspanne von 21-24 d (Abbildung 21A). Es kann hingegen kein eindeutiger Rückschluss auf die Auswirkungen der α Syn-GFP-Expression auf *atg1Δ*, *vps15Δ* und *vps34Δ* gezogen werden, da jeder dieser Stämme auch ohne α Syn-GFP-Expression bereits nach maximal 2 Tagen nicht mehr lebensfähig ist. Dieses Ergebnis lässt darauf hindeuten, dass der beobachtete Lebensspanneneffekt unter anderem auf eine generelle Autophagie-Defizienz zurückzuführen sein kann.

Da PI3P unter anderem eine zentrale Rolle bei der Initiierung der Autophagie spielt, sollte bestätigt werden, dass die vorliegenden *vps15Δ*- und *vps34Δ*-Stämme wie auch der Autophagie-defiziente *atg1Δ*-Stamm nicht mehr in der Lage sind, den Autophagie-Reporter GFP-Atg8 unter Stickstoffmangel zu freiem GFP abzubauen (Abbildung 21B) (Torggler et al., 2017). Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben, weshalb zur Bestätigung lediglich ein biologisches Replikat untersucht wurde (Kihara et al., 2001). Wie zu erwarten wird Atg8 im Wildtyp nach 16 h Stickstoffmangel fast vollständig abgebaut, wodurch freies GFP in der Vakuole verbleibt. In *vps15Δ* und *vps34Δ* kann, wie auch in der *atg1Δ*-Kontrolle kein Abbau von GFP-Atg8 beobachtet werden. Dies unterstreicht die Autophagie-Defizienz aufgrund des signifikanten PI3P-Mangels.

Die Expression von α Syn-GFP in *vps15Δ* und *vps34Δ* führt zu ausgeprägten Wuchsdefekten in teilungsaktiven Zellen, die nicht auf einen Funktionsverlust der autophagischen Maschinerie zurückzuführen sind. Lebensspannenanalysen sowie bereits veröffentlichte Daten zur α Syn-GFP-Expression in stationären, alternden Hefezellen deuten vielmehr darauf hin, dass Autophagie im Kontext der α Syn-Expression erst in postmitotischen Zellen an Relevanz gewinnt (Sampaio-Marques et al., 2012; Tenreiro et al., 2014). Die beobachteten Wuchsdefekte sind demnach vermutlich auf eine PI3K-Defizienz zurückzuführen. Besonders deutlich zeigt sich dies in *vps34Δ*-Stämmen, bei denen die Wachsrates, aber insbesondere die maximal erreichbare Zelldichte stärker reduziert ist als in *vps15Δ*-Stämmen, die noch vergleichsweise höhere PI3P-Mengen aufweisen.

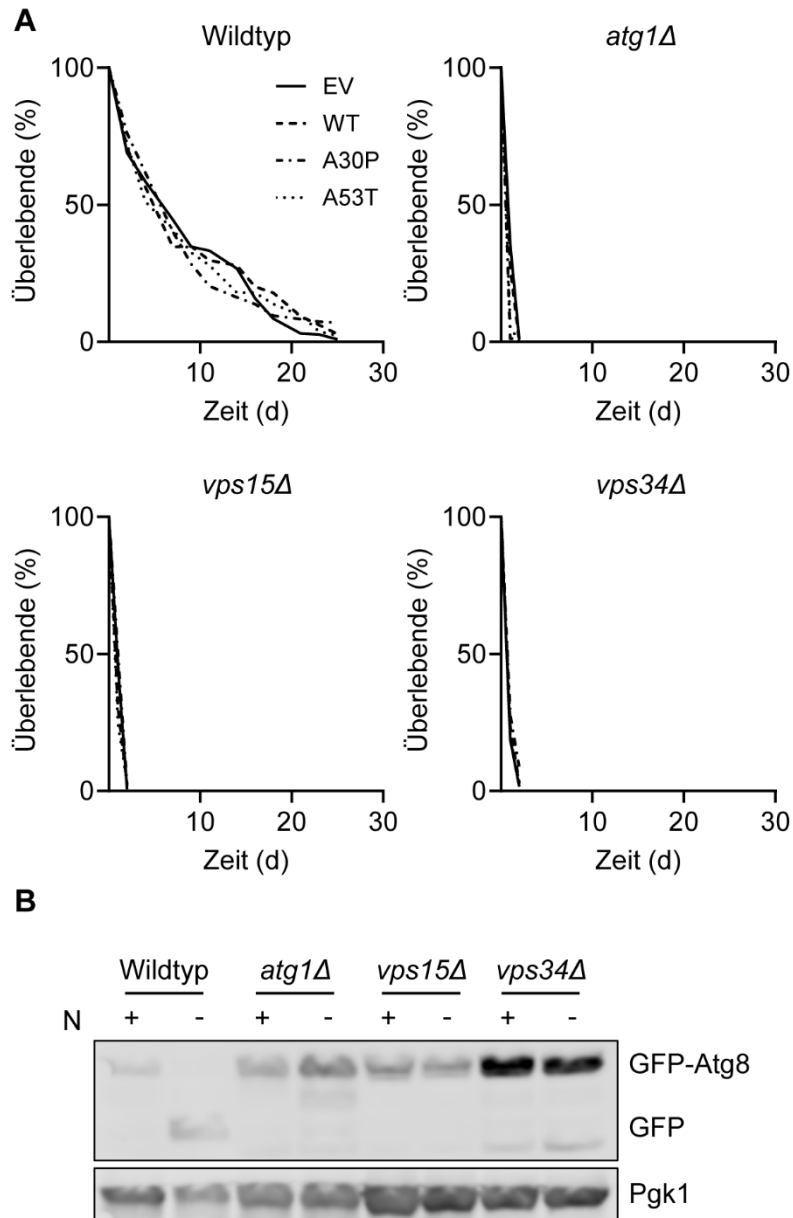


Abbildung 21: Der Verlust der autophagischen Maschinerie resultiert in einer drastisch reduzierten chronologischen Lebensspanne. A: Vergleichende chronologische Lebensspanne von Wildtyp-, *atg1Δ*-, *vps15Δ*- und *vps34Δ*-Stämmen die WT, A30P oder A53T α Syn-GFP exprimieren, oder die EV-Kontrolle beinhalten. In keinem der Stämme kann eine durch α Syn-GFP verursachte Lebensspannenreduktion beobachtet werden, ein Makroautophagie-Defizit reduziert die Lebensspanne hingegen deutlich. Die Anzahl der überlebenden Zellen wurde anhand kolonieformender Zellen auf Festmedium bestimmt. Die Kurven wurden aus den jeweiligen Mittelwerten ($n = 3$) erstellt. **B:** Immunologischer Autophagie-Assay zur Untersuchung der autophagischen Aktivität in den Stämmen aus **A**, ohne α Syn-GFP-Expression. Abgesehen vom Wildtyp zeigt keiner der Deletionsstäme eine autophagische Aktivität (erhöhtes GFP:Atg8-GFP-Verhältnis) nach 16 h Stickstoff (N)-Mangel. Pgk1 wurde als Ladekontrolle verwendet ($n = 1$).

3.3 PI3P-Verlust beeinflusst α Syn-Lokalisation und verursacht zelluläre Akkumulationen

Da die Expression von α Syn-GFP einen deutlichen Einfluss auf die Wachstumsrate von *vps15 Δ* und *vps34 Δ* hat, sollte im nächsten Schritt auch die Lokalisation der drei α Syn-GFP-Spezies mit dem Wildtyp und dem Autophagie-defizienten *atg1 Δ* -Stamm quantitativ verglichen werden. Sowohl *vps15 Δ* als auch *vps34 Δ* zeigen deutlich reduzierte PM-Lokalisation der membranbindenden α Syn-GFP-Spezies, verglichen mit den bereits untersuchten Wildtyp- und *atg1 Δ* -Stämmen (Abbildung 22A). So liegen WT und A53T α Syn-GFP in den Kontrollstämmen in nahezu 100% der Zellen PM-lokalisiert vor (Abbildung 22A und B). Der *vps34 Δ* -Stamm zeigt die stärkste Reduktion der PM-Lokalisation von α Syn-GFP, mit einem Rückgang um 86 % bzw. 98 % bei WT und A53T α Syn-GFP. In *vps15 Δ* weisen nur etwa 45 % der Zellen eine PM-Lokalisation von WT α Syn-GFP auf, während bei A53T α Syn-GFP lediglich 37 % der Zellen eine entsprechende Lokalisation zeigen. A30P- α Syn-GFP hingegen liegt in allen Stämmen hauptsächlich zytoplasmatisch vor (Abbildung 22A und B). In Wildtyp- und *atg1 Δ* -Stämmen liegen zudem keine zellulären GFP-Inklusionen vor, wohingegen GFP-positive Akkumulationen in *vps15 Δ* - und *vps34 Δ* -Stämmen bei Expression der α Syn-GFP-Varianten WT und A53T auftreten (Abbildung 22C). Inklusionen wurden dabei in 65 % bzw. 44 % der *vps15 Δ* - bzw. *vps34 Δ* -Zellen mit WT- α Syn-GFP und in 57 % bzw. 51 % der Zellen mit A53T- α Syn-GFP nachgewiesen. Zellen, die A30P α Syn-GFP exprimieren, zeigen hingegen signifikant weniger zytoplasmatische GFP-Akkumulationen. Dies deutet darauf hin, dass insbesondere membranbindende α Syn-GFP-Spezies unter PI3P-Mangel vermehrt zur Akkumulation neigen.

Um die Relevanz des N-Terminus für die Bildung zellulärer α Syn-GFP-Akkumulationen näher zu untersuchen, wurden ebenfalls die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Δ 38 α Syn-GFP und Δ 53 α Syn-GFP-Varianten in *vps15 Δ* und *vps34 Δ* exprimiert und deren zelluläre Lokalisation überprüft. Bei Expression dieser Trunkierungen in Wildtyp-, *atg1 Δ* - sowie den *vps15 Δ* - und *vps34 Δ* -Stämmen kann in keinem der Stämme eine PM-Lokalisation von α Syn-GFP nachgewiesen werden. Zudem liegen beide Varianten nicht in zytoplasmatischen Akkumulationen vor. Vielmehr gleicht die Lokalisation dieser artifiziellen α Syn-GFP-Konstrukte der Lokalisation der zytoplasmatischen A30P-Variante.

α Syn-GFP Spezies mit einem intakten, membranbindenden N-Terminus akkumulieren in den PI3K-defizienten Stämmen *vps15 Δ* und *vps34 Δ* . Da das Aggregationsverhalten von α Syn relevant für die Untersuchungen der PD-Pathologie ist, ergab sich die Fragestellung, ob die beobachteten Akkumulationen amyloider Natur sind, oder möglicherweise membranassoziiert vorliegen.

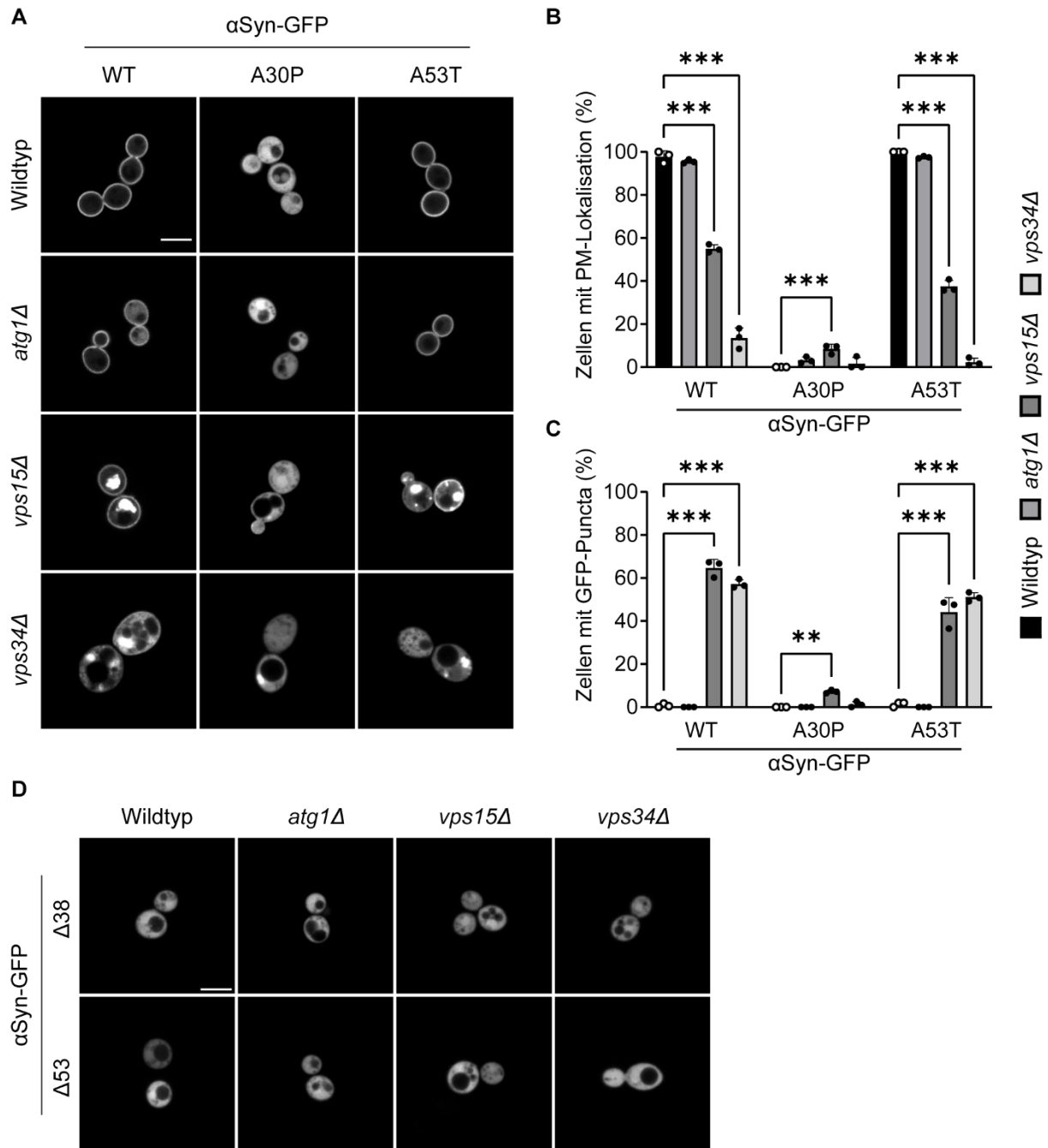


Abbildung 22: Der Verlust der PI3K resultiert in der zytoplasmatischen Akkumulation membranbindender α Syn-GFP-Spezies. **A:** Mikroskopische Lokalisation und **B-C:** Quantifizierung der PM-Lokalisation sowie GFP-Akkumulationen von WT, A30P und A53T α Syn-GFP in Wildtyp, *atg1Δ* und den *vps15Δ*- und *vps34Δ*-Stämmen. In *vps15Δ* und *vps34Δ* liegen membranbindende WT und A53T α Syn-GFP-Spezies vermehrt zytoplasmatisch vor und akkumulieren im Zytoplasma. **D:** Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation der artifizialen N-terminal trunkierten α Syn-GFP Konstrukte $\Delta 38$ und $\Delta 53$ in den Stämmen aus **A**. In keinem der Stämme kann PM-lokalisiertes α Syn-GFP bzw. GFP-positive Akkumulationen beobachtet werden. Maßstab: 5 μ m. In **B** und **C** sind die jeweiligen Datenpunkte aus $n = 3$ sowie die errechneten Mittelwerte + Standardabweichung aufgeführt. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.4 α Syn-Akkumulationen in PI3K-Mutanten sind nicht amyloid und membranassoziiert

Im klassischen Aggregationsprozess von α Syn lagern sich fehlgefaltete Monomere zu Oligomeren zusammen, welche sich β -Faltblatt-artig in Form von amyloiden Fibrillen anordnen (Cascella et al., 2019; de Oliveira & Silva, 2019). Daher sollte zunächst überprüft werden, ob die zellulären GFP-positiven Akkumulationen amyloide α Syn-Formen beinhalten. Hierfür wurde eine Thioflavin T-Färbung durchgeführt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie zu erwarten, akkumulieren WT und A53T α Syn-GFP sowohl in *vps15 Δ* - als auch in *vps34 Δ* -Stämmen, während bei A30P α Syn-GFP keine Akkumulationen beobachtet werden (Abbildung 23).

Aus den Färbungen geht zunächst hervor, dass keine der beiden EV-Kontrollen ein Thioflavin T-Signal aufweisen. Dies weist darauf hin, dass trotz des erhöhten Zellstress infolge des PI3P-Defizits keine amyloiden Aggregate endogener Proteine vorliegen. Auch die GFP-positiven Inklusionen in WT und A53T α Syn-GFP-exprimierenden Stämmen bleiben Thioflavin-T-negativ. Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Aggregaten nicht um amyloide Strukturen handelt.

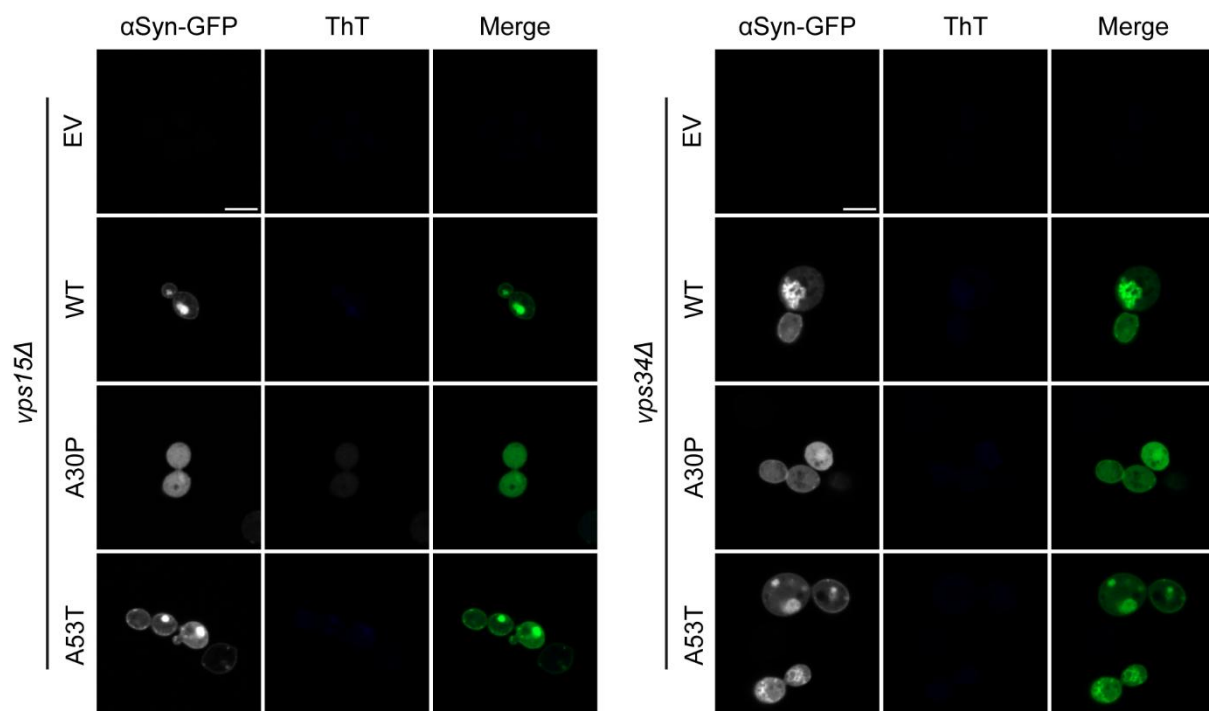


Abbildung 23: GFP-positive Akkumulationen in *vps15 Δ* und *vps34 Δ* sind nicht-amyloid. Mikroskopie Thioflavin T (ThT)-gefärbter Zellen von *vps15 Δ* - und *vps34 Δ* -Stämmen, die α Syn-GFP-Spezies (WT, A30P bzw. A53T) exprimieren. Zur Colokalisation der jeweiligen Fluoreszenzsignale wurden die Kanäle überlagert (Merge). Es kann kein ThT-Signal in den GFP-positiven Strukturen beobachtet werden. Maßstab: 5 μ m.

Als Nächstes wurde zudem untersucht, ob die Akkumulationen Lipidmembranen beinhalten, da α Syn in der PD-Pathogenese unter anderem auch an der Bildung großer vesikulärer Cluster beteiligt ist (Fanning et al., 2020; Kiechle et al., 2020). Hierfür wurde eine FM4-64-Färbung

durchgeführt. FM4-64 ist ein genereller Lipidfarbstoff, welcher an der PM bindet und von den Zellen internalisiert und über endosomale Sortierprozesse in Richtung der Vakuole transportiert wird (Vida & Emr, 1995). Der Farbstoff eignet sich daher auch als Marker, um endozytotische Prozesse zu verfolgen. In Wildtyp- und *atg1Δ*-Stämmen zeigt sich eine klare vakuoläre Lokalisierung des Farbstoffs, wenn WT, A30P bzw. A53T α Syn-GFP exprimiert wird (Abbildung 24A und B).

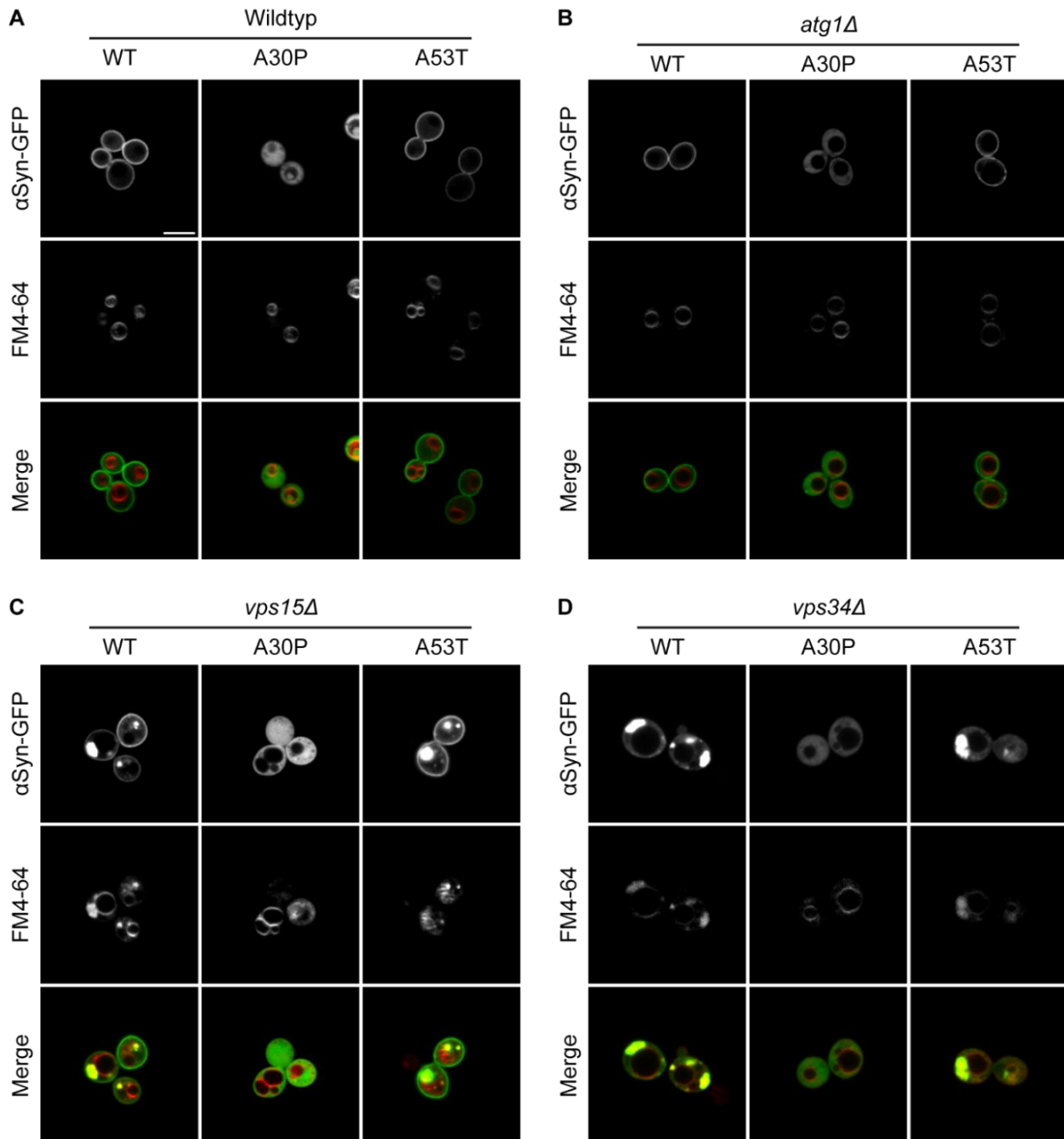


Abbildung 24: GFP-positive Akkumulationen enthalten Lipide des endosomalen Transportsystems. A-D: FM4-64-Färbung von WT, A30P und A53T α Syn-GFP-exprimierenden Wildtyp-, *atg1Δ*-, *vps15Δ*- und *vps34Δ*-Stämmen. Die Überlagerung der Farbkanäle (Merge) zeigt eine Colokalisation der GFP-Inklusionen und des Membranfarbstoffs FM4-64, was auf das Vorhandensein von Lipiden schließen lässt. Maßstab: 5 μ m.

Auffällig ist, dass die Expression von α Syn-GFP in *vps15 Δ* und *vps34 Δ* zwar zu einer Färbung vakuolärer Strukturen durch FM4-64 führt, aber bei Expression von WT und A53T α Syn-GFP zusätzlich die GFP-positiven Akkumulationen mit dem Farbstoff angefärbt werden (Abbildung 24C und D). Dies spricht dafür, dass die Akkumulationen beider Deletionsstämme generelle Lipidspezies beinhalten. Da die Vakuole nachweislich den Endpunkt der endozytotischen FM4-64-Internalisierung bildet, kann zudem davon ausgegangen werden, dass diese Inklusionen Lipide bzw. Membranen endosomaler Transportprozesse einschließen.

Basierend auf den Ergebnissen der Thioflavin T- und FM4-64-Färbungen, handelt es sich bei den GFP-positiven Signalen in den PI3K-defizienten Stämmen *vps15 Δ* und *vps34 Δ* um Zusammenlagerungen aus nicht-amyloiden, lipidassoziierten α Syn-GFP-Spezies mit Membranstrukturen aus dem endosomalen Transportsystem. Daher sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die endosomale PI3P-Biosynthese für die PM-Lokalisation von α Syn-GFP verantwortlich ist.

3.5 Endosomale PI3P-Biosynthese ist entscheidend für α Syn-Lokalisation

Die Gendichte des Hefegenoms ist verglichen mit höheren Eukaryoten sehr hoch, wodurch zahlreiche Gene mit den Promotorregionen benachbarter Gene überlappen können. So kann die Vollängen-Deletion eines Gens wie beispielsweise *VPS34* die Transkription des Nachbargens signifikant beeinflussen (Ben-Shitrit et al., 2012; Giaever & Nislow, 2014; Gordon et al., 2021). Bevor die Rolle endosomaler PI3P-Biosynthese für die α Syn-GFP-Lokalisation in *S. cerevisiae* untersucht werden konnte, galt es daher festzustellen, ob die α Syn-GFP-Mislokalisierung direkt auf Defekte in der PI3P-Synthese zurückzuführen ist oder durch sekundäre Effekte infolge dieser sogenannten „neighbouring gene interference“ verursacht wird.

Daher wurde zunächst eine Komplementationsanalyse durchgeführt, in der C-terminal *mRUBY2*-markierte *VPS15*- bzw. *VPS34*-Gene über ein Plasmid in die jeweiligen Deletionsmutanten eingebracht wurden. Die PI3K-Proteine wurden gemeinsam mit den α Syn-GFP-Isoformen WT, A30P oder A53T exprimiert, und die zelluläre Lokalisation von α Syn-GFP analysiert. Aus den Ergebnissen geht zunächst hervor, dass *Vps15-mRUBY2* und *Vps34-mRUBY2* in wenigen Puncta innerhalb der Zelle lokalisieren (Abbildung 25). Dies stimmt mit Ergebnissen aus der Literatur überein, die beschreiben, dass beide Enzyme insbesondere an endosomalen Strukturen vorliegen (Breker et al., 2014; Breker et al., 2013; Kihara et al., 2001). Zudem ist erkennbar, dass die Plasmid-vermittelte Expression von *Vps15-mRUBY2* bzw. *Vps34-mRUBY2* in den Deletionsmutanten die PM-Lokalisation der membranbindenden α Syn-GFP-Spezies wiederherstellt. In beiden Stämmen sind außerdem bei Expression von WT und A53T α Syn-GFP keine zytoplasmatischen GFP-Akkumulationen mehr nachweisbar. Dies

bestätigt, dass es sich bei der α Syn-GFP-Mislokalisierung um einen PI3P-abhängigen Effekt handelt, der durch das PI3K-Defizit hervorgerufen wird und nicht um „neighbouring gene interference“.

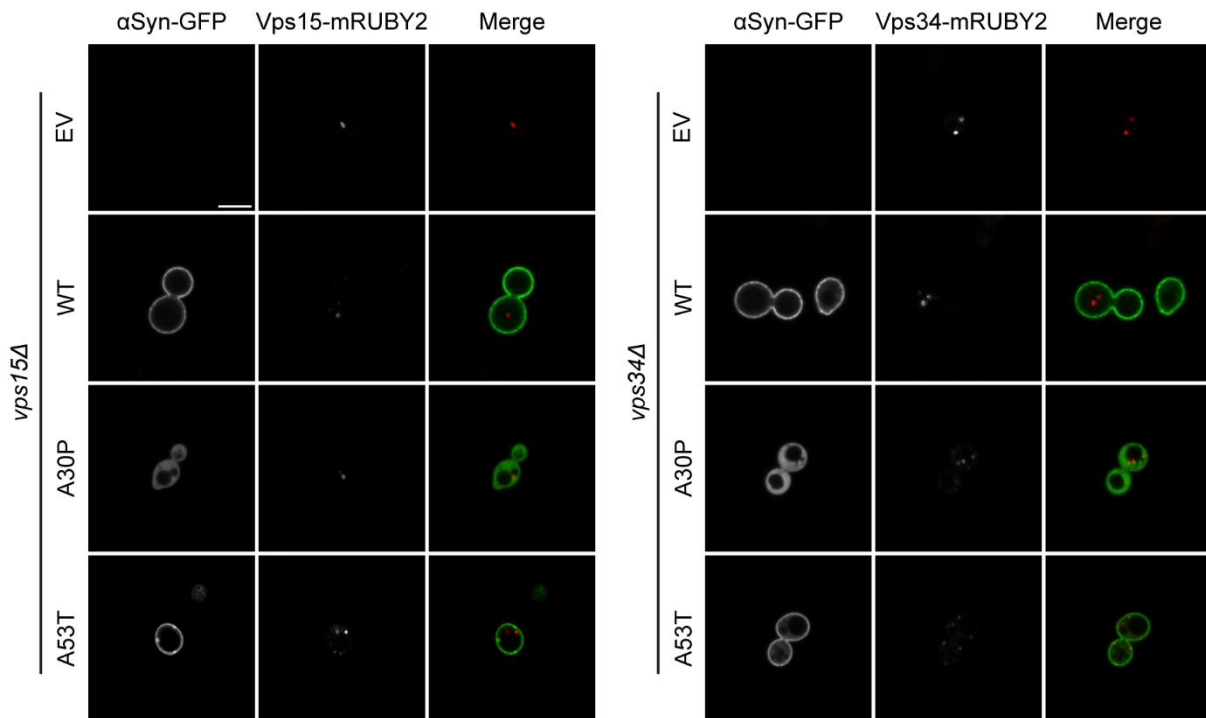


Abbildung 25: Plasmidvermittelte Komplementation der PI3K-Mutanten *vps15Δ* und *vps34Δ* stellt PM-Lokalisation membranbindender α Syn-GFP-Spezies wieder her. Mikroskopische Analyse der α Syn-GFP-Lokalisation durch die Expression von Vps15-mRUBY2 bzw. Vps34-mRUBY2 in den jeweiligen Deletionsstämmen. Die Komplementation revertiert die Mislokalisierung und zytoplasmatische Akkumulation des Proteins und deutet daher auf einen PI3K-spezifischen Effekt hin. Maßstab: 5 μ m.

Zusätzlich zu den Kernkomponenten des PI3K-Komplexes, Vps15 und Vps34, beinhaltet der Komplex weitere strukturelle Untereinheiten, die unter anderem für dessen zelluläre Lokalisation verantwortlich sind (Abbildung 26A). Der PI3K-Komplex I ist für die PI3P-Synthese an der ER-assoziierten PAS verantwortlich und enthält das Gerüstprotein Atg6 sowie die Komplex I-spezifischen Untereinheiten Atg14 und Atg38 (Araki et al., 2013; Kametaka et al., 1998). Komplex II synthetisiert PI3P an endosomalen Strukturen und beinhaltet ebenfalls Atg6 sowie das Komplex II-spezifische Protein Vps38 (Kihara et al., 2001). Im Gegensatz zu Atg14, das unerlässlich für die korrekte Lokalisation des Komplex I an der PAS und damit die Autophagie-Induktion ist, hat der Verlust von Vps38 nur einen geringen Effekt auf die Lokalisation von Komplex II (Kihara et al., 2001).

Als nächstes sollte untersucht werden, welcher dieser Komplex-Untereinheiten für die PI3P-Biosynthese benötigt wird und ob Einzeldelationen der strukturellen Untereinheiten die PI3P-Lokalisation beeinflussen können. Die mikroskopische Lokalisation von PI3P erfolgte durch das Reporterprotein mRFP-2xFYVE, welches aufgrund der FYVE-Domäne hochspezifisch an PI3P bindet. Es zeigt sich deutlich, dass PI3P in Wildtyp-Stämmen an großen zytosolischen Vesikeln und punktierten Strukturen angereichert ist (Abbildung 26B). Dabei handelt es sich nachweislich um Vakuolen sowie endosomale Vesikel (Gillooly et al., 2000). Zudem ist erkennbar, dass das Fehlen von *vps15Δ* und *vps34Δ* in einer zytosolischen Lokalisation des mRFP-2xFYVE-Proteins resultiert. Im Gegensatz dazu bindet der PI3P-Reporter in den anderen Deletionsstämmen *atg6Δ*, *atg38Δ*, *atg14Δ* und *vps38Δ*, wie auch im Wildtyp an vakuoläre Strukturen und endosomale Vesikel. Dies zeigt, dass der Verlust der strukturbildenden PI3K-Komplex-Untereinheiten die PI3P-Biosynthese nicht grundlegend beeinträchtigt. Die Beobachtung punktierter endosomaler Strukturen in diesen Stämmen, einschließlich der Komplex II-spezifischen *VPS38*-Einzeldelation, weist außerdem auf eine Komplex II-unabhängige endosomale PI3P-Synthese hin (Obara et al., 2008). Die fragmentierten PI3P-haltigen Vesikel in den Komplex I-spezifischen Deletionsmutanten *atg38Δ* und *atg14Δ* stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der daraus resultierenden Autophagie-Defizienz.

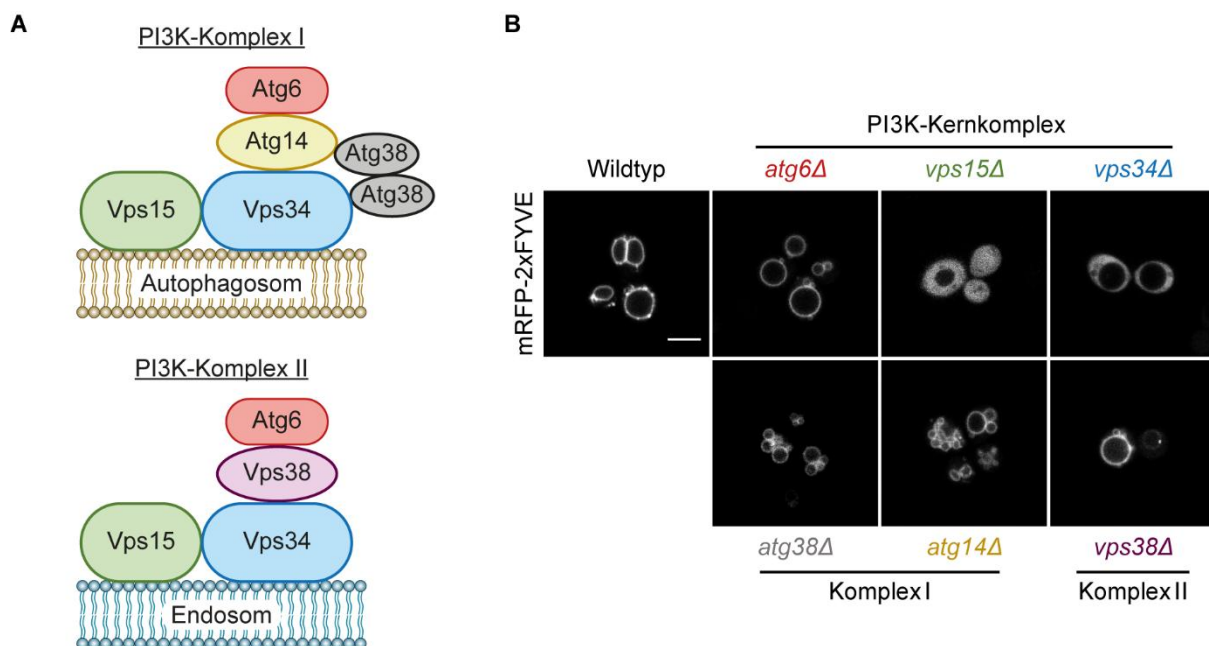


Abbildung 26: Der Verlust des katalytischen Kerns des PI3K-Komplexes resultiert in PI3P-Defizienz **A:** Schematische Darstellung des autophagosomalen PI3K-Komplex I, bestehend aus Vps15, Vps34, Atg14, Atg6 und Atg38 sowie des endosomalen Komplex II, bestehend aus Vps15, Vps34, Vps38 und Atg6. **B:** Mikroskopische PI3P-Lokalisation durch den hochspezifischen mRFP-2xFYVE-Reporter. PI3P liegt im Wildtyp an der Vakuole (Ringstruktur) sowie an endosomalen Membranen (Puncta) vor. Ausschließlich die Deletion von *VPS15* und *VPS34* führt zu einer deutlichen Reduktion der PI3P-Level und damit zu einer zytoplasmatischen Lokalisation des PI3P-Reporters. Maßstab: 5 μ m.

Um zu überprüfen, welcher Komplex der PI3K für die α Syn-Lokalisation notwendig ist, wurde WT α Syn-GFP in diesen PI3K-Komplex-Deletionsmutanten exprimiert und anschließend die maximale Wachstumsrate sowie die zelluläre α Syn-GFP-Lokalisation überprüft und mit dem Wildtyp sowie den *vps15 Δ* - und *vps34 Δ* -Stämmen verglichen. Die Wachsanalysen zeigen, dass in keinem der Deletionsstämme – abgesehen von *vps15 Δ* und *vps34 Δ* – eine signifikante Änderung der Wachstumsrate durch WT α Syn-GFP stattfindet (Abbildung 27A). Ebenso weisen alle Deletionsstämme der strukturbildenden PI3K-Komplex-Untereinheiten eine PM-Lokalisation von WT α Syn-GFP auf (Abbildung 27B).

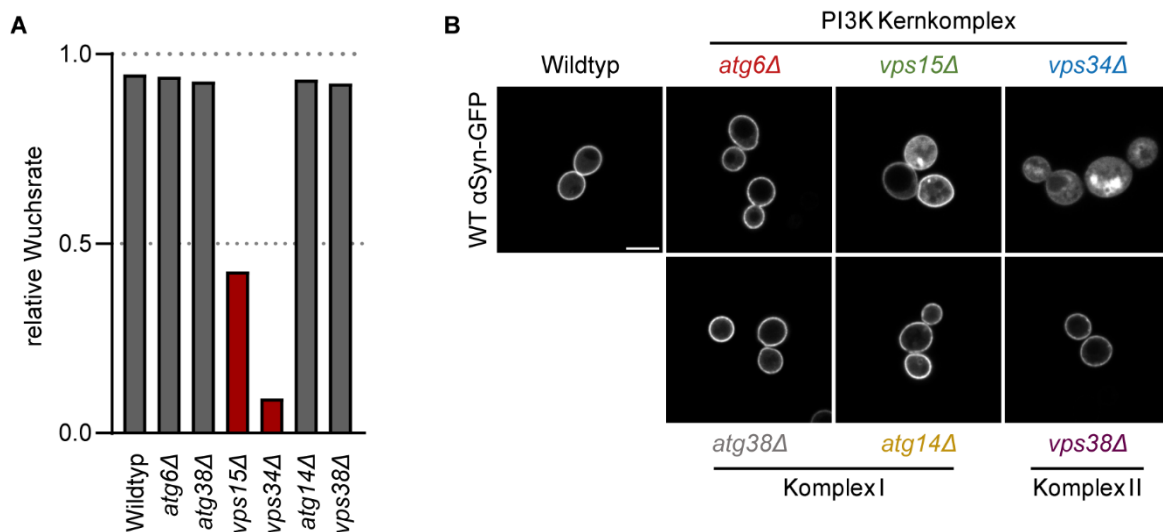


Abbildung 27: Die autophagosomale Lokalisation des PI3K-Komplexes ist nicht entscheidend für die PM-Lokalisation von α Syn-GFP. **A:** Ausschnitt der Wachsanalyse aus Abbildung 19, der ausschließlich Deletionsstämme der PI3K-Komplexe beinhaltet. Der Verlust der katalytischen PI3K-Aktivität resultiert in einer deutlichen Reduktion der maximalen Wachstumsrate. **B:** Mikroskopische Lokalisation von WT α Syn-GFP in den Deletionsstämmen aus **A**. Die Deletion der nicht-katalytischen Untereinheiten hat keinen Einfluss auf die PM-Lokalisation oder Akkumulation von α Syn-GFP. Maßstab: 5 μ m.

Da Atg14 essenziell für die Komplex I-abhängige PI3P-Synthese an der PAS ist und die Deletion keinen Einfluss auf die WT α Syn-GFP-Lokalisation hat, kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass die endosomale PI3P-Biosynthese der entscheidende Faktor für den α Syn-GFP-Transport zur PM ist. In *S. cerevisiae* liegen neben PI3P noch drei weitere PIP-Spezies vor, weshalb im Folgenden untersucht wurde, ob es sich bei PI3,5P2, PI4P und PI4,5P2 ebenfalls um relevante PIP-Spezies handelt, welche die α Syn-GFP-Lokalisation und -Akkumulation beeinflussen.

3.6 PI3P und PI3,5P2 beeinflussen PM-Lokalisation von α Syn

Neben PI3P existieren in *S. cerevisiae* noch drei weitere PIPs, welche von den Enzymen Fab1, Lsb6, Pik1, Stt4 und Mss4 synthetisiert werden. Fab1 synthetisiert PI3,5P2 an der Vakuole und an endosomalen Vesikeln, PI4P wird von Lsb6 an der Vakuole, von Pik1 am trans-Golgi und von Stt4 an der PM synthetisiert. Mss4 katalysiert die Synthese von PI4,5P2 aus PI4P an der PM (**siehe Einleitung 3.3**). Um zu untersuchen, ob die Defizienz weiterer PIP-Kinasen – und damit anderer PIP-Spezies – die α Syn-GFP-Lokalisation und -Sensitivität beeinflussen, wurden die drei α Syn-GFP-Spezies in Kinase-defizienten Deletions- bzw. Mutantenstämmen exprimiert und bezüglich ihrer zellulären Lokalisation überprüft. Zudem wurden Wuchskurven erstellt, um wie in den PI3K-Mutanten einen Einfluss auf die Zellvitalität zu untersuchen. Dabei ist zu beachten, dass *MSS4*, *PIK1* und *STT4* essenzielle Gene sind und es sich bei *mss4-103*, *pik1-104* und *stt4-4* um temperatursensitive Allele handelt. Bei 30 °C liegen die jeweiligen PIP-Spezies zwar signifikant, aber nicht vollständig, reduziert vor (Audhya & Emr, 2002; Audhya & Emr, 2003; Shin et al., 2020).

Es ist auffällig, dass von allen Kinase-Mutanten lediglich der Verlust der PI3P- bzw. PI3,5P2-synthetisierenden Kinasen Vps34 und Fab1 zu einer zumindest partiellen Mislokalisierung der membranbindenden α Syn-GFP-Spezies führt (Abbildung 28A und B). In *fab1 Δ* -Stämmen liegen WT und A53T α Syn-GFP, ähnlich zu den Beobachtungen in *vps15 Δ* , in etwa 60% bzw. 50% der Zellen zytoplasmatisch vor. In den Stämmen *lsb6 Δ* , *pik1-104*, *stt4-4* und *mss4-103* ist WT α Syn-GFP hingegen in mehr als 96% und A53T α Syn-GFP in über 93% der Zellen PM-lokalisiert.

Zytoplasmatische Akkumulationen werden wie bereits beschrieben vorwiegend in den PI3K-defizienten Stämmen *vps15 Δ* und *vps34 Δ* beobachtet (Abbildung 28C). In den *fab1 Δ* -, *lsb6 Δ* -, *pik1-104*-, *stt4-4*- und *mss4-103*-Stämmen akkumulieren WT und A53T α Syn-GFP in maximal 4-10% der Zellen in kleineren Inklusionen. Auffällig ist, dass in *stt4-4*-Stämmen lediglich die Expression von WT α Syn-GFP zu einem enormen Anstieg Akkumulations-positiver Zellen führt. Demnach zeigen etwa 33% der Zellen PM-lokalisierte GFP-positive Puncta, während die Expression von A53T α Syn-GFP nur in 6% der Zellen zu GFP-positiven Akkumulationen führt. Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit den Wuchskurven der jeweiligen Stämme. So zeigt mit Ausnahme von *stt4-4* keine der Kinasemutanten eine Änderung des Wachstumsverhaltens aufgrund der Expression der α Syn-GFP-Isoformen WT, A30P und A53T (Abbildung 28D). In *stt4-4* liegt hingegen eine deutliche Reduktion der Wachstumsrate aufgrund von WT α Syn-GFP, nicht aber der A30P- bzw. A53T-Spezies vor. So erreichen die Zellen nach 15 h eine OD₆₀₀ von ca. 0,6 und befinden sich noch in der exponentiellen Wachstumsphase, während die Wuchskurve der EV-Kontrolle bereits nach etwa 14 h bei 0,8 abflacht.

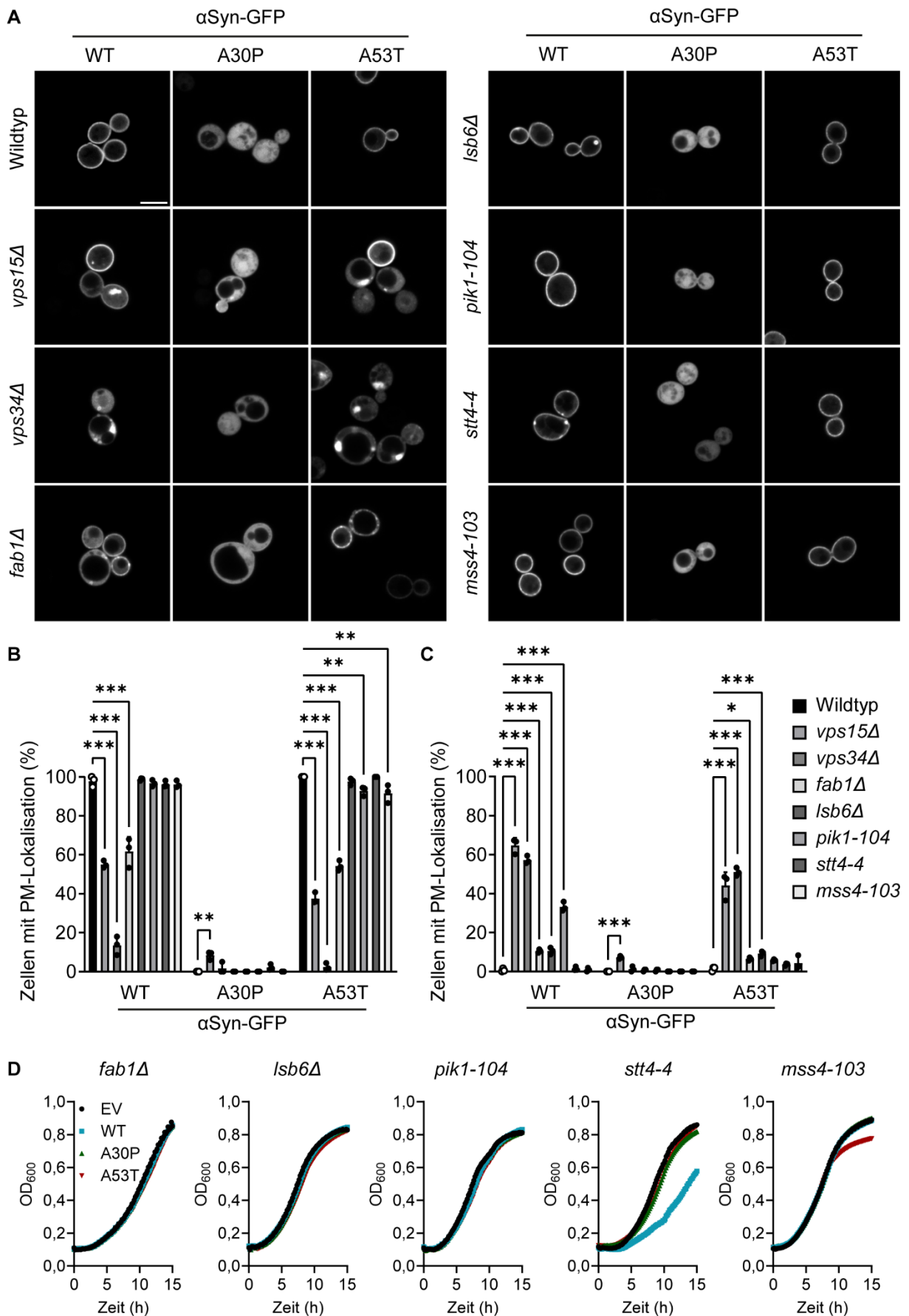


Abbildung 28: Die Synthese PI3-phosphorylierter PIP-Spezies vermittelt PM-Lokalisation von WT und A53T α Syn-GFP. A: Mikroskopische Lokalisation und **B-C:** Quantifizierung der PM-Lokalisation sowie GFP-Akkumulationen von WT, A30P und A53T α Syn-GFP-Isoformen in Deletions- bzw. Mutantenstämmen der sechs bekannten PIP-Kinasen *vps34Δ*, *fab1Δ*, *lsb6Δ*, *pik1-104*, *stt4-4* und *mss4-103*

103 sowie *vps15Δ*. Von den untersuchten Stämmen resultiert nur die Deletion von *VPS15*, *VPS34* und *FAB1* in einer mindestens partiellen zytoplasmatischen Lokalisation membranbindender α Syn-GFP-Spezies, wobei zusätzlich PM-nahe Akkumulationen von WT α Syn-GFP in PI4P-reduzierten *stt4-4*-Stämmen auftreten. Maßstab: 5 μ m. In **B** und **C** sind die jeweiligen Datenpunkte aus $n = 3$ sowie die errechneten Mittelwerte + Standardabweichung aufgeführt. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. **D**: Wuchskurven von α Syn-GFP-exprimierenden PIP-Kinase Mutantenstämmen (*fab1Δ*, *lsb6Δ*, *pik1-104*, *stt4-4* und *mss4-103*) sowie den jeweiligen EV-Kontrollen über 15 h. Ausschließlich die Wachstumsrate von *stt4-4* wird durch die Expression von WT α Syn-GFP beeinflusst. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der OD₆₀₀ aus $n = 3$, die für 15 h alle 10 min gemessen wurde.

Da PI4P im *stt4-4*-Stamm bei 30 °C nur um etwa 30% reduziert ist, wurde zusätzlich die Lokalisation von α Syn-GFP in Wildtyp-Zellen untersucht, die 5 h lang mit 5 μ M Wortmannin inkubiert wurden. In dieser Konzentration hemmt Wortmannin die PI4K Stt4 an der PM vollständig, während die Aktivität von Vps34 nur reduziert wird (Cutler et al., 1997; Stack & Emr, 1994). Hierfür wurde eine Zeitreihe erstellt, in der nach Wortmannin-Zugabe jede Stunde mikroskopische Aufnahmen erstellt wurden.

Zunächst wird in der DMSO-Kontrolle nach 5 Stunden eine PM-Lokalisation von WT und A53T α Syn-GFP sowie ein zytoplasmatisches Signal von A30P α Syn-GFP beobachtet (Abbildung 29). In A30P α Syn-GFP-exprimierenden Stämmen ist diese zytoplasmatische Lokalisation ohne zelluläre Akkumulationen auch nach 5 h Wortmannin-Behandlung unverändert. Im Gegensatz dazu zeigt sich, dass WT α Syn-GFP – ähnlich wie in *stt4-4*-Stämmen – primär nahe der PM akkumuliert. Auch in A53T α Syn-GFP-exprimierenden Zellen zeigen sich bei vollständiger chemischer Inhibition von Stt4 vergleichbare Akkumulationen. Anhand der Zeitreihe wird außerdem deutlich, dass diese Inklusionen insbesondere an Knospungsstellen wachsender Tochterzellen entstehen. Dies wird 2 h nach Wortmannin-Zugabe erkennbar, da sich zu diesem Zeitpunkt erst wenige Inklusionen gebildet haben. Die Anzahl dieser PM-lokalisierten Puncta nimmt bereits nach 3 h deutlich zu und nach 5 h sind die PM-Inklusionen der WT und A53T α Syn-GFP-exprimierenden Stämme vergleichbar mit den Effekten in der WT α Syn-GFP-exprimierenden *stt4-4*-Mutante. Dies könnte darauf hindeuten, dass WT α Syn-GFP generell empfindlicher auf reduzierte PI4P-Level an der PM reagiert als A53T α Syn-GFP, was auf eine stärkere funktionelle Abhängigkeit des Proteins von PI4P schließen lässt. Erst bei vollständiger PI4P-Inhibition durch Wortmannin kommt es so auch bei A53T α Syn-GFP zur Akkumulation nahe der PM.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass insbesondere PI3-phosphorylierte PIP-Spezies einen Einfluss auf die PM-Lokalisation membranbindender α Syn-GFP-Spezies haben. Zudem deutet das Wortmannin-Experiment darauf hin, dass die PM-lokalisierte PI4P-Biosynthese entscheidend für die Verteilung von α Syn-GFP entlang der PM ist. Die Knospennahe Lokalisation der GFP-positiven Akkumulationen in *stt4-4*-Stämmen und Wortmannin-behandelten Wildtyp-Zellen spricht dafür, dass dieser Effekt am Endpunkt der Sekretionsmaschinerie, der Exocyste erfolgt. Übereinstimmend damit konnten Studien zeigen,

dass α Syn-GFP insbesondere entlang des sekretorischen Wegs zur PM transportiert wird (Dixon et al., 2005).

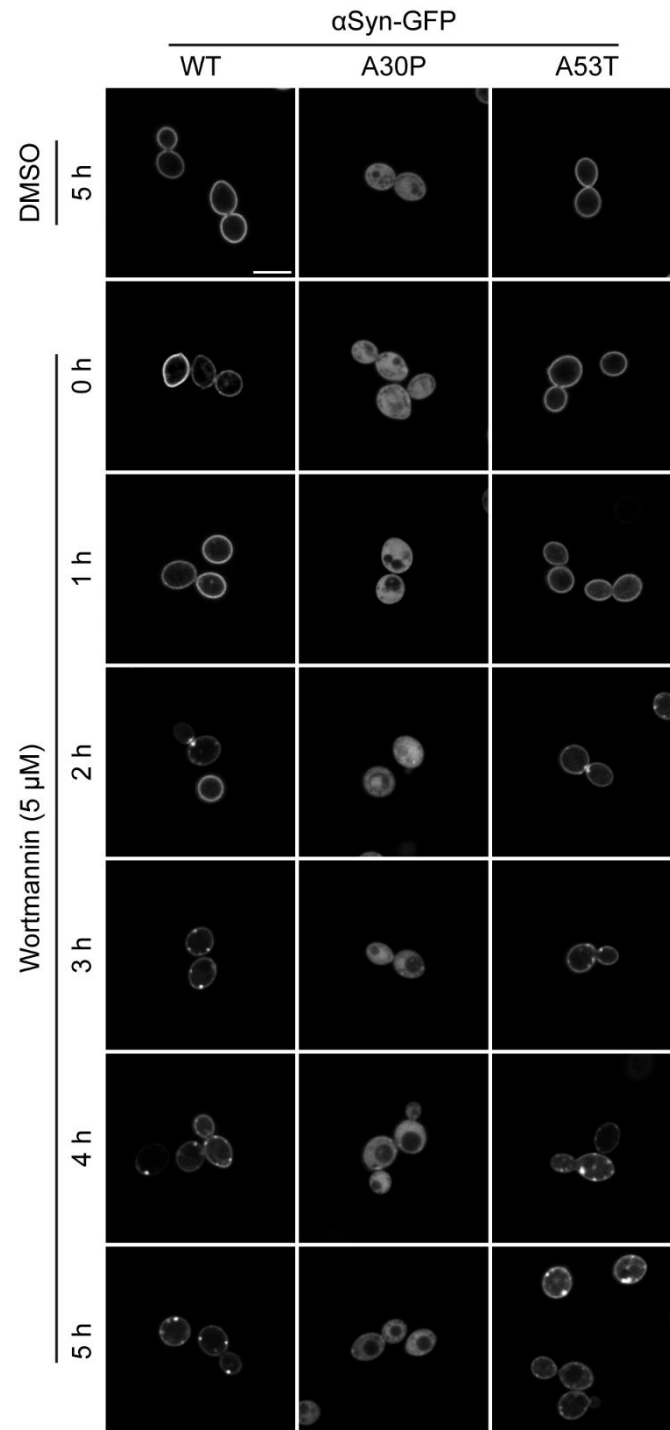


Abbildung 29: Die chemische Depletion von PM-lokalisiertem PI4P resultiert in der PM-nahen Akkumulation von WT und A53T α Syn-GFP. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der α Syn-GFP-Lokalisation 0-5 h nach Zugabe des Stt4-Inhibitors Wortmannin (5 μ M) bzw. nach 5 h in der DMSO-Kontrolle. Nach 2 h Wortmannin-Behandlung können WT und A53T α Syn-GFP-Akkumulationen nahe der Knospungsstellen beobachtet werden. Nach 5 h liegen viele PM-nahe GFP-Akkumulationen in der Zelle vor. Maßstab: 5 μ M.

4. α Syn beeinflusst die zelluläre Sekretionsmaschinerie

4.1 α Syn erreicht die PM über den sekretorischen Weg

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die endosomale Biosynthese von PI3P für die PM-Lokalisation von WT und A53T α Syn-GFP erforderlich ist. Ein Verlust von PM-lokalisiertem PI4P ermöglicht zwar grundsätzlich eine PM-Lokalisation, führt jedoch zu einer Akkumulation dieser α Syn-GFP-Isoformen an Endpunkten des sekretorischen Wegs, insbesondere an neu entstehenden Knospungsstellen. Studien deuten darauf hin, dass eine funktionelle sekretorische Maschinerie für den intrazellulären Transport von α Syn zur PM erforderlich ist und, dass Deletionsstämme, die Defekte in vesikulären Transportwegen aufweisen, empfindlicher gegenüber α Syn-Expression sind (Dixon et al., 2005; Soper et al., 2011; Soper et al., 2008). Es ist daher denkbar, dass die Interaktion von α Syn-GFP mit endosomalen, PI3P-haltigen Vesikeln einen Eintritt in die sekretorische Maschinerie ermöglicht.

Zunächst sollte verifiziert werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten α Syn-GFP Konstrukte wie das in der Literatur beschriebene N-terminal markierte GFP- α Syn primär zu Knospungsstellen über den sekretorischen Weg transportiert werden (Dixon et al., 2005). Zu diesem Zweck wurden die drei α Syn-GFP-Varianten in das pYCPlac33-GAL-GFP-Plasmid kloniert, was eine Galactose-abhängige Induktion der Expression von WT, A30P und A53T α Syn-GFP ermöglicht (Abbildung 30A). Anschließend wurden der Wildtyp und die Deletionsstämme *vps15 Δ* und *vps34 Δ* mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und die zelluläre Verteilung von α Syn-GFP wurde über einen Zeitraum von 8 h verfolgt. In Übereinstimmung mit den publizierten Daten, zeigen auch die C-terminal GFP-markierten WT und A53T α Syn-Konstrukte im Wildtyp eine initiale Lokalisation an den Knospungsstellen sich teilender Zellen (Abbildung 30B). Diese wird bereits 2 h nach Induktion der Genexpression sichtbar. Nach 4-8 h wurden diese α Syn-GFP-Spezies in den meisten Zellen gleichmäßig über die gesamte PM verteilt. A30P α Syn-GFP liegt während des gesamten Assays zytoplasmatisch lokalisiert vor.

Im Gegensatz zum Wildtyp liegen in *vps15 Δ* -Stämmen alle α Syn-GFP-Spezies bereits nach 2 h primär zytoplasmatisch vor und es wird kein intensiveres Signal an den Knospungsstellen beobachtet (Abbildung 30C). Vielmehr bilden sich schon nach 2 h erste Akkumulationen von WT und A53T α Syn-GFP, welche im Verlauf des Assays deutlich an Größe zunehmen. Es ist zudem erkennbar, dass die zellulären Akkumulationen der membranbindenden α Syn-GFP-Spezies primär aus dem Zellinneren heraus entstehen. Vergleichbar dazu weisen auch *vps34 Δ* -Stämme primär zytosolische Lokalisation aller α Syn-GFP-Isoformen auf (Abbildung 30D).

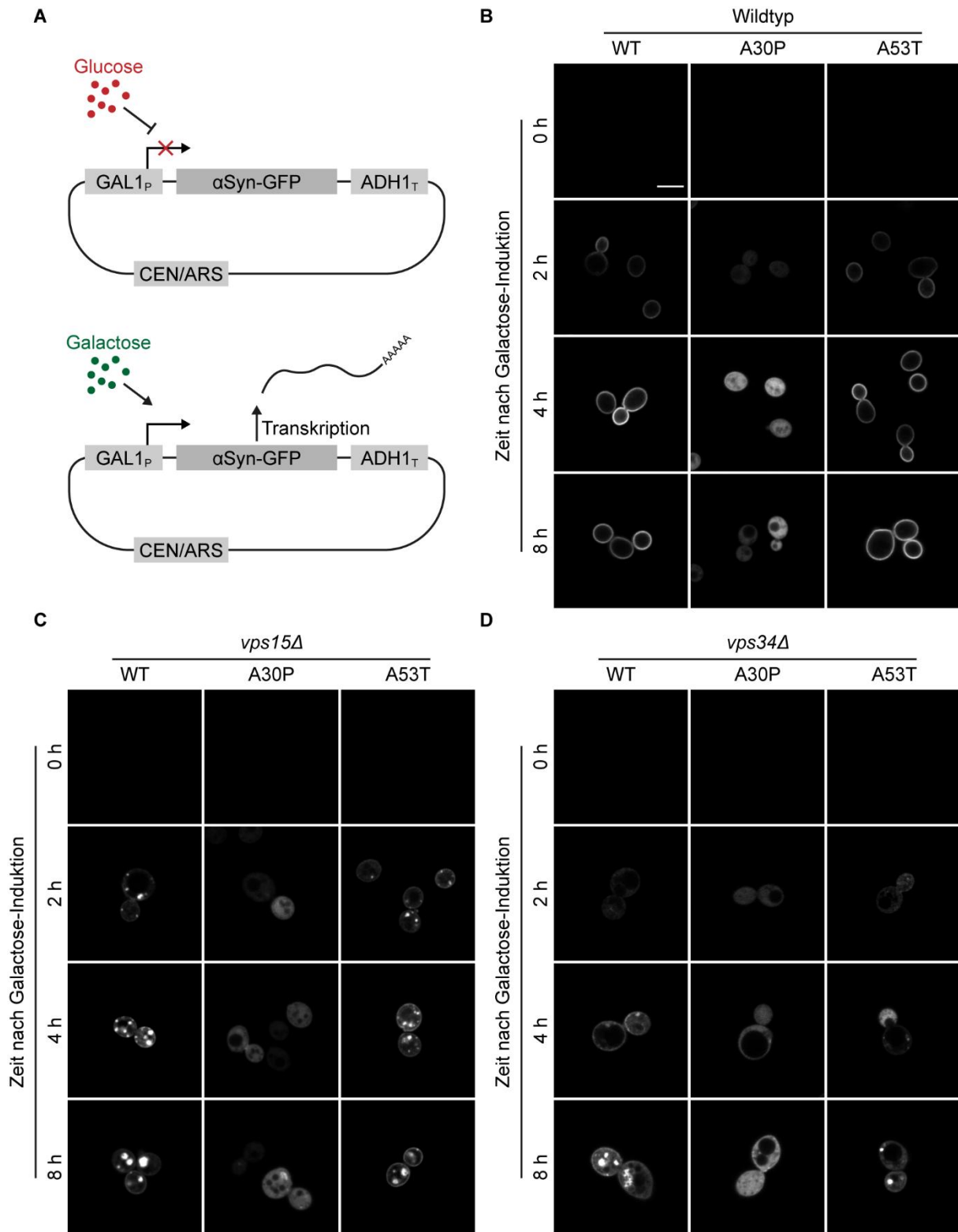


Abbildung 30: Die Akkumulationen membranbindender α Syn-GFP-Isoformen entstehen überwiegend aus dem Zellinneren heraus. **A:** Schematische Darstellung der GAL1-Promotorvermittelten Genexpression des verwendeten one-copy Plasmids. Das Plasmid-Rückgrat beinhaltet einen ADH1-Terminator und die CEN/ARS-Sequenz zur one-copy-Expression. Die Genexpression wird durch die Zugabe von Galactose induziert, während durch Glucose eine Katabolit-Repression vorliegt. **B-D:** Zeitaufgelöste Verfolgung der α Syn-GFP-Lokalisation im Wildtyp, *vps15Δ* und *vps34Δ* nach Galactose-abhängiger Induktion der Genexpression. Im Wildtyp werden WT und A53T α Syn-GFP bereits nach 2 h zu den Knospungsstellen neu entstehender Zellen transportiert. In den PI3K-Mutanten *vps15Δ* und *vps34Δ* entstehen zytoplasmatische Akkumulationen primär aus dem Inneren der Zelle. Maßstab: 5 μ m.

Auffällig ist hingegen, dass die zytoplasmatischen WT und A53T α Syn-GFP-Inklusionen in *vps34 Δ* erst nach etwa 8 h auftreten, während sie in *vps15 Δ* bereits nach 2 h sichtbar sind. Dies könnte durch den vergleichsweise langsameren Metabolismus von *vps34 Δ* erklärt werden, der möglicherweise eine verzögerte Reaktion auf die Veränderung der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Galactose zur Folge hat.

Die Analyse legt nahe, dass die C-terminal fusionierten WT und A53T α Syn-GFP-Konstrukte ebenfalls über den sekretorischen Weg zu Knospungsstellen an der PM transportiert werden (Dixon et al., 2005). Während dieser Transportweg bereits zuvor beschrieben wurde, zeigen die vorliegenden Ergebnisse erstmals, dass er nicht nur von der Membranbindungsfähigkeit von α Syn-GFP, sondern auch von einer intakten PI3P-Biosynthese abhängig ist.

4.2 Membranbindendes α Syn beeinflusst die Morphologie endosomaler Vesikel

Da der Transport von PI3P von hoher Relevanz für endosomales Recycling zur PM ist (Giridharan et al., 2022; Steinfeld et al., 2021) und das Fehlen der PI3K Vps34 eine Mislokalisierung von membranbindenden α Syn-GFP-Spezies verursacht, sollte untersucht werden, ob die Expression von α Syn-GFP in Wildtyp-Zellen einen Einfluss auf die Anzahl bzw. Verteilung PI3P-haltiger Vesikel hat. Zu diesem Zweck wurden α Syn-GFP-exprimierende Wildtyp-Stämme mit dem PI3P-Reporter mRFP-2xFYVE transformiert und PI3P-positive Strukturen anschließend mikroskopisch untersucht. Die EV-Kontrolle bestätigt, dass PI3P in Zellen ohne α Syn-GFP-Expression vornehmlich an der Vakuole und an endosomalen Strukturen lokalisiert ist (Abbildung 31A). Ein deutlicher Unterschied zeigt sich bei der Expression von WT und A53T α Syn-GFP. Die Expression dieser membranbindenden α Syn-GFP-Isoformen führt zu einer Anhäufung kleiner PI3P-positiver Puncta und einer Reduktion großer Vesikel. Um diese Effekte quantitativ zu vergleichen, wurden die PI3P-positiven Strukturen in große Vesikel ($\geq 1 \mu\text{m}$), kleine Vesikel ($< 1 \mu\text{m}$) sowie punktierte und damit vermutlich endosomale Strukturen untergliedert. Die Quantifizierung der mikroskopischen Analysen zeigt, dass in der EV-Kontrolle das Zahlenverhältnis kleiner Vesikel, großer Vesikel und Puncta annähernd gleich ist. So bilden jeweils etwa 30-35 % der PI3P-positiven Strukturen kleine und große Vesikel, während rund 35 % als Puncta vorliegen (Abbildung 31B). Ein vergleichbares Verhältnis wird auch in A30P α Syn-GFP-exprimierenden Stämmen beobachtet, die zu jeweils 33 % große und kleine Vesikel sowie zu etwa 35 % Puncta aufweisen. Dagegen führt die Expression der membranbindenden α Syn-GFP-Spezies zu einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses zugunsten zellulärer Puncta. In WT α Syn-GFP-Stämmen bestehen etwa 69 % der PI3P-positiven Strukturen aus Puncta, 22 % aus kleinen Vesikeln und 8 % aus großen Vesikeln; in A53T α Syn-GFP-Stämmen liegt der Anteil bei 68 % Puncta, 21 % kleinen Vesikeln und 10 % großen Vesikeln. Insgesamt weist die Analyse darauf hin, dass die Expression membranbindender α Syn-Spezies insbesondere eine Verschiebung

von großen Vesikeln hin zu Puncta bewirkt, da in diesen Strukturen die deutlichsten Veränderungen auftreten.

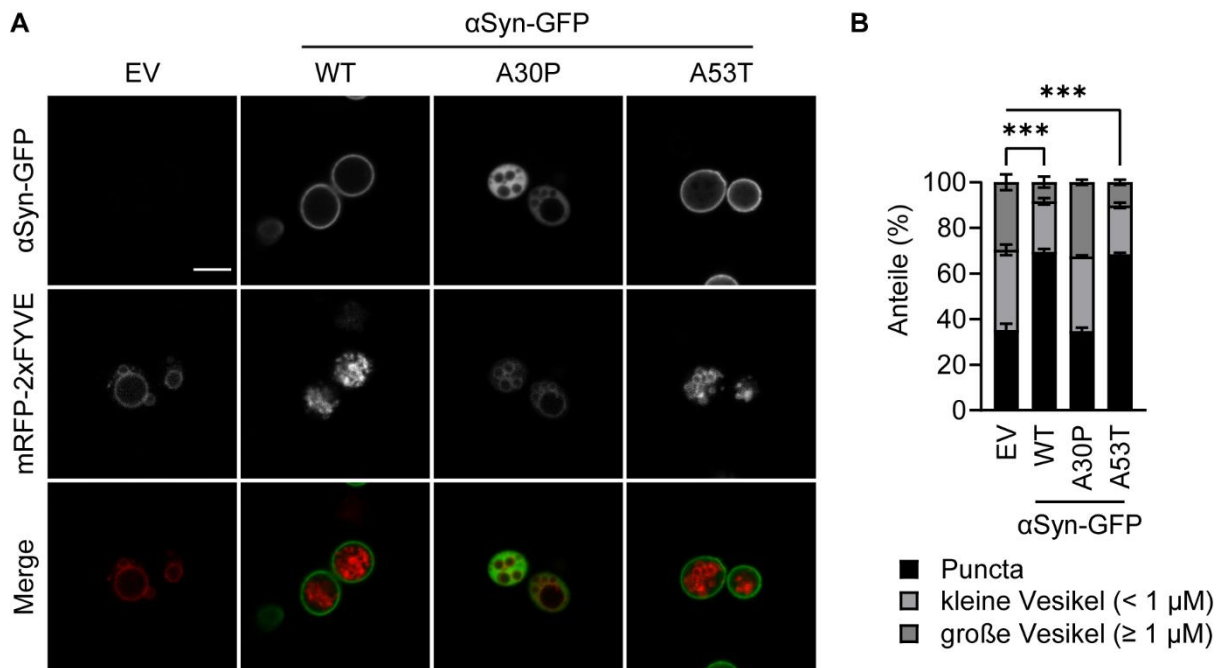


Abbildung 31: PM-lokalisierende αSyn-GFP-Spezies beeinflussen PI3P-positive Strukturen. A: Colokalisation von WT, A30P bzw. A53T αSyn-GFP mit PI3P-positiven Strukturen im Wildtyp. Maßstab: 5 μm. **B:** Quantifizierung der Anteile großer und kleiner Vesikel sowie punktierter Strukturen in den mikroskopischen Daten aus **A**. Die Expression von WT und A53T αSyn-GFP führt zu einem Anstieg punktierter PI3P-haltiger Strukturen von 30 auf über 60%. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 (>100 Zellen pro n) ± Standardabweichung. ***p < 0,001.

Die deutliche Zunahme punktierter PI3P-haltiger Strukturen durch die Expression von WT und A53T αSyn-GFP könnte auf eine erhöhte Mobilisierung endosomaler Vesikel hinweisen, die den Transport zur PM beschleunigen. Dies wird von Analysen gestützt, die zeigen, dass eine erhöhte PI3P-Biosynthese einen positiven Einfluss auf retrograde Membrantransport-Prozesse hat (Steinfeld et al., 2021). Gleichzeitig könnte es auch ein kompensatorischer Effekt sein, um αSyn-GFP-vermittelten Transport- bzw. Fusionsdefekten entgegenzuwirken. Um dies besser zu verstehen, wurde im nächsten Schritt potenzielle Effekte auf Proteine des sekretorischen Wegs untersucht.

4.3 WT und A53T αSyn erhöht SEC4-Expression und colokalisiert mit Sec4

Um zu überprüfen, ob die Expression membranbindender αSyn-GFP-Spezies einen Einfluss auf den sekretorischen Weg hat, wurden mithilfe von quantitativer RT-PCR die Expressionslevel der endogenen sekretorischen Gene *SEC4*, *SEC9* und *SEC14* in WT, A30P und A53T αSyn-GFP-exprimierenden Wildtyp-Stämmen untersucht. Die Rab GTPase Sec4 und das PM-lokalisierte t-SNARE Protein Sec9 wurden ausgewählt, da sie direkt am Transport und der Fusion sekretorischer Vesikel an der Zellknospe beteiligt sind (Brennwald et al., 1994; Geng et al., 2010; Guo et al., 1999). Sec14 ist ein zytosolisches PL-Transportprotein, das insbesondere dem Membrantransfer von PC und PI innerhalb des Golgi-Apparats dient und

nicht an der Fusion sekretorischer Vesikel mit der PM beteiligt ist (Mousley et al., 2008). Es wird deutlich, dass die Expression von WT und A53T α Syn-GFP zu einem etwa 1,8-fachen Anstieg der *SEC4*-Expressionslevel führt (Abbildung 32A). Im A30P α Syn-GFP-exprimierenden Wildtyp entspricht das *SEC4*-Expressionsniveau dem der EV-Kontrolle. Für *SEC9* wird bei keiner der untersuchten α Syn-GFP-Spezies ein signifikanter Anstieg der mRNA-Level festgestellt. Lediglich in WT und A53T α Syn-GFP steigt die *SEC9*-Transkriptmenge zwar um 34% bzw. 30%, dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant. Auch für *SEC14* wird keine signifikant veränderte Expression durch α Syn-GFP nachgewiesen.

Anschließend sollte außerdem die Lokalisation der jeweiligen Sec-Proteine in α Syn-GFP-exprimierenden Zellen untersucht werden. Hierfür wurden one-copy Plasmide erstellt, welche die N-terminal markierten mRUBY2-Fusionskonstrukte mRUBY2-Sec4, mRUBY2-Sec9 und mRUBY2-Sec14 exprimieren. Diese Proteine wurden gleichzeitig mit den jeweiligen α Syn-Spezies exprimiert und die Lokalisation mit dem EV verglichen. mRUBY2-Sec4 liegt in der EV-Kontrolle teilweise zytoplasmatisch aber primär nahe der PM an entstehenden Knospungsstellen vor (Abbildung 32B). Es ist auffällig, dass bei α Syn-GFP-Expression insbesondere WT und A53T α Syn-GFP mit mRUBY2-Sec4 ebenfalls nahe der PM colokalisiert, sich dort jedoch große α Syn- und Sec4-haltige Akkumulationen bilden. Ein ähnlich ausgeprägter Effekt kann nicht durch die Expression von A30P α Syn-GFP beobachtet werden. mRUBY2-Sec9 liegt in der EV-Kontrolle insbesondere in punktierten Strukturen an der PM vor und keine der α Syn-GFP-Spezies hat einen Einfluss auf dessen Lokalisation (Abbildung 32C). Da die Expression von α Syn-GFP auch das gesamte Erscheinungsbild der Zellen sichtbar macht, lässt sich erkennen, dass Sec9 ebenfalls überwiegend an den Übergangsbereichen zu den entstehenden Tochterzellen lokalisiert ist. mRUBY2-Sec14 zeigt ein diffuses zytoplasmatisches Signal, und in Übereinstimmung mit den qPCR-Daten hat die Expression von WT, A30P und A53T α Syn-GFP keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von mRUBY2-Sec14.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Untersuchung, dass von den analysierten Proteinen ausschließlich Sec4 direkt mit membranbindenden α Syn-GFP-Spezies – bzw. α Syn-GFP-positiven Vesikeln – in den terminalen Schritten der Vesikelsekretion in Richtung der Knospungsstelle colokalisiert. Bei diesen Vesikeln handelt es sich höchstwahrscheinlich um spät-sekretorische Vesikel, die in Richtung des Exocyst-Komplexes transportiert werden. Die Ausbildung großer Akkumulationen in unmittelbarer Nähe der Knospungsstellen deutet zudem darauf hin, dass eine gleichzeitige Überexpression beider Komponenten die effiziente Vesikelfusion mit der PM beeinträchtigen kann.

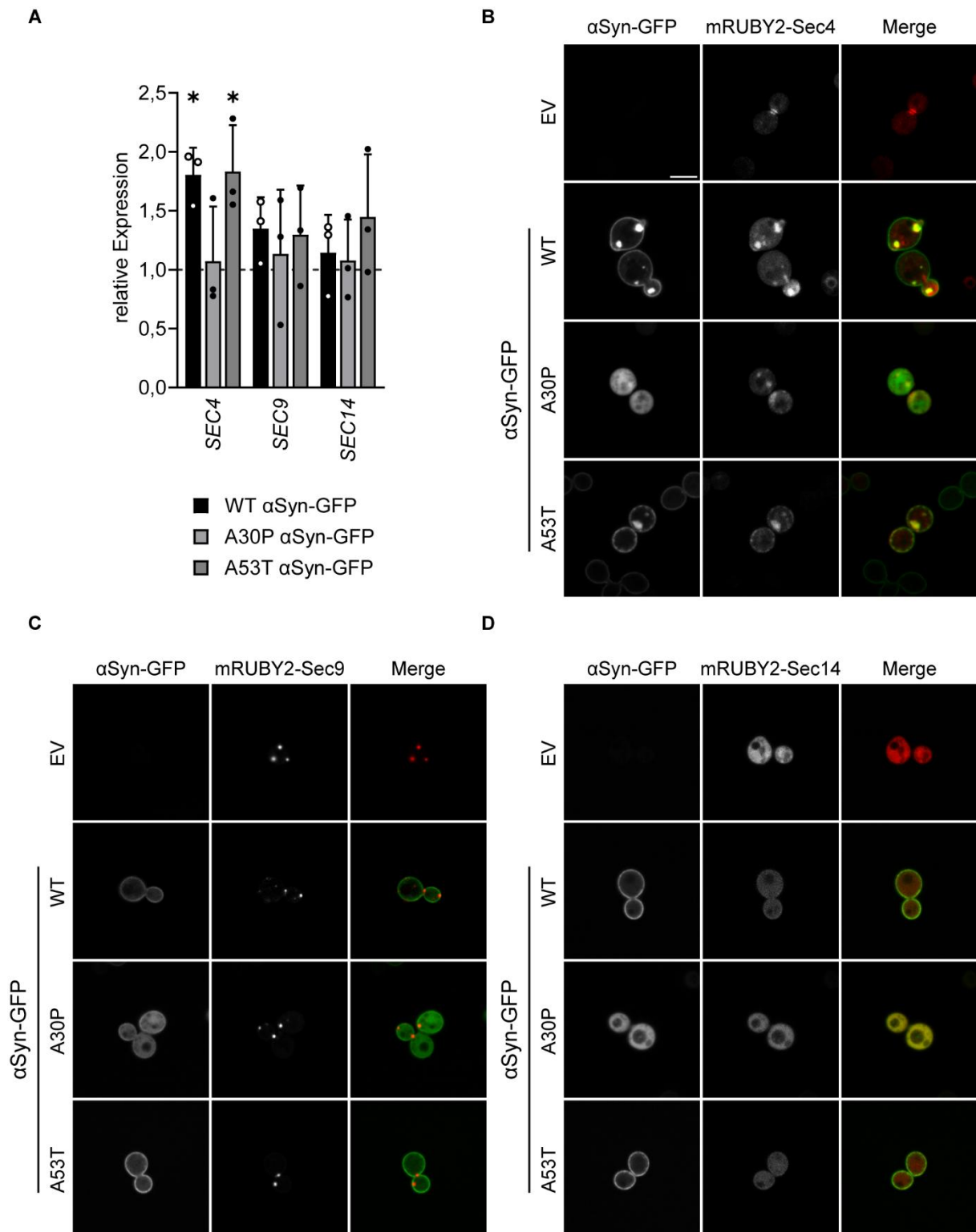


Abbildung 32: WT und A53T α Syn-GFP beeinflussen den sekretorischen Weg und kolokalisieren mit dem RAB3A-Ortholog Sec4. qPCR-Analyse der Transkriptlevel von *SEC4*, *SEC9* und *SEC14* in α Syn-GFP-exprimierenden Wildtyp-Stämmen. Die Expressionslevel wurden auf die Werte der EV-Kontrolle (= 1) normiert. Die mRNA-Level von *SEC4* werden durch die Expression von WT und A53T α Syn-GFP nahezu verdoppelt. Dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte ($n = 3$) und der Mittelwert + Standardabweichung. **B:** Mikroskopische Lokalisation der mRUBY2-markierten Sekretions-Proteine Sec4, Sec9 und Sec14 in Wildtyp-Stämmen, welche die α Syn-GFP-Isoformen (WT, A30P und A53T) oder die EV-Kontrolle beinhalten. mRUBY2-Sec4 kolokalisiert mit membranbindenden α Syn-GFP-Spezies nahe der PM an den Knospungsstellen sich teilender Zellen. Maßstab: 5 μ m.

Diskussion

Seit der Erstcharakterisierung von PD durch James Parkinson (1817) hat sich das Verständnis der pathologischen Mechanismen, welche der Krankheit zugrunde liegen, kontinuierlich erweitert (Parkinson, 2002 [1817]). Besonders in den vergangenen 60 Jahren wurde der Fokus auf molekularbiologische Grundlagen gerichtet, um Risikofaktoren zu identifizieren und potenzielle Therapieansätze zur Intervention und Behandlung – nicht nur von PD, sondern allgemein von Synucleinopathien – zu entwickeln. Dabei konnten zahlreiche genetische und umweltbedingte Risikofaktoren beschrieben werden, die die Degeneration dopaminerger Neuronen in der SNpc begünstigen. Mutationen in Genen wie *LRRK2*, *PINK1* und *PRKN* weisen dabei insbesondere auf pathogene Prozesse unterschiedlichen Ursprungs hin, darunter Störungen im Vesikeltransport, in der mitochondrialen Funktion oder im generellen Lipidstoffwechsel (Barbuti et al., 2025; Dugger et al., 2014; Pankratz & Foroud, 2007; Simón-Sánchez et al., 2009).

Trotz der vielfältigen Risikofaktoren steht α Syn meist im Zentrum der PD-Pathogenese. Die Fehlfaltung, toxische Oligomerisierung sowie die pathologische Interaktion mit Lipiden in membranassoziierten Prozessen bilden einen gemeinsamen Nenner vieler Krankheitsausprägungen; sowohl bei idiopathischen als auch genetisch bedingten Formen (Danzer et al., 2009; Miraglia et al., 2018; Spillantini et al., 1997). Da die Rolle von Lipiden in der α Syn-Pathologie zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist die Untersuchung von α Syn-Lipid-Interaktionen in der PD-Entwicklung unerlässlich. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit *S. cerevisiae* als Modellorganismus verwendet, um das Verhalten des humanen α Syn-Proteins in einer sich ändernden Lipidumgebung näher zu untersuchen. Die Bäckerhefe bietet ein viables System, um zu untersuchen, wie Veränderungen der Lipidbindeeigenschaften von α Syn hoch konservierte zelluläre Prozesse wie die Proteinqualitätskontrolle oder die Sekretionsmaschinerie beeinflussen können und wie sich α Syn innerhalb einer vereinfachten eukaryotischen Zelle verhält.

1. N-terminale Helix bestimmt Membranassoziation von α Syn

Die Grundlage der Untersuchung von α Syn in *S. cerevisiae* bildete eine initiale Charakterisierung der verwendeten α Syn-Isoformen und deren Lokalisation innerhalb der Wildtyp-Zelle sowie eine Untersuchung der dosisabhängigen Zytotoxizität des Proteins. Da Outeiro und Lindquist die verwendeten C-terminal markierten GFP-Fusionskonstrukte erstmals im Jahr 2003 in *S. cerevisiae* eingesetzt haben, wurden die Analysen vergleichend zur bestehenden Literatur durchgeführt (Outeiro & Lindquist, 2003). Alle verwendeten α Syn-GFP-Isoformen zeigten die in der Literatur beschriebenen Effekte, wie die PM-Lokalisation und dosisabhängige Zytotoxizität der membranbindenden α Syn-GFP-Isoformen WT und A53T sowie eine zytosolische Lokalisation und verminderte Zytotoxizität der A30P-Isoform (siehe

Ergebnisse, Abbildung 12 und 13) (Outeiro & Lindquist, 2003; Petroi et al., 2012; Sampaio-Marques et al., 2012). Die unterschiedlichen Lokalisationen der beiden PD-relevanten α Syn-GFP-Spezies zeigen, wie das Hefemodell verwendet werden kann, um komplexe mutationsbedingte Effekte auf die vereinfachte Fragestellung zu reduzieren, ob eine Membranbindung möglich ist oder nicht. Diese Unterteilung spielt auch eine wichtige Rolle in der Charakterisierung neu entdeckter PD-relevanter α Syn-Mutationen. Alle bislang bekannten α Syn-Mutationen, die mit der Entstehung von PD in Verbindung stehen, sind in den ersten 60 Aminosäuren, also dem lipidbindenden N-Terminus lokalisiert (C. Liu et al., 2021; Ruf et al., 2019).

Darunter existieren einige PD-relevante Mutationen, welche die Membranbindung nicht beeinflussen oder sogar verstärken. Dazu zählen E46K, H50Q und die hier untersuchte A53T-Mutation (Bodner et al., 2010; Guo et al., 2021). Da Lysinreste in KTKEGV-Motiven hauptsächlich für die Vermittlung der Bindung an anionischen Lipid-Kopfgruppen verantwortlich sind, erzeugt beispielsweise die Einführung von K46 eine höhere Affinität zu negativ geladenen, stark gekrümmten Membranen, ähnlich den synaptischen Vesikeln (Rovere et al., 2019). Alanin und Threonin stellen Reste unterschiedlicher Polarität dar, aber sind kurzketzig und unverzweigt und weisen daher eine sehr ähnliche räumliche Struktur auf. Daher wird die Membranbindung auch nicht bzw. nur wenig von der A53T-Mutation beeinflusst, weshalb das Protein an der PM von *S. cerevisiae* lokalisiert wird (Abbildung 33A und B) (Bodner et al., 2010; Burré et al., 2012). Dies konnte mithilfe der *in silico* Strukturanalyse (ColabFold) im Rahmen dieser Arbeit nachvollzogen werden (siehe Ergebnisse, Abbildung 11) und ist zudem nicht überraschend, da die Aminosäure an Position 53 innerhalb der Helix sehr wahrscheinlich Lösungsmittel-zugewandt vorliegt. Diese Annahme basiert auf „site-directed spin labeling“-Daten, die belegen, dass die unmittelbar davor liegenden Aminosäuren G51 und G52 gleichermaßen der Lipid-Seite zugewandt sind und eine vollständige Helixumdrehung in der Regel aus 3,6 Aminosäuren besteht (Jao et al., 2004).

Auf der anderen Seite existieren Mutationen wie A30P und G51D. Diese verändern durch die Einführung chemisch und strukturell unterschiedlicher Aminosäurereste die Form des Peptidrückgrats und haben nachweislich einen negativen Einfluss auf die Integrität der Proteinhelix (Fares et al., 2014; Ulmer & Bax, 2005). Die durchgeführte *in silico* Strukturanalyse der A30P-Mutante konnte dabei klar aufzeigen, wie die besondere Form von Prolin die Ausrichtung Wasserstoffbrücken-bildender Gruppen beeinflusst und damit die Helix auflöst (Abbildung 33C). Durch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) wurde bereits nachgewiesen, dass die Einführung der A30P-Mutation zum Bruch einer vollständigen Helixwindung (V26-A29) und zur Destabilisierung der vorhergehenden Windung (T22-G25) führt (Ulmer & Bax, 2005). Zudem konnte durch „site-directed spin labeling“ gezeigt werden, dass die Aminosäure an Position 30 der gebundenen Membran zugerichtet ist. In *S. cerevisiae*

lokalisieren sowohl die A30P-, als auch die G51D α Syn-Isoform zudem zytoplasmatisch und haben einen geringeren Effekt auf die Wachstumsrate des Organismus als beispielsweise die WT-Isoform oder die A53T-Mutante (Fares et al., 2014).

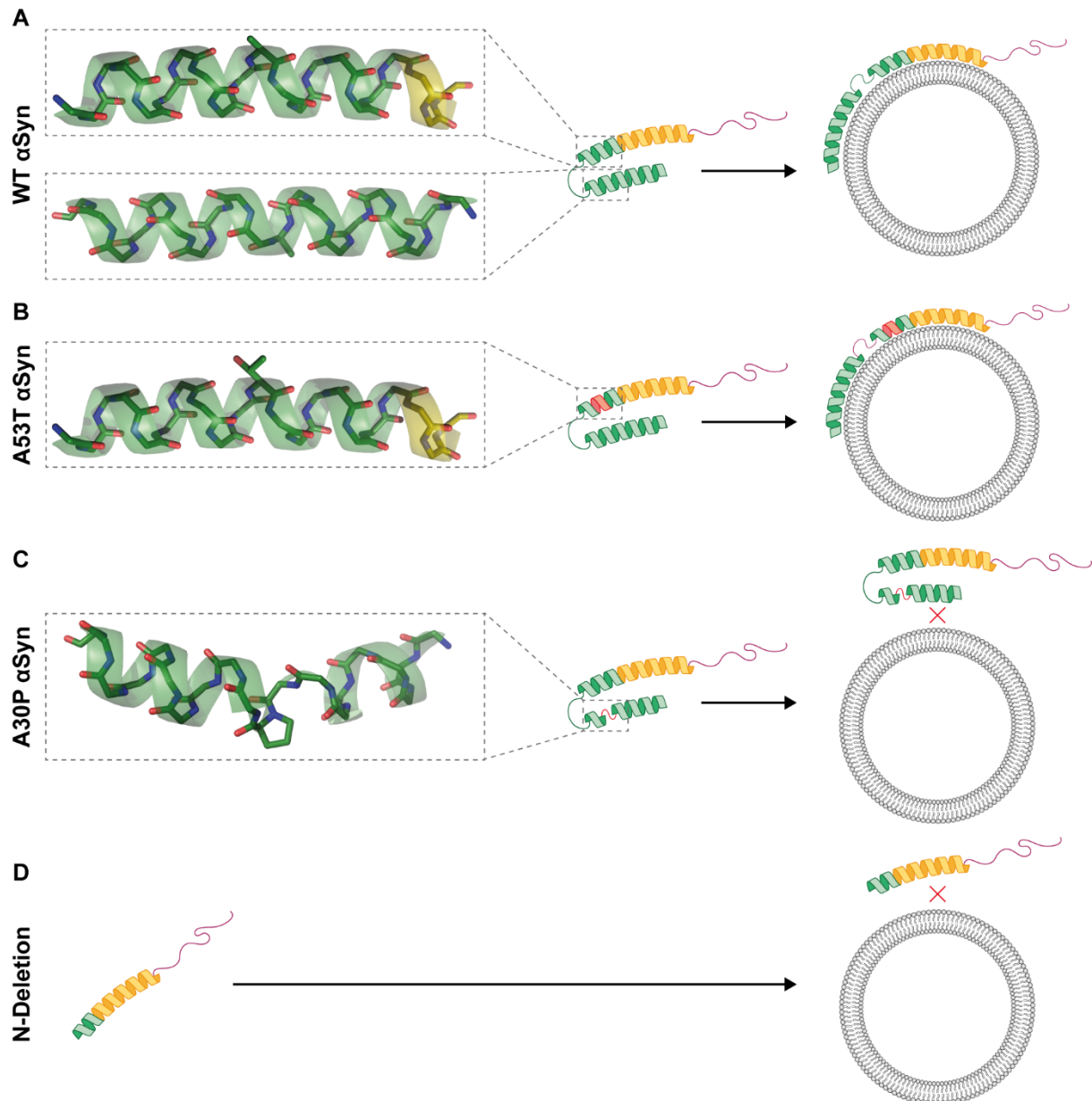


Abbildung 33: Die Stabilität der N-terminalen α -Helix bestimmt die Membran-Bindeeigenschaften von α Syn. Schematische Darstellung des Membran-Bindevorgangs der WT, A53T, A30P und N-terminal deletierten α Syn-Spezies. In den Detailansichten (links) bei WT, A53T und A30P α Syn ist das Peptidrückgrad dargestellt, wobei an Position 30 und 53 zudem der jeweilige Aminosäurerest abgebildet ist. **A und B:** WT und A53T α Syn bilden eine N-terminale Helix aus, welche bis in die NAC-Domäne (gelb) reicht. Diese α Syn-Spezies sind daher in der Lage, an Lipidmembranen zu binden (Bodner et al., 2010). **C:** Die Einführung eines Prolins an Aminosäure 30 in A30P α Syn unterbricht die α -Helix für mindestens eine Umdrehung und verhindert daher das Binden von α Syn an Lipidvesikel (Ulmer & Bax, 2005). **D:** Deletionen des N-Terminus verhindern ebenfalls das Binden des Proteins an Lipidmembranen.

Zusätzliche Deletionen gesamter N-terminaler Regionen konnten zeigen, dass ein intakter N-Terminus entscheidend für die Membranbindung des α Syn-Proteins ist (Abbildung 33D). Insbesondere die ersten 10-12 Aminosäuren stabilisieren die Membranbindung und allein der

Austausch von D2 durch einen Alaninrest hat bereits eine Verringerung der Membranaffinität zur Folge (Vamvaca et al., 2009). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die N-terminal trunkeierten Konstrukte, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wie auch die A30P-Variante nicht an der PM von *S. cerevisiae* lokalisieren (siehe Ergebnisse, Abbildung 12).

Nach der initialen Charakterisierung des α Syn-GFP-Proteins im Hefemodell lag der Fokus dieser Arbeit in erster Linie auf dem Einfluss von α Syn-GFP auf die Proteinqualitätskontrolle und die generelle Rolle Autophagie-relevanter Gene in der α Syn-Toxizität.

2. Autophagie-Regulation durch α Syn in *S. cerevisiae*

Die Untersuchung der autophagischen Aktivität ergab, dass weder die one-copy- noch die high-copy-Expression von α Syn-GFP einen substanziellen Einfluss auf Stickstoffmangel-induzierte Autophagie hat. So wurde bei allen α Syn-Varianten eine ähnliche Pho8-Aktivität wie in den EV-Kontrollen beobachtet (siehe Ergebnisse, Abbildung 15). Zudem war die zelluläre Lokalisation der α Syn-Spezies sowie die dosisabhängige Zytotoxizität in Autophagie-defizienten *atg1 Δ* -Stämmen vergleichbar mit den Beobachtungen in Wildtyp-Stämmen. In jungen, exponentiell wachsenden Zellen von *S. cerevisiae* ist dies zunächst nicht überraschend, da bereits gezeigt wurde, dass die Expression von α Syn zwar einen Anstieg des Autophagie-Adapterproteins Atg8, aber nicht der autophagischen Aktivität zur Folge hat (Sampaio-Marques et al., 2012; Tenreiro et al., 2014). Lediglich in gealterten, postmitotischen Zellen kann ein signifikanter Anstieg der Pho8-Aktivität, ausgelöst durch WT und A53T α Syn-GFP beobachtet werden (Sampaio-Marques et al., 2012). Interessanterweise hat die altersabhängige Autophagie-Induktion – insbesondere selektive Mitophagie – einen negativen Einfluss auf die chronologische Lebensspanne des Organismus (Sampaio-Marques et al., 2012). Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass stationäre Hefezellen nach Eintreten der sogenannten Diauxie von einem primär glykolytischen Metabolismus auf mitochondriale Respiration umschalten (Galdieri et al., 2010). Der übermäßige mitochondriale Abbau, welcher unter anderem durch die Hochregulation des Mitophagierezeptors Atg32 induziert wird, kann so ebenfalls funktionale mitochondriale Komponenten degradieren und schließlich zu Autophagie-abhängigem Zelltod führen (Li et al., 2021).

Offen bleibt zudem, warum der Einfluss von humanem α Syn in Hefezellen – ohne erkennbare Veränderungen in teilungsaktiven Zellen, jedoch mit erhöhter Aktivität in postmitotischen Zellen – deutlich von den Beobachtungen in anderen Systemen abweicht. In Neuronen von *Drosophila melanogaster* führt die Überexpression von α Syn zu einer beeinträchtigten autophagischen Aktivität, besonders der Mitophagie, und einer Akkumulation von Autophagosomen (Sarkar et al., 2021). In jungen PD-Modellen von *Caenorhabditis elegans* wird Autophagie durch α Syn-Expression zunächst induziert, wohingegen im Alter eine α Syn-abhängige Autophagie-Hemmung eintritt (Saha et al., 2015). In primären Maus-Mikroglia führt

extrazelluläres α Syn zu einer Autophagie-Inhibition und in Maushirnen sowie diversen Säugerzellmodellen wurde generell beobachtet, dass eine übermäßige α Syn-Expression zu einer RAB1A-abhängigen Fehllokalisation von ATG9 führt, wodurch die Autophagosomen-Biogenese beeinträchtigt wird (Tu et al., 2021; Winslow et al., 2010). Insgesamt zeigen diese Modelle im Gegensatz zu den in dieser Arbeit generierten Daten in *S. cerevisiae*, dass α Syn langfristig eher zu einer Autophagie-Inhibition als zu einer -Aktivierung führt.

Mögliche Gründe für diese abweichenden Effekte sind Gemeinsamkeiten der jeweiligen Modelle, die sie vom Hefemodell abgrenzen. Dazu zählen unter anderem die Differenzierung in bestimmte Zelltypen bzw. multizelluläre Gewebe, eine erhöhte Relevanz der mitochondrialen Atmungskette über den gesamten Entwicklungszyklus sowie die nachgewiesene Formierung toxischer α Syn-Oligomere und -Fibrillen in diesen Modellen (Dawson et al., 2010; Feany & Bender, 2000; Perni et al., 2021). In einzelligen Hefen wird die Respiration hingegen erst nach Eintreten der Diauxie in späten Wuchsphasen relevant und es wurden bislang keine fibrillären α Syn-Spezies in *S. cerevisiae* identifiziert (Soper et al., 2008). Zudem führen zahlreiche Studien die Autophagie-Inhibition in anderen Systemen auf eine pathologische Interaktion von α Syn mit dem lysosomalen Rezeptorprotein LAMP-2 zurück (Cuervo et al., 2004; Mak et al., 2010; Martinez-Vicente et al., 2008; Xilouri et al., 2009). In *S. cerevisiae* existiert kein Vakuolen-lokalisiertes LAMP-2-Ortholog, weshalb eine vergleichbare Interaktion nicht möglich ist.

Zusammenfassend ist die Untersuchung α Syn-vermittelter Autophagieeffekte in *S. cerevisiae* besonders in stationären Kulturen möglich. Die bedeutendsten Übereinstimmungen mit anderen Zellmodellen zeigen sich vor allem bei der Analyse selektiver Mitophagie in postmitotischen, atmungsaktiven Hefezellen (Sampaio-Marques et al., 2012).

3. Proteostase in *S. cerevisiae* unter α Syn-Expression

3.1 α Syn-abhängige Veränderungen der 26S-Proteasomaktivität

Die Untersuchung der Proteasomaktivität konnte hervorbringen, dass geringere Kopienzahlen von WT α Syn-GFP den Abbau von 26S-Substraten sowohl in Wildtyp- als auch *atg1Δ*-Stämmen erhöhen, wohingegen die Expression von high-copy-Plasmiden eine signifikante Inhibition des 26S-Proteasoms zur Folge hat (siehe Ergebnisse, Abbildung 16). Diese spezielle Form eines dosisabhängigen Effekts lässt sich in der Regel über den Begriff der Hormesis definieren. Hormesis wird beispielsweise beobachtet, wenn *S. cerevisiae* mit hoch reaktivem Wasserstoffperoxid behandelt wird. Bei einer Konzentration von 25 mM steigt die Lebensfähigkeit aufgrund einer aktivierten zellulären Stressantwort von Wildtyp-Zellen um bis zu 160% an, wohingegen bei 100 mM eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit beobachtet wird (Semchyshyn & Valishkevych, 2016).

Im Zusammenhang mit der Proteasom-Interaktion von α Syn ist bekannt, dass die proteasomale Inhibition in Hefen durch eine besonders starke Stabilisierung des Assemblierungs-Chaperons Rpn14 vermittelt wird (Galka et al., 2024; Saeki et al., 2009). Möglicherweise führt die one-copy-Expression von WT α Syn-GFP lediglich zu einer moderaten Stabilisierung von Rpn14 und unterstützt damit Aufbau und Integrität des Proteasoms. Auf diese Weise lässt sich die erhöhte Proteasom-Aktivität unter niedrigeren Expressionsbedingungen erklären, die bei high-copy-Expression jedoch in eine inhibierende Interaktion umschlägt. Ein alternativer Erklärungsansatz ist eine adaptive Stressantwort auf unterschiedliche α Syn-Expressionslevel. Hierbei würde die one-copy-Expression von α Syn einen milden Stressor darstellen, welcher die Aktivität der „unfolded protein response“ (dt. ungefaltete Proteinantwort) induziert. Diese Induktion schlägt in eine α Syn-vermittelte Inhibition um, wenn die Expressionslevel steigen und die übermäßige Stabilisierung von Rpn14 zu einer Behinderung der 26S-Assemblierung führt.

Beide Ansätze bieten potenzielle Erklärungen für die Proteasom-spezifischen Effekte, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, doch liefern keine Erklärung für ein Ausbleiben dieses potenziell hormetischen Prozesses bei Expression der PD-relevanten α Syn-GFP-Mutanten A30P und A53T. Insbesondere, da Outeiro und Lindquist (2003) zeigen konnten, dass die Expression jeder der drei α Syn-GFP-Spezies über zwei genomisch integrierte Kopien zu einer Anreicherung ubiquitinerter Proteine führt (Outeiro & Lindquist, 2003). Da der in dieser Arbeit verwendete Assay spezifisch für die Aktivität der 26S-Untereinheit ist und die Arbeit von Outeiro und Lindquist den gesamten UPS-Prozess betrachtet, ist es möglich, dass jede dieser α Syn-GFP-Spezies „upstream“-Prozesse des UPS inhibieren kann, doch nur WT α Syn-GFP eine spezifische Rpn14-abhängige Inhibition des Chymotrypsin-artigen Abbaus hervorruft (Galka et al., 2024).

Die Membranbindeigenschaften von α Syn-GFP spielen bei der Rpn14-abhängigen Inhibition durch WT α Syn-GFP vermutlich eine untergeordnete Rolle, da sonst ein ähnlicher Effekt in der A53T α Syn-GFP-Isoform beobachtet werden würde (siehe Ergebnisse, Abbildung 16). Da die Proteasom-Aktivität durch α Syn-GFP-vermittelte Rpn14-Interaktion beeinflusst wird, ist es möglich, dass A30P und A53T α Syn-GFP nicht mit Rpn14 interagieren. Untersuchungen zeigen, dass die A30P- und A53T-Isoformen von α Syn *in vitro* schneller nicht-fibrilläre Oligomere bilden und in höheren oligomeren Konzentrationen vorliegen als die WT-Variante. (Conway et al., 2000; Iljina et al., 2018). Möglicherweise setzt die Rpn14-Stabilisierung monomere α Syn-Spezies voraus, welche bei den PD-relevanten Spezies in geringeren Mengen vorliegen. Bislang liegen keine Daten zum Oligomerisierungszustand von α Syn in *S. cerevisiae* vor, weshalb dieser Erklärungsansatz weiterer Experimente bedarf.

Eine alternative Hypothese ist, dass insbesondere die Region, welche die Aminosäuren an Position 30 und 53 einschließt, für die Interaktion mit Rpn14 benötigt wird. Obwohl der C-

Terminus als Protein-interagierende Domäne von α Syn gilt, vermitteln beispielsweise die ersten 65 Aminosäuren von α Syn neben der Membranbindung außerdem die Interaktion mit dem neuronalen Protein Synphilin-1 in Säugern, wobei die A30P-Mutation diese Bindung sogar verstärken kann (Neystat et al., 2002). Da bislang ebenfalls keine Daten zur genauen Interaktion von α Syn mit Rpn14 vorliegen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Ein mögliches Vorgehen wäre etwa ein Screening der Proteasomaktivität in weiteren N-terminalen α Syn-Mutanten, um die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede zwischen den WT-, A30P- und A53T-Isoformen besser einzuordnen.

3.2 Aggregation endogener Proteine durch membranbindende α Syn-Spezies

Unabhängig von Autophagie und 26S-Aktivität wurde eine Anreicherung hefeeigener Proteinaggregate, nicht aber von α Syn durch die high-copy-Expression von WT und A53T α Syn-GFP in Wildtyp- und *atg1 Δ* -Stämmen beobachtet (siehe Ergebnisse, Abbildung 17). Es ist zunächst nicht überraschend, dass α Syn-GFP bei diesen Expressionsleveln nicht aggregiert vorliegt, da sich auch die Lokalisation der jeweiligen α Syn-Spezies bei high-copy-Expression nicht verändert (Outeiro & Lindquist, 2003).

Die Aggregation endogener Proteine ist hingegen besonders interessant, da sie nicht mit einer Inhibition der Autophagie und nur im Fall von WT α Syn-GFP mit einer Inhibition des Proteasoms zusammenhängen kann. Womöglich ist dieser Effekt zudem auf die Membran-Bindeeigenschaften von α Syn zurückzuführen, da die high-copy-Expression dieser WT und A53T- α Syn-Spezies auch in einer deutlichen Reduktion der Wachstumsrate resultiert (siehe Ergebnisse, Abbildung 13 und 14). Demnach stellt sich die Frage, ob es alternative zelluläre Mechanismen gibt, welche von membranbindenden α Syn-Spezies beeinflusst werden und möglicherweise im Zusammenhang mit Proteinaggregation und demnach der verringerten Wachstumsrate stehen.

Proteomanalysen von Popova et al. (2021) zeigen, dass die high-copy-Expression von WT α Syn nicht nur einen Einfluss auf Faktoren des Proteasoms wie Rpn14 hat, sondern unter anderem in einer Reduktion zahlreicher Proteine der mitochondrialen Funktionalität resultiert (Popova et al., 2021). Dazu zählen Enzyme der Elektronentransportkette, wie Cytochrom c-Untereinheiten und ATP-Synthase-Untereinheiten; des Citratzyklus, wie z.B. die Malat-Dehydrogenase und Malat-Synthase; sowie zahlreicher Membrantransporter, wie „translocase of the outer mitochondrial membrane 20“ (Tom20) und Tom40; und ribosomaler Untereinheiten, wie der „mitochondrial ribosomal protein-“ (Mrp-) und „ribosomal small subunit of mitochondria“ (Rsm-)Familien. Gleichzeitig wird ein Anstieg der iAAA-Protease-Superkomplex-Untereinheiten „yeast mitochondrial escape 1“ (Yme1) und „mitochondrial genome required 1“ (Mgr1) im Intermembranraum beobachtet. Diese mitochondriale Beeinträchtigung, kombiniert mit einer Reduktion von Hitzeschockchaperonen und

Disaggregasen, wie „heat shock protein 42“ (Hsp42) und Hsp104 sowie zahlreicher antioxidativer Peroxiredoxine, Thioredoxine und Superoxid-Dismutasen bietet einen Erklärungsansatz für die erhöhte Menge aggregierter Proteine, die in dieser Arbeit beobachtet wurden.

Obwohl diese Daten ausschließlich aus WT α Syn-exprimierenden Stämmen generiert wurden, ist es denkbar, dass diese mitochondrialen Effekte auch bei Expression der A53T-Isoform vorliegen. So wird die α Syn-Expression beider α Syn-Spezies in *S. cerevisiae*, wie bereits beschrieben, häufig mit mitochondrialen Effekten in Verbindung gebracht. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sowohl WT als auch A53T α Syn die mitochondriale ROS-Last, und demnach den oxidativen Stress in *S. cerevisiae* deutlich erhöhen und in gealterten Zellen insbesondere Mitophagie signifikant gesteigert ist (Büttner et al., 2008; Sampaio-Marques et al., 2012). Zudem schützt ein Verlust der respiratorischen Aktivität in atmungsdefizienten ρ^0 -Stämmen die Zellen vor WT und A53T α Syn-induziertem Zelltod (Büttner et al., 2008). Dieser Mitochondrien-abhängige Effekt bietet einen Erklärungsansatz für die erhöhte Aggregation hefeeigener Proteine bei Expression membranbindender α Syn-Spezies.

3.3 Stabilität von α Syn im Cycloheximid-Assay

Letztlich konnte durch Cycloheximid gezeigt werden, dass α Syn-GFP bei Translationsstopp nicht abgebaut wird, sondern über mindestens 24 h stabil in der Zelle verbleibt (siehe Ergebnisse, Abbildung 18). Hierbei gilt zu beachten, dass ein solcher Cycloheximid-Assay in der Regel genutzt wird, um sehr instabile Proteine, oder Proteine mit hoher „turn-over“-Rate zu identifizieren bzw. deren Abbau zu verfolgen. Humanes α Syn-GFP weist hingegen keine eindeutigen Signalsequenzen für den gerichteten Abbau auf. Dazu zählen Ubiquitinierungsstellen für den proteasomalen Abbau (Wang et al., 2022), wie auch eine Degron-Sequenz für den ERAD-spezifischen Abbau (Szulc & Pokrzywa, 2025; Szulc et al., 2024). Außerdem stellt α Syn ein zwar ungeordnetes, aber intrinsisch sehr stabiles Protein dar. Auch in Säugerzellen liegt α Syn stabil vor und insbesondere WT α Syn kann sogar Lipid droplets vor der Hydrolyse schützen (Cole et al., 2002; Li et al., 2004; McCormack et al., 2010).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Expression von α Syn-GFP in teilungsaktiven, glykolytisch wachsenden Hefezellen keinen wesentlichen Einfluss auf die autophagische Maschinerie ausübt. Gleichzeitig wird das Ubiquitin-Proteasom-System ausschließlich durch die Interaktion von WT α Syn-GFP mit dem Proteasom-Assemblierungsfaktor Rpn14 dosisabhängig beeinflusst (Galka et al., 2024). Auffällig ist zudem die Bildung zelleigener Proteinaggregate bei Expression von WT und A53T α Syn-GFP, die möglicherweise durch α Syn-abhängige Beeinträchtigung mitochondrialer Funktionen sowie einer Herunterregulation antioxidativer und disaggregierender Enzyme induziert wird (zusammengefasst in Abbildung

34). Diese Veränderungen wirken sich sowohl auf das Zellwachstum als auch auf die chronologische Lebensspanne von *S. cerevisiae* aus, da insbesondere in postmitotischen, respiratorisch aktiven Zellen eine erhöhte Mitophagie zu Autophagie-abhängigem Zelltod führen kann.

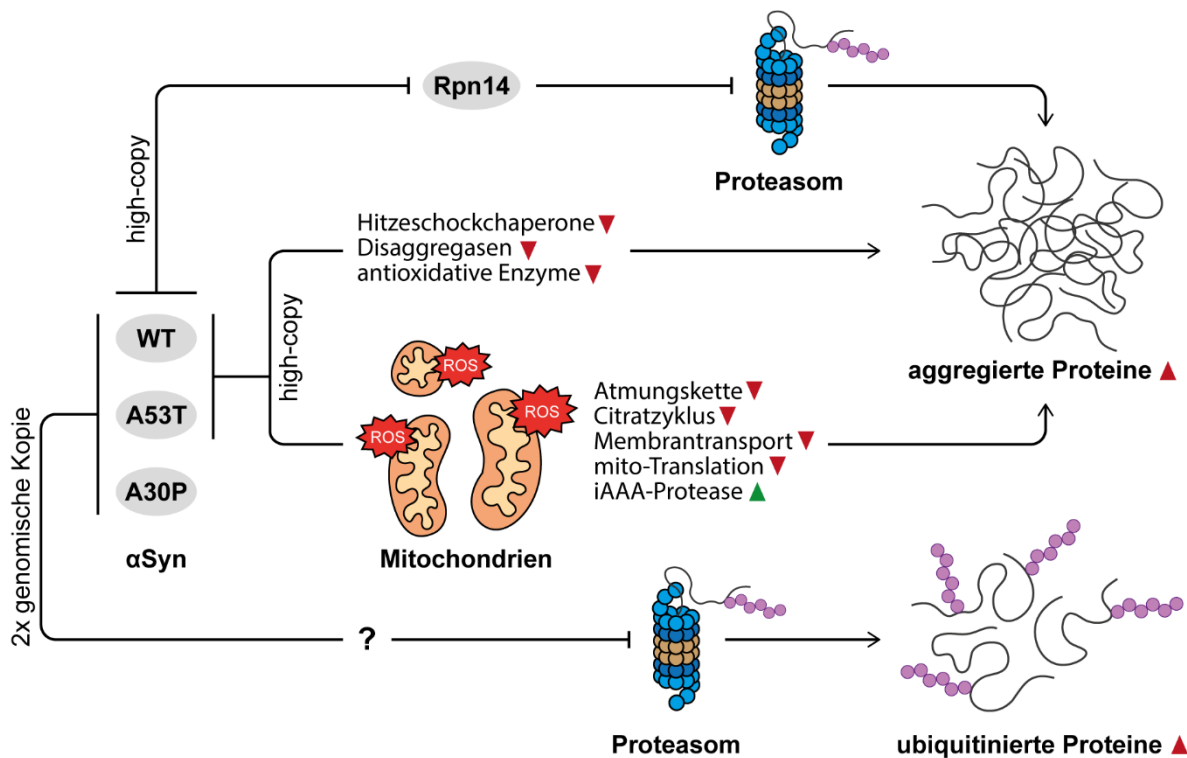


Abbildung 34: α Syn beeinflusst Komponenten der zellulären Proteostase über unterschiedliche Mechanismen. Schematische Zusammenfassung der in dieser Arbeit generierten Daten sowie der aktuellen Literatur bezüglich der Auswirkungen von α Syn-Expression auf zelluläre Mechanismen, die eine Anreicherung aggregierter bzw. ubiquitinierten Proteine zur Folge haben. Die high-copy-Expression von WT α Syn inhibiert die Proteasom-Assemblierung durch Interaktion von α Syn mit Rpn14 (Galka et al., 2024), was möglicherweise zur in dieser Arbeit beobachteten Anreicherung aggregierter Proteine beiträgt. Die high-copy-Expression der beiden membranbindenden α Syn-Spezies WT und A53T reduziert die Menge an Proteinen der Stressantwort und reduziert zudem Proteine des mitochondrialen Metabolismus, was zusammen mit einer erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die Bildung aggregierter Proteine beschleunigt und dem Abbau dieser Aggregate entgegenwirkt (Popova et al., 2021). Außerdem hat die doppelte genomische Integration aller α Syn-Spezies die Anreicherung ubiquitinierten Proteins zur Folge, möglicherweise durch Inhibition von „upstream“-Prozessen der Proteasomfunktionalität (Outeiro & Lindquist, 2003).

4. Modell eines PI3P- und PI3,5P2-vermittelten α Syn-Transports zur PM

Ein essenzieller Bestandteil dieser Arbeit lag auf der Rolle des PIP-Metabolismus und des intrazellulären Vesikeltransports für die Lokalisation und Toxizität von α Syn-GFP. Dies ergab sich aus der Beobachtung, dass Deletionen des katalytischen Zentrums des PI3K-Komplexes (*vps15 Δ* bzw. *vps34 Δ*) mit einer Reduktion der Wachstumsrate und einer zytoplasmatischen α Syn-GFP-Lokalisation mit großen GFP-positiven Inklusionen einhergehen (siehe Ergebnisse, Abbildung 19, 20 und 22). Aus den vorliegenden Daten wurde ein hypothetisches Modell des PIP-abhängigen α Syn-GFP-Transports entwickelt, das im Folgenden diskutiert wird.

4.1 PI3P als Eintrittspunkt für den membranabhängigen Transport von α Syn

Die Synthese von α Syn-GFP erfolgt mutmaßlich an freien Ribosomen im Zytosol, da α Syn nicht über ein „signal recognition particle“ (SRP)-Signalpeptid verfügt (Grudnik et al., 2009). Dort interagieren ausschließlich die membranbindenden WT und A53T-Spezies mit PI3P-haltigen Strukturen endosomalen Ursprungs, nicht aber die A30P-Isoform oder N-terminal trunkierte α Syn-GFP-Konstrukte. Die Bindung an PI3P-haltige Vesikel wird durch die zytoplasmatische Lokalisation dieser α Syn-GFP-Spezies in *vps15 Δ* und *vps34 Δ* -Stämmen belegt, im Gegensatz zur PM-Lokalisation in Wildtyp-Stämmen (siehe Ergebnisse, Abbildung 20). Die PM-Lokalisation von WT α Syn-GFP in PI3K-Komplex I-defizienten *atg14 Δ* -Stämmen belegt zudem die Notwendigkeit der endosomal lokalisierten PI3P-Biosynthese durch Komplex II und nicht der für Autophagie benötigten PAS-Lokalisation von Komplex I (siehe Ergebnisse, Abbildung 26). Dies hängt insbesondere damit zusammen, dass Atg14 essenziell für die Lokalisation der PI3K zur PAS ist, während endosomale PI3P-Biosynthese auch in Abwesenheit der strukturellen Komponenten Atg6 und Vps38 möglich ist (Kihara et al., 2001).

Der Verlust von PI3P, verursacht durch die *VPS34*-Deletion, hat die Akkumulation lipidreicher, nicht-amyloider α Syn-GFP-Akkumulationen zur Folge (siehe Ergebnisse, Abbildung 23 und 24). Bei den Lipidspezies handelt es sich unter anderem um Membranen aus dem endozytotischen bzw. dem endosomalen Transportnetzwerk, wie die FM4-64-Färbung belegen konnte (siehe Ergebnisse, Abbildung 24) (Vida & Emr, 1995). In Bezug auf die zytoplasmatischen α Syn-Ablagerungen bei Synucleinopathien konnten einige Studien in Lewy-Körper-artigen Strukturen (z.B. „pale bodies“) nicht nur aggregierte α Syn-Spezies, sondern ebenfalls mitochondriale Bestandteile sowie Transportvesikel und generelle Lipidspezies nachweisen (Forno & Norville, 1976; Gai et al., 2000; Shahmoradian et al., 2019).

Die hohe Bindungsaffinität von α Syn für PI3P-haltige Vesikel ist nicht überraschend, da Protein-Lipid-Überlagerungstests zeigen konnten, dass α Syn in Bezug auf gängige membranbildende Lipide am stärksten mit PI3P und PI3,4,5P3 assoziiert (Choong et al., 2023). Proteinstabilitäts-Assays konnten zudem zeigen, dass eine erhöhte Expression von WT α Syn zu einer Stabilisierung des *Vps34*-Aktivators *Vps15* führt (Galka et al., 2024). Es ist nicht vollständig auszuschließen, dass der Verlust von PI3P einen generellen Zusammenbruch vesikulärer Transportmechanismen zur Folge hat und so die Mislokalisierung von α Syn-GFP in das Zytosol ausgelöst wird. Da insbesondere sekretorische Gene in der Regel essenziell sind, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Sekretion – wenn auch in geringerer Effizienz – weiterhin stattfindet (Delic et al., 2013).

4.2 Zwei mögliche Wege des α Syn-Weitertransports

Der Weitertransport membranassoziierter α Syn-GFP-Spezies ausgehend von endosomalen Strukturen erfolgt den vorliegenden Daten zufolge über zwei vermutlich unterschiedliche, sich jedoch nicht gegenseitig ausschließende Prozesse.

Fab1-/PI3,5P2-abhängiges endosomales Recycling zur PM

Der erste potenzielle Transportprozess ist Fab1- bzw. PI3,5P2-abhängig und erfolgt über ein direktes endosomales PM-Recycling. Fab1 ist die einzige PI3,5P2-synthetisierende Kinase in *S. cerevisiae* und ortholog zur humanen PIKFyve. Die Lokalisation dieses Enzyms beschränkt sich auf die Vakuole, spät-endosomale Strukturen und sogenannte Signalendosomen (Chen et al., 2021; Gary et al., 1998). Interessanterweise führt der Verlust von PI3,5P2 im *fab1Δ*-Stamm zu einer teilweise zytosolischen Lokalisation von α Syn-GFP und einem geringen, aber signifikanten Anstieg zytoplasmatischer GFP-positiver Akkumulationen (siehe Ergebnisse, Abbildung 28). In Säugerzellen spielt PIKFyve und damit die Biosynthese von PI3,5P2 eine wichtige Rolle im direkten Vesikeltransport von Endosomen zur PM mithilfe des SNX17-abhängigen Retriever-Komplexes (Gallon & Cullen, 2015; Giridharan et al., 2022; Rivero-Rios et al., 2023). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Form des endosomalen Recyclings die Interaktion der PIKFyve mit der Rab GTPase RAB11A erfordert (Giridharan et al., 2022). Obwohl in *S. cerevisiae* bislang keine Orthologe von Komponenten des Retriever-Komplexes identifiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass erhöhte α Syn-Level zu einer Anhäufung zellulärer α Syn-Vesikelcluster führt, die mit dem RAB11A-Ortholog Ypt31 koloalisieren (Soper et al., 2011). Zudem gibt es Hinweise auf vergleichbar direktes PM-Recycling ausgehend von endosomalen Strukturen in *S. cerevisiae*. So wird der Lipidfarbstoff FM4-64 in einem „Recycling-Assay“ teilweise unabhängig vom Golgi-Apparat direkt über Endosomen in das umliegende Medium sekretiert (Best et al., 2020; Wiederkehr et al., 2000).

Eine Interaktion zwischen α Syn und PI3,5P2 liegt zudem nahe, da Protein-Lipid-Überlagerungstests zeigen konnten, dass α Syn eine besonders hohe Bindungsaffinität zu PI3,5P2 hat, unmittelbar hinter PI3P (Choong et al., 2023). In humanen Ovarialkarzinom-A2780-Zellen wurde zudem beobachtet, dass die Überexpression der PI5-Phosphatase INPP5E zu einer Abnahme PM-lokalisierter α Syn-Spezies führt (Jacob et al., 2021). Da in diesen Zellen neben PI3,5P2 noch PI4,5P2 und PI3,4,5P3 existieren, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Spezies von vergleichbarer oder sogar größerer Relevanz sind. Insbesondere, da die PM reich an PI4,5P2 ist (Ling et al., 2012; Yoneda et al., 2020). Eine PIP-einschließende Lipidomanalyse aufgereinigter PM-Fractionen könnte klären, ob die α Syn-Expression die PI3,5P2-Menge an der PM beeinflusst – ein Indikator für PI3,5P2-abhängiges Recycling zur PM.

Eintritt in den kanonischen sekretorischen Weg

Der zweite Transportweg erfolgt durch einen Eintritt in den kanonischen sekretorischen Weg, welcher vom ER über den Golgi zur PM erfolgt. Dixon et al. (2005) beschreiben, dass die Temperatur-abhängige Inaktivierung essenzieller sekretorischer Gene eine zytoplasmatische Lokalisation membranbindender α Syn-Spezies bewirkt (Dixon et al., 2005). Bei den relevanten Proteinen handelt es sich unter anderem um die spät-sekretorische Rab GTPase Sec4, das PM-lokalisierte t-SNARE Protein Sec9 und den PI-/PC-Transporter Sec14 (Dixon et al., 2005). Zudem kann die Überexpression der Rab GTPase Ypt1, welche insbesondere am cis-Golgi-Netzwerk wirkt, der Zytotoxizität von α Syn in *S. cerevisiae* entgegenwirken (Cooper et al., 2006). Im neuronalen Kontext konnte zudem gezeigt werden, dass die Überexpression des Ypt1-Orthologs RAB1A den α Syn-induzierten Verlust dopaminerger Neurone in *C. elegans* und *D. melanogaster* mindert (Cooper et al., 2006).

Der Transportmechanismus über den sekretorischen Weg ist zwar bekannt, jedoch konnte bislang kein spezifischer Eintrittspunkt von α Syn in die Sekretionsmaschinerie beschrieben werden. Endosomales PI3P, welches durch Komplex II der PI3K synthetisiert wird, wird anschließend entweder in Richtung der Vakuole (Endozytose), oder retrograd in Richtung des Golgi-Apparats transportiert (Gillooly et al., 2000; Steinfeld et al., 2021). Eine aktuelle Studie weist zudem darauf hin, dass das Endomembransystem von *S. cerevisiae* sehr reduziert im Vergleich zu höheren Eukaryoten ist und frühe endosomale Strukturen auch direkt in das trans-Golgi-Netzwerk übergehen können (Day et al., 2018).

Bei räumlicher Trennung des Endosoms und des Golgi-Apparats ist in der Regel der Retromer-Komplex oder die SNX-Proteine Atg20 und Atg24 für den Endosom-Golgi-Transport verantwortlich (Hetteema et al., 2003). Es ist dabei sehr wahrscheinlich, dass α Syn-GFP Atg24-abhängig transportiert wird. Dies wird durch eine aktuelle Analyse unterstützt, die zeigt, dass α Syn mit Atg24 um die Bindung an PI3P konkurriert (Rajasekaran et al., 2022). Diese Konkurrenz und der endosomale Ursprung von PI3P impliziert, dass α Syn-GFP und Atg24 an die gleichen Vesikel binden und in Richtung des Golgi-Apparats transportiert werden. Dieser Umstand könnte zudem erklären, warum WT α Syn-GFP in *atg20Δ*-Stämmen, und nicht in *atg24Δ*-Stämmen zytoplasmatisch lokalisiert und eine verringerte Wachstumsrate hervorruft (siehe Ergebnisse, Abbildung 19). Während die PX-Domäne von Atg24 ausschließlich an PI3P- bzw. PI_{3,5}P₂-haltige Vesikel bindet, kann der Atg20-Dimer auch PI- und PI₄ phosphorylierte Spezies binden (Reinhart et al., 2022). Atg20 und Atg24 sind gleichermaßen am Endosom-Golgi-Transport beteiligt, weshalb der Verlust von Atg20 die Kompensation von Atg24 erfordert. Da Atg24 jedoch mit α Syn um PI3P-haltige Vesikel konkurriert und kein Atg20 für den Transport von PI- oder PI₄-haltigen Vesikeln zur Verfügung steht, wird der ER-Golgi-Transport womöglich substanziell beeinträchtigt. Umgekehrt ist Atg20 in der Lage die *ATG24*-Deletion als sortierendes Nexin zu kompensieren. Die geringere PIP-Spezifität von Atg20

könnte entsprechend ausreichen, um den Endosom-Golgi-Transport zu stabilisieren und dadurch die PM-Lokalisation von α Syn-GFP zu ermöglichen. Ein weiterer Faktor der diesen Retromer- bzw. Atg20/Atg24-abhängigen Transport von α Syn zum Golgi bekräftigt, ist die zytoplasmatische Akkumulation von membranbindendem α Syn in Deletionsstämmen der Endosom-Golgi Rab GTPase Ypt6 (Soper et al., 2011). Diese Akkumulationen gleichen den in *vps34 Δ* beobachteten GFP-positiven Inklusionen.

Es ist denkbar, dass beide der vorgeschlagenen Transportwege simultan ablaufen und durch die Expression von membranbindenden α Syn-GFP-Spezies sogar induziert werden. Dies wird auch durch den in dieser Arbeit beobachteten Anstieg punktierter PI3P-haltiger Vesikel bekräftigt, welcher ausschließlich durch membranbindende α Syn-GFP-Spezies hervorgerufen wird (siehe Ergebnisse, Abbildung 31). Proteomanalysen WT α Syn-exprimierender Hefezellen belegen zudem, dass es zu einem α Syn-abhängigen Anstieg von SNARE-Proteinen wie Golgi SNARE 1 (Gos1), „carboxypeptidase Y-deficient 12“ (Pep12), „suppressor of the null allele of CAP 2“ (Snc2) und Ykt6; von Rab GTPasen wie Sec4 (Golgi-PM-Transport), Vps21 (endosomaler Transport), Ypt1 (ER-Golgi- und Endosom-Golgi-Transport), Ypt6 (Endosom-Golgi-Transport), Ypt31 (Golgi-PM-Transport), und Ypt52 (endosomaler Transport); sowie von ER-Golgi-Sortierungsproteinen wie Sec24, Sec62 und „Yip one suppressor 1“ (Yos1) kommt (Popova et al., 2021). Diese Proteine sind Bestandteile des sekretorischen Wegs sowie endosomaler Transportsysteme und werden direkt durch die Expression von α Syn beeinflusst. Besonders interessant sind hierbei die hochregulierten Rab GTPasen, da jedes dieser Proteine mit der PM-Lokalisation von α Syn in Verbindung gebracht wurde und zudem mit α Syn-Inklusionen colokalisiert (Gitler et al., 2008; Soper et al., 2011). Sie bilden zudem wichtige Faktoren für den gesamten beschriebenen Weg vom Endosom zur PM.

4.3 PM-Lokalisation von α Syn und funktionale Parallelen zur Säugersynapse

Der letzte Teil des sekretorischen Transportwegs beinhaltet den Transport vom trans-Golgi-Netzwerk zur PM. Hierbei werden PI4P-haltige, sekretorische Vesikel Ypt31- bzw. Ypt32-abhängig aus dem trans-Golgi entlassen (Benli et al., 1996; Jedd et al., 1997). Ypt31/32 rekrutiert den PI4P-bindenden „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF) Sec2 (Mizuno-Yamasaki et al., 2010), welcher wiederum die Rab GTPase Sec4 aktiviert (Elkind et al., 2000; Ortiz et al., 2002; Walch-Solimena et al., 1997). Sec4 ist eine essenzielle Rab GTPase, welche für die letzten Schritte des sekretorischen Wegs verantwortlich ist und mit hoher Affinität an sekretorische Vesikel bindet (Goud et al., 1988).

In dieser Arbeit zeigte bereits die one-copy-Expression von WT und A53T α Syn-GFP einen Anstieg der *SEC4*-Transkriptlevel (siehe Ergebnisse, Abbildung 32); zudem sind Ypt31 und Sec4 auf Proteinebene erhöht (Popova et al., 2021). Das legt nahe, dass ein Teil der α Syn-abhängigen Hochregulation sekretorischer Rab-GTPasen auf Transkriptebene erfolgt.

Interessanterweise liegt neben Sec4 und Ypt31 auch das v-SNARE Protein Snc2 in erhöhter Menge vor, wohingegen die Level der PM-lokalisierten t-SNARE-Proteine Sec9 und Sso1/2 unverändert sind (Popova et al., 2021) und auch die Expression von *SEC9* nicht beeinflusst wurde (siehe Ergebnisse, Abbildung 32). Da Sec9 hauptsächlich PM-lokalisiert an Knospungsstellen vorliegt, assoziiert es nicht direkt mit den von α Syn-gebundenen Vesikeln und ist kein Teil der „mobilen“ Einheit des sekretorischen Wegs. Demnach ist es auch nicht überraschend, dass die Lokalisation von Sec9 – im Gegensatz zu Sec4 – bei gleichzeitiger Überexpression mit α Syn nicht beeinflusst wird. Die beobachtete Anreicherung PI3P-haltiger Vesikel deutet darauf hin, dass die durch α Syn-Expression ausgelöste Hochregulation primär Faktoren der Transportvesikel betrifft.

Vereinfacht folgt der gezielte Transport sekretorischer Vesikel zur Hefeknospe einem vergleichbaren Prozess wie die Exozytose synaptischer Vesikel an der Präsynapse. In beiden Fällen handelt es sich bei den Cargovesikeln um kleine, stark positiv gekrümmte Membranen, welche insbesondere durch PS und PIPs eine anionische Oberfläche aufweisen (Binotti et al., 2021; Zinser et al., 1991). Beide Vesikeltypen können sowohl aus dem Golgi als auch endosomalen PI3P-haltigen Membranen hervorgehen. So stört beispielsweise die Inhibition der PI3P-Biosynthese in Säugerneuronen den natürlichen Recycling-Zyklus synaptischer Vesikel (Liu et al., 2022). An synaptischen Vesikeln wurde außerdem der VPS34-Effektor RAB5 gefunden, dessen funktionales Hefe-Ortholog Vps21 bei α Syn-Expression in erhöhter Menge vorliegt (Fischer von Mollard et al., 1994; Popova et al., 2021).

Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Säugerneuronen erfolgt der finale Schritt der Vesikelfusion über homologe SNARE-Komplexe, die aus einem Sec4/RAB3A-interagierenden v-SNARE und dem PM-lokalisierten t-SNARE-Komplex bestehen. In der Hefe rekrutiert die GTP-gebundene Form von Sec4 sekretorische Vesikel zur PM, wo der v-SNARE Snc2 mit dem t-SNARE-Komplex aus Sec9 (SNAP-25-Ortholog) und Sso1 bzw. Sso2 (Syntaxin-Orthologe) interagiert, um die Membranfusion einzuleiten (Brennwald et al., 1994; Guo et al., 1999; Rossi et al., 1997). Funktionell analog rekrutiert in Säugerneuronen die Rab GTPase RAB3A synaptische Vesikel, deren v-SNARE VAMP2 (Snc2-Ortholog) mit SNAP-25 (Sec9-Ortholog) und Syntaxinen (Sso1/2-Orthologe) einen nahezu identischen SNARE-Komplex bildet, um die Fusion von Vesikel und PM zu initiieren (Abbildung 35) (Horikawa et al., 1993; T. Li et al., 2022; Sutton et al., 1998).

Besonders interessant ist hierbei die α Syn-abhängige Hochregulation der spät-sekretorischen Rab GTPase Sec4 und der beobachteten Colokalisation mit α Syn-GFP nahe der Knospungsstellen in *S. cerevisiae* (siehe Ergebnisse, Abbildung 32). Sec4 ist ein funktionales Ortholog zu humanem RAB3A (51,7% Sequenzidentität), ein wichtiger Regulator für Priming und Sekretion synaptischer Vesikel an der Präsynapse (Schluter et al., 2006). In murinen Synaptosomen wurde beobachtet, dass α Syn und RAB3A an der Oberfläche synaptischer Vesikel binden und dort miteinander interagieren (Lv et al., 2022). Dieser Interaktionskomplex, welcher ausschließlich bei membranassoziierten RAB3A-Proteinen beobachtet wird, stabilisiert die Membranbindung von α Syn (Chen et al., 2013; Lv et al., 2022). Während die Interaktion von α Syn und RAB3A unter anderem über den C-Terminus von α Syn vermittelt wird (Lv et al., 2022), ist noch unklar, ob die Colokalisation von α Syn und Sec4 in *S. cerevisiae* ebenfalls auf einer direkten Protein-Protein-Wechselwirkung beruht, oder vielmehr durch eine konkurrierende Bindung an den gleichen sekretorischen Vesikeln hervorgerufen wird. Hinweise auf Letzteres liefern Studien, die zeigen, dass eine Deletion des Protein-interagierenden C-Terminus von α Syn keinen Einfluss auf die PM-Lokalisation in Hefe hat (Volles & Lansbury, 2007). Dies könnte auch erklären, warum es zu einer Akkumulation α Syn-GFP- und mRUBY2-Sec4-reicher Vesikel nahe der PM kommt (siehe Ergebnisse, Abbildung 32). Bindet α Syn ohne direkte Interaktion mit Sec4 an sekretorische Vesikel, kann es sein dass beide Proteine entweder um freie Bindungsstellen konkurrieren oder die Oberfläche dieser Vesikel überladen, was den Fusionsprozess an der Knospe letztlich behindern kann. Es bleibt zudem offen, ob α Syn – wie in Säugerzellen beschrieben – auch im Hefemodell zur Stabilisierung des SNARE-Komplexes beiträgt (Burré et al., 2010).

Da es sich bei humanem α Syn-GFP nicht um ein endogenes Hefeprotein handelt, stellt sich letztlich die Frage, inwiefern dieses Protein die Genregulation des sekretorischen Apparats beeinflussen kann. In Säugerzellen wurde α Syn teilweise im Nukleus nachgewiesen, wo es durch direkte Bindung des DNA-Rückgrats oder durch indirekte Interaktion mit epigenetischen Regulatoren die Genexpression beeinflussen kann (Desplats et al., 2011; Jiang et al., 2018; Surguchov, 2023). Diese Form der Genregulation ist jedoch im Fall des Hefesystems unwahrscheinlich, da insbesondere die mutierten Varianten A30P und A53T mit DNA-Modifikationen in Verbindung gebracht werden und die erhöhte Menge der *SEC4*-Transkripte ausschließlich durch membranbindende α Syn-Spezies WT und A53T hervorgerufen wird (Paiva et al., 2018; Surguchov, 2023). Zudem bestehen entsprechend dem phylogenetischen Abstand deutliche Unterschiede zwischen dem Hefe- und Säuger genom. So ist das Hefegenom neben der deutlich reduzierten Genzahl mit etwa 6000 offenen Leserahmen zudem dichter gepackt und es existieren vergleichsweise wenige Intronsequenzen. Auch die Promotorregionen höherer Eukaryoten weisen funktionale Unterschiede zu denen in *S. cerevisiae* auf (Künzler et al., 1994).

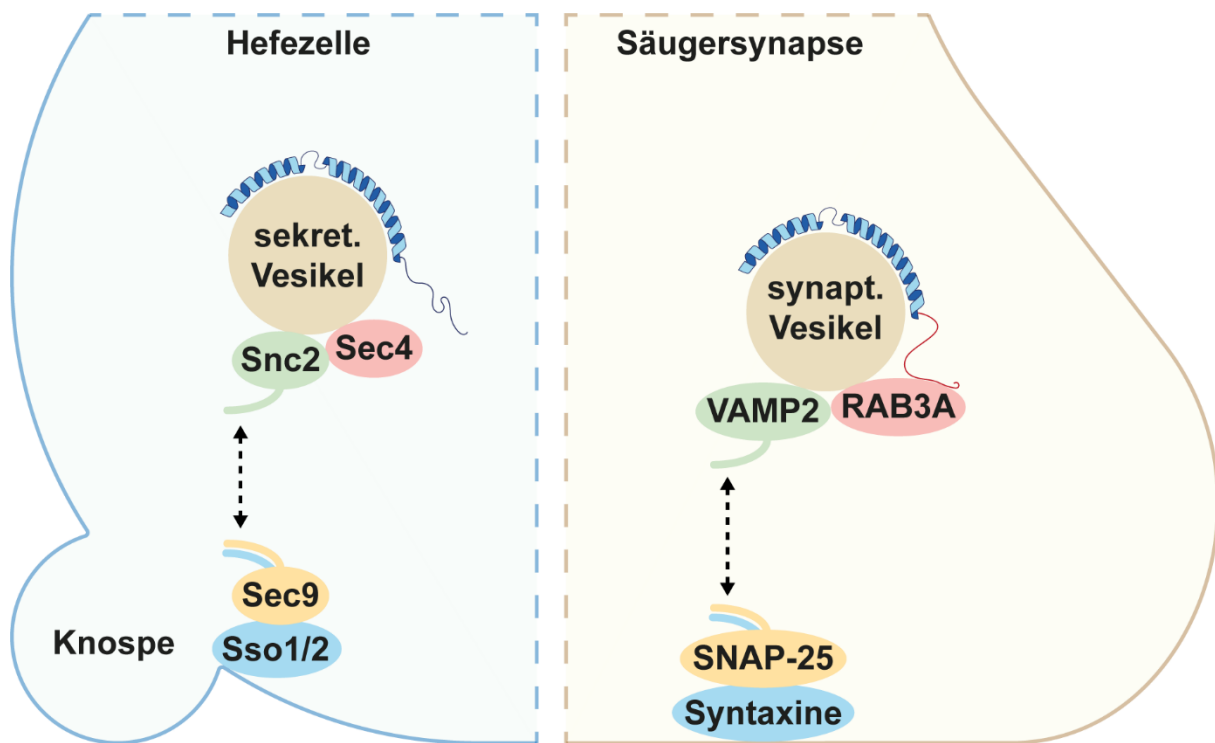


Abbildung 35: Die PM-Lokalisation α Syn-haltiger Vesikel in *S. cerevisiae* und an der Säugersynapse erfolgt über einen hoch-konservierten Prozess. Stark vereinfachte Darstellung des finalen Schritts der PM-Lokalisation von α Syn-gebundenen, PIP-haltigen sekretorischen (sekret.) Vesikeln in *S. cerevisiae* (links) und synaptischen (synapt.) Vesikeln an der Säugersynapse (rechts). In beiden Fällen interagieren konservierte vesikelgebundene Rab GTPasen (Sec4 bzw. RAB3A) zusammen mit v-SNAREs (Snc2 bzw. VAMP2) mit den PM-lokalisierten Untereinheiten des t-SNARE-Komplexes, unter anderem bestehend aus Sec9 bzw. SNAP-25 und Sso1/2 bzw. Syntaxinen. Ein entscheidender Unterschied ist, dass in Säugerzellen bekannt ist, dass α Syn zusätzlich C-terminal mit RAB3A interagiert (rot markierter C-Terminus). Dies ist für Sec4 nicht nachgewiesen.

Da α Syn mit hoher Spezifität an PIP-haltige Vesikel bindet und Rab GTPasen häufig über diese Signallipide an Zielmembranen rekrutiert werden (Jacob et al., 2021; Middleton & Rhoades, 2010), kann vielmehr davon ausgegangen werden, dass die bereits beschriebene Bindungskonkurrenz zwischen α Syn und Vesikel-assoziierten Proteinen wie Sec4 zu einem α Syn-induzierten vesikulären Transportstress führt. Ein vergleichbarer Effekt wurde bereits für das SNX-Protein Atg24 beobachtet und für Snx3 vermutet (Rajasekaran et al., 2022; Rajasekaran et al., 2021). Die in dieser Arbeit beobachtete Hochregulation sekretorischer Transportproteine sowie der Anstieg PI3P-haltiger Vesikel lassen sich als kompensatorische Antwort auf diesen Stress interpretieren (siehe Ergebnisse, Abbildung 31).

4.4 Verteilung von α Syn über die PM

An der PM angekommen wird α Syn-GFP über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Dies zeigt sich auch in der mikroskopischen Zeitreihe der Galactose-induzierten α Syn-GFP-Expression (siehe Ergebnisse, Abbildung 30). Für eine PI4P- bzw. PI4,5P2-abhängige laterale Verteilung des Proteins spricht die mikroskopische Zeitreihe nach vollständiger Stt4-Inhibition durch Wortmannin. Auch in diesem Fall bilden sich zelluläre α Syn-GFP-Akkumulationen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in den PI3P-defizienten Stämmen handelt es sich hierbei

jedoch um PM-lokalisierte Inklusionen, die insbesondere an Knospungsstellen sich teilender Zellen entstehen (siehe Ergebnisse, Abbildung 29).

Da es sich bei der PI4-Kinase Stt4 um ein zytosolisches Enzym handelt und PM-Lipide asymmetrisch verteilt sind – mit PS, PE und PIPs auf der zytosolischen Seite und PC sowie Sphingolipide auf der extrazellulären Seite (Boura & Nencka, 2015; Jain et al., 2025; Norris et al., 2024) – kann davon ausgegangen werden, dass α Syn-GFP gebunden an PI4P oder PI4,5P2 im zytosolischen Teil der PM angereichert wird. Ob letztlich PI4P oder PI4,5P2 entscheidend für den Transport entlang der PM ist, kann nicht vollständig geklärt werden, da im verwendeten *mss4-103*-Stamm noch geringe Mengen PI4,5P2 vorhanden sind (Audhya & Emr, 2003). Von den vier in *S. cerevisiae* beschriebenen PIP-Spezies hat α Syn jedoch die geringste Affinität zu PI4,5P2 (Galka et al., 2024).

Mithilfe der vorliegenden Daten und der aktuellen Literatur kann ein hypothetisches Modell für die PM-Lokalisation von α Syn erstellt werden (Abbildung 36). Dieses Modell zeigt, dass der intrazelluläre Transport von membranbindenden α Syn-Spezies in *S. cerevisiae* maßgeblich durch die Verfügbarkeit und Kompartiment-spezifische Lokalisation von PIP-Spezies beeinflusst wird. Dabei existieren möglicherweise zwei parallele, sich ergänzende Transportwege, die die PM-Lokalisation ermöglichen: ein Fab1- bzw. PI3,5P2-abhängiges endosomales Recycling und der klassische sekretorische Weg, ausgehend von endosomalem retrograden Vesikeltransport. Die spezifische Bindung von α Syn-GFP an PI3P-haltige Vesikel, die Bindungskonkurrenz zu endogenen PIP-assoziierten Proteinen wie Atg24 sowie die α Syn-abhängige Hochregulation diverser sekretorischer Rab GTPasen wie Sec4 deuten darauf hin, dass humanes α Syn über das Endosom gezielt in bestehende Transportprozesse eingreifen kann und somit in Richtung der PM transportiert wird. Hierbei stellt α Syn nicht nur vesikuläres Cargo dar, sondern ebenfalls einen aktiven Modulator von Lipid- bzw. Vesikel-assoziierten Prozessen.

Insgesamt verdeutlichen die vorliegenden Daten, dass α Syn in *S. cerevisiae* gezielt in evolutionär hochkonservierte Membrantransport- und Fusionsmechanismen eingreift, die funktionell mit Prozessen an neuronalen Präsynapsen verwandt sind. Trotz der phylogenetischen Distanz zwischen Hefen und Säugetieren lassen sich aussagekräftige Parallelen insbesondere in der Organisation der PM-lokalisierten Fusionskomplexe ausmachen. Das Hefemodell ermöglicht somit nicht nur die Identifizierung von PI3P als wichtigen Faktor der α Syn-Lokalisation, sondern liefert zudem wertvolle Hinweise auf molekulare Schnittstellen, die potenzielle Angriffspunkte für relevante, pathologische Veränderungen im PD-Kontext darstellen.

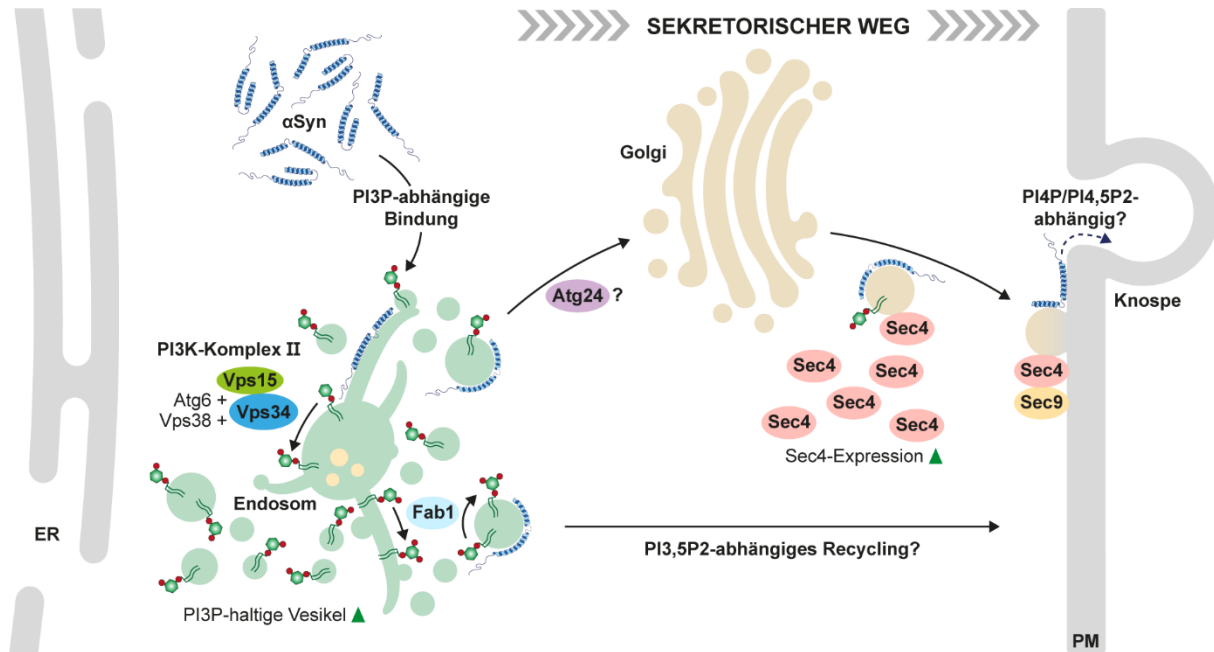


Abbildung 36: Hypothetisches Modell des PM-Transports von WT und A53T α Syn. Schematische Darstellung des beschriebenen α Syn-Transports vom Zytoplasma an die Knospungsstellen an der PM. Heterolog exprimiertes α Syn führt zu einer Anreicherung PI3P-haltiger Vesikel, welche endosomal durch den PI3K-Komplex II gebildet werden. In diesem Modell bindet α Syn an die PI3P-haltigen Vesikel und wird anschließend über zwei parallele Transportmechanismen zur PM befördert. Ein Weg ist das direkte endosomale Recycling, welches PI3,5P2-abhängig verläuft. Der zweite Weg beschreibt den Eintritt von α Syn in den kanonischen sekretorischen Weg über den retrograden, möglicherweise Atg24-abhängigen Transport vom Endosom zum Golgi. Am trans-Golgi wird α Syn, gebunden an PI4P- und Sec4-haltige Vesikel, zur PM befördert. Sec4 liegt bei Expression von WT und A53T α Syn transkriptionell hochreguliert vor. Die Fusion mit der PM erfolgt mutmaßlich unter anderem über die Interaktion mit dem t-SNARE Sec9 und die Verteilung entlang der PM ist abhängig von der PI4P- oder PI4,5P2-Verfügbarkeit. Abbildung angelehnt an (Löser et al., 2025).

Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, dass *S. cerevisiae* ein leistungsfähiges Modellsystem zur Untersuchung grundlegender molekularer Mechanismen zellulärer α Syn-Interaktionen darstellt. Da bislang kein Modellsystem existiert, das das gesamte Spektrum der mit Morbus Parkinson assoziierten Prozesse abbildet, ist es entscheidend, sich auf isolierte Mechanismen zu konzentrieren – mit dem Ziel, die dabei gewonnenen Erkenntnisse künftig auf phylogenetisch näher verwandte Systeme zu übertragen.

Das initiale Ziel dieser Arbeit war es, α Syn-abhängige Effekte auf konservierte Proteostase-Mechanismen zu untersuchen und zudem die Rolle Autophagie-assoziiierter Proteine für die Lokalisation und Zytotoxizität von α Syn zu bestimmen. Die Beobachtung einer ausgeprägten zytoplasmatischen Mislokalisierung von α Syn in der PI3K-Deletionsmutante *vps34 Δ* ermöglichte die erstmalige Identifikation eines direkten Zusammenhangs zwischen spezifischen Phosphoinositiden und sekretorischen Transportfaktoren, die maßgeblich am PM-Transport von α Syn beteiligt sind. Dieser Transportmechanismus ist von niederen

Eukaryoten bis zu Säugetieren hoch konserviert und bietet damit eine Grundlage, um die gewonnenen Erkenntnisse im nächsten Schritt auf physiologisch relevante PD-Modelle zu übertragen.

Im Bereich der Proteostase konnte gezeigt werden, dass α Syn keinen Einfluss auf die Stickstoffmangel-induzierte Aktivierung der zellulären Makroautophagie in teilungsaktiven, glykolytisch wachsenden Zellen hat. In alternden, respiratorisch aktiven Zellen nimmt jedoch die Bedeutung selektiver Autophagie deutlich zu, was sich in Lebensspannenexperimenten widerspiegelt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der dosisabhängige Effekt auf die 26S-Proteasomaktivität durch WT α Syn-GFP nicht ausschließlich mit den Lipid-Bindeeigenschaften des Proteins zusammenhängt. Im Gegensatz dazu führt die high-copy-Expression membranbindender α Syn-Spezies zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate. Literaturdaten weisen darauf hin, dass die Bildung dieser Aggregate möglicherweise mit mitochondrialem Stress in Verbindung steht.

Hinsichtlich des zellulären α Syn-Transports wurde deutlich, dass die endosomale PI3P-Biosynthese durch den PI3K-Komplex II essenziell für die PM-Lokalisation membranbindender α Syn-Spezies ist. Auch PI3,5P2 stellt – zumindest teilweise – einen wichtigen Faktor für die PM-Lokalisation dar. Auf der anderen Seite ist die PI4P- bzw. PI4,5P2-Synthese entscheidend für die Verteilung des Proteins entlang der PM. Eine Fehllokalisierung membranbindender α Syn-Spezies in das Zytoplasma führt hingegen zur zytosolischen Akkumulation nicht-amyloider α Syn-Spezies in großen Protein-Lipid-Clustern.

Darüber hinaus induzieren membranbindende α Syn-Spezies die Hochregulation zentraler Komponenten des sekretorischen Apparats, darunter PI3P-haltige Transportvesikel, essenzielle SNARE-Proteine und Rab GTPasen wie Sec4. Besonders hervorzuheben ist, dass die finalen Schritte des α Syn-Transports in Hefen eine ausgeprägte funktionale Ähnlichkeit zur Exozytose synaptischer Vesikel in Säugerneuronen aufweisen, insbesondere aufgrund der hohen Konservierung Fusions-vermittelnder Faktoren am SNARE-Komplex. Da in *S. cerevisiae* im Gegensatz zu Säugerzellen sehr wahrscheinlich keine direkte Bindung von α Syn an den Fusionsfaktor Sec4 vorliegt, ist es möglich, dass die N-terminale Affinität zu spezifisch zusammengesetzten Membranen der jeweiligen Vesikel – insbesondere in Bezug auf PIP-Spezies – einen größeren Einfluss auf die Lokalisation von α Syn in phylogenetisch unterschiedlichen Systemen ausübt als mögliche C-terminale Protein-Protein-Interaktionen. Dies kann aufgrund der signifikanten Änderungen am neuronalen Lipidom von PD-Patienten von großer Relevanz für zukünftige Untersuchungen sein.

Literaturverzeichnis

- Aaltonen, M. J., Friedman, J. R., Osman, C., Salin, B., di Rago, J. P., Nunnari, J., Langer, T., & Tatsuta, T. (2016). MICOS and phospholipid transfer by Ups2-Mdm35 organize membrane lipid synthesis in mitochondria. *J Cell Biol* **213**, 525-534, doi: 10.1083/jcb.201602007
- Amaya, C., Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2015). Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett* **589**, 3343-3353, doi: 10.1016/j.febslet.2015.09.021
- Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., Diep, L., Keim, P. S., Shen, X., Chataway, T., Schlossmacher, M. G., Seubert, P., Schenk, D., Sinha, S., Gai, W. P., & Chilcote, T. J. (2006). Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of α -Synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* **281**, 29739-29752, doi: 10.1074/jbc.M600933200
- Araki, Y., Ku, W. C., Akioka, M., May, A. I., Hayashi, Y., Arisaka, F., Ishihama, Y., & Ohsumi, Y. (2013). Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J Cell Biol* **203**, 299-313, doi: 10.1083/jcb.201304123
- Arias-Carrión, O., Guerra-Crespo, M., Padilla-Godínez, F. J., Soto-Rojas, L. O., & Manjarrez, E. (2025). α -Synuclein pathology in synucleinopathies: mechanisms, biomarkers, and therapeutic challenges. *Int J Mol Sci* **26**, 5405, doi: 10.3390/ijms26115405
- Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P. F., Meijer, A. J., Codogno, P., & Ogier-Denis, E. (2001). The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* **276**, 35243-35246, doi: 10.1074/jbc.C100319200
- Assayag, K., Yakunin, E., Loeb, V., Selkoe, D. J., & Sharon, R. (2007). Polyunsaturated fatty acids induce alpha-synuclein-related pathogenic changes in neuronal cells. *Am J Pathol* **171**, 2000-2011, doi: 10.2353/ajpath.2007.070373
- Athané, A., Buisson, A., Challier, M., Beaumatin, F., Manon, S., Bhatia-Kiššová, I., & Camougrand, N. (2015). Insights into the relationship between the proteasome and autophagy in human and yeast cells. *Int J Biochem Cell Biol* **64**, 167-173, doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.002
- Audhya, A., & Emr, S. D. (2002). Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev Cell* **2**, 593-605, doi: 10.1016/S1534-5807(02)00168-5
- Audhya, A., & Emr, S. D. (2003). Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* **22**, 4223-4236, doi: 10.1093/emboj/cdg397
- Auger, K. R., Serunian, L. A., Soltoff, S. P., Libby, P., & Cantley, L. C. (1989). PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* **57**, 167-175, doi: 10.1016/0092-8674(89)90182-7
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 211-233, doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113313
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., & Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701, doi: 10.1083/jcb.200803137
- Baba, T., Toth, D. J., Sengupta, N., Kim, Y. J., & Balla, T. (2019). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate controls Rab7 and PLEKHM1 membrane cycling during autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J* **38**, e100312, doi: 10.15252/embj.2018100312

- Bagola, K., & Sommer, T. (2008). Protein quality control: on IPODs and other JUNQ. *Curr Biol* **18**, R1019-R1021, doi: 10.1016/j.cub.2008.09.036
- Barbuti, P. A., Guardia-Laguarta, C., Yun, T., Chatila, Z. K., Flowers, X., Wong, C., Santos, B. F. R., Larsen, S. B., Lotti, J. S., Hattori, N., Bradshaw, E., Dettmer, U., Fanning, S., Menon, V., Reddy, H., Teich, A. F., Krüger, R., Area-Gomez, E., & Przedborski, S. (2025). The role of alpha-synuclein in synucleinopathy: Impact on lipid regulation at mitochondria-ER membranes. *NPJ Parkinsons Dis* **11**, 103, doi: 10.1038/s41531-025-00960-x
- Bartels, T., Ahlstrom, L. S., Leftin, A., Kamp, F., Haass, C., Brown, M. F., & Beyer, K. (2010). The N-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys J* **99**, 2116-2124, doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.035
- Bartels, T., Choi, J. G., & Selkoe, D. J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **477**, 107-110, doi: 10.1038/nature10324
- Baskaran, S., Ragusa, M. J., Boura, E., & Hurley, J. H. (2012). Two-site recognition of phosphatidylinositol 3-phosphate by PROPPINs in autophagy. *Mol Cell* **47**, 339-348, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.027
- Ben-Shitrit, T., Yosef, N., Shemesh, K., Sharan, R., Ruppin, E., & Kupiec, M. (2012). Systematic identification of gene annotation errors in the widely used yeast mutation collections. *Nat Methods* **9**, 373-378, doi: 10.1038/nmeth.1890
- Benli, M., Döring, F., Robinson, D. G., Yang, X., & Gallwitz, D. (1996). Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J* **15**, 6460-6475, doi: -
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-242, doi: 10.1093/nar/28.1.235
- Bernal-Conde, L. D., Ramos-Acevedo, R., Reyes-Hernández, M. A., Balbuena-Olvera, A. J., Morales-Moreno, I. D., Argüero-Sánchez, R., Schüle, B., & Guerra-Crespo, M. (2020). Alpha-Synuclein physiology and pathology: a perspective on cellular structures and organelles. *Front Neurosci* **13**, doi: 10.3389/fnins.2019.01399
- Best, J. T., Xu, P., McGuire, J. G., Leahy, S. N., & Graham, T. R. (2020). Yeast synaptobrevin, Snc1, engages distinct routes of postendocytic recycling mediated by a sorting nexin, Rcy1-COPI, and retromer. *Mol Biol Cell* **31**, 944-962, doi: 10.1091/mbc.E19-05-0290
- Binotti, B., Jahn, R., & Pérez-Lara, Á. (2021). An overview of the synaptic vesicle lipid composition. *Arch Biochem Biophys* **709**, 108966, doi: 10.1016/j.abb.2021.108966
- Birdsall, V., Kirwan, K., Zhu, M., Imoto, Y., Wilson, S. M., Watanabe, S., & Waites, C. L. (2022). Axonal transport of Hrs is activity dependent and facilitates synaptic vesicle protein degradation. *Life Sci Alliance* **5**, e202000745, doi: 10.26508/lsa.202000745
- Biswas, B., Roy, S., Mondal, J. A., & Singh, P. C. (2020). Interaction of α -Synuclein with phospholipids and the associated restructuring of interfacial lipid water: an interface-selective vibrational spectroscopic study. *Angew Chem Int Ed* **59**, 22731-22737, doi: 10.1002/anie.202011179
- Bluhm, A., Xiang, W., Wien, F., Thureau, A., Chevreuril, M., Raynal, B., Geissler, S., Wermann, M., Schilling, S., Bénas, P., Hartlage-Rübsamen, M., Schulze, A., Sauter, C., & Roßner, S. (2025). Monomers, dimers, and oligomers of pyroglutamate-modified α -Synuclein fragments exhibit distinct biophysical characteristics. *ACS Chem Neurosci* doi: 10.1021/acchemneuro.5c00106
- Bodner, C. R., Maltsev, A. S., Dobson, C. M., & Bax, A. (2010). Differential phospholipid binding of α -Synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy. *Biochemistry* **49**, 862-871, doi: 10.1021/bi901723p
- Boronenkov, I. V., & Anderson, R. A. (1995). The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *J Biol Chem* **270**, 2881-2884, doi: 10.1074/jbc.270.7.2881

- Boura, E., & Nencka, R. (2015). Phosphatidylinositol 4-kinases: function, structure, and inhibition. *Exp Cell Res* **337**, 136-145, doi: 10.1016/j.yexcr.2015.03.028
- Brás, J., Gibbons, E., & Guerreiro, R. (2021). Genetics of synucleins in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* **141**, 471-490, doi: 10.1007/s00401-020-02202-1
- Breker, M., Gymrek, M., Moldavski, O., & Schuldiner, M. (2014). LoQAtE--Localization and Quantitation ATlas of the yeast proteome. A new tool for multiparametric dissection of single-protein behavior in response to biological perturbations in yeast. *Nucleic Acids Res* **42**, D726-730, doi: 10.1093/nar/gkt933
- Breker, M., Gymrek, M., & Schuldiner, M. (2013). A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses. *J Cell Biol* **200**, 839-850, doi: 10.1083/jcb.201301120
- Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keranen, S., Bankaitis, V., & Novick, P. (1994). Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**, 245-258, doi: 10.1016/0092-8674(94)90194-5
- Buchanan, B. W., Lloyd, M. E., Engle, S. M., & Rubenstein, E. M. (2016). Cycloheximide chase analysis of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp* doi: 10.3791/53975
- Burns, R. S., LeWitt, P. A., Ebert, M. H., Pakkenberg, H., & Kopin, I. J. (1985). The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency. *N Engl J Med* **312**, 1418-1421, doi: 10.1056/NEJM198505303122203
- Burré, J., Sharma, M., & Sudhof, T. C. (2012). Systematic mutagenesis of alpha-synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J Neurosci* **32**, 15227-15242, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3545-12.2012
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Südhof, T. C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* **329**, 1663-1667, doi: 10.1126/science.1195227
- Büttner, S., Bitto, A., Ring, J., Augsten, M., Zabrocki, P., Eisenberg, T., Jungwirth, H., Hutter, S., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G., Winderickx, J., & Madeo, F. (2008). Functional mitochondria are required for α -Synuclein toxicity in aging yeast. *J Biol Chem* **283**, 7554-7560, doi: 10.1074/jbc.M708477200
- Cabezas, A., Pattni, K., & Stenmark, H. (2006). Cloning and subcellular localization of a human phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, PIKfyve/Fab1. *Gene* **371**, 34-41, doi: 10.1016/j.gene.2005.11.009
- Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., Macreadie, P., Varghese, J., & Macreadie, I. (2007). Alzheimer's A β fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res* **7**, 1230-1236, doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00285.x
- Carman, G. M., & Han, G. S. (2011). Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* **80**, 859-883, doi: 10.1146/annurev-biochem-060409-092229
- Cascella, R., Perni, M., Chen, S. W., Fusco, G., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Dobson, C. M., & De Simone, A. (2019). Probing the origin of the toxicity of oligomeric aggregates of α -Synuclein with antibodies. *ACS Chem Biol* **14**, 1352-1362, doi: 10.1021/acscchembio.9b00312
- Cebollero, E., van der Vaart, A., Zhao, M., Rieter, E., Klionsky, Daniel J., Helms, J. B., & Reggiori, F. (2012). Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Curr Biol* **22**, 1545-1553, doi: 10.1016/j.cub.2012.06.029
- Chan, K.-M., Liu, Y.-T., Ma, C.-H., Jayaram, M., & Sau, S. (2013). The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: A miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid* **70**, 2-17, doi: 10.1016/j.plasmid.2013.03.001

- Chang, S. C., Heacock, P. N., Mileykovskaya, E., Voelker, D. R., & Dowhan, W. (1998). Isolation and characterization of the gene (CLS1) encoding cardiolipin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 14933-14941, doi: 10.1074/jbc.273.24.14933
- Chen, B., Retzlaff, M., Roos, T., & Frydman, J. (2011). Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a004374, doi: 10.1101/cshperspect.a004374
- Chen, R. H. C., Wislet-Gendebien, S., Samuel, F., Visanji, N. P., Zhang, G., Marsilio, D., Langman, T., Fraser, P. E., & Tandon, A. (2013). α -Synuclein membrane association is regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity. *J Biol Chem* **288**, 7438-7449, doi: 10.1074/jbc.M112.439497
- Chen, Y., Wang, Y.-H., Zheng, Y., Li, M., Wang, B., Wang, Q.-W., Fu, C.-L., Liu, Y.-N., Li, X., & Yao, J. (2021). Synaptotagmin-1 interacts with PI(4,5)P2 to initiate synaptic vesicle docking in hippocampal neurons. *Cell Rep* **34**, 108842, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108842
- Chen, Z., Malia, P. C., Hatakeyama, R., Nicastro, R., Hu, Z., Péli-Gulli, M.-P., Gao, J., Nishimura, T., Eskes, E., Stefan, C. J., Winderickx, J., Dengjel, J., De Virgilio, C., & Ungermann, C. (2021). TORC1 determines Fab1 lipid kinase function at signaling endosomes and vacuoles. *Curr Biol* **31**, 297-309.e298, doi: 10.1016/j.cub.2020.10.026
- Cheng, D., Jenner, A. M., Shui, G., Cheong, W. F., Mitchell, T. W., Nealon, J. R., Kim, W. S., McCann, H., Wenk, M. R., Halliday, G. M., & Garner, B. (2011). Lipid pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. *PLOS ONE* **6**, e17299, doi: 10.1371/journal.pone.0017299
- Chernomordik, L. V., Melikyan, G. B., & Chizmadzhev, Y. A. (1987). Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta Rev Biomembr* **906**, 309-352, doi: 10.1016/0304-4157(87)90016-5
- Chiang, H.-L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., & Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **246**, 382-385, doi: 10.1126/science.2799391
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159, doi: 10.1006/abio.1987.9999
- Choong, C.-J., Aguirre, C., Kakuda, K., Beck, G., Nakanishi, H., Kimura, Y., Shimma, S., Nabekura, K., Hideshima, M., & Doi, J. (2023). Phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate interacts with alpha-synuclein and initiates its aggregation and formation of Parkinson's disease-related fibril polymorphism. *Acta Neuropathol* **145**, 573-595, doi: 10.1007/s00401-023-02555-3
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.-C., Waterfield, M. D., Backer, J. M., & Zerial, M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1**, 249-252, doi: 10.1038/12075
- Cirrito, J. R., Kang, J.-E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S., & Holtzman, D. M. (2008). Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid- β in vivo. *Neuron* **58**, 42-51, doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.003
- Cole, N. B., DiEuliis, D., Leo, P., Mitchell, D. C., & Nussbaum, R. L. (2008). Mitochondrial translocation of α -synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp Cell Res* **314**, 2076-2089, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.03.012
- Cole, N. B., Murphy, D. D., Grider, T., Rueter, S., Brasaemle, D., & Nussbaum, R. L. (2002). Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* **277**, 6344-6352, doi: 10.1074/jbc.M108414200
- Concha-Marambio, L., Pritzkow, S., Shahnawaz, M., Farris, C. M., & Soto, C. (2023). Seed amplification assay for the detection of pathologic alpha-synuclein aggregates in cerebrospinal fluid. *Nat Protoc* **18**, 1179-1196, doi: 10.1038/s41596-022-00787-3

- Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., & Lansbury, P. T., Jr. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 571-576, doi: 10.1073/pnas.97.2.571
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Marsischky, G., Kolodner, R. D., LaBaer, J., Rochet, J.-C., Bonini, N. M., & Lindquist, S. (2006). Alpha-Synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313**, 324-328, doi: 10.1126/science.1129462
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant α -Synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**, 1292-1295, doi: 10.1126/science.1101738
- Cutler, N. S., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (1997). STT4 is an essential phosphatidylinositol 4-kinase that is a target of wortmannin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**, 27671-27677, doi: 10.1074/jbc.272.44.27671
- Dale, G. E., Probst, A., Luthert, P., Martin, J., Anderton, B. H., & Leigh, P. N. (1992). Relationships between Lewy bodies and pale bodies in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **83**, 525-529, doi: 10.1007/BF00310030
- Dall'Armi, C., Devereaux, Kelly A., & Di Paolo, G. (2013). The role of lipids in the control of autophagy. *Curr Biol* **23**, R33-R45, doi: 10.1016/j.cub.2012.10.041
- Danzer, K. M., Krebs, S. K., Wolff, M., Birk, G., & Hengerer, B. (2009). Seeding induced by α -synuclein oligomers provides evidence for spreading of α -synuclein pathology. *J Neurochem* **111**, 192-203, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06324.x
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909, doi: 10.1016/S0896-6273(03)00568-3
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). Stabilization of α -Synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* **273**, 9443-9449, doi: 10.1074/jbc.273.16.9443
- Dawson, T. M., Ko, H. S., & Dawson, V. L. (2010). Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* **66**, 646-661, doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.034
- Day, J. O., & Mullin, S. (2021). The genetics of Parkinson's disease and implications for clinical practice. *Genes* **12**, doi: 10.3390/genes12071006
- Day, K. J., Casler, J. C., & Glick, B. S. (2018). Budding yeast has a minimal endomembrane system. *Dev Cell* **44**, 56-72.e54, doi: 10.1016/j.devcel.2017.12.014
- de Oliveira, G. A. P., & Silva, J. L. (2019). Alpha-synuclein stepwise aggregation reveals features of an early onset mutation in Parkinson's disease. *Commun Biol* **2**, 374, doi: 10.1038/s42003-019-0598-9
- De Pace, R., Britt, D. J., Mercurio, J., Foster, A. M., Djavaherian, L., Hoffmann, V., Abebe, D., & Bonifacino, J. S. (2020). Synaptic vesicle precursors and lysosomes are transported by different mechanisms in the axon of mammalian neurons. *Cell Rep* **31**, 107775, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107775
- Dear, A. J., Teng, X., Ball, S. R., Lewin, J., Horne, R. I., Clow, D., Stevenson, A., Harper, N., Yahya, K., Yang, X., Brewerton, S. C., Thomson, J., Michaels, T. C. T., Linse, S., Knowles, T. P. J., Habchi, J., & Meisl, G. (2024). Molecular mechanism of α -synuclein aggregation on lipid membranes revealed. *Chem Sci* **15**, 7229-7242, doi: 10.1039/D3SC05661A
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., Singleton, A., Olanow, C. W., Merchant, K. M., Bezard, E., Petsko, G. A., & Meissner, W. G. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol* **14**, 855-866, doi: 10.1016/s1474-4422(15)00006-x

- Delgado, R., Maureira, C., Oliva, C., Kidokoro, Y., & Labarca, P. (2000). Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a *Drosophila* mutant, shibire. *Neuron* **28**, 941-953, doi: 10.1016/S0896-6273(00)00165-3
- Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2013). The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 872-914, doi: 10.1111/1574-6976.12020
- Desplats, P., Spencer, B., Coffee, E., Patel, P., Michael, S., Patrick, C., Adame, A., Rockenstein, E., & Masliah, E. (2011). Alpha-synuclein sequesters Dnmt1 from the nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases. *J Biol Chem* **286**, 9031-9037, doi: 10.1074/jbc.C110.212589
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -Synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* **283**, 9089-9100, doi: 10.1074/jbc.M710012200
- Diaw, S. H., Borsche, M., Streubel-Gallasch, L., Dulovic-Mahlow, M., Hermes, J., Lenz, I., Seibler, P., Klein, C., Brüggemann, N., Vos, M., & Lohmann, K. (2023). Characterization of the pathogenic α -Synuclein Variant V15A in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* **9**, 148, doi: 10.1038/s41531-023-00584-z
- Dixon, C., Mathias, N., Zweig, R. M., Davis, D. A., & Gross, D. S. (2005). Alpha-synuclein targets the plasma membrane via the secretory pathway and induces toxicity in yeast. *Genetics* **170**, 47-59, doi: 10.1534/genetics.104.035493
- Dugger, B. N., Adler, C. H., Shill, H. A., Caviness, J., Jacobson, S., Driver-Dunckley, E., & Beach, T. G. (2014). Concomitant pathologies among a spectrum of parkinsonian disorders. *Parkinsonism Relat Disord* **20**, 525-529, doi: 10.1016/j.parkreldis.2014.02.012
- Elkind, N. B., Walch-Solimena, C., & Novick, P. J. (2000). The role of the COOH terminus of Sec2p in the transport of post-Golgi vesicles. *J Cell Biol* **149**, 95-110, doi: 10.1083/jcb.149.1.95
- Ellis, C. E., Murphy, E. J., Mitchell, D. C., Golovko, M. Y., Scaglia, F., Barceló-Coblijn, G. C., & Nussbaum, R. L. (2005). Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking α -Synuclein. *Mol Cell Biol* **25**, 10190-10201, doi: 10.1128/MCB.25.22.10190-10201.2005
- Elmqvist, D., & Quastel, D. M. (1965). A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J Physiol* **178**, 505-529, doi: 10.1113/jphysiol.1965.sp007639
- Emamzadeh, F. N. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci* **21**, 29, doi: 10.4103/1735-1995.181989
- Engel, S. R., Aleksander, S., Nash, R. S., Wong, E. D., Weng, S., Miyasato, S. R., Sherlock, G., & Cherry, J. M. (2025). *Saccharomyces* Genome Database: advances in genome annotation, expanded biochemical pathways, and other key enhancements. *Genetics* **229**, doi: 10.1093/genetics/iyae185
- Fader, C. M., Sánchez, D., Furlán, M., & Colombo, M. I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in K562 cells. *Traffic* **9**, 230-250, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x
- Fanning, S., Selkoe, D., & Dettmer, U. (2020). Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy? *NPJ Parkinsons Dis* **6**, 3, doi: 10.1038/s41531-019-0103-7
- Fares, M. B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M. K., Jovičić, A., Kiely, A., Holton, J. L., Lee, S. J., Gitler, A. D., Eliezer, D., & Lashuel, H. A. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Hum Mol Genet* **23**, 4491-4509, doi: 10.1093/hmg/ddu165

- Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* **404**, 394-398, doi: 10.1038/35006074
- Fischer von Mollard, G., Stahl, B., Walch-Solimena, C., Takei, K., Daniels, L., Khoklatchev, A., De Camilli, P., Südhof, T. C., & Jahn, R. (1994). Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur J Cell Biol* **65**, 319-326, doi: -
- Forno, L. S., & Norville, R. L. (1976). Ultrastructure of Lewy bodies in the stellate ganglion. *Acta Neuropathol* **34**, 183-197, doi: 10.1007/BF00688674
- Fortin, D. L., Troyer, M. D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M. D., & Edwards, R. H. (2004). Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci* **24**, 6715-6723, doi: 10.1523/jneurosci.1594-04.2004
- Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham, S. M., & Fry, M. J. (2003). The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* **116**, 3037-3040, doi: 10.1242/jcs.00609
- Fusco, G., Pape, T., Stephens, A. D., Mahou, P., Costa, A. R., Kaminski, C. F., Kaminski Schierle, G. S., Vendruscolo, M., Veglia, G., Dobson, C. M., & De Simone, A. (2016). Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α -synuclein. *Nat Comm* **7**, 12563, doi: 10.1038/ncomms12563
- Gai, W. P., Pountney, D. L., Power, J. H. T., Li, Q. X., Culvenor, J. G., McLean, C. A., Jensen, P. H., & Blumbergs, P. C. (2003). α -synuclein fibrils constitute the central core of oligodendroglial inclusion filaments in multiple system atrophy. *Exp Neurol* **181**, 68-78, doi: 10.1016/S0014-4886(03)00004-9
- Gai, W. P., Yuan, H. X., Li, X. Q., Power, J. T. H., Blumbergs, P. C., & Jensen, P. H. (2000). In situ and in vitro study of colocalization and segregation of α -Synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. *Exp Neurol* **166**, 324-333, doi: 10.1006/exnr.2000.7527
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., & Vancura, A. (2010). Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omic* **14**, 629-638, doi: 10.1089/omi.2010.0069
- Galka, D., Ali, T. T., Bast, A., Niederleithinger, M., Gerhardt, E., Motosugi, R., Sakata, E., Knop, M., Outeiro, T. F., Popova, B., & Braus, G. H. (2024). Inhibition of 26S proteasome activity by α -synuclein is mediated by the proteasomal chaperone Rpn14/PAAF1. *Aging Cell* **23**, e14128, doi: 10.1111/accel.14128
- Gallon, M., & Cullen, P. J. (2015). Retromer and sorting nexins in endosomal sorting. *Biochem Soc Trans* **43**, 33-47, doi: 10.1042/BST20140290
- Galvagnion, C., Buell, A. K., Meisl, G., Michaels, T. C., Vendruscolo, M., Knowles, T. P., & Dobson, C. M. (2015). Lipid vesicles trigger alpha-synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat Chem Biol* **11**, 229-234, doi: 10.1038/nchembio.1750
- Gary, J. D., Wurmser, A. E., Bonangelino, C. J., Weisman, L. S., & Emr, S. D. (1998). Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *J Cell Biol* **143**, 65-79, doi: 10.1083/jcb.143.1.65
- Geng, J., Nair, U., Yasumura-Yorimitsu, K., & Klionsky, D. J. (2010). Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **21**, 2257-2269, doi: 10.1091/mbc.e09-11-0969
- George, A. A., Hayden, S., Stanton, G. R., & Brockerhoff, S. E. (2016). Arf6 and the 5'phosphatase of synaptojanin 1 regulate autophagy in cone photoreceptors. *BioEssays* **38**, S119-S135, doi: 10.1002/bies.201670913
- 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, doi: 10.1016/0896-6273(95)90040-3
- Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P. K., & Maji, S. K. (2017). α -synuclein aggregation and its modulation. *Int J Biol Macromol* **100**, 37-54, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021

- Giaever, G., & Nislow, C. (2014). The yeast deletion collection: a decade of functional genomics. *Genetics* **197**, 451-465, doi: 10.1534/genetics.114.161620
- Gibellini, F., & Smith, T. K. (2010). The Kennedy pathway--de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* **62**, 414-428, doi: 10.1002/iub.337
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343-345, doi: 10.1038/nmeth.1318
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., Parton, R. G., & Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* **19**, 4577-4588, doi: 10.1093/emboj/19.17.4577
- Giridharan, S. S. P., Luo, G., Rivero-Rios, P., Steinfeld, N., Tronchere, H., Singla, A., Burstein, E., Billadeau, D. D., Sutton, M. A., & Weisman, L. S. (2022). Lipid kinases VPS34 and PIKfyve coordinate a phosphoinositide cascade to regulate retriever-mediated recycling on endosomes. *Elife* **11**, doi: 10.7554/eLife.69709
- Gitler, A. D., Bevis, B. J., Shorter, J., Strathearn, K. E., Hamamichi, S., Su, L. J., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Rochet, J.-C., McCaffery, J. M., Barlowe, C., & Lindquist, S. (2008). The Parkinson's disease protein α -synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 145-150, doi: 10.1073/pnas.0710685105
- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a008862, doi: 10.1101/cshperspect.a008862
- Gómez-Sánchez, R., Rose, J., Guimarães, R., Mari, M., Papinski, D., Rieter, E., Geerts, W. J., Hardenberg, R., Kraft, C., Ungermann, C., & Reggiori, F. (2018). Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J Cell Biol* **217**, 2743-2763, doi: 10.1083/jcb.201710116
- Gomez, T. S., & Billadeau, D. D. (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell* **17**, 699-711, doi: 10.1016/j.devcel.2009.09.009
- Gordon, M. R., Zhu, J., Qu, V., & Li, R. (2021). A case of convergent-gene interference in the budding yeast knockout library causing chromosome instability. *G3* **11**, doi: 10.1093/g3journal/jkab084
- Goud, B., Salminen, A., Walworth, N. C., & Novick, P. J. (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* **53**, 753-768, doi: 10.1016/0092-8674(88)90093-1
- Goulden, B. D., Pacheco, J., Dull, A., Zewe, J. P., Deiters, A., & Hammond, G. R. V. (2018). A high-avidity biosensor reveals plasma membrane PI(3,4)P2 is predominantly a class I PI3K signaling product. *J Cell Biol* **218**, 1066-1079, doi: 10.1083/jcb.201809026
- Grudnik, P., Bange, G., & Sinning, I. (2009). Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol Chem* **390**, 775-782, doi: 10.1515/BC.2009.102
- Guadagnolo, D., Piane, M., Torrisi, M. R., Pizzuti, A., & Petrucci, S. (2021). Genotype-phenotype correlations in monogenic Parkinson disease: a review on clinical and molecular findings. *Front Neurol* **12**, doi: 10.3389/fneur.2021.648588
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., & Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J* **18**, 1071-1080, doi: 10.1093/emboj/18.4.1071
- Guo, Y., Sun, Y., Song, Z., Zheng, W., Xiong, W., Yang, Y., Yuan, L., & Deng, H. (2021). Genetic Analysis and Literature Review of SNCA Variants in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* **13**, doi: 10.3389/fnagi.2021.648151

- Habeck, G., Ebner, F. A., Shimada-Kreft, H., & Kreft, S. G. (2015). The yeast ERAD-C ubiquitin ligase Doa10 recognizes an intramembrane degron. *J Cell Biol* **209**, 261-273, doi: 10.1083/jcb.201408088
- Han, G. S., Audhya, A., Markley, D. J., Emr, S. D., & Carman, G. M. (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* LSB6 gene encodes phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J Biol Chem* **277**, 47709-47718, doi: 10.1074/jbc.M207996200
- Handley, E. E., Pitman, K. A., Dawkins, E., Young, K. M., Clark, R. M., Jiang, T. C., Turner, B. J., Dickson, T. C., & Blizzard, C. A. (2016). Synapse dysfunction of layer v pyramidal neurons precedes neurodegeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathies. *Cereb Cortex* **27**, 3630-3647, doi: 10.1093/cercor/bhw185
- Harata, N., Ryan, T. A., Smith, S. J., Buchanan, J., & Tsien, R. W. (2001). Visualizing recycling synaptic vesicles in hippocampal neurons by FM 1-43 photoconversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12748-12753, doi: 10.1073/pnas.171442798
- Harterink, M., Port, F., Lorenowicz, M. J., McGough, I. J., Silhankova, M., Betist, M. C., van Weering, J. R. T., van Heesbeen, R. G. H. P., Middelkoop, T. C., Basler, K., Cullen, P. J., & Korswagen, H. C. (2011). A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nat Cell Biol* **13**, 914-923, doi: 10.1038/ncb2281
- Hasegawa, T., Konno, M., Baba, T., Sugeno, N., Kikuchi, A., Kobayashi, M., Miura, E., Tanaka, N., Tamai, K., Furukawa, K., Arai, H., Mori, F., Wakabayashi, K., Aoki, M., Itoyama, Y., & Takeda, A. (2011). The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -Synuclein. *PLOS ONE* **6**, e29460, doi: 10.1371/journal.pone.0029460
- Hawk, B. J. D., Khounlo, R., & Shin, Y.-K. (2019). Alpha-Synuclein continues to enhance SNARE-dependent vesicle docking at exorbitant concentrations. *Front Neurosci* **13**, doi: 10.3389/fnins.2019.00216
- Herman, P. K., & Emr, S. D. (1990). Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 6742-6754, doi: 10.1128/mcb.10.12.6742-6754.1990
- Hettema, E. H., Lewis, M. J., Black, M. W., & Pelham, H. R. (2003). Retromer and the sorting nexins Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *EMBO J* **22**, 548-557, doi: 10.1093/emboj/cdg062
- Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* **57**, 315-344, doi: 10.1083/jcb.57.2.315
- Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 215-223, doi: 10.1016/0955-0674(95)80031-X
- Holroyd, C., Kistner, U., Annaert, W., & Jahn, R. (1999). Fusion of endosomes involved in synaptic vesicle recycling. *Mol Biol Cell* **10**, 3035-3044, doi: 10.1091/mbc.10.9.3035
- Hoopmann, P., Punge, A., Barysch, S. V., Westphal, V., Bückers, J., Opazo, F., Bethani, I., Lauterbach, M. A., Hell, S. W., & Rizzoli, S. O. (2010). Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19055-19060, doi: 10.1073/pnas.1007037107
- Horikawa, H. P., Saisu, H., Ishizuka, T., Sekine, Y., Tsugita, A., Odani, S., & Abe, T. (1993). A complex of rab3A, SNAP-25, VAMP/synaptobrevin-2 and syntaxins in brain presynaptic terminals. *FEBS Lett* **330**, 236-240, doi: 10.1016/0014-5793(93)80281-x
- Horton, A. C., Rácz, B., Monson, E. E., Lin, A. L., Weinberg, R. J., & Ehlers, M. D. (2005). Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* **48**, 757-771, doi: 10.1016/j.neuron.2005.11.005

- Hsu, L. J., Mallory, M., Xia, Y., Veinbergs, I., Hashimoto, M., Yoshimoto, M., Thal, L. J., Saitoh, T., & Masliah, E. (1998). Expression pattern of Synucleins (non-A β component of Alzheimer's disease amyloid precursor protein/ α -Synuclein) during murine brain development. *J Neurochem* **71**, 338-344, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71010338.x
- Hu, J., Wei, M., Mirisola, M. G., & Longo, V. D. (2013). Assessing chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* **965**, 463-472, doi: 10.1007/978-1-62703-239-1_30
- Huang, M., Wang, B., Li, X., Fu, C., Wang, C., & Kang, X. (2019). α -Synuclein: a multifunctional player in exocytosis, endocytosis, and vesicle recycling. *Front Neurosci* **13**, doi: 10.3389/fnins.2019.00028
- Ilijina, M., Dear, A. J., Garcia, G. A., De, S., Tosatto, L., Flagmeier, P., Whiten, D. R., Michaels, T. C. T., Frenkel, D., Dobson, C. M., Knowles, T. P. J., & Klenerman, D. (2018). Quantifying co-oligomer formation by α -Synuclein. *ACS Nano* **12**, 10855-10866, doi: 10.1021/acsnano.8b03575
- Jacob, R. S., Eichmann, C., Dema, A., Mercadante, D., & Selenko, P. (2021). α -Synuclein plasma membrane localization correlates with cellular phosphatidylinositol polyphosphate levels. *Elife* **10**, e61951, doi: 10.7554/eLife.61951
- Jain, B. K., Duan, H. D., Valentine, C., Samiha, A., Li, H., & Graham, T. R. (2025). P4-ATPases control phosphoinositide membrane asymmetry and neomycin resistance. *Nat Cell Biol* **27**, 1114-1124, doi: 10.1038/s41556-025-01692-z
- Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zöchling, R., Boissl, K. W., & Reichmann, H. (1994). Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **169**, 126-128, doi: 10.1016/0304-3940(94)90372-7
- Jao, C. C., Der-Sarkissian, A., Chen, J., & Langen, R. (2004). Structure of membrane-bound α -synuclein studied by site-directed spin labeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8331-8336, doi: 10.1073/pnas.0400553101
- Jedd, G., Mulholland, J., & Segev, N. (1997). Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment. *J Cell Biol* **137**, 563-580, doi: 10.1083/jcb.137.3.563
- Jellinger, K. A. (2009). Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J Neurol* **256**, 270-279, doi: 10.1007/s00415-009-5243-y
- Jia, F., Fellner, A., & Kumar, K. R. (2022). Monogenic Parkinson's disease: genotype, phenotype, pathophysiology, and genetic testing. *Genes* **13**, 471, doi: 10.3390/genes13030471
- Jiang, K., Rocha, S., Westling, A., Kesarimangalam, S., Dorfman, K. D., Wittung-Stafshede, P., & Westerlund, F. (2018). Alpha-Synuclein modulates the physical properties of DNA. *Chemistry* **24**, 15685-15690, doi: 10.1002/chem.201803933
- Jin, N., Mao, K., Jin, Y., Tevzadze, G., Kauffman, E. J., Park, S., Bridges, D., Loewith, R., Saltiel, A. R., Klionsky, D. J., & Weisman, L. S. (2014). Roles for PI(3,5)P2 in nutrient sensing through TORC1. *Mol Biol Cell* **25**, 1171-1185, doi: 10.1091/mbc.e14-01-0021
- Johansson, E., Freuchet, A., Williams, G. P., Michealis, T., Frazier, A., Litvan, I., Goldman, J. G., Alcalay, R. N., Standaert, D. G., Amara, A. W., Stover, N., Fon, E. A., Postuma, R. B., Sidney, J., Sulzer, D., Lindestam Arlehamn, C. S., & Sette, A. (2025). T cell responses towards PINK1 and α -synuclein are elevated in prodromal Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis* **11**, 137, doi: 10.1038/s41531-025-01001-3
- Ju, S., Tardiff, D. F., Han, H., Divya, K., Zhong, Q., Maquat, L. E., Bosco, D. A., Hayward, L. J., Brown, R. H., Jr., Lindquist, S., Ringe, D., & Petsko, G. A. (2011). A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity. *PLOS Biol* **9**, e1001052, doi: 10.1371/journal.pbio.1001052

- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* **20**, 1992-2003, doi: 10.1091/mbc.e08-12-1249
- Kaganovich, D., Kopito, R., & Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**, 1088-1095, doi: 10.1038/nature07195
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* **386**, 896-912, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3
- Kametaka, S., Okano, T., Ohsumi, M., & Ohsumi, Y. (1998). Apg14p and Apg6/Vps30p form a protein complex essential for autophagy in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 22284-22291, doi: 10.1074/jbc.273.35.22284
- Karim, A. S., Curran, K. A., & Alper, H. S. (2013). Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res* **13**, 107-116, doi: 10.1111/1567-1364.12016
- Kiechle, M., Grozdanov, V., & Danzer, K. M. (2020). The role of lipids in the initiation of α -Synuclein misfolding. *Front Cell Dev Biol* **8**, doi: 10.3389/fcell.2020.562241
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., & Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **152**, 519-530, doi: 10.1083/jcb.152.3.519
- Kim, J., Huang, W. P., & Klionsky, D. J. (2001). Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J Cell Biol* **152**, 51-64, doi: 10.1083/jcb.152.1.51
- Klionsky, D. J. (2007). Monitoring autophagy in yeast: the Pho8Delta60 assay. *Methods Mol Biol* **390**, 363-371, doi: 10.1007/978-1-59745-466-7_24
- Klug, L., & Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res* **14**, 369-388, doi: 10.1111/1567-1364.12141
- Knorr, R. L., Dimova, R., & Lipowsky, R. (2012). Curvature of double-membrane organelles generated by changes in membrane size and composition. *PLOS ONE* **7**, e32753, doi: 10.1371/journal.pone.0032753
- Koike, S., & Jahn, R. (2024). Rab GTPases and phosphoinositides fine-tune SNAREs dependent targeting specificity of intracellular vesicle traffic. *Nat Comm* **15**, 2508, doi: 10.1038/s41467-024-46678-x
- Kontopoulos, E., Parvin, J. D., & Feany, M. B. (2006). Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum Mol Genet* **15**, 3012-3023, doi: 10.1093/hmg/ddl243
- Köroğlu, Ç., Baysal, L., Cetinkaya, M., Karasoy, H., & Tolun, A. (2013). DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Relat Disord* **19**, 320-324, doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.11.006
- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., & Nakatogawa, H. (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 10363-10368, doi: 10.1073/pnas.1806727115
- Krebs, C. E., Karkheiran, S., Powell, J. C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., Di Paolo, G., Walker, R. H., Shahidi, G. A., Buxbaum, J. D., De Camilli, P., Yue, Z., & Paisán-Ruiz, C. (2013). The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mut* **34**, 1200-1207, doi: 10.1002/humu.22372
- Krick, R., Sandra, H., Joern, T., & Thumm, M. (2008). Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy* **4**, 896-910, doi: 10.4161/auto.6801

- Krick, R., Tolstrup, J., Appelles, A., Henke, S., & Thumm, M. (2006). The relevance of the phosphatidylinositolphosphat-binding motif FRRGT of Atg18 and Atg21 for the Cvt pathway and autophagy. *FEBS Lett* **580**, 4632-4638, doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.041
- Krobitsch, S., & Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1589-1594, doi: 10.1073/pnas.97.4.1589
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schöls, L., & Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* **18**, 106-108, doi: 10.1038/ng0298-106
- Künzler, M., Braus, G. H., Georgiev, O., Seipel, K., & Schaffner, W. (1994). Functional differences between mammalian transcription activation domains at the yeast GAL1 promoter. *EMBO J* **13**, 641-645, doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06302.x
- Kurokawa, Y., Konishi, R., Yoshida, A., Tomioku, K., Futagami, T., Tamaki, H., Tanabe, K., & Fujita, A. (2019). Essential and distinct roles of phosphatidylinositol 4-kinases, Pik1p and Stt4p, in yeast autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1864**, 1214-1225, doi: 10.1016/j.bbalip.2019.05.004
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of Meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979-980, doi: 10.1126/science.6823561
- Lee, J. Y., Marian, O. C., & Don, A. S. (2021). Defective lysosomal lipid catabolism as a common pathogenic mechanism for dementia. *Neuromolecular Med* **23**, 1-24, doi: 10.1007/s12017-021-08644-4
- Leenders, A. G. M., da Silva, F. H. L., Ghijsen, W. E. J. M., & Verhage, M. (2001). Rab3A is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol Biol Cell* **12**, 3095-3102, doi: 10.1091/mbc.12.10.3095
- Lehner, K. R., Jiang, K., Rincon-Torroella, J., Perera, R., & Bettgowda, C. (2023). Cerebrospinal Fluid biomarkers in pediatric brain tumors: a systematic review. *Neoplasia* **35**, 100852, doi: 10.1016/j.neo.2022.100852
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**, 201-213, doi: 10.1034/j.1600-0854.2004.00071.x
- Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Björklund, 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. *Nat Med* **14**, 501-503, doi: 10.1038/nm1746
- Li, S., Zhang, J., Liu, C., Wang, Q., Yan, J., Hui, L., Jia, Q., Shan, H., Tao, L., & Zhang, M. (2021). The role of mitophagy in regulating cell death. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, 6617256, doi: 10.1155/2021/6617256
- Li, T., Cheng, Q., Wang, S., & Ma, C. (2022). Rabphilin 3A binds the N-peptide of SNAP-25 to promote SNARE complex assembly in exocytosis. *Elife* **11**, e79926, doi: 10.7554/eLife.79926
- Li, W., Lesuisse, C., Xu, Y., Troncoso, J. C., Price, D. L., & Lee, M. K. (2004). Stabilization of α -Synuclein protein with aging and familial Parkinson's disease-linked A53T mutation. *J Neurosci* **24**, 7400-7409, doi: 10.1523/jneurosci.1370-04.2004
- Li, Y., Li, S., & Wu, H. (2022). Ubiquitination-proteasome system (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress. *Cells* **11**, doi: 10.3390/cells11050851
- Lindersson, E., Beedholm, R., Højrup, P., Moos, T., Gai, W., Hendil, K. B., & Jensen, P. H. (2004). Proteasomal inhibition by α -Synuclein filaments and oligomers. *J Biol Chem* **279**, 12924-12934, doi: 10.1074/jbc.M306390200

- Ling, Y., Stefan, C. J., Macgurn, J. A., Audhya, A., & Emr, S. D. (2012). The dual PH domain protein Opy1 functions as a sensor and modulator of PtdIns(4,5)P₂ synthesis. *EMBO J* **31**, 2882-2894, doi: 10.1038/emboj.2012.127
- Liu, C., Zhao, Y., Xi, H., Jiang, J., Yu, Y., & Dong, W. (2021). The membrane interaction of Alpha-Synuclein. *Front Cell Neurosci* **15**, 633727, doi: 10.3389/fncel.2021.633727
- Liu, C. W., Giasson, B. I., Lewis, K. A., Lee, V. M., Demartino, G. N., & Thomas, P. J. (2005). A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. *J Biol Chem* **280**, 22670-22678, doi: 10.1074/jbc.M501508200
- Liu, G. T., Kochlamazashvili, G., Puchkov, D., Müller, R., Schultz, C., Mackintosh, A. I., Vollweiler, D., Haucke, V., & Soykan, T. (2022). Endosomal phosphatidylinositol 3-phosphate controls synaptic vesicle cycling and neurotransmission. *EMBO J* **41**, e109352, doi: 10.15252/emboj.2021109352
- Liu, H., Koros, C., Strohäker, T., Schulte, C., Bozi, M., Varvaresos, S., Ibáñez de Opakua, A., Simiti, A. M., Bougea, A., Voumvourakis, K., Maniati, M., Papageorgiou, S. G., Hauser, A.-K., Becker, S., Zweckstetter, M., Stefanis, L., & Gasser, T. (2021). A novel SNCA A30G mutation causes familial Parkinson's disease. *Mov Disord* **36**, 1624-1633, doi: 10.1002/mds.28534
- Liu, J.-J. (2016). Retromer-mediated protein sorting and vesicular trafficking. *J Genet Genomics* **43**, 165-177, doi: 10.1016/j.jgg.2016.02.006
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Loijens, J. C., & Anderson, R. A. (1996). Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* **271**, 32937-32943, doi: 10.1074/jbc.271.51.32937
- Longatti, A., & Tooze, S. A. (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ* **16**, 956-965, doi: 10.1038/cdd.2009.39
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* **50**, 325-328, doi: 10.2144/000113672
- Löser, T., Bekbulat, F., Behl, C., & Schepers, J. (2025). Phosphatidylinositol 3-phosphate metabolism impacts cellular α -Synuclein localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 110666, doi: 10.1016/j.jbc.2025.110666
- Lou, X., Kim, J., Hawk, B. J., & Shin, Y.-K. (2017). α -Synuclein may cross-bridge v-SNARE and acidic phospholipids to facilitate SNARE-dependent vesicle docking. *Biochem J* **474**, 2039-2049, doi: 10.1042/bcj20170200
- Lv, G., Ko, M. S., Das, T., & Eliezer, D. (2022). Molecular and functional interactions of alpha-synuclein with Rab3a. *J Biol Chem* **298**, 102239, doi: 10.1016/j.jbc.2022.102239
- Madeira, F., Madhusoodanan, N., Lee, J., Eusebi, A., Niewielska, A., Tivey, A. R. N., Lopez, R., & Butcher, S. (2024). The EMBL-EBI job dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res* **52**, W521-W525, doi: 10.1093/nar/gkae241
- Mak, S. K., McCormack, A. L., Manning-Boğ, A. B., Cuervo, A. M., & Di Monte, D. A. (2010). Lysosomal degradation of α -Synuclein in vivo. *J Biol Chem* **285**, 13621-13629, doi: 10.1074/jbc.M109.074617
- Makasewicz, K., Carlström, G., Stenström, O., Bernfur, K., Fridolf, S., Akke, M., Linse, S., & Sparr, E. (2024). Tipping point in α -synuclein-membrane interactions from stable protein-covered vesicles to amyloid aggregation. *Cell Rep Phys Sci* **5**, doi: 10.1016/j.xcrp.2024.102309

- Malkus, K. A., & Ischiropoulos, H. (2012). Regional deficiencies in chaperone-mediated autophagy underlie α -synuclein aggregation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* **46**, 732-744, doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.017
- Mann, V. M., Cooper, J. M., Krige, D., Daniel, S. E., Schapira, A. H. V., & Marsden, C. D. (1992). Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* **115**, 333-342, doi: 10.1093/brain/115.2.333
- Manzanza, N. O., Sedlackova, L., & Kalaria, R. N. (2021). Alpha-Synuclein post-translational modifications: implications for pathogenesis of Lewy body disorders. *Front Aging Neurosci* **13**, 690293, doi: 10.3389/fnagi.2021.690293
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* **8**, 2804-2815, doi: 10.1523/jneurosci.08-08-02804.1988
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.-C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P. T., Sulzer, D., & Cuervo, A. M. (2008). Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* **118**, 777-788, doi: 10.1172/JCI32806
- Martinez, Z., Zhu, M., Han, S., & Fink, A. L. (2007). GM1 specifically interacts with alpha-synuclein and inhibits fibrillation. *Biochemistry* **46**, 1868-1877, doi: 10.1021/bi061749a
- Matteoli, M., Takei, K., Perin, M., Südhof, T., & De Camilli, P. (1992). Exo-endocytotic recycling of synaptic vesicles in developing processes of cultured hippocampal neurons. *J Cell Biol* **117**, 849-861, doi: 10.1083/jcb.117.4.849
- McCormack, A. L., Mak, S. K., Henderson, J. M., Bumcrot, D., Farrer, M. J., & Di Monte, D. A. (2010). α -Synuclein suppression by targeted small interfering RNA in the primate substantia nigra. *PLOS ONE* **5**, e12122, doi: 10.1371/journal.pone.0012122
- McNally, K. E., Faulkner, R., Steinberg, F., Gallon, M., Ghai, R., Pim, D., Langton, P., Pearson, N., Danson, C. M., Nägele, H., Morris, L. L., Singla, A., Overlee, Brittany L., Heesom, K. J., Sessions, R., Banks, L., Collins, B. M., Berger, I., Billadeau, D. D., et al. (2017). Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nat Cell Biol* **19**, 1214-1225, doi: 10.1038/ncb3610
- Menezes, R., Tenreiro, S., Macedo, D., Santos, C. N., & Outeiro, T. F. (2015). From the baker to the bedside: yeast models of Parkinson's disease. *Microb Cell* **2**, 262-279, doi: 10.15698/mic2015.08.219
- Menges, S., Minakaki, G., Schaefer, P. M., Meixner, H., Prots, I., Schlötzer-Schrehardt, U., Friedland, K., Winner, B., Outeiro, T. F., Winklhofer, K. F., von Arnim, C. A., Xiang, W., Winkler, J., & Klucken, J. (2017). Alpha-synuclein prevents the formation of spherical mitochondria and apoptosis under oxidative stress. *Sci Rep* **7**, 42942, doi: 10.1038/srep42942
- Middleton, E. R., & Rhoades, E. (2010). Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys J* **99**, 2279-2288, doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.056
- Mielke, M. M., Maetzler, W., Haughey, N. J., Bandaru, V. V. R., Savica, R., Deuschle, C., Gasser, T., Hauser, A.-K., Gräber-Sultan, S., Schleicher, E., Berg, D., & Liepelt-Scarfone, I. (2013). Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study. *PLOS ONE* **8**, e73094, doi: 10.1371/journal.pone.0073094
- Miraglia, F., Ricci, A., Rota, L., & Colla, E. (2018). Subcellular localization of alpha-synuclein aggregates and their interaction with membranes. *Neural Regen Res* **13**, 1136-1144, doi: 10.4103/1673-5374.235013

- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* **19**, 679-682, doi: 10.1038/s41592-022-01488-1
- Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., & Novick, P. (2010). Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev Cell* **18**, 828-840, doi: 10.1016/j.devcel.2010.03.016
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., & Nagatsu, T. (1996). Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **211**, 13-16, doi: 10.1016/0304-3940(96)12706-3
- Mohite, G. M., Kumar, R., Panigrahi, R., Navalkar, A., Singh, N., Datta, D., Mehra, S., Ray, S., Gadhe, L. G., Das, S., Singh, N., Chatterjee, D., Kumar, A., & Maji, S. K. (2018). Comparison of kinetics, toxicity, oligomer formation, and membrane binding capacity of α -Synuclein familial mutations at the A53 site, including the newly discovered A53V mutation. *Biochemistry* **57**, 5183-5187, doi: 10.1021/acs.biochem.8b00314
- Moors, T. E., Maat, C. A., Niedieker, D., Mona, D., Petersen, D., Timmermans-Huisman, E., Kole, J., El-Mashtoly, S. F., Spycher, L., Zago, W., Barbour, R., Mundigl, O., Kaluza, K., Huber, S., Hug, M. N., Kremer, T., Ritter, M., Dziadek, S., Geurts, J. J. G., et al. (2021). The subcellular arrangement of alpha-synuclein proteoforms in the Parkinson's disease brain as revealed by multicolor STED microscopy. *Acta Neuropathol* **142**, 423-448, doi: 10.1007/s00401-021-02329-9
- Morris, A. M., & Finke, R. G. (2009). Alpha-synuclein aggregation variable temperature and variable pH kinetic data: a re-analysis using the Finke-Watzky 2-step model of nucleation and autocatalytic growth. *Biophys Chem* **140**, 9-15, doi: 10.1016/j.bpc.2008.11.003
- Mortiboys, H., Thomas, K. J., Koopman, W. J. H., Klaffke, S., Abou-Sleiman, P., Olpin, S., Wood, N. W., Willems, P. H. G. M., Smeitink, J. A. M., Cookson, M. R., & Bandmann, O. (2008). Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Ann Neurol* **64**, 555-565, doi: 10.1002/ana.21492
- Mousley, C. J., Tyeryar, K., Ile, K. E., Schaaf, G., Brost, R. L., Boone, C., Guan, X., Wenk, M. R., & Bankaitis, V. A. (2008). Trans-Golgi network and endosome dynamics connect ceramide homeostasis with regulation of the unfolded protein response and TOR signaling in yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 4785-4803, doi: 10.1091/mbc.e08-04-0426
- Nagatsu, T., & Sawada, M. (2009). L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism Relat Disord* **15**, S3-S8, doi: 10.1016/S1353-8020(09)70004-5
- Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., Sesaki, H., Cheng, Y., Finkbeiner, S., Nussbaum, R. L., Masliah, E., & Edwards, R. H. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* **286**, 20710-20726, doi: 10.1074/jbc.M110.213538
- Nalls, M. A., Duran, R., Lopez, G., Kurzawa-Akanbi, M., McKeith, I. G., Chinnery, P. F., Morris, C. M., Theuns, J., Crosiers, D., Cras, P., Engelborghs, S., De Deyn, P. P., Van Broeckhoven, C., Mann, D. M., Snowden, J., Pickering-Brown, S., Halliwell, N., Davidson, Y., Gibbons, L., et al. (2013). A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA Neurol* **70**, 727-735, doi: 10.1001/jamaneurol.2013.1925
- Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., DeStefano, A. L., Kara, E., Bras, J., Sharma, M., Schulte, C., Keller, M. F., Arepalli, S., Letson, C., Edsall, C., Stefansson, H., Liu, X., Pliner, H., Lee, J. H., et al. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet* **46**, 989-993, doi: 10.1038/ng.3043
- Naslavsky, N., & Caplan, S. (2018). The enigmatic endosome - sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci* **131**, doi: 10.1242/jcs.216499

- Natarajan, P., Liu, K., Patil, D. V., Sciorra, V. A., Jackson, C. L., & Graham, T. R. (2009). Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGEF. *Nat Cell Biol* **11**, 1421-1426, doi: 10.1038/ncb1989
- Neystat, M., Rzhetskaya, M., Kholodilov, N., & Burke, R. E. (2002). Analysis of synphilin-1 and synuclein interactions by yeast two-hybrid β -galactosidase liquid assay. *Neurosci Lett* **325**, 119-123, doi: 10.1016/S0304-3940(02)00253-7
- Nice, D. C., Sato, T. K., Stromhaug, P. E., Emr, S. D., & Klionsky, D. J. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem* **277**, 30198-30207, doi: 10.1074/jbc.M204736200
- Nikawa, J.-i., & Yamashita, S. (1984). Molecular cloning of the gene encoding CDPdiacylglycerol-inositol 3-phosphatidyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **143**, 251-256, doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08366.x
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahlijanian, M., Lau, L. F., & Duff, K. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* **38**, 555-565, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00259-9
- Nordengen, K., & Morland, C. (2024). From synaptic physiology to synaptic pathology: the enigma of α -Synuclein. *Int J Mol Sci* **25**, 986, doi: 10.3390/ijms25020986
- Norris, A. C., Mansueto, A. J., Jimenez, M., Yazlovitskaya, E. M., Jain, B. K., & Graham, T. R. (2024). Flipping the script: advances in understanding how and why P4-ATPases flip lipid across membranes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1871**, 119700, doi: 10.1016/j.bbamcr.2024.119700
- Obara, K., Noda, T., Niimi, K., & Ohsumi, Y. (2008). Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **13**, 537-547, doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01188.x
- Ohashi, Y., Tremel, S., & Williams, R. L. (2019). VPS34 complexes from a structural perspective. *J Lipid Res* **60**, 229-241, doi: 10.1194/jlr.R089490
- Oliveira, L. M., Falomir-Lockhart, L. J., Botelho, M. G., Lin, K. H., Wales, P., Koch, J. C., Gerhardt, E., Taschenberger, H., Outeiro, T. F., Lingor, P., Schüle, B., Arndt-Jovin, D. J., & Jovin, T. M. (2015). Elevated α -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. *Cell Death Dis* **6**, e1994, doi: 10.1038/cddis.2015.318
- Orenstein, S. J., & Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 719-726, doi: 10.1016/j.semcdb.2010.02.005
- Ortiz, D., Medkova, M., Walch-Solimena, C., & Novick, P. (2002). Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J Cell Biol* **157**, 1005-1016, doi: 10.1083/jcb.200201003
- Oueslati, A., Fournier, M., & Lashuel, H. A. (2010). Chapter 7 - Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of α -synuclein: Implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. In A. Björklund & M. A. Cenci (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 183, pp. 115-145). Elsevier, doi:10.1016/S0079-6123(10)83007-9
- Outeiro, T. F., & Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* **302**, 1772-1775, doi: 10.1126/science.1090439
- Pagano, R. E., & Sleight, R. G. (1985). Defining lipid transport pathways in animal cells. *Science* **229**, 1051-1057, doi: 10.1126/science.4035344

- Paiva, I., Jain, G., Lázaro, D. F., Jerčić, K. G., Hentrich, T., Kerimoglu, C., Pinho, R., Szegő, È. M., Burkhardt, S., Capece, V., Halder, R., Islam, R., Xylaki, M., Caldi Gomes, L. A., Roser, A.-E., Lingor, P., Schulze-Hentrich, J. M., Borovečki, F., Fischer, A., & Outeiro, T. F. (2018). Alpha-synuclein deregulates the expression of COL4A2 and impairs ER-Golgi function. *Neurobiol Dis* **119**, 121-135, doi: 10.1016/j.nbd.2018.08.001
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., Schwartz, S. L., DiProspero, N. A., Knight, M. A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D. L., Garza, D., Hubbert, C. C., Yao, T.-P., Baehrecke, E. H., & Taylor, J. P. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* **447**, 860-864, doi: 10.1038/nature05853
- Pankratz, N., & Foroud, T. (2007). Genetics of Parkinson disease. *Genet Med* **9**, 801-811, doi: 10.1097/GIM.0b013e31815bf97c
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1837**, 408-417, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.10.006
- Parkinson, J. (2002 [1817]). An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **14**, 223-236; discussion 222, doi: 10.1176/jnp.14.2.223
- Pearce, R. K. B., Owen, A., Daniel, S., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1997). Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* **104**, 661-677, doi: 10.1007/BF01291884
- Pereira-Leal, J. B., & Seabra, M. C. (2001). Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**, 889-901, doi: 10.1006/jmbi.2001.5072
- Perni, M., van der Goot, A., Limbocker, R., van Ham, T. J., Aprile, F. A., Xu, C. K., Flagmeier, P., Thijssen, K., Sormanni, P., Fusco, G., Chen, S. W., Challa, P. K., Kirkegaard, J. B., Laine, R. F., Ma, K. Y., Müller, M. B. D., Sinnige, T., Kumita, J. R., Cohen, S. I. A., et al. (2021). Comparative studies in the A30P and A53T α -Synuclein *C. elegans* strains to investigate the molecular origins of Parkinson's disease. *Front Cell Dev Biol* **9**, doi: 10.3389/fcell.2021.552549
- Petroi, D., Popova, B., Taheri-Talesh, N., Imniger, S., Shahpasandzadeh, H., Zweckstetter, M., Outeiro, T. F., & Braus, G. H. (2012). Aggregate clearance of α -Synuclein in *Saccharomyces cerevisiae* depends more on autophagosome and vacuole function than on the proteasome. *J Biol Chem* **287**, 27567-27579, doi: 10.1074/jbc.M112.361865
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Phillips, M. J., & Voeltz, G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 69-82, doi: 10.1038/nrm.2015.8
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* **85**, 257-273, doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.007
- Piffl, C., Rajput, A., Reither, H., Blesa, J., Cavada, C., Obeso, J. A., Rajput, A. H., & Hornykiewicz, O. (2014). Is Parkinson's disease a vesicular dopamine storage disorder? Evidence from a study in isolated synaptic vesicles of human and nonhuman primate striatum. *J Neurosci* **34**, 8210-8218, doi: 10.1523/jneurosci.5456-13.2014
- Pike, S. C., Havrda, M., Gilli, F., Zhang, Z., & Salas, L. A. (2024). Immunological shifts during early-stage Parkinson's disease identified with DNA methylation data on longitudinally collected blood samples. *NPJ Parkinsons Dis* **10**, 21, doi: 10.1038/s41531-023-00626-6
- Pirc, K., & Ulrih, N. P. (2015). α -Synuclein interactions with phospholipid model membranes: key roles for electrostatic interactions and lipid-bilayer structure. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 2002-2012, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.06.021

- Polson, H. E. J., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M. J., & Tooze, S. A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**, 506-522, doi: 10.4161/auto.6.4.11863
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -Synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045-2047, doi: 10.1126/science.276.5321.2045
- Popova, B., Galka, D., Häffner, N., Wang, D., Schmitt, K., Valerius, O., Knop, M., & Braus, G. H. (2021). α -Synuclein decreases the abundance of proteasome subunits and alters ubiquitin conjugates in yeast. *Cells* **10**, 2229, doi: 10.3390/cells10092229
- Postuma, R. B., Aarsland, D., Barone, P., Burn, D. J., Hawkes, C. H., Oertel, W., & Ziemssen, T. (2012). Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord* **27**, 617-626, doi: 10.1002/mds.24996
- Qin, X.-Y., Zhang, S.-P., Cao, C., Loh, Y. P., & Cheng, Y. (2016). Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol* **73**, 1316-1324, doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2742
- Rajasekaran, S., Patel, D., & Witt, S. N. (2022). alpha-synuclein and phosphoinositide-binding proteins: alpha-synuclein inhibits the association of PX- but not FYVE-containing proteins with vesicles in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **603**, 7-12, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.01.101
- Rajasekaran, S., Peterson, P. P., Liu, Z., Robinson, L. C., & Witt, S. N. (2021). α -synuclein inhibits Snx3-retromer retrograde trafficking of the conserved membrane-bound proprotein convertase Kex2 in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* **31**, 705-717, doi: 10.1093/hmg/ddab284
- Rand, J. D., & Grant, C. M. (2006). The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell* **17**, 387-401, doi: 10.1091/mbc.e05-06-0520
- Ray, J., Sapp, D. G., & Fairn, G. D. (2024). Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate: Out of the shadows and into the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* **88**, 102372, doi: 10.1016/j.ceb.2024.102372
- Reidick, C., Boutouja, F., & Platta, H. W. (2017). The class III phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **398**, 677-685, doi: 10.1515/hsz-2016-0288
- Reinhart, E. F., Katzenell, S., Andhare, D., Bauer, K. M., & Ragusa, M. J. (2022). A comparative analysis of the membrane binding and remodeling properties of two related sorting nexin complexes involved in autophagy. *Biochemistry* doi: 10.1021/acs.biochem.2c00007
- Reinisch, K. M., & Prinz, W. A. (2021). Mechanisms of nonvesicular lipid transport. *J Cell Biol* **220**, doi: 10.1083/jcb.202012058
- Richards, D. A., Guatimosim, C., Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2003). Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. *Neuron* **39**, 529-541, doi: 10.1016/S0896-6273(03)00405-7
- Riederer, P., & Laux, G. (2011). MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol* **20**, 1-17, doi: 10.5607/en.2011.20.1.1
- Rivero-Rios, P., Tsukahara, T., Uygun, T., Chen, A., Chavis, G. D., Giridharan, S. S. P., Iwase, S., Sutton, M. A., & Weisman, L. S. (2023). Recruitment of the SNX17-Retriver recycling pathway regulates synaptic function and plasticity. *J Cell Biol* **222**, doi: 10.1083/jcb.202207025

- Rizalar, F. S., Lucht, M. T., Petzoldt, A., Kong, S., Sun, J., Vines, J. H., Telugu, N. S., Diecke, S., Kaas, T., Bullmann, T., Schmied, C., Löwe, D., King, J. S., Cho, W., Hallermann, S., Puchkov, D., Sigrist, S. J., & Haucke, V. (2023). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate facilitates axonal vesicle transport and presynapse assembly. *Science* **382**, 223-230, doi: 10.1126/science.adg1075
- Rodriguez, J. A., Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Cascio, D., Reyes, F. E., Shi, D., Sangwan, S., Guenther, E. L., Johnson, L. M., Zhang, M., Jiang, L., Arbing, M. A., Nannenga, B. L., Hattne, J., Whitelegge, J., Brewster, A. S., Messerschmidt, M., Boutet, S., Sauter, N. K., et al. (2015). Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals. *Nature* **525**, 486-490, doi: 10.1038/nature15368
- Rossi, G., Salminen, A., Rice, L. M., Brünger, A. T., & Brennwald, P. (1997). Analysis of a yeast SNARE complex reveals remarkable similarity to the neuronal SNARE complex and a novel function for the C terminus of the SNAP-25 homolog, Sec9. *J Biol Chem* **272**, 16610-16617, doi: 10.1074/jbc.272.26.16610
- Rostislavleva, K., Soler, N., Ohashi, Y., Zhang, L., Pardon, E., Burke, J. E., Masson, G. R., Johnson, C., Steyaert, J., Ktistakis, N. T., & Williams, R. L. (2015). Structure and flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes. *Science* **350**, aac7365, doi: 10.1126/science.aac7365
- Rovere, M., Powers, A. E., Jiang, H., Pitino, J. C., Fonseca-Ornelas, L., Patel, D. S., Achille, A., Langen, R., Varkey, J., & Bartels, T. (2019). E46K-like α -synuclein mutants increase lipid interactions and disrupt membrane selectivity. *J Biol Chem* **294**, 9799-9812, doi: 10.1074/jbc.RA118.006551
- Roy, S., Winton, M. J., Black, M. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2007). Rapid and intermittent cotransport of slow component-b proteins. *J Neurosci* **27**, 3131-3138, doi: 10.1523/jneurosci.4999-06.2007
- Ruf, V. C., Nübling, G. S., Willikens, S., Shi, S., Schmidt, F., Levin, J., Bötzel, K., Kamp, F., & Giese, A. (2019). Different effects of α -Synuclein mutants on lipid binding and aggregation detected by single molecule fluorescence spectroscopy and ThT fluorescence-based measurements. *ACS Chem Neurosci* **10**, 1649-1659, doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00579
- Rusten, T. E., & Stenmark, H. (2006). Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins. *Nat Methods* **3**, 251-258, doi: 10.1038/nmeth867
- Rusten, T. E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L. M. W., Nezis, I. P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.-P., Brech, A., Bilder, D., & Stenmark, H. (2007). ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* **17**, 1817-1825, doi: 10.1016/j.cub.2007.09.032
- Ryu, S., Baek, I., & Liew, H. (2019). Sumoylated α -synuclein translocates into the nucleus by karyopherin $\alpha 6$. *Mol Cell Toxicol* **15**, 103-109, doi: 10.1007/s13273-019-0012-1
- Saeki, Y., Toh-e, A., Kudo, T., Kawamura, H., & Tanaka, K. (2009). Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell* **137**, 900-913, doi: 10.1016/j.cell.2009.05.005
- Saha, S., Ash, P. E. A., Gowda, V., Liu, L., Shirihai, O., & Wolozin, B. (2015). Mutations in LRRK2 potentiate age-related impairment of autophagic flux. *Mol Neurodegener* **10**, 26, doi: 10.1186/s13024-015-0022-y
- Sampaio-Marques, B., Felgueiras, C., Silva, A., Rodrigues, M., Tenreiro, S., Franssens, V., Reichert, A. S., Outeiro, T. F., Winderickx, J., & Ludovico, P. (2012). SNCA (α -synuclein)-induced toxicity in yeast cells is dependent on Sir2-mediated mitophagy. *Autophagy* **8**, 1494-1509, doi: 10.4161/auto.21275
- Sampaio-Marques, B., Guedes, A., Vasilevskiy, I., Gonçalves, S., Outeiro, T. F., Winderickx, J., Burhans, W. C., & Ludovico, P. (2019). α -Synuclein toxicity in yeast and human cells is caused by cell cycle re-entry and autophagy degradation of ribonucleotide reductase 1. *Aging Cell* **18**, e12922, doi: 10.1111/accel.12922

- Santiago-Tirado, F. H., & Bretscher, A. (2011). Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* **21**, 515-525, doi: 10.1016/j.tcb.2011.05.005
- Santiago-Tirado, F. H., Legesse-Miller, A., Schott, D., & Bretscher, A. (2011). PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev Cell* **20**, 47-59, doi: 10.1016/j.devcel.2010.11.006
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101, doi: 10.1126/science.1106148
- Sarkar, S., Olsen, A. L., Sygnecka, K., Lohr, K. M., & Feany, M. B. (2021). α -synuclein impairs autophagosome maturation through abnormal actin stabilization. *PLOS Genet* **17**, e1009359, doi: 10.1371/journal.pgen.1009359
- Sarmiento, M. J., Llorente, A., Petan, T., Khnykin, D., Popa, I., Nikolac Perkovic, M., Konjevod, M., & Jaganjac, M. (2023). The expanding organelle lipidomes: current knowledge and challenges. *Cell Mol Life Sci* **80**, 237, doi: 10.1007/s00018-023-04889-3
- Saxton, W. M., & Hollenbeck, P. J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* **125**, 2095-2104, doi: 10.1242/jcs.053850
- Schepers, J., & Behl, C. (2021). Lipid droplets and autophagy-links and regulations from yeast to humans. *J Cell Biochem* **122**, 602-611, doi: 10.1002/jcb.29889
- Schepers, J., Löser, T., & Behl, C. (2024). Lipids and α -Synuclein: adding further variables to the equation. *Front Mol Biosci* **11**, doi: 10.3389/fmolb.2024.1455817
- Schiestl, R. H., & Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**, 339-346, doi: 10.1007/bf00340712
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682, doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schluter, O. M., Basu, J., Sudhof, T. C., & Rosenmund, C. (2006). Rab3 superprimers synaptic vesicles for release: implications for short-term synaptic plasticity. *J Neurosci* **26**, 1239-1246, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3553-05.2006
- Schulte, C., & Gasser, T. (2011). Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet* **4**, 67-80, doi: 10.2147/tacg.S11639
- Seddon, J. M. (1990). Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta Rev Biomembr* **1031**, 1-69, doi: 10.1016/0304-4157(90)90002-T
- Segrest, J. P., De Loof, H., Dohlman, J. G., Brouillette, C. G., & Anantharamaiah, G. M. (1990). Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins: Struct, Funct, Bioinf* **8**, 103-117, doi: 10.1002/prot.340080202
- Semchyshyn, H. M., & Valishkevych, B. V. (2016). Hormetic effect of H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of TOR and glutathione reductase. *Dose Response* **14**, 1559325816636130, doi: 10.1177/1559325816636130
- Shahmoradian, S. H., Lewis, A. J., Genoud, C., Hench, J., Moors, T. E., Navarro, P. P., Castano-Diez, D., Schweighauser, G., Graff-Meyer, A., Goldie, K. N., Sutterlin, R., Huisman, E., Ingrassia, A., Gier, Y., Rozemuller, A. J. M., Wang, J., Paepe, A., Erny, J., Staempfli, A., et al. (2019). Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci* **22**, 1099-1109, doi: 10.1038/s41593-019-0423-2
- Sharma, M., & Burré, J. (2023). α -Synuclein in synaptic function and dysfunction. *Trends Neurosci* **46**, 153-166, doi: 10.1016/j.tins.2022.11.007

- Shelton, S. N., Barylko, B., Binns, D. D., Horazdovsky, B. F., Albanesi, J. P., & Goodman, J. M. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* contains a Type II phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J* **371**, 533-540, doi: 10.1042/BJ20021407
- Shin, J. J. H., Liu, P., Chan, L. J., Ullah, A., Pan, J., Borchers, C. H., Burke, J. E., Stefan, C., Smits, G. J., & Loewen, C. J. R. (2020). pH biosensing by PI4P regulates cargo sorting at the TGN. *Dev Cell* **52**, 461-476.e464, doi: 10.1016/j.devcel.2019.12.010
- Siegel, D. P. (1999). The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys J* **76**, 291-313, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77197-3
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27, doi: 10.1093/genetics/122.1.19
- Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S. W., Hernandez, D. G., Krüger, R., Federoff, M., Klein, C., Goate, A., Perlmutter, J., Bonin, M., Nalls, M. A., Illig, T., Gieger, C., et al. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* **41**, 1308-1312, doi: 10.1038/ng.487
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572, doi: 10.1038/42408
- Simonsen, A., Gaullier, J.-M., D'Arrigo, A., & Stenmark, H. (1999). The Rab5 effector EEA1 interacts directly with Syntaxin-6. *J Biol Chem* **274**, 28857-28860, doi: 10.1074/jbc.274.41.28857
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.-M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.-H., Murphy, C., Zerial, M., & Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498, doi: 10.1038/28879
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Soper, J. H., Kehm, V., Burd, C. G., Bankaitis, V. A., & Lee, V. M. (2011). Aggregation of alpha-synuclein in *S. cerevisiae* is associated with defects in endosomal trafficking and phospholipid biosynthesis. *J Mol Neurosci* **43**, 391-405, doi: 10.1007/s12031-010-9455-5
- Soper, J. H., Roy, S., Stieber, A., Lee, E., Wilson, R. B., Trojanowski, J. Q., Burd, C. G., & Lee, V. M. (2008). Alpha-synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **19**, 1093-1103, doi: 10.1091/mbc.e07-08-0827
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840, doi: 10.1038/42166
- Srivastava, T., Raj, R., Dubey, A., Kumar, D., Chaturvedi, R. K., Sharma, S. K., & Priya, S. (2020). Fast kinetics of environmentally induced α -synuclein aggregation mediated by structural alteration in NAC region and result in structure dependent cytotoxicity. *Sci Rep* **10**, 18412, doi: 10.1038/s41598-020-75361-6
- Stack, J. H., & Emr, S. D. (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *J Biol Chem* **269**, 31552-31562, doi: -
- Stack, J. H., Herman, P. K., Schu, P. V., & Emr, S. D. (1993). A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J* **12**, 2195-2204, doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05867.x
- Steinfeld, N., Lahiri, V., Morrison, A., Metur, S. P., Klionsky, D. J., & Weisman, L. S. (2021). Elevating PI3P drives select downstream membrane trafficking pathways. *Mol Biol Cell* **32**, 143-156, doi: 10.1091/mbc.E20-03-0191

- Steinmetz, J. D., Seeher, K. M., Schiess, N., Nichols, E., Cao, B., Servili, C., Cavallera, V., Cousin, E., Hagins, H., Moberg, M. E., Mehlman, M. L., Abate, Y. H., Abbas, J., Abbasi, M. A., Abbasian, M., Abbastabar, H., Abdelmasseh, M., Abdollahi, M., Abdollahi, M., et al. (2024). Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Neurol* **23**, 344-381, doi: 10.1016/S1474-4422(24)00038-3
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513-525, doi: 10.1038/nrm2728
- Stockinger, W., Sailer, B., Strasser, V., Recheis, B., Fasching, D., Kahr, L., Schneider, W. J., & Nimpf, J. (2002). The PX-domain protein SNX17 interacts with members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor. *EMBO J* **21**, 4259-4267, doi: 10.1093/emboj/cdf435
- Strahl, T., & Thorner, J. (2007). Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 353-404, doi: 10.1016/j.bbali.2007.01.015
- Strochlic, T. I., Setty, T. G., Sitaram, A., & Burd, C. G. (2007). Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol* **177**, 115-125, doi: 10.1083/jcb.200609161
- Struck, D. K., Hoekstra, D., & Pagano, R. E. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, 4093-4099, doi: 10.1021/bi00517a023
- Sugeno, N., Jäckel, S., Voigt, A., Wassouf, Z., Schulze-Hentrich, J., & Kahle, P. J. (2016). α -Synuclein enhances histone H3 lysine-9 dimethylation and H3K9me2-dependent transcriptional responses. *Sci Rep* **6**, 36328, doi: 10.1038/srep36328
- Summers, D. W., & Cyr, D. M. (2011). Use of yeast as a system to study amyloid toxicity. *Methods* **53**, 226-231, doi: 10.1016/j.ymeth.2010.11.007
- Sun, J., Wang, L., Bao, H., Premi, S., Das, U., Chapman, E. R., & Roy, S. (2019). Functional cooperation of α -synuclein and VAMP2 in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 11113-11115, doi: 10.1073/pnas.1903049116
- Surguchov, A. (2023). α -Synuclein and mechanisms of epigenetic regulation. *Brain Sci* **13**, doi: 10.3390/brainsci13010150
- Surmeier, D. J. (2018). Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *FEBS J* **285**, 3657-3668, doi: 10.1111/febs.14607
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353, doi: 10.1038/26412
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., & Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **12**, 209-218, doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01050.x
- Szulc, N. A., & Pokrzywa, W. (2025). DEGRONOPEDIA: A practical guide to identifying and targeting protein degrons. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, doi:10.1016/bs.mie.2025.06.014
- Szulc, N. A., Stefaniak, F., Piechota, M., Soszyńska, A., Piórkowska, G., Cappannini, A., Bujnicki, Janusz M., Maniaci, C., & Pokrzywa, W. (2024). DEGRONOPEDIA: a web server for proteome-wide inspection of degrons. *Nucleic Acids Res* **52**, W221-W232, doi: 10.1093/nar/gkae238
- Taguchi-Atarashi, N., Hamasaki, M., Matsunaga, K., Omori, H., Ktistakis, N. T., Yoshimori, T., & Noda, T. (2010). Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy. *Traffic* **11**, 468-478, doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01034.x

- Tang, Y., Das, U., Scott, D. A., & Roy, S. (2012). The slow axonal transport of alpha-synuclein-mechanistic commonalities amongst diverse cytosolic cargoes. *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 506-513, doi: 10.1002/cm.21019
- Tariq, K., & Luikart, B. W. (2021). Striking a balance: PIP(2) and PIP(3) signaling in neuronal health and disease. *Explor Neuroprotective Ther* **1**, 86-100, doi: 10.37349/ent.2021.00008
- Teixeira, M., Sheta, R., Idi, W., & Oueslati, A. (2021). Alpha-Synuclein and the endolysosomal system in Parkinson's disease: guilty by association. *Biomolecules* **11**, doi: 10.3390/biom11091333
- Temkin, P., Lauffer, B., Jäger, S., Cimermancic, P., Krogan, N. J., & von Zastrow, M. (2011). SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol* **13**, 715-721, doi: 10.1038/ncb2252
- Tenreiro, S., Reimão-Pinto, M. M., Antas, P., Rino, J., Wawrzycka, D., Macedo, D., Rosado-Ramos, R., Amen, T., Waiss, M., Magalhães, F., Gomes, A., Santos, C. N., Kaganovich, D., & Outeiro, T. F. (2014). Phosphorylation modulates clearance of alpha-Synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease. *PLOS Genet* **10**, e1004302, doi: 10.1371/journal.pgen.1004302
- Thayanidhi, N., Helm, J. R., Nycz, D. C., Bentley, M., Liang, Y., & Hay, J. C. (2010). Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell* **21**, 1850-1863, doi: 10.1091/mbc.e09-09-0801
- Tian, J., Dai, S.-B., Jiang, S.-S., Yang, W.-Y., Yan, Y.-Q., Lin, Z.-H., Dong, J.-X., Liu, Y., Zheng, R., Chen, Y., Zhang, B.-R., & Pu, J.-L. (2022). Specific immune status in Parkinson's disease at different ages of onset. *NPJ Parkinsons Dis* **8**, 5, doi: 10.1038/s41531-021-00271-x
- Timney, B. L., Raveh, B., Mironska, R., Trivedi, J. M., Kim, S. J., Russel, D., Wentz, S. R., Sali, A., & Rout, M. P. (2016). Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **215**, 57-76, doi: 10.1083/jcb.201601004
- Tolias, K. F., & Cantley, L. C. (1999). Pathways for phosphoinositide synthesis. *Chem Phys Lipids* **98**, 69-77, doi: 10.1016/s0009-3084(99)00019-5
- Torggler, R., Papinski, D., & Kraft, C. (2017). Assays to monitor autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cells* **6**, doi: 10.3390/cells6030023
- Tran, J., Anastacio, H., & Bardy, C. (2020). Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *NPJ Parkinsons Dis* **6**, 8, doi: 10.1038/s41531-020-0110-8
- Traynor-Kaplan, A. E., Thompson, B. L., Harris, A. L., Taylor, P., Omann, G. M., & Sklar, L. A. (1989). Transient increase in phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils. *J Biol Chem* **264**, 15668-15673, doi: -
- Trépanier, G., Furling, D., Puymirat, J., & Mirault, M. E. (1996). Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. *Neuroscience* **75**, 231-243, doi: 10.1016/0306-4522(96)00222-9
- Trexler, A. J., & Rhoades, E. (2009). α -Synuclein binds large unilamellar vesicles as an extended helix. *Biochemistry* **48**, 2304-2306, doi: 10.1021/bi900114z
- Trotter, P. J., Pedretti, J., & Voelker, D. R. (1993). Phosphatidylserine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of mutants, cloning of the gene, and creation of a null allele. *J Biol Chem* **268**, 21416-21424, doi: -
- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P. A., Crews, L., Spencer, B., & Masliah, E. (2012). Role of α -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *FEBS J* **279**, 1000-1013, doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08489.x

- Tu, H.-Y., Yuan, B.-S., Hou, X.-O., Zhang, X.-J., Pei, C.-S., Ma, Y.-T., Yang, Y.-P., Fan, Y., Qin, Z.-H., Liu, C.-F., & Hu, L.-F. (2021). α -synuclein suppresses microglial autophagy and promotes neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Aging Cell* **20**, e13522, doi: 10.1111/accel.13522
- Tuttle, M. D., Comellas, G., Nieuwkoop, A. J., Covell, D. J., Berthold, D. A., Kloepper, K. D., Courtney, J. M., Kim, J. K., Barclay, A. M., Kendall, A., Wan, W., Stubbs, G., Schwieters, C. D., Lee, V. M., George, J. M., & Rienstra, C. M. (2016). Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 409-415, doi: 10.1038/nsmb.3194
- Ulmer, T. S., & Bax, A. (2005). Comparison of structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein and Parkinson disease variants. *J Biol Chem* **280**, 43179-43187, doi: 10.1074/jbc.M507624200
- Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human α -Synuclein. *J Biol Chem* **280**, 9595-9603, doi: 10.1074/jbc.M411805200
- Vamvaca, K., Volles, M. J., & Lansbury, P. T., Jr. (2009). The first N-terminal amino acids of alpha-synuclein are essential for alpha-helical structure formation in vitro and membrane binding in yeast. *J Mol Biol* **389**, 413-424, doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.021
- van den Brink-van der Laan, E., Dalbey, R. E., Demel, R. A., Killian, J. A., & de Kruijff, B. (2001). Effect of nonbilayer lipids on membrane binding and insertion of the catalytic domain of leader peptidase. *Biochemistry* **40**, 9677-9684, doi: 10.1021/bi002903a
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112-124, doi: 10.1038/nrm2330
- Vandebroek, T., Vanhelmont, T., Terwel, D., Borghgraef, P., Lemaire, K., Snauwaert, J., Wera, S., Van Leuven, F., & Winderickx, J. (2005). Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. *Biochemistry* **44**, 11466-11475, doi: 10.1021/bi0506775
- Vargas, J. N. S., Hamasaki, M., Kawabata, T., Youle, R. J., & Yoshimori, T. (2023). The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 167-185, doi: 10.1038/s41580-022-00542-2
- Vázquez-Martínez, R., Díaz-Ruiz, A., Almabouada, F., Rabanal-Ruiz, Y., Gracia-Navarro, F., & Malagón, M. M. (2012). Revisiting the regulated secretory pathway: from frogs to human. *Gen Comp Endocrinol* **175**, 1-9, doi: 10.1016/j.ygcen.2011.08.017
- Verhoef, L. G. G. C., Lindsten, K., Masucci, M. G., & Dantuma, N. P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet* **11**, 2689-2700, doi: 10.1093/hmg/11.22.2689
- Vida, T. A., & Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-792, doi: 10.1083/jcb.128.5.779
- Vilariño-Güell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., Yu, I., Encarnacion, M., Munsie, L. N., Tapia, L., Gustavsson, E. K., Chou, P., Tatarnikov, I., Evans, D. M., Pishotta, F. T., Volta, M., Beccano-Kelly, D., Thompson, C., Lin, M. K., et al. (2013). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet* **23**, 1794-1801, doi: 10.1093/hmg/ddt570
- Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, Owen A., Dachsel, Justus C., Kachergus, Jennifer M., Lincoln, Sarah J., Soto-Ortolaza, Alexandra I., Cobb, Stephanie A., Wilhoite, Gregory J., Bacon, Justin A., Behrouz, B., Melrose, Heather L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, Daniel M., Conibear, E., Wasserman, Wyeth W., Aasly, Jan O., Burkhard, Pierre R., et al. (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **89**, 162-167, doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.001

- Voelzmann, A., Okenve-Ramos, P., Qu, Y., Chojnowska-Monga, M., del Caño-Espinel, M., Prokop, A., & Sanchez-Soriano, N. (2016). Tau and spectraplakins promote synapse formation and maintenance through Jun kinase and neuronal trafficking. *Elife* **5**, e14694, doi: 10.7554/eLife.14694
- Volles, M. J., & Lansbury, P. T., Jr. (2007). Relationships between the sequence of alpha-synuclein and its membrane affinity, fibrillization propensity, and yeast toxicity. *J Mol Biol* **366**, 1510-1522, doi: 10.1016/j.jmb.2006.12.044
- Walch-Solimena, C., Collins, R. N., & Novick, P. J. (1997). Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J Cell Biol* **137**, 1495-1509, doi: 10.1083/jcb.137.7.1495
- Walke, G., Kumar, R., & Wittung-Stafshede, P. (2024). Copper ion incorporation in α -synuclein amyloids. *Protein Sci* **33**, e4956, doi: 10.1002/pro.4956
- Wang, C., Tan, X., Tang, D., Gou, Y., Han, C., Ning, W., Lin, S., Zhang, W., Chen, M., Peng, D., & Xue, Y. (2022). GPS-Uber: a hybrid-learning framework for prediction of general and E3-specific lysine ubiquitination sites. *Brief Bioinform* **23**, doi: 10.1093/bib/bbab574
- Wang, H., Sun, H.-Q., Zhu, X., Zhang, L., Albanesi, J., Levine, B., & Yin, H. (2015). GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7015-7020, doi: 10.1073/pnas.1507263112
- Wang, Y., Meriin, A. B., Zaarur, N., Romanova, N. V., Chernoff, Y. O., Costello, C. E., & Sherman, M. Y. (2009). Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J* **23**, 451-463, doi: 10.1096/fj.08-117614
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G., & Yin, H. L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299-310, doi: 10.1016/s0092-8674(03)00603-2
- Watson, E. T., Pauers, M. M., Seibert, M. J., Vevea, J. D., & Chapman, E. R. (2023). Synaptic vesicle proteins are selectively delivered to axons in mammalian neurons. *Elife* **12**, doi: 10.7554/eLife.82568
- Weids, A. J., & Grant, C. M. (2014). The yeast peroxiredoxin Tsa1 protects against protein-aggregate-induced oxidative stress. *J Cell Sci* **127**, 1327-1335, doi: 10.1242/jcs.144022
- Westphal, C. H., & Chandra, S. S. (2013). Monomeric synucleins generate membrane curvature. *J Biol Chem* **288**, 1829-1840, doi: 10.1074/jbc.M112.418871
- Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenaer-Tsapis, R., & Riezman, H. (2000). The F-Box protein Rcy1p is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **149**, 397-410, doi: 10.1083/jcb.149.2.397
- Willingham, S., Outeiro, T. F., DeVit, M. J., Lindquist, S. L., & Muchowski, P. J. (2003). Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or α -Synuclein. *Science* **302**, 1769-1772, doi: 10.1126/science.1090389
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., & Riek, R. (2011). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4194-4199, doi: 10.1073/pnas.1100976108
- Winslow, A. R., Chen, C.-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D. E., Peden, A. A., Lichtenberg, M., Menzies, F. M., Ravikumar, B., Imarisio, S., Brown, S., O'Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2010). α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* **190**, 1023-1037, doi: 10.1083/jcb.201003122

- Wong, L. H., Gatta, A. T., & Levine, T. P. (2019). Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 85-101, doi: 10.1038/s41580-018-0071-5
- Wright, A. P., Bruns, M., & Hartley, B. S. (1989). Extraction and rapid inactivation of proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by trichloroacetic acid precipitation. *Yeast* **5**, 51-53, doi: 10.1002/yea.320050107
- Wu, D., Sun, J. K., & Chow, K. H. (2024). Neuronal cell cycle reentry events in the aging brain are more prevalent in neurodegeneration and lead to cellular senescence. *PLOS Biol* **22**, e3002559, doi: 10.1371/journal.pbio.3002559
- Xie, Z., Nair, U., & Klionsky, D. J. (2008). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**, 3290-3298, doi: 10.1091/mbc.e07-12-1292
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., & Stefanis, L. (2009). Abberant α -Synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLOS ONE* **4**, e5515, doi: 10.1371/journal.pone.0005515
- Xiong, L., Zeng, Y., Tang, R.-Q., Alper, H. S., Bai, F.-W., & Zhao, X.-Q. (2018). Condition-specific promoter activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb cell fact* **17**, 58, doi: 10.1186/s12934-018-0899-6
- Xu, C. K., Meisl, G., Andrzejewska, E. A., Krainer, G., Dear, A. J., Castellana-Cruz, M., Turi, S., Edu, I. A., Vivacqua, G., Jacquat, R. P. B., Arter, W. E., Spillantini, M. G., Vendruscolo, M., Linse, S., & Knowles, T. P. J. (2024). α -Synuclein oligomers form by secondary nucleation. *Nat Comm* **15**, 7083, doi: 10.1038/s41467-024-50692-4
- Xu, J., Wu, X.-S., Sheng, J., Zhang, Z., Yue, H.-Y., Sun, L., Sgobio, C., Lin, X., Peng, S., Jin, Y., Gan, L., Cai, H., & Wu, L.-G. (2016). α -Synuclein mutation inhibits endocytosis at mammalian central nerve terminals. *J Neurosci* **36**, 4408-4414, doi: 10.1523/jneurosci.3627-15.2016
- Xu, L., Nussinov, R., & Ma, B. (2016). Coupling of the non-amyloid-component (NAC) domain and the KTK(E/Q)GV repeats stabilize the α -synuclein fibrils. *Eur J Med Chem* **121**, 841-850, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.044
- Xu, T., Gan, Q., Wu, B., Yin, M., Xu, J., Shu, X., & Liu, J. (2020). Molecular basis for PI(3,5)P(2) recognition by SNX11, a protein involved in lysosomal degradation and endosome homeostasis regulation. *J Mol Biol* **432**, 4750-4761, doi: 10.1016/j.jmb.2020.06.010
- Xu, Y., Hortsman, H., Seet, L., Wong, S. H., & Hong, W. (2001). SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat Cell Biol* **3**, 658-666, doi: 10.1038/35083051
- Yamamoto, A., DeWald, D. B., Boronenkov, I. V., Anderson, R. A., Emr, S. D., & Koshland, D. (1995). Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell* **6**, 525-539, doi: 10.1091/mbc.6.5.525
- Yang, J., Tian, Y., Liu, H., Kan, Y., Zhou, Y., Wang, Y., & Luo, Y. (2021). Harnessing the endogenous 2 μ Plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* for pathway construction. *Front Microbiol* **12**, doi: 10.3389/fmicb.2021.679665
- Yang, W., Chang, Z., Que, R., Weng, G., Deng, B., Wang, T., Huang, Z., Xie, F., Wei, X., Yang, Q., Li, M., Ma, K., Zhou, F., Tang, B., Mok, V. C. T., Zhu, S., & Wang, Q. (2020). Contra-directional expression of plasma superoxide dismutase with lipoprotein cholesterol and high-sensitivity C-reactive protein as important markers of Parkinson's disease severity. *Front Aging Neurosci* **12**, doi: 10.3389/fnagi.2020.00053
- Yang, X., Ma, Z., Lian, P., Wu, Y., Liu, K., Zhang, Z., Tang, Z., Xu, Y., & Cao, X. (2025). Disruption of axonal transport in Parkinson's disease: the role of pathological α -Syn and AMPK/p38 MAPK signaling. *NPJ Parkinsons Dis* **11**, 114, doi: 10.1038/s41531-025-00926-z

- Yeger-Lotem, E., Riva, L., Su, L. J., Gitler, A. D., Cashikar, A. G., King, O. D., Auluck, P. K., Geddie, M. L., Valastyan, J. S., Karger, D. R., Lindquist, S., & Fraenkel, E. (2009). Bridging high-throughput genetic and transcriptional data reveals cellular responses to alpha-synuclein toxicity. *Nat Genet* **41**, 316-323, doi: 10.1038/ng.337
- Yilmaz, A., Ashrafi, N., Ashrafi, R., Akyol, S., Saiyed, N., Kerševičiūtė, I., Gabrielaite, M., Gordevicius, J., & Graham, S. F. (2025). Lipid profiling of Parkinson's disease brain highlights disruption in lysophosphatidylcholines, and triacylglycerol metabolism. *NPJ Parkinsons Dis* **11**, 159, doi: 10.1038/s41531-025-01023-x
- Yoneda, A., Kanemaru, K., Matsubara, A., Takai, E., Shimozawa, M., Satow, R., Yamaguchi, H., Nakamura, Y., & Fukami, K. (2020). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility. *Biochem Biophys Res Commun* **527**, 1050-1056, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.040
- Yoo, G., Shin, Y.-K., & Lee, N. K. (2023). The role of α -Synuclein in SNARE-mediated synaptic vesicle fusion. *J Mol Biol* **435**, 167775, doi: 10.1016/j.jmb.2022.167775
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol Biol Cell* **16**, 1593-1605, doi: 10.1091/mbc.e04-11-1035
- Yoshida, T., Kawano, H., Omi, J., Hori, T., Kobayashi, Y., Saitoh, N., Aoki, J., & Takamori, S. (2025). Synaptic vesicle fusion promotes phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis for efficient synaptic transmission. *Cell Rep* **44**, doi: 10.1016/j.celrep.2025.115634
- Zhang, J., Sun, B., Yang, J., Chen, Z., Li, Z., Zhang, N., Li, H., & Shen, L. (2022). Comparison of the effect of rotenone and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on inducing chronic Parkinson's disease in mouse models. *Mol Med Rep* **25**, 91, doi: 10.3892/mmr.2022.12607
- Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., & Guo, W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol* **180**, 145-158, doi: 10.1083/jcb.200704128
- Zhang, X. M., Anwar, S., Kim, Y., Brown, J., Comte, I., Cai, H., Cai, N. N., Wade-Martins, R., & Szele, F. G. (2019). The A30P α -synuclein mutation decreases subventricular zone proliferation. *Hum Mol Genet* **28**, 2283-2294, doi: 10.1093/hmg/ddz057
- Zheng, Q., Su, H., Tian, Z., & Wang, X. (2011). Proteasome malfunction activates macroautophagy in the heart. *Am J Cardiovasc Dis* **1**, 214-226, doi: -
- Zhong, Q., Lazar, C. S., Tronchère, H., Sato, T., Meerloo, T., Yeo, M., Songyang, Z., Emr, S. D., & Gill, G. N. (2002). Endosomal localization and function of sorting nexin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6767-6772, doi: 10.1073/pnas.092142699
- Zhu, M., & Fink, A. L. (2003). Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* **278**, 16873-16877, doi: 10.1074/jbc.M210136200
- Zimprich, A., Benet-Pagès, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S. H., Offman, M. N., Haubenberger, D., Spielberger, S., Schulte, E. C., Lichtner, P., Rossle, S. C., Klopp, N., Wolf, E., Seppi, K., Pirker, W., Presslauer, S., Mollenhauer, B., Katzenschlager, R., Foki, T., et al. (2011). A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **89**, 168-175, doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.008
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C. D., Fasch, E. V., Kohlwein, S. D., Paltauf, F., & Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**, 2026-2034, doi: 10.1128/jb.173.6.2026-2034.1991

Zolov, S. N., Bridges, D., Zhang, Y., Lee, W. W., Riehle, E., Verma, R., Lenk, G. M., Converso-Baran, K., Weide, T., Albin, R. L., Saltiel, A. R., Meisler, M. H., Russell, M. W., & Weisman, L. S. (2012). In vivo, PIKfyve generates PI(3,5)P₂, which serves as both a signaling lipid and the major precursor for PI5P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17472-17477, doi: 10.1073/pnas.1203106109

Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**, 355-405, doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547

Anhang

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verschiedene Risikofaktoren beeinflussen die Fehlfaltung des α Syn-Proteins.....	5
Abbildung 2: Evolutionäre Konservierung und Struktur von α Syn.	7
Abbildung 3: Vorgeschlagene physiologische Interaktionen von α Syn im Neuron.....	10
Abbildung 4: Aggregationsverhalten und -prozess von α Syn	13
Abbildung 5: Überblick über die zelluläre Phospholipid-Biosynthese.	18
Abbildung 6: Möglichkeiten des zellulären Lipidtransfers.	20
Abbildung 7: Überblick über die Enzyme der PIP-Biosynthese.	21
Abbildung 8: Phosphoinositid-Biosynthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
Abbildung 9: Signalfunktionen von PIPs in der Autophagie.	26
Abbildung 10: Die Rolle von PIPs im Recycling synaptischer Vesikel.....	29
Abbildung 11: <i>In silico</i> -Strukturanalyse von WT α Syn und PD-relevanten Mutanten A30P und A53T.	60
Abbildung 12: α Syn-Lokalisation setzt eine intakte N-terminale α -Helix voraus.....	61
Abbildung 13: Membranbindende α Syn-Spezies haben einen größeren Einfluss auf die Zellvitalität.	62
Abbildung 14: Der Verlust der autophagischen Maschinerie hat keinen Einfluss auf Lokalisation, Toxizität und Proteinlevel der α Syn-GFP-Spezies.	63
Abbildung 15: Die autophagische Aktivität wird nicht durch die Expression von α Syn-GFP beeinflusst.	64
Abbildung 16: WT α Syn-GFP beeinflusst die 26S-Aktivität dosisabhängig.	66
Abbildung 17: Die high-copy-Expression membranbindender α Syn-GFP-Spezies induziert die Aggregation endogener Proteine.	67
Abbildung 18: α Syn-GFP liegt stabil in <i>S. cerevisiae</i> vor und wird auch nach Translationsstopp nicht in der Zelle abgebaut.	69
Abbildung 19: One-copy-Expression von WT α Syn-GFP hemmt das Wachstum bestimmter Autophagie-spezifischer Deletionsstämme.	70
Abbildung 20: One-copy α Syn-GFP reduziert die Wachstumsrate der PI3K-Deletionsstämme.	72
Abbildung 21: Der Verlust der autophagischen Maschinerie resultiert in einer drastisch reduzierten chronologischen Lebensspanne.	74
Abbildung 22: Der Verlust der PI3K resultiert in der zytoplasmatischen Akkumulation membranbindender α Syn-GFP-Spezies.	76
Abbildung 23: GFP-positive Akkumulationen in <i>vps15Δ</i> und <i>vps34Δ</i> sind nicht-amyloid.	77
Abbildung 24: GFP-positive Akkumulationen enthalten Lipide des endosomalen Transportsystems.	78

Abbildung 25: Plasmidvermittelte Komplementation der PI3K-Mutanten <i>vps15Δ</i> und <i>vps34Δ</i> stellt PM-Lokalisation membranbindender α Syn-GFP-Spezies wieder her.	80
Abbildung 26: Der Verlust des katalytischen Kerns des PI3K-Komplexes resultiert in PI3P-Defizienz	81
Abbildung 27: Die autophagosomale Lokalisation des PI3K-Komplexes ist nicht entscheidend für die PM-Lokalisation von α Syn-GFP.	82
Abbildung 28: Die Synthese PI3-phosphorylierter PIP-Spezies vermittelt PM-Lokalisation von WT und A53T α Syn-GFP.	84
Abbildung 29: Die chemische Depletion von PM-lokalisiertem PI4P resultiert in der PM-nahen Akkumulation von WT und A53T α Syn-GFP.	86
Abbildung 30: Die Akkumulationen membranbindender α Syn-GFP-Isoformen entstehen überwiegend aus dem Zellinneren heraus.	88
Abbildung 31: PM-lokalisierende α Syn-GFP-Spezies beeinflussen PI3P-positive Strukturen.	90
Abbildung 32: WT und A53T α Syn-GFP beeinflussen den sekretorischen Weg und colokalisieren mit dem RAB3A-Ortholog Sec4.	92
Abbildung 33: Die Stabilität der N-terminalen α -Helix bestimmt die Membran-Bindeeigenschaften von α Syn.	95
Abbildung 34: α Syn beeinflusst Komponenten der zellulären Proteostase über unterschiedliche Mechanismen.	101
Abbildung 35: Die PM-Lokalisation α Syn-haltiger Vesikel in <i>S. cerevisiae</i> und an der Säugersynapse erfolgt über einen hoch-konservierten Prozess.	108
Abbildung 36: Hypothetisches Modell des PM-Transports von WT und A53T α Syn.	110

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller verwendeten Laborgeräte.	32
Tabelle 2: Auflistung aller Stoffe und Chemikalien.	33
Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten kommerziellen Puffersysteme.	35
Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten <i>Escherichia coli</i> -Stämme.	35
Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.	36
Tabelle 6: Darstellung aller verwendeten Plasmide.	37
Tabelle 7: Darstellung aller verwendeten Oligonukleotide.	38
Tabelle 8: Auflistung aller genutzten Enzyme.	39
Tabelle 9: Liste aller genutzten kommerziellen Kits.	39
Tabelle 10: Darstellung der verwendeten Antikörper.	40
Tabelle 11: Darstellung der genutzten Größenstandards.	40
Tabelle 12: Zusätzliche verwendete Materialien.	41
Tabelle 13: Verwendeter Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.	42
Tabelle 14: Verwendete Puffer für die SDS-PAGE.	46
Tabelle 15: Verwendete Puffer für die Western Blot-Detektion.	47
Tabelle 16: Verwendete Puffer für den Proteinaggregations-Assay.	48
Tabelle 17: Zusammensetzung der für den Cycloheximid-Assay verwendeten Puffer.	49
Tabelle 18: Verwendete Puffer für die Autophagie-Assays.	50

Tabelle 19: Verwendete Puffer für den 26S-Proteasom-Assay.	51
Tabelle 20: Zusammensetzung des Anzuchtmediums von <i>E. coli</i>	51
Tabelle 21: Zusammensetzung der für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> verwendeten Medien.	52
Tabelle 22: Verwendete Lösungen für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	53
Tabelle 23: Zusammensetzung der für die Transformation von <i>S. cerevisiae</i> verwendeten Puffer.	53
Tabelle 24: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die denaturierende Proteinisolation aus <i>S. cerevisiae</i>	54
Tabelle 25: Verwendete Puffer für die nicht-denaturierende Proteinisolation aus <i>S. cerevisiae</i>	55

3. Abkürzungsverzeichnis

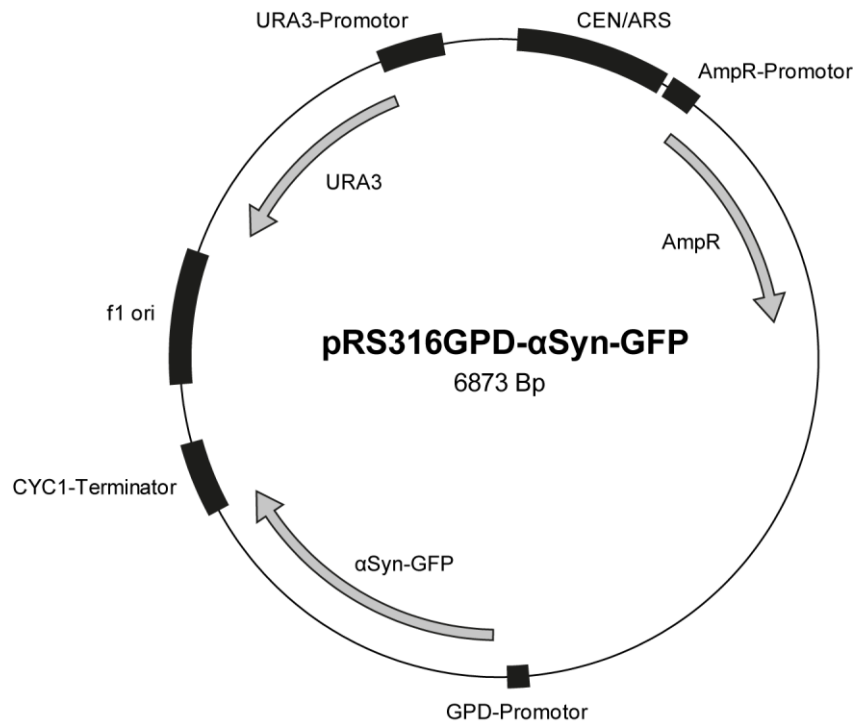
Abkürzung	Vollname	Übersetzung
®	registered trademark	eingetragenes Warenzeichen
2μ	2-micron plasmid	2 μm-Plasmid
A ₂₃₀	Absorption bei 230 nm	
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm	
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm	
AA	amino acids	Aminosäuren
AD	Alzheimer's disease	Alzheimer-Krankheit
ALP	Aggregations-Lysispuffer	
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	Amyotrophe Lateralsklerose
ÄMM	äußere Mitochondrienmembran	
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase	
ANOVA	analysis of variance	Varianzanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat	
αSyn	Alpha-Synuclein	
ATG	autophagy-related	Autophagie-verwandt
ATP	Adenosintriphosphat	
BCA	bicinchonic acid	Bicinchoninsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke	
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	
BSA	bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise	
CCC	COMMD-CCDC22-CCDC93	
CDP	Cytidindiphosphat	
CDP-Cho	Cytidindiphosphat-Cholin	
CDP-Etn	Cytidindiphosphat-Ethanolamin	
CHX	Cycloheximid	
CL	Cardiolipin	
CORVET	class C core vacuole/endosome tethering	Klasse-C-Kernkomplex der Vakuolen/Endosomen-Verankerung
cPI	cOmplete Protease Inhibitor	
CTP	Cytidintriphosphat	
DAG	Diacylglycerin	
DJ-1	Parkinsonism associated deglycase	Parkinson-assoziierte Deglykase
DMSO	Dimethylsulfoxid	

Abkürzung	Vollname	Übersetzung
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DNAJ	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member	DnaJ-Hitzeschockprotein-Familie (Hsp40) Mitglied
dt.	deutsch	
DTT	Dithiothreitol	
ECL	enhanced chemiluminescence	verbesserte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
EGFP	enhanced green fluorescent protein	verbessertes Grün-fluoreszierendes Protein
engl.	englisch	
ERAD	endoplasmic-reticulum-associated protein degradation	Endoplasmatisches Retikulum-assoziiertes Proteinabbau
et al.	et alia	und andere
etc.	et cetera	und so weiter
EV	empty vector	Leervektor
Fab	formation of aploid and binucleate cells protein	Protein der Bildung aploider und binukleärer Zellen
GAL	galactose-inducible	Galactose-induzierbar
GBA	Glucocerebrosidase	
GDF	guanine nucleotide dissociation inhibitor displacing factor	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor Verdrängungsfaktor
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
Gos1	Golgi SNARE 1	
GPD	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	
GTP	Guanosintriphosphat	
GWAS	genome-wide association study	genomweite Assoziationsstudie
H _{II}	hexagonale Phase II	
Hrd1	HMG-CoA reductase degradation protein	HMG-CoA-Reduktase-Abbauprotein
HRP	horseradish peroxidase	Meerrettichperoxidase
Hsp	heat shock protein	Hitzeschockprotein
IMM	innere Mitochondrienmembran	
IMR	Intermembranraum	
Ino	inositol-requiring	Inositol-erforderlich
INPP5F	Inositol-Polyphosphat 5-Phosphatase F	
IPOD	insoluble protein deposit	unlösliche Proteinablagerung
JUNQ	juxtannuclear quality control	juxtannukleäre Qualitätskontrolle
LAMP	Lysosome-associated membrane protein	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LB	lysogeny broth	Lysogenie-Nährbrühe
LC	microtubule-associated protein 1 light chain	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1 leichte Kette
LD	lipid droplet	Lipidtröpfchen
L-Dopa	Levodopa	
LRRK	leucine-rich repeat kinase	Leucin-reiche Repeat-Kinase
Lsb	Las seventeen binding protein	Las17-bindendes Protein
LUHMES	Lund human mesencephalic	Lund menschliches Mesencephalon
MAOI	monoamine oxidase inhibitors	Monoaminoxidase-Inhibitoren
MAPT	microtubule-associated protein tau	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
Mgr	mitochondrial genome required	erforderlich für das mitochondriale Genom
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin	
Mrp	mitochondrial ribosomal protein	mitochondriales Ribosomenprotein

Abkürzung	Vollname	Übersetzung
Msb	multicopy suppressor of bud emergence	Multikopie-Suppressor der Knospenentstehung
Mss	multicopy suppressor of Stt4 mutation	Multikopie-Suppressor der Stt4-Mutation
MTMR	myotubularin-related	Myotubularin-verwandt
mTORC	mechanistic target of rapamycin complex	Mechanistischer Rapamycin-Zielkomplex
N	Stickstoff	
n	biologisches Replikat	
NAC	non-amyloid component	nicht-amyloider Bestandteil
NEB	new england biolabs	
NMR	nuclear magnetic resonance	Kernspinresonanz
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm	
PAS	pre autophagosomal site	Präautophagosomale Seite
PBS	phosphate buffered saline	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
PD	Parkinson's disease	Parkinson-Krankheit
PE	Phosphatidylethanolamin	
PEG	Polyethylenglykol	
Pep	carboxypeptidase Y-deficient	Carboxypeptidase-Y-defizient
PET	Positronenemissionstomographie	
PG	Phosphatidylglycerin	
PI	Phosphatidylinositol	
PI3,5P2	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat	
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphat Kinase	
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat	
PI4,5P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	
PI4P	Phosphatidylinositol-4-phosphat	
Pik1	1-Phosphatidylinositol 4-Kinase	
PINK	PTEN-induced kinase	PTEN-induzierte Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat	
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)	
PL	Phospholipid	
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	
pNPP	p-Nitrophenylphosphat	
PRKN	Parkin	
PS	Phosphatidylserin	
PUFA	polyunsaturated fatty acids	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PX	Phox-Homologie	
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
Rab	Ras-related in brain	Ras-verwandt im Gehirn
ROS	reactive oxygen species	reaktive Sauerstoffspezies
Rsm	ribosomal small subunit of mitochondria	kleine ribosomale Untereinheit der Mitochondrien
RT	Raumtemperatur	
SCa	slow component a	langsame Komponente a
SCb	slow component b	langsame Komponente b
SD	standard defined	Standard definiert
SDS	sodium dodecylsulfate	Natriumdodecylsulfat
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzung	Vollname	Übersetzung
Sec	secretory protein	sekretorisches Protein
SNAP-25	synaptosomal-associated protein of 25 kDa	Synaptosomen-assoziiertes 25 kDa-Protein
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor	löslicher N-Ethylmaleimid-sensitiver Faktor-Bindungsrezeptor
Snc	suppressor of the null allele of CAP	Suppressor des Null-Allels von CAP
SNCA	Synuclein Alpha	
SNpc	substantia nigra pars compacta	
SNX	sortierendes Nexin	
SRP	signal recognition particle	Signalerkennungspartikel
Sso	supressor of Sec one	Sec1-Suppressor
Stt	staurosporine and temperature sensitive	staurosporin- und temperatursensitiv
Suc-LLVY-AMC	Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin	
SUV	small unilamellar vesicle	kleines unilamellares Vesikel
SV	synaptisches Vesikel	
SYNJ	Synaptojanin	
TAE	tris acetic acid edta	Tris Essigsäure EDTA
TAG	Triacylglycerol	
TCA	trichloroacetic acid	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
Tlg	t-SNARE affecting a late Golgi compartment	t-SNARE des späten Golgi-Kompartiments
Tm	melting temperatur	Schmelztemperatur
™	trademark	Warenzeichen
Tom	translocase of the outer mitochondrial membrane	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid	
t-SNARE	vesicle synaptosome-associated protein receptor	Vesikel-Synaptosom-assoziiierter Proteinrezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute	
Ubp	Ubiquitin-specific-processing protease	Ubiquitin-spezifische Prozessierungs-Protease
UHL	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L	Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase L
ULK	Unc-51-like kinase	Unc-51-ähnliche Kinase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System	
VAMP	vesicle-associated membrane protein	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
VPS	vacuolar protein sorting	
VPS	vacuolar protein sorting	vakuoläre Proteinsortierung
v-SNARE	target synaptosome-associated protein receptor	Ziel-Synaptosom-assoziiierter Proteinrezeptor
w/o	without	ohne
WASH	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein und SCAR-Homolog	
WT	Wildtyp	
Yme	yeast mitochondrial escape	Entkommen (der mitochondrialen DNA) in Hefe
YNB	yeast nitrogen base	Hefe-Stickstoffbasis
Yos	Yip one suppressor	Yip1-Suppressor
YPD	yeast extract peptone dextrose	Hefextrakt Pepton Dextrose
Ypt	yeast protein two	Hefeprotein 2
ZNS	zentrales Nervensystem	

4. Vektorkarten der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide



Sequenz pRS316GPD-WT αSyn-GFP:

```
GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
CTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTTATTTATTTTTATGTTTTGTATTTGGATTTTAGAAAGTAAATAAAGAGGTTAGAAGAGTTACGG
AATGAAGAAAAAATAAACAAAGGTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAATAGATATACAT
TCGATTAACGATAAGTAAAATGTAATACACAGGATTTTCGTGTGTGGTCTCTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAACTGAGAGCAGGAAGA
GCAAGATAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTTACATCTTCGGAAAACAAAAATATTTTTCTTAATTTCTTTTTTACTTTCTATTT
TTAATTTATATATTTATTTAAAAAATTTAAATTAATATTTTTATAGCAGTGTGATAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTA
TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
GTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGCGATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGCCTAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGTGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACAAACGAC
GAGCGTGACACACGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTTAACTGGCGAAGTACTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGA
TGGAGGCGGATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGT
CATTGCAAGCACTGGGGCAGATGGAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGTGTTTTGCTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTTGAGA
TCCTTTTTTCTGCGCGGTAATCTGCTGCTTGCACAAACAAAAAACCCGCTACACAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
GTAAGTGGCTTCAAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAAGTGGCCACCACCTCAAGAAGTCTGTAGCACCAGCTACATACTCG
CTCTGCTAATCCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCAGCGGTCGGG
CTGAACGGGGGTTCTGTGACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCAGCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCAGCTTCCCGAA
GGGAGAAAGCGGACAGGATCCGGTAAGCGCGAGGTCGGGAACAGGAGCGCAGGAGCTTCCAGGGGGAAGCAGCTGGTATCTTTATAGCTGTGCG
GGTTTTGCGCACCTCTGACTTGAAGCGTCAATTTTTGTGATGCTGCTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTCTTGGC
CTTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAAACCCTATACCCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGAGC
CGAAGCAGCGAGCGAGTCAAGTGAAGCGGAAAGCGGAAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAAGTGGC
ACGACAGGTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
TCCTATGTTGTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGGAACAA
AAGCTGGAGCTCAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTATTTTCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC
CTTTAATTTCTGCTGTAACCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTATTCTTCTGGCATCC
ACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGTGGCATCCAGAAAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCAACAACCATCAGTTCATAGGTCCTA
TTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAACCGGGCACAACCTCAATGGAGTGTGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTGACCCAGCATGTATCTATCTATTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGTGAAGAAAAAGGTTGAACACAGTTCC
CTGAAATTTCCCTACTTGAATAAAGTATATAAAGACGGTAGGTTGATTTGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAACTTCTTAAATTTACTTTTATA
GTTAGTCTTTTTTATGTTTTAAAAACACAGAACTTGTTCGACGGATTCTAGAACTAGTATGGATGATTCATGAAGAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGA
GTTGTGGTGTCTGCTGAGAAAAACAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGAGTGG
TGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGCAAAAGAGCAAGTGACAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCAGAAAGCAGAGTGG
GGGAGCAGGGAGCATTCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACAGTTGGGCAAGAAATGAAGAAGGAGCCACAGGAAGGAATTTGGAAGATATGCTT
GTGGATCCTGACAAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAAGCCAGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
CCGGGGTGGTGCATCCTGGTCAAGCTGGACGGCGACGTAACAGGGCCACAAGTTCAAGCGTGTCCGGCAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC
CCTGAAGTTCACTGACCAACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCTCGTGACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGGACAC
ATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCCGCATGCCGGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCTCCGCGGAGG
```

TGAAGTTCGAGGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAA
 CAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAGCAAGCAAGAACGGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCCGCAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGCCCAACGAGAAGC
 GCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTGGCATGGACGAGTGTACAAGTAACCGAGTCAATAGTATGTACACGC
 TTACATTCACGCCCTCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAGGAAAGGAGTTAGACAACCTGAAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTAT
 TAAGAAGCTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACG
 CTCGAAAGCTTTAAATTTGCGGCCGTACCCAATTCGCCCTATAGTGTGCTATTACGGCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAAAGCTCGTGACTGGGAAAAC
 CTGGCGTTACCCAATTAATCGCTTGCAGCACATCCCTTTCCGCAAGTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGGCGAG
 CCTGAATGGCGAATGGCGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCG
 CCCGCTCCTTTGCTTTCTCCCTTCTTCTGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGTCT
 TACGGCACCTCGACCCAAAAAATTTGATTAGGGTGTAGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGCTT
 CTTTAATAGTGGACTTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTCCGATTTCCGGCTATTGGTTA
 AAAAAAGAGCTGATTTAAACAAAAATTAACCGCAATTTAAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCTGATGCGGATTTTCTCCTACGCATCTGTGCGGTAT
 TTCACACCGCATAGGGTAATAACTGATATAATTAATTAAGAGCTCAATTTGTGAGTTTGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTATGTTTTGCTG
 GCCGCATCTTCAAATATGCTTCCAGCCTGCTTTCTGTAACTTACCCTTACCTTAGCATCCCTTCCCTTTGCAAAATAGTCCCTTCCAACAATAATA
 ATGTACAGTCCGTAGAGACACATCATCCACGGTTCTACTGTGACCGGATAAGCTTTAGCCCAATGCTGACCCTGATAGACGGTTTTTCCGCTTCAACCAAT
 CGTAACCTTCACTCTTCCACCCATGTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAACAAAAATTTTGTGCTCTTCCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTATATTCTCC
 AGTAGATAGGGAGCCCTTGCATGACAATTTGCTAACATCAAAAGCCCTTCTAGGTTCCCTTTGTACTTCTTCTGCGCCTGCTTCAACCGCTAACAATACCT
 GGGCCACCACCGGTGTGCAATTCGTAATGTGCCCATTTCTGTATTTCTGTATACACCCGACAGAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGTACAGCAATTT
 TTTGCTTTGCAAGAGTAAAAATTTGACTTGGCGGATAAGCTTTAGCCGCTTAACTGACGCTTCCATGGAAAAATCAAGTCAAGATGTCACATGCTTTTT
 TAGTAAACAATTTGGGCACTTAAGTCTTCAACTCAAGTAACTTGGTGGTGTGCAACATCAATGAAAGCACACAGTTTGTGTTTTGCTTTTCTGTCATG
 ATATTAATAGCTTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCAGCTTCTTATATGAGCTTTCGACATGATTTATCTCGTTTTCTGCGAGTTTGTGTC
 TGTGCAAGTTGGGTTAAGAATACTGGGCAATTTTATGTTCTTCAACACTACATATGCGTATATATACCAATCTAAGTCTGTGCTCCTTCTGTTCTTCTT
 CTGTTCCGAGATACCGAATCAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAAAAAAGAATAAAAAAATGATGAATGAATGAAAAGCTGTGGTATGGTGC
 ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGCAACCCGCAACCCGCTGACGCGCCCTGCTGCTCCGGCATCCG
 CTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGATGTGTGAGGTTTTACCCTCATCCCGAAACGCGCA

Sequenz pRS316GPD-A30P α Syn-GFP:

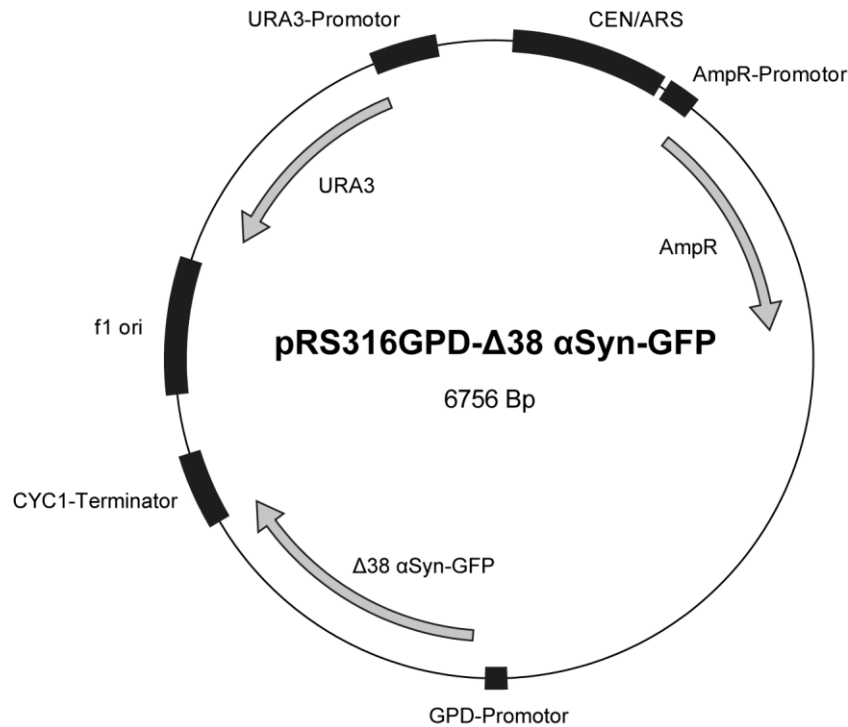
GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCCCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
 CTTTTAATGATGGAATAAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGATATTTGGATTTTAGAAAAGTAAATAAAGAGGTAGAAGAGTTACGG
 AATGAAGAAAAAATAAATAAAGGTTTTAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTTTATAGCAAGAAAAAGCAGATAAATAGATATAAT
 TCGATTAACGATAAGTAAATGTAATACACAGGATTTTCGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGTGAACAATTCGGCATTAACTACGAGCAGGAAGA
 GCAAGATAAAGGTAAGTATTTGTTGGCGATCCCTTAGAGTCTTTACATCTTCGGAAAAAACAATTTTTCTTTAATTTCTTTTTTACTTTCTATTT
 TTAATTTATATATTTATATAAAAAATTTAAATTTAATTTATTTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCATTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACC
 CCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATCAAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTA
 TTAACATTTCCGTTGCGCCTTATCCCTTTTTGCGGCAATTTGCTTCTGTTTTTCCACTGTTTTGCTCACCAGAAACCGTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
 GTTGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGATTTATCCGCTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
 TCACAGAAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGTGCAGGCAACTTACTTTCGACAAAG
 CGGAGGACCGAAGGAGTAAACCGCTTTTTGCAACAATGGGGGATCATGTAACCTGCTTGGTGGTGGAGTGAAGTGAAGCCATACCAACGAC
 GAGCGTGCACACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGA
 TGGAGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGCGTGGGCTCGCGGAT
 CATTGACGCACTGGGGCCAGATGTAAGCCCTCCGCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
 ATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTTGGTAAGTGTGACAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATTAAGG
 TGAAGATCCTTTTTGATAAATCTCATGAAAGCGGGCAGTGAAGCAAGCAATTAAGTGTGTTTTGCTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTGAAGAAAGTCAAGGATCTCTT
 TCGAATGCTTTCGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
 GTAACGTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGACCCGCTACATACCTCG
 CTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGG
 CTGAACGGGGGGTTCGTGACACAGCCCAAGTTCGGAGCAACGACTTACACGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGAA
 GGGAGAAAAGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGAGGGTGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGTTATCTTTATAGTCTGTG
 GGTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCTCGATTTTTGTGATGCTGCTGAGGGGGCGGAGCTATGGAAAAAGCCAGCAACGCGGCTTTTACGGTCCCTGGC
 CTTTTGCTGGCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGACG
 CGAAGCAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAGGAGGAGCCCAATACGAAACCCGCTTCCCGCGCTTGGCGGATTTCAATGACGCTGGC
 ACGACAGTTTTCCGACTTGGAAAGCGGGCAGTGAAGCAAGCAATTAAGTGTGTTTTGCTTCCACTTACCTAGGCAACCCGCTTACACTTTATGCTTTCGGC
 TCCTATGTTGTGGAATTTGAGCGGATAAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAA
 AAGCTGGAGCTCAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTGAATTTCTTAACTTTATTTAGTCAAAAAATAGC
 CTTTTAATTTCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAAACAATCGTAGGTGTGGGTGAACAGTTTATCTTGGCATCC
 ACTAAATATAATGGAGCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAAAATATTGTTTTTCTCACCACCATCAGTTATAGGATGATG
 TTCTTCTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACTCAATGGAGTGTGCAACCTGCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
 CAATTGACCCAGCATGTATCTATCTATTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAGAAAGCTGAAAAAAGGTTGAACAGGTTCC
 CTGAAATTTATCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTTAGTATGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTTACTTTTTATA
 GTTAGCTTTTTTTAGTTTTAAACACCAAGAACTAGTTTTCGACGGATTCTAGAAGTATGATGATGATTTATGTAAGGAGCTTTCAAAGGCAAGGAGGGA
 GTTGTGGCTGCTGAGAAAAACCAACAGGGTGTGGCAGAAGCAAGGAAAGCAAAAGAGGGGTGTTCTATGTAAGGCTTCAAACCAAGGAGGAGTGG
 TGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAAGAGCAAGTGAACAATTTGGAGGAGCAGTGGTACGCGGTGTGACAGCAGTACCCAGAAGACAGTGG
 GGGAGCAGGGAGCATGTCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAGAGGACAGTTGGGCAAGAAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAATTTGGAAGATATGCTT
 GTGGATCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAAGGTTCAAGACTACGAACCTGAAGCAAGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCA
 CGGGGTGCTCCATCTGCTGCTGAGCTGGACGGCGACGTAACCGCCACAAGTACCGCTGCTCCGGCGAGGGCGAGGGGATGACCACTACGGCAAGGAGG
 CCTGAAGTTCTATGCAACACCGGCAAGCTGCCGCTGCCCTGGCCACCTCTGACACCTTACCTACGCGCTGACGTTGCTTACGGCTACCCGACCCAC
 ATGAAGCAGCAGACTTCTCAAGTCCGCTATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCGCGCGGAGG
 TGAAGTTGAGGGGCGACACCTGTTGAACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAA
 CAGCCACAACGCTATATATCGCCGACAAGCAGAAGACGGCATCAAGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 CACTACCAGAAACCCCATCGGCGACGGCCCGCTGCTGCCGCAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGCCCAACGAGAAGC
 GCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTGGCATGGACGAGTGTACAAGTAACCTCGAGTCAATAGTATGTACACGC
 TTACATTCACGCCCTCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAGGAAAGGAGTTAGACAACCTGAAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTAT
 TAAGAAGCTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACG
 CTCGAAAGCTTTAAATTTGCGGCCGTACCCAATTCGCCCTATAGTGTGCTATTACGGCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAACTGCTGACTGGGAAAAC

CTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCTTTCGACGACATCCCCCTTTCGCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
 CCTGAATGGCGAATGGCGCAGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACTTGGCAGCGCCCTAGCG
 CCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCGCGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAAAGGTTCCGATTTAGTGCTT
 TACGGCACC TCGACCCAAAAAATTTGATTAGGGTGTAGGTTACCGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT
 CTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTCCGATTTTCGGCTATTGGTTA
 AAAAAAGCTGATTTAAACAAAAATTAACGCGAATTTAAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCCGTATGCGGATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTAT
 TTCACACCGCATAGGGTAATAACTGATATAATTAATTAAGCTCTAAATTTGAGCTTAAATTTGAGTGTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTT
 GCGCATCTTCTCAAAATAGCTTCCAGCTGCTTTTCTGTAACGTTTACCCTTACCTTAGCATCCCTTCCCTTTGCAAAATAGTCTCTTCCAAATAATA
 ATGTCAGATCCTGTAGAGACCACATCATCCAGGTTCTATACTGTTGACCAATGCGTCTCCCTTGTCTATCAACCCACACCGGGTGTATAATCAACCAAT
 CGTAACCTTCTATCTTCCACCCATGTCTCTTGTAGCAATAAAGCCGATAACAAAATCTTGTGCTCTTTCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTATAATCTCC
 AGTAGATAGGGAGCCCTTGCATGACAATTCGCTAACATCAAAAGCCCTTAGTTCCTTTGTTACTTCTTTCGCCCTGCTTCAAACCGTCAACAATCTTCC
 GGGCCACACACCGTGTGCAATCGTAATGTCTGCCATTCTGTATTCTGTATACACCCGACAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGTCAAGCAAAAT
 TTCTGTCTTGAAGAGTAAAAATTTGACTTGGCGGATAATGCCTTTAGCGGCTTAACTGTGCCCTCCATGAAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTTT
 TAGTAAACAAATTTTGGACCTAATGTCTCAACTAACTCCAGTAATCTTGGTGGTACGAACTCAATGAAGCACACAAGTTGTTTCTTTCGTCATG
 ATATTAATAGCTTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCAGCTTCTATATGAGTCTTTCGACATGATTTATCTCGTTTCTCGCAGGTTTTGTTCT
 TGTCAATTTAGGTTTAAAGAACTGGCAATTTTCAATTTCTTCAACACTACATATGCGTATATATACCAATCTAAGTCTGTCTCCCTCTGCTTCTGCTTCT
 CTGTTCCGAGATTACCGAATCAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAAAAAAGAATAAAAAAAATGATGAATGAATGAAAAGCTGTGGTATGGTGC
 ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACCCCGCAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCGGCATCCG
 CTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCAATGTGTGAGGTTTTACCCTCATCCCGAAACGCGCA

Sequenz pRS316GPD-A53T α Syn-GFP:

GACGAAAGGCGCTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTATGATAAATAGGTTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCTGTAACCTACACGCGCCCTCGTAT
 CTTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGATTTGGATTTTGAAGTAATAAAGAAAGGTAGAAGAGTTACGG
 AATGAAGAAAAAAAATAAACAAAGGTTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACAT
 TCGATTAAACGATAAAGTAAATGTAATAACACAGGATTTTCGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGTGAACAATTCGGCATTAACTAGAGAGCAGGAAGA
 CGAAGATAAAGAGTAGTATTTGTTGGGATCCCCCTAGAGTCTTTTACATCTCGGAAAAAATAAATTTTCTTAAATTTCTTTTACTTTCTTCTATTT
 TTAATTTATATTTATTTAAAAAATTTAAATTTAATTTATTTTAGCAGCTATGATAAAGGACCCAGGTGGCATTTCCTGGGTTTCTGCTCGGCAAC
 CCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTTCAAAATGATATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGTA
 TTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGGATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
 GTTGGTGGCAGGAGTGGTTACATCGAATGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGGAGTTCGCCCCGAAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGATTTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGGACAACCTCGTCCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAG
 TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATATGCAAGTCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATTTACTTCTGACAACGAT
 CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGATCATGTAACCTCGCTTGTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAC
 GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTTACTAGCTTCCCGGCAAAATTAATAGACTGGA
 TGGAGCGGATAAAGTTCAGAGGCACTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTTGCTGATAAATCTGGAGCCGTGAGCGTGGTCTCGCGTAT
 CATTGGCAGCACTGGGGCCAGATGTAAGCCCTCCGATATCGTAGTTTCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATGACAGATGCTCGTAG
 ATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAATTTAAAGGATCTAGG
 TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGA
 TCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
 GTAACGTGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAACTACTGCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACACTTCAAGAACTTTATAGTCAAAAAATACCTCG
 CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGG
 CTGAACGGGGGTTCTGTGACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
 GGGAGAAAAGGGGACAGGATTCGGTAAAGCGGAGGGTGGAGACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTG
 GGTTTGCCACTCTGACTTGGACGCTCGATTTTGTGATGCTCTGAGGGGCGGAGCTATGAAAAACGCCAGAACGCGGCTTTTTACGGTTCTCGGC
 CTTTTGCTGGCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTCGGTTATCCCTGATCTGTGGATGTAACCGTATTACCGCCTTTGAGTAACTCTAAATCTCGCCGACG
 CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAAACGAAACCGCTTCCCGCGGCTTGGCCGATTCTAATGACGCTGGC
 ACGACAGGTTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGAACGCAATTAATGTGAGTTACTTACTTACTTACTAGGCAACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
 TCCTATGTTGTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCTACTAAGGGGAACAA
 AAGCTGGAGCTCAGTTTATCAATTAATCAACTCGCCATTTCAAAGAACTAGTAAATTAATAGTAGTGAATTTCTAATTTTATAGTCAAAAAATAGC
 CTTTTAATCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAAATACATCGTAGGTTCTGGGTGAACAGTTTATTCTGGCATCC
 ACTAAATATAATGGAGCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTACCACCATCAGTTTATAGGTCCA
 TTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGACAAACAGGCAAAAAACGGGACAACTCAATGGAGTGATGCAACCTGCTTGGAGTAAATGATGACACAAGG
 CAATGACCAACGCAATCTACTCTATCTATTTCTTACACCTTCTTACTTCTGCTCTCTGATTTGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCACTTCC
 CTGAAATTTTCCCTTACTGACTAATAAGTATAAAGAGCGTAGGTTAGTATTGATGTAATTTCTGTAATCTTAAATCTTAAATCTTACTTTTATA
 GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTTCGACGATTCTAGAAGTATGATGATGATTTATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGA
 GTTGTGGCTGCTGTGAGAAAAACAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAGAACAAAGAGGGTGTCTCTATGATAGGCTTCAAACCAAGGAGGAGTGG
 TGATGGTGTGACAACAGTGGCTGAGAAGACAAAGAGCAAGTGAACAATTTGGAGGAGCAGTGGTGAAGGGTGTGACAGCAGTACCCAGAAGACAGTGGG
 GGGAGCAGGGAGCATTGACAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAGAGGACAGTTGGGCAAGAAATGAAGAAGGAGCCACAGGAAGGAAATCTGGAAGATATGCT
 GTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCAGGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTCA
 CCGGGTGGTGGCCATCTGCTGAGCTGGACGGCAGCTAAACGGCCACAAGTTAGCGTGTCCGGCAGGGCGAGGGCGATGCCACTACGGCAAGCTGAC
 CCTGAAGTTCTATCTGACACACCGGCAAGCTGCCCTGCTTGGCCACCTCTGTGACACCTTACCTACGGCTGACAGTCTTACGGCTACCCCGACCA
 ATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCAGCACTTCTTCAAAGCAGCGGCAACTACAAGCCCGCCAGG
 TGAAGTTGAGGGCGACACTGGTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGTTCAGGAGGACCGCAACATCTGGGGCAGCTGGAGTACAAC
 CAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACTACTTACGACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGC
 GCGATCACAATGGTCTGCTGGAGTTCTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGCATGGAGCAGCTGTACAAGTAACTCGAGTCAATGATGATGATGACGCG
 TTACTTTACGCGCTCCCCCAGCTTAAACCGAAAAAGGAGGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTTTATTTTTTATAGTTATGATGAT
 TAAGAAGCTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGATGTAACATTAATACTGAAAACCTTGTGAGAAAGTTTTGGGACG
 CTCGAAGGCTTAAATTTGGCGCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGTGATGATACGCGCGCTACTGGCCGTGTTTTACAACGCTGATGAGGAAAAAC
 CTGGCGTTACCCAACTTAAATCGCTTGCAGCAGATCCCCCTTTCGCGAGTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
 CCTGAATGGCGAATGGCGCAGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCTGACCGCTACTTGGCAGCGCCCTAGCG
 CCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTGCGCACGTTCCGCCGCTTCCCGCTCAAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTGCTT
 TACGGCACC TCGACCCAAAAAATTTGATTAGGGTGTAGGTTACCGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT
 CTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTCCGATTTTCGGCTATTGGTTA
 AAAAAAGCTGATTTAAACAAAAATTAACGCGAATTTAAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCCGTATGCGGATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTAT
 TTCACACCGCATAGGGTAATAACTGATATAATTAATTAAGCTCTAAATTTGAGTGTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTATAGTTTTGCTG

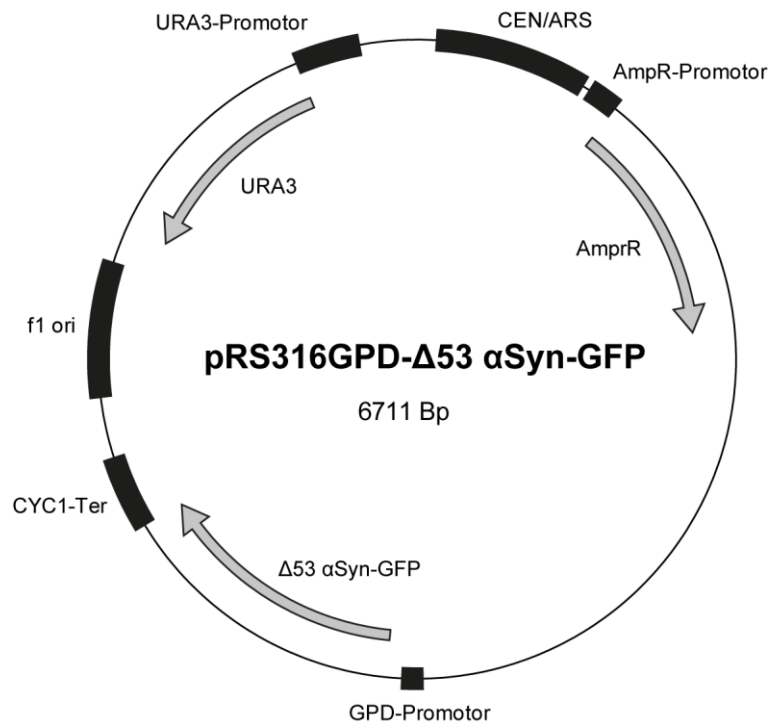
GCCGCATCTTCTCAAATAGCTTCCCAGCTGCTTTTCTGTAACTGACCTCTACCTTAGCATCCCTTCCCTTTGCAAAATAGTCTCTTCCAACAATAATA
 ATGTCAGATCCTGTAGAGACCACATCATCCACGGTTCTACTGTTGACCCAATGCGTCTCCCTTGTGTCATCTAAACCCACACGGGTGTATAATCAACCAAT
 CGTAACCTTCATCTCTTCCACCCATGTCTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAACAAAATCTTTGTCGCTCTTGCATGTCACACAGTACCCTTAGTATATTCTCC
 AGTAGATAGGGAGCCCTTGCATGACAATTCTGCTAACATCAAAGGCTCTAGGTTCCCTTTGTACTTCTTCTGCCCTGCTTCAAACCGCTAACAATACCT
 GGGCCACCACACCGTGTGCAATCGTAATGTCGCCATTCTGCTATTCTGTATACACCCGACAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGTCAGCAAAT
 TTCTGTCTTGAAGAGTAAAAAATGTAAGTGGCGGATAATGCCTTTAGCGGCTTAAGTGTGCCCTCCATGGAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTTTT
 TAGTAAAAAATTTGGGACCTAATGCTTCAACTAAGTAACTCCAGTAACTCCCTGGTGGTACGAACATCCAATGAAGCACACAAGTTTGTCTTTTCTGTCATG
 ATATTAATAGCTTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTTCTTATATGAGCTTTCGACATGATTTATCTTCGTTTCTGACAGTTTTTGTTC
 TGTGACGTTGGGTTAAGAATACTGGGCAATTTTCATGTTTCTTCAACTACATATGCGTATATATACCAATCTAAGTCTGTGCTCTCTCTGTTCTTCTT
 CTGTTGCGAGATTACCGAATCAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAAAAAAGAATAAAAAAATGATGAATTGAATTGAAAAGCTGTGGTA TGGTGC
 ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACCCGCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCG
 CTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCA



Sequenz:

GACGAAAGGCGCTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
 CTTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGTATTTGGATTTTAGAAAAGTAAATAAAGAGGTAGAAGAGTTACGG
 AATGAAGAAAAAATAAACAAGGTTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACAT
 TCGATTAACGATAAGTAAAAATGTAATAATCACAGGATTTTTCTGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGTGAACAATTCGGCATTAACTACCTGAGAGCAGGAAGA
 GCAAGATAAAAGGTAGTATTGTTGGCGATCCCTTAGAGTCTTTACATCTTCGGAAAAAACAATTTTTCTTAAATTTCTTTTTTACTTTCTATTT
 TTAATTTATATATTTATATAAAAAATTTAAATTAATTTATTTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGAAACC
 CCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGAGTATGAGTA
 TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCAATTTGCGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
 GTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGTTATTCCTGATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAG
 TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATATGCAAGTCTGCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGAT
 CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAATGCGGGATCATGTAAGTGCCTTGTATGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAC
 GAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTTACTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGA
 TGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTTCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT
 CATTGACGACTGGGGCCAGATGTTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
 ATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGG
 TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGA
 TCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
 GTAACCTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGCTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGCTGTGAGCACCCTACATACCTCG
 CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAAGCGCAGCGGTGGG
 CTGAACGGGGGTTCTGTGACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
 GGGAGAAAAGCGGACAGGATTCCTGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCAAGGGGAAACCGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTG
 GTTTTGCCACCTCTGACTTGAAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCTATGAAAAACGCCAGAACGCGGCCCTTTTACGGTTCTGGC
 CTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCCCTGCTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCAGCTTGTGAGTACACCGCTCGCCGACG
 CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGGAAGCGGAAAGCGCCAAATACGAAACCGCTTCCCGCGGCTTGGCCGATTCTAATATGACGCTGGC
 ACGACAGGTTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTTACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
 TCCTATGTTGTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGTATGACCAATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCTAAAGGGAACAA
 AAGCTGGAGCTCAGTTTTATCATTATCAACTCGCCATTTCAAAGAATACGTTAAATTAATAGTAGTGAATTTTCTAACCTTTATAGTCAAAAAATGAGC
 CTTTTAATCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAAATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCTGGCATCC

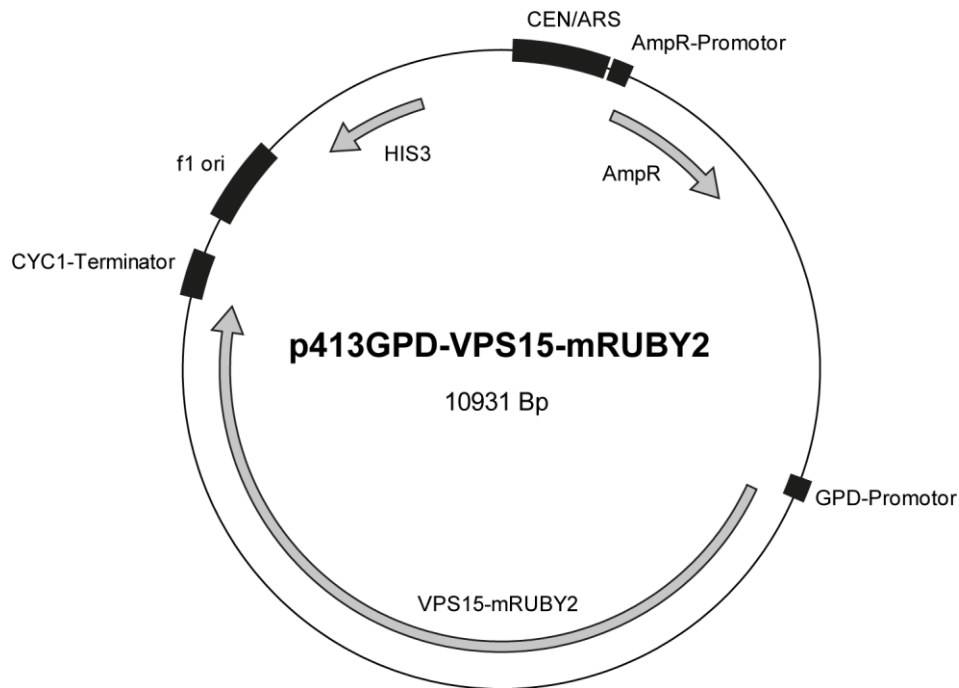
ACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCCAGCACAAAATATTGTTTTCTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCA
 TTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCACAAAAACGGGCACAACTCAATTGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
 CAATTGACCACGCATGTATCTATCTATTTTTCTTACACCTTCTATTACCTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTTC
 CTGAAATTATCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGATTTGATGTAATCTGTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATCTACTTTTATA
 GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAAACACAGAACTTAGTTTTGACGGATTCTAGAACTAGTATGGATGATTTATGAAAGGACTTTCAGTGCATGGTGTGGCA
 ACAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCA
 TTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAAGTTGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCAAGGAAGGAATTCGGAAGATATGCCTGTGGATCCTGACAA
 TGAGGCTTAGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCAAGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCC
 ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGCCACCAAGTTACGCGTGTCCGGCAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCT
 GCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCA
 CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGG
 GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACCTCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACACGCTCT
 ATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAA
 CACCCCATCGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCATCACATGGTC
 CTGCTGGAGTTCTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGTCAATGTAATTAGTTATGTACACGCTTACATTACGCCC
 TCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTT
 ATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGGTGTACGCATGTAACATTACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAA
 TTTGCGCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAAGTGTATTACGCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAACGCTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAA
 CTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCGAGTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAAT
 GCGCGAGCGCCCTGTAGCGGCGATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCTGACCCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTCGC
 TTTCTTCCCTTCTTTCGCGCAGCTTCCCGGCTTCCCGTCAAGCTTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTCTTTACGGCACCTCGAC
 CCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTCAGTGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGAC
 TCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT
 TTAACAAAAATTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGATAG
 GGTAATAACTGATATAATTAATTAAGTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCACTTACTTATAATACAGTTTTTTAGTTTTGTGCGCCGATCTTCTCA
 AATATGCTTCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGTTACCCCTTACCTTAGCATCCCTTCCCTTTGCAAATAGTCTCTTCCAACAATAAATGTCAGATCTCTGT
 AGAGACCACATCATCCAGGTTCTATACTGTTGACCAATGCGTCTCCCTTGTCATCTAAACCACACCCGGGTGTCATAATCAACCAATCGTAACCTTCATCT
 CTTCCACCATGCTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAACAAAATCTTTGTGCTCTTCGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTATATTTCCAGTAGATAGGGAGC
 CTTGTCATGACAATTCGCTAACATCAAAGGCCCTTAGGTTCTTTGTTACTTCTTGCAGCCTGCTTCAAACCGTAACAATACCTGGGCCACCACACC
 GTGTGCATTGTAATGCTGCCCATTCTGCTATTCTGTATACACCCGAGAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGTGAGCAAAATTTCTGTCTTCGAAG
 AGTAAAAAATGTAAGTGGCGGATAATGCCTTAGCGGCTTAACTGTGCCCTCCATGAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTTTTAGTAAACAAATTT
 TGGGACCTAATGCTTCAACTAACTCCAGTAATTCCTTGGTGGTACGAACATCCAATGAAGCACACAAGTTGTTGCTTTTCGTGATGATATAAATAGCTT
 GGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCAGTTCCTTATATGTAGCTTTCGACATGATTTATCTTCTGTTTCTGACAGTTTTTGTCTGTGCGAGTTGGGTT
 AAGAATACTGGCAATTTATGTTTTCTTCAACTACATATGCGTATATACCAATCTAAGTCTGTGCTCCTTCTTCTGTTCTTCTGTTCTCGAGATTA
 CCGAATCAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAAAAAAGAATAAAAAAATGATGAATTGAATTGAAAAGCTGTGGTATGGTGCAGTCTCAGTACAAT
 CTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCT
 GTGACCGTCTCCGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATACCCGAAACGCGCGCA



Sequenz:

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
 CTTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGTATTTGGATTTTAGAAAAGTAAATAAAGAAGGTAGAAGAGTTACGG
 AATGAAGAAAAAATTAACAAAGGTTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAATAGATATACAT
 TCGATTAACGATAAGTAAATGTAAATCACAGGATTTTCGTGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAACTACCTGAGAGCAGGAAGA

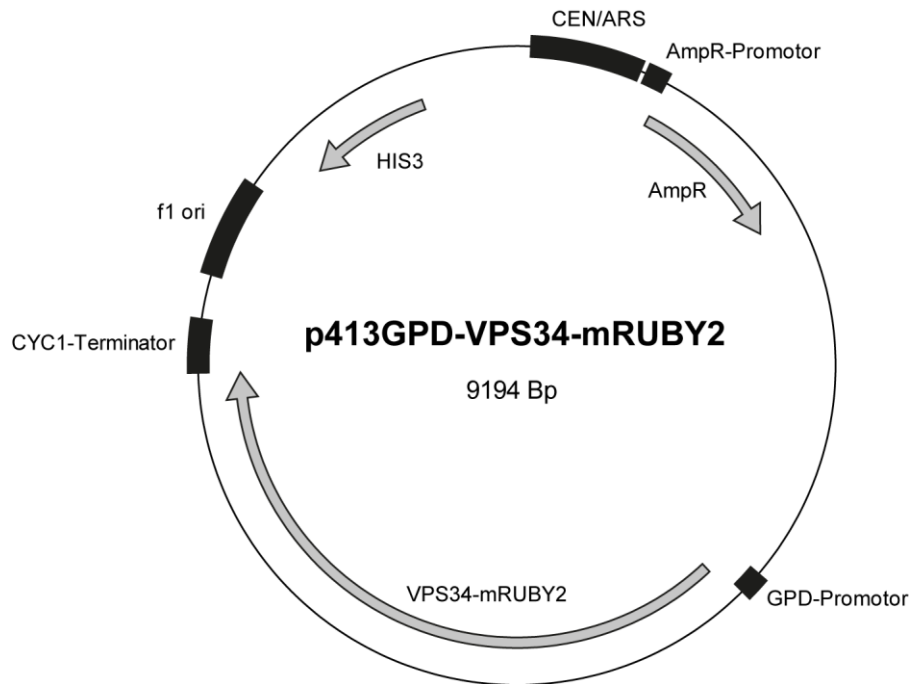
GCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCTAGAGTCTTTACATCTTCGGAAAAACAAAACATTTTTTCTTTAATTTCTTTTTTACTTTCTATTT
TTAATTTATATATTTATATTAATAAATTTAAATTTATATATTTATTTTATAGCAGTGTGATAAGAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCC
CCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGATGAGTA
TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCGGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
GTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTTACCGATGGCTGACAGTAAGAGAAATTTAGCATGCTGCCATAAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGAAACCGGAGTGAAAGAACCATACCAACGAC
GAGCGTGACACACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGA
TGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT
CAATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCCCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAATAGACAGATGACTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACAGCAAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCTTAACTGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGA
TCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
GTAACCTGGCTTACGAGAGCGAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCCTACATACTCTG
CTCTGCTAATCCTGTTACCACTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTTCTTACCAGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGCGCAGCGGTCCGG
CTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACGATACACGCGTACGATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
GGGAGAAAAGCGGACAGGATCCCGTAAAGCGGAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGCTCTGTG
GGTTTTCCGACCTCTGACTTGAAGCTGATTTTTTGTGATGCTCGTACGGGGGGGGAGCTTGGAAAAACGCCAGAACGCGGCCCTTTTTACGGTCTCTGGC
CTTTTTGCTGGCTTTTGTGCATGCTTTTTCTGCTGCTTATCCCTGATCTCTGTTGATGATTAACGCTTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCAGCG
CGAACGACGAGCGACGCGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAAGCGCCAAATACGCAAAACCCCTTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAAATGACGATGGC
ACGACAGGTTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTACGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
TCCATGTTGTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCTAAAGGGAAACAA
AAGCTGGAGCTCAGTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTATTTTCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATAGC
CTTTTTAATCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGTTACACAGAAATATAACATCGTAGGTGCTGGGTGAACAGTTTTTCTCGGCATCC
ACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCGAAAAAAAAGAAATCCAGACCAAAAATTTGTTTTCTTACCAACCATCAGTTTATAGGTCCA
TTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCAAAAACAGGCAAAAACGGGACAACTCAATGGAGTGATGCAACCTGCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTGACCCAGCATGTATCTATCTATTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAGTGAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCC
CTGAAATATTTCCCTACTTACTAATAAGTATATAAGACGGTAGGTTAGTATGTAATTTCTGTAATCTATTTCTAACTTCTTAAATTTACTTTTTATA
GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAACACCCAGAACTTAGTTTTCGACGGATTTAGAACTAGTATGGATGATTTATGAAAGGACTTCAACAATTTGGAGGA
GCAGTGGTACGGGTGTGACAGCAGTAGCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACAGTTGGCAAGA
ATGAAAGAGGAGCCCAAGGAAAGTTCGGAAGATATGCTGTGGATCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCCTTCTGAGGAAAGGATCAAGACTACGA
ACCTGAAGCAAGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCAGGGGTGGTCCCATCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAACAGGCCACAAGTTACG
GTGTCGGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCGTTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCA
CCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAAGGCTACGTCAGGAGCGCAC
CATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAGACCCCGCGCGAGGTGAAGTTCCAGGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
GAGGACGGCAACATCTTGGGCGACAAGCTGGAGTACAATACAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCA
AGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCTGCAGCTGCCGACACTACACAGAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTA
CCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGAGCCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGAC
GAGCTGTACAAGTAACTCGAGTCATGTAATAGTTATGTACGCTTACATTCACGCCCTCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGATTAGACAACC
TGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGGTGACGCA
TGTAACATTAATACTGAAAACCTTGTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTAAATTTGCGGCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTGTGATTACGC
GCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAACGCTCGTACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCAACTTAACTCGCCTTGACAGCACATCCCCCTTCCGCAAGCTGGCGTAA
AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGTGTTG
TGGTTACGCGCAGCGTACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCAGCCGCTCTTTGCTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCAGGTTCCGCCGCTTCCCCGTC
AGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGCTAGTGGGCCATCG
CCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGGTTCTTAAATAGTGGACTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATTT
CTTTTTGATTTATAAGGGATTTTTGCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAAATTAACGCGAATTTTAAACAAAATTAACGTTTTAC
AATTTCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGATAGGGTAATAACTGATATAAATTAATGAAGCTCTAATTTGTGAGTTT
AGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTTTAGTTTTGCTGGCCGATCTTCTCAAATATGCTTCCAGCCTGCTTTCTGTAACTGTTACCCCTCACT
TAGCATCCCTTCCCTTGAATAAGTCTCTTCCAACAATAAATGTAGATCTGTAGAGACCACATCATCCAGGTTCTATACTGTTGACCCAATGCGTCT
TCCCTTGTATCTAAACCCACACCGGGTGTCAATAACCAACTCGTAACTTCTATCTTCCACCATGCTCTTTGAGCAATAAAGCCGATAACAAAATCT
TTGTCGCTCTTCCGAATGTCAACAGTACCTTAGTATATTTCCAGTAGATAGGGAGCCCTTGCATGACAATTTGCTAACATCAAAAGGCTCTAGGTTCT
TTGTTACTTCTTCCGCGCTGCTTCAAACCGCTAAACAATACCTGGGCCACACACCGTGTGCAATCGTAATGTCTGCCATTCTGCTATTCTGTATACACC
CGCAGAGTACTGCAATTTGACTGTATTACCAATGTGAGCAAAATTTCTGCTTCCGAAGAGTAAAAAATGTAATTTGGCGGATAATGCCCTTAGCGGCTTAACT
GTGCCCTCCATGAAAAAATCAGTCAAGATATCCACATGTGTTTTAGTAAACAAATTTGGGACCTAATGCTTCAACTCACTCAGTAATCTTGGTGGTAC
GAACATCCAATGAAGCACACAAGTTTTGTTGTTTTCTGTCATGATATAAATAGCTGGCAGCAACAGGACTAGGATGAGTAGCAGCAGCTTCTTATATGT
AGCTTTCGACATGATTTATCTTCTGTTCCGAGGTTTTGTTCTGTGCAAGTTGGGTAAGAATACTGGGCAATTTCTGTTTTCTTCAACTACATATGCGT
ATATATACCAATCTAAGTCTGTGCTCTTCTTCTGTTCTTCTGTTCTGTTGAGGATTTACCGAATCAAAAAAATTTCAAAGAAACCGAAATCAAAAAAAGAAAT
AAAAAAAATGATGAATGAATGAAAAGCTGTGGTATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCCAAC
ACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGATGTGACAGGTTTTACCCGTC
TACCGAAACGCGCA



Sequenz:

```
GACGAAAGGCGCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTAGGACGGATCGCTGCCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
CTTTTAAATGATGGAATAAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGTATTTGGATTTTAGAAAAGTAAATAAAGAGGTAGAAGAGTTACGG
AATGAAGAAAAAATAAACAAAGGTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACAT
TCGATTAACGATAAGTAAAAATGTAATAACACAGGATTTTCGTGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAACTGAGAGCAGGAAGA
GCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTACATCTCGGAAAAACAATAAATTTTTCTTTAAATTTCTTTTTTACTTTCTATTT
TTAATTTATATATTTATATTAATAAATTTAAATTTATAATTTATTTTATAGCAGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTA
TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCACTTTTGCCTTCCGTGTTTTGCTCACCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
GTTCTGCTATGTGGCGGATTTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATATGCAAGTCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC
GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGA
TGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGGGTCTCGCGGAT
CATTGACGACTGGGGCAGATGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGACAGCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAATTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTTGAGA
TCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
GTAACCTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGAGTTAGGCCACCCTCAAGAAGCTCTGTAGCACCCTACATACCTCG
CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAAGCGCAGCGGTGGG
CTGAACCGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCACTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGGAA
GGGAGAAAAGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGCGAGGTGCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTG
GGTTTCCGCACTCTGACTTGAGCTCGATTTTTGTGATGCTCTGAGGGGGGAGGCTATGGAACAAACGCGCAGCAACCGGCTTTTTACGGTTCTCGG
CTTTTTGCTGGCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCAGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAC
CGAACGACCGAGCGAGCGAGTCAAGTCAAGGAGGAAAGCGGCAACGCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCTTGGCCGATTCAATTAAGCAGCTGGC
ACGACAGGTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
TCCTATGTTGTGGAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAA
AAGCTGGAGCTCAGTTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC
CTTTTAAATCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTATTCTGGCATCC
ACTAAATATAATGGAGCCCGTTTTTAAAGTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTACCACCAACATCAGTTTATAGGTCAC
TTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTTGACCCAGCATGTATCTATCTCATTTTTCTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAGTTGAAACCAAGTTCC
CTGAAATTTTCCCTACTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAAACTTCTAAATTTACTTTTTATA
GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAACACCAGAACTTAGTTTCGACGGATTCTAGAAGTATGGCATAACCCTATGATGTTCCAGATTACGCTGATGGGGGC
ACAATTATCACTAGTGGTCCAAAGCATCACCTTCCATAGCCATTTTTTATATATCGATGCTTAGAGGAAGTACACTACGTTTACAGTTAAACTCATCAAGA
TTCTTAAAAACATGCAAGGCACTGGACCTAACGGCGAAATGTTATCAAAGTGTTTATTAACCAAAAAGACCAATATAGCTTACGACCTTTTCTCCAACGTA
TAAGGCTCAATCGTTTAAAGTTGGGACAACTACCGCACGTTTTTAAACTACAGTAAATTTGATCGAGACAAATAGAGCCGGCTACATGATACGGCAGCACTTAAA
AAATAATTTATATGACAGATTGAGTTTGGAGACCTTACTTACAAGACATTGAACTGAAATTCATTGCTTTCCAGTTGTTAAATGCATTAAAGGACATTCATAAT
CTGAATATTGTCCATGGTGATATAAAGACAGAAAATATCCTAGTAACAGTTGGAATTTGGTGTATATTGACAGATTTTGTCTGATTTATCAAACCCGTATATT
TGCCCTGAAGATAATCCAGGTGAATTTTTATTCTACTTGCACACCTCGAAGAGAAGAACCTGTTATCTAGCCCGGAGAGGTTAACTCTAAACTTTACCAAGA
TGGAATACTAAACATGGTAGGCTAACTAAAGAAATGGACATATTTAGTCTGGATGTGTTATTGACAGAAATTTGCTGAAGGAAGACCCATCTTCAACTTA
TCACAGCTATTTCAAATATAAAGTAAATTCATATGACGTAACAGGGAATTTCTCATGGAGAAATGAATTTCCAGATTTAAGGAACTTTGGTTCTAGACATGA
TTCACTAGATCCATCCAAAAGACTTTCATGTGATGAACACTGAATAAATATCGTGGCATTTTCTTCCCGGATTTTCTACACTTTTATGATTATTT
CAGAAAATTTGGTTACTATGACAACAGCACACCGATATCAGATAACACTTGACCAATAGTACCTTGAAGACAAATGTAATAACTTTTATAGTAAACTACGGAA
AAAATATACAGAGATTTTCCCAAATATGTCTATTGTTGGACTTTCTTTAATAAAGACGGGGTGAGATTGGTTTACAGCCCCCAATTTTGAATCTTACA
AAATAGAGATAGAAAATAGTCGGTTTTTAAACACAACCTTATATTTCCCAAAAATACCATTAGTCTTACAGCAGTTTACCAAAGTATCCGAAAAGATAAA
```

ATCAGTTAAAGAGGAATGTGCCTTACTCTTTATCTCTTATTGTCTCATAGTATAAGAAGTATTGTTTCGACTGCTACGAACTTAAAAATTTAGAACTATTA
 GCAGTATTTGCACAATTCGTTTCTGATGAAAAATAAATGATCGAGTCGTACCTTATTTCTGATGTTGTTTTGAAGATAGTGACCAGGACGTCCAGGCCCTAT
 CTTTGTAAACATTAATCCAGGTACTCACCTCTGTAAGAAAAATGAATCAATTGAACGAGAATATATTTGTGGACTACTTACTTCCGAGACTGAAAAAGATTACT
 TATTTCCAATAGGCAGAATACCAATTTAAGGATGTGTTGCTAATTGTTGAGCGACTGGCCATTATCATTAAATAGATTTCAAGAATTTACATTTGCT
 CAGCACTGCAATGATAACTCAATGGATAACAACACGGAAATCATGGAAAGCAGTACCAAGTATTCAGCAAAATGATCCAAAGTGTGGAAGTTAACTGTCT
 CTTTTTAAACAGATAATGACTTATGTAAGATGGCACTTTGCAAAACATTTCCACTTTGTAATTTTTGGTAGGGAAAGAAACAAACGATATTATACT
 GAGTCATTTTAAACCTACCTTAAATGATAAGGACCCAGCATTTGCGAGTTTCCCTAATTCAAACAATATCCGGAATATCAATTTTGGGTACCGTTACATTA
 GAACAGTATATTTACCATTGTTAATCCAGACCATCACTGATTCGGAAGAATTAGTAGTGATCAGTGTTTACAAGCTTAAAACTTTGTTCAAGACTGGGT
 TGATTAGGAAAAATATATATGATATATCAAAAAACAATCTCCCTGTTGTTGCATCCTAATAATTGGATAAGACAGTTTACTTGTATGATAATTATAGA
 AATTATTAATAAGTTATCAAAAGCCGAAGTGTACTGCATCTCTATCCAATAAAGGCCCTTCTCGAATTTGACGTTGAGTCAACTCAAATCAATGATA
 AGCTGTTGCAAGCAACAGTGTCAAGATCGGTTTACAATCTATTGTGTAGTTGGTCTGTTAGAGCGTCAAAATCTTTATTTTGGAAAAAATCATCAAAATC
 ATGTAGATTCATTTCGAAAAATAGAATCGAATTTATACAAAAAAATTACTCAAGTAAAAAATATGGATTTAATAAAAGAGATACGAAATCAAGTTCCTCGCT
 GAAGGGTATTAACATCATCCACCGTCTATTACATGACAACAAGGAAATCCCTTAACTGCTGAAGACAGAAATGGATTGATAAGTCCACATTTATGGG
 CTAACAGAAAAAGATATTTGGAAAAATGTGGCTTTGAGGGGTATGTAATAAGGACAGCGAGAGTTATGGCAGCGAACCCCTGATTTTCCATATAATAATAGTA
 ATTACCGTCCATTAGTACAGAACTCACCACTAACCTAACCTTACGAATATATGCAAGAAACATTTCTTGTATGATAGAGTTGCTGAAGAGTCGACAAG
 TGAGGGACAAGATTCTAACTTAGAGAACCACAGATATATAAATATGATGAAAGTGAGAAAGATAGCAATAAGCTAAATATTAAACGGTAGCAAAACAGCTATCT
 ACCGTCATGGACATAAATGGATCACTAATTTCAAAAAAAGTCCATTGCCACTACTTCTAATTTGAAGAAGCTTTTGTTCAGTTAGAACCAACGTCTCT
 ATCAGATGCAATTTCCAAATCATGGCTTGAAAGATAATGCAAAATGTTAAACCAGAAAGGAAGGTAGTCGTGACGACAGCTATGAAGGCGACGTTGAAGGAT
 AGAAAAATCCTATCGACTTCAAAATTTACTCTCTGAGAGATTATAAGGAGTTTGGGCTTATCAAGAGATTGTACGGAGTCCAAACATGGGTAAATTTG
 AGGGCAAGTTGATAGCTACTTTGATGGAAACGAACCCAACTTATTACGTTCTCTGTTTCCAGGAGAAACACCCCTATTTAATAACAGGTTACAGTTCAGAT
 AAGGTTAATCAAGATTTGAAACCTGAAAGAGATTATCGTGGGCGAGGTTACTCTTCTTAACTTAGACTGCTCTCTACCGTAACTGAGTAACTCAACAT
 GATTCCTAATTTGACGCGTTTCCGCTTCCAGTAAAGATGGACAAATAATTGATTTAAAGGTTAATCATTACCAACAAGAAAGTGAAGTCAAATTTTGAAT
 TGCGAATGCATCAGGAAAAATTAACCTGAAGAATTTTGGTAAAAATGAATACCGAGTGAGAATGAGAGCATTGTGAATGAGGAAAAATCTCTACTAGTAGCAT
 TGACGAATTTGCAAGGGTATTATATTTGATATTAGAACCCTGGAGAGGTTACAATAATAGAGAATTTCCAAGGCATGGTGGCTTTCAAGCATCTGTAT
 CGATGAAGAGTGTGTGCTTAAATTTGGGGACGACTAGAGGTTATTGATATATGGGATATCCGTTTCAACGTGCTGATAAGGAGTTGGCTTTGGGGAC
 CACGCACCAATCACGCATGTGGAGGTTTGTGAGTTTATGGAAAGATTCTGTAATTGTTGTAGGAGGTAGTTCAAAAAATTTCTAACAATATGGAATTTTG
 TTAAGGGGATGTGAGTATGCTTTCATAAATCTGATGAACAGCCATCTATGGAGCACTTTTACCAATTTGAGAAAGGCTTAGAAGAATTAATTTTTGTGG
 AATCAGGCTTTAAACGCACTAAGCACTATCTCAGTATCTAATGATAAAATCTTCTTACCGATGAAGCAACAAGTTCATTGTTATGTTAGCTAAATGAG
 CTTTCTTCTTAAAGCAGTAATAAGTCTTCAAGATTCAAGTACGCTTTTATTCTACACAAGTTACGGCAAATCTCAAAATGTTATTGAGAAAAATGAAAC
 GTACTAGCACTATTAGTAGATGATTTCTATATCATCATGATATTATAAATCTATATCTACATGTGAAGTTGATGAGACACCTTTGGTGGTGTGTTGA
 TAACTCAGGGCTTATTGGAATCTTCAAAATCGGTGACGGTGGATCCTTAATTAACATGGTGTCAAAGGAGAGGAGTTAATCAAGGAAAAATGAGAATGAAA
 GTTGTGATGGAGGGCTCCGTTAATGGTCAACCAATCAAGTGTACAGGGGAAGGTGAAGGTAATCCTTACATGGGTACACAACTATGAGAATTAAGTAATTTG
 AAGCGGACCACTACCATTGCAATTTGACATTCTGGCAACGTCATTCATGTACGGATCACGAACCTTATCAAGTACCCTAAGGATACCCAGACTTTTTCAA
 GCAATCTTTTCCAGAGGGTTTTACATGGGAAAGGGTTACAAGATACGAAGATGGGAGTGTGTCACAGTTATGCAAGATACTTATTAGAAGATGGCTGACCT
 GTCTATCATGTGCAAGTAAAGGGGTTGAATTTTCTTCTAACGGACCTGTGATGCAGAAAAAGACCAAGGTTGGGAACCAAACTGAAATGATGTACCCAG
 CTGATGGAGGTTTGGAGGCTACACACACATGGCGCTTAAAGTTGATGGTGGAGGTCATTGTGCTTGTAGTTTTGTTACCCTTATCGTTCTAAAAAGACTGT
 TGGCAATATCAAAATGCCAGGAATACATGCTGTAGACCACAGACTAGAAAGACTCGAAGAGAGCGATAACGAAATGTTCTGTTGACAGAGAGAGCATGCCGTA
 GCCAAATTTGCTGGCTTAGGCGGTGGTATGGATGAATGTATAAGTAAGTCAATGATAGTTATGTACAGCTTACATTCACGCCCTCCCCACATCCGCTC
 TAACCGAAAAAGGAAGGATTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAAGACGTTATTATATTTCAAAATTTTTCT
 TTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATATACTGAAAACCTTGCTTGAAGAAGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTAAATTTGCGGCCGTTACCCA
 ATTCGCCCTATAGTGAGTCTGATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAACCCCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGC
 ACATCCCCCTTTCGCCAGTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGCCCTGT
 AGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTTGGTGGTTACGCGCAGCGTACCCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTCCCTTCTTCT
 TCGCCAGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCAAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTTCGGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAAATTTGATTA
 GGGTATGTTTACGATAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGAAGTTGAGTCCAGCTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGGA
 ACAACTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTGATTTAAGGGATTTTGGCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTAACG
 CGAATTTAACAATAATTAACGTTTACAATTTCTGATGCGGTTATTTCTTACGCATCTGTGCGGTTATTTACACCCGATAGATCCGTCGAGTTCAAGA
 GAAAAAAGAAAAAGCAAAAAAGAAAAAGGAAAGCGCCCTGTTGAGAAATGACACGATAGAAATGATGACTTACCTTGTCTCTTCAAGTATCATACTGTT
 CGTATACATACTACTGACATTCATAGGTATACATATATACACATGATATATATCGTATGCTGCAGCTTAAATAATCGGTGCTACTACATAAGAACACCTT
 TGGTGGAGGGAACATCGTTGGTACCATTGGGCGAGGTGGCTTCTTATGGCAACCGCAAGAGCCTTGAACGCACTCTCACTACGGTGTGATCATTCTGGC
 TCGAGACAATCAACGTGGAGGGTAATCTGCTAGCCTCTGCAAGCTTTCAAGAAAAATGCGGGATCATCTCGCAAGAGAGATCTCTACTTTCTCCCTTTGC
 AAACCAAGTTGCAACAACCTGCTACGGCCTGTTTCGAAAGATCTACCACCGCTCTGGAAGTGCCTCATCCAAGGCGCAAATCTGATCCAAACCTTTTTACTC
 CACGCGCCAGTAGGGCTCTTTAAAGCTTGACCGAGAGCAATCCCGCAGCTTCAAGTGGTGTGATGGTCTGATGTGAAGTCAACATGCACTCAACGAT
 TAGCGACCGCGGAATGCTTTGGCCAGAGCATGTATCATATGTTCCAGAAACCCCTATACCTGTGTGGAGCTTAATCACTTGGCATTGTGTGGCCTGTTCTGCT
 ACTGCTTCTGCCTTTTTCTGGGAAGATCGAGTGTCTATCGTAGGGGACCCCTTAAAGAGATCGCAATCTGAATCTTGGTTTCAATTTGTAATACGCT
 TTAAGGGCTTTCTGCTGTGCTCTTTGCTTCTGTTTATCTTGCCTGCTCATTTTTTAGTATATCTTCAAGAAATCACATTACTTTATATAATGATATAA
 TTCATTATGTGATAATGCCAATCGCTAAGAAAAAAGAGGATCATCCGCTAGGGGAAAAAAGAAAAATGAAAAATCATTACCGAGGCATAAAAAATATAGAGTG
 TACTAGAGGAGGCAAGAGTAAAGAAAAAAGAAAAATGCGGAAAGGACTGTGTTAGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTCAAACGATACCTGGCAGTGACT
 CCTAGCGCTCACCAGCTCTTAAACCGGGAATTTATGGTCACTCTCAGTACAATCTGCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACG
 CGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTGCTGCCGCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTAGAGGTTTTACCCTCATCA
 CCGAAACGCGCGA



Sequenz:

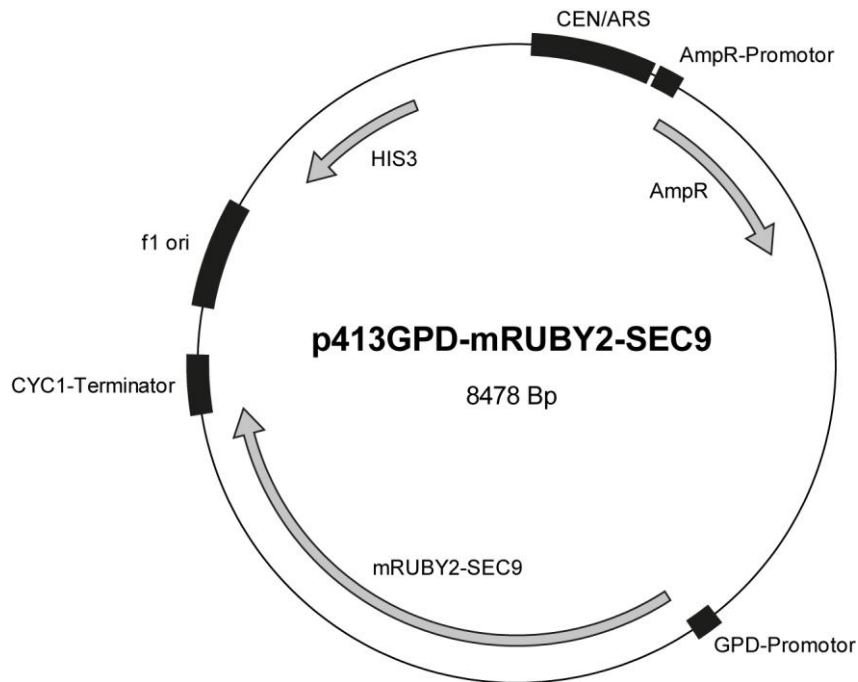
```

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
CTTTAATGATGGAATAAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGATTTGGATTTTAGAAAAGTAATAAAGAAGGTAGAAGGTTACGG
AATGAAGAAAAAATAAACAAAGGTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACAT
TCGATTAACGATAAGTAAAAATGAAAATCACAGGATTTTCGTGTGGTCTTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAACTACCTGAGAGCAGGAAGA
GCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTTACACTCTCGGAAAAACAAAAACTATTTTTCTTTAATTTCTTTTTTACTTTCTATTT
TTAATTTATATATTTATATTAATAAATTTAATTTATAAATTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGAGTA
TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
GTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCGTTATGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGTGCTGGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAC
GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTTAACTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCGGCAACAATTAATAGACTGGA
TGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCGTGGTCTCGCGGTAT
CATTGCAGCACTGGGGCAGATGGAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCCTACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACAGCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAATCTATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGTCAAAGGATCTCTTGAGA
TCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
GTAAGTGGCTCAGCAGAGCGAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAAGTGGCCACCCTCAAGAAGTCTGTAGCACCCTACATACCTCG
CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGTGCTTACCAGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGCGCAGCGGTGGG
CTGAACCGGGGGTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
GGGAGAAAGGGGACAGGATCCGGTAAGCGGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTG
GTTTTGCGCACTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGATGCTCTGACGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCTTTTACGGTTCCTGGC
CTTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCCTTTGAGTGAAGTGTATACCGTCCGCGCAGC
CGAACGACCAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGAGGAAGCGGAAAGCGCCAAATACGCAAAACCGCTTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGC
ACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
TCCTATGTTGTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAACAGCTGATGACCAATTAACGCAAGCGCAATTAACGCAAGCGCAATTAACGCAAGCGCA
AAGCTGGAGCTCAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTATTTTCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATAGC
CTTTAATTTCTGCTGTAACCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAAATACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTATTCTTCCGATCC
ACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTACCACCATCAGTTTATAGGTTCCA
TTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGTGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTTCTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAAGTCC
CTGAAATTTTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTTAGTTGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAACTTCTTAAATTTACTTTTTATA
GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAACACAGAACTTGTTCGACGGATTCTAGAACTAGTATGGCATAACCTTATGATGTTCCAGATTACGCTGATGCTACT
GAACAACATAACATTTCTGTGCTCACAGGATCTGGATGTTCCCTGAAAGTGAATACTAAGTCAATGGAAAGGACATAAGCCACTGTTGAAGCCATCTCAAAA
ATCCTGAACCTGAAATTAATGCTGATAGGGTCAAATGTATTCCTTCTAGTGATCTAATTTACAGGTTATTTGATAAAGAGAGAAAACAGAAAATTTAA
CTCTTCCGATATACACGCGGTATATTTCTTTCAGAACTCTAGAACTTGGGATTTTGGTTGACTTTGCCATACGATCAAAACGCTTAACTTTAGCAGTCA
TTTACGCTATTTTTGTGGGAATAAATGGATCCAAGCAAATTCCTTTTTCAATCTAGAAACGAGCATCTTAACTTAAAAGACTGTACTTTAAAAGAGGG
TTTGAATCCTTAAAATTTCTGTATGATGTGATTGACCACTGTGAAGTGGTCACTGATAACAAAGATCAAGAAAATTTGAATAAATTTTTACGGGTGAATTC
CGAGACTCCCTGGCTTGACGAAATCACTATAAGCAAATTAAGGAAACAACGGGAAAAATAGGACTTGGCCTCAGGGCACCTTTGCTTAACTTAGAATTTCC
AATGTTAGAGCTTCCGTGTTGTTTCATCGAAAAGGAAATTAAGAACTCAAAATGAATATTTCAACTTTGAAAGAACAACTTGGACTAAGCACAGACTACGA
GAACCGAATAGGAATGATCCTCAAATCAAATTTCTTTGGGGGACAAATCACTCCACATGAAAGTTTACGATCTGACCAACCAAAATGATCCAATAG
AGGAAAAGTATAGGAGATTGGAAAAGAGCATCTAAAATGCAAACTTGGCAAGCAAGTGAAGCCGGACATTTAAAAGAGGGACTACTTGAATAAATCATCAA
CTACCCCTTGGCACTAAATTAACAGCAGATGAAAAGGGTTCAATATGGAATATAGGATATTTGATGAACAATAAAAAAGCTTTACAAAGTTATTACAG
AGTACAAAATTTGAGAGAAGAATCGGAAAGAGTAGAGTTTTAGAACTAATGGACTCATGGCAGAAATGATATAGACGACGCAATTAAGACTATTAGGCTCAA
CTTTTAAAACCTTTTCACTGAGATCGTACGCCGTAATAGGCTGAAAGAGGCAATGACACAAGGAGCTGGAATTTGACTTTACAGTTGGTGAAGGCTGTCTG

```


Sequenz:

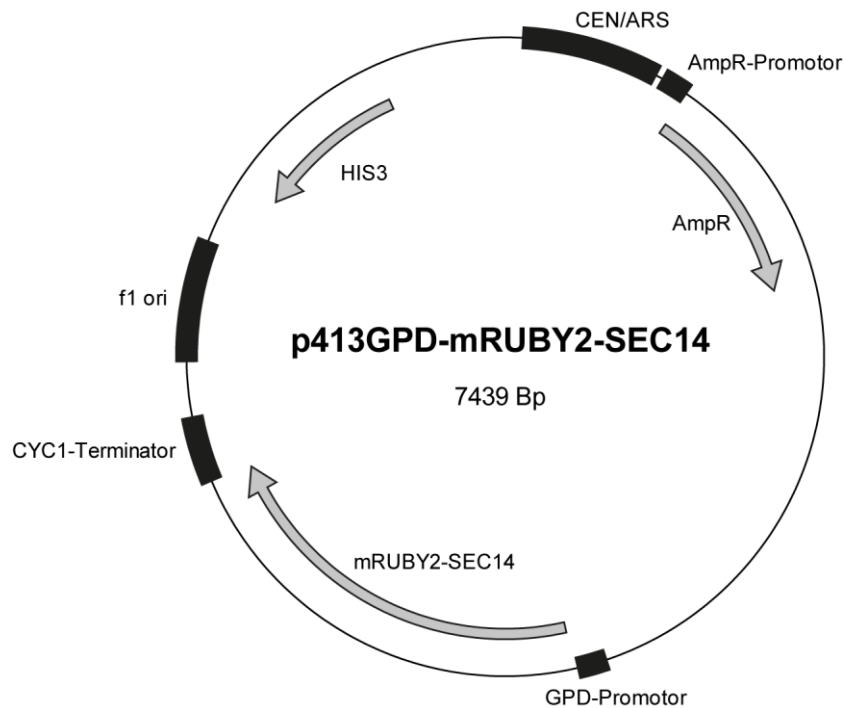
GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAGGTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
 CTTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTTATTTATTTTTATGTTTGTATTTGGATTTTGAAGAAATAAAGAGGTTAGAAGGTTACGG
 AATGAAGAAAAAATAAACAAAGGTTAAAAAATTTCAACAAAAAAGCTACTTTACATATATATTTATAGACAAGAAAGAGCAGATTAATAGATATACAT
 TCGATTAACGATAAGTAAAAATCAACAGGATTTTCGTGTGGTCTTCTACAGACAAAGATGAAACAATTCGGCATTAACTACCTGAGAGCAGGAAGA
 GCAAGATAAAAGGTAGTATTGTTGGCGATCCCTAGAGTCTTTACATCTCGGAAAAAACAATTTTTCTTAATTTCTTTTTTACTTCTATTT
 TTAATTTATATATTTATTTAAAAAATTTAAATTTAATTTATTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCAGCTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACC
 CCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTTCAAAATGATATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGATGAGTA
 TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAAGATGCTGAAGATCA
 GTTGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGAGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
 TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGACAGTCTGCCATAACCATGAGTGATAACTGCGGCAACTTACTTCTGACAACGAT
 CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGATCATGTAACCTGCCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAC
 GAGCGTAGCAACAGCTGCCTGTAGCAATGGCAACAACCTTTCGCAAACTTTAACTGGCAGCACTACTTACTAGCTTCCGCGCAACAATTAAGAGCTGGA
 TGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACACTTTCGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGTCTCGCGTAT
 CATTGACGACTGGGGCCAGATGTTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
 ATAGGTGCCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGG
 TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAAGATCAAAAGGATCTCTTGAGA
 TCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
 GTAACGTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACAAATCTGCTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCG
 CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGCTTACCGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGG
 CTGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCCGTAA
 GGGAGAAAGGCGACAGTATCCGTTAAGCGGCAAGGTCGGAACAGGACAGGAGCGACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAGCCAGCTGGTATCTTTATAGCTGTCG
 GGTTCGCCACCTCTGACTTGGAGCGTATTTTTGTGATGCTCGTACGGGGGGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGC
 CTTTTGCTGGCCTTTTCTCACATGTTCTTTCTGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCAGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGACG
 CGAACGAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCTTGGCCGATTTAATGACAGTGGC
 ACGACAGGTTCCCGACTTGAAGCGGGCAGTGGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTTATGTTTCCGGC
 TCCTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTACTAAAGGGAACAA
 AAGCTGGAGCTCAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTATTTTCTTAACCTTATTAGTCAAAAAATTAGC
 CTTTTAATCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAAACAATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTATTCTTGGCATCC
 ACTAAATATAATGGAGCCGCTTTTTAAGTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAAATTTGTTTTCTTACCACCATCAGTTTATAGGTCCA
 TTTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCAAAAACAGGCAAAAACGGGCAACCTCAATGGAGTATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
 CAATTGACCCAGCATGTATCTATCTATTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTCC
 CTGAAATATTTCCCTACTGACTAATAAGTATATAAAGACGTTAGGTATTGATTGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTTACTTTTATA
 GTTAGTCTTTTTTAGTTTTAAACACCAGAATAGTTTTGACGGATTCTAGAATAGTATGGTGTCCAAGGAGAGGAGTAAATCAAGGAAAAACATGAGA
 ATGAAAGTTGTGATGGAGGCTCCGTAAATGGTCAACCAATTAAGTGTACAGGGGAAGGTGAAGGTAATCCTACATGGGTACACAACATATGAGAAATTAAG
 TAATTGAAGGCGGACACTACCATTTGCATTTGACATTTCTGGCAACGTCATTATGACGGATCACGAACCTTCAAGTACCCTAAAGGATACACAGACTT
 TTTCAAGCAATCTTTCCAGAGGTTTTACATGGGAAAGGTTACAAGATACGAAGATGGGGTGTGTCACAGTTATGCAAGATACTTATTAGAAGATGGC
 TGCCCTGTCTATCATGTGCAAGTAAGAGGGGTGAATTTCTTCAACGGACCTGTGATGCAAGAAAAAGCACAAGGTTGGGAACCAAACTACTGAAATGATGT
 ACCAGCTGATGGAGTTTGGAGGCTACACACATGCGCTTAAAGTTGATGGTGGAGTCACTTGTCTGTAGTTTTGTTACCACCTATCGTCTTAAAAA
 GACTGTTGGCAATATAAAAATGCAAGAAATACATGCTGTAGACAAACAGACTAGAAGACTCAGAAAGAGCGATAACGAAATGTTCTGTTGACAGAGAGCAT
 GCCGTAGCCAAATTTGCTGGCTTAGGGGTGGTATGGATGAATTTGATAAGTTCGACATCGATATGTCAGGCTTGAGAACTGTTTCTGCTTATCCGGTAATG
 GAAAGAGCTATGACTCTATTATGAAAAATTTATTTGATTGGTGTCTGGTGTGGGAAATCATGTTTATTGGTTGTTTTGTTGAAGACAAATTTAACCCGCT
 ATTTATCACCACTATGGTATTGATTTCAAATAAAGACTGTGATATCAACGGTAAGAAGGTAAGTGCACCTTTGGGATACCCTGGTCAAGAAGCTTTT
 CCGCAATCACACAGCGTATTATCGTGTGCTATGGGTATCATTTGATATGATGTGACAGACGAGAGAACAATTTACTAATATCAAGAACTGGTTAAAA
 CCGTTAATGAGCATGCAACGATGAAGCACAGTACTGTTGGTGGTAAACAGAGCGATATGGAGACGAGAGTGGTAACAGCTGATCAAGGTGAAGCCTGGC
 TAAGGAGCTGGGTATACATTCATCGAGTCCAGTGC TAAGAACGATGACAATGTC AACGAGATTTTTTACCTTGGCGAAGTAAATCCAAGAAAAAATCGAC
 AGTAACAAGCTTGTGGCGTGGTAACGGTAAGAGGGCAATATAGCATCAATAGTGGGAGCGGAAACAGTTC TAAATCAAATGCTGTTGACTCGAGTCAT
 GTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCCCCACATCCGCTTAACCGAAAAAGGAGGTTAGACAACCTGAAGCTTAGTCCCATTATTTATTT
 TTTATAGTTATGTTAGTAAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCAATGTAACCTTATACTACTACTTGC
 TTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTAAATTTGCGGCCGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAAGTGTATTACGCGCTCACTGGCCGCTGTTTTACAA
 CGTGTGACTGGGAAAAACCTTGGCGTATCCCAACTTAAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCC
 CTTCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCGGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCTGACCGCTAC
 ACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCAGCTTTCGCCGCTTTCCCGCTCAAGCTCAAATCGGGGGCTCCCTTTA
 GGGTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTACGCTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTT
 TGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAACCTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTGGC
 GATTTCCGGCTATTTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTAACCGGAATTTTAAACAATAATTAACGTTTACAATTTCTGATCGGTTATTTCTCC
 TTACGCATCTGTGCGGATTTACACCCGCATAGATCCGTGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAAGCAAAAAGAAAAAGGAAAGCGCCCTCGTTGAGAAAT
 GACACGATAGAATGATGCAATACCTTGCATCTCAGTATCACTGTTCGATACATACTACTGACATTCATAGGTATACATATATACACATGATATAT
 ATCGTATGCTGCAGCTTAAATAATCGGTGTCACATACAAGAACCTTTGGTGGAGGGAACATCGTTGGTACCATTGGGCGAGGTGGCTTCTTTATGGCA
 ACCGCAAGAGCCTTGAACGCACTCTCACTACGGTGTGATCATTCTGCCTCGCAGACAACTCAACGTGGAGGGTAATTCGCTAGCTCTGCAAGGCTTCAA
 GAAAATGCGGGATCATCTCGAAGAGAGATCTCTACTTTCTCCCTTTGCAAAACCAAGTTCGACAACCTCGGTACGGCTGTTGCAAGAGTCTACCACCGCTCT
 GGAAAGTGGCTCATCTCAAAGGCGCAAAATCTGATCCAACTTTTTACTCCACCGCCAGTAGGGCTCTTTAAAGGCTTACCCGAGAGCAATCCCGCAGTCT
 TCAGTGGTGTGATGGTGTCTATGTGTAAGTACCAATGCACTCAACGATTAGCGACAGCGGAAATGCTTGGCCAGAGCATGATCATATGGTCCAGAAACC
 CTATACCTGTGTGGACGTTAATCACTTGCATTTGTGTGGCTGTCTGCTACTGCTTCTGCTCTTTTCTGGGAAAGATCGAGTGTCTATCGCTAGGGGACC
 ACCCTTAAAGAGATCGCAATCTGAATCTTGGTTTCATTGTAATACGCTTACTAGGGCTTCTGCTGTCTCTTTGCCTTCTGTTATCTTTCGCTGCTCA
 TTTTTTAGTATATTTTGAAGAAATCACATTACTTTATATAATGTAATTTCAATATGTTGATAATGCAATCGCTAAGAAAAAAGAGTCAATCCGCTAGG
 GGAAAAAAGAAATGAAATCATTACCGAGGCAAAAAAATATAGAGTGTACTAGAGGAGGCAAGAGTAAAGAAAAAAGAAATTTGCGGAAAGGACTGTG
 TTATGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTTCAAACGATACCTGGCAGTACTCTAGCGCTCACAAGCTTAAACGGGAATTTATGGTGCATCTCAGTACA
 ATCTGCTGTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGCACCCGCCAACACGCGCTGACGCGCTGACGGGCTGCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAG
 CTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGATGTGTGAGAGTTTACCCTGTCATACCCGAAACGCGCGA



Sequenz:

```
GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAGGTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
CTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTTATTTATTTTTATGTTTTGTATTTGGATTTTAGAAAAGTAAATAAAGAGGTTAGAAGGTTACGG
AATGAAGAAAAAAATAAACAAAGGTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACAT
TCGATTAAACGATAAGTAAAATGTAATAACACAGGATTTTCGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAACTTACAGAGCAGGAAGA
GCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTTACATCTTCGGAAAAACAAAAACTATTTTTCTTTAATTTCTTTTTTACTTTCTATTT
TTAATTTATATATTTTATTTAAAAAATTTAAATTTAATTTATTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGAGTA
TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTGCTTCTGTTTTGCTCACCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
GTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGCAGCATTAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGTGCTGGGAAACGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGAC
GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTTAACTGGCGAAGTACTTACTTAGCTTCCGGCAACAATTAATAGATGGGA
TGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGCTCGCGGAT
CATTGCAGCACTGGGGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACAGCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGTCAAAGGATCTCTTGAGA
TCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC AAAA AAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTGTTGTTGCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
GTAACCTGGCTTCAAGCAGAGCGAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAAGTCTGTAGCACCCTACATACCTCG
CTCTGCTAATCCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGG
CTGAACGGGGGGTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACAGTACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
GGGAGAAAGGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTG
GGTTTTCGCCACTCTGACTTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTCTGACGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCCCTGGC
CTTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCCTTTGAGTGAGTGATACCGCTCGCCGACG
CGAACGACCAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAAACGCAAAACCGCTTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGACGCTGGC
ACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
TCCATGTTGTGTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACA
AAGCTGGAGCTCAGTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTATTTTCTTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC
CTTTAATTTCTGCTGTAACCCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTATTCTTCCGCTCC
ACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGTGGCATCCAGAAAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTACCACCAATCAGTTTATAGGTTCCA
TTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGAAACCAAGTTCC
CTGAAATTTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTTGATTGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAACTTCTTAAATTTACTTTTATA
GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTTAAAACACCAGAACTTGTTCGACGGATTCTAGAACTAGTATGGTGTCCAAAGGAGAGGAGTTAATCAAGGAAAAACATGAGA
ATGAAAGTTGTGATGGAGGGCTCCGTTAATGGTCAACAATCAAGTGTACAGGGGAAGGTGAAGGTAATCCTTACATGGGTACACAACTATGAGAATTAAG
TAATTTGAAGGCGGACCACTACCAATTTGCAATTTGACATTTGACATTTGACAACTGTAAGGTGACATCGATATGGGATTAAGAAATTTTTTAAAGTAAAGGTAACCAAGG
TTTTCAAGCAATCTTTCCAGAGGGTTTTACATGGGAAAGGGTTACAAGATACGAAGTGGGGGTGCTGACAGTTATGCAAGTACTTCAATAGAAGATGGC
TGCCTTGTCTATCATGTGCAAGTAAAGAGGGTGAATTTCTTCTAACGGACCTGTGATGCAGAAAAAGACCAAAGGTTGGGAACCAAACTACTGAAATGATGT
ACCCAGCTGATGGAGGTTTGGAGGCTACACACACATGGCGCTTAAAGTTGATGGTGGAGGTCATTTGCTTGTAGTTTTGTTACCCTTATCGTTCTAAAAA
GACTGTTGGCAATATAAAAATGCCAGGAATACATGCTGTAGACCACAGACTAGAAAAGCTCGAAGAGAGCGATAAACGAAATGTTGTTGTACAGAGAGAGCAT
GCCGTAGCCAAATTTGCTGGCTTAGGCGGTGGTATGGATGAATTTGATAAAGGTGACATCGATATGGGATTAAGAAATTTTTTAAAGTAAAGGTAACCAAGG
AAGCGACACAGAACAGAACAGGATACCTTTGATGGAACCTGGTATTAGTGTCAAAAACCTAGCAAGAAAAGAAAAGAAAATTTGCCGCTACGGTAAATTT
TGCAAAATGATAAAGCTGAAGATAAGGATACCGCCACCAGGTTATGAGCAGTATGCTAGGCCACAGGATGAACCTTGGAGTTTGAATGCTTCCCTTAGAT
GCCAATGCTAACGAGGCAACTGTGGTTCTAATAGAGGTTCAAGTGGCACGCAAGATCTCGGAAATGGAGCAGAATCCAATTTATGCAAGATCCGTACGCTA
TCGAAAATGATGATACCAGTATGATACGATCCTTATGCAAGGTTTCAAGCTTAATAAAGTAAATGGGAGAGGTAGCGTCAATGCTGCCTTATGGTGATTA
TGGAGGGGGTACAATGGCAGATCTGAAATTCATATAAACAAGTTGGCCGATTAGTAACAAAAACTTCAAACAGCTGGGTGAATGCGAATGGCCGATTAAT
```

AGTTTAAATCATTCAAACAGCACTTTAAACGTAGGGCCTTCGAGGCAAAACAGGCAACC GCCGGTTCAACGTCGACCAACAGCTTATCGCTTGACCAAAGAA
 GTCCCTTAGCAAACCCGATGCAAGAAAAGAGAATCTTACGCTGATATGAATAGTTATGGCGGGGCGTATGACTCCAATACTAATAGATCTAGCGGTACTCG
 ACAAGGAAGCTCCAAGATGCAAAATCCATACGCTCTATGGCGAACGACTCATATAGTAAATGGAAATTTGAACAGGTCTGCAAAATCCATATTTAGTGAAGT
 GTGCGTCAACCGCAATCGCAACAAGCTCCAATGACTTATACGCCCTCTTTATTGCTTCTGATGAAGCAGCAGCAATAGTGAAGTTGATTTAAATGAAGAAC
 CTAGAACAGGTGAATTTGATTTTGAAGAAGTTATGCTGACAAGTCTGCAGAAAAATAGAGCGGCATTAGATGAGCCTGATTTGAATGCAATGACGAAATGA
 AGATTCATAGATTTAAATGCGTCCGAAGTTGATCATAGTTCAAGACAGCAGCAGCAGCAACAGTGGTTCATGGATGAGCAGCAACAGCAACAGCAACACTTT
 AACGCAACAATAACCAATATGGAGATCAAAGGGTTACAAAAACATTTGAAGAAAATACAAAAAGAAAGAGGAGGCTCGCCAGCAGCAGGAAAGATGAAGCAG
 TAGATGAAATCAAGCAGGAGATCAAATTCAGAAACAGAGTCCGTAGCCTCTACTAGAAATACACTAAAAATGGCTCAAGACGCCGAAAGAGCAGGTATGAA
 CACATTTGGGTATGCTGGGTCAATCAAGTGAACAATTTGAATAACGTAGAGGAAACTTAGATTTAATGAAGTGCAAAATAAAGTTGCAGATGAAAAAGTTGCA
 GAACTAAAAAATTTGAACCGTAGTATATTTGGCTGTCCATGTTTCTAATCCGTTAATTTCAAGAGAAGGAGAAGGGAGAGGGAAGAGCAGCTGAAGAATAGGA
 AAATTTGAAGAAAAATTAATGAGAGAGCAACAAGTCAACAATTTGCTCAGTCCACTCAAAGAATAGAGGGTGCATGAACGCAAAATAACATAAGTGAAGT
 GCGGGAAAGATATCAGAGGAAGAATGTTCTAGAAAAAGGCAAAAGAGATACAGTCTTGAAGATGATGAAGAAGATGACGAAATGGAATTTGGAATTTGATAGGAAT
 TTGGACCAGATTGAGCAGGTAGCAACAGATTGAAGAAAATGGCCTTGACCCTGGTAAAGAATTAGACTCTCAGCAAAAACGTCTCAACAACATTGAGGAAA
 GCACTGATGATCTAGATATCAATCTCCATATGAATACCAACAGTTGGCAGGTATCAGATAGCTCAGTCAATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTACAGC
 CCTCCCCACATCCGCTCTAACGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTAT
 TTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTT
 AATTTGCGGCCGTACCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGATTACGCGCGCTCAGTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCC
 AACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCC AACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGA
 ATGGCGCAGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTC
 GCTTTCTCCCTTCTTCGCGCAGCTTCCCGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG
 ACCCAAAAAAATTTGATTAGGGTATGGTTACGCTAGTGGGCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGG
 ACTCTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG
 ATTTAAACAAAAATTTAACGCGAATTTAAACAAAATATTAACGTTTACAAATTTCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCAT
 AGATCCGTCGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGGAAAGCGCCCTCGTTCAGAATGACACGTATAGAATGATGCATTACCTTGCA
 TCTTCAGTATCATACTGTTGATATACATACTTACTGACATTCATAGGTATACATATATACACATGTATATATATCGTATGTCAGCTTTAAATAATCGGTG
 CACTACATAAGAACACCTTTGGTGGAGGAACATCGTTGGTACCATTGGGCGAGGTGGCTTCTTATGGCAACCGCAAGAGCCTTGAACGCACTCTCACTAC
 GGTGATGATCATTCTGCTCGCAGACAATCAACGTGGAGGGTAATCTGCTAGCCTCTGCAAAAGCTTCAAGAAAAATGCGGGATCATCTCGCAAGAGAGATC
 TCCTACTTTCTCCCTTTGCAAAACCAAGTTGCAACAATGCGTACGGCCTGTTGCAAAAGATCTACCACCGCTCGGAAAGTGCCTCATCAAAGGCGCAAAATCCT
 GATCAAACCTTTTACTCCACGCGCCAGTAGGGCTCTTTAAAAGCTTGACCAGAGCAATCCCGCAGTCTTCAAGTGGTGTGATGGTGTGCTATGTGTAAGT
 CACCAATGCACCTAACGATTAGCGACCGCCGGAATGCTTGGCCAGAGCATGTATCATATGGTCCAGAAAACCTATACTCTGCTGACTAATGCTGTTTCAA
 TTGTTGGCCTGTTCTGCTACTGCTTCTGCTCTTTTCTGGGAAGATCGAGTGTCTATCGTAGGGGACCACCCTTAAAGAGATCGCAATCTGAATCTTG
 GTTTCATTTGTAATACGCTTACTAGGGCTTCTGCTCTGTCTTTCGCTTCTGTTTATCTTGCCTGCTCATTTTTTAGTATATTTCTCGAAGAAATCACAT
 TACTTTATAATGATAAATCATTATGTGATAATGCCAATCGCTAAGAAAAAAGAGTATCCGCTAGGGGAAAAAAGAAATGAAATCATTACCGAGG
 CATAAAAAATATAGAGTGTACTAGAGGAGGCCAAGAGTAATAGAAAAAAGAAATTTGCGGAAAGGACTGTGTTATGACTTCCCTGACTAATGCCGTGTTCAA
 ACGATACCTGGCAGTGACTCTAGCGCTCACCAGCTCTTAAAACGGGAATTTATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGC
 CCCGACCCCGCCAACAGCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCA
 GAGGTTTTACCCTCATCCGAAACGCGCGA



Sequenz:

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAGTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
 CTTTTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGATTTGGATTTTAGAAAAGTAAATAAAGAAAGGTAGAAGAGTTACGG
 AATGAAGAAAAAATAAACAAGGTTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTACTTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACAT
 TCGATTAACGATAAGTAAATGTAATACAGGATTTTCGTGTGTGGTCTTCTACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAAATACCTGAGAGCAGGAAGA
 GCAAGATAAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTACATCTTCGGAAAAAACAATAATTTTTCTTTAATTTCTTTTTTACTTTTCTATTT

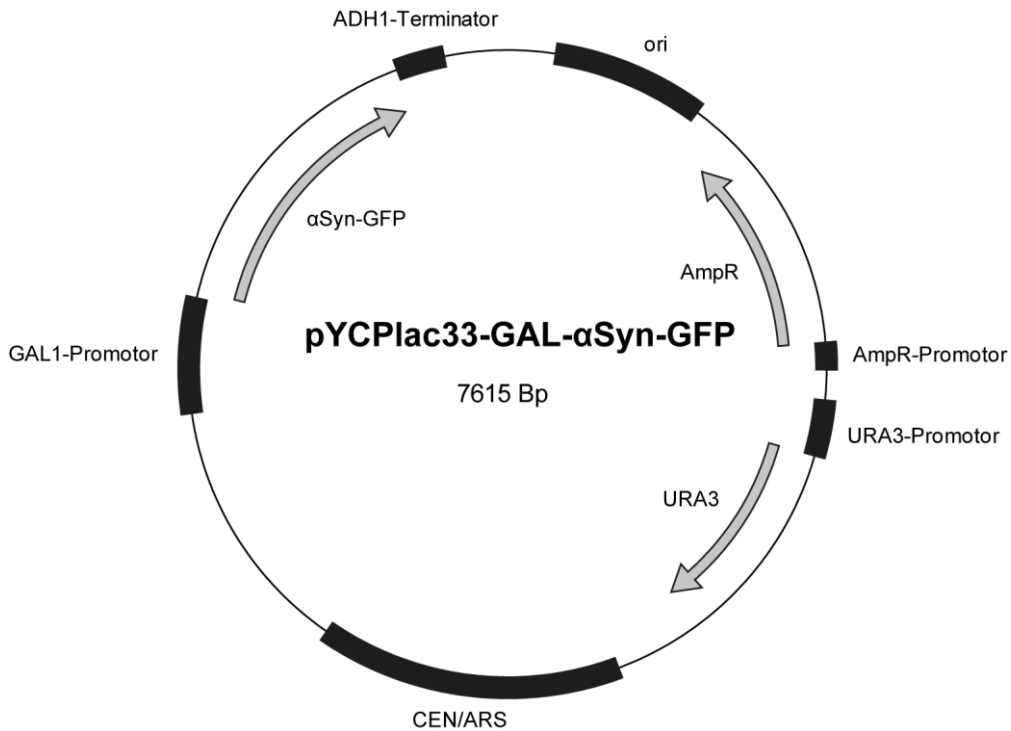
TTAATTTATATATTTATATTAATAAATTTAAATTTATTAATTTTTATAGCACGTGATGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
CCTATTGTTTATTTTCTAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGATGAGTA
TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
GTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCGATTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGCAGTGTCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACACAGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTTAACCTTTTTGACACAACATGGGGGATCATGTAATCTGCCTTGTATGCTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGGCAATACCAAACGAC
GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGA
TGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT
CATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCCTGAG
ATAGGTGCCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACGTGCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAATTTAAAAGGATCAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAAGTCAAAGGATCTTCTTGAGA
TCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCTGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
GTAACGTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGCTCTGTAGCACCGCTACATACCTCG
CTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGG
CTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
GGGAGAAAAGCGGACAGGATCCGGTAAGCGCGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCG
GGTTTTCCGACCTCTGACTTGGAGCTGATTTTTGTGATGCTGCTGAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTCTCTGGC
CTTTTGTGGCCTTTTGTCTCAGATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTGTGGATAACCGTATTACCAGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTTTCAGCGCAGC
CGAACGACCGGAGCGACCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGCGCCAAATCCAGCAACCCGCTTCCCGCGCGTGGCCGATCATTAAATCGAGCTGGC
ACGACAGTTTTCCGACGTGAAAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTCTACTATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGC
TCCTATGTTGTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCTACTAAAGGGAACAA
AAGCTGGAGCTCAGTTTTATCATTATCAATACTCGCCATTTCAAAGAATACGTAATAAATTAATAGTAGTATTTCTTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGC
CTTTAATTTCTGCTGTAACCCGATACGCCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAACATCGTAGGTGCTGGGTGAACAGTATTCTTCCGGCATCC
ACTAAATATAAGTGGAGCCCGTTTTTAAAGTGGCATCCAGAAAAAAAAGAAATCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCCACCAACTCAGTTATGAGGTC
TTCTTCTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACTCAATGGAGTGATGCAACCTGCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
CAATTGACCCACGATGTATCTATCTCATTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTGGA AAAAGCTGAAAAAAAAGGTTGA AACCGATTC
CTGAAATTTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTTAGTTGTAATTTCTGTAATCTATTCTTAAACTTCTTAAATTTACTTTTTATA
GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAACACAGAATCTAGTTTTGCGCGATTCTAGAAGTATGTTGTTCCAAAGGAGAGGAGTTAATCAAGGAAAAACATGAGA
ATGAAAAGTTGTCATGGAGGGCTCCGTTAATGGTCAACCAATTTCAAGTGTACAGGGGAAAGGTGAAGGTAATCCTACATGGGTACACAAACTATGAGAATTAAG
TAATTGAAGGCGGACCACTACCATTTGCATTTGACATTTGCAACGTCATTATGACGGATCACGAACCTTCAAGTACCTAAAGGATACCAGACTTT
TTTCAAGCAATCTTTCCAGAGGGTTTTACATGGGAAAAGGGTACAAGATACGAAGATGGGGGTGCTGTCACAGTTATGCAAGATACTTATGAAAGATGGC
TGCTTGTCTATCATGTGAAGTAAAGGGGTGAATTTCTTCTAACCGCACTGTGATGCAAAAAAGACCAAAGGTTGGGAACCAAACTACTGAAATGATGT
ACCCAGCTGATGGAGGTTGAGAGGCTACACACACATGGCGCTTAAAGTTGATGGTGGAGGTCATTGTCTTGTAGTTTTGTTACCACATATGCTTCTAAAA
GACTGTTGGCAATATAAATGCCAGGAATACATGCTGTAGACCACAGACTAGAAAAGCTCGAAGAGAGCGATAACGAAATGTTGCTTGTACAGAGAGAGCAT
GCCGTAGCCAAATTTGCTGGCTTAGGGCGTGGTATGGATGAATTTGATAAGTTCGACATCGATATGTTACACAACAAGAAAAGGAAATTTTGAATCCTACC
CTCAAAACTGCTCTCAGATGCTTGCCTGGTACTCAGGAAATTTAGACAGCGCTCAAGAGAAGGCATGGCAGAACTAAGAAAACCTTTGGAAGACGCTGG
TTTCAATGAACGTTTAGACGATCAACTTTACTAGTTTTTTGAGAGCCAGAAAATTTGATGTTCAATTTGGCTAAAGAAATGTTGAAAACGCGAAAAATGG
AGGAAGGATATGGTACCGACACTATCTTGAAGATTTTCAATATGATGAAAAAACCAATGATTGCCAAATTTACCCCAATATTATCATAAAACCGATAAAG
ATGGCCGCCAGTATATTTGAAGAATTAGGTGCTGTTAACTTACATGAAATGAACAAGGTTACTCTGAAGAGAGGATGTTGAAAACCTTGGTTGGGAATA
CGAATCTGTCGTTCAATACAGATTACCTGCCTGTTCAAGAGCTGCTGGTCACTAGTGGAAACTTCAATGACAATTTAGGATTTGAAAAGGATATCCATATCT
AGTGATACAGTGTATGTCATATGTTAGGGAAGCCTCTACATAAGTCAAACTATTACCAGCAAGTATGGGTAATTTACATCATCAACGCGCCATTCG
GTTTTCTACCCGATTTAGGCTATTTAAACCTTTCTTGGATCCAGTCACTGTTTCAAAGATTTTTACTTGGGTTCTTCTTCCAGAAAGGCAATTTAAAGCA
AATTCAGCTGAAAACCTACCAGTCAAATTTGGCGTAAGTCTGAAGTTGATGAATCCAAGGGTGGGTTATACCTATCCGATATCGGTCCATGGAGGGATCCA
AAGTATATTGGACCGAAAGGTGAAGCTCCGGAAGCCTTTTCGATGAAATGAGACTCGAGTCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTACGCCCTCCCCC
ACATCCGCTCAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTTATATTTT
AAATTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGATGTAACATATACTGAAAACCTTGTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCGG
CCGGTACCCCAATTCGCCATTAGTGAGTGTATACGCGCGCTCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATC
GCCTTGACGACATCCCTTTCCGACGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATGCCCTTCCCAAGTTCGCGAGCTGAATGGCGAATGGCGGA
CGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTACGCGCAGCGTACCGCTACACTTGCACGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTCGCTTCTTC
CCTTCTTTCTCGCCAGTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCAAAA
AACTTGATTAGGGTGTGGTTACAGTGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGCTTCTTTAATAGTGGACTCTTTG
CCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGTGTATTAACAA
AAATTTAACGCGAATTTAAACAAAATTAACGTTTTACAATTTCTGATGGGATTTTTCTCTTACGCTATGTCGGTATTTACACCCGATAGATCCGTC
GAGTTCAAGAGAAAAAAAAGAAAAAGCAAAAAAGGAAAGCGCCCTGTTTCAAGTACACGATAGAAATGATGATTTACCTTGTCTATTTCAAGT
TCATACTGTTGATACATACTTACTGACATTCATAGGTATACATATACACATGATATATGATGCTGCAGCTTTAAATTAATCCGGTGTACTACATA
AGAACACCTTTGGTGGAGGGAACATCGTTGGTACCATTTGGGCGAGGTGGCTTCTCTTATGGCAACCGAAGAGCCTTGAACGCACTCTCACTACGGTATGAT
CATTCTTCCCTCGCAGACAATCAACGTGGAGGGTAATTTCTGCTAGCCCTGCAAAAGCTTTCAAGAAAATGCGGGATCATTCGCAAGAGAGATCTCTACTTT
CTCCCTTTGCAACCAAGTTGCAACAAGTGTGCAAGTACCGCTGTTGCAAGATCTACCACCGCTTGGAAAAGTGCCTCATCAAAGGCGCAAACTCTGATCAAAC
CTTTTTACTCCAGCGCCAGTAGGGCTCTTTAAAAGCTTGACCGAGAGCAATCCCGAGTCTTCAAGTGGTGTGATGGTGTGATGTTAAGTACCAATGC
ACTCAACGATTAGCGACCGAGCCGAATGCTTGGCCAGAGCATGTATCATATGGTCCAGAAAACCTATACCTGTGTGGAGCTTAATCACTTGGCATGTTGTGGC
CTGTTCTGCTACTGCTTCTGCTCTTTTTCTGGGAAGATCGAGTGTCTATGCTAGGGGACCACCCTTTAAAGAGATCGCAATCTGAATCTTGGTTTCAAT
GTAATACGCTTTACTAGGGCTTCTGCTGTGATCTTTGCCCTCGTTTATCTTGGCTGCTCATTTTTTAGTATATCTTCAAGAAAATCACATTACTTTATA
TAATGTATAATCATTATGTGATAATGCCAATCGCTAAGAAAAAAAAGAGTCACTCCGCTAGGGGAAAAAAAATGAAAATCATTACCGAGGCATAAAAAA
ATATAGAGTGTACTAGAGGAGCCAAAGATTAAGAAAAAGAAAATGCGGGAAAGGACTGTGTATGACTTCCCTGACTAATGCGGTGTCAAACGATACCT
GGCAGTGACTCTTAGCGCTCACCAGCTCTAAAACGGGAATTTATGGTCACTCTAGTACAACTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGCCCGACACC
CGCCAACACGCGCTGACGCGCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTT
ACCGTCATACCGAAACGCGCA

GCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGTCATGTAATTAGTTATGTACACGC
 TTACATTCACGCCCTCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTAT
 TAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACG
 CTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACGGGAAAACC
 CTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAG
 CCTGAATGGCGAATGGCGGACCGCCCTGTAGCGGCGATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTGCCAGCGCCCTAGCG
 CCGCTCCTTTCCGCTTTCCCTTCCCTTCCGACGTTCCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT
 TACGGCACCCTGACCCCAAAAACCTTGATAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT
 CTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTTATCTTTGATTTATAAGGGATTTGCGCATTTGCGCTATTGGTTA
 AAAAAAGAGCTGATTTAACAATAATTAACGCGAATTTAACAATAATTAACGTTTACAATTTCTGTATGCGGTATTTCTCCTACGCATCTGTGCGGTAT
 TTCACACCGCATAGATCCGTCGAGTTCAAGAGAAAAAAGAAAAAGCAAAAAGAAAAAGGAAAGCGCCCTGTCAGAAATGACACGTATAGACGATGTC
 ATTACCTTGTCTTCACTACTACTGTTTACATACTACTGACATTATAGGTATACATATATACACATGATATATATCGTATGTCGAGCTTTA
 AATAATCGGTGCTACTACATAAGAACCTTTGGTGGAGGGAACATCGTTGGTACCATTGGGCGAGGTGGCTTCTTTATGGCAACCGCAAGAGCTTTGAACG
 CACTCTCACACGGTGTGATCATTTCTGCTCGACAGCAATCAACGTGGAGGGTAATTCGTAGCCTTGCAAAAGCTTCAAGAAAAAGCGGGATCATCTC
 GCAAGAGAGATCTCTACTTTCTCCCTTTGCAAAACCAAGTTGCAACTGCGTACGGCCTGTTGCAAGATCTACCACCGCTTGGAAGTGCCTCATCCAAA
 GGCGCAAACTCTGATCCAAACCTTTTTACTCCACGCGCCAGTAGGGCCCTTTAAAAGCTTGACCGAGAGCAATCCCGCAGTCTTCAAGTGGTGTAGTGGTCT
 CTATGTGTAAGTACCAATGCACTCAACGATTAGCGACGCGGAATGCTGGCCAGAGCATGATCATATGGTCCAGAAACCTATACCTGTGTGGACGTT
 AATCACTTGCATTTGTGTGGCTGTTCTGCTACTGCTTCTGCCCTTTTTCTGGGAAGATCGAGTGTCTATCGCTAGGGGACCCCTTTAAAGAGATCGCA
 ATCTGAATCTGGTTTCAATTTGTAATACGCTTTACTAGGGCTTTCTGCTCTGTACTTTTGCCTTCTGTTTATCTTGCCTGCTCATTTTTAGTATATTTCTCG
 AAGAAATCACATTTCTTATATAATGTATAATTCATATGTGATTAATGCAATCGTCAAGAAAAAAGAAAAAGCATCCGCTAGGGGAAAAAATAATGAAAA
 TCATTACCGAGGATAAAAAATAATAGAGTGTACTAGAGGAGCAAGAGTAATAGAAAAAAGAAAAATGGGGAAAGGACTGTGTTATGACTCTCCCTGACTAA
 TGCCGTGTTCAAACGATACCTGGCAGTGACTCTAGCGCTCACAAGCTCTTAAAACGGGAATTTATGGTGACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGAT
 AGTTAAGCCAGCCCGACCCGCCAACACGCGCTGACGCGCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCCGGAG
 CTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCTACCCGAAACGCGCGA

Sequenz p413GPD-A30P α Syn-GFP:

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTTCTTAGGACGGATCGCTGCCTGTAACCTACACGCGCCTCGTAT
 CTTTTAATGATGGAATAAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTATTTATTTTTATGTTTTGATTTGGATTTTAGAAAAGTAAATAAAGAAAGGTAGAAGGTTACGG
 AATGAAGAAAAAATAAACAAGGTTTTAAAAAATTTCAACAAGAGCGTACTTTACATATATATTTATAGACAAGAAAAGCAGATTAAATAGATATACAT
 TCGATTAAACGATAAGTAAAAATGAAAATCACAGGATTTCTGCTGTGGTCTTCTACACAGACAAGTGAACAATTCGGCATTAATACCTGAGAGCAGGAAGA
 GCAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTACAGTCTTGGGAAAGAAAAAAGCAAAAACCTATTTTTCTTTAATTTCTTTCTATTT
 TTAATTTATATATTTATATTAATAAATTTAAATTTAATTTATTTTTATAGCAGTGTGAAAAGGACCCAGGTGGCAGCTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACC
 CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTA
 TTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTTCCCTTTTTGCGGCAATTTGCTTCTGTTTTGCTCACCGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCA
 GTTGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAAGTCTTGGAGATTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGATTTATCCCGTATTGACGCGCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCA
 TCACAGAAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGTAAGAAATATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGAACACTGCGGCCAAGCTTACTCTGACAACGAT
 CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGATCATGTAACCTGCGCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC
 GAGCGTGACACCACGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGGCAAACTTAACTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGA
 TGGAGCGGATAAAAGTTGACGAGCACTTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGGGCTCGCGGTAT
 CATTGCAAGCACTGGGGCAGATGGAAGCCCTCCGCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
 ATAGGTGCCCTACTGATTAAGCATTTGGTAACTGTGACAGCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAATTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
 TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGA
 TCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG
 GTAACGTGGCTTACGACAGGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCCACCCCTACTGCTG
 CTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGG
 CTGAACGCGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTATGAGTACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
 GGGAGAAAAGGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGCGAGGTGGAACAGGAGGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCG
 GGTTCGCCACTCTGACTGTGAGCTCGATTTTTGTGATGCTGTGAGGCGGGGAGGCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGCCCTTTTACGGTCTCGCG
 CTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCAGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGACG
 CGAACGACGAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAAATACGCAAAACCGCTTCCCGCGCGCTTGGCCGATTCATTAATGCAAGTGGC
 ACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTACTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC
 TCCTATGTTGTGGAAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAGACGTTGAGCAAGTATGAGCAAGCGCAATTAACCTCACTAAAGGAAACAA
 AAGCTGGAGCTCAGTTTTATCATTAATACTCGCCATTTCAAAGAACTGCTAAATAATTAATAGTATGATTTTTCTAACTTTTATGTTAGTCAAAATTAAGC
 CTTTTAATTTCTGCTGAACCCGTACATGCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATAAATACGTTAGGTTGCTGGGTGAACAGTTTATTCTGGCATCC
 ACTAAATATAATGGAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAAATCCAGACCAAAAATATTGTTTTCTTACCACCATCAGTTTATAGGTTCCCA
 TTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGTGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGG
 CAATTGACCCACGATGATATCTATCTCATTTTTCTTACACCTTCTATTACCTCTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAGTTGAAAACAGTTCC
 CTGAAATTTATCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTTAGTTGTAATTTCTGTAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTTACTTTTATA
 GTTAGTCTTTTTTTAGTTTTAAAACACAGAAGTACTGTTTCTGACGGATTCTAGAAGTATGATGATGATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCAAGGAGGGA
 GTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAACCAACAGGTTGTGGCAGAAGCACCAGGAAGCAAAAAGAGGGTGTCTCTATGATAGGCTTCAAACCAAGGAGGGAGTGG
 TGCATGGTGTGGCAACAGTGGTGAAGAACCAAGAGCAAGTGAACAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGCAGGTTGTGACAGCAGTAGCCGAAAGACAGTGGGA
 GGGAGCAGGAGGATGACAGACGCTGCTTTGTTCAAAAAGGACAGTTGGGCAAGAAATGAAGAAGGAGCCCAAGGAAAGGAAATCTGGAAGATTAATGCTT
 GTGGATCCTGACAAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGTTAACAAGTACGAACTGAAGCAGCTTATCGATAGCAAGGGCAGGAGCTGTTCA
 CCGGGTGGTGGCCATCTGCTGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAAGCGTGTCCGGCAGGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC
 CCTGAAGTTCATCTGCACACCGGCAAGCTGCCGTTGCCCTGGCCACCCCTGCTGACCAACCTGACCTACGGCTGTCAGTGTCTTACGGCTACCCGACCCAC
 ATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAAGCTGCGCCATGCCGGAAGGCTACGTCAGGAGGACCACTTCTTCAAAGCAGCAGGCAACTACAAGCCGCGCCGAGG
 TGAAGTTCAAGGGCGACACCTGTTGAACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAATACAA
 CAGCCACAAGCTTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
 CACTACCAGCAGAACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGCAACCACTACTGAGCACCAGTCCGCTTGAAGAAAGCCCAACGAGAAGC
 GCGATCACAATGGTCTGCTGGAGTCTGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGTCAATGATGATGTCACGC
 TTACATTCACGCCCTCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTAT
 TAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACG
 CTCGAAGGCTTTAATTTGCGGCCGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACGGGAAAACC
 CTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAG
 CCTGAATGGCGAATGGCGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTACGCG

AATAATCGGTGTCACATAAGAACACCTTTGGTGGAGGGAACATCGTTGGTACCATTGGGCGAGGTGGCTTCTCTTATGGCAACCGCAAGAGCCTTGAACG
 CACTCTCAC TACGGTGTATGATCATTCTTGCCTCGCAGACAATCAACGTGGAGGGTAATTCGCTAGCCTCGAAAGCTTCAAGAAAATGCGGGATCATCTC
 GCAAGAGAGATCTCTACTTTCTCCCTTTGCAAACCAAGTTCGACAACCTGCTACGGCCTGTTTCAAAGATCTACCACCGCTCTGGAAAAGTGCCTCATCCAAA
 GGCGCAAACTCTGATCCAAACCTTTTTACTCCACGCGCCAGTAGGGCTCTTTAAAAGCTTGACCGAGAGCAATCCCGAGTCTTCAAGTGGTGTATGGTGTG
 CTATGTGTAAGTACCAATGCACTCAACGATTAGCGACAGCGGAATGCTTGGCCAGAGCATGTATCATATGGTCCAGAAAACCTATACTCTGTGGACGTT
 AACTACTTGGCATTGTGGCTGTTCTGCTACTGCTTCTGCTCTTTTTCTGGGAAGATCGAGTGTCTATCGCTAGGGGACCACCTTTAAAGAGATCGCA
 ATCTGAATCTTGGTTTCAATTTGTAATACGCTTTACTAGGGCTTTCTGCTCTGTCTATCTTTGCCTTCGTTTATCTTGCCTGCTCAATTTTTAGTATATTCTCG
 AAGAAATCACATTACTTTATATAATGTATAATTCATATGTGATAATGCCAATCGCTAAGAAAAAAGAGTCAATCCGCTAGGGGAAAAAAGAAATGAAAA
 TCATTACCGAGGCATAAAAAATATAGAGTGTACTAGAGGAGGCCAAGAGTAAATAGAAAAAAGAAATTTGCGGGAAGGACTGTGTTATGACTTCCCTGACTAA
 TGCCGTGTTCAAACGATACCTGGCAGTACTCTAGCGCTCACAAGCTCTTAAACGGGAATTTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAT
 AGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACGCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAG
 CTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGA



Sequenz pYCPlac33-GAL-WT α Syn-GFP:

TCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG
 GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA
 CGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCT
 GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG
 TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACT
 AGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG
 GTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTC
 ACGTTAAGGGATTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGAGTAA
 ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCATCTGTCTATTTGTTTCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGTGTAGATAA
 CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGG
 AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCACTCAGTCTATTAATTTGCGGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTAAATAGTTG
 CGCAACGTTGTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGCTTGTGGTATGGTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGAT
 CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCCGTCCTCGATCGTTGTGAGAAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCA
 TAATTCCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCT
 TGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTGGAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTAC
 CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCACTGATCTTCAAGATCTTTTACTTTTCAACAGGTTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCA
 AAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATG
 AGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTTATCA
 TGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACAGGGCCCTTCTGCTTCAAGAATTAGCTTTTCAATTAATTCATCTTTTTTTTTTATCTTTTTTTTGTATT
 TCGGTTCTTTGAAATTTTTGATTCCGTAATCTCCGAACAGAAGGAAGAACGAAGGAAGGACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATGTAGTGTG
 GAAGAAACATGAAATTGCCCAAGTATTCTTAACCCAACCTGCACAGAAACAAAAACATGCAGGAAACGAAGATAAATCATGTGAAAGCTACATATAAGGAACGCTG
 CTGCTACTCATCTAGTCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAACAACTTGTGTGCTTCAATGGATGTTGTTACCACCAAGGAATT
 ACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTTCCAAAAATTTGTTTACTAAAAACATGTGGATATCTTGTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAG
 GCATTAACCGCAAGTACAATTTTTACTCTTCAAGACAGAAAATTTGCTGACATTTGGTAAATACAGTCAAATGCAAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAAATAG
 CAGAATGGGCAGACATTAACGAATGCACACGGTGTGGTGGCCACGCTTTGTAGCGGTTTGAAGCAGGCGGAGAAAGTAAACAAAGGAACCTAGAGGCCCT
 TTTGATGTTAGCAGAATGTGATGCAAGGGCTCCCTATCTACTGGAGAATACTAAGGGTACTGTTGACATTCGAAGAGCGACAAAGATTTGTTATCGGC
 TTTATTGCTCAAAGAGACATGGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTAGATGACAAGGGAGACGATTTGGTCAAC

AGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATGTTGGAAGAGGACTATTTGCAAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACG
TTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACTAAAAAAGTATTATAAGTAAATGCATGTAATACTAACTCACAAATTAGA
GCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATCGTCCAACGTCATGGAGATGAGTCTGGCAAGAATACCAAGAG
TTCTCGGTTGGCAGTTATAAAAGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCTTACAGAAAACCTCATTGTTTATTCCCTGTTT
ATTGAGAAGCAGGTGGGACAGGTGAACCTTTGGATTGGAATCGATTCTGACTGGGTTGGAAGGCAAGAGAGCCCGAGAGCTTACATTTATGTTAGCTGG
TGGACTGCAGCCAGAAAATTTGGTGTGCGCTTAGATTAATGGCTATTGGTGTGATGTAAGCGAGGTGGAGACAAATGGGTAAAAGACTTAAAC
AAAATAGCAAAATTTGCAAAAATGCTAAGAAATAGGTATTACTGAGTAGTTTATTTTAAAGTATTGTTTGGCAGCTTTGCCAAGCCTTTGAAAAGCA
GCATAAAGATCTAAACATAAAATCTGTAATAAACAAGATGTAAGATAATGCTAAATCATTGGCTTTTTGATTGATTGTACAGGAAAATATACATCGCAG
GGGTTGACTTTTACATTTACCAGCAATGGAATCAAACCTGTTGAAAGAGATGTTACAGGCGCATACGCTACAAATGACCCGATTCTTGCTAGCCTTTCTC
GGTCTTGCAAAACCCGCGCAGCTTAGTATATAAATACACATGTACATACCTCTCCGATCTCTCGTAATCATTCTTGATTATATCGTCTTTTCGCTG
TAAAACTTTATCACACTTATCTCAAATACACTTATTAACCGCTTTTACTATTATCTCTACGCTGACAGTAAATCAAAACAGTGACACATATAAACACAGT
GGTTTTCTTGCAATAAACACCATCAGCCTCAAGTCGTAAGTAAAGTTTCTGTTTCATGCAAGATAGATAACAATCTATATGTTGATAATTAGCGTTGCCTCAT
CAATGCGAGATCCGTTTAAACGGACCTAGTGCCTTACCCACGTTCCGTCACGTGTGCCGAACATGCTCCCTTACTATTTAACATGTGGAATTAATTC
TCATGTTTGACAGCTTATCATGAACTCTAAGAGGTGATACTTATTACTGTAATACTGTGACGATAAAACCGGAAGGAAAGATAAGAAAACCTGAACTGATC
TATAATGCCATTTTCTGTAAGAGTTAAGCTATGAAAGCTCGGCATTTTGGCCGCTCCTAGGTAGTCTTTTTTCAAAGGACAAAACAGTTCCTTTTTT
TTGAGCAGGTTTTATGTTTCGGTAATCATAAACAATAAATAAATTTATTTTATGTTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAAGTATTTAAATTTTTTAAAAAGTT
GATTATAAGCATGTGACCTTTTGAAGCAATTAATTTGCAATTTGTGATTTTAGGCAAAAGTTACAATTTCTGGCTCGTGAATATATGATGCTAAAGTG
AACTTTTACAAAGTCGATATGGACTTAGTCAAAGAAATTTCTTAAAAATATATAGCACTAGCAATTTAGCACTTCTTTATGAGATATATTATAGACTTTA
TTAAGCCAGATTTGTGATTTATATGATTTTACCCGCGCAATCATGGACATACATTTGAAATAGGTAAATTTCTCTATGGTGAGACAGCATAGATAACCTAGG
ATACAAGTTAAAAGCTAGTACTGTTTTCGAGTAATTTTTTCTTTATAAAGATTTACCACCTAAATAGTTATAAAGTCAATAGTAAAGTTGATTTT
GATTGTAATAACCGTAATATATTTGATGATCAAAGGCTCAATGTTGACTAGCCAGCATGTCAACCACTATATTGATCACCGATATATGAGCTTCCACACC
AACTAGTAATAGCAATAAATCAAGATATTTCTCATGAGAATGGCCAGCGATATATGCGGTGTGAAAACCCGACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCA
TCAGGCGCCATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACCGCAGCTGGCGAAAAGGGGATGCTGCAAG
GCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGTTTTCCAGTCAGCAGCTGTAACACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTTATATGAAATTTTAAAAATTTTACTTTT
TTTTTAAATAAAGTTATAAAAAAGCAATTAATAATCATATTACATGGCATTACCACCATATACATATCCATATCTAATCTTATGTTGAAATGTAAG
AGCCCCATTATCTAGCCTAAAAAACCTTCTCTTTGAACTTTCAGTAATACGCTTAACTGCTATTGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCGAGCG
GGCGACAGCCCTCCGACGGAAGACTCTCTCCGTCGCTCCTGCTTACCAGGTCGCTTCTGAAACGCAAGATGCTCCGCGCCGACTGCTCCGAACAAT
AAAGATTTACAATACTAGCTTTTATGTTTATGAAAGGAAAAATGGCAGTAACCTGGCCCCACAACCTTCAAATTAACGAATCAAATTAACAACCATAGG
ATGATTAATGCGATTAGTTTTTACGCTTATTTCTGGGTAATTAATCAGCAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATAAATGGAAGGATGCATAA
CCACTTTAACTAATACTTTTCAACATTTTCAGTTTTGATTTACTTCTTAAATGTCTATAAAGTATCAACAAAAAATTTGTAATATACCTCTATACTTTAAC
GTCAAGGAGAAAAACCCGGATCTCTAGAAGTATGATGATTTTATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGAGAAAAACC
AAACAGGGTGTGGCAGAAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTG
AGAAGACCAAGAGCAAGTGACAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGACAGCAGTAGCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGAGCATTGACAGCAGC
CACTGCTTTGTCTAAAAGGACCAAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCAAGGAAGGAATTTCTGGAAGATATGCTCGTGAACCTGACAGTGAAGCTTAT
GAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCAAGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGGTGGTGCCCATCTGGTGC
AGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTACTGACACCACCGG
CAAGCTGCCCGTCCCTGGCCACCTCGTGACACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCGACCATGAAGCAGCAGCATCTTCTAAG
TCCGCTATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACAGGGCACTCAAGACCCGCGGAGGTGAAGTTCTGAGGGCGACACCTGG
TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATTGACTTCAAGGAGGACCGCAACTCTGGGCGCAAGCTGGAGTACAACCTACAACGCGCAACCTATATCATATGGC
CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAGCTTCAAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATC
GGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATACATGGTCTGCTGGAGT
TCGTGACCCCGCCGGGACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGTCGAGCAAGCTAATTCGGGGCAATTTCTTATGATTTATGATTTT
TATTATTAATAAAGTTATAAAAAAATAAAGTGTATACAAATTTTAAAGTACTCTTAGTGTTTAAAAACGAAAATTTCTATTCTTGAAGTAACTTTCTCTGATG
GTCAGGTTGCTTCTCAGGTATAGCATGAGGTGCTCTTATTGACCACCTCTACCGGCATGCAAGCTTGGGTAATCATGGTATAGCTGTTTCTGTTG
AAATGTTATCCGCTCACAAATTCACACAAATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
CGCTACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGGTATTGGGCGC

Sequenz pYCPlac33-GAL-A30P α Syn-GFP:

TCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGTCTGGTCTGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG
GGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGA
CGAGCATCACAAAATGACGCTCAAGTCAGAGGTGGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTCCTCCCTGGAAGCTCCTCGTGCCTCTCCT
GTTCCGACCTGCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTGGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGATCTCAGTTCGGTGTAGG
TCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTCACGAACCCCGCTTACGCCGACCGCTTATCCGGTAACTATCGCTTGAATCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATCCGCACTGGCAGCAGCCATGTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
AGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCCCGTGGTAGCGGTG
GTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGTCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAATC
ACGTTAAGGGATTTGGTATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGAGTAA
ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAACTCAGTGAGGCACTCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTACATCCATAGTTGCCTGACTCCCGCTGTGATGAA
CTACGATACGGGAGGGTTACCATCTGGCCCAAGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCAGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGG
AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGCGGGGAAGCTAGAGTAAAGTGTGCGCAGTAAATAGTTT
CGCAACGTTGTGTCATTTGACAGGATCGTGGTGTGACGCTCGTCTGGTATGGTATGGTCTATTACGCTCCGGTTCACCAAGCATAAAGCGAGTACATGAT
CCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCTTCCGCTCCGATCGTGTGAGAAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAGTGCATA
TAATCTTACTGTACTGATCCATCCGATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAATCAACCAAGTCACTTGGAGAAATGTTGATGCGGGCAGCGGTTGCTCT
TGCCCGGGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATCTTGGAAAACGTTCTTGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTAC
CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAAGTCTTTTACTTTTCAAGGCTTCTGAGGAGCAAAAACAGGAAGGCA
AAATCCGCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATCACTACTCTCTTTTCAATATTTGAAGCAATTTATCAGGGTTATTGCTCTAGT
AGCGGATACATATTTGAAGTATTAGAAAATAAACAATAAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTCCACCTGACGCTTAAAGCAACCATATTATCA
TGACATTAACCTATAAAAAAGGCGTATCAGAGGCCCTTCTGCTTCAAGAATTAGCTTTTCAATTTCAATTTATCTTTTTTTTATTCTTTTTTTGATT
TCGGTTCTTTGAAATTTTTTTGATTGGTAAATCTCCGAACAGAAGGAAGCAAGGAAGGAGCAGACTTAGATTGGTATATACGCATATGATGTT
GAAGAAACATGAAATGCCCCAGTATTTAAACCAACTGCACAGAAACAAAACATGCAAGGAAACGAAGATAAATCATGTGAAAGCTACATATAAGGAACGTT
CTGCTACTCATCTAGTCTGTTGCTGCAAGTATTTAATATCATGCAAGAAAGCAAAACAACTGTGTGCTTCAATTTGATGTTTCTGACCCCAAGGAAAT
ACTGGAGTTAGTTGAAGTATTAGGTCCTAAAATTTGTTTACTAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTCCATGGAGGGCAGCAATTAAGCCGCTAAAG
GCATTAACCGCAAGTACAATTTTTACTTCTGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTTGGTAAATACAGTCAAATGCAAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAG
CAGAATGGGCGACATTTACGAATGCACAGGTTGGTGGGCCAGGATTTGTTAGCGGTTGAAAGCAGGCGGAGAGAAGTAAACAAAGGAACTAGAGCCCT
TTTGATGTTAGCAGAAATGTCATGCAAGGGCTCCCTATCTACTGGAGAAATATAAAGGTAAGTGTGACATTCGAAGAGCGCAAAAGATTTGTTATCGGC
TTTATTGCTCAAAGAGACATGGGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTGTGATGATGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGAGACGATTTGGTGCAC

AGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTGGAAAGGACTATTTGCAAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACG
 TTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACTAAAAAAGTATTATAAGTAAATGCATGATACTAACTCACAAATTAGA
 GCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATCGTCCAACGATGAGATGAGTCTGGCAAGAATACCAAGAG
 TTCTCGGTTGGCAGTTATAAAAGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCTTACAGAAAACCTCATTGTTTATTCCCTGTTT
 ATTCAGAAGCAGGTGGGACAGGTGAACCTTTGGATTGGAATCGATTCTGACTGGGTTGGAAGGCAAGAGAGCCCGAGAGCTTACATTTATGTTAGCTGG
 TGGACTGACCGCAGAAAATTTGGTGTGCGCTTAGATTAATGGCTATTGGTGTGATGTAAGCGAGGTGGAGACAAATGGGTAAAAGACTTAAAC
 AAAATAGCAAAATTTGCAAAATGCTAAGAAATAGGTATTACTGAGTAGTTTATTGTTTAAAGTATTGTTGTGCACCTTTGCCAAGCCTTTGAAAAGCAA
 GCATAAAGATCTAAACATAAAATCTGTAATAAACAAGATGTAAGATAATGCTAAATCATTGGCTTTTTGATTGATTGTACAGGAAAATATACATCGCAG
 GGGGTTGACTTTTACATTTACCAGCAATGGAATCAAACCTGTTGAAAGAGATGTTACAGGCGCATACGCTACAAATGACCCGATTTCTGCTAGCCTTTCTC
 GGTCTTGCAAAACCGCCGAGCTTAGTATATAAATACACATGTACATACCTCTCCGATCTCTCGTAAATCATTCTTGATTATTATCGCTTTTCGCTG
 TAAAACTTTATCACACTTATCTCAAATACACTTATTAACCGCTTTTACTATTATCTCTACGCTGACAGTAAATCAAAACAGTGACACATATAAACACAGT
 GGTCTTTGTCATAAACACCATCAGCCTCAAGTCGTAAGTAAAGTTTCTGTTTCATGACAGATAGATAACAATCTATATGTTGATAATTAGCGTTGCTCAT
 CAATGCGAGATCCGTTTAAACGGACCTAGTGCCTTACCCACGTTCCGTCACGTGTGTCGCAACATGCTCTTCACTATTTAACATGTGGAATTAATTC
 TCATGTTTGACAGCTTATCATGAACTCTAAGAGGTGATACTTATTACTGTAATACTGTGACGATAAAACCGGAAGGAAAGATAAGAAAACCTGAACTGATC
 TATAATGCCATTTCTGTAAGAGTTAAGCTATGAAAGCTCGGCATTTGGCCGCTCCTAGGTAGTCTTTTTTCCAAGGACAAAACAGTTCCTTTTTCT
 TTGAGCAGGTTTTATGTTTCGGTAATCATAAACAATAAATAAATTTATTTTATGTTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAAGTATTTAAATTTTTTAAAAAGTT
 GATTATAAGCATGTGACCTTTTGAAGCAATTAATTTGCAATTTGTGATTTTAGGCAAAAGTTACAATTTCTGGCTCGTGAATATATGATGCTAAAGTG
 AACTTTTACAAAGTCGATATGGACTTAGTCAAAGAAATTTCTTAAAAATATATAGCACTAGCAATTTAGCACTTCTTTATGAGATATATTATAGACTTTA
 TTAAGCCAGATTTGTGATTTATATGATTTTACCCGCGAATCATGGACATACATTTGAAATAGGTAAATTTCTCTATGGTGGAGACAGCATAGATAACCTAGG
 ATACAAGTTAAAAGCTAGTACTGTTTTCGAGTAATTTTTTCTTTATAAAGATTTACCACCTAAATAGTTATAAAGTCAATAGTAAAGTTTGATTTT
 GATTGTAATAACCGTAATATATTTGATGATCAAAGGCTCAATGTTGACTAGCCAGCATGTCAACCACTATATTGATCACCGATATATGAGCTTCCACACC
 AACTAGTAATAGCAATAAATCAAGATATTTCTCATGAGAATGGCCAGCGATATATGCGGTGTGAAAACCCGACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCA
 TCAGGCGCCATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACCGCAGCTGGCGAAAAGGGGATGCTGCAAG
 GCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGTTTTCCAGTCAGCAGTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTATATGAATTTTTCAAAAATTTCTACTTT
 TTTTTTGATGGACGCAAGAAAGTTTTAATAATCATATTACATGGCATTACCACCATATACATATCCATATCTAATCTTATGTTGGAAATGTAAG
 AGCCCCATTATCTAGCCTAAAAAACCTTCTCTTTGAACTTTCAAGTAATACGCTTAACTGCTATTGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCGAGCG
 GCGCAGCAGCCTCCGACGGAAGACTCTCTCCGTCGCTCCTGCTTACCAGGTCGCTTCTGAAACGACAGATGCTCCTCCGCGCCGACTGCTCCGAACAAT
 AAAGATTTACAATACTAGCTTTTATGTTTATGAAGAGGAAAAATGGCAGTAACCTGGCCCCACAACCTTCAAATTAACGAATCAAATTAACAACCATAGG
 ATGATTAATGCGATTAGTTTTTAGCCTTATTTCTGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATAAATGGAAGGATGCATAA
 CCACCTTAACTAATCTTTTCAACATTTTCAGTTTTGATTTACTCTTATTAATGTCATAAAAGTATCAACAAAAAATTTGTAATATACCTCTATCTTTAAC
 GTCAAGGAGAAAAACCCGGATCTCTAGAAGTATGATGATTTATGTAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGTGAGAAAAC
 AAACAGGGTGTGGCAGAAAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTG
 AGAAGACCAAGAGCAAGTGACAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGACAGCAGTAGCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGACATTGACAGCAGC
 CACTGCTTTGTCAAAAAGGACCAAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCAAGGAAGGAATTTCTGGAAGATATGCTGTGGATCTGCAACATGAGGCTTAT
 GAAATGCCTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCAAGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCAGGGGTGGTCCCATCTGGTGC
 AGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTACTCTGCACCACCGG
 CAAGCTGCCCGTCCCTGGCCACCTCGTGACACCTGACTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCGACCATGAAGCAGCAGCATCTTTCAAG
 TCCGCTATGCCGAAGCTACGTCAGGAGCGACCATCTTCTCAAAGCAGCGGCACTCAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCTGAGGGCAGACCCCTGG
 TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATTGACTTCAAGGAGGACCGCAACTCTGGGGCAAGCTGGAGTACAACCTACAACCGCAACCTATATCATATGGC
 CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAGCTTCAAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATC
 GCGCAGCGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGT
 TCGTGACCCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGTCAGCCAAAGCTAATTCGGGGCAATTTCTTATGATTTATGATTTT
 TATTATTAATAAAGTTATAAAAAAATAAAGTGTATACAAATTTTAAAGTACTCTTAGTGTTTAAAAACGAAAATTTCTATTCTTGAGTAACTTTTCTGTTAG
 GTCAGGTTGCTTCTCAGGTATAGCATGAGGTGCTCTTATTGACCACCTCTACCGGCATGCAAGCTTGGGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTTG
 AAATGTTATCCGCTACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
 CGCTACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGGTATTGGGCGC

Sequenz pYClac33-GAL-A53T α Syn-GFP:

TCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGTCTGGTCTGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAG
 GGGATAACGCGAGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGA
 CGAGCATCACAAAATGACGCTCAAGTCAGAGGTGGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGGAAAGCTCCTCGTGCCTCTCCT
 GTTCCGACCTTCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTGGGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGATATCTCAGTTCCGTTGATG
 TCGTTCCGTTCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCCTTATCCGTTAACTATCGCTTGAAGTCAACCCGGTAAGACACGA
 CTTATCCGCACTGGCAGCAGCCATGTTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGGGCGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCAACTACCGCTTACACT
 AGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACACCCGCTGGTAGCGGTG
 GTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGTCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAATC
 ACGTTAAGGGATTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGAGTAA
 ACTTTGCTGACAGTTACCAATGCTTAACTCAGTGAGGCACTCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCAATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGTGATGATA
 CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAAGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGG
 AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGCGGGGAAGCTAGAGTAAAGTGTGCGCAGTAAATAGTTT
 CGCAACGTTGTGTCATTTGACAGGATCGTGGTGTGACGCTCGTCTGGTATGGCTTATTACGCTCCGTTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGAT
 CCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCTTCCGCTCCGATCGTGTGTCAGAAAGTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAGTGCATA
 TAACTCTTACTGTACTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAATCAACCAAGTCACTTGAGAAATAGTGTATCGGGCGACCGGAGTGTCT
 TGCCCGGGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTAAAAGTGTCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCAAAAATCTCAAGGATCTTAC
 CGCTGTTGAGATCCAGTTTCATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAAGTCTTTTACTTTTCAACAGGCTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCA
 AAATCCGCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATCACTACTCTCTTTTCAATATTTTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATG
 AGCGGATACATATTTGAATGTTTATGAAAAAATAAACAATAAGGGGTTCCGCGACATTTCCCGAAAAGTGCACCTGACGCTTAAAGAACCAATATTATCA
 TGACATTAACCTATAAAAAAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGCTTCAAGAATTAGCTTTTCAATTTCAATTTTATCTTTTTTTTATTCTTTTTTTTATT
 TCGGTTCTTTGAAATTTTTTTGATTGCGTAACTCCGAACAGAAGGAAGCAAGGAAGGAGCAGACAGCTTAGATTGGTATATACGCATATGATGTT
 GAAGAAACATGAAATGCCCCAGTATTTTAAACCAACTGCACAGAAACAAAACATGCAAGGAAACGAAGATAAATCATGTGAAAGCTACATATAAGGAACGTT
 CTGCTACTCATCTAGTCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCAAGAAAGCAAAACAACTGTGTGCTTCAATTTGATGTTTTCGTTACCACCAAGGAAAT
 ACTGGAGTTAGTTGAAGCTATTAGTTCCTCCAAAATTTGTTTACTAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTCCATGGAGGGCAGCAAGTAAAGCGCTAAAG
 GCATTAATCCGCAAGTACAATTTTTTACTCTTCAAGACAGAAAATTTGCTGACATTTGGTAAATACAGTCAAATGCAAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAG
 CAGAATGGGCGACATTTACGAATGCACAGGTTGGTGGGCCAGGATTTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGCGGAGAGAAGTAAACAAAGGAACCTAGAGGCCCT
 TTTGATGTTAGCAGAAATGTCATGCAAGGGCTCCCTATCTACTGGAGAAATACTAAGGGTACTGTTGACATTCGCAAGAGCGCAAAAGATTTTGTATCGGC
 TTTATTGCTCAAAGAGACATGGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTGTATTGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGAGACGCATTTGGTGCAC

AGTATAGAACCCTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTGGAAAGAGGACTATTTGCAAAGGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACG
TTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAAACTAAAAACTGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAACTCACAAATTAGA
GCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTACCCAATTTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATCGTCCAACATGCATGGAGATGAGTCGTGGCAAGAATACCAAGAG
TTCTCTCGTTTGGCAGTTATTAAGAGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCTTACAGAAAACCTCATTGTTTATTCCCTTGTGTTG
ATTCAGAAGCAGGTGGGACAGGTGAACTTTTGGATTGGAACCTGATTTCTGACTGGGTTGGAAGGCAAGAGAGCCCCGAGAGCTTACATTTTATGTTAGCTGG
TGGACTGACGCCAGAAAATGTTGGTGTAGCCTTAGATTAATGGCGTTATTGGTGTGATGTAAGCGGAGGTGGAGACAAAATGGTGTAAAAGACTCTAAC
AAAATAGCAAATTTCTGCAAAAATGCTAAGAAATAGGTATTACTGAGTAGTATTTATTTAAAGTATTGTTTGTGCACCTTGCCTGCAAGCCTTTTGAAGAAGCAA
GCATAAAGATCTAACATAAAATCTGTAATAAACAAGATGTAAGATAATGCTAAATCATTGGCTTTTTGATTGATTGTACAGGAAAATATACATCGCAG
GGGTTGACTTTTACATTTACCAGCAATGGAATCAAACCTGTTGAAAGAGATGTTACAGGCGCATACGCTACAATGACCCGATTCTTGCTAGCCTTTTCTC
GGTCTTGCAAAACACCGCCGAGCTTAGTATATAAATACACATGTACATACCTCTCTCCGATCTCTCGTAATCATTCTTGATTATTATCGTCTTTTCGCTG
TAAAACTTTATCACACTTATCTCAAATACACTTATTAACCGCTTTTACTATTTACTCTACGCTGACAGTAATATCAAACAGTGACACATATTAACACAGT
GGTTTTCTTGCATAAACACCATCAGCCTCAAGTCGTAAGTAAAGATTTCTGTTTATGCAGATAGATAACAATCTATATGTTGATAATTAGCGTTGCTCAT
CAATGCGAGATCCGTTTAAACGGACCTTAGTGCCTTACCCACGTTCCGTCACGTGTGTCGCAACATGCTCCCTTCACTATTTTAAACATGTGGAATTAATTC
TCATGTTTGCACGCTTATCATCGAACTCTAAGAGGTGATACTTATTTACTGTAAAACGTGTGACGATAAAAACCGGAAGGAAGATAAAGAAAACCTGAACTGATC
TATAATGCCATTTTCTGTAAGAGTAAAGCTATGAAAGCTCGGCATTTTGGCCGCTCTAGGTAGTGTCTTTTTCGAAGGACAAAACAGTTCCTTTTTTC
TTGAGCAGGTTTTATGTTTCCGTAATCATAAACAATAAATAAATTTTTCATTTATGTTTAAAAATAAAAAATAAAAAAGTATTTTAAATTTTTTAAAAAGTT
GATTATAAGCATGTGACCTTTTGAAGCAATTAATTTTGAATTTGTGATTTTAGGCAAAAGTTACAATTTCTGGCTCGTGAATATATGATGCTAAAGTG
AACTTTTACAAAGTCGATATGGACTTAGTCAAAGAAATTTTCTTAAAAATATATAGCACTAGCAATTTAGCACTTCTTTATGAGATATATTATAGACTTTA
TTAAGCCAGATTTGTGATTTATATGATTTTACCCGCGAATCATGGACATACATTTCTGAAATAGGTAAATTTCTCTATGGTGAGACAGCATAGATAACCTAGG
ATACAAGTTAAAAGTAGTACTGTTTTCAGTAATTTTTTTCTTTTTTATAAGAAATGTTACCACCTAAATAAGTTATAAAGTCAATAGTTAAGTTGATATTT
GATTTTGGATGGACGCAAGAAGTTAATAATCATATTACATGGCATTACCACCATATACATATCCATATCTAATCTTACTTATATGTTGTGGAAATGTAAG
AACTAGTAATGACAATAAATCAAGATATTTCTCATGAGAATGGCCAGCGATATATGCGGTGTGAAAACCCGACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCA
TCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAAGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCGCAGCTGGCGAAAAGGGGATGTGCTGCAAG
GCGATTAAGTTGGTAAACGCGAGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTATATGAATTTTCAAAAATTTCTACTTT
TTTTTTGGATGGACGCAAGAAGTTAATAATCATATTACATGGCATTACCACCATATACATATCCATATCTAATCTTACTTATATGTTGTGGAAATGTAAG
AGCCCCATTATCTAGCCTAAAAAACCTTCTCTTTGGAACCTTTCAGTAATACGCTTAACTGCTCATTGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCGAGCG
GGCGACAGCCCTCCGACGGAAGACTCTCTCCGTGCGTCTCTGCTTACCAGGTCGCGTCTCTGAAACGCAAGATGTGCTCCGCGCCGACTGCTCCGAACAAT
AAAGATTTACAATACTAGCTTTTATGTTTATGAAGAGGAAAAATGGCAGTAACCTGGCCCCACAACCTTCAAATTAACGAATCAAATTAACAACCATAGG
ATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGGAAAAGCTGCATAA
CCACTTTAACTAATACTTTCAACATTTTTCAGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTCAAAAAGTATCAACAAAAAATTTGTTAATATACCTCTATACTTTAAC
GTCAAGGAGAAAAAACCCGGATCTCTAGAACTAGTATGGATGATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTGCTGCTGAGAAAAC
AAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGACAACAGTGGCTG
AGAAGCAAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGC
CACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAAGTTGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAATTTCTGGAAGATATGCCTGTGGATCTTGACAATGAGGCTTAT
GAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCAAGCTTATCGATAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCAGGGGGTGGTGCCATCTGGTCTG
AGCTGGACGGCGAGTAAACGGCCACAAGTTACGCTGTCCGGCAGGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTACTCTGCACCACCGG
CAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCACCTCGTGACACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCAGGACTTCTTAAAG
TCCGCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCTTGG
TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGC
CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAGCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATC
GGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGT
TCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCGAGCTGCAGCAAGCTAATTCGGGGCAATTTCTTATGATTTATGATTTT
TATTTATAAATAAGTTATAAAAAAATAAAGTGTATACAAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTTAAAAACGAAAATTTCTTATCTTGAGTAACTCTTTCTGTAG
GTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATGAGGTGCTCTTATTGACCACCTCTACCGGATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTG
AAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
CGCTACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGC

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei [REDACTED] bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Chance, Teil dieses spannenden Forschungsumfeldes sein zu dürfen. Ich habe Ihre wertvollen Ratschläge ebenso geschätzt wie unsere gelegentlichen Fußballdiskussionen.

Mein Dank gilt ebenso [REDACTED] für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit sowie meinem Zweitbetreuer [REDACTED]

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin [REDACTED]. Sie hat mich während des gesamten Projekts mit großem Engagement, wertvollen Hinweisen und unermüdlicher Unterstützung begleitet. Mit Freude denke ich an unsere Zusammenarbeit und die gemeinsamen Konferenzbesuche zurück. Für deine zukünftige berufliche Laufbahn wünsche ich dir alles Gute und viel Erfolg.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Ihr habt mich von Anfang an herzlich aufgenommen und stets unterstützt. Ein besonderer Dank gilt dabei [REDACTED] – die Zusammenarbeit mit euch hat mir große Freude bereitet, und ich freue mich schon auf weitere Bowlingabende!

Mein Dank gilt auch [REDACTED], der meine Promotionszeit in vielerlei Hinsicht bereichert hat. Die regelmäßigen Aldi-Besuche waren nicht nur ein fester Bestandteil des Laboralltags, sondern auch ein wichtiger Beitrag zum Gelingen dieses Projekts.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meinen Freunden meinen tief empfundenen Dank aussprechen. Ohne ihre beständige Unterstützung, Motivation und ihr Verständnis wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt [REDACTED] – für deine Geduld, deine bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage und die wertvollen Ablenkungen während der Labor- und Schreibzeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Timo Löser, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Einfluss der Phosphoinositid-Biosynthese auf Lokalisation und Toxizität von Alpha-Synuclein in *Saccharomyces cerevisiae*“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel (dazu zählen auch KI-basierte Anwendungen oder Werkzeuge) benutzt habe. Sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate sind kenntlich gemacht und nachgewiesen. Ich versichere, dass ich keine Hilfsmittel verwendet habe, deren Nutzung die Prüferin oder der Prüfer explizit ausgeschlossen hat.

In **Material und Methoden 2.5** „Nutzung von KI-Tools“ habe ich die verwendeten KI-Tools dokumentiert.

Mit Abgabe der vorliegenden Leistung übernehme ich die Verantwortung für das eingereichte Gesamtprodukt. Ich verantworte damit auch jegliche KI-generierten Inhalte, die ich in meine Arbeit übernommen habe. Die Richtigkeit übernommener (KI-generierter) Aussagen und Inhalte habe ich nach bestem Wissen und Gewissen geprüft.

Mir ist bekannt, dass ein Verstoß gegen die genannten Punkte prüfungsrechtliche Konsequenzen hat und insbesondere dazu führen kann, dass die Promotionsleistung als mit „nicht bestanden“ bewertet wird. Die Einschreibung kann für bis zu zwei Jahre widerrufen werden, wenn Studierende zweimal oder häufiger bei Prüfungsleistungen täuschen (§ 69 Abs. 4 und 5 HochSchG).

Ort, Datum und Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Vor- und Nachname	Timo Löser
Anschrift	[REDACTED]
Telefon	[REDACTED]
E-Mail	[REDACTED]
Geburtsdatum	[REDACTED]
Geburtsort	[REDACTED]

Bildungsweg

10.2018 – 12.2020	Molekulare Biowissenschaften (Master of Science) J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main „Untersuchung zur Bedeutung von PaUPS1 und PaUPS2 für den mitochondrialen Lipidmetabolismus des Ascomyceten <i>Podospora anserina</i> “
10.2015 – 09.2018	Biowissenschaften (Bachelor of Science) J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main „Untersuchungen zur Rolle von PaUPS1 und PaUPS2 in der Cardiolipinsynthese des Ascomyceten <i>Podospora anserina</i> “
2006 – 2014	Kurpfalz Gymnasium, Schriesheim Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Berufliche Laufbahn

ab 01.10.2025	Forschungskordinator Diagnostische und Interventionelle Radiologie Universitätsklinikum, Heidelberg
03.2022 – 08.2025	Wissenschaftlicher Mitarbeiter The Autophagy Lab – Arbeitsgruppe Behl Institut für Pathobiochemie Universitätsmedizin der JGU, Mainz
01.2021 – 02.2022	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Molekulare Entwicklungsbiologie – Arbeitsgruppe Osiewacz Institut für Molekulare Biowissenschaften J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main
09.2015 – 12.2020	Wissenschaftliche Hilfskraft Unterstützung von Forschungstätigkeiten Diagnostische und Interventionelle Radiologie Universitätsklinikum, Heidelberg

09.2014 – 09.2015 **Bundesfreiwilligendienst IB Heidelberg**
Röntgenanmeldung/Ultraschall
Diagnostische und Interventionelle Radiologie
Universitätsklinikum, Heidelberg

Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

- 10.2025 **Löser T, Bekbulat F, Behl C, Schepers J**
“Phosphatidylinositol 3-phosphate metabolism impacts cellular α -Synuclein localisation in *Saccharomyces cerevisiae*”
J Biol Chem, 110666
- 08.2024 **Schepers J & Löser T, Behl C**
„Lipids and α -Synuclein: adding further variables to the equation“
Front Mol Biosci **11**, 1455817

Wissenschaftliche Konferenzen

- 03.2025 **German Neuroscience Society Meeting**; Göttingen, Deutschland
- 03.2025 **Quality Control in Life Processes**; Frankfurt am Main, Deutschland
- 07.2024 **Phospholipids in Aging and Disease**, Saint Paul, Minnesota, USA
- 08.2023 **Yeast Genetics and Molecular Biology**; Florenz, Italien
- 10.2022 **Quality Control in Life Processes**; Frankfurt am Main, Deutschland