

Regulation des Proteins α -Synuclein während der zellulären Alterung

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Verena Schmitt
geboren am 14.12.1982 in Lahnstein

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Alterung	1
1.1.1	Zelluläre Seneszenz.....	1
1.1.2	DNA-Schäden.....	3
1.1.2.1	Ursachen von DNA-Schäden und DNA-Schadensantwort	3
1.1.2.2	DNA-Reparatur.....	5
1.1.2.3	DNA-Schäden als Ursache für Alterung	7
1.2	α -Synuclein.....	8
1.2.1	Die Synuclein-Familie.....	8
1.2.2	Struktur und physikalische Eigenschaften von α -Synuclein.....	9
1.2.3	Funktion von α -Synuclein.....	11
1.2.4	Pathophysiologische Rolle von α -Synuclein.....	13
1.2.5	Morbus Parkinson.....	16
1.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalwege	18
1.3.1	Der ERK1/2-MAPK-Signaltransduktionsweg.....	19
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Materialien.....	23
2.1.1	Zelllinien.....	23
2.1.2	Bakterien-Zellen.....	23
2.1.3	Plasmide, Oligonukleotide (<i>Primer</i>), siRNA	23
2.1.4	Enzyme.....	24
2.1.5	Antikörper	25
2.1.6	Marker.....	26
2.1.7	Chemikalien und Reagenzienansätze	26
2.1.8	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	29
2.1.9	Laborgeräte	29
2.1.10	EDV-Programme	31
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	31
2.2.1.1	Kultivierung von IMR-90- und WI38-Zellen.....	31
2.2.1.2	Herstellung von Dauerkulturen (Kryokonservierung).....	33
2.2.1.3	Behandlung der Zellen.....	33
2.2.1.4	Transfektion von Zellen mittels Elektroporation.....	33

2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.2.1	Herstellung von Proteingesamtlysat mit SDS-haltigem Puffer	34
2.2.2.2	Fraktionierung mit NP-40-Puffer	35
2.2.2.3	Kernfraktionierung mit Tris-Puffer	35
2.2.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	36
2.2.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	37
2.2.2.6	Western Blot	38
2.2.2.7	Immunologische Proteindetektion	39
2.2.2.8	Densitometrische Auswertung der Western Blots	40
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.3.1	RNA-Extraktion aus Fibroblastenzellen	40
2.2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.2.3.3	Synthese von cDNA mittels reverser Transkription	42
2.2.3.4	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qPCR)	42
2.2.3.5	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	44
2.2.3.6	Ligation	44
2.2.3.7	Transformation von Bakterienzellen mittels Hitzeschock	45
2.2.3.8	Plasmidpräparation	45
2.2.3.9	Agarose-Gelelektrophorese	46
2.2.3.10	Gelextraktion	47
2.2.3.11	Klonierung zur Herstellung des α SynWT.GFP-N1-Konstruktes	47
2.2.3.12	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
2.2.4	Immunhistochemie	48
2.2.5	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Charakterisierung der zellulären Alterungsmodelle IMR-90 und WI-38	50
3.1.1	Bestimmung der zellulären Seneszenzphase	50
3.1.2	Charakterisierung des seneszenten Phänotyps	51
3.1.3	Biochemischer Nachweis der zellulären Alterung	51
3.2	Untersuchung von α -Synuclein während der zellulären Alterung	52
3.2.1	Analyse der altersassoziierten α -Synuclein-Expression	52
3.2.2	Analyse der Löslichkeit von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten	53
3.3	Nähere Analyse der gesteigerten α -Synuclein-Expression	54
3.3.1	Untersuchung von DNA-Schäden während der zellulären Alterung	54
3.3.2	Einfluss von DNA-Schäden auf die Expression von α -Synuclein	55
3.3.3	Wirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf den Proteinspiegel von α -Synuclein	57
3.3.4	Einfluss von α -Synuclein auf den Grad von DNA-Schäden	60

3.4	Intrazelluläre Lokalisation von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten.....	61
3.5	Einfluss des ERK1/2-MAPK-Signalweges auf die Expression von α -Synuclein	63
3.5.1	Untersuchung des ERK1/2-MAPK-Signalweges in jungen IMR-90-Zellen nach DNA-Schädigung.....	63
3.5.2	Einfluss des ERK1/2-MAPK-Signalweges auf die Expression von α -Synuclein in seneszenten Fibroblasten	66
3.5.3	Untersuchung des ERK1/2-MAPK-Signalweges während der zellulären Alterung.....	67
4	Diskussion.....	70
4.1	Untersuchung von α -Synuclein in humanen alternden Fibroblasten.....	70
4.1.1	Expression und Löslichkeit von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten ..	71
4.1.2	Wirkung von genotoxischem Stress auf die Expression von α -Synuclein	72
4.1.3	Mögliche Rolle von α -Synuclein bei der DNA-Reparatur	75
4.1.4	Regulation der α -Synuclein-Expression über den ERK1/2-MAPK-Signalweg	77
4.2	Regulation des ERK1/2-MAPK-Signalweges in seneszenten humanen Fibroblasten	80
4.3	Ausblick.....	81
5	Zusammenfassung.....	83
6	Summary	84
7	Literaturverzeichnis.....	85
8	Anhang	101
8.1	Abbildungsverzeichnis	101
8.2	Tabellenverzeichnis	102
8.3	Vektorkarten	103
8.3.1	Vektorkarte und Sequenz von pGPF-N1	103
8.3.2	Vektorkarte und Sequenz von p α SynWT-N1.....	104
8.3.3	Vektorkarte und Sequenz von p α SynWT.GFP-N1.....	105
8.4	Abkürzungsverzeichnis	106
8.5	Lebenslauf.....	110
8.6	Eidesstattliche Erklärung	111
8.7	Danksagung.....	112

1 Einleitung

1.1 Alterung

Alterung ist ein fortschreitender, nicht umkehrbarer Prozess, der fast jeden Organismus und jedes Organ betrifft und schließlich mit dem Tod endet. Die Alterung stellt eine Ansammlung von Veränderungen dar und geht mit der Abnahme von einer großen Anzahl physiologischer Funktionen einher, was die Anfälligkeit für Krankheiten erhöht. Bessere Lebensbedingungen, die medizinische Weiterentwicklung und bessere hygienische Verhältnisse in gut entwickelten Ländern führen zur Verlängerung der durchschnittlichen Lebenserwartung, die aber wiederum ein erhöhtes Risiko für altersbedingte Krankheiten darstellt.

Eine Vielzahl von Alterstheorien versucht auf zellulärer und molekularer Ebene den Prozess der Alterung zu beschreiben (Behl & Ziegler, 2014; Kirkwood & Austad, 2000), wobei keine dieser Theorien allein die Ursache der Alterung erklären kann. Vielmehr ist ein Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren für diesen Prozess verantwortlich. Die ‚Freie-Radikal-Theorie‘ beschreibt die im Zuge der Alterung erfolgende Ansammlung von Sauerstoffradikalen und die damit entstehenden oxidativen Schäden der Zelle (Harman, 1956). Hayflick und Moorhead erläuterten im Jahre 1961 mit der ‚Hayflick limit theory of aging‘ die begrenzte Teilungsfähigkeit von menschlichen Zellen (Hayflick & Moorhead, 1961). Die ‚DNA-Schaden-Theorie der Alterung‘ setzt sich dagegen mit der Akkumulation von nicht reparierten, natürlich entstandenen DNA-Schäden als Ursache für die Alterung auseinander (Freitas & de Magalhaes, 2011). Die Grundlagen des ‚Hayflick Limits‘ sowie der DNA-Schäden als Ursache für Alterung werden im Folgenden näher erläutert.

1.1.1 Zelluläre Seneszenz

Die zelluläre Seneszenz wurde erstmals 1961 von Hayflick und Moorhead beschrieben, als sie bei der Kultivierung von humanen fetalen Lungenfibroblasten eine begrenzte Teilungsfähigkeit beobachteten (Hayflick & Moorhead, 1961). Das Phänomen der replikativen Seneszenz wurde schließlich nach seinem Entdecker als ‚Hayflick limit‘ bezeichnet. Diese Erkenntnis war neu, da man bis dahin von einer uneingeschränkten Proliferationskapazität von Zellen ausging. Nach Hayflick durchlaufen Fibroblasten eine bestimmte Anzahl an Zellteilungen (*PDL*; engl. *population doubling level*), wobei die Teilungsrate anfänglich sehr hoch ist, dann kontinuierlich abnimmt, bis die Zelle schließlich in einen irreversiblen Wachstumsarrest übergeht (Hayflick & Moorhead, 1961). Der Wachstumsarrest der seneszenten Zellen erfolgt in der G1-Phase des Zellzyklus (Sherwood et al, 1988). Das Eintreten in diese postmitotische Phase geschieht innerhalb einer alternden Kultur asynchron, was bedeutet, dass jede Zelle zu einem individuellen Zeitpunkt in diese Phase eintritt, wodurch eine heterogene Kultur aus seneszenten und präseneszenten Zellen vorliegt. Dieser Arrest

ist irreversibel, da die Zellen nicht mehr auf Wachstumsfaktoren reagieren und daher die Zellteilung nicht wieder aufnehmen können (Matsuda et al, 1992). Dennoch bleiben die arretierten Zellen noch für eine gewisse Zeit stoffwechselaktiv (Campisi, 1996). Seneszenz oder postmitotische Zellen müssen somit von mitotischen Zellen unterschieden werden, die für unbestimmte Zeit in einen reversiblen Zellzyklusarrest (G0-Stadium) übergehen können. Die Dauer unterscheidet sich je nach Zelltyp oder Ursache des Arrestes und kann durch physiologische Stimuli wieder rückgängig gemacht werden. Die Zellen können dann wieder in den Zellzyklus eintreten und weiter proliferieren (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Replikative Seneszenz ist nicht auf Fibroblastenzellen beschränkt, sondern auch bei anderen Zelltypen wie z. B. Keratinozyten, Endothelzellen oder Lymphozyten zu finden (Cristofalo et al, 2004).

Neben dem Proliferationsstopp als auffälligstem Merkmal von seneszenten Zellen weisen diese noch eine Reihe weiterer charakteristischer Veränderungen ihrer Morphologie auf (Cristofalo, 1988; Cristofalo et al, 2004). Sie sind durch eine abgeflachte Struktur und eine Vergrößerung des Zellumfangs gekennzeichnet, was eine Abnahme der Zelldichte in einer Kultur zur Folge hat. Außerdem vergrößern sich der Zellkern und der Nukleolus. Intrazellulär werden die Veränderungen z. B. durch die erhöhte Anzahl von Mikrofilamenten und Vakuolen im Zytoplasma sowie eine erhöhte Anzahl an Lysosomen sichtbar.

Zahlreiche physiologische und biochemische Veränderungen charakterisieren die zelluläre Seneszenz (Cristofalo et al, 2004; Cristofalo et al, 1998). So wird der Zellzyklusarrest durch die erhöhte Genexpression Zellzyklus-regulierender Proteine, wie z. B. p53, p16 oder p21, bewirkt (Kuilman et al, 2010). Ebenso wird die β -Galaktosidase in gealterten Zellen verstärkt exprimiert (Dimri et al, 1995). Die genannten Gene dienen damit auch als Marker zum Nachweis der Seneszenz. Der altersassoziierte Proliferationsarrest steht außerdem in Zusammenhang mit Defekten in der Weiterleitung äußerer Faktoren über Signaltransduktionswege, deren Aktivität im Zuge der replikativen Seneszenz verringert ist (Kim et al, 2000; Lim et al, 2000; Tresini et al, 2001). Zusätzlich stellt eine veränderte Degradation von intrazellulären Proteinen einen weiteren altersassoziierten Unterschied dar (Gamerding et al, 2009; Sitte et al, 2000).

Als Hauptgrund für die Ausprägung des seneszenten Proliferationsstopps wird die Verkürzung der Telomere angesehen. Telomere werden aufgrund der unvollständigen Replikation im Bereich der Chromosomenenden mit zunehmender Anzahl an Zellteilungen verkürzt. Im Gegensatz zu z. B. Keimzellen wird in den meisten somatischen Zellen keine Telomerase exprimiert, die für die Verlängerung der Chromosomenenden verantwortlich ist (Herbig et al, 2006). Dies macht die Telomere zu einer Art ‚biologischen Uhr‘, die die Anzahl der Zellteilungen einschränkt. Zelluläre Seneszenz kann unabhängig von einer Telomerverkürzung auch durch verschiedene Stressfaktoren ausgelöst werden, was demzufolge als ‚Stress induzierte, vorzeitige Seneszenz‘ (SIPS, engl. *stress-*

induced premature senescence) bezeichnet wird. Zellen, die der replikativen Seneszenz und der SIPS unterliegen, teilen Eigenschaften wie Wachstumsarrest, Morphologie, erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität oder die Expression altersassoziierter Gene (Toussaint et al, 2000). Zu den Induktoren der SIPS zählen z. B. oxidativer Stress, ionisierende Strahlung oder DNA-schädigende Agenzien.

Im Verlauf der Alterung akkumulieren seneszente Zellen in verschiedenen Geweben (Baker et al, 2011; Herbig et al, 2006; Jeyapalan et al, 2007). Außerdem ist bekannt, dass die zelluläre Alterung von Hautfibroblasten von Patienten mit einem Progeroid-Syndrom (verfrühte Alterung) *in vitro* beschleunigt ist (Davis et al, 2007). Daher wird angenommen, dass die zelluläre Seneszenz für die Alterung von Organismen verantwortlich ist (Chen et al, 2007).

1.1.2 DNA-Schäden

DNA ist der Träger der genetischen Information und für die Zelle von entscheidender Bedeutung. Die Stabilität und Integrität des genomischen Materials spielt eine bedeutende Rolle für die exakte Funktion der zellulären Prozesse sowie für die Übertragung auf Tochterzellen.

1.1.2.1 Ursachen von DNA-Schäden und DNA-Schadensantwort

Die Zelle wird kontinuierlich durch spontane Prozesse (Hydrolyse von Nukleotiden) sowie durch endogene (intrazelluläre metabolische Prozesse) oder exogene (Umweltfaktoren) Quellen angegriffen, die die DNA auf vielfältige Weise schädigen können und damit die Stabilität der DNA beeinträchtigen. Endogene Faktoren, die für die Schädigung der DNA verantwortlich sind, sind zum einen Nebenprodukte von intrazellulären Stoffwechselprozessen wie der Atmungskette oder der Lipidperoxidation. Dabei können reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($OH\cdot$) gebildet werden, die zu oxidativen Schäden führen (De Bont & van Larebeke, 2004; Luczaj & Skrzydlewska, 2003). Zum anderen führen auch spontan auftretende Prozesse zur Schädigung der DNA (Gates, 2009). Dazu zählen z. B. die Depyrimidierung oder Depurinierung, bei denen es zu einer hydrolytischen Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen Base und dem Zucker-Phosphatrest kommt. Die entstehenden basenfreien Bereiche werden als apyrimidinische/apurinische (AP)-Läsionen bezeichnet. Bei der ebenfalls spontan erfolgenden Deaminierung wird die Aminogruppe der Basen Cytosin, Adenin oder Guanin abgespalten. Das bei der Deaminierung von Cytosin entstehende Uracil wird jedoch von DNA-Reparaturmechanismen erkannt und schließlich entfernt. Wird dagegen 5-Methylcytosin deaminiert, entsteht die DNA-Base Thymin. Diese wird nicht als Schaden erkannt und verbleibt fälschlicherweise in der DNA, was zu einer Fehlpaarung führt. Des Weiteren können DNA-Schäden auch während des Replikationsprozesses entstehen, die in Form von Basenfehlpaarungen, Insertionen oder Deletionen auftreten.

Daneben können auch exogene Quellen, also Umweltfaktoren wie ultraviolette (UV)- oder ionisierende Strahlung (z. B. Röntgen- oder Gammastrahlung) sowie chemische Agenzien für Schäden in der DNA verantwortlich sein (Friedberg et al, 2004). Ionisierende Strahlung führt zur Bildung von Sauerstoffradikalen und damit zu oxidativen Schäden. Bei starker ionisierender Strahlung können außerdem Einzel- und Doppelstrangbrüche entstehen. Durch UV-Licht kommt es häufig zur Bildung von Dimeren zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen, insbesondere Thyminen, was den Abbruch der DNA-Replikation im folgenden Replikationszyklus zur Folge hat. Es gibt außerdem zahlreiche Agenzien, die DNA-Schäden verursachen. Die Art der Schäden durch Chemikalien ist vielfältig und beinhaltet sowohl Fehlpaarungen, wie z. B. durch Basenanaloga, als auch DNA-Strangbrüche oder die Interkalation der Chemikalien in die DNA.

Jede Zelle ist vielen tausend endogenen und exogenen Angriffen ausgesetzt, die täglich bis zu 10^5 DNA-Schäden verursachen (Giglia-Mari et al, 2011). Besonders schwerwiegend können diese Schäden sein, wenn dadurch die Replikation oder Transkription beeinflusst wird. Nicht oder nicht vollständig reparierte DNA-Schäden können schließlich zu Mutationen und Chromosomenaberrationen führen. Damit das Überleben von Zellen und Organismen gewährleistet werden kann, muss die genetische Information exakt auf die Tochterzellen übertragen werden. Eukaryoten haben dafür komplexe Mechanismen entwickelt, die den Schaden erkennen und in eine adäquate Antwort übersetzen, was zusammengefasst als DNA-Schadensantwort (DDR, engl. *DNA damage response*) bezeichnet wird (Jackson & Bartek, 2009; Shiloh, 2003). Dabei spielen Zellzyklus-Kontrollpunkte sowie DNA-Reparaturmechanismen eine besondere Rolle (Giglia-Mari et al, 2011).

Die DNA-Schadensantwort stellt einen Signaltransduktionsweg dar, der sich aus Sensoren, Transduktoren, Mediatoren und Effektoren zusammensetzt (Abb. 1-1). Nach Erkennung eines DNA-Schadens durch Sensorproteine erfolgt die Signalweiterleitung mithilfe einer Phosphorylierungskaskade über Transduktorproteine, zu denen die Serin/Threonin Proteinkinasen ATM (engl. *ataxia telangiectasia mutated*), ATR (engl. *ATM and Rad3 related*) und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase) gehören. Die Signale werden dann mittels Phosphorylierung von Mediatorproteinen zu den Effektorproteinen weitergeleitet. Diese aktivieren Zielproteine, die zum Zellzyklusarrest führen oder, bei zu schwerwiegenden Schäden, die Apoptose einleiten. Der Zellzyklusarrest verhindert, dass die geschädigte DNA verdoppelt und auf die Tochterzellen übertragen wird und gibt der Zelle Zeit, den Schaden zu beheben. Zellzykluskontrollpunkte befinden sich bei dem Übergang von der G1/S-Phase, innerhalb der S-Phase sowie bei dem Übergang der S/M-Phase und der M/G2-Phase (Sancar et al, 2004).

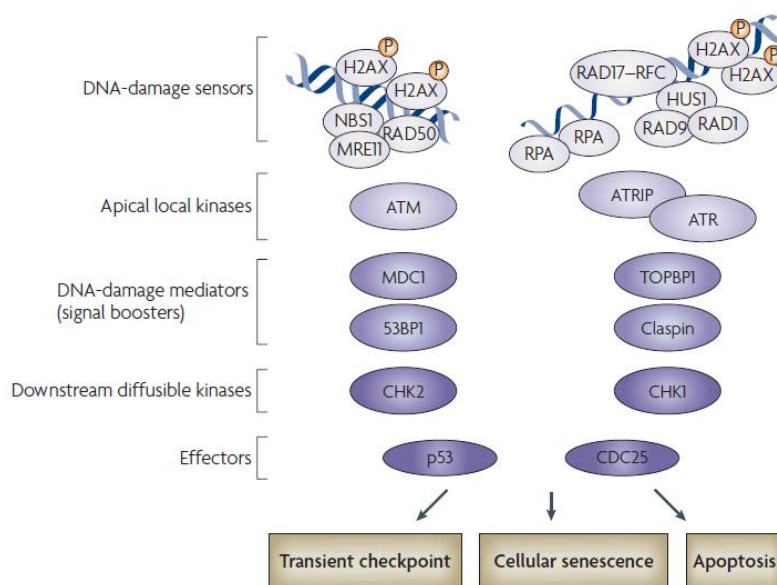


Abb. 1-1 Signaltransduktionsweg der DNA-Schadensantwort

Signalweiterleitung nach DNA-Schädigung über Transduktoren wie ATM oder ATR und über Mediatoren bis hin zu Effektoren, die nachgeschaltet Proteine aktivieren, um eine adäquate zelluläre Antwort wie Zellzyklusarrest, zelluläre Seneszenz oder Apoptose auszulösen. Aus d'Adda di Fagagna, 2008.

1.1.2.2 DNA-Reparatur

Durch die Vielfältigkeit der DNA-Schäden haben sich in eukaryotischen Zellen zahlreiche spezifische und hoch konservierte DNA-Reparaturmechanismen entwickelt. Neben der direkten Beseitigung von DNA-Modifikationen durch spezifische Enzyme wie z. B. die Photolyase, die Pyrimidindimere auflöst (Sancar, 2008), können bei der DNA-Reparatur vier wichtige Reparaturmechanismen unterschieden werden (Tab. 1-1).

Einzelstrangbrüche sowie Veränderungen von Basen wie bei der Deaminierung oder der hydrolytischen Abspaltung von Nukleotiden werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER) behoben (Lindahl & Barnes, 2000). Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) kommt z. B. bei Verlinkungen von Basen innerhalb eines DNA-Stranges oder bei der Bildung von Dimeren benachbarter Basen zum Einsatz. Fehlpaarungen innerhalb der DNA, wie sie bei der Deaminierung von Basen oder im Verlauf der Replikation auftreten können, sowie Insertionen und Deletionen werden durch die Fehlpaarungsreparatur (MMR, engl. *mismatch repair*) beseitigt (Jiricny, 2006). Alle drei Reparaturwege benötigen zahlreiche Proteine, die in einer Kaskade von nachgeschalteten Reaktionen agieren. Vereinfacht gesagt werden bei diesen Wegen einzelne Basen mittels der BER oder mehrere Nukleotide um den Bereich des DNA-Schadens mittels der NER und der MMR entfernt und anhand des komplementären DNA-Stranges ersetzt.

Ein weiterer Mechanismus ist für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA verantwortlich. Doppelstrangbrüche stellen die schwerwiegendsten Schäden der DNA dar, weil hier beide Stränge betroffen sind. Dadurch kann es leicht zu Translokationen oder zu einer chromosomalen

Fragmentierung kommen, weshalb eine schnelle Reparatur notwendig ist. Bei der Reparatur von DSBs können zwei Reparaturwege, die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ, engl. *non homologous end joining*), voneinander unterschieden werden (Khanna & Jackson, 2001). Bei der HR dient die intakte homologe Region des Schwesterchromatids als Vorlage für die Reparatur. Bei der NHEJ werden die beiden Enden des Bruches wieder miteinander verbunden, was eine hohe Fehleranfälligkeit birgt (Khanna & Jackson, 2001).

Tab. 1-1 Liste der unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen

<i>DNA-Reparaturmechanismus</i>	<i>Art des Schadens</i>
Basenexzisionsreparatur (BER)	Veränderte Basen AP-Stellen Einzelstrangbrüche
Nukleotidexzisionsreparatur (NER)	Vernetzung innerhalb eines DNA-Stranges Pyrimidindimere Einzelstrangbrüche
Fehlpaarungs-Reparatur (MMR)	Basen-Fehlpaarung Insertionen Deletionen
Homologe Rekombination (HR) Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)	Vernetzung zwischen komplementären DNA-Strängen Doppelstrangbrüche

Eine der schnellsten Antworten auf DNA-Strangbrüche, die innerhalb von Sekunden nach Entstehung des Schadens beginnt, stellt die Phosphorylierung der Histonvariante H2A.X dar, wobei γ H2A.X entsteht (Rogakou et al, 1998). Diese Modifikation erfolgt innerhalb einer spezifischen Konsensussequenz am Serin 139 der C-terminalen Region und wird je nach Ursache des Strangbruchs durch die Proteinkinasen ATM, ATR oder DNA-PK (Stiff et al, 2004; Ward & Chen, 2001) katalysiert. Die Bildung von γ H2A.X hat die Lockerung des Chromatins zur Folge und dient als Andockstelle für die Rekrutierung von weiteren Sensorkomplexen der DDR, die das Signal amplifizieren. Die Phosphorylierung findet somit zunächst im Bereich des DNA-Schadens statt und weitet sich schließlich auf einen größeren Chromatinbereich von mehreren Megabasen aus (Rogakou et al, 1999). Diese Bereiche können mittels Immunfluoreszenz als definierte Punkte (γ H2A.X-Foci) sichtbar gemacht werden, wobei sich die Anzahl der Foci proportional zu der Häufigkeit der Doppelstrangbrüche verhält (Rogakou et al, 1999). γ H2A.X scheint dabei allerdings nicht essentiell für die Reparatur zu sein, sondern macht die Reparatur effizienter (Celeste et al, 2002). Neben Doppelstrangbrüchen kann es auch bei weiteren Prozessen wie der DNA-Fragmentierung oder der Alterung zu der Bildung von γ H2A.X kommen (Rogakou et al, 2000; Wang et al, 2009).

Kann ein DNA-Schaden erfolgreich repariert werden, nimmt die Zelle ihre Teilungsaktivität wieder auf. Ist die Reparatur nicht möglich, weil die Schäden zu schwerwiegend sind oder Defekte in den Reparaturmechanismen auftreten, verbleibt die Zelle im Zellzyklusarrest und es werden Seneszenz

oder Apoptose eingeleitet (Best, 2009). Wird beschädigte DNA repliziert, können permanente Mutationen entstehen, die zu zellulären Fehlfunktionen und schließlich zu vielen verschiedenen Krankheiten führen können (Abb. 1-2).

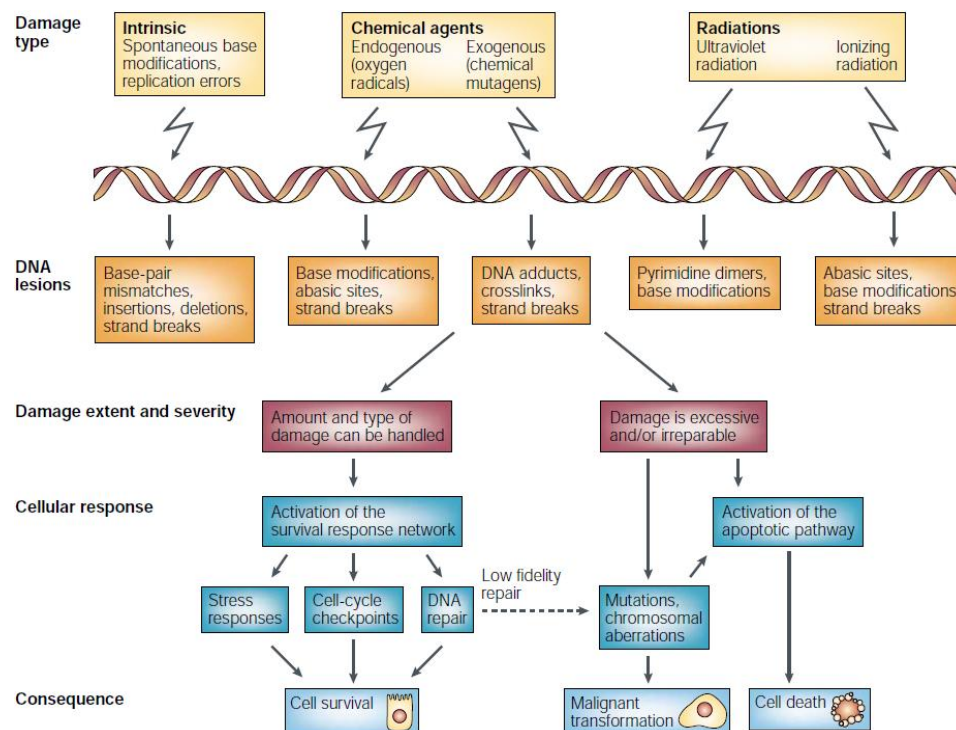


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Ursachen von DNA-Schäden und der Zellantwort. Die verschiedenen Arten von DNA-Schäden haben unterschiedliche zelluläre Antworten zur Folge. Im Fall von reparablen DNA-Schäden werden Zellzyklus-Kontrollpunkte aktiviert und es kommt zur Reparatur der DNA, was das Überleben der Zelle ermöglicht. Sind die DNA-Schäden zu schwerwiegend und nicht reparabel, führt die Aktivierung eines apoptotischen Signalweges entweder zum Zelltod oder es verbleiben Mutationen im Erbgut, die eine maligne Transformation der Zellen zur Folge haben. Aus Shiloh, 2003.

1.1.2.3 DNA-Schäden als Ursache für Alterung

Die Akkumulation von DNA-Schäden im Verlauf der Alterung wird als eine Ursache für zelluläre Veränderungen und dem damit einhergehenden Alterungsprozess angesehen. Dieser Umstand wird mit der ‚DNA-Schaden-Theorie der Alterung‘ beschrieben (Freitas & de Magalhaes, 2011).

Grund für die Ansammlung von DNA-Schäden kann die im Alter erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies darstellen, die zytotoxischen oxidativen Stress in der Zelle verursacht. Verantwortlich dafür scheint eine altersbedingte reduzierte Funktion der Elektronentransportkette zu sein (Zahn et al, 2006). Die Abnahme der Effektivität des Antioxidans-Systems wird als Ursache für das erhöhte Aufkommen von ROS allerdings kontrovers diskutiert (Chen et al, 2007). Des Weiteren kann die Akkumulation von DNA-Schäden im Alter teilweise durch eine verringerte Expression von DNA-Reparatur-Proteinen verursacht werden (Goukassian et al, 2000). Vielmehr jedoch ist der Funktionsverlust verschiedener DNA-Reparatursysteme verantwortlich für die geringere Reparatur-

Kapazität. Eine besondere Bedeutung spielen dabei Defekte in BER, NER und NHEJ (Freitas & de Magalhaes, 2011). Beispielsweise zeigen die DNA-Polymerase β und die DNA-Ligase, die bei der BER involviert sind, eine geringere Aktivität im Alter (Krishna et al, 2005). Der für die DSB-Reparatur verantwortliche Mechanismus NHEJ ist in seneszenten Zellen weniger effizient und fehleranfälliger (Seluanov et al, 2004). Ein weiteres Beispiel stellt die Histon-Deacetylase SIRT6 aus der Familie der Sirtuin-Proteine dar. SIRT6 ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (Liszt et al, 2005) und dort an Chromatin gebunden (Mostoslavsky et al, 2006). Das Enzym spielt bei der BER und der DSB-Reparatur eine Rolle (McCord et al, 2009). So zeigen Mäuse, die defizient für SIRT6 sind, eine verfrühte Alterung (Mostoslavsky et al, 2006).

Verschiedene Krankheiten sind bekannt, bei denen Patienten eine Ansammlung altersspezifischer Merkmale erfahren, was insgesamt zu einer verfrühten Alterung führt. Diese werden als Progeroid-Syndrome bezeichnet, wobei die meisten Defekte in Genen für DNA-Reparatur-Proteine aufweisen. Beispiele dieser Krankheiten sind das Werner-Syndrom, Ataxia telangiectasia, Xeroderma pigmentosum oder das Cockayne-Syndrom (Freitas & de Magalhaes, 2011).

1.2 α -Synuclein

1.2.1 Die Synuclein-Familie

Zu der Familie der humanen Synucleine gehören die drei homologen Proteine α -, β - und γ -Synuclein (Clayton & George, 1998). Im Jahr 1988 wurde das erste Synuclein-Protein mit einer Länge von 143 Aminosäuren von Maroteaux und seinen Kollegen in dem elektrischen Organ des kalifornischen Zitterrochens *Torpedo californica* sowie im Gehirn von Ratten entdeckt und mittels eines Antiserums gegen cholinerge Vesikel isoliert. Aufgrund seiner Lokalisation in Synapsen und der Kernmembran wurde diesem Protein der Name ‚Synuclein‘ zugeschrieben (Maroteaux et al, 1988). In den folgenden Jahren kam es zu der Entdeckung weiterer Synucleine, die diesen aber zunächst nicht zugeordnet werden konnten und deshalb in der Literatur mit unterschiedlichen Namen zu finden sind. So wurde 1990 ein Protein bestehend aus 134 Aminosäuren in dem Gehirn von Rindern und Ratten entdeckt (Nakajo et al, 1990), welches durch weitere Untersuchungen als ein phosphoryliertes, 14 kDa großes Protein identifiziert werden konnte und ihm somit der Name Phosphoneuroprotein-14 (PNP-14) zugeteilt wurde (Nakajo et al, 1993; Shibayama-Imazu et al, 1993). Gleichzeitig wurde ein bis dahin unbekanntes Peptid, das in den Amyloid-Plaques von Patienten der Alzheimer-Krankheit vorkommt, untersucht. Mithilfe dieses zirka 35 Aminosäure langen Peptids, welches als NAC (*non-amyloid- β -component of Alzheimer's disease amyloid*)-Fragment bezeichnet wurde, konnte ein 140 Aminosäuren langes Vorläufer-Protein, NACP (*NAC precursor*), isoliert werden (Ueda et al, 1993). Durch die weitere Isolierung von 134 und 140 Aminosäuren langen Proteinen aus dem menschlichen

Gehirn, die homolog zu dem PNP-14- bzw. zu dem Vorläufer-Protein und dem von Maroteaux isolierten Protein aus der Ratte waren, wurden diese Proteine erstmals in eine Familie von humanen Synucleinen zusammengefasst. Es folgte schließlich die Einteilung in α - und β -Synuclein (Jakes et al, 1994). Einige Jahre später wurde im Zuge der Untersuchung einer cDNA-Bibliothek aus gesunder Brust und Brust-Karzinomen ein spezifisch in Brustkrebs überexprimiertes Gen namens BCSG-1 (engl. *breast cancer-specific gene*) beschrieben (Ji et al, 1997). Aufgrund seiner Homologie zu dem NAC-Fragment der A β -Plaques wurde dieses Protein schließlich als weiteres Mitglied der Synuclein-Familie identifiziert und γ -Synuclein benannt (Lavedan et al, 1998). Das gleiche Protein, welches zunächst den Namen Persyn erhielt, wurde im Nervensystem von Mäusen und Ratten entdeckt (Buchman et al, 1998). Ein weiteres Protein aus den Retinazellen wurde Synoretin genannt (Surguchov et al, 1999). Nach dieser Einordnung entspricht das zuerst entdeckte Synuclein aus dem Zitterrochen ebenfalls dem menschlichen γ -Synuclein. Ein weiteres Ortholog zu α -Synuclein namens Synelfin wurde auch in anderen Organismen wie dem Kanarienvogel *Serinus canaria* entdeckt (George et al, 1995). Die Proteine der Synuclein-Familie wurden bislang nur in Vertebraten beschrieben und konnten nicht in niederen Organismen wie *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden.

1.2.2 Struktur und physikalische Eigenschaften von α -Synuclein

Das menschliche α -Synuclein-Gen ist auf dem Chromosom 4q21.3-q22 lokalisiert (Chen et al, 1995) und überspannt einen Bereich von 111 Kilobasen (kb) (Abb. 1-3 a). Die beiden weiteren Synuclein-Mitglieder werden von unterschiedlichen Genen kodiert. β -Synuclein befindet sich auf dem Chromosom 5q35 (Spillantini et al, 1995) und γ -Synuclein ist auf dem Chromosom 10q23.2-q23.3 lokalisiert (Ninkina et al, 1998). Das Gen für α -Synuclein (*SNCA*) setzt sich aus insgesamt sieben Exons zusammen, wobei fünf davon den Protein kodierenden Bereich bilden (Abb. 1-3, b und c). Mit einer Länge von 140 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 14 kDa ist α -Synuclein ein verhältnismäßig kleines Molekül. Die 140 Aminosäuren lange Form wird am häufigsten transkribiert und ist das vollständige *SNCA*-Transkript. Bislang sind noch drei weitere Isoformen mit Längen von 98, 112 und 126 Aminosäuren bekannt, die durch alternatives Spleißen der Exons drei und fünf entstehen (Beyer & Ariza, 2013). Unter physiologischen Bedingungen liegt α -Synuclein ungefaltet vor und besitzt keine typische Sekundärstruktur, sondern bildet nur zufällig verwundene Strukturen (*random coils*) aus (Davidson et al, 1998; Weinreb et al, 1996). Die Bildung einer Sekundärstruktur hängt dabei von den das Protein umgebenden Bedingungen ab (Davidson et al, 1998).

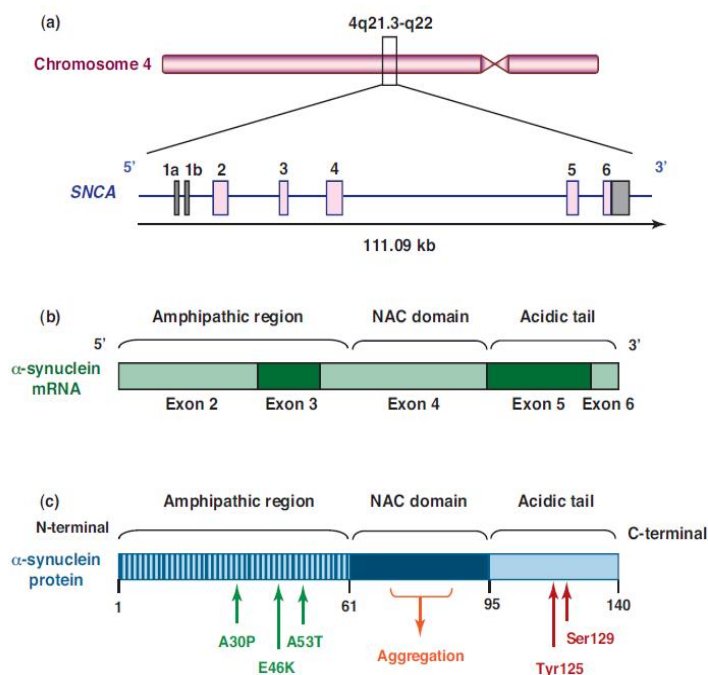


Abb. 1-3 Schematische Darstellung des menschlichen α -Synuclein

a) Lokalisation von α -Synuclein in der chromosomalen Region 4q21.3-q22, die einen Bereich von 111 kb überspannt. Darunter ist die Genorganisation von α -Synuclein in 5'-3'-Richtung dargestellt. b) Organisation der α -Synuclein-mRNA bestehend aus den Exons zwei bis sechs. c) Darstellung des Volllängen-Proteins mit einer Länge von 140 Aminosäuren und der Unterteilung des Proteins in eine amphipathische N-terminale Region, eine NAC-Domäne und den sauren C-terminalen Bereich. In der N-terminalen Region sind außerdem die drei zuerst entdeckten Mutationen A53T, A30P und E46K eingezeichnet. Tyr125 und Ser129 stellen die Nitrierungs- bzw. Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich dar. Aus Venda et al, 2010.

Die Sequenz von α -Synuclein kann in drei unterschiedliche Bereiche unterteilt werden: die amphipathische aminoternale (N-terminale) Domäne, die zentrale NAC-Domäne und die carboxyterminale (C-terminale) Region (Abb. 1-3). Der hoch konservierte aminoternale Bereich (Aminosäuren 1 bis 60), der allen drei Synuclein-Mitgliedern gemeinsam ist, enthält vier der insgesamt sieben ungleichen Wiederholungssequenzen bestehend aus einer Konsensussequenz mit der Aminosäurefolge KTKEGV (George et al, 1995). Diese Sequenz befähigt das ungefaltete Protein zur Ausbildung der amphipathischen α -Helices, die für die Bindung an säurereiche Phospholipid-Vesikel oder für die Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich sind (Davidson et al, 1998; Eliezer et al, 2001). Die Bindung des Proteins an Lipide hat dabei eine deutliche Veränderung der Sekundärstruktur zur Folge, bei der der Anteil der α -Helices innerhalb des Proteins von 3 % auf über 70 % ansteigt (Perrin et al, 2000). Viele physiologische Funktionen, die α -Synuclein zugeschrieben sind, werden auf die Fähigkeit zur Bindung von Phospholipiden zurückgeführt (Chandra et al, 2005). Innerhalb der N-terminalen Region befinden sich außerdem die bislang bekannten, beim Menschen beschriebenen Mutationen A53T (Polymeropoulos et al, 1997), A30P (Kruger et al, 1998), E46K (Zarranz et al, 2004), G51D (Lesage et al, 2013) und H50Q (Appel-Cresswell et al, 2013; Proukakis et al, 2013) von α -Synuclein (siehe Abschnitt 1.2.3). Die zentrale Domäne von α -Synuclein (Aminosäuren

61 bis 95), die aufgrund ihres Vorkommens in amyloiden Plaques von Patienten der Alzheimer-Krankheit auch als NAC-Domäne bezeichnet wird, stellt die am stärksten hydrophobe Region des Proteins dar. Diese Domäne ist charakteristisch für α -Synuclein und unterscheidet sich von den beiden anderen Synucleinen β und γ durch die Ausbildung von geordneten fibrillären Strukturen sowie β -Faltblatt-Strukturen (Goedert, 2001). Die C-terminale Domäne (Aminosäuren 96 bis 140) stellt den am wenigsten konservierten Bereich des Proteins dar und ist sehr variabel in Größe und Sequenz. Aufgrund des hohen Gehalts an sauren Aminosäuren ist diese Sequenz stark negativ geladen. Sie reguliert das Aggregationsverhalten des Volllängen-Proteins (Murray et al, 2003). Ein Teil dieser Region ist verantwortlich für die Chaperon-ähnliche Funktion von α -Synuclein (Weinreb et al, 1996). Dies wurde durch den Verlust der Chaperonaktivität nach Deletion des C-terminalen Bereichs bestätigt (Kim et al, 2002). Innerhalb des C-Terminus können außerdem zahlreiche posttranskriptionelle Modifikationen angefügt werden, die das Aggregationsverhalten und das Interaktionsverhalten von α -Synuclein beeinflussen. Dazu zählen z. B. Phosphorylierung an Ser87, Ser129, sowie an Tyr125, Tyr133 und Tyr135 oder Nitrierungen an den Aminosäuren Tyr39, Tyr125, Tyr133 und Tyr136 (zusammengefasst in Beyer & Ariza, 2013).

α -Synuclein wird hauptsächlich im Gehirn, insbesondere im Striatum, Neocortex, Hippocampus, Thalamus, Cerebellum und der Substantia nigra, exprimiert. Das Protein kommt in allen subzellulären Kompartimenten vor, ist aber hauptsächlich in den präsynaptischen Endigungen lokalisiert, wo es mit den synaptischen Vesikeln (Clayton & George, 1999) und den *Lipidrafts* der Plasmamembran (Fortin et al, 2004) verbunden ist. Wie es der Name Synuclein impliziert, ist α -Synuclein aber auch im Nukleus, sowohl in der Kernmembran als auch im Kerninneren, lokalisiert.

Die Expression von α -Synuclein ist jedoch nicht gehirnspezifisch. Das Protein kommt z. B. auch in Herz, Lunge, Pankreas, Nieren, Leber, Plazenta oder Skelettmuskeln vor, obwohl die Expression in diesen Geweben deutlich geringer als im Gehirn ist. Daneben konnte α -Synuclein auch in verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen wie Makrophagen, Lymphozyten, Thrombozyten, Monozyten oder Megakaryozyten nachgewiesen werden (Litic et al, 2004; Ueda et al, 1993).

1.2.3 Funktion von α -Synuclein

Die physiologische Funktion von α -Synuclein ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten, konnte bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Mithilfe einer Microarray-Studie von dopaminergen Neuroblastom-Zellen konnte nach Herunterregulation von α -Synuclein mittels siRNA eine Veränderung der Expression von insgesamt 361 Genen (davon 279 hoch- und 82 herunterreguliert) beobachtet werden, die an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sind (Habig et al, 2009). Nach Unterteilung in Kategorien konnten die meisten dieser Gene funktionell der transkriptionellen Regulation zugeordnet werden. Z. B. verändert α -Synuclein die Expression von

Genen wie *c-fos*. Dies erfolgt durch die verringerte Phosphorylierung von ERK und die damit abgeschwächte Signalweiterleitung bis hin zur Aktivierung von Elk-1, welches schließlich für die geringere Expression von *c-fos* verantwortlich ist (Iwata et al, 2001b). Regulierte Gene sind auch bei Prozessen wie der Modifikation von Proteinen, der Zellzyklusregulation, der intrazellulären Signalweiterleitung, der Proteindegradation oder der Apoptose involviert. Außerdem spielt ein Anteil der Gene eine Rolle bei dem Lipidmetabolismus, dem DNA- und RNA-Metabolismus oder der G-Protein-gekoppelten Signalweiterleitung und dem intrazellulären Proteintransport (Habig et al, 2009).

Da α -Synuclein im Nervengewebe zirka 1 % des gesamten zytosolischen Proteins ausmacht (Iwai et al, 1995), fokussiert sich ein großer Teil der möglichen Funktionen in den Neuronen. So wird z. B. die neuronale Entwicklung und die synaptische Plastizität durch α -Synuclein beeinflusst (Sidhu et al, 2004). Ein Hinweis für eine mögliche Rolle bei der synaptischen Plastizität liefert die bei Zebrafinken verringerte Expression in Gehirnregionen während der Gesangsentwicklung (George et al, 1995). Innerhalb der Neurone ist α -Synuclein hauptsächlich in den präsynaptischen Endigungen lokalisiert und dort mit den synaptischen Vesikeln assoziiert. Deshalb ist α -Synuclein in fast alle Prozesse der Neurotransmission und des Vesikelzyklus, vom Transport innerhalb der Vesikel bis hin zur Neurotransmitterausschüttung und das Wiederbefüllen der Vesikel, involviert (Cheng et al, 2011).

α -Synuclein hemmt die Ausschüttung von Neurotransmittern sowie die Regeneration, genauer gesagt, das Wiederbefüllen der Vesikel (Abeliovich et al, 2000; Cabin et al, 2002). Dieser negative regulatorische Einfluss auf die Neurotransmission könnte durch die Bindung an die Vesikelmembranen und die dadurch erfolgte Hemmung der Phospholipase D2 (PLD2), die für den Transport der Vesikel verantwortlich ist, hervorgerufen werden (Jenco et al, 1998). Des Weiteren besitzt α -Synuclein eine Chaperonaktivität und wirkt bei der Faltung und Rückfaltung von SNARE-Proteinen (engl. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*), die ebenfalls bei dem Vesikelzyklus eine Rolle spielen. Überexprimiertes α -Synuclein kompensiert die Defizite bei CSP α (engl. *cysteine string protein α*)-*Knockout*-Mäusen und verhindert die Degeneration oder das Absterben von Neuronen (Chandra et al, 2005). Des Weiteren inhibiert α -Synuclein durch einen regulatorischen Einfluss auf die Expression und die Aktivität der Tyrosin-Hydroxylase (TH) die Synthese von Dopamin in dopaminergen Neuronen und beeinflusst damit den Gehalt des Neurotransmitters in diesen Zellen (Perez et al, 2002).

Die offene und unstrukturierte Konformation von α -Synuclein in Lösung war ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktion von α -Synuclein als Chaperon (Weinreb et al, 1996). Dies wird durch eine 40%ige Sequenzhomologie zwischen α -Synuclein und der Chaperonfamilie 14-3-3 unterstützt (Ostrerova et al, 1999). Das Chaperon 14-3-3 ist für viele regulatorische Prozesse wie die Signaltransduktion und die Zellzykluskontrolle verantwortlich und spielt eine Rolle bei der

neuronalen Entwicklung (Fu et al, 2000). α -Synuclein bindet 14-3-3-Proteine sowie einige Bindepartner von 14-3-3, die für das Zellüberleben von Bedeutung sind, u. a. die Proteinkinase C (PKC), ERK oder BAD (engl. *Bcl-2-associated death promoter*) (Ostrerova et al, 1999).

Die Rolle von α -Synuclein innerhalb der Synapse wird dennoch kontrovers diskutiert. Zum einen ist α -Synuclein nur in Vertebraten exprimiert, was eine entscheidende Funktion des Proteins für z. B. die synaptische Transmission ausschließt. Zum anderen zeigen einige α -Synuclein-*Knockdown*-Studien keinen deutlichen Einfluss auf die Funktionen in den Synapsen (Abeliovich et al, 2000). Auch der Doppel-*Knockdown* von α - und β -Synuclein lässt keinen besonderen Phänotyp in Bezug auf Veränderungen der synaptischen Funktionen erkennen (Chandra et al, 2004).

Neben der Lokalisation in präsynaptischen Nervenenden wurde α -Synuclein schon bei seiner Entdeckung im Jahre 1988 in der nukleären Membranhülle nachgewiesen, was ausschlaggebend für den Namen ‚Synuclein‘ war (Maroteaux et al, 1988). Die Lokalisation im Zellkern konnte nachfolgend in verschiedenen Modellsystemen wie Mäusen (Goers et al, 2003; Masliah et al, 2000), Ratten (Mori et al, 2002; Zhang et al, 2008) und transgenen Drosophila-Fliegen (Kontopoulos et al, 2006), aber auch in kultivierten Zellen (McLean et al, 2000) sowie Hefen (Liu et al, 2011) bestätigt werden. Die Funktion von α -Synuclein im Zellkern wurde bislang allerdings kaum untersucht, weshalb diese weitestgehend ungeklärt ist. Es konnte gezeigt werden, dass α -Synuclein im Zellkern an Histone bindet (Goers et al, 2003) sowie mit der DNA interagiert und z. B. die Promotorregionen von PGC1 α (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) und Notch 1 bindet (Desplats et al, 2012; Hegde et al, 2010; Siddiqui et al, 2012). Außerdem wurde gezeigt, dass α -Synuclein in Folge von Stress verstärkt in den Zellkern wandert und dort entweder eine protektive Rolle spielt oder toxisch auf die Zelle wirkt (Zhou et al, 2013). So inhibiert α -Synuclein z. B. die Histon-Acetylierung, was die erhöhte Expression von neurotoxischen Genen zur Folge hat (Kontopoulos et al, 2006).

1.2.4 Pathophysiologische Rolle von α -Synuclein

α -Synuclein wurde einige Jahre nach seiner Entdeckung mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Verschiedene Hinweise deuteten dabei auf toxische Eigenschaften von α -Synuclein hin. Der erste Anhaltspunkt für diese Korrelation kam durch die Beobachtungen von Ueda (Ueda et al, 1993), der ein bis dahin noch unbekanntes Peptid (genannt NAC) von 35 Aminosäuren aus den amyloiden Plaques von Patienten mit der Alzheimer-Krankheit untersuchte und diese als Domäne des heute bekannten α -Synuclein identifizierte.

Durch die Entdeckung von drei Punktmutationen (A53T, A30P und E46K) in der aminoterminalen Domäne des α -Synuclein-Gens, die als Ursache für die seltene Form der familiären Parkinson-Krankheit gelten (Kruger et al, 1998; Polymeropoulos et al, 1997; Zarranz et al, 2004), wurde die Rolle

von α -Synuclein hinsichtlich der Ausprägung neurodegenerativer Erkrankungen weiter unterstützt. Den drei autosomal-dominant vererbten Mutationen ist ein früher Krankheitsbeginn und schwerer Krankheitsverlauf gemeinsam. Kürzlich wurden zwei weitere vererbare Punktmutationen (G51D und H50Q) bekannt, die ebenfalls im aminoterminalen Bereich des α -Synuclein-Gens lokalisiert sind (Appel-Cresswell et al, 2013; Lesage et al, 2013; Proukakis et al, 2013).

In der sporadischen und familiären Form der Parkinson-Krankheit wurde α -Synuclein als Hauptkomponente von Lewy-Körperchen, eosinophilen Proteinablagerungen, entschlüsselt (Spillantini et al, 1998b; Spillantini et al, 1997). Diese Ablagerungen sind nach Fritz Heinrich Lewy benannt, der schon im Jahre 1912 Proteineinschlüsse in verschiedenen Gehirnregionen von Parkinson-Patienten beschrieb (Lewy, 1912). Die Einschlusskörperchen wurden einige Jahre später von Tretiakoff dann auch in der Substantia nigra entdeckt (Tretiakoff, 1919). Neben α -Synuclein konnten bislang 80 Proteine in Lewy-Körperchen identifiziert werden, darunter Ubiquitin, Hitzeschockproteine, ERK, Immunglobuline oder Tubulin (Wakabayashi et al, 2007). Mikroskopisch weisen Lewy-Körperchen eine charakteristische Struktur auf: sie unterteilen sich in einen dichten Kern und einen diesen umgebenden, weniger dichten Hof (Abb. 1-4a).

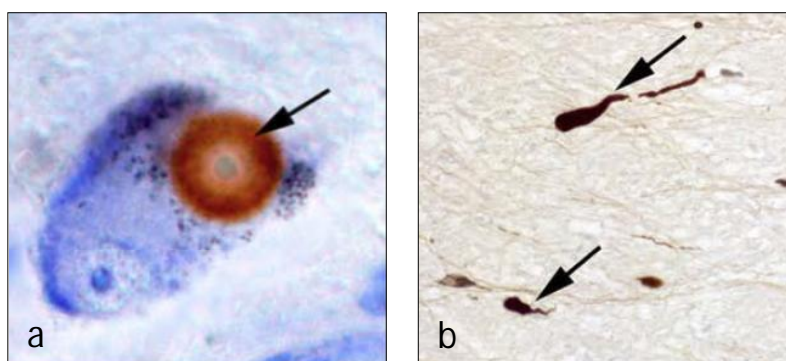


Abb. 1-4 Lewy-Körper und Lewy-Neuriten

Immunfärbung mit einem Antikörper gegen α -Synuclein zeigt Lewy-Körperchen (a) und Lewy-Neuriten (Pfeile in b) im Gehirn von Parkinson-Patienten. In a) ist deutlich die charakteristische Struktur eines Lewy-Körperchens mit einem dichten Kern (Pfeil) und einem etwas schwächeren Hof zu erkennen. Aus Licker et al, 2009.

Neben der Parkinson-Krankheit sind noch weitere neurodegenerative Krankheiten durch unterschiedliche α -Synuclein-Ablagerungen im Gehirn gekennzeichnet, die gemeinsam unter dem Namen Synucleinopathien zusammengefasst werden. Dazu zählen u. a. die Alzheimer-Krankheit, die Multiple System-Atropie, die Demenz mit Lewy-Körperchen, das Down-Syndrom und die Hallervorden-Spatz-Krankheit. Dabei scheint bei allen Krankheiten die Aggregation von α -Synuclein in bestimmten Neuronengruppen die Ursache für die Pathogenität zu sein. Multiple System-Atropie ist dagegen durch zytoplasmatische Einschlüsse in Gliazellen und neuronalen Zellen charakterisiert (Spillantini et al, 1998a; Wakabayashi et al, 1998).

Ein bedeutsamer Durchbruch für das Verständnis der Rolle von α -Synuclein bei der Entwicklung der Parkinson-Krankheit war die Entdeckung von Multiplikationen im α -Synuclein-Gen. Zwei voneinander unabhängige Familien zeigten eine autosomal-dominant vererbte Form der Parkinson-Krankheit, die ebenfalls durch einen frühen Ausbruch bei einem Durchschnittsalter von 34 Jahren und durch ein schwerwiegendes Krankheitsbild einschließlich Tremor, Rigidität und Bradykinesie sowie Demenz gekennzeichnet war. Diese Form konnte jedoch nicht auf Mutationen oder eine Veränderung der α -Synuclein-Sequenz zurückgeführt werden. Die Ursache lag vielmehr in der Triplikation des α -Synuclein-Gens, welche zu einer Verdopplung der α -Synuclein-Expression führte (Farrer et al, 2004). Daneben wurde auch eine familiär vererbte Genduplikation gefunden. Die Krankheit verläuft in diesen Patienten deutlich milder als bei Patienten mit Triplikationen und der Phänotyp ist vergleichbar mit dem der idiopathischen Form (Chartier-Harlin et al, 2004; Ibanez et al, 2004). Diese Beobachtungen machten einen Gen-Dosis-Effekt von α -Synuclein deutlich, da sowohl für den Krankheitsbeginn als auch für die Schwere des Phänotyps die Menge des Proteins entscheidend zu sein scheint (Chartier-Harlin et al, 2004; Eriksen et al, 2005). Diese Hypothese wird durch Studien an der Promotorregion des α -Synuclein-Gens unterstützt (Chiba-Falek & Nussbaum, 2001). Hier konnte gezeigt werden, dass die polymorphe Mikrosatelliten-Sequenz, NACP-Rep1, die ungefähr 10 kb aufwärts des α -Synuclein-Gens lokalisiert ist, die Expression von α -Synuclein verändert und damit zur Entstehung der sporadischen Parkinson-Krankheit beiträgt (Chiba-Falek & Nussbaum, 2001).

α -Synuclein liegt nativ ungefaltet vor, kann aber in Lösung Aggregate bilden. Die Aggregation erfolgt über mehrere Zwischenstufen: zuerst werden lösliche oligomere Formen, sogenannte Protofibrillen, gebildet, die entweder als Ringe, Kugeln oder Ketten auftreten können; anschließend entstehen unlösliche, amyloid-ähnliche Fibrillen, die als Basis für die charakteristischen Lewy-Körperchen gelten (Abb. 1-5).

Die Aggregation von α -Synuclein kann durch verschiedene Faktoren, wie eine hohe Proteinkonzentration, Mutationen, Interaktion mit Metallen oder posttranslationale Modifikationen ausgelöst werden (Beyer, 2006; Brown, 2007; Uversky et al, 2001a). Kontrovers diskutiert wird nach wie vor die Rolle der α -Synuclein-Aggregation als kausale Ursache für die Degeneration von Neuronen. Einige Studien sehen die Aggregate als toxische Komponenten an, die für Neurodegeneration in der Parkinson-Krankheit verantwortlich sind (Masliah et al, 2000). Im Gegensatz dazu sehen andere die Aggregation als protektiven Mechanismus an, der mögliche toxische Eigenschaften des Proteins abfängt. In diesem Fall werden vor allem die löslichen Oligomere als toxische Spezies angesehen (Outeiro et al, 2007).

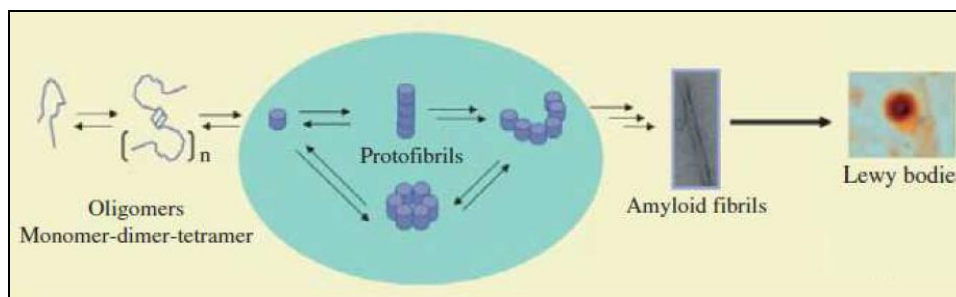


Abb. 1-5 Aggregatbildung von α -Synuclein

Die Aggregation von α -Synuclein zu Lewy-Körperchen verläuft über mehrere Zwischenstufen: zunächst kommt es zur Oligomerbildung, löslichen Protofibrillen, die entweder kugelförmig, ringförmig oder kettenförmig sein können. Diese bilden schließlich unlösliche Fibrillen, die als Basis für die Ausbildung von Lewy-Körperchen dienen. Verändert nach Lashuel & Lansbury, 2006.

1.2.5 Morbus Parkinson

Die Parkinson-Krankheit stellt nach der Alzheimer-Krankheit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung dar. Sie wurde nach dem englischen Arzt James Parkinson benannt, der schon im Jahre 1817 in seiner Arbeit *„An Essay on the Shaking Palsy“* die Symptome dieser Erkrankung beschrieb (Parkinson, 1817). Die Prävalenz der Krankheit ist abhängig vom Alter und steigt von ungefähr 1 % bei den über 60-jährigen auf 5 % bei den 80- bis 84-jährigen (de Rijk et al, 1997). Die Krankheit ist ausschließlich im Menschen ausgeprägt und betrifft alle ethnischen Gruppen, wobei Männer ein erhöhtes Risiko tragen, die Krankheit zu entwickeln (Baldereschi et al, 2000; Van Den Eeden et al, 2003).

Klinisch ist die Parkinson-Krankheit durch vier Kardinalsymptome gekennzeichnet, die das motorische System der Patienten betreffen. Das für die Diagnose unerlässliche Hauptmerkmal ist die Bradykinese, die allgemein einen verlangsamten Bewegungsablauf beschreibt. Bradykinese betrifft nahezu den gesamten Körper und schreitet unaufhaltsam voran. Ein weiteres Merkmal ist die Rigidität, auch Muskelstarre genannt. Diese wird durch eine unwillkürliche Anspannung der quergestreiften Muskulatur verursacht. Das wohl auffälligste Merkmal stellt das Muskelzittern (Ruhetremor) dar, das bei zirka 70 % der Parkinson-Patienten auftritt. Außerdem weisen Patienten eine Störung in der Körperhaltung auf, was auch als posturale Instabilität bezeichnet wird. Dabei sind der Gleichgewichtssinn und das Koordinationsvermögen beeinträchtigt, was ebenso durch eine nach vorn gebeugte Körperhaltung sichtbar wird. Neben diesen motorischen Symptomen kommt es auch zu Störungen des nicht-motorischen Systems (Chaudhuri & Schapira, 2009), insbesondere psychischen Veränderungen bis hin zu Depressionen, die bei 40 bis 50 % der Betroffenen auftreten (McDonald et al, 2003). Bei zirka 40 % der Patienten wird die Krankheit von Demenz begleitet (Emre, 2003). Weiterhin können auch Symptome wie Schlafstörungen und eine Verschlechterung des Geruchssinns vorkommen (Chaudhuri & Schapira, 2009).

Neuropathologisch ist die Parkinson-Krankheit durch das Absterben von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra *pars compacta* charakterisiert, was die Reduktion des Neurotransmitters Dopamin in dieser Gehirnregion zur Folge hat. Die daraus resultierenden motorischen Defizite der Krankheit treten allerdings erst auf, wenn es in dieser Gehirnregion zu einem Verlust von 50 % der dopaminergen Neurone kommt und das striatale Dopamin zu 80 % reduziert ist (Fearnley & Lees, 1991).

Ein weiteres histopathologisches Merkmal sind Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten (Abb. 1-4). Sie treten im Zytoplasma der verbleibenden Neurone der Substantia nigra auf, kommen aber auch in Neuronen anderer Gehirnregionen wie dem Cortex, der Amygdala und dem peripheren autonomen System vor (Dickson et al, 2009).

Als Ursache für die Entstehung der Parkinson-Krankheit wird das Zusammenwirken von verschiedenen Faktoren wie einer genetischen Disposition, dem Alter und Umweltfaktoren vermutet. Die Entdeckung von Mutationen, die die Parkinson-Krankheit verursachen, veränderte das Verständnis für die Pathogenese der Krankheit. Die erste Mutation, die mit Parkinson assoziiert werden konnte, war die Mutation A53T, die sich in dem Gen für α -Synuclein befindetet (Polymeropoulos et al, 1997). Bis heute sind fast 20 Loci bekannt, die verantwortlich für die vererbte Form der Parkinson-Krankheit sind (zusammengefasst in Licker et al, 2009). Die familiären Formen machen allerdings nur ungefähr 5 bis 10 % der Krankheitsfälle aus. In Tab. 1-2 sind die bislang entdeckten Loci und, soweit bekannt, die Namen der dazugehörigen Gene aufgelistet.

Tab. 1-2 Liste der bislang bekannten Parkinson-auslösenden Gene

Bislang sind 18 Loci bekannt, die für die Entstehung der Parkinson-Krankheit verantwortlich sind. Aufgelistet sind die 18 PARK-Gene mit den dazu gehörigen Genbezeichnungen, sowie die entsprechenden Chromosomenregionen. Wenn bekannt, ist ebenfalls die Vererbungsform der Gene mit aufgeführt (AD = autosomal dominant; AR = autosomal rezessiv). Tabelle verändert nach Licker et al, 2009

	Gen	Name	Vererbung	Chromosome n-Region
PARK 1	<i>SNCA</i>	α -Synuclein	AD	4q21.3-q22
PARK 2	<i>PRKN</i>	Parkin (RBR E3 Ubiquitin Protein-Ligase)	AR	6q25.2-q27
PARK 3	<i>Unbekannt</i>	Parkinson-Krankheit 3 (Lewy-Körperchen)	AD	2p13
PARK 4	<i>SNCA</i>	α -Synuclein	AD	4q21.3-q22
PARK 5	<i>UCHL1</i>	Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase L1 (Ubiquitin Thiolesterase)	AD	4p13
PARK 6	<i>PINK1</i>	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>	AR	1p36.12
PARK 7	<i>DJ-1</i>	DJ-1	AR	1p36.23
PARK 8	<i>LRRK2</i>	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>	AD	12q12
PARK 9	<i>ATP13A2</i>	ATPase Typ 13A2	AR	1p
PARK 10	<i>Unbekannt</i>	Parkinson-Krankheit 10		1p32
PARK 11	<i>GIGYF2</i>	<i>Grb10 interacting GYF Protein2</i>	AR	2q36-q37
PARK 12	<i>Unbekannt</i>	Parkinson-Krankheit 12		Xq21-q25
PARK 13	<i>HTRA2</i>	HtrA Serin Peptidase 2		2p13.1
PARK 14	<i>PLA2G6</i>	Phospholipase A2, Gruppe VI (zytosolisch, Kalzium-unabhängig)	AR	22q13.1
PARK 15	<i>FBXO7</i>	F-box Protein 7	AR	22q12.3
PARK 16	<i>Unbekannt</i>	Parkinson-Krankheit 16		1q32
PARK 17	<i>VPS35</i>	<i>Vacuolar protein sorting 35 homolog (S. cerevisiae)</i>		16q12
PARK 18	<i>EIF4G1</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1</i>		3q27.1

Die Ursache für die hauptsächlich vorkommende sporadische Parkinson-Krankheit ist bislang nicht aufgeklärt. In den meisten Fällen scheint das Auftreten der Krankheit durch die im Alter erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Kombination aus genetischer Disposition und Umweltfaktoren zu sein (Steece-Collier et al, 2002). Die Erkenntnis, dass Umweltfaktoren für die Entstehung der Parkinson-Krankheit verantwortlich sein können, wurde durch eine zufällige Entdeckung in den 80er Jahren gewonnen. Drogensüchtige, die sich ein mit MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) kontaminiertes synthetisches Heroin injizierten, entwickelten nach der Eigenapplikation Symptome der Parkinson-Krankheit (Langston et al, 1983). Zu den weiteren Umweltfaktoren, die Risikofaktoren für die Parkinson-Krankheit darstellen, zählen Pestizide, Herbizide, oder Schwermetalle (Migliore & Coppede, 2009; Moretto & Colosio, 2013).

1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalwege

Fast jede zelluläre Funktion ist von externen Signalen abhängig (Pawson & Nash, 2000). Dabei werden extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine oder Neurotransmitter, aber auch sensorische und mechanische Reize von Rezeptoren aufgenommen, in eine intrazelluläre Antwort übersetzt und amplifiziert. Einige Rezeptoren wie z. B. Hormon-Rezeptoren können entweder direkt im Nukleus oder im Zytoplasma vorliegen, an Hormone (z. B. Steroide) binden und als Komplex in den Zellkern einwandern, wo sie selbst als Transkriptionsfaktoren die Genexpression von Hormon-regulierten Genen beeinflussen. Daneben erfolgt die Signalweiterleitung mithilfe von membranständigen Rezeptoren, die durch die Bindung von spezifischen Liganden im Zellinneren eine adäquate Antwort über eine Signalkaskade hervorrufen. Die Liganden üben dabei ihre Wirkung ausschließlich durch die Bindung an die Rezeptoren aus, wandern aber selbst nicht in die Zelle ein.

Wichtige Signalwege, die über membranständige Rezeptoren reguliert werden, sind Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalwege. Die Weiterleitung der Signale erfolgt bei diesen Wegen über eine Phosphorylierungskaskade, die aus drei hintereinander geschalteten Kinasen besteht, den MAPK-Kinasen-Kinasen, den MAPK-Kinasen und den MAPK. Die Phosphorylierung der MAPK erfolgt an einem Threonin und einem Tyrosin in einer konservierten Domäne (Thr-Xxx-Tyr) (Plotnikov et al, 2011; Seger & Krebs, 1995). Es können in Säugetieren vier MAPK-Gruppen unterschieden werden: die extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und die extrazellulär Signal-regulierte Kinase 5 (ERK5) (Plotnikov et al, 2011) (Abb. 1-6). Die MAPK-Signalwege sind wichtige Faktoren für die Regulation der Embryogenese, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung sowie der Apoptose und werden durch verschiedenste Faktoren reguliert. Die Aktivierung der ERK1/2-MAPK erfolgt dabei hauptsächlich durch Mitogene und Wachstumsfaktoren, aber auch durch Stressfaktoren. ERK5 wird ebenfalls durch Wachstums-

und Stressfaktoren reguliert. Die Aktivierung der JNK- und p38-MAPK erfolgt dagegen vorwiegend durch Stressfaktoren (Cargnello & Roux, 2011).

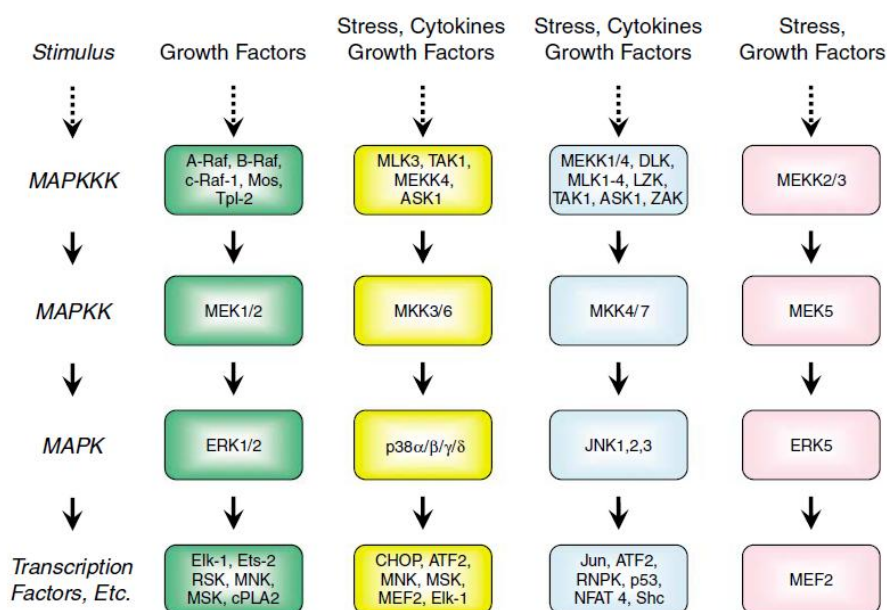


Abb. 1-6 Schematische Darstellung der drei MAPK-Signalwege

Übersicht der vier MAPK-Signalwege: extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und ERK5. Nach der Aktivierung durch Stimuli wie z. B. Wachstums- oder Stressfaktoren verläuft die Phosphorylierungskaskade über die Proteinkinasen MAPKKK, MAPKK, MAPK bis hin zu den verschiedenen Zielproteinen. Aus Roberts & Der, 2007.

Die Regulation der MAPK-Signalwege erfolgt neben der Phosphorylierung mittels Kinasen auch über die Dephosphorylierung mithilfe von MAPK-Phosphatasen (MKPs), die zu der Familie der dual spezifischen Phosphatasen (DUSPs) gehören. In Säugern sind zehn spezifische MKPs bekannt, die für die Dephosphorylierung der Threonin- und Tyrosinreste von MAPK verantwortlich sind (Caunt & Keyse, 2013). Diese unterscheiden sich trotz der Sequenzhomologie in ihrer Substratspezifität und ihrer zellulären Verteilung. Sie können, wie z. B. die Phosphatase MKP-2 nukleär vorliegen oder wie die ERK-spezifische Phosphatase MPK-3 im Zytoplasma lokalisiert sein. Andere MKPs können ihre Position zwischen Zytoplasma und Zellkern wechseln (Camps et al, 2000; Theodosiou & Ashworth, 2002).

1.3.1 Der ERK1/2-MAPK-Signaltransduktionsweg

Der ERK1/2-MAPK-Signalweg, der über EGFs (engl. *epidermal growth factors*; epidermale Wachstumsfaktoren) aktiviert wird, stellt den bislang am besten untersuchten Signalweg dar. Die Aktivierung des ERK1/2-MAPK-Signalweges beginnt mit der Bindung von Liganden an zwei Rezeptoren, die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), in der Zellmembran (McKay & Morrison, 2007). Die RTKs besitzen an ihrer intrazellulären Domäne eine Tyrosinkinaseaktivität, welche die

Phosphorylierung von Tyrosinresten von Proteinen ermöglicht. Nach der Bindung der Liganden vereinigen sich die beiden Rezeptoren zu einem Dimer und werden durch Autophosphorylierung an ihren Tyrosinresten aktiviert, was zur Bindung eines Adapter-Moleküls GRB2 (engl. *growth factor receptor-bound factor 2*) führt (Abb. 1-7). Die anschließende Bindung des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors (GEF, engl. *guanine nucleotide exchange factor*) SOS (engl. *son of sevenless*) hat die Aktivierung des membranständigen G-Proteins RAS zur Folge. Die Aktivierung von RAS erfolgt durch den Austausch von Guanosin-Diphosphat (GDP) gegen ein Guanosin-Triphosphat (GTP), welches dann eine direkte Interaktion mit Effektoren wie RAF eingeht. Die daraus resultierende Konformationsänderung von RAF bewirkt die Aktivierung der Kinaseaktivität von MEK1/2 (McKay & Morrison, 2007). Diese phosphoryliert die nachstehende MAPK ERK1/2 an den beiden konservierten Threonin- und Tyrosin-Resten innerhalb des konservierten Motifs Thr-Glu-Tyr (Crews et al, 1992). MAPK sind erst aktiv, wenn beide Reste phosphoryliert sind. Die Substrate der ERK1/2-Kinasen sind vielfältig und können sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern oder anderen Organellen lokalisiert sein (Yoon & Seger, 2006). Die Translokation des aktivierten ERK1/2 in den Zellkern erfolgt entweder als Monomer oder als Dimer (Lidke et al, 2010; Seger & Krebs, 1995), wo verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. Elk-1 mittels Phosphorylierung aktiviert werden (Casar et al, 2008; Seger & Krebs, 1995).

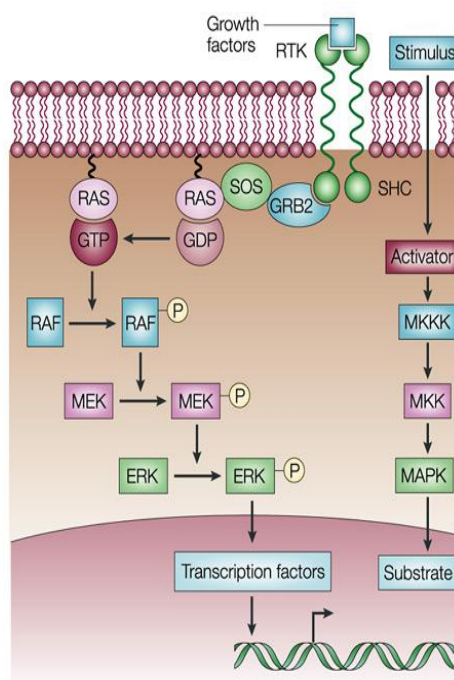


Abb. 1-7 Schematische Darstellung der ERK1/2-MAPK-vermittelten Signalweiterleitung

Vereinfachte schematische Übersicht der Aktivierung des ERK1/2-MAPK-Signalweges. Dargestellt ist die Bindung von Liganden, z. B. Wachstumsfaktoren (engl. *growth factors*) an die RTKs, was zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors führt und die Signalkaskade in Gang setzt. Die anschließende Bindung eines Adapter-Moleküls GRB2 und eines GEFs namens SOS dienen der Aktivierung des G-Proteins RAS, indem GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Dies führt zur nacheinander folgenden Phosphorylierung und Aktivierung der Kinasen RAF, MEK1/2 und ERK1/2. ERK1/2 phosphoryliert Substrate im Zytoplasma oder anderen Organellen oder wandert schließlich in den Zellkern ein, wo es Zielproteine aktiviert. Aus Chin, 2003.

Da der ERK1/2-MAPK-Signalweg für essentielle zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose verantwortlich ist, spielt die Regulation dieses Weges eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion. Die Fehlregulation des ERK1/2-MAPK-Signalweges trägt zu der Entwicklung verschiedener Krankheiten wie z. B. der Alzheimer-Krankheit oder Krebs bei (Kim & Choi, 2010) und beeinflusst außerdem Alterungsprozesse.

Die Aktivität des ERK1/2-MAPK-Signalweges ist im Alter deutlich herabgesetzt, was die Abnahme der Proliferationsfähigkeit als Antwort auf Mitogene und Wachstumsfaktoren von seneszenten Zellen erklärt. Eine bei Seneszenz verringerte Aktivität dieses Signalweges konnte schon in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden, wie z. B. in gealterten Hepatozyten von Ratten (Hutter et al, 2000; Liu et al, 1996), in Lymphozyten von alten Mäusen (Gorgas et al, 1997) oder in seneszenten humanen Fibroblasten (Kim et al, 2000; Lim et al, 2000; Tresini et al, 2001). Ein Merkmal dieser verringerten Aktivität des ERK1/2-MAPK-Signalweges in seneszenten Zellen ist die über diesen Signalweg verringerte Expression der Zielgene im Zellkern. Ein Beispiel stellt das Protein *c-Fos* dar (Keogh et al, 1996), welches für die Regulation der Zelldifferenzierung und Zellproliferation verantwortlich ist. Ursächlich für diese verringerte Expression ist u. a. die in seneszenten humanen Fibroblasten abgeschwächte Translokation von aktivem phosphoryliertem ERK1/2 in den Zellkern (Bose et al, 2004; Tresini et al, 2001).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

α -Synuclein konnte aufgrund von Mutationen im α -Synuclein-Gen (Appel-Cresswell et al, 2013; Kruger et al, 1998; Lesage et al, 2013; Polymeropoulos et al, 1997; Proukakis et al, 2013; Zarranz et al, 2004), Gen-Multiplikationen (Farrer et al, 2004; Singleton et al, 2003) sowie durch die Aggregation des Proteins (Spillantini et al, 1998b; Spillantini et al, 1997) mit der neurodegenerativen Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht werden. In der altersassoziierten, sporadisch auftretenden Form der Parkinson-Krankheit, die nicht mit Mutationen oder nur selten durch Genmultiplikationen ausgelöst wird (Ahn et al, 2008; Lesage et al, 2013), wurde ebenfalls ein erhöhter α -Synuclein-Spiegel beobachtet (Chiba-Falek et al, 2006; Grundemann et al, 2008).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression von α -Synuclein im Verlauf der zellulären Alterung in einem humanen Fibroblastenmodell (IMR-90-Zellen) untersucht werden. Dazu sollten die α -Synuclein-Spiegel in jungen und seneszenten Zellen mithilfe proteinbiochemischer und molekularbiologischer Methoden miteinander verglichen werden. Da die Aggregation von α -Synuclein eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen spielt, sollte die Löslichkeit des Proteins auch während der zellulären Alterung analysiert werden. Ein weiteres Ziel ist die Entschlüsselung des Signalweges, der für die Expression des Proteins in jungen und seneszenten Zellen verantwortlich ist. Da die Akkumulation von DNA-Schäden zur zellulären Seneszenz führen kann (Best, 2009), sollten DNA-Schäden in jungen Zellen mit verschiedenen Substanzen induziert und ein möglicher Einfluss auf Expression von α -Synuclein untersucht werden. Dabei soll auch die intrazelluläre Lokalisation von α -Synuclein nach DNA-Schädigung in jungen und seneszenten Zellen näher betrachtet werden.

Die Funktion von α -Synuclein ist bislang noch nicht endgültig aufgeklärt und auch die Toxizität des Proteins ist nach wie vor umstritten, da eine erhöhte Expression auch mit einer protektiven Funktion in Verbindung gebracht wird (da Costa et al, 2000; Monti et al, 2007). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand somit darin, durch *Knockdown* und Überexpression von α -Synuclein mögliche Funktionen des Proteins zu entschlüsseln. Durch die Ergebnisse soll ein besseres Verständnis über die Funktion von α -Synuclein in der zellulären Seneszenz erhalten werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die beiden humanen, fötalen Fibroblastenlinien, IMR-90 und WI-38 des *Coriell Institute for Medical Research* (Camden) verwendet. WI-38-Zellen wurden 1962 aus Lungengewebe eines 12 Wochen alten weiblichen Fötus isoliert. IMR-90-Fibroblasten wurden 1975 aus Lungengewebe eines 16 Wochen alten weiblichen Fötus gewonnen (Nichols et al, 1977). Beide Fibroblasten-Linien zeichnen sich durch replikative Seneszenz aus (Hayflick & Moorhead, 1961), was eine definierte Anzahl von Zellteilungen erlaubt, bis die Zellen schließlich in einen irreversiblen Wachstumsarrest übergehen, bei dem sie in der G1-Phase des Zellzyklus verbleiben.

2.1.2 Bakterien-Zellen

Als Bakterien-Zellen wurden in dieser Arbeit kompetente DH-5 α *E. coli*-Zellen (Invitrogen) eingesetzt.

2.1.3 Plasmide, Oligonukleotide (*Primer*), siRNA

Tab. 2-1: Plasmide

Plasmidname	Resistenz	Hersteller
pGFP-N1	Kanamycin	<i>Clontech</i>
p α SynWT-N1	Kanamycin	<i>Generiert aus Grundvektor pGFP-N1 (2.2.3.11)</i>
p α SynWT.GFP-N1	Kanamycin	<i>generiert aus Grundvektor pGFP-N1 (2.2.3.11)</i>

Tab. 2-2: Primer für die PCR unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase

Primer	Sequenz 5'-3'
α -Synuclein_ <i>forward</i>	5'-CGCGGGCCCCGGATCCCCGACGACAGTGTGGTGTAAAGG-3'
α -Synuclein_ <i>reverse</i>	5'-TCTAGAGTCGCGCCCGCGACTGGGCACATTGGAAGTGG-3'
α -SynucleinGFP_ <i>forward</i>	5'-GAAGATCTTCATGGATGTATTCATGAAAGGA-3'
α -SynucleinGFP_ <i>reverse</i>	5'-GGGGTACCCCGGCTTCAGGTTTCGTAGTCT-3'

Tab. 2-3: Primer für quantitative *Real-Time*-PCR-Analysen

Primer	Sequenz 5'-3'
human α -Synuclein_ <i>forward</i>	5'-GACGGGTGTGACAGCAGTAG-3'
human α -Synuclein_ <i>reverse</i>	5'-CCTTCTTCATTCTTGCCCAACT-3'
human γ -Synuclein_ <i>forward</i>	5'-TGAGCAGCGTCAACACTGTG-3'
human γ -Synuclein_ <i>reverse</i>	5'-GAGGTGACCGCGATGTTCTC-3'
human RNA-Polymerase II_ <i>forward</i>	5'-GGGCTCTGCCTCTTAGCTG-3'
human RNA-Polymerase II_ <i>reverse</i>	5'-CATCACCATCCCGACCTACAG-3'
Aktin_ <i>forward</i>	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'
Aktin_ <i>reverse</i>	5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'

Tab. 2-4: Primer für Sequenzierungen

Primer	Sequenz
CMV_ <i>forward</i>	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
sv40 poly A_ <i>reverse</i>	5'-CCTCTACAAATGTGGTATGG-3'

Tab. 2-5: siRNA-Sequenzen

Primer	Sequenz 5'-3'
nonsense	<i>sense</i> AUUCUCCGAACGUGUCACG <i>antisense</i> CGUGACACGUUCGGAGAAU
α -Synuclein	<i>sense</i> GCCACUGGCUUUGUCAAAA <i>antisense</i> UUUUGACAAAGCCAGUGGC

2.1.4 Enzyme

Tab. 2-6: Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittstelle	Hersteller
BamHI	5'-G/GATCC-3'	NEB
NotI	5'-GC/GGCCGC-3'	NEB
KpnI	5'-A/GATCT-3'	NEB
BglII	5'-GGTAC/C-3'	NEB

Tab. 2-7: sonstige Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
<i>Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase</i>	Amplifikation mittels PCR	<i>Finnzymes</i>
<i>T4 DNA-Ligase</i>	Ligation	NEB

2.1.5 Antikörper

Tab. 2-8: Primärantikörper für Western Blot-Analysen (WB) und Immunhistochemie (I)

Antikörper gegen	Spezies	Proteingröße (in kDa)	Verdünnung	Hersteller
Aktin	Kaninchen	42	1:5000 (WB)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Caveolin-1	Maus	α 24/ β 21	1:1000 (WB)	<i>BD transduction Laboratories</i>
ERK1/2	Kaninchen	42/44	1:1000 (WB)	<i>Cell Signaling</i>
GFP	Kaninchen	27	1:1000 (WB)	<i>Clontech</i>
HistonH3 (Di+Tri methyl K4)	Maus	17	1:500 (WB)	<i>Abcam</i>
Hsp70	Maus	70	1:1000 (WB)	<i>Enzo</i>
MEK1/2	Kaninchen	45	1:1000 (WB)	<i>Cell Signaling</i>
MKP-3 (DUSP6)	Kaninchen	42/44	1:500 (WB)	<i>Epitomics</i>
P21	Maus	21	1:500 (WB)	<i>BD Bioscience</i>
p-ERK1/2	Maus	42/44	1:1000 (WB)	<i>Cell Signaling</i>
p-MEK1/2		45	1:1000 (WB)	<i>Cell Signaling</i>
SIRT6	Kaninchen	37	1:1000 (WB)	<i>Abcam</i>
SOD1	Kaninchen	19	1:1000 (WB)	<i>Epitomics</i>
Tubulin- α	Maus	50	1:2000 (WB)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Vimentin (H-84)	Kaninchen	57	1:500 (WB)	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
α -Synuclein	Maus	19	1:200-1:500 (WB)	<i>BD transduction Laboratories</i>
α -Synuclein	Kaninchen	19	1:500 (WB)	<i>Sigma-Aldrich</i>
γ H2A.X	Kaninchen	15	1:1000 (WB) 1:200 (I)	<i>Cell Signaling</i>

Tab. 2-9: Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen und Immunhistochemie

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen	Esel	HRP	1:5000	<i>Jackson Immunoresearch</i>
Anti-Maus	Esel	HRP	1:5000	<i>Jackson Immunoresearch</i>
Anti-Kaninchen-Cy5	Esel	Cy5	1:200	<i>Jackson Immunoresearch</i>

2.1.6 Marker

Tab. 2-10: Protein- und DNA-Größenmarker

	Marker	Hersteller
<i>Protein</i>	<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	<i>Thermo Scientific</i>
<i>DNA</i>	<i>MassRuler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use (103 ng/μl)</i>	<i>Fermentas</i>

2.1.7 Chemikalien und Reagenzienansätze

Tab. 2-11: verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	<i>GIBCO</i>
4-Hydroxynonenal (4-HNE)	<i>Cayman Chemical Company</i>
ABsolute SYBR Green Fluorescein (2x)	<i>Thermo Scientific</i>
Acrylamid 40 % (29:1)/Bisacrylamid (AccuGel)	<i>National Diagnostics</i>
Agarose	<i>SeaKem</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Antibiotika/Antimykotika (100x)	<i>GIBCO</i>
Aphidicolin	<i>Enzo Life Science/Alexis</i>
Bacto Agar	<i>BD</i>
Bacto Peptone	<i>BD</i>
Bacto Tryptone	<i>BD</i>
Bis-Tris	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bromphenolblau	<i>BioRad</i>
DEPC-behandeltes Wasser	<i>Ambion</i>
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	<i>Roche</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,5 % für Molekularbiologie	<i>Sigma-Aldrich</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,5 % zur Synthese	<i>Sigma-Aldrich</i>
Di-Natriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	<i>Roth</i>
DNaseI	<i>Macherey- Nagel</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>GIBCO</i>
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	<i>Roth</i>
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Essigsäure	<i>Merck</i>
Ethanol	<i>Roth</i>
Ethidiumbromid-Lösung (0.07 % "Dropper Bottle")	<i>Sigma-Aldrich</i>
Etoposid	<i>Sigma-Aldrich</i>

Fötale Kälberserum (FCS; engl. <i>fetal calf serum</i>)	<i>Invitrogen</i>
Glycerol	<i>Merck</i>
Glycin	<i>Roth</i>
Hefeextrakt	<i>GIBCO</i>
HEPES	<i>Sigma-Aldrich</i>
IGEPAL® CA-630 (NP-40)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	<i>Millipore</i>
Isopropanol	<i>Roth</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Roth</i>
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	<i>Roth</i>
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	<i>Fluka</i>
Kanamycinsulfat	<i>Roth</i>
Luminol	<i>Sigma-Aldrich</i>
Magermilchpulver	<i>Hill Country Fare, AppliChem</i>
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	<i>Sigma-Aldrich</i>
MEK Inhibitor U0126	<i>Promega</i>
Methanol	<i>Roth</i>
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	<i>Bio-Rad</i>
Natriumacetat (Na-Acetat) x 3 H ₂ O	<i>Merck</i>
Natrium-Azid	<i>Sigma-Aldrich</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Roth</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Roth</i>
Natrium-Pyruvat (100 mM)	<i>GIBCO</i>
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	<i>GIBCO</i>
NuPAGE MES SDS-Laufpuffer (20x)	<i>Invitrogen</i>
Oligo-dT ₁₅ -Primer (10 µM)	<i>Promega</i>
Orange G	<i>AppliChem</i>
Paraformaldehyd (PFA)	<i>Merck</i>
para-Hydroxycumarinsäure	<i>Sigma-Aldrich</i>
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	<i>GIBCO</i>
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	<i>Sigma-Aldrich</i>
Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO, antifading	<i>Fluka</i>
PonceauS	<i>Sigma-Aldrich</i>
Protease-Inhibitor-Cocktail	<i>Sigma-Aldrich</i>
Rinderserumalbumin (BSA; engl. <i>bovine serum albumine</i>)	<i>NEB</i>

RNAse-Inhibitor	<i>Promega</i>
Saccharose	<i>Roth</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Roth</i>
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	<i>Roth</i>
Staurosporin	<i>Sigma-Aldrich</i>
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	<i>Pierce, Thermo Scientific</i>
Sytox Orange (5 mM Lösung in DMSO)	<i>Invitrogen</i>
Tris	<i>Roth</i>
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	<i>Roth</i>
Trypanblau (0,5 % w/v)	<i>Seromed</i>
Tween®20	<i>Roth</i>
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30 % in H ₂ O)	<i>Sigma-Aldrich</i>
B-Mercaptoethanol	<i>Roth</i>

Tab. 2-12: Reagenzienansätze

Name	Verwendung	Hersteller
<i>Jetstar 2.0 Maxi Kit</i>	Aufreinigung von Plasmid-DNA → Maxi-Präparation	<i>Genomed</i>
<i>NucleoBond® Xtra Midi EF</i> <i>Endotoxin-free plasmid DNA purification</i>	Aufreinigung von Plasmid-DNA → Midi-Präparation	<i>Macherey-Nagel</i>
<i>NucleoSpin® Extract II</i> <i>PCR clean-up Gel extraction</i>	Gel-Extraktion	<i>Macherey-Nagel</i>
<i>NucleoSpin® Plasmid</i> <i>Plasmid DNA Purification</i>	Aufreinigung von Plasmid-DNA → Mini-Präparation	<i>Macherey-Nagel</i>
<i>NucleoSpin® RNA II</i> <i>Total RNA Isolation</i>	Extraktion von RNA	<i>Macherey-Nagel</i>
<i>Omniscript® RT-Kit</i>	cDNA-Synthese	<i>Qiagen</i>
<i>Pierce® BCA Protein Assay Kit</i>	Proteinbestimmung	<i>Thermo Scientific</i>
<i>Senescence Cells Histochemical Staining Kit</i>	Färbung von seneszenten Zellen mittels β-Galaktosidase	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>In-Fusion® HD Cloning Kit</i>	Ligation	<i>Clontech</i>

2.1.8 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tab. 2-13: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-Loch-PCR-Platte	<i>StarLab</i>
96-Loch-Platte	<i>TPP</i>
Bakterienröhrchen	<i>Greiner</i>
Deckgläschen (Ø 12 mm)	<i>Fisher Scientific</i>
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 15 ml)	<i>Cellstar® Greiner bio-one</i>
Einmalspritzen (20 ml)	<i>Braun</i>
Einwegskalpell	<i>A. Hartenstein</i>
Gefäßstreifen (12 Gefäße) mit Deckel (0,2 ml)	<i>Thermo Scientific</i>
<i>iCycler IQ Optical Tape</i>	<i>BioRad</i>
Minisart single use Syringe Filters (Ø 0,2 µm)	<i>A. Hartenstein</i>
Objektträger Superfrost Plus Menzel Gläser	<i>Thermo Scientific</i>
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl); <i>TipOne®</i>	<i>StarLab</i>
Pipettenspitzen (wattiert) (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	<i>Greiner bio-one</i>
Reaktionsgefäße mit Deckel (1,5 ml und 2 ml)	<i>A. Hartenstein</i>
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	<i>Greiner bio-one</i>
Spritzen Injekt®-F 0,01 – 1 ml	<i>Braun</i>
<i>Sterican®</i> Einmal-Injektions-Kanülen 25G x 5/8" (0,5 x 16 mm BL/LB)	<i>Braun</i>
<i>Western Blot</i> -Inkubationsbox; <i>Perfec Western™</i>	<i>GenHunter Corporation</i>
Blottingpapier	<i>A. Hartenstein</i>
Whatman Protran Nitrozellulose Transfermembran	<i>A. Hartenstein</i>
Zellkulturschalen	<i>TPP</i>
Zellkulturschalen	<i>Greiner</i>
Zellspatel	<i>TPP</i>

2.1.9 Laborgeräte

Tab. 2-14: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe, <i>Vakusafe comfort</i>	<i>Integra</i>
Agarosegelkammer, <i>Agagel-Mini</i>	<i>Biometra</i>
Bakterienschüttler	<i>Infors</i>
Brutschrank, <i>Queue</i>	<i>Nunc</i>
Brutschränke (Zellkultur)	<i>Binder</i>

Elektroporation, <i>Nucleofector I</i>	<i>Amaxa Biosystems</i>
Fluoreszenz-Mikroskop, Axiophot	<i>Carl Zeiss</i>
Fluoreszenz-Mikroskop, <i>Olympus CKX41</i>	<i>Olympus</i>
Gasbrenner	<i>Bochem</i>
Gefrierschränke (-80 °C)	<i>Thermo Scientific</i>
Heizblock <i>Thermomixer comfort</i>	<i>Eppendorf</i>
iCycler	<i>Bio-Rad</i>
iCycler, <i>Thermal Cycler</i>	<i>Bio-Rad</i>
Kühl- und Gefrierschränke (-20 °C)	<i>Liebherr</i>
LAS-3000 <i>Intelligent Dark Box</i>	<i>Fuji</i>
Laser-Scanning-Mikroskop 710	<i>Carl Zeiss</i>
Magnetrührer	<i>Janke & Kunkel, IKA-Werke</i>
Mikroskop, Wilovert	<i>Hund</i>
Mikrowelle	<i>Progress</i>
Netzgerät (Agarose-Gele)	<i>Biometra</i>
Netzgeräte (SDS-PAGE)	<i>Bio-Rad</i>
pH-Meter; CG 825	<i>Schott</i>
Photometer, <i>Multiscan RC</i>	<i>Thermo Labsystems</i>
Pipettierhilfe, <i>Pipetboy Accu-jet®</i>	<i>Brand</i>
Präzisionswaage, TE 153S	<i>Sartorius</i>
Schallgerät, <i>Micro Ultrasonic Cell Disrupter</i>	<i>Kontes</i>
Schüttler	<i>Janke & Kunkel, IKA-Werke</i>
SDS-PAGE-System, <i>Mini-PROTEAN® 3 Cell</i>	<i>Bio-Rad</i>
SDS-PAGE-System, <i>XCell SureLock™ Mini-Cell</i>	<i>Invitrogen</i>
Sterilbank, <i>Heraafe</i>	<i>Heraeus</i>
Sterilbank, <i>SterilGARD III Advance</i>	<i>The Baker Company</i>
Stickstofftank, <i>Cryosystem 6000</i>	<i>MVE</i>
Thermocycler, T-Gradient	<i>Biometra</i>
Tischzentrifuge, <i>Biofuge 13</i>	<i>Heraeus</i>
Tischzentrifuge, <i>Centrifuge 5415D</i>	<i>Eppendorf</i>
Tischzentrifuge; <i>Micro Centrifuge</i>	<i>Roth</i>
UV/VIS Spectrophotometer DU 800	<i>Beckman-Coulter</i>
UV-Tisch	<i>Intas</i>
UV-Tisch, <i>Fluorescent Table (312 nm)</i>	<i>Renner</i>
Vortexer, Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries</i>

Waage, BL6100	<i>Sartorius</i>
Waage, PL1200	<i>Mettler</i>
Wasserbad	<i>PD Industriegesellschaft</i>
Western Blot System, <i>Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell</i>	<i>Bio-Rad</i>
Zählkammer Neubauer- <i>Improved</i>	<i>Optik Labor</i>
Zentrifuge (96-Loch-Platte), <i>PerfectSpin P</i>	<i>Peqlab</i>
Zentrifuge, <i>Micro 200R</i>	<i>Hettich</i>
Zentrifuge, <i>Multifuge 3 S-R</i>	<i>Heraeus</i>

2.1.10 EDV-Programme

Tab. 2-15: Liste der in dieser Arbeit verwendeten EDV-Programme

EDV-Programm	Verwendung
<i>AIDA Image Analyzer v.4.26</i>	Densitometrische Auswertung
<i>Ascent Software Version 2.6</i>	Proteinbestimmung
<i>Clone manager</i>	<i>Primer-Design</i>
<i>CorelDRAW X6</i>	Bildbearbeitung
<i>iCycler iQ Multi-Color Real-Time-PCR Detection System Version 3.1</i>	Quantitative PCR
<i>Image J v. 1.4.6</i>	Bildbearbeitung
<i>Image Reader LAS-3000 Version 2.2</i>	Proteindetektion
<i>Intas 1.51</i>	Dokumentation Agarosegele
<i>Photoshop CS5</i>	Bildbearbeitung
<i>SigmaStat Version 3.5</i>	Statistische Auswertung
<i>SPOT 4.0.9</i>	Bild-Dokumentation
<i>ZEN 2011 SP2 (black edition) Version 8.0</i>	Aufnahmen Laser-Scanning-Mikroskop

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von IMR-90- und WI38-Zellen

Die Kultivierung der IMR-90- und WI-38-Fibroblasten erfolgte in phenolrothaltigem DMEM, versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Antibiotika/Antimykotika, 1 mM Natrium-Pyruvat und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (s. u.), in einem Brutschrank bei 37 °C unter Wasserdampf-gesättigter CO₂-Atmosphäre von 5 %.

Nach Entnahme der Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort in 10 ml 37 °C warmes Zellkulturmedium überführt. Um das DMSO (Tab. 2-11) zu entfernen, wurden die Zellen bei Raumtemperatur durch vierminütige Zentrifugation bei 1200 rpm (engl. *rounds per minute*; Runden pro Minute) pelletiert und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Bevor die Zellen auf die Kulturschalen ausgesät wurden, erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl (s. u.). Am folgenden Tag wurde standardmäßig das Zellkulturmedium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Bevor die Zellen für ein Experiment ausgesät wurden, wurden diese mindestens ein weiteres Mal passagiert.

Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde das Zellkulturmedium an jedem dritten Tag erneuert. Erreichten die Zellen eine Konfluenz zwischen 80 und 90 % wurden diese zur Verdünnung auf neue Zellkulturschalen überführt. Die Zellen wurden dafür einmal mit 1x PBS (GIBCO) gewaschen und durch fünfminütige Inkubation mit 3x Trypsin (siehe Tab. 2-11), verdünnt in 1x PBS, bei 37 °C im Brutschrank von den Zellkulturschalen abgelöst. Das Volumen des 3x Trypsins wurde dabei dem Durchmesser der Zellkulturschale angepasst. Durch die Aufnahme der Zellen in fünffachem Volumen des Zellkulturmediums wurde die Trypsin-Reaktion abgestoppt und die Zellen von der Schale gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen, wie oben beschrieben, zentrifugiert und resuspendiert. Vor der Aussaat auf neue Zellkulturschalen wurden die Zellen gezählt, um die gewünschte Zellzahl für die durchzuführenden Experimente zu bestimmen sowie die Populationsverdopplung (das Alter der Zellen) zu ermitteln. Dafür wurden die resuspendierten Zellen in einer Verdünnung von 1:2 mit Trypanblau (siehe Tab. 2-11) vermischt und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Trypanblau diente dabei der Visualisierung von toten Zellen, die den Farbstoff aufnehmen und somit bei der Zählung vernachlässigt werden können. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gezählte Lebendzellzahl} / 4_{(\text{Anzahl der Großquadrate})} \times 2_{(\text{Verdünnungsfaktor})} \times 10000_{(\text{Kammerfaktor})} \times \text{Volumen Zellkulturmedium} = \text{Gesamtzellzahl der Schale.}$$

Die Populationsverdopplung (PDL) wurde schließlich mit folgender Formel ermittelt:

$$(\log_{10}(\text{Gesamtzellzahl nach Zellernte}) - \log_{10}(\text{Anzahl ausgesäter Zellen})) / \log_{10} 2$$

Zellkulturmedium

phenolrot-haltiges DMEM (4,5 mg/ml Glukose)	500 ml
fötale Kälberserum (aktiv)	10 %
Antibiotika/Antimykotika (100x)	1 %
Natrium-Pyruvat (100 mM)	1 mM
nicht-essentielle Aminosäure (100x)	1 %

2.2.1.2 Herstellung von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Zur langfristigen Aufbewahrung von Zellen können diese in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Die Zellen wurden dafür wie unter 2.2.1.1 beschrieben von den Zellkulturschalen abgelöst und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Zellkulturmedium (siehe 2.2.1.1) resuspendiert und mit 10 % DMSO (Tab. 2-11) versetzt. Das DMSO verhindert hierbei die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses, welche die Zellen zerstören könnten. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen zunächst über Nacht in einer mit Isopropanol versehenen Einfrierbox langsam auf -80 °C abgekühlt und für die dauerhafte Konservierung schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren.

2.2.1.3 Behandlung der Zellen

Für eine Behandlung wurden die Zellen 24 Stunden (h) vorher auf entsprechende Zellkulturschalen ausgesät. Die jeweilige Substanz wurde in der gewünschten Konzentration in Zellkulturmedium (siehe 2.2.1.1) verdünnt und auf die Zellen gegeben. Bei mehrtägiger Behandlung wurde das Behandlungsmedium alle 24 h erneuert.

2.2.1.4 Transfektion von Zellen mittels Elektroporation

Die Transfektion bezeichnet die Übertragung von DNA in eukaryotische Zellen. Mithilfe der Elektroporation werden Zellmembranen durch Anlegen eines elektrischen Feldes kurzzeitig permeabilisiert, so dass die Zelle die DNA oder siRNA aufnehmen kann. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1 beschrieben passagiert und die für die Transfektion benötigte Zellzahl ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen von der Schale abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert (siehe 2.2.1.1). Das Pellet wurde pro Transfektion in einem Volumen von 450 µl des Elektroporationspuffers (s. u.) resuspendiert. 400 µl der Zellsuspension wurden schließlich mit Plasmid-DNA bzw. siRNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette (Sigma-Aldrich) mit einer Spaltbreite von 0,4 cm überführt. Die Elektroporation fand in dem *Nucleofector 1* (Amaxa) mit dem Programm U 24 statt. Anschließend wurden die Zellen in der Elektroporationsküvette für acht Minuten bei RT inkubiert, dann in Zellkulturmedium überführt und auf Zellkulturschalen ausgesät. Um tote Zellen aus dem Zellkulturmedium zu entfernen, wurde standardmäßig 24 h nach der Transfektion ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt.

Überexpressions-Experimente wurden mit 60 µg Plasmid-DNA durchgeführt. Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 2-1 aufgelistet. Für *Knockdown*-Experimente wurden 20 µg siRNA (Eurofins MWG Operon) eingesetzt. Die Sequenzen sind in Tab. 2-5 aufgeführt.

Elektroporationspuffer

KCl	135 mM
HEPES	10 mM
EDTA	5 mM
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	0,2 mM
FCS	25 %

→ ad ddH₂O

→ Puffer sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße)

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Proteingesamtlysate mit SDS-haltigem Puffer

Die Zellen wurden zunächst einmal mit eiskaltem 1x PBS (GIBCO) gewaschen, bevor die Zelllyse mit einem 1x SDS-Lysepuffer (s. u.) erfolgte. Innerhalb eines Versuches wurde das Volumen des SDS-Lysepuffers der Zelldichte, die vor Beginn der Zelllyse unter dem Mikroskop optisch bestimmt wurde, angepasst, um Schwankungen in den Proteinkonzentrationen der Gesamtlysate zu vermeiden. Der SDS-haltige Puffer zerstört sowohl die Zellmembran als auch die Membran des Zellkerns, so dass ein Gemisch aus allen Zellproteinen vorliegt. Nach einer Inkubation von wenigen Minuten wurden die Zellen mit einem Spatel von den Zellkulturschalen gekratzt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Bis hierhin erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis. Um den Aufschluss der Zellen noch zu verbessern, wurde das Lysat für zirka zehn Sekunden mit dem Schallgerät *Micro Ultrasonic Cell Disrupter* sonifiziert und schließlich in dem Heizblock *Thermomixer comfort* (Eppendorf) bei 99 °C unter Schütteln mit 950 rpm aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese zur Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.2.4) eingesetzt oder bei -80 °C aufbewahrt.

1x SDS-Lysepuffer

Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM
EDTA	1 mM
SDS	2 %
Saccharose	10 %

→ Protease-Inhibitor-Cocktail 1:100 und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1:100

2.2.2.2 Fraktionierung mit NP-40-Puffer

Um Zellproteine in lösliche und unlösliche Bestandteile zu unterteilen, erfolgte die Zellyse mit einem milden Puffer. Dieser enthält das Detergenz Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma-Aldrich), welches nicht-denaturierende Eigenschaften besitzt und in der eingesetzten Konzentration von 0,5 % die Zellkernmembran intakt lässt. Bei dieser Methode fanden ebenfalls alle Arbeiten auf Eis statt. Die Zellen wurden zunächst einmal mit kaltem 1x PBS (GIBCO) gewaschen und für 20 min mit dem NP-40-Puffer auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Spatel von der Zellkulturschale gekratzt und nach Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 18600 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthält, wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet mit der nukleären Fraktion wurde noch dreimal mit NP-40-Puffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für 3 min bei 18600 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben in dem 1x SDS-Lysispuffer resuspendiert, sonifiziert und aufgeköcht. Die Proben wurden anschließend einer Bestimmung der Proteinkonzentration unterzogen (siehe 2.2.2.4) oder zur Aufbewahrung bei -80 °C gelagert.

NP-40-Puffer

Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
EGTA	1 mM
NP-40	0,5 %

→ Puffer sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße)

→ Protease-Inhibitor-Cocktail 1:100, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1:100

2.2.2.3 Kernfraktionierung mit Tris-Puffer

Zur Unterteilung der Zellproteine in eine Kern- und eine Zytoplasmafraktion wurde ebenfalls ein milder Kernfraktionierungs-Puffer (s. u.) verwendet, mit welchem die Zellkernmembran zunächst intakt bleibt. Alle Arbeiten fanden durchgehend auf Eis statt. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben gewaschen und von den Zellkulturschalen gekratzt, wobei hier die Zellyse mit dem Kernfraktionierungspuffer durchgeführt wurde. Das Zellysate in dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde zehnmal mithilfe einer 25-Gauge-Kanüle durch eine Spritze gezogen, bevor das Lysat für 20 min bei 700 g und 4 °C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand, der die zytoplasmatische Fraktion enthält, in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet, welches die Kernfraktion darstellt, wurde mit 500 µl des Kernfraktionierungs-Puffers gewaschen und erneut zehnmal durch die

Spritze gezogen. Beide Fraktionen wurden ein weiteres Mal für zehn Minuten bei 700 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zytoplasma-Fraktion wurde wiederum in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Bei der Kernfraktion wurde der Waschpuffer abgezogen und das Pellet wie unter 2.2.2.1 beschrieben mit dem 1x SDS-Lysepuffer resuspendiert, sonifiziert und aufgeköcht. Die Proben wurden anschließend einer Bestimmung der Proteinkonzentration unterzogen (siehe 2.2.2.4) oder zur Aufbewahrung bei -80 °C gelagert.

Kernfraktionierungs-Puffer pH7,3

Tris 50 mM

HEPES 15 mM

Saccharose 10 %

→ Puffer sterilfiltriert

→ Protease-Inhibitor-Cocktail 1:100 und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1:100

2.2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *Pierce® BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) verwendet. Das Prinzip des hier eingesetzten Systems basiert auf dem Farbumschlag von chelatisierter Bicinchoninsäure (BCA, engl. *bicinchoninic acid*) (Smith et al, 1985), der für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Probe herangezogen wird. Für diese Reaktion werden in alkalischer Lösung zunächst Cu^{2+} -Ionen durch Bindung an Proteine (Biuret-Reaktion) komplexiert und zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Durch die anschließende Chelatbildung von zwei BCA-Molekülen mit einem Cu^{1+} -Ion kommt es zu einer violetten Färbung der Lösung, deren Intensität photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden kann.

Ausgehend von einem BSA-Standard mit 1 mg/ml wurde eine BSA-Standardreihe mit Proteinkonzentrationen von 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml in einem Volumen von 50 µl angesetzt. Für den Nullabgleich wurden 50 µl ddH₂O eingesetzt. Von den zu bestimmenden Proteinproben wurden jeweils 2 µl in 50 µl ddH₂O verdünnt. Alle Proben wurden schließlich mit 1 ml BCA-Reagenz (Reagenz A:Reagenz B = 50:1) gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 60 °C bei 550 rpm in dem Heizblock *Thermomix comfort* (Eppendorf) erfolgte eine Abkühlung der Proben auf Eis. 100 µl jeder Probe wurden schließlich in eine 96-Loch-Platte überführt und die Extinktion der Probe bei 562 nm mit dem Photometer *Multiscan RC* von Thermo Labsystem bestimmt. Durch den Abgleich mit der Eichkurve der BSA-Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

2.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mithilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Für die Gelelektrophorese wurden zum einen kommerzielle Gele des NuPAGE® Bis-Tris-Systems (Life Technologies) eingesetzt. Zum anderen wurden Gele mit einem Bis-Tris-Puffer (s. u.) mit dem *Mini-PROTEAN® 3 Cell System* von Bio-Rad selbst hergestellt. Die verwendeten Gele besaßen eine Schichtdicke von 1 mm und einen Acrylamidanteil von 10 oder 12 % im Trenngel und 4 % im Sammelgel (siehe Tab. 2-16). Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma-Aldrich) dient dabei der Induktion der Polymerisationsreaktion. Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Bio-Rad) stellt einen Katalysator für die Polymerisationsreaktion dar.

Bis-Tris-Puffer

Bis-Tris 1,25 M

Ad ddH₂O

→ pH 6,6 - 6,7

→ Puffer sterilfiltriert

Tab. 2-16: Pipettierschema Bis-Tris-Gele

	ddH ₂ O	Bis-Tris Puffer	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	APS (10 %)	TEMED
Sammelgel (1-2 Gele)	3,22 ml	1,5 ml	0,525 ml	31 µl	15 µl
Trenngel 10 % (1 Gel)	2,43 ml	1,5 ml	1,32 ml	37 µl	10 µl
Trenngel 12 % (1 Gel)	2,17 ml	1,5 ml	1,58 ml	37 µl	10 µl

Zur Herstellung der Gele wurde zunächst der Trenngelpuffer nach Zugabe von APS und TEMED sofort zwischen die zwei Glasplatten, die durch einen Abstandshalter von 1 mm voneinander getrennt sind, gegossen und mit 100 %igem Isopropanol (Roth) überschichtet. Das Isopropanol sorgt für die Glättung der Trenngeloberfläche, sowie für die Abschirmung des angrenzenden Sauerstoffs von der Geloberfläche. Nach der Polymerisierung des Gels wurde das Isopropanol entfernt und sorgfältig mit dH₂O gespült. Der Sammelgelpuffer wurde ebenfalls mit APS und TEMED vermischt, auf das Trenngel geschichtet und mit einem Kamm versehen. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Gel entweder sofort verwendet oder für maximal vier Tage in einem mit dH₂O getränkten Tuch bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Vorbereitung der Proben wurde die gewünschte Menge Protein in einem Gesamtvolumen zwischen 12 und 25 µl angesetzt. Die Proteinproben wurden mit 1x SDS-Lysepuffer (siehe 2.2.2.1) auf jeweils das gleiche Volumen aufgefüllt und mit einem Ladepuffer (s. u.) versehen. Daraufhin wurden

die Proben für drei Minuten bei 99 °C in dem Heizblock *Thermomixer comfort* (Eppendorf) unter Schütteln bei 950 rpm aufgekocht und schließlich auf Eis abgekühlt. Das Aufkochen der Proben denaturiert die Proteine und löst deren Sekundär- sowie Tertiärstruktur auf. Durch das im Lysepuffer enthaltene SDS, welches in einem Verhältnis von zirka 1,4 g SDS/Gramm Protein an das denaturierte Protein bindet, wird die Eigenladung der Proteine aufgehoben. Das dem Ladepuffer zugesetzte β -Mercaptoethanol spaltet zusätzlich noch die Disulfidbrücken-Bindungen auf, so dass die Proteine für die elektrophoretische Auftrennung linearisiert vorliegen und alle eine negative Gesamtladung aufweisen. Die Proben wurden nach Abkühlen auf Eis auf das Gel aufgetragen. Durch das Glycerol, welches im Ladepuffer enthalten ist, wird die Probe beschwert, was das Absinken der Probe in die Geltasche erleichtert. Das Bromphenolblau dient der Visualisierung der Proben, wodurch die Lauffront während des Gellaufs verfolgt werden kann. Zunächst wurde für zirka fünf Minuten eine Spannung von 80 Volt (V) angelegt, bis die Proben das Sammelgel vollständig passiert hatten und in das Trenngel eingelaufen waren. Dies war an der beginnenden Auftrennung des Größenmarkers zu erkennen. Die Spannung wurde dann auf 130 bis 160 V erhöht. Für den Gellauf wurde der NuPAGE MES SDS-Laufpuffer (Invitrogen) verwendet. Das Bis-Tris-System zusammen mit dem eingesetzten Laufpuffer erlaubt dabei eine besonders scharfe Auftrennung von Proteinen im kleinen bis mittelgroßen kDa-Bereich. Der Gellauf der selbst hergestellten Gele fand in den Kammern des *Mini-PROTEAN® 3 Cell Systems* von Bio-Rad statt, für die NuPAGE-Gele wurden die Kammern des *XCell SureLock™ Mini-Cell* Elektrophoresesystems (Invitrogen) verwendet.

4x SDS-Ladepuffer

Tris, pH 6,8	250 mM
Glycerol	40 %
β -Mercaptoethanol	20 %
SDS	8 %
Bromphenolblau	0,04 %

5x SDS-Ladepuffer

Tris, pH 6,8	500 mM
Glycerol	50 %
β -Mercaptoethanol	25 %
SDS	8 %
Bromphenolblau	0,04 %

2.2.2.6 Western Blot

Nach dem Gellauf erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Whatman Protran Nitrozellulose-Membran (A. Hartenstein) mittels Western Blot. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Tank-Blot-Methode für den Proteinübertrag angewandt und dafür das *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell*-System von Bio-Rad eingesetzt. Die Komponenten für den Blotaufbau wurden in einer Blotkassette in folgender Reihenfolge luftblasenfrei aufeinandergeschichtet: ein Schwamm, ein Filterpapier, eine Nitrozellulose-Membran, das Gel, ein Filterpapier, ein Schwamm. Alle Komponenten wurden vor dem Aufbau kurz in Transferpuffer (s. u.) getränkt. Die fest

zusammengedrückte Blotkassette wurde schließlich in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingesetzt, so dass die Nitrocellulose-Membran auf der Seite der Anode positioniert war. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes wurden somit die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode gezogen und auf die Membran transferiert. Der Transfer verlief entweder mit einer Spannung von 100 V für eine h bei 4 °C, bei 60 bis 65 V für 3 bis 5 h bei RT oder bei 30 oder 45 V über Nacht bei RT. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran zunächst für zirka eine Minute bei Raumtemperatur mit einer Ponceau S-Lösung (s. u.) reversibel angefärbt, um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Mit Ponceau S können Proteinmengen ab 50 ng pro Bande nachgewiesen werden. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 1x PBS-T (s. u.) gewaschen und für mindestens 20 min unter sachtem Schütteln bei Raumtemperatur mit einem Blockierungspuffer (5 % Milchpulver gelöst in 1x PBS-T) blockiert, um unspezifische Bindungen auf der Membran abzudecken.

1x Transferpuffer

Glycin	250 mM
Tris	25 mM
Methanol	20 %

Ponceau S-Färbelösung

Ponceau S	0,025 %
Essigsäure	1 %

1x PBS-T

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
Tween20	0,05 %

2.2.2.7 Immunologische Proteindetektion

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurde die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper (Tab. 2-8) gegen das gewünschte Protein unter sachtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Alle Antikörper wurden in 1x PBS-T (siehe 2.2.2.6) verdünnt und mit 0,02 % Natrium-Azid (Sigma-Aldrich) versetzt. Zur mehrmaligen Verwendung wurden diese bei 4 °C aufbewahrt. Nach Entfernen des primären Antikörpers wurde die Membran für 20 min mit 1x PBS-T gewaschen, wobei der Puffer dreimal ausgetauscht wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden

HRP-gekoppelten (engl. *horseradish peroxidase*; Meerrettichperoxidase) Sekundärantikörper (Tab. 2-9) für 90 min bei RT. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit 1x PBS-T gewaschen. Für den Nachweis der Proteine wurde die Membran mit ein bis zwei ml einer ECL (engl. *enhanced chemiluminescence*; verstärkte Chemilumineszenz)-Lösung benetzt. Abhängig von der Stärke des zu detektierenden Signals wurden unterschiedliche ECL-Lösungen verwendet. Die Detektion von Proteinen mit schwachen Signalen erfolgte mit der *Immobilon Western*-Lösung (Millipore). Proteine mit starken Signalen wurden entweder mit der *SuperSignal West Pico ECL*-Lösung (Pierce, Thermo Scientific) oder mit einer selbst hergestellten ECL-Lösung (s. u.) detektiert. Diese ist aus 1 ml der Lösung A, 100 µl der Lösung B und 1 µl einer 30 %igen H₂O₂-Lösung zusammengesetzt. Die gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert dabei die Oxidation des Chemilumineszenzsubstrats (z. B. Luminol) durch H₂O₂. Das dabei entstehende Signal wurde in der Entwicklermaschine Las-3000 *Intelligent Dark Box* (Fuji) detektiert und mithilfe einer Kamera dokumentiert. Nach erneuter 20-minütiger Blockierung der Membran in Blockierungspuffer (siehe 2.2.2.6) wurde ein weiterer Antikörper mit der Membran inkubiert.

ECL-Entwicklerlösung

Lösung A	Luminol	0,025 %
	Tris-HCl (pH 8,6)	0,1 M
Lösung B	para-Hydroxycumarinsäure	0,11 %
	DMSO	
Lösung C	H ₂ O ₂ (30 %ig)	

2.2.2.8 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Für die densitometrische Auswertung der Western Blots wurden die Bandenintensitäten mit dem Programm *AIDA Image Analyzer* bestimmt. Alle Banden wurden zweidimensional densitometrisch vermessen und anschließend die Signalstärke unter Abzug des Hintergrundes ermittelt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Extraktion aus Fibroblastenzellen

Die Isolation von RNA aus Fibroblastenzellen wurde nach Angaben des Herstellers, wie unter 5.1 des Benutzerhandbuches beschrieben, mit dem *NucleoSpin® RNA II-Kit* von Macherey-Nagel durchgeführt. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit eiskaltem 1x PBS (GIBCO) mit dem im Protokoll angegebenen Lysepuffer auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Spatel von den Schalen

gekratzt. Außerdem wurde die Elution der RNA mit 70 °C warmem ddH₂O durchgeführt. Die RNA-Proben wurden bis zur Aufbewahrung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*) können spezifische DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden. Dieser Abschnitt wird dafür am Anfang und am Ende von zwei kurzen *Primern* (*Forward-Primer* und *Reverse-Primer*) flankiert. Unter Verwendung einer DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden ausgehend von den an die DNA-Einzelstränge gebundenen *Primer* jeweils komplementäre Stränge synthetisiert und durch mehrere Zyklen dieser Reaktion die gewünschte Sequenz exponentiell vervielfältigt (Mullis et al, 1986). In dieser Arbeit wurde die Vervielfältigung der α -Synuclein-Sequenz mit der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) durchgeführt. Dieses Enzym besitzt neben seiner 5'-3'-Polymerase-Aktivität eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und eignet sich somit aufgrund geringer Fehlerraten für die Amplifikation von DNA-Sequenzen, die nachfolgend bei einer Klonierung eingesetzt werden sollen. Die Sequenzen der für die PCR verwendeten *Primer* sind in Tab. 2-2 aufgeführt.

Für eine PCR-Reaktion wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

Matrizen-DNA (Menge je nach Konzentration der eingesetzten DNA bestimmt)

1 μ l	dNTPs (10 mM)
0,5 μ l	<i>forward-Primer</i> (100 μ M)
0,5 μ l	<i>reverse-Primer</i> (100 μ M)
1,5 μ l	DMSO
0,5 μ l	Phusion DNA-Polymerase (2 U/ μ l)
10 μ l	Phusion HF-Puffer (5x)
ad 50 μ l ddH ₂ O	

Die PCR erfolgte in einem *Thermocycler* der Firma Bio-Rad (München) mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung		2 min	98 °C	
Amplifikation	Denaturierung	20 sec	98 °C	35 Zyklen
	<i>Primer</i> -Anlagerung	30 sec	60 °C	
	Elongation	20 sec	72 °C	
Denaturierung		7 min	72 °C	
Abkühlung		∞	4 °C	

Im Anschluss an die PCR wurde das jeweilige Amplifikat auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.9) und die entsprechenden Banden aus dem Gel extrahiert (2.2.3.10).

2.2.3.3 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription

Die Reverse Transkriptase-PCR beschreibt die Synthese von spezifischen cDNA-Sequenzen anhand einer RNA-Matrize. Diese Reaktion wird mithilfe der reversen Transkriptase, auch RNA-abhängige DNA-Polymerase genannt, katalysiert (Spiegelman et al, 1971). Die reverse Transkription wurde mit dem *Omniscript® RT-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Alle Arbeiten fanden auf Eis statt. Für eine Reaktion wurden 1 µg der zuvor extrahierten RNA eingesetzt und jede Probe mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der RNA wurden die Proben zunächst für fünf Minuten bei 65 °C in einem Thermocycler (Biometra) erwärmt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Zu jeder Probe wurden 10 µl des Mastermixes (s. u.) zugegeben.

	Mastermix	Finale Konzentration
2 µl	10x RT-Puffer	1x
2 µl	dNTPs-Mix (5 mM pro dNTP)	0,5 mM pro dNTP
2 µl	Oligo-dT ₁₅ -Primer (10 µM)	1 µM
1 µl	Omniscript Reverse Transkriptase	4 U
0,25 µl	RNase-Inhibitor	10 U
2,75 µl	ddH ₂ O	

Zur Synthese der cDNA wurden die Proben für eine Stunde bei 37 °C in einem Thermocycler von Bio-Rad (München) inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die entstandene cDNA wurde sofort für eine quantitative *Real-Time*-PCR (siehe 2.2.3.4) eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4 Quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR)

Die quantitative *Real-Time*-PCR ermöglicht nach dem Prinzip einer herkömmlichen PCR die Quantifizierung der Expression bestimmter Gene auf Transkriptionsebene. Die Methode beruht dabei auf der Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* in doppelsträngige DNA, wobei das Fluoreszenzsignal nach jedem durchlaufenen Zyklus proportional zur Menge der gebildeten Amplifikate ansteigt. Die Quantifizierung ist nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich, deren Beginn durch den *Ct*-Wert (*Cycle threshold*) gekennzeichnet ist. Dieser beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz der entstandenen PCR-Produkte erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der PCR-Produkte überprüft. Die

Schmelzkurve ergibt sich durch die im Anschluss an die Amplifikation erfolgende schrittweise Temperaturerhöhung, wobei die DNA-Doppelstränge aufgetrennt werden und somit eine Veränderung des Fluoreszenzsignals messbar ist. Als Quantifizierungs-Reagenz wurde hier das *ABsolute SYBR Green Fluorescein* (Thermo Scientific) verwendet. Für eine qPCR-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl folgende Komponenten zu der zu untersuchenden cDNA zugegeben:

1 µl	cDNA bzw. ddH ₂ O (für Negativkontrolle)
12,5 µl	Absolute SYBR Green Fluorescein (2x)
0,5 µl	<i>Forward-Primer</i> (100 pmol/µl)
0,5 µl	<i>Reverse-Primer</i> (100 pmol/µl)
10,5 µl	ddH ₂ O

In der vorliegenden Arbeit wurde eine qPCR für die Untersuchung der Genexpression von α -Synuclein und γ -Synuclein durchgeführt. Als Referenzgene diente die RNA-Polymerase II und Aktin. Die Sequenzen der verwendeten *Primer* sind in Tab. 2-3 angegeben. Die Proben wurden in eine für qPCR vorgesehene 96-Loch-Platte (StarLab) gegeben und mit einer Klebefolie (BioRad) versiegelt. Die qPCR wurde mit dem *iCycler* der Firma Bio-Rad mit dem nachstehenden Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung		15 min	95 °C	
Amplifikation	Denaturierung <i>Primer-Anlagerung</i> Elongation	15 sec 15 sec 20 sec	95 °C 60 °C 72 °C	35 Zyklen
Denaturierung		1 min	95 °C	
Abkühlung		1 min	70 °C	
Schmelzkurve		30 sec	50 °C → Anstieg der Temperatur um 0,5 °C pro Zyklus	90 Zyklen

Die Messung jeder cDNA erfolgte im Triplikat. Zur Überprüfung der *Primer*-Spezifität wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die keine cDNA enthielt. Hier wurde anstelle der cDNA 1 µl ddH₂O eingesetzt.

Die gemessenen *Ct*-Werte wurden im Anschluss mithilfe des Auswertungsprogramms REST (engl. *relative expression software tools*) (Pfaffl et al, 2002) analysiert und die relative Expression der Gene errechnet.

2.2.3.5 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Mithilfe des Restriktionsverdau wird die DNA an bestimmten Sequenzen aufgetrennt. Die dafür verwendeten Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und an jeweils definierten Stellen spalten. Für eine Klonierung wird die DNA mit zwei Enzymen geschnitten, die unterschiedliche Erkennungssequenzen besitzen, um so eine gerichtete Klonierung zu gewährleisten. In dieser Arbeit wurden die DNA-Spaltung mit den Enzymen BamHI und NotI oder KpnI und BglII durchgeführt und erfolgten in folgenden Ansätzen über Nacht bei 37 °C:

4 µg (4 µl)	pGFP-N1	15 µl α-Syn-Amplifikat oder 10 µg (4,2 µl) pGFP-N1
2 µl	BamHI	3 µl KpnI
2 µl	NotI	3 µl BglII
1 µl	BSA (100x)	5 µl BSA (10x)
10 µl	NEB-Puffer 3	5 µl NEB-Puffer 2
ad 100 µl ddH ₂ O		ad 50 µl ddH ₂ O

Um einen vollständigen Restriktionsverdau zu garantieren, wurde nach der Inkubation über Nacht nochmals 1 µl von jedem verwendeten Enzym zu dem Ansatz dazugegeben und dieser für weitere ein bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der linearisierte Vektor auf einem präparativen Agarosegel (siehe 2.2.3.9) aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und für die Klonierung eingesetzt. Für Test-DNA-Spaltungen wurden 2 µl der Plasmid-DNA mit den entsprechenden Enzymen in einem Gesamtvolumen von 10 oder 50 µl für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.3.6 Ligation

Die Ligation beschreibt die durch ein Enzym katalysierte Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Ligationsschritte wurden in dieser Arbeit zum einen mit dem *In-Fusion® HD Cloning* Kit von Clontech und zum anderen mit der T4 DNA-Ligase von NEB nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bei der Verwendung des *In-Fusion® HD Cloning* Kit wurde der Ligationsansatz abweichend zum Herstellerprotokoll in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 15 min bei 37 °C, anschließend für 15 min bei 50 °C und dann bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C inkubiert.

Für die Ligation mit der T4 DNA-Ligase wurden der linearisierte Vektor und die Integrat-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. In einem Volumen von 20 µl wurden die entsprechende Menge des Vektors (40 ng) und der Integrat-DNA (11 ng) mit 1 µl der T4 DNA-Ligase und 2 µl des 10x T4-Puffers gemischt und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.3.7 Transformation von Bakterienzellen mittels Hitzeschock

Die Transformation bezeichnet die Übertragung von fremder DNA in Bakterienzellen. Zur Vervielfältigung eines Plasmids erfolgte die Transformation von chemisch kompetenten DH-5 α *E. coli*-Zellen (Invitrogen). Pro Transformationsansatz wurden 50 μ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit der gewünschten Plasmid-DNA vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock der Zellen, indem diese für 90 Sekunden bei 42 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 450 μ l LB-Medium (s. u.) erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C unter Schütteln bei 1400 rpm in dem Heizblock *Thermomixer comfort* (Eppendorf). Schließlich wurden 100 μ l des Transformationsansatzes auf eine mit Kanamycin (50 μ g/ml) versehene LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium

Bacto-Trypton	1 %
Bacto Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %

→ das Medium wurde für 30 min bei 120 °C autoklaviert und anschließend bei 4 °C gelagert

LB-Agar

Bacto-Trypton	1 %
Bacto Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %
Agar	1,5 %

2.2.3.8 Plasmidpräparation

Um die gewünschte Plasmid-DNA zu vermehren, wurde jeweils ein Klon aus der vorangegangenen Transformation in LB-Medium (siehe 2.2.3.7), versetzt mit 30 μ g/ml Kanamycin, überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Um nach einer Klonierung Klone auf die Aufnahme des richtigen Konstruktes zu überprüfen, wurden Minikulturen in einem Volumen von 5 ml LB-Medium hergestellt. Für die Kultivierung wurden Röhrchen der Firma Greiner verwendet. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem *NucleoSpin® Plasmid* Kit von Macherey-Nagel. Nach Überprüfung des Plasmids mittels Restriktionsverdau wurden 50 μ l der Minikultur in einem Ansatz von 100 ml LB-Medium, versetzt mit 30 μ g/ml Kanamycin, vermehrt. Für die Plasmidpräparation wurde entweder das *Jetstar 2.0 Maxi*-Kit von Genomed oder das *NucleoBond® Xtra Midi EF*-Kit von Macherey-Nagel eingesetzt.

2.2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA kann aufgrund ihrer negativen Eigenladung mithilfe von Agarosegelen der Molekülgröße nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Prozentigkeit des Agarosegels, und damit die Porengröße der Gelmatrix, bestimmt dabei die Wanderungsentfernung der DNA-Moleküle vom Startpunkt. Zur Auftrennung der DNA wurden 1 %ige Agarosegele hergestellt. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer (s. u.) durch Aufkochen gelöst. Pro Gel wurden 25 ml der Agarose-Lösung mit einem Tropfen einer Ethidiumbromid-Lösung (*Dropper Bottle*, Sigma-Aldrich) versetzt und in die Gelapparatur *Agagel-Mini* von Biometra gegossen. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und dient bei Anregung mit UV-Licht zur Visualisierung der DNA-Banden im Gel. In die noch flüssige Agarose wurde ein Kamm für die gewünschte Taschenanzahl gesteckt. Nach der Aushärtung des Gels bei 4 °C wurde dieses mit den DNA-Proben, denen 6x Orange G-Ladepuffer (s. u.) zugesetzt wurde, beladen. Als Größenmarker wurde der *MassRuler™ DNA Ladder* von Fermentas eingesetzt. Der Gellauf erfolgte für 30 bis 45 min bei einer Spannung von 50 mA und fand bei RT statt. Auf einem UV-Tisch wurde bei einer Wellenlänge von 312 nm der Ethidiumbromid-Farbstoff angeregt und die aufgetrennten DNA-Banden mit dem Geldokumentationsprogramm von Intas dokumentiert.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, die aus dem Gel extrahiert und in eine Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden präparative Agarosegele hergestellt. Diese enthielten größere Taschen, die die Auftragung eines größeren Volumens ermöglichten. Damit keine Schäden in der DNA entstehen, wurde das Gel nach der elektrophoretischen Auftrennung von 30 min nur kurz bei energiearmem UV-Licht (366 nm) beleuchtet und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Im Anschluss erfolgte die Dokumentation des Rest-Gels, um die Vollständigkeit der ausgeschnittenen Banden zu überprüfen.

1x TAE-Puffer

Tris	40 mM
Na-Acetat x 3 H ₂ O	20 mM
EDTA	1 mM

6x Orange G-Ladepuffer

Glycerin	30 %
Orange G	0,25 %

2.2.3.10 Gelextraktion

Um die DNA aus dem ausgeschnittenen Gel zu extrahieren, wurde das *NucleoSpin® Extract II*-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die Gelstücke wurden zunächst gewogen, um nach Angaben des Herstellers das entsprechende Volumen des Gelextraktion-Puffers hinzuzugeben.

2.2.3.11 Klonierung zur Herstellung des p α SynWT.GFP-N1-Konstruktes

Die Klonierung dient dazu, eine gewünschte DNA-Sequenz in einen Vektor einzubringen, um diese Sequenz schließlich für Untersuchungen vermehren zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde in zwei Schritten ein mit GFP-markiertes α -Synuclein-Plasmid (p α SynWT.GFP-N1) hergestellt.

Schritt 1: Herstellung des p α SynWT-N1-Konstruktes

Zunächst wurde ein pEGPF-N1-Vektor (Clontech) mit den Enzymen BamHI und NotI geschnitten, um die GFP-Sequenz aus dem Vektor zu entfernen und diesen für die Ligation mit der α -Synuclein-Sequenz einzusetzen. Die Vektorkarte des Plasmids mit den entsprechenden Schnittstellen ist im Anhang (siehe 8.3.1) abgebildet. Die Amplifikation der α -Synuclein-Sequenz erfolgte mittels PCR unter Verwendung einer zuvor hergestellten cDNA (2.2.3.2). Die *Primer* (α -Synuclein_ *forward* und α -Synuclein_ *reverse*) für die Amplifizierung enthielten eine mit dem Vektor überlappende Sequenz, die Schnittstellen für die DNA-Spaltung mit BamHI und NotI (siehe Tab. 2-2) beinhalteten. Vor der Ligation der geschnittenen Vektor- und Integrat-DNA erfolgte die Auftrennung und Aufreinigung der Fragmente aus einem präparativen Agarosegel (2.2.3.9, 2.2.3.10). Die Ligation wurde mit dem *In-Fusion® HD Cloning* Kit von Clontech wie unter 2.2.3.6 beschrieben durchgeführt. Das entstandene Konstrukt wurde als p α SynWT-N1 bezeichnet (Vektorkarte siehe 8.3.2 im Anhang). Nach der Transformation von DH5 α -Zellen (2.2.3.7) mit diesem Konstrukt wurden zunächst sechs Minikulturen mittels Minipräparationen analysiert (2.2.3.8). Zur Überprüfung der richtigen Plasmid-Sequenz erfolgte eine Test-DNA-Spaltung mit dem Enzym BamHI und die Auftrennung der Fragmente durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Die Plasmid-DNA mit übereinstimmenden Fragmentgrößen wurde mit den *Primern* CMV_ *forward* und sv40 poly A_ *reverse* (siehe Tab. 2-4) sequenziert. Die Sequenzierung wurde von der Firma *GENterprise GENOMICS* Mainz durchgeführt. Pro Ansatz wurden 750 ng Plasmid-DNA und 1 μ l des entsprechenden *Primers* angesetzt und auf 7 μ l mit ddH₂O aufgefüllt. Nach erfolgreicher Überprüfung der Sequenz wurde das Plasmid p α SynWT-N1 mittels einer 100 ml Übernacht-Kultur (2.2.3.8) vermehrt.

Schritt 2: Herstellung des p α SynWT.GFP-N1-Plasmids

Zur Herstellung des p α SynWT.GFP-N1-Plasmids wurde im zweiten Schritt der pGFP-N1-Vektor mit den Enzymen KpnI und BglII innerhalb des Polylinkers linearisiert. Die Amplifikation der α -Synuclein-Sequenz erfolgte unter Verwendung des zuvor hergestellten p α SynWT-N1-Plasmids und wurde mit *Primern*, die Schnittstellen von KpnI und BglII beinhalten, durchgeführt (α -SynucleinGFP_ *forward* und

α -SynucleinGFP_reverse, siehe Tab. 2-2). Die Amplifikate wurden mithilfe eines Agarosegels aufgetrennt und mit dem PCR *clean-up Gel extraction* Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Nach der Spaltung des α -SynGFP-Amplifikats und des Vektors pGFP-N1 mit KpnI und BglII erfolgten die erneute Auftrennung der Vektor- und Insert-DNA in einem präparativen Agarosegel und die Extraktion der DNA-Fragmente. Die Ligation wurde mit der T4 DNA-Ligase der Firma NEB durchgeführt (2.2.3.6). Im Anschluss an die Transformation erfolgte, wie oben beschrieben, die Überprüfung mehrerer Klone mittels ‚Übernacht-Kulturen‘ und anschließend eine Test-Spaltung der Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen KpnI und BglII. Ein Klon des entstandenen Plasmids p α SynWT.GFP-N1 wurde mit dem *Primer CMV_forward* ebenfalls bei der Firma *GENterprise GENOMICS* sequenziert. Nach Verifizierung der Sequenz erfolgte die Vervielfältigung der korrekten Plasmide mittels einer 100 ml Übernacht-Kultur (2.2.3.8).

2.2.3.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA wurden die Proben in einem Volumen von 100 μ l 1:20 in ddH₂O verdünnt und das gesamte Volumen in eine Quarzküvette überführt. Für die Leerprobe wurden 100 μ l ddH₂O verwendet. Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte mit dem *UV/VIS Spectrophotometer DU 800* (Beckmann-Coulter) bei einer Absorptions-Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der Nukleinsäuren ergibt sich aus folgender Formel:

Konzentration DNA [μ g/ml] = $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Konzentration RNA [μ g/ml] = $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die Faktoren 40 bzw. 50 ergeben sich aus den durchschnittlichen Extinktionskoeffizienten, die bei einer OD_{260} von eins 50 μ g/ml DNA bzw. 40 μ g/ml RNA in H₂O entsprechen. Um eine Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen ausschließen zu können, wurde außerdem die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist auf die aromatischen Aminosäuren der Proteine zurückzuführen. Nach jeder Messung wurde die Probe aus der Küvette genommen und verworfen und die Küvette gründlich mit Wasser gesäubert.

2.2.4 Immunhistochemie

Mithilfe der Immunhistochemie können Proteine durch einen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper in der Zelle nachgewiesen werden. Dafür wurden Zellen auf Deckgläschen in 24-Loch-Platten ausgesät und wie unter Punkt 2.2.1.3 beschrieben behandelt. Es wurden 20000 Zellen pro Loch ausgesät. Um eine Anfärbung der Zellen zu ermöglichen wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 1 ml eiskaltem 1x PBS (GIBCO) für 20 min mit 600 μ l 3,5 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei Raumtemperatur fixiert, wodurch die Proteine miteinander vernetzt werden. Die Zellen

wurden dreimal mit je 1 ml 1x PBS pro Loch gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für sechs min mit 800 µl eiskaltem 90 %igem Methanol bei -20 °C inkubiert. Das Methanol dient dabei sowohl der Permeabilisierung der Zelle, als auch der Denaturierung von Proteinen sowie deren Präzipitation. Um das Methanol vollständig zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung der Zellen mit 800 µl 3 % BSA, gelöst in 1x PBS, für 1 h bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Zur Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper wurden die auf den Deckgläschen fixierten Zellen aus der 24-Loch-Platte entnommen und in eine mit Wasserdampf gesättigte Kammer überführt. Der primäre γ H2A.X-Antikörper wurde in 1 % BSA/PBS verdünnt und pro Deckgläschen mit einem Volumen von 60 µl für 2 h bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit je 100 µl 1 % BSA/PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5, erfolgte. Der sekundäre Antikörper wurde in einem Volumen von 60 µl in 1x PBS verdünnt. Die Verdünnung des eingesetzten Antikörpers ist in Tab. 2-9 angegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h im Dunkeln, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Nach weiterem zweimaligem Waschen der Zellen mit je 100 µl 1 % BSA/PBS erfolgte zur Markierung der Kerne eine zehnmünütige Inkubation, ebenfalls abgedunkelt, mit Sytox Orange (1:50000) in 60 µl 1x PBS. Um die Sytox Orange-Rückstände zu entfernen, wurden die Zellen einmal mit 100 µl 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend luftblasenfrei auf einem Objektträger fixiert. Dafür wurde zunächst ein Tropfen Eindeckmedium (*antifading*, Fluka) auf den Objektträger gegeben und das Deckgläschen mit der mit Zellen behafteten Seite mit dem Eindeckmedium eingebettet, so dass dieses gleichmäßig unter dem Deckgläschen verteilt war. Das Eindeckmedium dient dabei als Schutz vor dem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe. Um das Einschließen von Sauerstoff und Austrocknen der Präparate zu vermeiden, wurde das Deckgläschen schließlich mit Nagellack versiegelt und die Präparate bei 4 °C aufbewahrt. Die Dokumentation erfolgte mit dem *Laser-Scanning-Mikroskop 710* von Zeiss.

2.2.5 Statistische Auswertung

Für alle statistischen Auswertungen wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei die genaue Anzahl der Versuche in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben ist. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem t-Test des Statistikprogramms Sigma-Stat. Ein Experiment galt ab einem Wert von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der zellulären Alterungsmodelle IMR-90 und WI-38

3.1.1 Bestimmung der zellulären Seneszenzphase

Zur Bestimmung des zellulären Alters der humanen Fibroblastenlinie IMR-90 wurde bei jeder Passage die Populationsverdopplung (*population doubling level*; PDL) ermittelt. Die daraus resultierende Alterskurve der IMR-90-Zellen zeigt das typische von Hayflick und Moorhead 1961 erstmals beschriebene Merkmal der begrenzten Teilungsfähigkeit von Fibroblasten (Hayflick & Moorhead, 1961). Wie in Abb. 3-1 gezeigt, nimmt die Teilungsrate der Zellen kontinuierlich ab, bis diese schließlich in einen irreversiblen Wachstumsarrest übergehen. Durch die Bestimmung des zellulären Alters konnte somit ein Bereich definiert werden, in dem die Zellen für die Durchführung der Experimente herangezogen wurden. Dieser lag für Untersuchungen in jungen Zellen bei einer PDL bis 32. Für Experimente in seneszenten Fibroblasten wurden Zellen ab einer PDL von 44 verwendet. Hierbei muss bemerkt werden, dass die seneszenten Zellen bei ihrer Verwendung noch keinen postmitotischen Status erreicht hatten, sondern noch eine geringe Teilungsrate aufwiesen, was für die Durchführung der Experimente unerlässlich war. Die Zellen unterschieden sich jedoch proteinbiochemisch und morphologisch (siehe 3.1.2 und 3.1.3) sowie von der verminderten Teilungsrate deutlich von den jungen Fibroblasten.

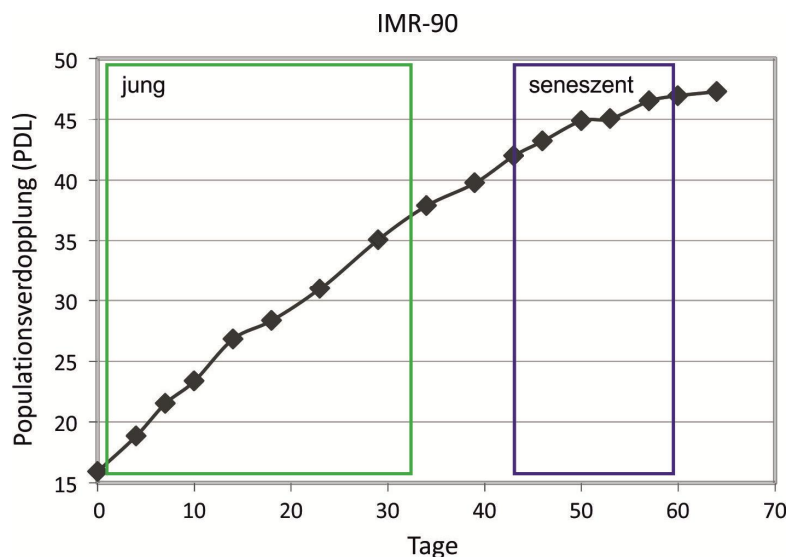


Abb. 3-1: Wachstumskurve der IMR-90-Fibroblasten

IMR-90-Fibroblasten wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Dichte von 80 bis 90 % regelmäßig passagiert und dabei die PDL bestimmt. In der graphischen Darstellung wurde die PDL gegen die Tage der Zellen in Kultur aufgetragen und damit eine Wachstumskurve erstellt.

3.1.2 Charakterisierung des seneszenten Phänotyps

Neben der begrenzten Teilungsfähigkeit und dem irreversiblen Wachstumsarrest weisen seneszente Fibroblasten noch weitere charakteristische Veränderungen wie z. B. eine vergrößerte, abgeflachte Zellform auf (Cristofalo et al, 2004). Um die morphologische Struktur der hier verwendeten IMR-90-Zellen gegenüberzustellen, wurden zunächst lichtmikroskopische Aufnahmen von jungen und seneszenten Zellen mit einer PDL von 46 gemacht. Im Gegensatz zu der spindelförmigen Zellform junger Fibroblasten wurde dabei die vergrößerte und abgeflachte Struktur seneszenten Zellen deutlich (Abb. 3-2).

Zum weiteren Nachweis gealterter Zellen wurde der Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Test durchgeführt. Seneszente Zellen weisen bei pH 6 eine erhöhte Aktivität einer altersspezifischen β -Galaktosidase auf und können somit anhand einer Blaufärbung mittels X-Gal identifiziert werden (Dimri et al, 1995). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eine deutliche Blaufärbung bei einem großen Teil der Zellen mit PDL 46, was die Alterung dieser Zellen bestätigt (Abb. 3-2).

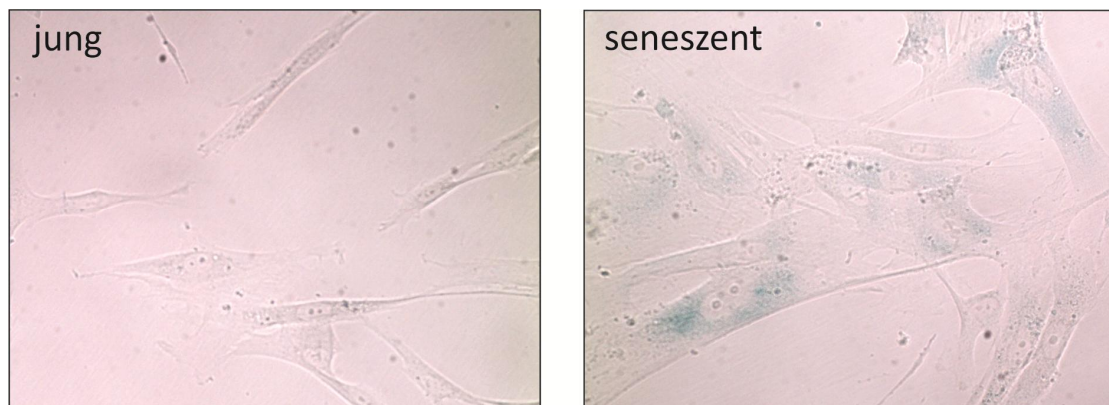


Abb. 3-2: Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in seneszenten Fibroblasten

Junge und seneszente IMR-90-Zellen wurden nach dem Passagieren für 24 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde die zelluläre Alterung mithilfe eines β -Galaktosidase-Tests nachgewiesen. Die Auswertung der Zellfärbung erfolgte durch eine mikroskopische Betrachtung.

3.1.3 Biochemischer Nachweis der zellulären Alterung

Die Seneszenz von Fibroblasten ist von einem veränderten Genexpressionsmuster gekennzeichnet (Cristofalo et al, 1998), weshalb diese Genprodukte als Marker für die Zellalterung herangezogen werden können. So ist die Expression von Caveolin-1, welches eine Hauptkomponente der vesikulären Zellmembraneinstülpungen namens Caveolae darstellt, in seneszenten Fibroblasten erhöht (Park et al, 2000) und kann bei Überexpression Seneszenz auslösen (Volonte et al, 2002), weshalb sich Caveolin-1 gut als Altersmarker eignet. Für dessen Nachweis wurden junge und seneszente IMR-90-Zellen nach dem Passagieren für 48 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend Proteinlysate mit einem SDS-haltigen Puffer

hergestellt. Der biochemische Nachweis mittels Western Blot-Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg des Expressionsspiegels von Caveolin-1 in gealterten Zellen (Abb. 3-3) und bestätigte somit auch auf biochemischer Ebene die Seneszenz der Fibroblasten. Dieses Ergebnis konnte auch in den WI-38-Zellen verifiziert werden (nicht dargestellt).

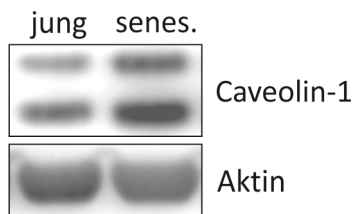


Abb. 3-3: Expressionsunterschiede von Caveolin-1 in jungen und seneszenten IMR-90-Fibroblasten. Junge und seneszente IMR-90-Fibroblasten wurden nach dem Passagieren für 48 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen inkubiert und anschließend lysiert. Nach der Zellyse erfolgte die Auftrennung der Gesamtproteine mittels SDS-PAGE. Die nachfolgende Immundetektion diente der Untersuchung der Expressionsspiegel von Caveolin-1. Die detektierte Doppelbande repräsentiert die beiden Isoformen α (24 kDa) und β (21 kDa). Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2 Untersuchung von α -Synuclein während der zellulären Alterung

3.2.1 Analyse der altersassoziierten α -Synuclein-Expression

α -Synuclein trägt sowohl durch Mutationen im α -Synuclein-Gen (Appel-Cresswell et al, 2013; Kruger et al, 1998; Lesage et al, 2013; Polymeropoulos et al, 1997; Proukakis et al, 2013; Zarranz et al, 2004), als auch durch Erhöhung der Expression des wildtypischen Proteins (Singleton et al, 2003) zur Entstehung der Parkinson-Krankheit bei. Um den Einfluss der Zellalterung auf die Expression von α -Synuclein zu untersuchen, wurden Gesamtzelllysate von Zellen unterschiedlicher PDL der beiden Fibroblastenlinien IMR-90 und WI-38 mittels Western Blot-Analyse und *Real-Time*-PCR miteinander verglichen. In beiden Zelllinien konnte im Zuge der Alterung ein signifikanter Anstieg der α -Synuclein-Spiegel auf Proteinebene beobachtet werden (Abb. 3-4 a und b). Auch auf transkriptioneller Ebene war sowohl in IMR-90-, als auch in WI-38-Zellen ein erhöhter mRNA-Spiegel von α -Synuclein erkennbar, wobei nur bei WI-38-Zellen eine Signifikanz erreicht wurde (Abb. 3-4 c und d). In IMR-90-Zellen kann die fehlende Signifikanz auf die große Varianz innerhalb der drei unabhängigen Experimente zurückgeführt werden, obwohl jeder der drei Versuche eine Hochregulation von α -Synuclein zeigte. Um die Spezifität dieser altersassoziierten Veränderung von α -Synuclein zu bestätigen, wurde ein weiteres Mitglied der Synuclein-Familie auf transkriptioneller Ebene untersucht. Da in Lungengewebe neben α -Synuclein auch γ -Synuclein vorhanden ist (Lavedan et al, 1998), wurde auch von diesem der mRNA-Gehalt durch *Real-Time*-PCR ermittelt. In IMR-90-Zellen war ein signifikant verringerter Expressionsspiegel von γ -Synuclein in seneszenten Zellen zu erkennen, wohingegen die Expression in WI-38-Zellen leicht erhöht war (Abb. 3-4 c und d).

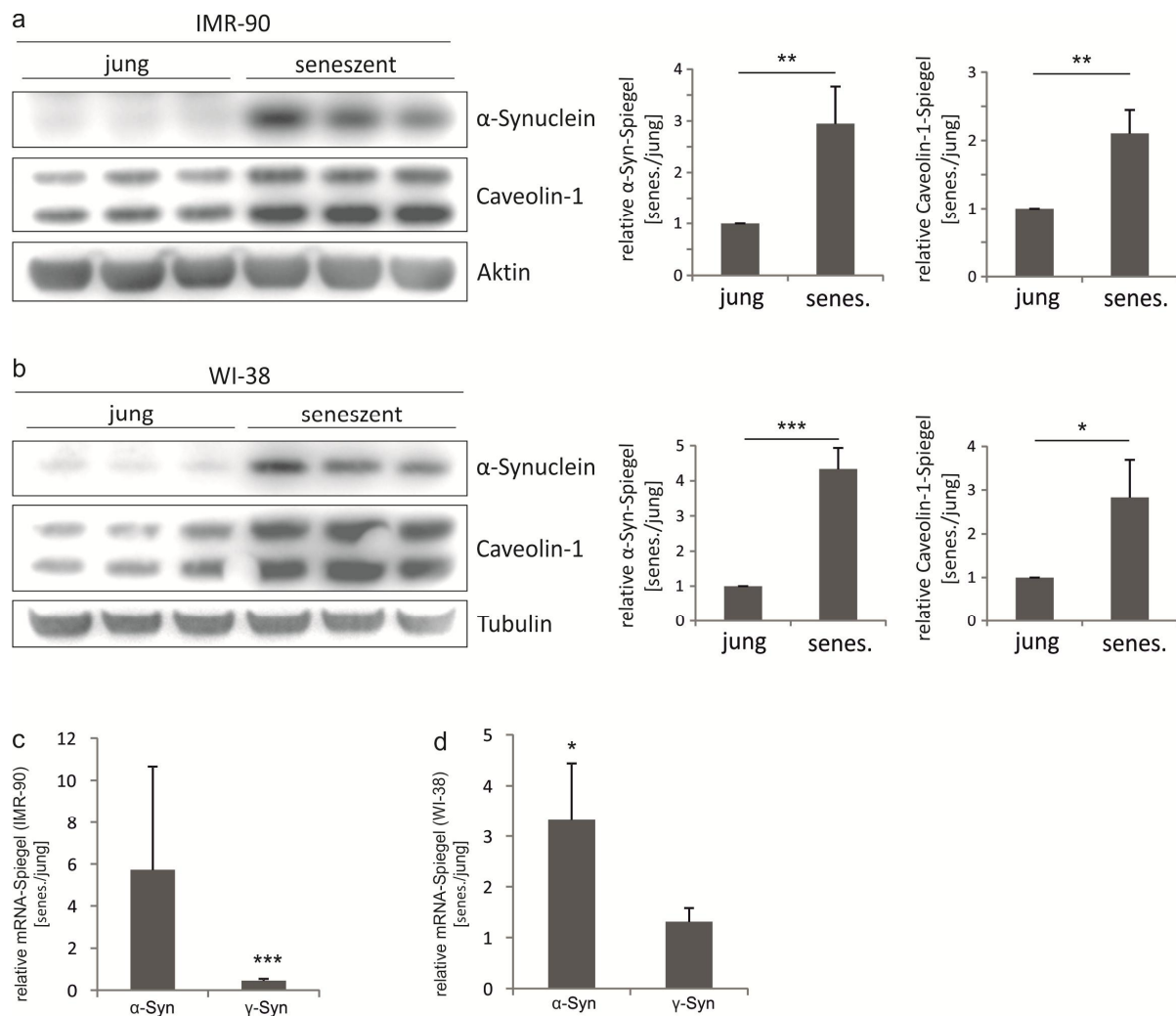


Abb. 3-4: Analyse der α -Synuclein-Expression während der zellulären Alterung

Zwei Fibroblastenlinien, IMR-90 und WI-38, wurden nach dem Passagieren für 48 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen inkubiert. Im Anschluss erfolgte in jungen und seneszenten Zellen beider Linien die Untersuchung der α -Synuclein-Spiegel (14 kDa) mittels Western Blot-Analyse und *Real-Time*-PCR. a) und b) Gesamtzelllysate (jeweils 15 μ g Protein) von jungen und seneszenten IMR-90- oder WI-38-Zellen wurde mit SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und die oben aufgeführten Proteine mithilfe der entsprechenden Antikörper detektiert. Dabei diente jeweils Caveolin-1 als Altersmarker. Als Ladekontrolle wurde in IMR-90-Zellen Aktin und in WI-38-Zellen Tubulin herangezogen. Für die statistische Auswertung wurden alle Banden densitometrisch bestimmt und α -Synuclein sowie Caveolin-1 gegen Tubulin abgeglichen. Für die graphische Darstellung wurde die relative Veränderung der alten zu jungen Zellen bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des t-Tests ermittelt, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 3$. c) und d) Gesamt-RNA wurde aus den Zellen extrahiert. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 1 μ g RNA eingesetzt. Die Genexpression von α -Synuclein und γ -Synuclein wurde schließlich mittels *Real-Time*-PCR nachgewiesen. γ -Synuclein diente dabei als Vergleichsgen. Als Referenzgen wurde die RNA-Polymerase II eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit der Software zur Bestimmung der relativen Expression (REST). Bei der graphischen Darstellung wurden die relativen Veränderungen der jungen vs. alten Zellen gegeneinander aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des t-Tests, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 3$.

3.2.2 Analyse der Löslichkeit von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten

Bei der Entstehung von Lewy-Körperchen in Fällen der sporadischen altersassoziierten Parkinson-Krankheit (Baba et al, 1998; Spillantini et al, 1997) wird der Prozess der Alterung für die Aggregation von α -Synuclein in Betracht gezogen (Canron et al, 2012). Dies wird durch Studien zur Stabilisierung

des Proteins während der Alterung unterstützt. Diese Stabilisierung wird u. a. auf die vermehrt auftretenden oxidativen Modifikationen als Folge von einem erhöhten Aufkommen an oxidativem Stress zurückgeführt (Li et al, 2004). Um die Löslichkeit von α -Synuclein in dem hier verwendeten zellulären Alterungsmodell zu bestimmen, wurden junge und seneszente IMR-90-Zellen in lösliche und unlösliche Komponenten unterteilt und mittels Western Blot-Analyse untersucht. Durch den Nachweis von Vimentin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), die als Marker für die unlöslichen respektive löslichen Zellbestandteile dienten, konnte die saubere Trennung der zwei Proteinfractionen bestätigt werden (Abb. 3-5). Die Analyse von α -Synuclein zeigte den schon in Abbildung 3-4 a dargestellten Anstieg der α -Synuclein-Expression in seneszenten Zellen. Die Lokalisation des Proteins beschränkte sich jedoch sowohl in jungen als auch in seneszenten Zellen ausschließlich auf die lösliche Fraktion, was eine potentielle altersbedingte Aggregation von α -Synuclein in dem hier verwendeten zellulären Alterungsmodell ausschließt.

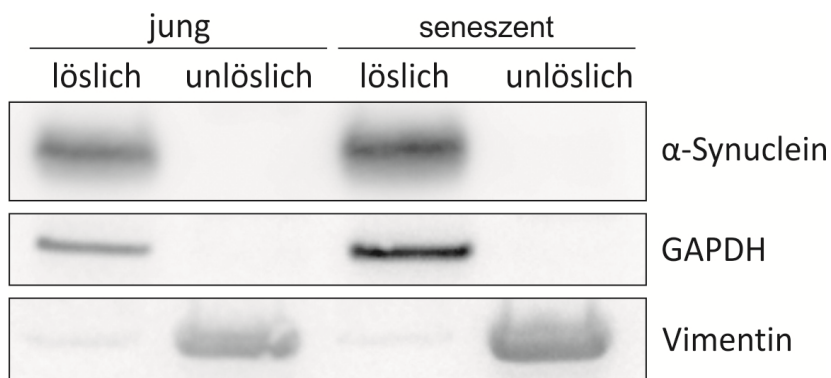


Abb. 3-5: Untersuchung der Löslichkeit von α -Synuclein während der zellulären Alterung
Junge und seneszente IMR-90-Zellen wurden nach dem Passagieren einer 48-stündigen Inkubation unter Standardbedingungen unterzogen und anschließend mit einem milden Puffer (0,5 % NP-40) in lösliche und unlösliche Zellbestandteile unterteilt. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Spiegel der oben angegebenen Proteine wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. GAPDH diene als Kontrolle für die lösliche Fraktion und Vimentin als Nachweis für die unlösliche Fraktion.

3.3 Nähere Analyse der gesteigerten α -Synuclein-Expression

3.3.1 Untersuchung von DNA-Schäden während der zellulären Alterung

Zelluläre Seneszenz wird durch das Zusammenspiel vielfältiger Faktoren verursacht. Neben der Telomerverkürzung oder der Entstehung von freien Radikalen wird auch die Akkumulation von DNA-Schäden als Ursache für die Alterung angesehen, was mit der ‚DNA-Schaden-Theorie der Alterung‘ beschrieben wird.

SIRT6 gehört zu der evolutionär hochkonservierten Familie der Sirtuine und stellt eine Histon-Deacetylase dar. SIRT6 spielt eine maßgebliche Rolle bei der Regulation der Lebensspanne. So führt das Ausschalten von SIRT6 zu einer verfrühten Alterung bei Mäusen (Mostoslavsky et al, 2006), was

auf die beobachtete Rolle des Enzyms bei der Reparatur von DNA-Schäden zurückgeführt werden kann (Mao et al, 2011; McCord et al, 2009). Als Promotor der DNA-Reparatur dient SIRT6 somit als indirekter Marker für verstärkt geschädigte DNA (Mostoslavsky et al, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erhöhung der SIRT6-Expression nach Etoposid-Behandlung beobachtet werden (Abb. 3-11). Um die Expression in dem hier verwendeten Fibroblastenmodell zu untersuchen, wurde der SIRT6-Spiegel auf proteinbiochemischer Ebene in jungen und seneszenten Zellen miteinander verglichen. Dafür wurden IMR-90-Zellen mit unterschiedlicher PDL nach dem Passagieren für 48 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen kultiviert und die Proteine anschließend mit einem SDS-haltigen Puffer aus den Zellen isoliert. Die Analyse mittels Western Blot zeigte einen signifikanten Anstieg der SIRT6-Proteinspiegel in seneszenten Zellen, was auf eine gesteigerte DNA-Schädigung in diesen Zellen hindeuten könnte (Abb. 3-6).

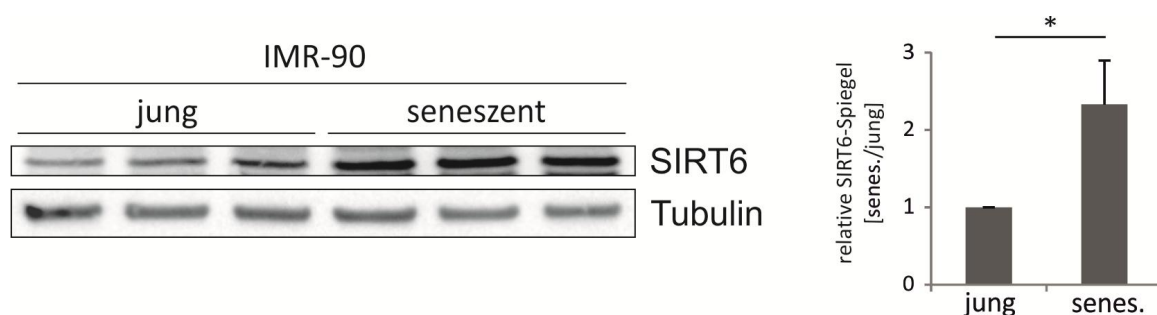


Abb. 3-6: Vergleich der SIRT6-Expression in jungen und alten Fibroblasten

Junge und seneszente IMR-90-Fibroblasten wurden nach dem Passagieren für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einem SDS-haltigen Puffer lysiert. Jeweils 15 µg Gesamtprotein wurden elektrophoretisch aufgetrennt und der SIRT6-Spiegel (37 kDa) mittels Immundetektion nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Anhand der ermittelten optischen Bandenintensität wurde SIRT6 gegen Tubulin abgeglichen und die relative Veränderung der alten zu jungen Zellen graphisch dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des t-Test bestimmt, * $p < 0,05$; $n = 3$.

3.3.2 Einfluss von DNA-Schäden auf die Expression von α -Synuclein

Zelluläre Seneszenz kann auch durch verschiedene Stimuli verursacht werden (siehe Abschnitt 1.1.1). In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Behandlung von jungen Zellen mit dem DNA-schädigenden Toxin Etoposid Seneszenz induziert. Etoposid ist ein synthetisch hergestelltes zytotoxisches Agens und stellt ein Derivat des Podophyllotoxins, welches in der Wurzel des amerikanischen Maiapfels vorkommt, dar. Etoposid wirkt als Inhibitor der Topoisomerase II, eines Enzyms, welches bei der Replikation für die Entwindung der DNA sorgt und dafür kurzzeitig Einzel- und Doppelstrangbrüche in diese einfügt. Die Toxizität von Etoposid besteht darin, dass es die Komplexbildung zwischen der Topoisomerase II und der geschnittenen DNA stabilisiert und damit Strangbrüche in der DNA verbleiben (Baldwin & Osheroff, 2005).

Um die Anreicherung von DNA-Schäden in Seneszenz-induzierten Zellen zu untersuchen, wurden zunächst junge IMR-90-Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Loch-Platte ausgesät und einer

48-stündigen Behandlung mit 10 μ M Etoposid unterzogen. Im Anschluss wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem γ H2A.X-Antikörper vorgenommen, welcher als Marker für geschädigte DNA dient. H2A.X stellt als eine Variante der H2A-Familie ein Histon der Nukleosomen im Zellkern dar. Dieses Histon wird sofort nach der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen hauptsächlich durch die Kinase ATM an dem Serinrest 139 phosphoryliert und demzufolge als γ H2A.X bezeichnet (Burma et al, 2001; Rogakou et al, 1998). Die Phosphorylierung hat eine Rekrutierung verschiedener Faktoren wie Reparaturenzymen zur Folge. Durch die Phosphorylierung von H2A.X in einem begrenzten Bereich kann die Entstehung von Strangbrüchen in der DNA immunhistochemisch durch Foci im Zellkern nachgewiesen werden.

Die Behandlung der Zellen mit Etoposid hatte eine Vermehrung der γ H2A.X-Foci im Zellkern zur Folge (Abb. 3-7) und wurde morphologisch durch eine Vergrößerung der Zellkerne sichtbar (siehe Sytox Orange-Färbung). Außerdem stellten die Zellen nach Behandlung mit Etoposid im Vergleich zur DMSO-Behandlung die Zellteilung ein. Die Etoposid-behandelten Zellen erscheinen im G2-Stadium des Zellzyklus als arretiert. Bei den mit DMSO behandelten Zellen waren anhand der DNA-Färbung mit dem Farbstoff Sytox Orange deutlich verschiedenen Mitosestadien zu erkennen (nicht abgebildet).

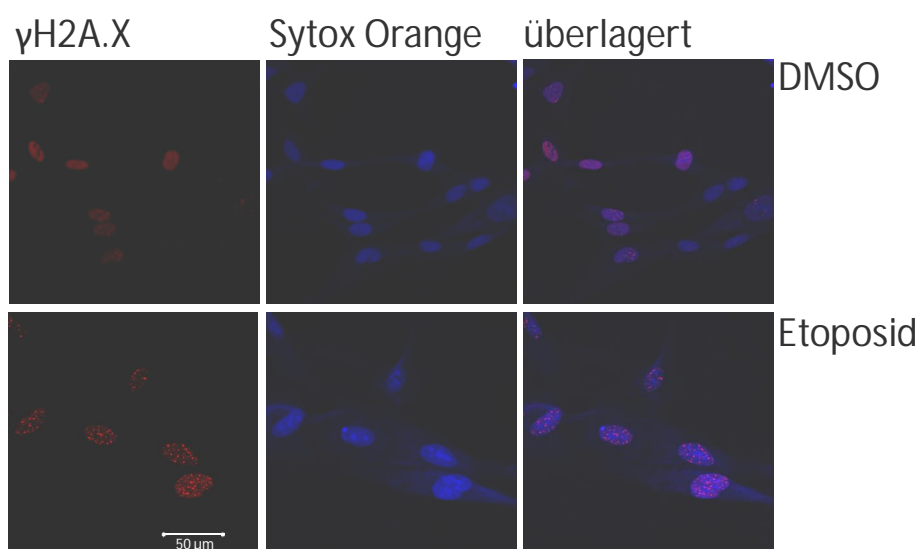


Abb. 3-7: Einfluss von Etoposid auf die Morphologie von jungen IMR-90-Fibroblasten

Junge IMR-90-Zellen wurden auf Deckgläschen in einer 24-Loch-Platte ausgesät und nach 24-stündiger Inkubation für 48 h zweimal mit 10 μ M Etoposid oder DMSO als Kontrolle behandelt. Im Anschluss erfolgten die Fixierung der Zellen mit 3,5 % PFA und der immunhistochemische Nachweis von γ H2A.X. Die Anfärbung der DNA mittels Sytox Orange diente der Visualisierung der Zellkerne. Die Bilder wurden mit einem LSM unter 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Da der Grund für die erhöhte Expression von α -Synuclein während der Zellalterung unbekannt ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine mögliche Korrelation zwischen dem beobachteten Anstieg der α -Synuclein-Protein- und mRNA-Spiegel (siehe Abb. 3-4) und der erhöhten

DNA-Schädigung in seneszenten Fibroblasten (siehe Abb. 3-6) besteht. Um den Einfluss von DNA-Schäden auf die Expression von α -Synuclein zu untersuchen, wurden junge IMR-90-Fibroblasten mit den beiden Konzentrationen 1 und 10 μ M des DNA-schädigenden Agens Etoposid behandelt und anschließend mittels Western Blot-Analyse untersucht. Nach der 48-stündigen Behandlung stieg der γ H2A.X-Spiegel bei einer Konzentration von 10 μ M signifikant an. Interessanterweise zeigte die Western Blot-Analyse auch einen konzentrationsabhängigen Anstieg der α -Synuclein-Expression (siehe Abb. 3-8). Als Kontrolle für den Zellzyklusstopp nach der DNA-Schädigung diente der Nachweis von p21. p21 ist ein Inhibitor mehrerer Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs, engl. *cyclin-dependent kinases*) und reguliert nach dem Entstehen von DNA-Schäden verschiedene Prozesse wie z. B. den Zellzyklusarrest oder die Inhibition der Replikation (zusammengefasst in Cazzalini et al, 2010). Nach der Behandlung mit Etoposid konnte auch für p21 eine erhöhte Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden.

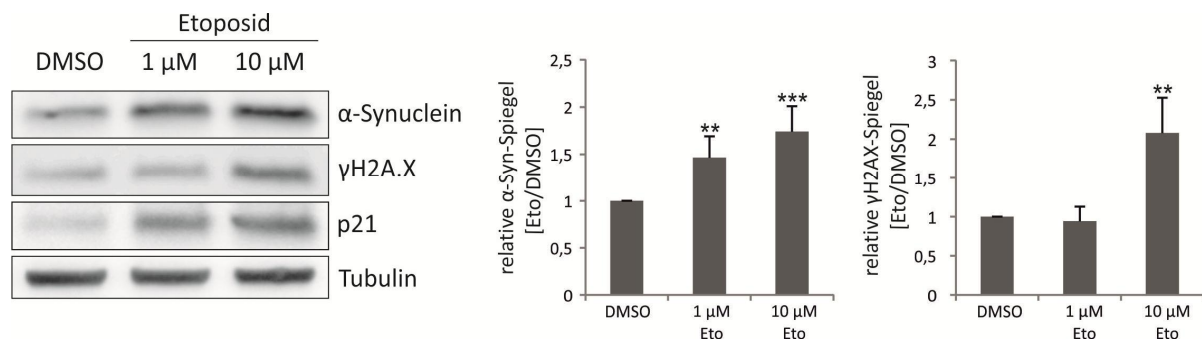


Abb. 3-8: Einfluss von Etoposid auf die Expression von α -Synuclein

Junge IMR-90-Fibroblasten wurden zweimal für 24 h mit je 1 und 10 μ M Etoposid oder DMSO als Kontrolle behandelt. Im Anschluss an die Zellyse erfolgte eine Western Blot-Analyse zum Nachweis von α -Synuclein und γ H2A.X. Tubulin diente als Ladekontrolle. Für die statistische Auswertung wurde die optische Bandenintensität bestimmt und die α -Synuclein- und γ H2A.X-Spiegel auf Tubulin abgeglichen. Die graphische Darstellung zeigt die relativen α -Synuclein- bzw. γ H2A.X-Spiegel nach Etoposid-Behandlung in Bezug auf die DMSO-Kontrolle. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; n=4; für p21: n=2.

3.3.3 Wirkung unterschiedlicher Stressfaktoren auf den Proteinspiegel von α -Synuclein

Um das Ergebnis der erhöhten α -Synuclein-Expression nach DNA-Schädigung zu verifizieren, wurde die zelluläre Antwort auf drei weitere Stressfaktoren, Aphidicolin (Aphi), Staurosporin (Stauro) und 4-Hydroxynonenal (4-HNE), getestet, die unterschiedliche Prozesse in der Zelle beeinflussen. Für die Untersuchung wurden junge IMR-90-Zellen mit den jeweils angegebenen Konzentrationen für 24 oder 48 h inkubiert und im Anschluss mit einem SDS-haltigen Puffer lysiert. Für den Nachweis der Expressionsspiegel wurden die Gesamtproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Proteine mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Substanz Aphidicolin. Aphidicolin hemmt in eukaryotischen Zellen die Replikation der DNA, indem es die Funktion der DNA-Polymerasen α und δ inhibiert

(Goscin & Byrnes, 1982; Ohashi et al, 1978). Durch die Hemmung der Polymerasen wird die DNA-Reparaturfähigkeit dieser Enzyme gestört. Es verbleiben somit Strangbrüche in der DNA, was schließlich zum Zellzyklusarrest führt. In der vorliegenden Arbeit wurden junge IMR-90-Zellen nach einer 48-stündigen Behandlung mit 1 μ M Aphidicolin oder DMSO als Kontrolle untersucht. Durchgeführte Western Blot-Analysen zeigten deutlich, dass die Expression von α -Synuclein nach der Behandlung mit Aphidicolin signifikant anstieg. Auch der Zellzyklus-Inhibitor p21, der als Marker für den Zellzyklusstopp nach der DNA-Schädigung diente, war nach der Behandlung mit Aphidicolin verstärkt exprimiert (siehe Abb. 3-9 a).

Des Weiteren wurde die Wirkung des ATP kompetitiven Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin auf die α -Synuclein-Expression untersucht. Staurosporin ist bekannt, starke DNA-Fragmentierung hervorzurufen und Apoptose auszulösen (Bertrand et al, 1994). Um die Stressantwort auf diese Substanz zu testen, wurden die Fibroblasten für 24 h mit 5 und 10 nM Staurosporin bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. γ H2A.X war in Bezug auf die DMSO-Kontrolle bei beiden Konzentrationen signifikant erhöht, wobei der Anstieg in Abhängigkeit von der Konzentration bei 10 nM am stärksten war (Abb. 3-9 b). Die verstärkte Bildung von γ H2A.X ließ somit auf die vermehrte Entstehung von DNA-Schäden schließen. Interessanterweise ergab auch der Nachweis von α -Synuclein einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Proteinspiegels, der ebenfalls bei 5 und 10 nM signifikant war (Abb. 3-9 b).

Als weiterer Stressfaktor wurde 4-HNE verwendet. 4-HNE, welches bekanntlich oxidativen Stress induziert, entsteht als eines der Hauptendprodukte der Lipidperoxidation und spielt nach Entstehung von oxidativem Stress eine Rolle bei der Vermittlung von apoptotischen Prozessen (Poli & Schaur, 2000). Eine erhöhte Menge an 4-HNE-modifizierten Proteinen wurde außerdem in der Substantia nigra von Patienten der Parkinson-Krankheit beobachtet (Yoritaka et al, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden junge IMR-90-Fibroblasten für 48 h mit 5 und 10 μ M 4-HNE oder Ethanol als Kontrolle behandelt. Die Western Blot-Analyse zeigte anhand des konzentrationsabhängigen Anstiegs der HSP70-Expression, dass die Zellen bei den eingesetzten Konzentrationen mit einer deutlichen Stressantwort reagierten. Bei 10 μ M 4-HNE war der HSP-70-Spiegel signifikant erhöht. Die Inkubation der Zellen mit 4-HNE führte ebenfalls zu einem Arrest des Zellzyklus, was an der deutlich erhöhten p21-Expression zu erkennen war. Der p21-Spiegel stieg bei einer Konzentration von 5 μ M 4-HNE am stärksten an, nahm jedoch bei 10 μ M wieder leicht ab. Trotz der Stressantwort war nach der Behandlung mit 4-HNE kein DNA-Schaden, gemessen an dem γ H2A.X-Spiegel, zu erkennen. Bei γ H2A.X war sogar eine signifikante Herunterregulation zu beobachten. Interessant war hierbei, dass die α -Synuclein-Expression parallel zu dem γ H2A.X-Spiegel keine Regulation zeigte (Abb. 3-9 c).

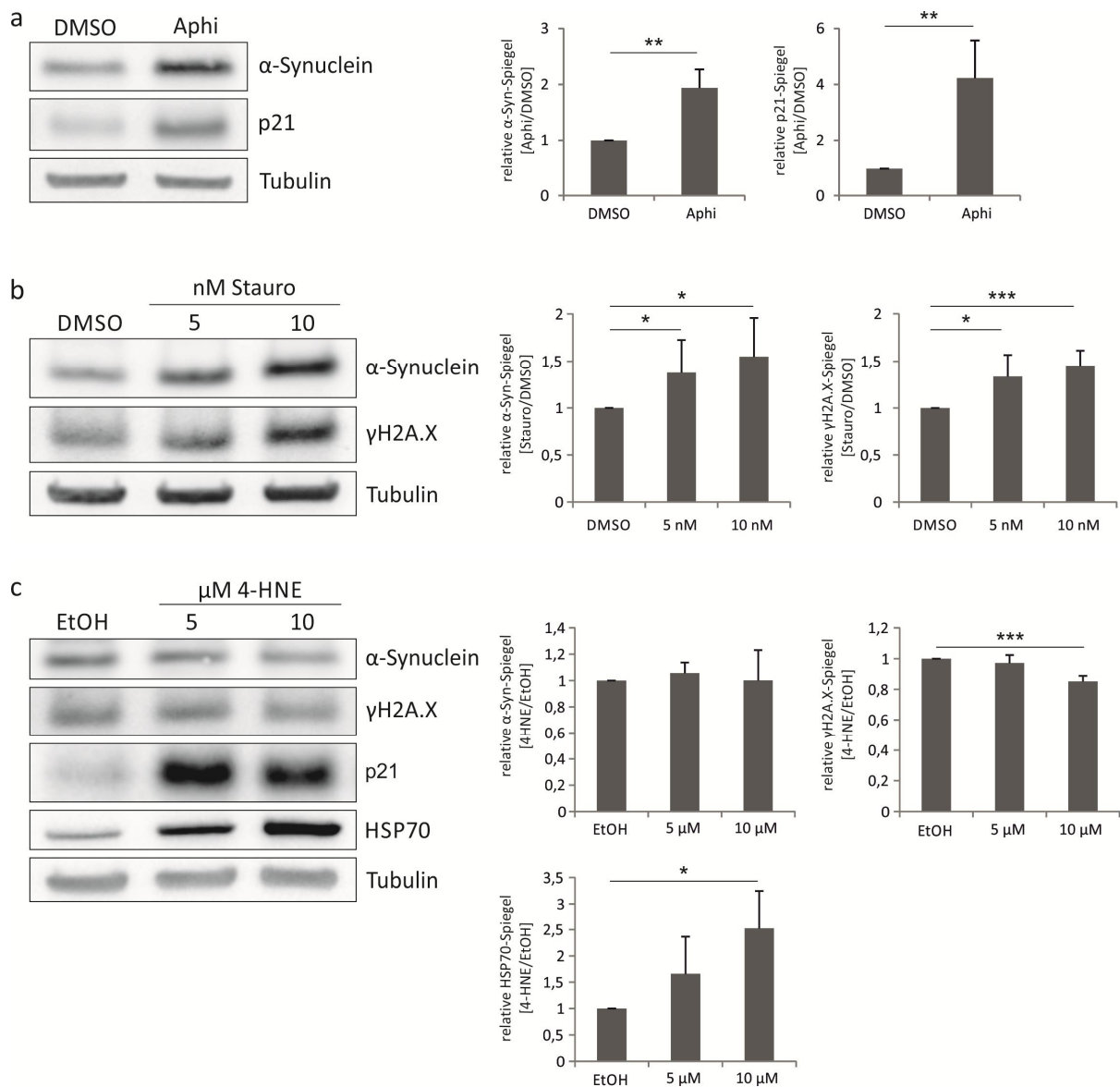


Abb. 3-9: Wirkung verschiedener Stressfaktoren auf die Expression von α -Synuclein

a) Junge IMR-90-Fibroblasten wurden für 48 h mit 1 μ M Aphidicolin oder DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend die Expression von α -Synuclein und p21 mittels Immunblot bestimmt. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Anhand der densitometrisch ermittelten Bandenintensität wurden die Spiegel von α -Synuclein und p21 auf Tubulin abgeglichen und in den abgebildeten Graphen die jeweils relativen Veränderungen nach Aphidicolin-Behandlung dargestellt. ** $p < 0,01$; $n = 3$. b) Junge IMR-90-Zellen wurden nach einer 24-stündigen Inkubation mit 5 und 10 nM Staurosporin bzw. DMSO mittels Western Blot analysiert und die Spiegel von α -Synuclein und γ H2A.X bestimmt. Als Ladekontrolle wurde Tubulin herangezogen. Die α -Synuclein- und γ H2A.X-Expression wurde nach der densitometrischen Auswertung auf Tubulin abgeglichen. Für die graphische Darstellung wurde die relative Veränderung der jeweiligen Proteinspiegel auf die DMSO-Kontrolle bezogen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 5$. c) Junge IMR-90-Zellen wurden für 48 h mit 5 und 10 μ M 4-HNE oder Ethanol als Kontrolle behandelt und im Anschluss die Proteinspiegel von α -Synuclein, γ H2A.X, p21 und HSP70 mittels Immunblot ermittelt. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die graphische Darstellung erfolgte anhand der densitometrisch bestimmten Bandenintensität. Dabei wurden die genannten Proteinspiegel jeweils auf Tubulin abgeglichen und die jeweilige relative Expression, bezogen auf Ethanol, aufgetragen. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 4$ für α -Syn und γ H2A.X, $n = 3$ für HSP70; $n = 1$ für p21.

3.3.4 Einfluss von α -Synuclein auf den Grad von DNA-Schäden

Aufgrund der Beobachtung, dass die Expression von α -Synuclein insbesondere bei der Entstehung von Schäden in der DNA erhöht ist, wurde untersucht, ob der α -Synuclein-Spiegel einen Einfluss auf den Grad des DNA-Schadens ausübt. Dafür wurde zunächst die α -Synuclein-Expression in jungen IMR-90-Zellen durch die Transfektion von siRNA gegen α -Synuclein herunterreguliert. Als Kontrolle wurden Zellen mit *nonsense* siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion, die mittels Elektroporation durchgeführt wurde, erfolgte eine 48-stündige Behandlung der Zellen mit 10 μ M Etoposid zur Schädigung der DNA. Die proteinbiochemische Analyse 72 h nach der Transfektion bestätigte eine Herunterregulation von α -Synuclein um fast 70 % (Abb. 3-10 a). Die Bildung von γ H2A.X nach Etoposid-Behandlung war in α -Synuclein-depletierten Zellen im Vergleich zu den *nonsense*-transfizierten Zellen signifikant erhöht (Abb. 3-10 a). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ein α -Synuclein-GFP-Fusionsprotein (α -Syn::GFP) überexprimiert. Dafür wurden junge IMR-90-Zellen mittels Elektroporation mit dem α -Syn::GFP-Plasmid bzw. einem GFP-Plasmid zur Kontrolle transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Behandlung der Zellen für 48 h mit 10 μ M Etoposid. Unter Verwendung eines GFP-Antikörpers wurde die erfolgreiche Überexpression von α -Synuclein nachgewiesen. Interessanterweise führte die 48-stündige Etoposid-Inkubation zu einem signifikant verringerten γ H2A.X-Spiegel bei den α -Synuclein-überexprimierenden Zellen gegenüber den mit GFP transfizierten Zellen (Abb. 3-10 b). Diese Befunde lassen auf einen möglichen Einfluss von α -Synuclein auf den Grad des induzierten DNA-Schadens in jungen Fibroblasten schließen.

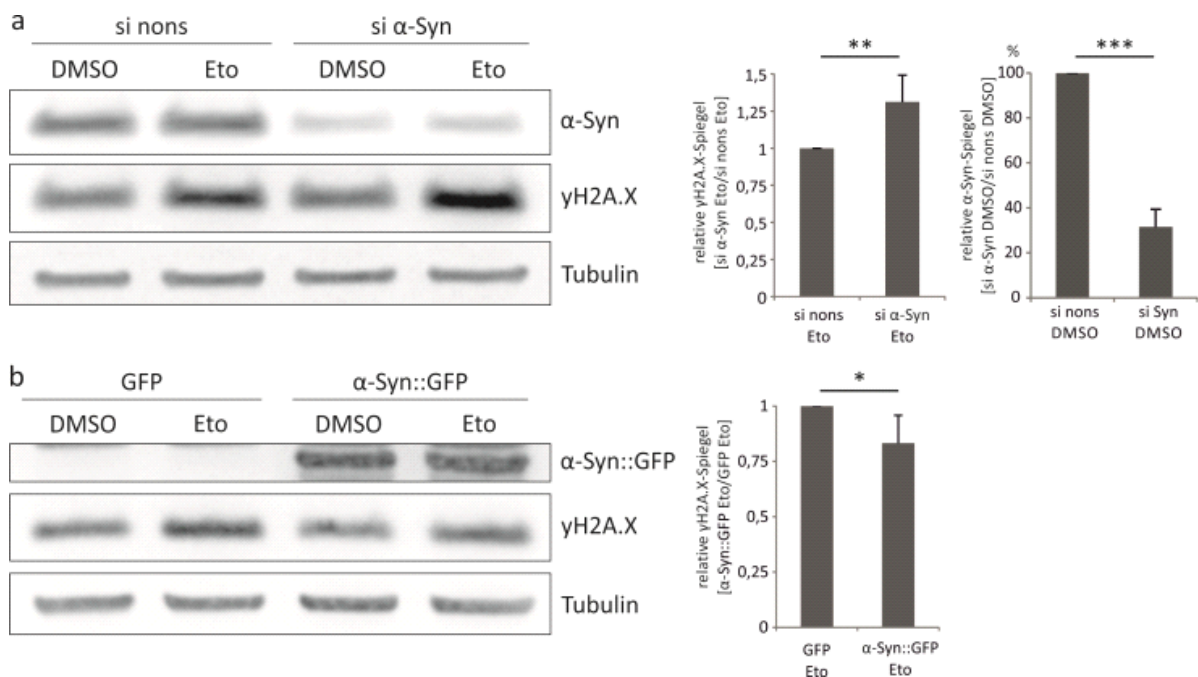


Abb. 3-10: Einfluss von α -Synuclein auf den Grad des DNA-Schadens nach Behandlung mit Etoposid
Abbildungstext auf der nächsten Seite

a) Junge IMR-90-Fibroblasten wurden mit siRNA gegen α -Synuclein, bzw. *nonsense* siRNA als Kontrolle, transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine 48-stündige Behandlung der Zellen mit 10 μ M Etoposid bzw. DMSO. Nach der Zellyse wurden die Gesamtproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert und die Spiegel der genannten Proteine untersucht. Zum Nachweis des DNA-Schadens wurde γ H2A.X verwendet. Tubulin diente als Ladekontrolle. Für die statistische Auswertung wurden die Bandenintensitäten densitometrisch bestimmt und γ H2A.X auf Tubulin abgeglichen. Für die graphischen Auswertung wurde die relative Veränderung der γ H2A.X-Spiegel nach Etoposid-Behandlung in α -Synuclein-transfizierten Zellen auf die Spiegel in *nonsense*-transfizierten Zellen bezogen. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 6$.

b) Junge IMR-90-Zellen wurden zur Überexpression von α -Synuclein mit einem α -Syn:GFP-Konstrukt bzw. mit einem GFP-Plasmid als Kontrolle transfiziert. Nach 24 h erfolgte eine zweimalige Behandlung der Zellen mit 10 μ M Etoposid oder DMSO als Kontrolle für insgesamt 48 h. Im Anschluss an die Zellyse wurden die oben aufgeführten Proteine mittels Western Blot-Analyse untersucht. Zum Nachweis der Überexpression von α -Synuclein wurde ein GFP-Antikörper verwendet. γ H2A.X diente dem Nachweis von DNA-Schäden und Tubulin als Ladekontrolle. Anhand der ermittelten optischen Bandenintensität wurden die Spiegel von γ H2A.X auf Tubulin abgeglichen. In der graphischen Auswertung wurde die relative Veränderung der γ H2A.X-Spiegel nach Etoposid-Behandlung in α -Syn::GFP-transfizierten Zellen bezogen auf die GFP-transfizierten Zellen dargestellt. * $p < 0,05$; $n = 4$.

3.4 Intrazelluläre Lokalisation von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten

Schon bei seiner Entdeckung wurde eine Lokalisation von α -Synuclein im Zellkern beobachtet (Maroteaux et al, 1988), was auch durch spätere Untersuchungen bestätigt werden konnte (Goers et al, 2003; Kontopoulos et al, 2006; Yu et al, 2007). Neuere Studien zeigen außerdem, dass α -Synuclein auch eine mögliche Funktion im Zellkern zukommt, die jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Goers et al, 2003; Kontopoulos et al, 2006; Liu et al, 2011). Ausgehend von diesen Befunden und dem hier beobachteten Einfluss von α -Synuclein auf den Grad des DNA-Schadens wurde untersucht, ob aufgrund dieses genotoxischen Stresses die Verteilung von α -Synuclein in der Zelle beeinflusst und möglicherweise eine Verschiebung in den Zellkern verursacht wird. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Lokalisation von α -Synuclein während der zellulären Alterung, die von erhöhten DNA-Schäden gekennzeichnet ist, verändert ist. Junge und seneszente IMR-90-Zellen wurden dafür für 48 h mit 10 μ M Etoposid behandelt und anschließend mithilfe eines milden Puffers in zwei Fraktionen bestehend aus Zytoplasmaproteinen und Kernproteinen unterteilt. Unter Verwendung von Antikörpern gegen Histone H3 und SOD1 konnte die Auftrennung in nukleäre bzw. zytoplasmatische Proteinfractionen bestätigt werden (Abb. 3-11). Der Nachweis von SIRT6 zeigte die zu erwartende Erhöhung des Proteinspiegels in gealterten Fibroblasten, was die verstärkte Entstehung von DNA-Schäden in gealterten Zellen bestätigte. Es war außerdem sowohl in jungen als auch in seneszenten Zellen ein Anstieg von SIRT6 nach Induktion von DNA-Schäden mit Etoposid erkennbar (Abb. 3-11), was den Einfluss von SIRT6 in Bezug auf DNA-Reparatur unterstreicht. Die Untersuchung von α -Synuclein zeigte, dass sowohl in jungen als auch in gealterten Zellen die Expression des Proteins nach Etoposid-Behandlung erhöht war. In jungen Zellen konnte nach DNA-Schädigung ausschließlich im Zellkern eine Anreicherung von α -Synuclein beobachtet werden. Interessanterweise verblieb in den seneszenten Zellen nach der Behandlung mit Etoposid der größte

Anteil des Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion, wohingegen im Zellkern kein Anstieg der α -Synuclein-Spiegel detektierbar war (Abb. 3-11). Dieser Befund lässt somit auf eine veränderte Lokalisation von α -Synuclein während der zellulären Alterung schließen.

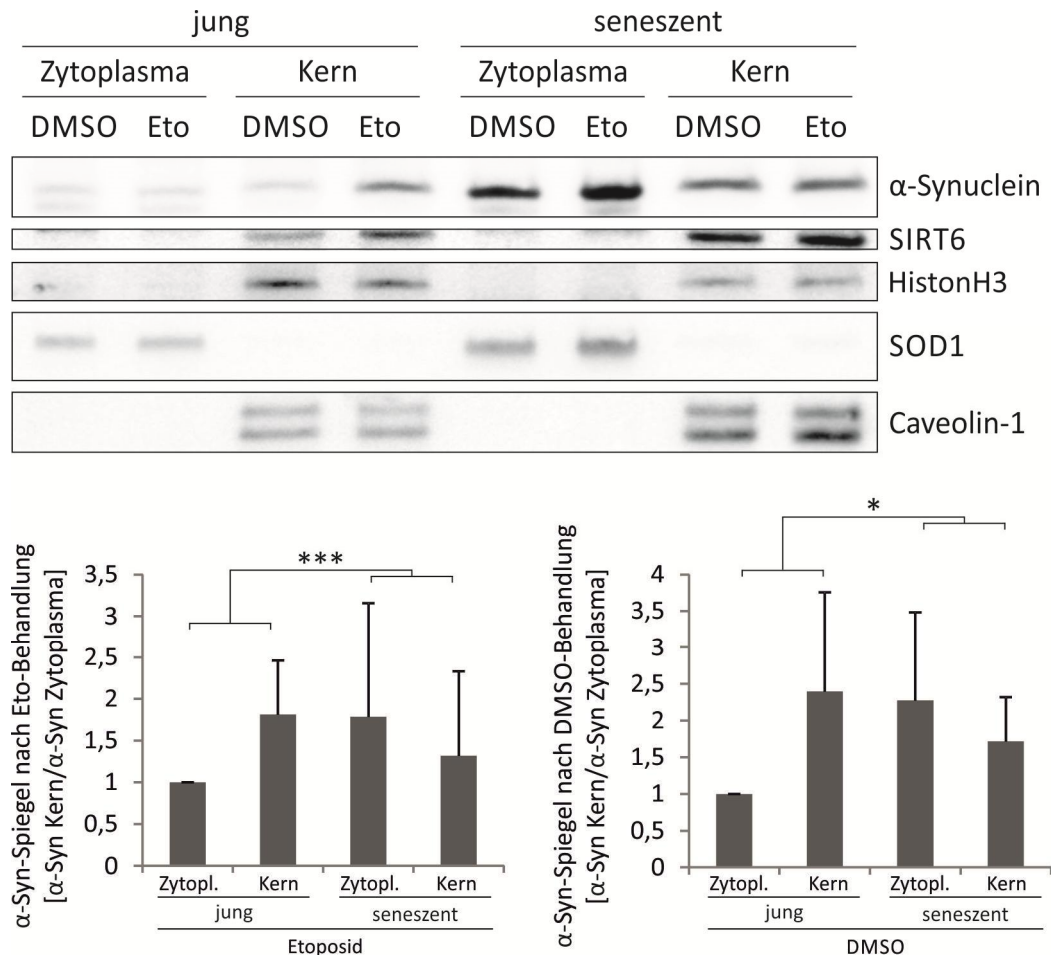


Abb. 3-11: Einfluss von DNA-Schädigung auf die Lokalisation von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten

Junge und seneszente IMR-90-Fibroblasten wurden nach 48-stündiger Behandlung mit 10 μ M Etoposid mithilfe eines milden Kernfraktionierungspuffers in Zytoplasma- und Kernfraktionen unterteilt. Die Proteine der unterschiedlichen Fraktionen wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immunblot untersucht. SOD1 und Histone H3 dienten als Nachweis für die Zytoplasma- respektive Kernfraktion. Mit SIRT6 wurde die Entstehung von DNA-Schäden nachgewiesen. Caveolin-1 diente als Marker der zellulären Alterung. Anhand der ermittelten Bandenintensitäten wurde die relative Veränderung von α -Synuclein im Kern nach Etoposid- sowie nach DMSO-Behandlung in seneszenten in Bezug auf junge Zellen graphisch dargestellt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 6$.

Um den Befund, dass α -Synuclein nach Schädigung der DNA von jungen Zellen in den Zellkern wandert, zu stärken, wurden in einem weiteren Versuchsansatz junge IMR-90-Fibroblasten für 24 h mit 5 nM Staurosporin inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Fraktionierung in zytoplasmatische und nukleäre Zellbestandteile. Unter Verwendung der Antikörper gegen γ H2A.X und SOD1 konnte mittels Western Blot-Analyse die Auftrennung in Kern- und Zytoplasma-Fraktion bestätigt werden (Abb. 3-12). Die erhöhten γ H2A.X-Spiegel der nukleären Fraktion bestätigten außerdem die Entstehung von

DNA-Schäden nach der Staurosporin-Behandlung. Die Untersuchung der α -Synuclein-Expression ergab einen deutlichen Anstieg des Proteins in der nukleären Fraktion nach Behandlung mit Staurosporin, wohingegen in der zytoplasmatischen Fraktion sogar eine leichte Abnahme nach der Behandlung zu erkennen war (Abb. 3-12).

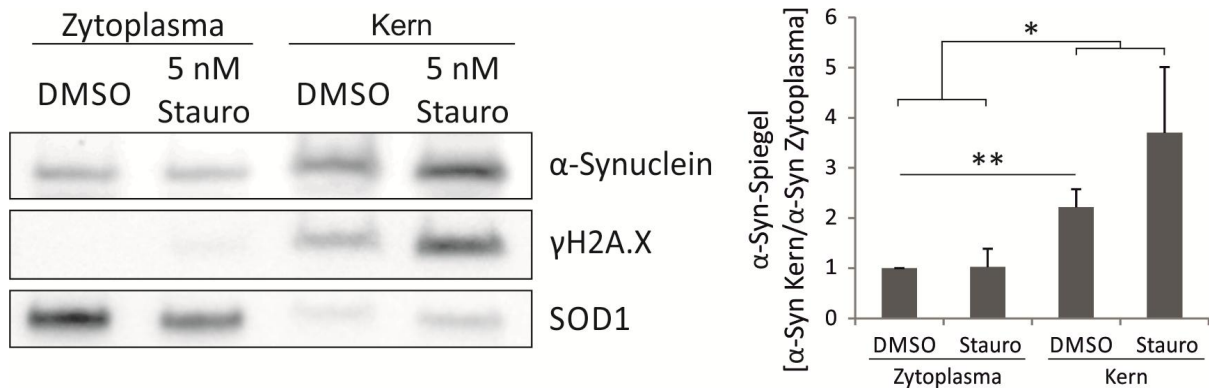


Abb. 3-12: Einfluss von Staurosporin auf die intrazelluläre Lokalisation von α -Synuclein

Junge IMR-90-Zellen wurden für 24 h mit 5 nM Staurosporin behandelt und im Anschluss mithilfe eines Kernfraktionierungspuffers in zytoplasmatische und nukleäre Proteinfractionen unterteilt. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunblot untersucht. Zum Nachweis der nukleären Fraktion, sowie des Grads des DNA-Schadens wurde der γ H2A.X-Antikörper verwendet. SOD1 diente als Marker der zytoplasmatischen Fraktion. Anhand der densitometrischen Auswertung wurden die jeweiligen α -Synuclein-Spiegel nach Staurosporin-Behandlung auf die DMSO-Kontrolle bezogen und die relative Veränderung der α -Synuclein-Spiegel im Kern in Bezug auf die Spiegel im Zytoplasma graphisch aufgetragen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 3$.

3.5 Einfluss des ERK1/2-MAPK-Signalweges auf die Expression von α -Synuclein

3.5.1 Untersuchung des ERK1/2-MAPK-Signalweges in jungen IMR-90-Zellen nach DNA-Schädigung

Signaltransduktionswege stellen einen wichtigen Mechanismus der Zelle dar, um äußere Signale ins Innere der Zelle zu übertragen und damit eine adäquate Antwort hervorzurufen. Der ERK1/2-MAPK-Signalweg wird über extrazelluläre Mitogene aktiviert und reguliert zahlreiche wichtige Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung, aber auch die zelluläre Antwort auf Stress. Demnach ist dieser Signalweg auch verantwortlich für die Aktivierung vieler verschiedener Proteine im Zellkern, unter anderem die des Transkriptionsfaktors Elk-1 (Gille et al, 1992). Zahlreiche Studien belegen, dass α -Synuclein ebenfalls durch den ERK1/2-MAPK-Signalweg reguliert wird (Cai et al, 2010; Clough & Stefanis, 2007). In Bezug auf diese Studien wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob dieser Signalweg für den erhöhten Proteinspiegel von α -Synuclein nach DNA-Schädigung in Fibroblasten verantwortlich ist. Um den ERK1/2-MAPK-Signalweg zu manipulieren, wurde der Inhibitor U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadiene) eingesetzt. U0126 ist ein hoch selektiver Inhibitor von MEK1 und MEK2, der die Aktivität dieser MAPK-Kinase hemmt und somit die Phosphorylierung der nachfolgenden MAPK ERK1/2 verringert (Favata et al, 1998). Unter

Verwendung von U0126, der mit einer Konzentration von 25 μM eingesetzt wurde, wurden junge IMR-90-Zellen für 48 h behandelt. Die proteinbiochemische Analyse bestätigte anhand der reduzierten p-ERK1/2-Spiegel die inhibierende Wirkung von U0126 auf MEK1/2 (Abb. 3-13). Die Betrachtung des Immunblots zeigte außerdem eine signifikante Herunterregulation von α -Synuclein nach der Behandlung mit U0126. Um weiterhin einen möglichen Einfluss dieses Inhibitors auf die Expression von α -Synuclein nach DNA-Schädigung zu analysieren, wurde in einem weiteren Ansatz das DNA-schädigende Agens Etoposid in Anwesenheit von U0126 getestet. Zur Kontrolle erfolgte zusätzlich eine Einzelbehandlung mit 10 μM Etoposid. Die Behandlung mit Etoposid hatte neben der Hochregulation von α -Synuclein eine Erhöhung der p-ERK1/2-Spiegel und damit der Aktivität des ERK1/2-MAPK-Signalweges zur Folge. Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 erfolgt durch die Phosphorylierung durch die dual-spezifischen Kinasen MEK1/2 an jeweils einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest (Crews & Erikson, 1992). Nur wenn beide Reste phosphoryliert sind, sind die Kinasen aktiv und können ihre Funktion im Zellkern ausüben (Anderson et al, 1990). In dieser Arbeit wurde deshalb ein spezifischer Antikörper eingesetzt, der die dual-phosphorylierte Form von ERK1/2 erkennt. Interessanterweise konnte in Anwesenheit von Etoposid die durch dieses Agens verursachte Hochregulation von α -Synuclein mit U0126 teilweise reduziert werden, wobei der Proteinspiegel von α -Synuclein zwischen den Spiegeln der beiden Einzelbehandlungen lag (Abb. 3-13 a). Um zu untersuchen, ob die beobachtete Expression von α -Synuclein auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen ist, wurde mit dem gleichen Versuchsansatz auch die Genexpression von α -Synuclein analysiert. Die Untersuchung zeigte auch auf mRNA-Ebene eine Herunterregulation von α -Synuclein nach U0126-Behandlung und unterstreicht außerdem die auf Proteinebene gezeigte Hochregulation der α -Synuclein-Expression nach Etoposid-Behandlung. Vergleichbar mit den Proteinspiegeln wurde der Anstieg der α -Synuclein-Spiegel nach DNA-Schädigung auch auf transkriptioneller Ebene durch die U0126-Behandlung teilweise unterdrückt (Abb. 3-13 c).

Um den Einfluss des MEK-Inhibitors U0126 auf die Expression von α -Synuclein nach Induktion von DNA-Schäden zu verifizieren, wurde der gleiche Versuchsansatz unter Verwendung eines zweiten DNA-schädigenden Agens durchgeführt. Anstelle von Etoposid wurde in diesem Ansatz 1 μM Aphidicolin eingesetzt. Die Untersuchung der Expressionsspiegel ergab im Hinblick auf die α -Synuclein- und p-ERK1/2-Spiegel sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene die gleichen Ergebnisse (Abb. 3-13 b und d). Die Behandlung mit Aphidicolin zeigte hier keinen Einfluss auf die gesamt-ERK1/2-Spiegel. Diese Ergebnisse weisen somit auf eine mögliche ERK1/2-MAPK-Signalweg-vermittelte Regulation der α -Synuclein-Expression bei genotoxischem Stress hin.

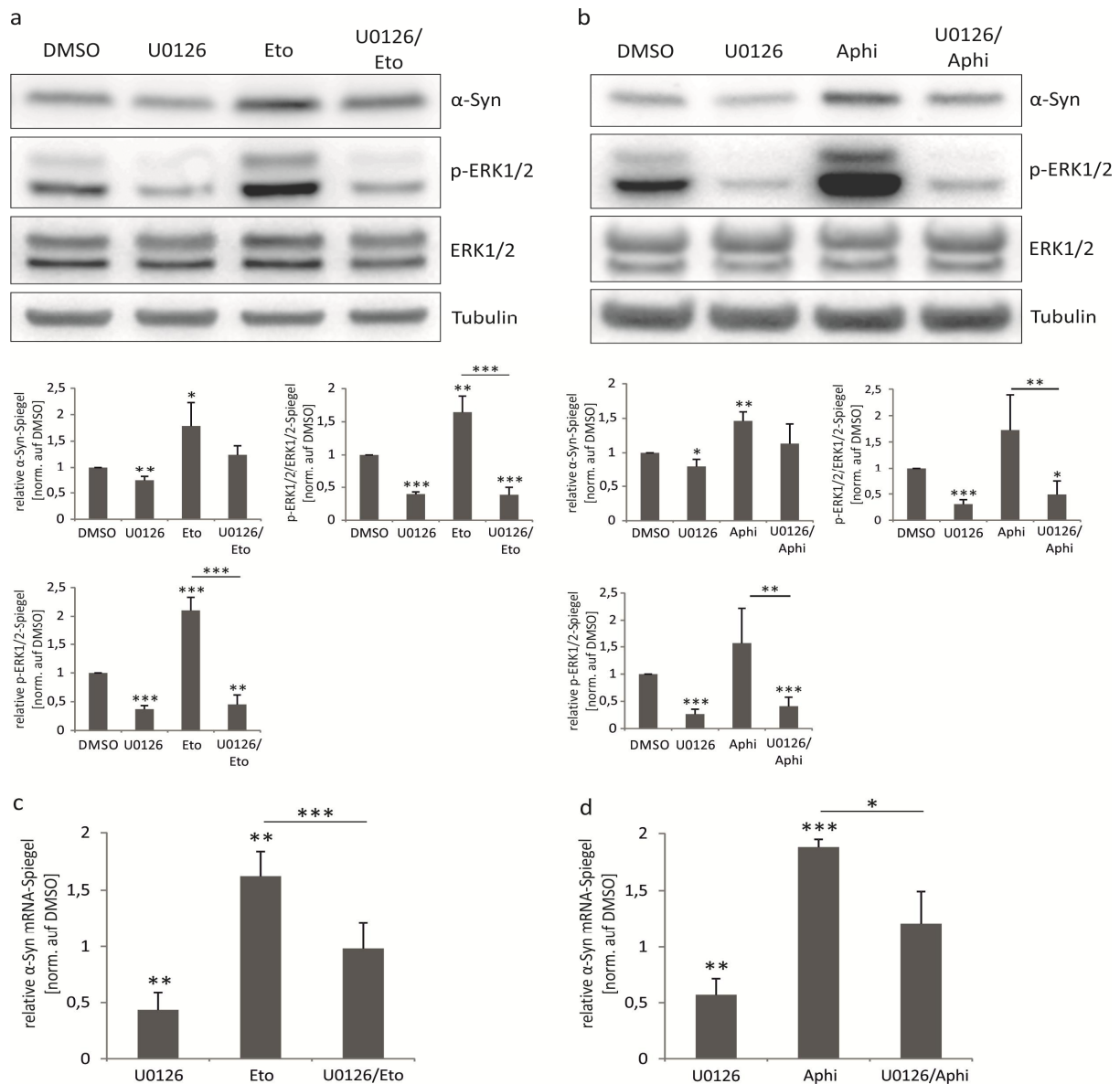


Abb. 3-13: Wirkung von U0126 auf die Expression von α -Synuclein

Junge IMR-90-Fibroblasten wurden 24 h nach dem Passagieren in zwei unterschiedlichen Ansätzen den folgenden Behandlungen unterzogen. Die Zellen wurden im ersten Ansatz entweder mit 25 μ M U0126 bzw. 10 μ M Etoposid (Eto) oder mit 25 μ M U0126 in Anwesenheit von 10 μ M Etoposid behandelt. Im zweiten Ansatz erfolgte die Behandlung mit 25 μ M U0126 oder 1 μ M Aphidicolin (Aphi) oder einer Doppelbehandlung mit 25 μ M U0126 und 1 μ M Aphidicolin. Als Kontrolle wurde in beiden Ansätzen jeweils DMSO verwendet. Die Zellen wurden insgesamt für 48 h mit dem Behandlungsmedium inkubiert, wobei dieses nach 24 h erneuert wurde. a) und b) Im Anschluss an die Zelllyse mit einem SDS-haltigen Puffer erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und deren Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western Blot. Die aufgeführten Proteine wurden anschließend mittels Immundetektion analysiert. In a) und b) dienen Tubulin und Vimentin als Ladekontrolle. Zur Ermittlung der relativen Proteinspiegel wurden die Bandenintensitäten von α -Synuclein, p-ERK1/2 und ERK1/2 densitometrisch bestimmt und auf die jeweilige Ladekontrolle abgeglichen. Für die graphische Auswertung wurden die relativen Veränderungen der jeweiligen Proteinspiegel, bezogen auf DMSO, dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a) $n = 3$; b) $n = 3$. c) und d) Nach der Behandlung wurde jeweils die Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert. Zur Herstellung der cDNA mithilfe reverser Transkription wurden 1 μ g RNA pro Probe eingesetzt. Im Anschluss wurde die Genexpression von α -Synuclein mittels *Real-Time*-PCR bestimmt. Als Referenzgen diente bei c) Aktin und bei d) RNA-Polymerase II. Die Auswertung erfolgte mit der Software zur Bestimmung der relativen Expression (REST), wobei unter Berücksichtigung des jeweiligen Referenzgens die relative Genregulation von α -Synuclein bestimmt wurde. Für die graphische Darstellung wurden die relativen Veränderungen der α -Synuclein-Expression nach den jeweiligen Behandlungen, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, aufgetragen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; c) $n = 3$; d) $n = 3$.

3.5.2 Einfluss des ERK1/2-MAPK-Signalweges auf die Expression von α -Synuclein in seneszenten Fibroblasten

Der beobachtete Einfluss des ERK1/2-MAPK-Signalweges auf die Expression von α -Synuclein unter Punkt 3.5.1 bezog sich auf die Induktion von DNA-Schäden in jungen Fibroblasten. Um zu untersuchen, ob die Regulation der α -Synuclein-Expression auch in seneszenten Zellen über diesen Signalweg stattfindet, wurde auch in diesen der ERK1/2-MAPK-Signalweg mit dem MEK-Inhibitor U0126 blockiert. Gealterte IMR-90-Zellen wurden für 72 h mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5 und 10 μ M) U0126 bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert. Die proteinbiochemische Analyse zeigte eine erfolgreiche Inhibierung der MAPK-Kinase MEK1/2, was an den signifikant reduzierten Menge von p-ERK1/2 ab einer Konzentration von 1 μ M U0126 zu erkennen war (Abb. 3-14 a). Die Inhibierung der Kinase wurde zudem durch das verstärkte Vorkommen von p-MEK1/2 bestätigt. Der Nachweis von α -Synuclein zeigte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proteinmenge nach 72-stündiger Behandlung mit U0126 (Abb. 3-14 a). Diese Daten deuten somit darauf hin, dass auch in seneszenten Zellen ein Einfluss des ERK1/2-MAPK-Signalweges auf die Expression von α -Synuclein besteht.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ein vergleichbarer Versuchsansatz mit gealterten WI-38-Fibroblasten durchgeführt. Bei diesen Zellen wurden 10 und 15 μ M U0126 eingesetzt. Diese Konzentrationen waren etwas höher als bei den IMR-90-Zellen. Außerdem erfolgte die Behandlung der WI-38-Zellen für insgesamt 96 h. Das Ergebnis dieses Versuchs war mit dem in IMR-90-Zellen vergleichbar (Abb. 3-14 b). Die Inhibition konnte anhand der signifikant herunterregulierten p-ERK1/2-Spiegel demonstriert werden. Außerdem war auch bei diesem Versuch eine konzentrationsabhängige Herabregulation von α -Synuclein zu erkennen.

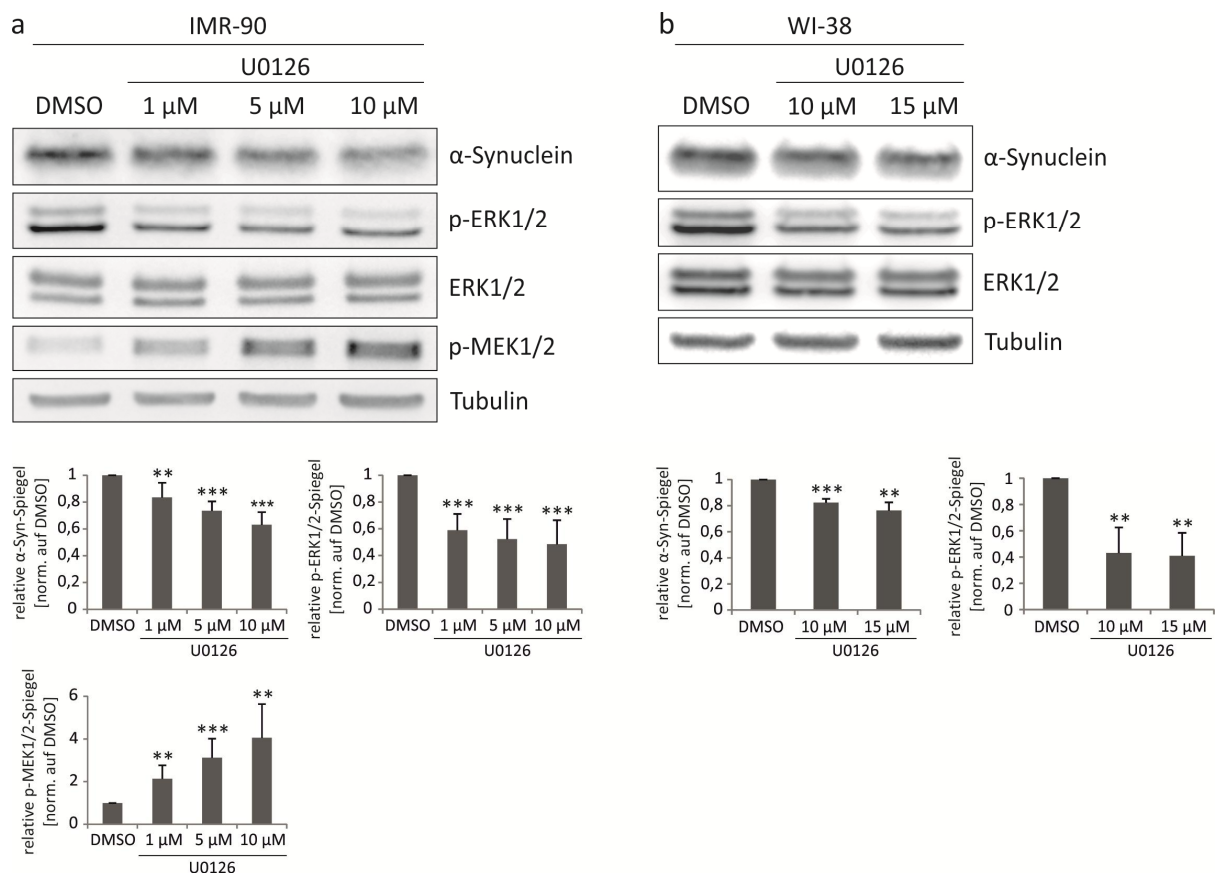


Abb. 3-14: Wirkung von U0126 auf die α -Synuclein-Expression in seneszenten Zellen

Seneszente Zellen wurden auf Zellkulturschalen ausgesät und 24 h später einer mehrtägigen Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 unterzogen. Als Kontrolle diente eine reine DMSO-Behandlung. Das Behandlungsmedium wurde dabei alle 24 h erneuert. a) IMR-90-Zellen wurden für 72 h mit 1, 5 und 10 μ M U0126 behandelt. b) Die Behandlung der seneszenten WI-38-Zellen erfolgte für insgesamt 96 h mit 10 und 15 μ M U0126. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem SDS-haltigen Puffer lysiert und die angegebenen Proteine mittels Western Blot-Analyse untersucht. Tubulin diente in beiden Ansätzen als Ladekontrolle. Für die Auswertung wurden nach Abgleich auf Tubulin die relativen Bandenintensitäten bestimmt und jeweils in Bezug auf die DMSO-Kontrolle graphisch dargestellt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; a) $n = 5$, b) $n = 3$.

3.5.3 Untersuchung des ERK1/2-MAPK-Signalweges während der zellulären Alterung

Ausgehend von den Literaturdaten ist bekannt, dass die Aktivität des ERK1/2-MAPK-Signalweges während der Alterung von Fibroblasten abgeschwächt ist (Kim et al, 2000; Lim et al, 2000; Tresini et al, 2001). Um dies auch für die hier verwendete Fibroblastenlinie IMR-90 nachzuweisen, wurden junge und seneszente Zellen nach dem Passagieren einer 48-stündigen Inkubation bei 37 °C in Standard-Zellkulturmedium unterzogen, anschließend lysiert und die gewünschten Proteine des ERK1/2-MAPK-Signalweges mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Seneszente IMR-90-Zellen zeigten bei dem Vergleich mit jungen Zellen einen signifikanten Anstieg der ERK1/2-Expression. Interessanterweise war im Gegensatz dazu kein Mengenunterschied der phosphorylierten Proteine zwischen jungen und seneszenten Fibroblasten erkennbar (Abb. 3-15). Aufgrund der erhöhten ERK1/2-Spiegel in seneszenten Zellen führt das relative Verhältnis von aktivem ERK1/2 zu totalem ERK1/2 zu einer signifikanten Abnahme in seneszenten Fibroblasten, was

auf eine geringere Aktivierung von ERK1/2 in gealterten IMR-90-Zellen hindeutet. Da in der Signalkaskade die Kinasen MEK1/2 für die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 verantwortlich sind, wurden im Folgenden sowohl die Proteinmenge von MEK1/2 als auch die Bildung von p-MEK1/2 untersucht. Die Western Blot-Analyse zeigte auch hier eine vergleichbare Menge an aktivem phosphoryliertem MEK1/2 in jungen und seneszenten Zellen. Im Vergleich dazu war in seneszenten Zellen auch ein Anstieg der totalen MEK1/2-Spiegel zu beobachten. Die statistische Auswertung ergab mit einem p-Wert von 0,065 zwar keine Signifikanz für diesen Anstieg, ließ jedoch einen deutlichen Trend für eine erhöhte MEK1/2-Expression erkennen. Das relative Verhältnis von aktivem p-MEK1/2 zu den totalen MEK1/2-Spiegeln ergab hier eine Tendenz zur Abnahme der Aktivität von MEK1/2 in seneszenten Zellen.

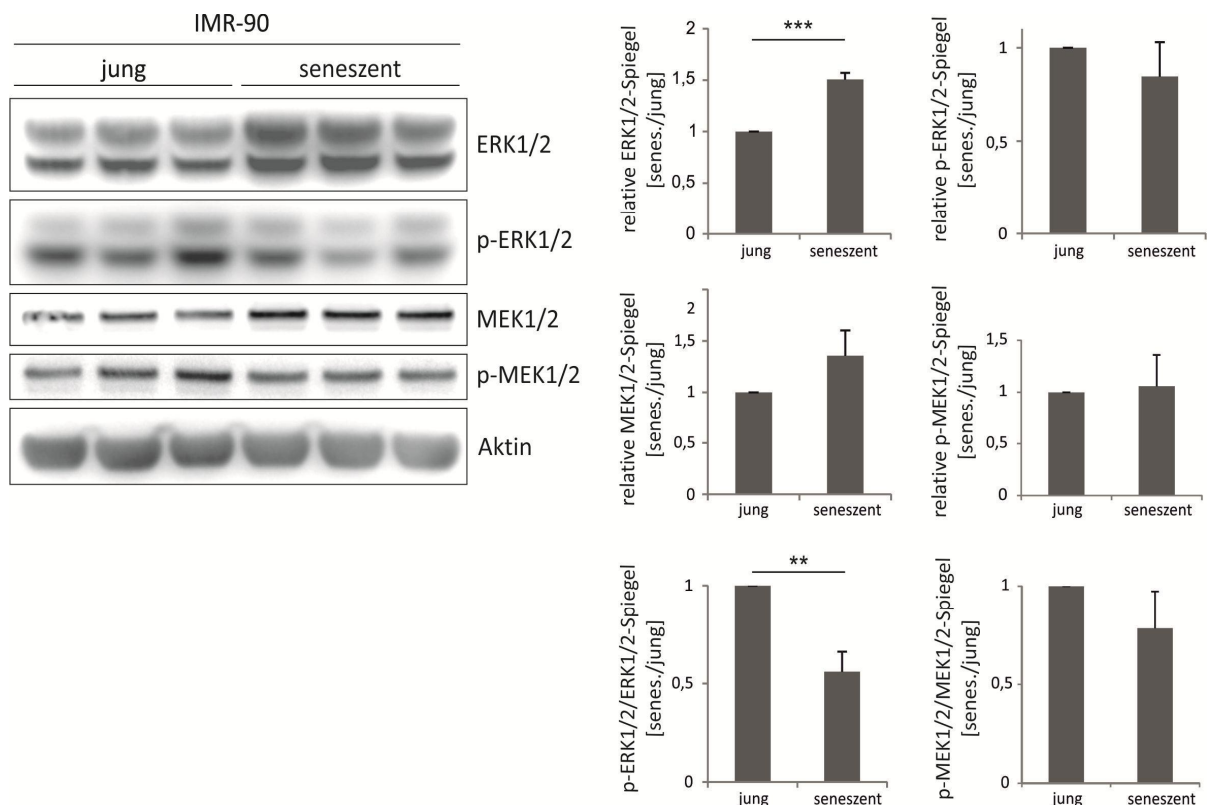


Abb. 3-15: Expression der Komponenten des ERK1/2-MAPK-Signalweges in alternden Fibroblasten
 Junge und seneszente IMR-90-Fibroblasten wurden nach dem Passagieren für 48 h unter Standard-Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach der Zellyse wurde das Gesamtprotein gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinspiegel der genannten Proteine mittels Immunblot untersucht. Bei dem Immunblot der IMR-90-Zellen dienten Aktin und Tubulin als Ladekontrolle. Nach dem Abgleich auf die entsprechende Ladekontrolle wurden jeweils die relativen Bandenintensitäten der alten in Bezug auf die jungen Zellen graphisch dargestellt. **p<0,01, ***p<0,001; n=3.

Die Regulation des MAPK-Signalweges erfolgt mithilfe der Aktivität von Kinasen und Phosphatasen durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Für die Dephosphorylierung sind MAPK-Phosphatasen (MKPs), die zur Familie der Dual-spezifischen Phosphatasen (DUSPs) gehören, verantwortlich. Nach einer Studie von Torres (Torres et al, 2003) wird eine erhöhte Aktivität der

MAPK-Phosphatase MKP-2 für die Dephosphorylierung von ERK1/2 in seneszenten Fibroblasten verantwortlich gemacht. Ein weiteres Mitglied dieser Familie stellt das Enzym MKP-3, auch bekannt als DUSP6, dar, welches sehr spezifisch die Dephosphorylierung von p-ERK1/2 reguliert (Muda et al, 1996a; Muda et al, 1996b). In Anlehnung an die Ergebnisse von Torres (Torres et al, 2003) wurde auch in der vorliegenden Arbeit der Proteinspiegel von MKP-3 in IMR-90-Zellen unterschiedlicher PDL untersucht. Mithilfe der proteinbiochemischen Analyse konnte im Vergleich zu jungen Zellen eine signifikante Hochregulation von MKP-3 in seneszenten Fibroblasten gemessen werden (Abb. 3-16). Somit könnte auch in den hier verwendeten seneszenten IMR-90-Zellen der unveränderte p-ERK1/2-Spiegel auf die erhöhte Expression von MKP-3 zurückzuführen sein.

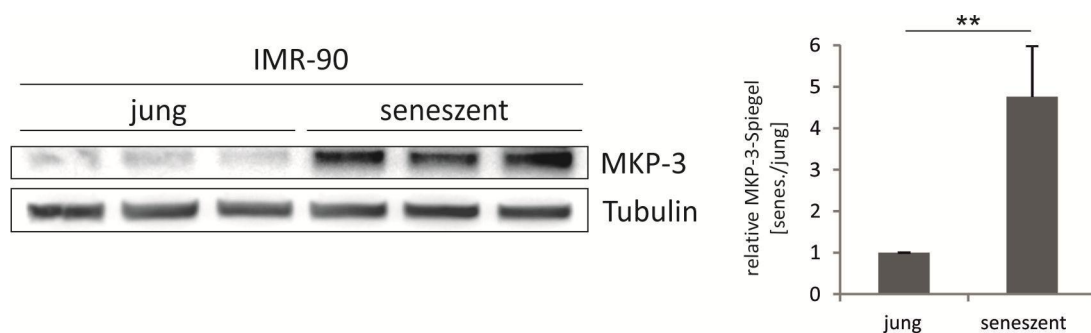


Abb. 3-16: Expression von MKP-3 im Vergleich von jungen und seneszenten Fibroblasten

Junge und seneszente Fibroblasten wurden nach dem Passagieren für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einem SDS-haltigen Puffer einer Proteinisolierung unterzogen. 15 µg Gesamtprotein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und der MKP-3-Spiegel (42 kDa) mittels Immunblot-Analyse untersucht. Für die graphische Auswertung wurde die optische Bandenintensität von MKP-3 bestimmt, auf Tubulin abgeglichen und die relative Veränderung der Proteinspiegel von alten in Bezug auf junge Zellen dargestellt. **p<0,01; n=3.

4 Diskussion

Verschiedene Mutationen im α -Synuclein-Gen (Appel-Cresswell et al, 2013; Kruger et al, 1998; Lesage et al, 2013; Polymeropoulos et al, 1997; Proukakis et al, 2013; Zarranz et al, 2004) sowie die Aggregation des Proteins (Spillantini et al, 1998b; Spillantini et al, 1997) werden mit der Entstehung der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht. Weitere Forschungsarbeiten führten zu der Erkenntnis, dass auch die erhöhte Expression von wildtypischem α -Synuclein durch z. B. Multiplikationen des α -Synuclein-Gens einen pathogenen Effekt besitzt und zur Entstehung der Krankheit beiträgt (Farrer et al, 2004; Singleton et al, 2003). Überexpressionsstudien unterstützen diese Befunde und weisen auf eine dosisabhängige Toxizität des Proteins hin (Feany & Bender, 2000; Maries et al, 2003). Die Funktion von α -Synuclein hinsichtlich der Toxizität ist jedoch umstritten, da auch viele protektive Eigenschaften des Proteins nachgewiesen wurden (da Costa et al, 2000; Monti et al, 2007). In der altersassoziierten, sporadisch auftretenden Form der Parkinson-Krankheit konnten bislang keine Mutationen und nur sehr selten Genmultiplikationen identifiziert werden (Ahn et al, 2008; Lesage et al, 2013). In diesen Fällen wurden aber ebenfalls erhöhte Spiegel von α -Synuclein beobachtet (Chiba-Falek et al, 2006; Grundemann et al, 2008). In dieser Arbeit wurde mithilfe eines replikativen Seneszenzmodells untersucht, ob der zelluläre Alterungsprozess *per se* zur Hochregulation von α -Synuclein führt und welche physiologische Rolle dem Protein möglicherweise während der zellulären Alterung zukommt.

4.1 Untersuchung von α -Synuclein in humanen alternden Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von α -Synuclein sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in humanen alternden Fibroblasten signifikant ansteigt. Dabei bildete α -Synuclein keine für die Parkinson-Krankheit charakteristischen unlöslichen Proteinaggregate aus, sondern lag sowohl in jungen als auch in seneszenten Zellen in löslicher Form vor. Die in seneszenten Zellen beobachtete Hochregulation von α -Synuclein konnte mit den im Alter akkumulierenden DNA-Schäden korreliert werden, da auch in jungen Zellen die Induktion von DNA-Schäden eine verstärkte α -Synuclein-Expression zur Folge hatte. Sowohl die nach DNA-Schäden induzierte als auch die in seneszenten Zellen beobachtete Hochregulation von α -Synuclein wurde durch den ERK1/2-MAPK-Signalweg vermittelt. Die spezifische Hochregulation von α -Synuclein nach DNA-Schäden macht eine mögliche Rolle des Proteins bei der DNA-Reparatur denkbar. Diese Hypothese wurde dadurch bestärkt, dass die Überexpression bzw. die Herunterregulation von α -Synuclein zu einem verringerten respektive erhöhten DNA-Schaden führt und somit eine protektive Eigenschaft des Proteins im Hinblick auf die DNA-Reparatur vermutet werden kann.

4.1.1 Expression und Löslichkeit von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten

Der altersassoziierte Anstieg von α -Synuclein, der auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, weist darauf hin, dass die zelluläre Alterung generell zur gesteigerten Expression von α -Synuclein führt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit zahlreichen *in vivo* Expressionsstudien. So konnte ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge von α -Synuclein in verschiedenen Hirnregionen gealterter Menschen und Mäuse nachgewiesen werden (Hsu et al, 1998; Li et al, 2004). Im Menschen zeigen auch die speziell von der Parkinson-Krankheit betroffenen Neurone der Substantia nigra einen Anstieg des Proteins α -Synuclein (Chu & Kordower, 2007).

Bei Untersuchungen an Mäusen konnte neben der erhöhten Proteinmenge auch ein Anstieg der α -Synuclein-mRNA im Verlauf der Gehirnentwicklung bis hin zu adulten Tieren nachgewiesen werden (Hsu et al, 1998). In den hier durchgeführten Untersuchungen war der mRNA-Spiegel von α -Synuclein in seneszenten Fibroblasten ebenfalls deutlich erhöht. Die Zunahme der Proteinmenge von α -Synuclein konnte somit auf eine verstärkte Transkription des Gens zurückgeführt werden. Mit γ -Synuclein sollte ein weiteres Mitglied der Synuclein-Familie untersucht werden. In Anlehnung an Untersuchungen von verschiedenen Gehirnregionen der Ratte (Malatynska et al, 2006) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der mRNA-Spiegel von γ -Synuclein in seneszenten IMR-90-Zellen signifikant herunterreguliert war. In seneszenten WI-38-Zellen war dagegen keine veränderte Expression des Gens zu erkennen. Die beobachteten Unterschiede in der transkriptionellen Regulation der beiden Mitglieder der Synuclein-Familie deuteten somit darauf hin, dass altersbedingt ausschließlich α -Synuclein verstärkt exprimiert wurde.

α -Synuclein liegt nativ ungefaltet vor, neigt aber unter verschiedenen Bedingungen aufgrund seiner NAC-Domäne zur Oligomerisierung und Bildung von Aggregaten (Bodles et al, 2001). Altersassoziierte Krankheiten wie die familiäre und idiopathische Form der Parkinson-Krankheit, Multisystematrophie oder die Lewy-Körper-Demenz sind durch Proteinablagerungen namens Lewy-Körperchen gekennzeichnet, deren Hauptkomponente α -Synuclein darstellt (Spillantini et al, 1998b; Spillantini et al, 1997). Diese Ablagerungen werden daher weitestgehend als Ursache für die Entwicklung dieser Krankheiten angesehen. Allerdings werden mittlerweile auch protektive Eigenschaften dieser Einschlüsse diskutiert. Dabei wird angenommen, dass mit der Aggregation apoptotische Eigenschaften des Proteins verloren gehen und somit Oligomere und Protofibrillen die toxischen Vorläufer-Spezies darstellen (Lashuel & Lansbury, 2006).

Die Untersuchung des Aggregationszustandes während der zellulären Alterung von Fibroblasten zeigte, dass α -Synuclein sowohl in jungen als auch in seneszenten IMR-90-Zellen ausschließlich in löslicher Form vorlag, obwohl der Proteingehalt in seneszenten Zellen signifikant erhöht war. Schon frühere Studien konnten zeigen, dass in der Substantia nigra gesunder alter Menschen und Affen im

Gegensatz zu den Patienten der Parkinson-Krankheit keine Aggregation trotz erhöhter α -Synuclein-Spiegel festzustellen war (Chu & Kordower, 2007; McCormack et al, 2012; Xuan et al, 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuteten somit darauf hin, dass die während der Alterung beobachtete erhöhte α -Synuclein-Expression keinen Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins hatte. Somit müssen zusätzliche Faktoren als Auslöser vorhanden sein, um die Aggregation des Proteins im Alter zu bewirken.

Das Aggregationsverhalten von α -Synuclein kann durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden und hängt von den umgebenden Bedingungen ab. So aggregiert α -Synuclein z. B. bei einem niedrigen pH oder einer hohen Temperatur und bildet dabei Thioflavin S-positive Filamente aus, so wie sie auch in Lewy-Körperchen zu finden sind (Hashimoto et al, 1998). Außerdem bewirken Umweltfaktoren wie das Pestizid Paraquat oder das Neurotoxin MPTP, die zu Parkinson-typischen Merkmalen führen, einen Anstieg der α -Synuclein-Expression und dessen Aggregation (Manning-Bog et al, 2002; Uversky et al, 2001b). Andere Studien an Mäusen konnten dagegen keine Aggregation von α -Synuclein nach Überexpression des wildtypischen Proteins oder nach erhöhter Expression, ausgelöst durch das Toxin MPTP, nachweisen (Manning-Bog et al, 2003; Matsuoka et al, 2001; Vila et al, 2000). Zusammengefasst ließ sich daraus folgern, dass die Löslichkeit von α -Synuclein nicht alleine durch das erhöhte Vorkommen des Proteins verändert wird, so wie es auch in dieser Arbeit gezeigt wurde. In einer Studie von Bartels konnte außerdem gezeigt werden, dass α -Synuclein in verschiedenen Zelltypen, entgegen der allgemein beschriebenen nativen und ungefalteten Konformation, als gefaltetes Tetramer vorliegt, welches keine Aggregate bildet. Es wird in dieser Studie angenommen, dass eine Destabilisierung dieses Tetramers die Aggregation des Proteins fördert (Bartels et al, 2011). Diese Konformation könnte eine weitere Möglichkeit für die gleich bleibende Löslichkeit von α -Synuclein während der Alterung darstellen, müsste jedoch mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden.

4.1.2 Wirkung von genotoxischem Stress auf die Expression von α -Synuclein

Die Hochregulation von α -Synuclein konnte in dieser Arbeit mit DNA-Schäden korreliert werden. Die α -Synuclein-Expression konnte bereits durch verschiedene potentiell DNA-schädigende Agenzien wie Paraquat, MPTP oder Permethrin verstärkt induziert werden (Gillette & Bloomquist, 2003; Manning-Bog et al, 2002; Quilty et al, 2006; Vila et al, 2000). In den hier durchgeführten Versuchen wurden vier Agenzien (Etoposid, Aphidicolin, Staurosporin und 4-HNE) mit DNA-schädigender Wirkung eingesetzt. Die Entstehung von induzierten DNA-Schäden wurde unter Verwendung des etablierten Markers γ H2A.X nachgewiesen. Doppelstrangbrüche in der DNA führen zur Phosphorylierung von H2A.X in einem großen Bereich des DNA-Schadens, was als γ H2A.X-Foci sichtbar wird (Rogakou et al, 1998). In dieser Arbeit konnten mittels immunhistochemischer Färbungen ebenfalls die durch

Etoposid-Behandlung vermehrt auftretenden γ H2A.X-Foci im Zellkern nachgewiesen werden. Außerdem war auf proteinbiochemischer Ebene ein erhöhter γ H2A.X-Spiegel nach Behandlung mit Etoposid sowie Staurosporin zu beobachten. Nach Aphidicolin-Behandlung wurde hier kein Nachweis der γ H2A.X-Spiegel vorgenommen. Es ist aber bekannt, dass in Fibroblasten DNA-Strangbrüche durch Aphidicolin, welches die DNA-Reparatur blockiert, entstehen (Mirzayans et al, 1993). Daher konnte auch hier von der DNA-schädigenden Wirkung von Aphidicolin ausgegangen werden.

Nach Behandlung mit Etoposid, Aphidicolin und Staurosporin konnte neben der Induktion von DNA-Schäden ein erhöhter α -Synuclein-Proteinspiegel nachgewiesen werden. Die Untersuchung der α -Synuclein-Transkription ergab ebenfalls eine signifikante Hochregulation in Etoposid- und Aphidicolin-behandelten Zellen. Dies sprach dafür, dass die α -Synuclein-Expression spezifisch durch DNA-Strangbrüche induziert wurde und diese Induktion auf transkriptioneller Ebene erfolgte.

Eine Studie an HepG2-Zellen (Leberkarzinom) zeigte, dass 4-HNE zum Zellzyklusarrest führt und DNA-Doppelstrangbrüche zur Folge hat, was an der verstärkten γ H2A.X-Bildung erkennbar war (Chaudhary et al, 2013). In den hier durchgeführten Versuchen konnte anhand der γ H2A.X-Spiegel keine DNA-schädigende Wirkung von 4-HNE beobachtet werden, obwohl die Stressantwort der Zellen in Form von erhöhter HSP70-Expression und der Zellzyklusarrest durch einen ansteigenden p21-Spiegel eindeutig nachweisbar war. Möglicherweise ist das Ausbleiben der DNA-Schädigung durch die gewählten 4-HNE-Konzentrationen bedingt. In der Studie von Chaudhary (Chaudhary et al, 2013) wurden im Vergleich zu den hier eingesetzten 5 und 10 μ M höhere 4-HNE-Konzentrationen verwendet. Eine deutlich verstärkte Bildung von γ H2A.X war mittels Western Blot-Analyse jedoch erst ab einer Konzentration von 20 μ M erkennbar. Es ist daher möglich, dass in den IMR-90-Zellen eine höhere 4-HNE-Konzentration vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche induziert hätte, wodurch die Nachweisgrenze erreicht worden wäre. Des Weiteren könnte auch eine unterschiedliche Sensitivität der beiden Zelltypen (Karzinom-Zellen vs. Fibroblasten) einen Grund für das abweichende Ergebnis darstellen. Dieses Ergebnis bestärkte die Beobachtung, dass α -Synuclein insbesondere nach Induktion von DNA-Schäden verstärkt exprimiert wurde.

Der durch Etoposid, Aphidicolin und 4-HNE induzierte Anstieg von p21 macht neben DNA-Schädigung auch den Zellzyklusarrest als Ursache für die erhöhte α -Synuclein-Expression möglich. Ebenso könnte die erhöhte α -Synuclein-Menge in seneszenten Zellen ein Effekt des Zellzyklusarrestes darstellen. Interessanterweise führte die Verwendung von 4-HNE in der gewählten niedrigen Konzentration trotz der Stressantwort nicht zu einem Anstieg des α -Synuclein-Spiegels. Gleichzeitig blieb auch die durch DNA-Schäden induzierte Bildung von γ H2A.X aus. Weiterhin kann in seneszenten Zellen die α -Synuclein-Expression nach Etoposid-Behandlung noch weiter erhöht werden. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass in den verwendeten Fibroblasten die Expression von

α -Synuclein durch DNA-Schädigung induziert wurde, wobei der Zellzyklusarrest auch eine Rolle bei der erhöhten Expression spielte.

Toxische Agenzien können bei proliferierenden Zellen eine vorzeitige Seneszenz einleiten, die je nach Auslöser durch Zellzyklusarrest und morphologischen Veränderungen wie Zellvergrößerung, veränderte Zellform oder multiplen Nuclei gekennzeichnet ist (Kuilman et al, 2010). Auch in dieser Arbeit konnte mittels immunhistochemischer Färbung gezeigt werden, dass durch die Behandlung der IMR-90-Zellen mit Etoposid morphologische Veränderungen wie eine vergrößerte Zellform oder ein vergrößerter Zellkern und eine geringere Zelldichte durch das Eintreten des Zellzyklusarrestes auftreten. Zudem konnte sowohl nach Etoposid- als auch nach Aphidicolin-Behandlung bestätigt werden, dass der Zellzyklusarrest durch einen erhöhten Proteinspiegel von p21 induziert wurde, was in Einklang mit der Literatur steht (Cazzalini et al, 2010).

Die durch DNA-Schäden induzierte zelluläre Seneszenz, die in Verbindung mit der Hochregulation von α -Synuclein steht, ließ vermuten, dass die erhöhte Expression in seneszenten Zellen ebenfalls über DNA-Schäden bewirkt wurde, da DNA-Schäden im Verlauf der Alterung akkumulieren (Best, 2009; Hoeijmakers, 2009). Die erhöhten DNA-Schäden können durch mehrere Faktoren verursacht werden. Verschiedene mit der DNA-Reparatur assoziierten Prozesse weisen eine Veränderung im Alter auf. Hauptsächlich ist diese Veränderung auf eine geringere Aktivität der Reparatur-Enzyme wie z. B. der DNA-Polymerase β und der DNA-Ligase, die bei der BER involviert sind, zurückzuführen, was zu einer geringeren Reparatur-Kapazität führt (Krishna et al, 2005). Weiterhin kommt es zu einer veränderten Expression von Reparatur-Proteinen. Die Proteine Ku70 und Mre11 werden im Alter in geringeren Mengen exprimiert (Ju et al, 2006). Dies macht den NHEJ-Mechanismus, der für die Reparatur der DSB verantwortlich ist, in seneszenten Zellen weniger effizient und fehleranfälliger (Seluanov et al, 2004). Dagegen sind z. B. die bei der BER beteiligten Enzyme 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase und die Uracil DNA-Glykosylase im Alter hochreguliert (Lu et al, 2004). In dieser Arbeit konnte ein erhöhter Proteinspiegel für die an der DNA-Reparatur beteiligten Histon-Deacetylase SIRT6 nachgewiesen werden. Nach DNA-Schädigung ist SIRT6 verantwortlich für die Stabilisierung der für die DNA-Reparatur benötigten DNA-Proteinkinase c (PKC) an der Stelle des DNA-Schadens (McCord et al, 2009). Der hier beobachtete Anstieg des SIRT6-Spiegels deutete somit auf eine erhöhte DNA-Reparatur und damit erhöhte Schädigung der DNA in seneszenten Zellen hin. Diese Erkenntnis ließ somit auch in seneszenten Zellen eine Korrelation zwischen der Hochregulation von α -Synuclein und den akkumulierenden DNA-Schäden zu.

4.1.3 Mögliche Rolle von α -Synuclein bei der DNA-Reparatur

Die in seneszenten Zellen durch akkumulierte DNA-Schäden verursachte Hochregulation von α -Synuclein sowie die spezifisch nach der Induktion von DNA-Schäden vermittelte erhöhte Expression des Proteins macht eine protektive Funktion hinsichtlich der DNA-Reparatur denkbar. Die Beobachtung, dass α -Synuclein aufgrund von altersassoziierten oder Agenzien-vermittelten DNA-Schäden verstärkt exprimiert wurde, ließ vermuten, dass α -Synuclein eine protektive Funktion bei der DNA-Reparatur hatte. Dies wurde durch den Nachweis unterstützt, dass die Überexpression von α -Synuclein Etoposid-vermittelte DNA-Schäden reduzierte und die siRNA-vermittelte Reduktion von α -Synuclein die DNA-Schäden erhöhte.

Eine protektive Wirkung von α -Synuclein in Bezug auf DNA-Schädigung wurde bereits in anderen Studien beobachtet. So konnte nach Überexpression von α -Synuclein eine verstärkte Resistenz gegenüber Fe(II)-induzierten DNA-Schäden sowie eine verminderte DNA-Fragmentierung durch Staurosporin und damit ein Schutz auch vor schwerwiegenden DNA-Schäden gezeigt werden (Alves Da Costa et al, 2002; Martin et al, 2003). Dies wird in einer Studie von Gomez-Santos bestätigt, in der die α -Synuclein-Spiegel durch MPP⁺ (1-Methyl-4-Phenylpyridinium), welches DNA-Schäden und Apoptose induziert, ansteigen und eine zytoprotektive Wirkung des Proteins beobachtet wird (Gomez-Santos et al, 2002). Weiterhin ist bekannt, dass α -Synuclein eine Chaperonfunktion besitzt und homolog zu der Chaperonfamilie 14-3-3 ist (Ostrerova et al, 1999). 14-3-3-Chaperone binden an verschiedene Proteine, unter anderem die Proteinkinase Chk1 oder die Exonuklease 1 (hEXO1), die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Andersen et al, 2012; Chen et al, 1999). Da α -Synuclein eine 40%ige Homologie zu den 14-3-3-Chaperonen aufweist und funktionelle Eigenschaften (wie die Bindung verschiedener Proteine) mit diesen teilt, ist auch für α -Synuclein ein vergleichbarer Einfluss auf die DNA-Reparatur denkbar.

Die beobachtete protektive Wirkung von α -Synuclein auf den Grad des DNA-Schadens machte die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des Proteins insbesondere nach DNA-Schädigung interessant.

Proteine können als Antwort auf DNA-Schäden ihre Position innerhalb der Zelle verändern, um Reparaturprozesse direkt oder indirekt zu unterstützen (Tembe & Henderson, 2007). Die Bewegung der Proteine ist dabei von dem Typ des DNA-Schadens abhängig. Verschiedene Proteine werden dabei aus dem Zellkern exportiert, um dann funktionell z. B. mit Mitochondrien zu interagieren (Feng et al, 2004; Song et al, 2011). Ebenso kommt es zu einer entgegengesetzten Bewegung von Proteinen vom Zytoplasma in den Zellkern, wo sie direkt an der Stelle des Schadens wirken (Tembe & Henderson, 2007). Durch die Ansammlung verschiedener Faktoren in den Bereichen des DNA-Schadens sind diese mittels Immunhistochemie als DNA-Reparatur-Foci zu erkennen (Rogakou et al,

1998). Die Translokation von HSP70 vom Zytoplasma in den Zellkern konnte nach einer durch H_2O_2 verursachten DNA-Schädigung beobachtet werden, wobei HSP70 eine protektive Aufgabe im Zellkern zugeschrieben wird (Abe et al, 1995). Auch für das Protein S100A11, welches direkt an der DNA-Reparatur beteiligt ist, wurde diese subzelluläre Veränderung wahrgenommen und eine mögliche Rolle dieses Proteins bei der Regulation des Zellzyklus beobachtet (Gorsler et al, 2010). Weiterhin verändert das die Parkinson-Krankheit auslösende Protein Parkin nach DNA-Schädigung seine Position in den Zellkern, wo eine unterstützende Wirkung auf die DNA-Reparatur vermutet wird (Kao, 2009). Übereinstimmend damit wurde auch für α -Synuclein eine Translokation in den Zellkern als Stressantwort beobachtet (Monti et al, 2010; Siddiqui et al, 2012). So wiesen verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien nach der Behandlung mit dem Pestizid Paraquat, dem Zytostatikum Hydroxyurea oder Eisen eine Anreicherung von α -Synuclein im Zellkern nach (Goers et al, 2003; Liu et al, 2011; Sangchot et al, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals in IMR-90-Fibroblasten eine verstärkte Migration von α -Synuclein nach DNA-Schädigung beobachtet werden. In jungen IMR-90-Zellen wurde ein verstärktes Vorkommen von α -Synuclein in der Kernfraktion nach Etoposid- und Staurosporin-Behandlung nachgewiesen. Die nach DNA-Schädigung bewirkte Translokation des Proteins in den Zellkern unterstützte den vermuteten Einfluss von α -Synuclein auf die DNA-Reparatur.

Es gibt zahlreiche Studien, die protektive Funktionen von α -Synuclein im Zellkern beschreiben und eine Rolle des Proteins bei der DNA-Reparatur unterstützen. So wurde gezeigt, dass α -Synuclein nach Behandlung mit Paraquat und Hydroxyurea in den Zellkern transloziert und durch die Bindung an Histone deren Acetylierung verstärkt (Goers et al, 2003; Liu et al, 2011). Die Modifikation von Histonen stellt einen wichtigen regulatorischen Mechanismus der Transkription dar (An, 2007). Die Acetylierung und die Deacetylierung sind Prozesse, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (Gong & Miller, 2013). Durch die Acetylierung von Histonen wird die Interaktion zwischen DNA und Nukleosomen gelockert, was die DNA zugänglicher für Transkriptionsfaktoren macht. Dies zeigt, dass α -Synuclein einen Einfluss auf epigenetische Modifikationen besitzt und für regulatorische Prozesse der Zelle wie die Transkription von Genen verantwortlich ist. Dies wird dadurch bestärkt, dass α -Synuclein sowohl an freie DNA als auch an Chromatin binden kann und somit durch die Bindung an zahlreiche Promotorregionen die Transkription vieler Gene beeinflusst (Cherny et al, 2004; Hegde & Jagannatha Rao, 2003; Hegde & Rao, 2007; Padmaraju et al, 2011; Siddiqui et al, 2012). An Neuroblastom-Zellen wurde der Einfluss eines α -Synuclein-*Knockdown* auf die Expression verschiedener Gene untersucht. Bei dieser Analyse konnte eine Expressionsveränderung von insgesamt 361 Genen beobachtet werden. Dabei lagen 82 hochreguliert und 279 herunterreguliert

vor, die unter anderem für transkriptionelle Regulation und den Zellzyklus verantwortlich sind (Habig et al, 2009). Damit könnte α -Synuclein die Transkription von protektiven Genen unterstützen. Ein Beispiel dafür stellt eine Studie von Liu dar, in der gezeigt werden konnte, dass α -Synuclein die Transkriptionsrate der Ribonukleotidreduktase (RNR) verstärkt (Liu et al, 2011). RNR stellt ein Enzym für die Synthese von DNA-Bausteinen dar und ist daher essentiell für Prozesse wie die Zellteilung oder die DNA-Reparatur (Elledge et al, 1993).

In den hier untersuchten seneszenten Zellen war der α -Synuclein-Spiegel altersbedingt erhöht und stieg nach Etoposid-Behandlung noch weiter an. Im Vergleich zu jungen Zellen war trotz dieser erhöhten Proteinmenge ein signifikant geringerer Anteil von α -Synuclein im Zellkern nachweisbar als in den jungen Zellen. Somit verblieb in den seneszenten Zellen nach der Induktion von DNA-Schäden der größte Anteil des Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion. Die in seneszenten Zellen verringerte Translokation von α -Synuclein in den Zellkern könnte bedeuten, dass das Protein in diesen Zellen die protektive Wirkung nicht mehr ausüben kann und damit zur weiteren Akkumulation der DNA-Schäden in seneszenten Zellen beiträgt.

Für seneszente humane Fibroblasten wurde bereits beschrieben, dass der Transport verschiedener Proteine in den Zellkern deutlich vermindert ist (Kim et al, 2011). Somit war denkbar, dass während der zellulären Alterung ein veränderter Kernimport von α -Synuclein stattfand und das Protein somit verstärkt in der zytoplasmatischen Fraktion verblieb. Da α -Synuclein mit 14 kDa ein sehr kleines Protein darstellt, ist sowohl in jungen als auch in seneszenten Zellen eine Diffusion des Proteins durch die Kernmembran möglich. α -Synuclein wird außerdem mithilfe des nukleären Transportproteins Importin- α in den Zellkern transportiert (Ma et al, 2013). Die Proteinspiegel zahlreicher Transportproteine wie RanBP1, Nukleoporine, Importine oder Exportine sind während der zellulären Alterung herunterreguliert und damit ist der zytokleäre Transport in der Zelle altersbedingt herabgesetzt (Kim et al, 2012; Kim et al, 2010; Pujol et al, 2002). Diese altersassoziierte Abnahme der Transportproteine hängt mit dem verringerten Spiegel des Transkriptionsfaktors SP1 zusammen, der für die Expression der Transportproteine verantwortlich ist (Kim et al, 2012). Eine verringerte Importin- α -Expression konnte auch in gealterten Epithel-Zellen des Herzventrikels bestätigt werden (Ahluwalia et al, 2010). Die in seneszenten Zellen verminderte Verfügbarkeit von Importin- α könnte somit für die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Lokalisation von α -Synuclein im Zytoplasma verantwortlich gewesen sein.

4.1.4 Regulation der α -Synuclein-Expression über den ERK1/2-MAPK-Signalweg

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass α -Synuclein durch den ERK1/2-MAPK-Signalweg reguliert wird. Durch verschiedene Studien ist bekannt, dass eine Verbindung zwischen der

α -Synuclein-Expression und dem ERK1/2-MAPK-Signalweg besteht (Clough & Stefanis, 2007; Iwata et al, 2001a). Außerdem wurde bereits beschrieben, dass der ERK1/2-MAPK-Signalweg in Fibroblasten nach Induktion von DNA-Schäden durch Etoposid und andere Agenzien aktiviert wird. In Abhängigkeit von der Schwere des DNA-Schadens führt der ERK1/2-MAPK-Signalweg entweder zu einem Zellzyklusarrest oder der Apoptose (Tang et al, 2002). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte neben der signifikant verstärkten α -Synuclein-Expression der ERK1/2-MAPK-Signalweg mit den DNA-schädigenden Agenzien Etoposid und Aphidicolin aktiviert werden, was durch erhöhte Spiegel an phosphoryliertem ERK1/2 mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen wurde. Der beobachtete Etoposid- und Aphidicolin-induzierte Zellzyklusarrest könnte, wie auch bei Tang beschrieben (Tang et al, 2002), durch den ERK1/2-MAPK-Signalweg verursacht worden sein. Die Inhibition der MEK1/2-Aktivität mit U0126 führte sowohl zu einer verringerten ERK1/2-Phosphorylierung als auch zu einer Abnahme des α -Synuclein-Spiegels. Interessanterweise konnte in den verwendeten Fibroblasten die durch Etoposid und Aphidicolin induzierte α -Synuclein-Expression durch Behandlung mit dem MEK-Inhibitor teilweise verhindert werden. Dies steht im Einklang mit einer Studie mit Ratten Phäochromozytom-Zellen PC12, in der die durch Mangan erzeugte Hochregulation von α -Synuclein durch den MEK1-Inhibitor PD98059 gehemmt werden konnte (Cai et al, 2010). Die Hemmung der α -Synuclein-Expression durch U0126 alleine sowie nach Induktion von DNA-Schäden erfolgte nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf transkriptioneller Ebene. Dies wurde ebenfalls in einer Studie von Clough und Stefanis in PC12-Zellen beobachtet (Clough & Stefanis, 2007). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass in jungen IMR-90-Fibroblasten die transkriptionelle Regulation von α -Synuclein nach genotoxischem Stress über den ERK1/2-MAPK-Signalweg erfolgte. Die durch DNA-Schäden induzierte erhöhte Expression von α -Synuclein wurde nicht vollständig durch U0126 rückgängig gemacht, wohingegen U0126 die Aktivität des ERK1/2-Signalweges vollständig inhibiert. Es ist bekannt, dass die α -Synuclein-Expression auch über den PI3K-Akt- und den JNK-Signalweg reguliert werden kann (Clough & Stefanis, 2007; Kim et al, 2013). Daher wäre auch in den verwendeten Fibroblasten die Regulation über weitere Signalwege denkbar. In der Literatur wird sogar eine protektive Wirkung von α -Synuclein als Antwort auf toxische Stimuli auch mit der Aktivierung des PI3K/Akt-Kinase-Signalweges (Seo et al, 2002) oder mit der Inhibition des JNK-Signalweges (Hashimoto et al, 2002) in Verbindung gebracht.

Ein wichtiger Faktor für die initialen Schritte nach der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen stellt die Proteinkinase ATM dar. ATM bewirkt die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- κ b (Shiloh, 2003). Es ist bekannt, dass die ERK-Aktivierung nach Etoposid-induzierter DNA-Schädigung von ATM abhängig ist (Tang et al, 2002). Es ist somit möglich, dass die DNA-Schaden-induzierte Hochregulation von α -Synuclein ebenfalls in Abhängigkeit einer Aktivierung von NF- κ b erfolgte.

Die über den ERK1/2-MAPK-Signalweg vermittelte Regulation von α -Synuclein nach genotoxischem Stress führte zu der Frage, ob dieser Signalweg auch in seneszenten Zellen die Expression von α -Synuclein reguliert. Unter Verwendung des MEK-Inhibitors U0126 konnte in dieser Arbeit die Aktivität des MAPK-Signalweges, gemessen an dem Verhältnis der phosphorylierten ERK1/2- zu den totalen ERK1/2-Spiegeln, gesenkt werden. In einer Studie von Clough und Stefanis konnte durch die Inhibition mit U0126 in PC12-Zellen eine konzentrationsabhängige Abnahme des α -Synuclein-Spiegels beobachtet werden (Clough & Stefanis, 2007). Auch in seneszenten IMR-90- und WI-38-Zellen war eine Abnahme der α -Synuclein-Expression in Abhängigkeit von der U0126-Konzentration festzustellen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der ERK1/2-MAPK-Signalweg auch in seneszenten Fibroblasten einen Einfluss auf die α -Synuclein-Expression hatte.

In dieser Arbeit wurde, wie auch schon mehrfach in der Literatur beschrieben (Kim et al, 2000; Lim et al, 2000; Tresini et al, 2001), gezeigt, dass der ERK1/2-MAPK-Signalweges in seneszenten Zellen eine geringere Aktivität besaß. Daher konnte in diesen Zellen die erhöhte α -Synuclein-Expression nur teilweise über diesen Signalweg erfolgen. Vergleichbar zu jungen Zellen könnten somit auch in seneszenten Zellen weitere Signalwege wie der PI3K-Akt- oder der JNK-Signalweg an der Hochregulation von α -Synuclein beteiligt gewesen sein.

Wie in jungen Zellen gezeigt wurde, wird die α -Synuclein-Expression nach DNA-Schädigung über den ERK1/2-MAPK-Signalweg vermittelt. Es ist daher möglich, dass die erhöhte Expression von α -Synuclein während der zellulären Seneszenz durch die akkumulierten DNA-Schäden ausgelöst wurde und teilweise über den ERK1/2-MAPK-Signalweg verlief.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass obwohl α -Synuclein hauptsächlich in den Neuronen exprimiert wird und dort eine wesentliche Rolle bei präsynaptischen Funktionen spielt, die Lokalisation in anderen Geweben ebenfalls von Bedeutung ist. Auch hier scheint die Expression des Proteins eine funktionelle Bedeutung zu haben. In den untersuchten Fibroblasten sind vermutlich die in der Alterung akkumulierenden DNA-Schäden für die Hochregulation von α -Synuclein verantwortlich. Möglicherweise ist α -Synuclein ein altersspezifischer Faktor, der versucht, die Zelle vor den Folgen der DNA-Schäden zu schützen. Dabei scheint insbesondere die Lokalisation des Proteins im Zellkern von entscheidender Bedeutung zu sein.

In den von der Parkinson-Krankheit betroffenen Neurone der Substantia nigra konnte eine erhöhte α -Synuclein-Expression beobachtet werden (Rockenstein et al, 2001). Interessanterweise wurden in dieser Gehirnregion bei Patienten der Parkinson-Krankheit auch erhöhte oxidative DNA-Schäden nachgewiesen (Alam et al, 1997). Durch die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die Hochregulation von α -Synuclein als Folge von DNA-Schäden und der möglichen Rolle bei der DNA-Reparatur, könnte auch in diesen Neuronen solche Korrelation angenommen werden.

4.2 Regulation des ERK1/2-MAPK-Signalweges in seneszenten humanen Fibroblasten

Da α -Synuclein sowohl nach DNA-Schädigung als auch in seneszenten Zellen über den ERK1/2-MAPK-Signalweg reguliert wurde, wurde dieser Signalweg näher betrachtet. Die Aktivierung dieser Signalkaskade kann durch genotoxischen Stress wie DNA-Schäden (Tang et al, 2002) aber auch über Wachstumsfaktoren erfolgen. Es ist aus früheren Studien bekannt, dass seneszente humane Fibroblasten eine verringerte Aktivität des ERK1/2-MAPK-Signalweges aufweisen (Kim et al, 2000; Lim et al, 2000; Tresini et al, 2001), was die verminderte Antwort der Zelle auf mitogene Stimuli wie Wachstumsfaktoren erklärt. Auch in anderen Zelltypen wie gealterten Hepatozyten von Ratten (Hutter et al, 2000; Liu et al, 1996) oder Lymphozyten alter Mäuse (Gorgas et al, 1997) ist dieser Signalweg abgeschwächt. Deshalb war interessant, ob in den verwendeten Fibroblasten die Hochregulation von α -Synuclein auch mit einer verstärkten Aktivität dieses Signalweges zusammenhieng. Übereinstimmend mit einer Studie von Tresini konnte ein erhöhter Spiegel an inaktivem ERK1/2 in serumkultivierten seneszenten Zellen beobachtet werden (Tresini et al, 2001), wohingegen die Menge an aktivem, phosphoryliertem ERK1/2 in jungen und seneszenten Zellen unverändert war. Bei dem Abgleich der phosphorylierten ERK1/2-Spiegel auf totale ERK1/2-Spiegel war eine signifikante Abnahme an aktivem ERK1/2 erkennbar, was eine verringerte Aktivierung der ERK1/2-Kinasen bedeutet. Neben ERK1/2 konnte auch eine Abnahme der in der Phosphorylierungskaskade vorangeschalteten MEK1/2-Kinasen in seneszenten Zellen beobachtet werden, wobei auch hier die totalen MEK1/2-Spiegel in seneszenten Zellen erhöht waren. Die Akkumulation der totalen ERK1/2-Spiegel in seneszenten Zellen war damit auf die verringerte Aktivität von MEK1/2 zurückzuführen, die nur noch eine geringe Menge an ERK1/2 aktivieren können. Die erhöhten Spiegel an MEK1/2 ließen darauf schließen, dass auch die Aktivität der diesen Kinasen vorangeschalteten MAPK-Kinasen-Kinasen verringert war. Die Ergebnisse bestätigten somit die in der Literatur schon mehrfach belegte Abnahme der Aktivität des ERK1/2-MAPK-Signalweges in seneszenten IMR-90-Zellen. Durch die erhöhte Expression von ERK1/2 und MEK1/2 können seneszenten Zellen jedoch weiterhin gut auf Stimuli reagieren.

Die Akkumulation von DNA-Schäden in seneszenten Zellen schien somit im Gegenteil zu den induzierten DNA-Schäden keine verstärkte Aktivierung des ERK1/2-MAPK-Signalweges zu bewirken. Die Erhöhung der ERK1/2-Expression bei gleich bleibendem p-ERK1/2-Spiegel könnte verschiedene Ursachen haben. Die Akkumulation der totalen ERK1/2-Kinase-Spiegel in seneszenten Fibroblasten könnte auf eine verstärkte Dephosphorylierung zurückzuführen sein, die durch eine erhöhte Aktivität von MAPK-Phosphatasen (MPK) begünstigt wurde. Die Dephosphorylierung von ERK1/2 erfolgt spezifisch durch MKP-3 (Muda et al, 1996a; Muda et al, 1996b). In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Untersuchung der Proteinspiegel von MKP-3 in jungen und seneszenten IMR-90-Zellen

übereinstimmend mit einer Studie von Torres (Torres et al, 2003) eine signifikante Zunahme des MKP-3-Spiegels in seneszenten IMR-90-Zellen beobachtet werden. Da der Abbau von MKP-3 hauptsächlich über das Proteasom erfolgt (Torres et al, 2003), könnte die abnehmende proteasomale Aktivität während der zellulären Seneszenz (Gamerding et al, 2009; Sitte et al, 2000) für die erhöhten Proteinspiegel von MKP-3 verantwortlich gewesen sein. Die Translokation von aktiviertem ERK1/2 in den Zellkern ist essentiell für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die damit einhergehende Transkription von Genen, die die Zellproliferation oder Differenzierung als Antwort auf Mitogene und Wachstumsfaktoren regulieren (Brunet et al, 1999). In seneszenten Zellen ist weniger phosphoryliertes und damit aktives ERK1/2 im Zellkern vorhanden (Lorenzini et al, 2002; Tresini et al, 2001). Ein Grund für diese Abnahme könnte ein verringerter Import von aktivem ERK1/2 in den Zellkern darstellen (Lim et al, 2000). In WI-38-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Aktivität und die Menge der MAPK-Phosphatase MKP-2 in seneszenten Zellen deutlich erhöht ist (Torres et al, 2003). Die Dephosphorylierung von ERK1/2 durch MKP-2 erfolgt vorwiegend im Zellkern (Torres et al, 2003) und kann somit ebenfalls für die Abnahme von aktivem ERK1/2 im Zellkern verantwortlich sein. MKP-3 ist dagegen fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, was somit bedeutet, dass eine Inaktivierung von ERK1/2 sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma stattfindet (Camps et al, 1998). Weiterhin wird die Phosphorylierung von ERK1/2 durch die Bindung von α -Synuclein beeinflusst und teilweise verhindert (Iwata et al, 2001b; Ostrerova et al, 1999). Durch die erhöhten α -Synuclein- und ERK1/2-Spiegel in seneszenten Zellen könnten somit mehr ERK1/2-Proteine gebunden sein, was die Menge von p-ERK1/2 reduzieren würde. Die Bindung an α -Synuclein könnte damit einen Einfluss auf die Translokation von aktivem ERK in den Zellkern und damit auch auf die Aktivität des Signalweges besessen haben.

4.3 Ausblick

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass α -Synuclein in jungen Zellen nach Induktion von DNA-Strangbrüchen hochreguliert und infolge dessen die Translokation des Proteins in den Zellkern bewirkt wird. Es wird daher vermutet, dass die Hochregulation von α -Synuclein in seneszenten Fibroblasten ebenfalls eine Folge der Akkumulation von DNA-Schäden ist. Die Beobachtung, dass die Überexpression von α -Synuclein Etoposid-vermittelte DNA-Schäden reduziert und die Herunterregulation von α -Synuclein die induzierten DNA-Schäden erhöht, lassen die Vermutung einer protektiven Funktion von α -Synuclein im Zellkern zu. Die genaue Funktion von α -Synuclein im Zellkern konnte abschließend jedoch nicht aufgeklärt werden. In jungen Zellen könnte α -Synuclein im Zellkern die Transkription von protektiven Genen beeinflussen oder möglicherweise direkt an DNA-Reparatur-Prozessen beteiligt sein. In seneszenten Zellen verbleibt α -Synuclein nach DNA-Schädigung

weitestgehend im Zytoplasma, was möglicherweise an einem herabgesetzten Transport in den Zellkern liegt. Das fehlende Protein im Zellkern kann somit die mögliche schützende Funktion nicht mehr ausüben. Für zukünftige Studien wäre es daher interessant potentielle Faktoren, die zu der protektiven Wirkung von α -Synuclein beitragen, zu analysieren. Weiterhin könnte die Ursache für die in seneszenten Zellen verringerte Translokation in den Zellkern weiterführend evaluiert werden. Interessant wäre daher auch die Untersuchung der Wirkung von α -Synuclein im Hinblick auf DNA-Schäden durch die Expression von α -Synuclein mit einer Kernlokalisierungssequenz, die in seneszenten Zellen eine Kernlokalisierung von α -Synuclein bewirkt. Des Weiteren wäre die Untersuchung relevant, ob während der zellulären Alterung weitere Signalwege für die die Hochregulation von α -Synuclein von Bedeutung sind.

5 Zusammenfassung

α -Synuclein wird durch Mutationen sowie der Ausbildung von Proteinaggregaten namens Lewy-Körperchen mit der Entstehung der altersassoziierten Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht. Sowohl familiäre als auch sporadische Fälle sind durch erhöhte α -Synuclein-Spiegel gekennzeichnet. In familiären Fällen wurden Multiplikationen des α -Synuclein-Gens als Ursache für die erhöhte Expression aufgedeckt. In sporadischen Fällen stellt die Alterung den entscheidenden Risikofaktor für die Entstehung der Krankheit dar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation von α -Synuclein während der zellulären Alterung in humanen Fibroblasten untersucht. In seneszenten Zellen konnte ein Anstieg der α -Synuclein-Expression nachgewiesen werden, der jedoch die Löslichkeit des Proteins nicht veränderte. Damit scheint die zelluläre Alterung *per se* nicht für die Aggregation des Proteins, wie sie in Form von Lewy-Körperchen bei z. B. Patienten der Parkinson-Krankheit beobachtet wird, verantwortlich zu sein. Möglicherweise ist die Hochregulation von α -Synuclein eine Folge der Akkumulation von DNA-Schäden in den seneszenten Zellen. Diese Korrelation konnte in jungen Zellen nach dem Einsatz verschiedener DNA-schädigender Agenzien bestätigt werden. Die Untersuchung des Regulationsmechanismus ergab, dass die erhöhte Expression von α -Synuclein in Folge von DNA-Schäden über den ERK1/2-MAPK-Signalweg vermittelt wird. In seneszenten Zellen konnte ebenfalls ein Einfluss dieses Signalweges auf die Expression von α -Synuclein beobachtet werden, allerdings scheint dieser nicht alleinig für die Hochregulation verantwortlich zu sein. Des Weiteren ergab die Betrachtung des γ H2A.X-Spiegels nach Induktion von DNA-Schäden, dass α -Synuclein möglicherweise eine protektive Funktion besitzt, da dessen Überexpression zu einer verringerten und die Herunterregulation zu einer vermehrten DNA-Schädigung führte. Die Analyse der subzellulären Lokalisation von α -Synuclein ergab außerdem, dass es in jungen Zellen nach der Induktion von DNA-Schäden zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern kommt. Diese Translokation war in seneszenten Zellen verringert. Dies lässt vermuten, dass α -Synuclein in jungen Zellen nach DNA-Schädigung durch den ERK1/2-MAPK-Signalweg hochreguliert wird und durch die Translokation in den Zellkern möglicherweise die Transkription von protektiven Genen beeinflusst oder an DNA-Reparatur-Prozessen beteiligt ist. In seneszenten Zellen ist das Protein zwar deutlich stärker exprimiert, der Transport in den Zellkern jedoch verringert, wodurch die protektive Wirkung im Zellkern herabgesetzt wäre.

6 Summary

α -Synuclein is linked to the age-associated Parkinson's disease because of mutations in the α -Synuclein gene (*SNCA*) and protein aggregates named Lewy bodies. Both the familial and the sporadic form of the disease are characterized by an increase in α -Synuclein protein. In familial Parkinson's disease the increased expression is caused by *SNCA* multiplications whereas in sporadic cases aging represents the major risk factor. Therefore it was interesting to investigate the expression of α -Synuclein during the process of cellular aging. In senescent cells an increase in α -Synuclein expression was detected which had no influence on the solubility of the protein. This implicated that aging *per se* is not responsible for the aggregation of the protein as it is the case in for example Parkinson's disease in form of Lewy bodies. Possibly, the increase of α -Synuclein is a consequence of the accumulation of DNA damage during cellular senescence. This correlation was approved in young IMR-90 cells after treatment with DNA damaging agents. Analysis of the regulation mechanism in young cells identified the ERK1/2-MAPK-signalling pathway as mediator for the increase of α -Synuclein expression due to DNA damage. The elevated α -Synuclein level in senescent cells was influenced by the ERK1/2-MAPK pathway as well even though other pathways may also be involved in the up-regulation of the protein. The examination of the γ H2A.X level due to the induction of DNA damage suggested a protective role for α -Synuclein as overexpression or knockdown of α -Synuclein led to a decreased or increased extent of DNA damage, respectively. The investigation of the subcellular distribution showed the translocation of α -Synuclein into the nucleus after the induction of DNA damage in young cells. In contrast, this translocation was reduced in senescent cells. These data implicate that in young cells the α -Synuclein expression is elevated in consequence of DNA damage through the ERK1/2-MAPK-signalling pathway and that the translocation into the nucleus influences the transcription of protective genes or processes in DNA repair. In senescent cells the translocation into the nucleus is decreased what may result in loss of protective function of the protein.

7 Literaturverzeichnis

Abe T, Konishi T, Hirano T, Kasai H, Shimizu K, Kashimura M, Higashi K (1995) Possible correlation between DNA damage induced by hydrogen peroxide and translocation of heat shock 70 protein into the nucleus. *Biochemical and biophysical research communications* 206: 548-555

Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A et al (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239-252

Ahluwalia A, Narula J, Jones MK, Deng X, Tarnawski AS (2010) Impaired angiogenesis in aging myocardial microvascular endothelial cells is associated with reduced importin alpha and decreased nuclear transport of HIF1 alpha: mechanistic implications. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 61: 133-139

Ahn TB, Kim SY, Kim JY, Park SS, Lee DS, Min HJ, Kim YK, Kim SE, Kim JM, Kim HJ et al (2008) alpha-Synuclein gene duplication is present in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70: 43-49

Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B (1997) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *Journal of neurochemistry* 69: 1196-1203

Alves Da Costa C, Paitel E, Vincent B, Checler F (2002) Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *The Journal of biological chemistry* 277: 50980-50984

An W (2007) Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation. *Sub-cellular biochemistry* 41: 351-369

Andersen SD, Keijzers G, Rampakakis E, Engels K, Luhn P, El-Shemerly M, Nielsen FC, Du Y, May A, Bohr VA et al (2012) 14-3-3 checkpoint regulatory proteins interact specifically with DNA repair protein human exonuclease 1 (hEXO1) via a semi-conserved motif. *DNA repair* 11: 267-277

Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343: 651-653

Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J et al (2013) Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28: 811-813

Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American journal of pathology* 152: 879-884

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM (2011) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479: 232-236

Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D (2000) Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. *Italian Longitudinal Study on Aging. Neurology* 55: 1358-1363

Baldwin EL, Osheroff N (2005) Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents* 5: 363-372

- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ (2011) alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477: 107-110
- Behl C, Ziegler C (2014) *Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease*: Springer Verlag
- Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y (1994) Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental cell research* 211: 314-321
- Best BP (2009) Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. *Rejuvenation research* 12: 199-208
- Beyer K (2006) Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol* 112: 237-251
- Beyer K, Ariza A (2013) alpha-Synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration. *Molecular neurobiology* 47: 509-524
- Bodles AM, Guthrie DJ, Greer B, Irvine GB (2001) Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity. *Journal of neurochemistry* 78: 384-395
- Bose C, Bhuvaneshwaran C, Udupa KB (2004) Altered mitogen-activated protein kinase signal transduction in human skin fibroblasts during in vitro aging: differential expression of low-density lipoprotein receptor. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 59: 126-135
- Brown DR (2007) Interactions between metals and alpha-synuclein--function or artefact? *The FEBS journal* 274: 3766-3774
- Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO journal* 18: 664-674
- Buchman VL, Hunter HJ, Pinon LG, Thompson J, Privalova EM, Ninkina NN, Davies AM (1998) Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 9335-9341
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 276: 42462-42467
- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R et al (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 8797-8807
- Cai T, Yao T, Zheng G, Chen Y, Du K, Cao Y, Shen X, Chen J, Luo W (2010) Manganese induces the overexpression of alpha-synuclein in PC12 cells via ERK activation. *Brain research* 1359: 201-207
- Campisi J (1996) Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 84: 497-500
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* 8: 729-740
- Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C, Arkininstall S (1998) Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. *FEBS letters* 425: 271-276

- Camps M, Nichols A, Arkinstall S (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14: 6-16
- Canron MH, Perret M, Vital A, Bezard E, Dehay B (2012) Age-dependent alpha-synuclein aggregation in the *Microcebus murinus* lemur primate. *Scientific reports* 2: 910
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 75: 50-83
- Casar B, Pinto A, Crespo P (2008) Essential role of ERK dimers in the activation of cytoplasmic but not nuclear substrates by ERK-scaffold complexes. *Molecular cell* 31: 708-721
- Caunt CJ, Keyse SM (2013) Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *The FEBS journal* 280: 489-504
- Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA, Prosperi E (2010) Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutation research* 704: 12-20
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ et al (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296: 922-927
- Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, Hammer RE, Battaglia G, German DC, Castillo PE et al (2004) Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14966-14971
- Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM, Sudhof TC (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123: 383-396
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M et al (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1167-1169
- Chaudhary P, Sharma R, Sahu M, Vishwanatha JK, Awasthi S, Awasthi YC (2013) 4-Hydroxynonenal induces G2/M phase cell cycle arrest by activation of the ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related protein (ATR)/checkpoint kinase 1 (Chk1) signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 288: 20532-20546
- Chaudhuri KR, Schapira AH (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet neurology* 8: 464-474
- Chen JH, Hales CN, Ozanne SE (2007) DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic acids research* 35: 7417-7428
- Chen L, Liu TH, Walworth NC (1999) Association of Chk1 with 14-3-3 proteins is stimulated by DNA damage. *Genes & development* 13: 675-685
- Chen X, de Silva HA, Pettenati MJ, Rao PN, St George-Hyslop P, Roses AD, Xia Y, Horsburgh K, Ueda K, Saitoh T (1995) The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics* 26: 425-427
- Cheng F, Vivacqua G, Yu S (2011) The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *Journal of chemical neuroanatomy* 42: 242-248

- Cherny D, Hoyer W, Subramaniam V, Jovin TM (2004) Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of alpha-synuclein in vitro and is associated with the mature fibrils: an electron microscopy study. *Journal of molecular biology* 344: 929-938
- Chiba-Falek O, Lopez GJ, Nussbaum RL (2006) Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 21: 1703-1708
- Chiba-Falek O, Nussbaum RL (2001) Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat upstream of the alpha-synuclein gene (SNCA) on transcription in a cell culture luciferase reporter system. *Human molecular genetics* 10: 3101-3109
- Chin L (2003) The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nature reviews Cancer* 3: 559-570
- Chu Y, Kordower JH (2007) Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiology of disease* 25: 134-149
- Clayton DF, George JM (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends in neurosciences* 21: 249-254
- Clayton DF, George JM (1999) Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of neuroscience research* 58: 120-129
- Clough RL, Stefanis L (2007) A novel pathway for transcriptional regulation of alpha-synuclein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21: 596-607
- Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258: 478-480
- Crews CM, Erikson RL (1992) Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 8205-8209
- Cristofalo VJ (1988) Cellular biomarkers of aging. *Experimental gerontology* 23: 297-307
- Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M (2004) Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev* 125: 827-848
- Cristofalo VJ, Volker C, Francis MK, Tresini M (1998) Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 8: 43-80
- d'Adda di Fagagna F (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews Cancer* 8: 512-522
- da Costa CA, Ancolio K, Checler F (2000) Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 --> Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *The Journal of biological chemistry* 275: 24065-24069
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of biological chemistry* 273: 9443-9449
- Davis T, Wyllie FS, Rokicki MJ, Bagley MC, Kipling D (2007) The role of cellular senescence in Werner syndrome: toward therapeutic intervention in human premature aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100: 455-469

- De Bont R, van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19: 169-185
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA (1997) Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 62: 10-15
- Desplats P, Spencer B, Crews L, Pathel P, Morvinski-Friedmann D, Kosberg K, Roberts S, Patrick C, Winner B, Winkler J et al (2012) alpha-Synuclein induces alterations in adult neurogenesis in Parkinson disease models via p53-mediated repression of Notch1. *The Journal of biological chemistry* 287: 31691-31702
- Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK et al (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet neurology* 8: 1150-1157
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O et al (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9363-9367
- Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Jr., Browne G (2001) Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *Journal of molecular biology* 307: 1061-1073
- Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB, Navas TA (1993) DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 15: 333-339
- Emre M (2003) Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet neurology* 2: 229-237
- Eriksen JL, Przedborski S, Petrucelli L (2005) Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine* 11: 91-96
- Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D et al (2004) Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Annals of neurology* 55: 174-179
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F et al (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry* 273: 18623-18632
- Feany MB, Bender WW (2000) A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 404: 394-398
- Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain : a journal of neurology* 114 (Pt 5): 2283-2301
- Feng Z, Kachnic L, Zhang J, Powell SN, Xia F (2004) DNA damage induces p53-dependent BRCA1 nuclear export. *The Journal of biological chemistry* 279: 28574-28584
- Fortin DL, Troyer MD, Nakamura K, Kubo S, Anthony MD, Edwards RH (2004) Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 6715-6723
- Freitas AA, de Magalhaes JP (2011) A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation research* 728: 12-22

- Friedberg EC, McDaniel LD, Schultz RA (2004) The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Current opinion in genetics & development* 14: 5-10
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40: 617-647
- Gamerding M, Hajjeva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO journal* 28: 889-901
- Gates KS (2009) An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chemical research in toxicology* 22: 1747-1760
- George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15: 361-372
- Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W (2011) DNA damage response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3: a000745
- Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE (1992) Phosphorylation of transcription factor p2TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358: 414-417
- Gillette JS, Bloomquist JR (2003) Differential up-regulation of striatal dopamine transporter and alpha-synuclein by the pyrethroid insecticide permethrin. *Toxicology and applied pharmacology* 192: 287-293
- Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience* 2: 492-501
- Goers J, Manning-Bog AB, McCormack AL, Millett IS, Doniach S, Di Monte DA, Uversky VN, Fink AL (2003) Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry* 42: 8465-8471
- Gomez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Vinals F, Barrachina M, Ambrosio S (2002) MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain research* 935: 32-39
- Gong F, Miller KM (2013) Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Mutation research* 750: 23-30
- Gorgas G, Butch ER, Guan KL, Miller RA (1997) Diminished activation of the MAP kinase pathway in CD3-stimulated T lymphocytes from old mice. *Mech Ageing Dev* 94: 71-83
- Gorsler T, Murzik U, Ulbricht T, Hentschel J, Hemmerich P, Melle C (2010) DNA damage-induced translocation of S100A11 into the nucleus regulates cell proliferation. *BMC cell biology* 11: 100
- Goscin LP, Byrnes JJ (1982) DNA polymerase delta: one polypeptide, two activities. *Biochemistry* 21: 2513-2518
- Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrist BA (2000) Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14: 1325-1334
- Grundemann J, Schlaudraff F, Haeckel O, Liss B (2008) Elevated alpha-synuclein mRNA levels in individual UV-laser-microdissected dopaminergic substantia nigra neurons in idiopathic Parkinson's disease. *Nucleic acids research* 36: e38

- Habig K, Walter M, Stappert H, Riess O, Bonin M (2009) Microarray expression analysis of human dopaminergic neuroblastoma cells after RNA interference of SNCA--a key player in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain research* 1256: 19-33
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11: 298-300
- Hashimoto M, Hsu LJ, Rockenstein E, Takenouchi T, Mallory M, Masliah E (2002) alpha-Synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 277: 11465-11472
- Hashimoto M, Hsu LJ, Sisk A, Xia Y, Takeda A, Sundsmo M, Masliah E (1998) Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. *Brain research* 799: 301-306
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25: 585-621
- Hegde ML, Jagannatha Rao KS (2003) Challenges and complexities of alpha-synuclein toxicity: new postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson's disease. *Archives of biochemistry and biophysics* 418: 169-178
- Hegde ML, Rao KS (2007) DNA induces folding in alpha-synuclein: understanding the mechanism using chaperone property of osmolytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 464: 57-69
- Hegde ML, Vasudevaraju P, Rao KJ (2010) DNA induced folding/fibrillation of alpha-synuclein: new insights in Parkinson's disease. *Frontiers in bioscience* 15: 418-436
- Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM (2006) Cellular senescence in aging primates. *Science* 311: 1257
- Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* 361: 1475-1485
- Hsu LJ, Mallory M, Xia Y, Veinbergs I, Hashimoto M, Yoshimoto M, Thal LJ, Saitoh T, Masliah E (1998) Expression pattern of synucleins (non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor protein/alpha-synuclein) during murine brain development. *Journal of neurochemistry* 71: 338-344
- Hutter D, Yo Y, Chen W, Liu P, Holbrook NJ, Roth GS, Liu Y (2000) Age-related decline in Ras/ERK mitogen-activated protein kinase cascade is linked to a reduced association between Shc and EGF receptor. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 55: B125-134
- Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364: 1169-1171
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14: 467-475
- Iwata A, Maruyama M, Kanazawa I, Nukina N (2001a) alpha-Synuclein affects the MAPK pathway and accelerates cell death. *The Journal of biological chemistry* 276: 45320-45329
- Iwata A, Miura S, Kanazawa I, Sawada M, Nukina N (2001b) alpha-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *Journal of neurochemistry* 77: 239-252

- Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-1078
- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS letters* 345: 27-32
- Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, Morris AJ (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry* 37: 4901-4909
- Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U (2007) Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 128: 36-44
- Ji H, Liu YE, Jia T, Wang M, Liu J, Xiao G, Joseph BK, Rosen C, Shi YE (1997) Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer research* 57: 759-764
- Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews Molecular cell biology* 7: 335-346
- Ju YJ, Lee KH, Park JE, Yi YS, Yun MY, Ham YH, Kim TJ, Choi HM, Han GJ, Lee JH et al (2006) Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Experimental & molecular medicine* 38: 686-693
- Kao SY (2009) DNA damage induces nuclear translocation of parkin. *Journal of biomedical science* 16: 67
- Keogh BP, Tresini M, Cristofalo VJ, Allen RG (1996) Effects of cellular aging on the induction of c-fos by antioxidant treatments. *Mech Ageing Dev* 86: 151-160
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics* 27: 247-254
- Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1802: 396-405
- Kim JN, Kim MK, Cho KS, Choi CS, Park SH, Yang SI, Joo SH, Park JH, Bahn G, Shin CY et al (2013) Valproic Acid Regulates alpha-Synuclein Expression through JNK Pathway in Rat Primary Astrocytes. *Biomolecules & therapeutics* 21: 222-228
- Kim K, Nose K, Shibamura M (2000) Significance of nuclear relocalization of ERK1/2 in reactivation of c-fos transcription and DNA synthesis in senescent fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 275: 20685-20692
- Kim SY, Kang HT, Han JA, Park SC (2012) The transcription factor Sp1 is responsible for aging-dependent altered nucleocytoplasmic trafficking. *Aging cell* 11: 1102-1109
- Kim SY, Ryu SJ, Ahn HJ, Choi HR, Kang HT, Park SC (2010) Senescence-related functional nuclear barrier by down-regulation of nucleo-cytoplasmic trafficking gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* 391: 28-32
- Kim SY, Ryu SJ, Kang HT, Choi HR, Park SC (2011) Defective nuclear translocation of stress-activated signaling in senescent diploid human fibroblasts: a possible explanation for aging-associated apoptosis resistance. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 16: 795-807
- Kim TD, Paik SR, Yang CH (2002) Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochemistry* 41: 13782-13790

- Kirkwood TB, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408: 233-238
- Kontopoulos E, Parvin JD, Feany MB (2006) Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human molecular genetics* 15: 3012-3023
- Krishna TH, Mahipal S, Sudhakar A, Sugimoto H, Kalluri R, Rao KS (2005) Reduced DNA gap repair in aging rat neuronal extracts and its restoration by DNA polymerase beta and DNA-ligase. *Journal of neurochemistry* 92: 818-823
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics* 18: 106-108
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010) The essence of senescence. *Genes & development* 24: 2463-2479
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980
- Lashuel HA, Lansbury PT, Jr. (2006) Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Quarterly reviews of biophysics* 39: 167-201
- Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, Polymeropoulos MH (1998) Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Human genetics* 103: 106-112
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honore A, Rozas N, Pieri L, Madioua K, Durr A, Melki R et al (2013) G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of neurology*
- Lewy FH (1912) *Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie*: Julius Springer, Berlin
- Li W, Lesuisse C, Xu Y, Troncoso JC, Price DL, Lee MK (2004) Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 7400-7409
- Licker V, Kovari E, Hochstrasser DF, Burkhard PR (2009) Proteomics in human Parkinson's disease research. *Journal of proteomics* 73: 10-29
- Lidke DS, Huang F, Post JN, Rieger B, Wilsbacher J, Thomas JL, Pouyssegur J, Jovin TM, Lenormand P (2010) ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 285: 3092-3102
- Lim IK, Won Hong K, Kwak IH, Yoon G, Park SC (2000) Cytoplasmic retention of p-Erk1/2 and nuclear accumulation of actin proteins during cellular senescence in human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 119: 113-130
- Lindahl T, Barnes DE (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 65: 127-133
- Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L (2005) Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 280: 21313-21320

- Liu X, Lee YJ, Liou LC, Ren Q, Zhang Z, Wang S, Witt SN (2011) Alpha-synuclein functions in the nucleus to protect against hydroxyurea-induced replication stress in yeast. *Human molecular genetics* 20: 3401-3414
- Liu Y, Guyton KZ, Gorospe M, Xu Q, Kokkonen GC, Mock YD, Roth GS, Holbrook NJ (1996) Age-related decline in mitogen-activated protein kinase activity in epidermal growth factor-stimulated rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 271: 3604-3607
- Lorenzini A, Tresini M, Mawal-Dewan M, Frisoni L, Zhang H, Allen RG, Sell C, Cristofalo VJ (2002) Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Experimental gerontology* 37: 1149-1156
- Ltic S, Perovic M, Mladenovic A, Raicevic N, Ruzdijic S, Rakic L, Kanazir S (2004) Alpha-synuclein is expressed in different tissues during human fetal development. *Journal of molecular neuroscience : MN* 22: 199-204
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429: 883-891
- Luczaj W, Skrzydlewska E (2003) DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular & molecular biology letters* 8: 391-413
- Ma KL, Song LK, Yuan YH, Zhang Y, Han N, Gao K, Chen NH (2013) The nuclear accumulation of alpha-synuclein is mediated by importin alpha and promotes neurotoxicity by accelerating the cell cycle. *Neuropharmacology*
- Malatynska E, Pinhasov A, Crooke J, Horowitz D, Brenneman DE, Ilyin SE (2006) Levels of mRNA coding for alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the brains of newborn, juvenile, and adult rats. *Journal of molecular neuroscience : MN* 29: 269-277
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* 277: 1641-1644
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Purisai MG, Bolin LM, Di Monte DA (2003) Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 3095-3099
- Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, Seluanov A, Gorbunova V (2011) SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* 332: 1443-1446
- Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K (2003) The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nature reviews Neuroscience* 4: 727-738
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8: 2804-2815
- Martin FL, Williamson SJ, Paleologou KE, Hewitt R, El-Agnaf OM, Allsop D (2003) Fe(II)-induced DNA damage in alpha-synuclein-transfected human dopaminergic BE(2)-M17 neuroblastoma cells: detection by the Comet assay. *Journal of neurochemistry* 87: 620-630
- Maslah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287: 1265-1269

- Matsuda T, Okamura K, Sato Y, Morimoto A, Ono M, Kohno K, Kuwano M (1992) Decreased response to epidermal growth factor during cellular senescence in cultured human microvascular endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 150: 510-516
- Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E et al (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiology of disease* 8: 535-539
- McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, Guan S, Shi X, Gozani O, Burlingame AL et al (2009) SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany NY)* 1: 109-121
- McCormack AL, Mak SK, Di Monte DA (2012) Increased alpha-synuclein phosphorylation and nitration in the aging primate substantia nigra. *Cell death & disease* 3: e315
- McDonald WM, Richard IH, DeLong MR (2003) Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biological psychiatry* 54: 363-375
- McKay MM, Morrison DK (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26: 3113-3121
- McLean PJ, Ribich S, Hyman BT (2000) Subcellular localization of alpha-synuclein in primary neuronal cultures: effect of missense mutations. *Journal of neural transmission Supplementum*: 53-63
- Migliore L, Coppede F (2009) Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutation research* 667: 82-97
- Mirzayans R, Dietrich K, Paterson MC (1993) Aphidicolin and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine strongly inhibit transcriptionally active DNA repair in normal human fibroblasts. *Carcinogenesis* 14: 2621-2626
- Monti B, Gatta V, Piretti F, Raffaelli SS, Virgili M, Contestabile A (2010) Valproic acid is neuroprotective in the rotenone rat model of Parkinson's disease: involvement of alpha-synuclein. *Neurotoxicity research* 17: 130-141
- Monti B, Polazzi E, Batti L, Crochemore C, Virgili M, Contestabile A (2007) Alpha-synuclein protects cerebellar granule neurons against 6-hydroxydopamine-induced death. *Journal of neurochemistry* 103: 518-530
- Moretto A, Colosio C (2013) The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data. *Toxicology* 307: 24-34
- Mori F, Tanji K, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K (2002) Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system. *Brain research* 941: 118-126
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM et al (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124: 315-329
- Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou JC, Martinou I, Camps M, Schlegel W, Arkininstall S (1996a) MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 271: 4319-4326
- Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, Boschert U, Camps M, Gillieron C, Davies K, Ashworth A, Arkininstall S (1996b) The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 271: 27205-27208

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1: 263-273
- Murray IV, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2003) Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42: 8530-8540
- Nakajo S, Omata K, Aiuchi T, Shibayama T, Okahashi I, Ochiai H, Nakai Y, Nakaya K, Nakamura Y (1990) Purification and characterization of a novel brain-specific 14-kDa protein. *Journal of neurochemistry* 55: 2031-2038
- Nakajo S, Tsukada K, Omata K, Nakamura Y, Nakaya K (1993) A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein. Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation. *European journal of biochemistry / FEBS* 217: 1057-1063
- Nichols WW, Murphy DG, Cristofalo VJ, Toji LH, Greene AE, Dwight SA (1977) Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 196: 60-63
- Ninkina NN, Alimova-Kost MV, Paterson JW, Delaney L, Cohen BB, Imreh S, Gnuchev NV, Davies AM, Buchman VL (1998) Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene. *Human molecular genetics* 7: 1417-1424
- Ohashi M, Taguchi T, Ikegami S (1978) Aphidicolin: a specific inhibitor of DNA polymerases in the cytosol of rat liver. *Biochemical and biophysical research communications* 82: 1084-1090
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin B (1999) alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 5782-5791
- Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, Volk CB, Maxwell MM, Rochet JC, McLean PJ et al (2007) Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* 317: 516-519
- Padmaraju V, Bhaskar JJ, Prasada Rao UJ, Salimath PV, Rao KS (2011) Role of advanced glycation on aggregation and DNA binding properties of alpha-synuclein. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 24 Suppl 2: 211-221
- Park WY, Park JS, Cho KA, Kim DI, Ko YG, Seo JS, Park SC (2000) Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *The Journal of biological chemistry* 275: 20847-20852
- Parkinson J (1817) *An Essay on the Shaking Palsy*, London, 1817:
- Pawson T, Nash P (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes & development* 14: 1027-1047
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 3090-3099
- Perrin RJ, Woods WS, Clayton DF, George JM (2000) Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 275: 34393-34398

- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30: e36
- Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et biophysica acta* 1813: 1619-1633
- Poli G, Schaur RJ (2000) 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB life* 50: 315-321
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R et al (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047
- Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, Houlden H, Schapira AH (2013) A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 80: 1062-1064
- Pujol G, Soderqvist H, Radu A (2002) Age-associated reduction of nuclear protein import in human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 294: 354-358
- Quilty MC, King AE, Gai WP, Pountney DL, West AK, Vickers JC, Dickson TC (2006) Alpha-synuclein is upregulated in neurones in response to chronic oxidative stress and is associated with neuroprotection. *Experimental neurology* 199: 249-256
- Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310
- Rockenstein E, Hansen LA, Mallory M, Trojanowski JQ, Galasko D, Masliah E (2001) Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease. *Brain research* 914: 48-56
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology* 146: 905-916
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *The Journal of biological chemistry* 275: 9390-9395
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273: 5858-5868
- Sancar A (2008) Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *The Journal of biological chemistry* 283: 32153-32157
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 73: 39-85
- Sangchot P, Sharma S, Chetsawang B, Porter J, Govitrapong P, Ebadi M (2002) Deferoxamine attenuates iron-induced oxidative stress and prevents mitochondrial aggregation and alpha-synuclein translocation in SK-N-SH cells in culture. *Developmental neuroscience* 24: 143-153
- Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9: 726-735

- Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V (2004) DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7624-7629
- Seo JH, Rah JC, Choi SH, Shin JK, Min K, Kim HS, Park CH, Kim S, Kim EM, Lee SH et al (2002) Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16: 1826-1828
- Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT (1988) Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 9086-9090
- Shibayama-Imazu T, Okahashi I, Omata K, Nakajo S, Ochiai H, Nakai Y, Hama T, Nakamura Y, Nakaya K (1993) Cell and tissue distribution and developmental change of neuron specific 14 kDa protein (phosphoneuroprotein 14). *Brain research* 622: 17-25
- Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* 3: 155-168
- Siddiqui A, Chinta SJ, Mallajosyula JK, Rajagopalan S, Hanson I, Rane A, Melov S, Andersen JK (2012) Selective binding of nuclear alpha-synuclein to the PGC1alpha promoter under conditions of oxidative stress may contribute to losses in mitochondrial function: implications for Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine* 53: 993-1003
- Sidhu A, Wersinger C, Vernier P (2004) Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 637-647
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R et al (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841
- Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Grune T, Davies KJ (2000) Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14: 2495-2502
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150: 76-85
- Song G, Wang W, Hu T (2011) p53 facilitates BH3-only BID nuclear export to induce apoptosis in the irreparable DNA damage response. *Medical hypotheses* 77: 850-852
- Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL (1971) Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 2843-2845
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M (1998a) Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuroscience letters* 251: 205-208
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998b) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6469-6473

- Spillantini MG, Divane A, Goedert M (1995) Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics* 27: 379-381
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-840
- Steece-Collier K, Maries E, Kordower JH (2002) Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13972-13974
- Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research* 64: 2390-2396
- Surguchov A, Surgucheva I, Solessio E, Baehr W (1999) Synoretin--A new protein belonging to the synuclein family. *Molecular and cellular neurosciences* 13: 95-103
- Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ (2002) ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *The Journal of biological chemistry* 277: 12710-12717
- Tembe V, Henderson BR (2007) Protein trafficking in response to DNA damage. *Cellular signalling* 19: 1113-1120
- Theodosiou A, Ashworth A (2002) MAP kinase phosphatases. *Genome biology* 3: REVIEWS3009
- Torres C, Francis MK, Lorenzini A, Tresini M, Cristofalo VJ (2003) Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts. *Experimental cell research* 290: 195-206
- Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental gerontology* 35: 927-945
- Tresini M, Lorenzini A, Frisoni L, Allen RG, Cristofalo VJ (2001) Lack of Elk-1 phosphorylation and dysregulation of the extracellular regulated kinase signaling pathway in senescent human fibroblast. *Experimental cell research* 269: 287-300
- Tretiakoff C (1919) Contribution a l'étude de l'anatomie du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives à la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Thèse de Paris.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 11282-11286
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001a) Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *The Journal of biological chemistry* 276: 44284-44296
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001b) Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. *FEBS letters* 500: 105-108
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM (2003) Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American journal of epidemiology* 157: 1015-1022

- Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, Wade-Martins R (2010) alpha-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 33: 559-568
- Vila M, Vukosavic S, Jackson-Lewis V, Neystat M, Jakowec M, Przedborski S (2000) Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *Journal of neurochemistry* 74: 721-729
- Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, Galbiati F (2002) Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Molecular biology of the cell* 13: 2502-2517
- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 27: 494-506
- Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H (1998) Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuroscience letters* 249: 180-182
- Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T (2009) DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging cell* 8: 311-323
- Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of biological chemistry* 276: 47759-47762
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT, Jr. (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35: 13709-13715
- Xuan Q, Xu SL, Lu DH, Yu S, Zhou M, Ueda K, Cui YQ, Zhang BY, Chan P (2011) Increased expression of alpha-synuclein in aged human brain associated with neuromelanin accumulation. *Journal of neural transmission* 118: 1575-1583
- Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors* 24: 21-44
- Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 2696-2701
- Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Li Y, Xu S, Liu C, Gao Y, Yang H et al (2007) Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. *Neuroscience* 145: 539-555
- Zahn JM, Sonu R, Vogel H, Crane E, Mazan-Mamczarz K, Rabkin R, Davis RW, Becker KG, Owen AB, Kim SK (2006) Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature. *PLoS genetics* 2: e115
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B et al (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* 55: 164-173
- Zhang L, Zhang C, Zhu Y, Cai Q, Chan P, Ueda K, Yu S, Yang H (2008) Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain research* 1244: 40-52
- Zhou M, Xu S, Mi J, Ueda K, Chan P (2013) Nuclear translocation of alpha-synuclein increases susceptibility of MES23.5 cells to oxidative stress. *Brain research* 1500: 19-27

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

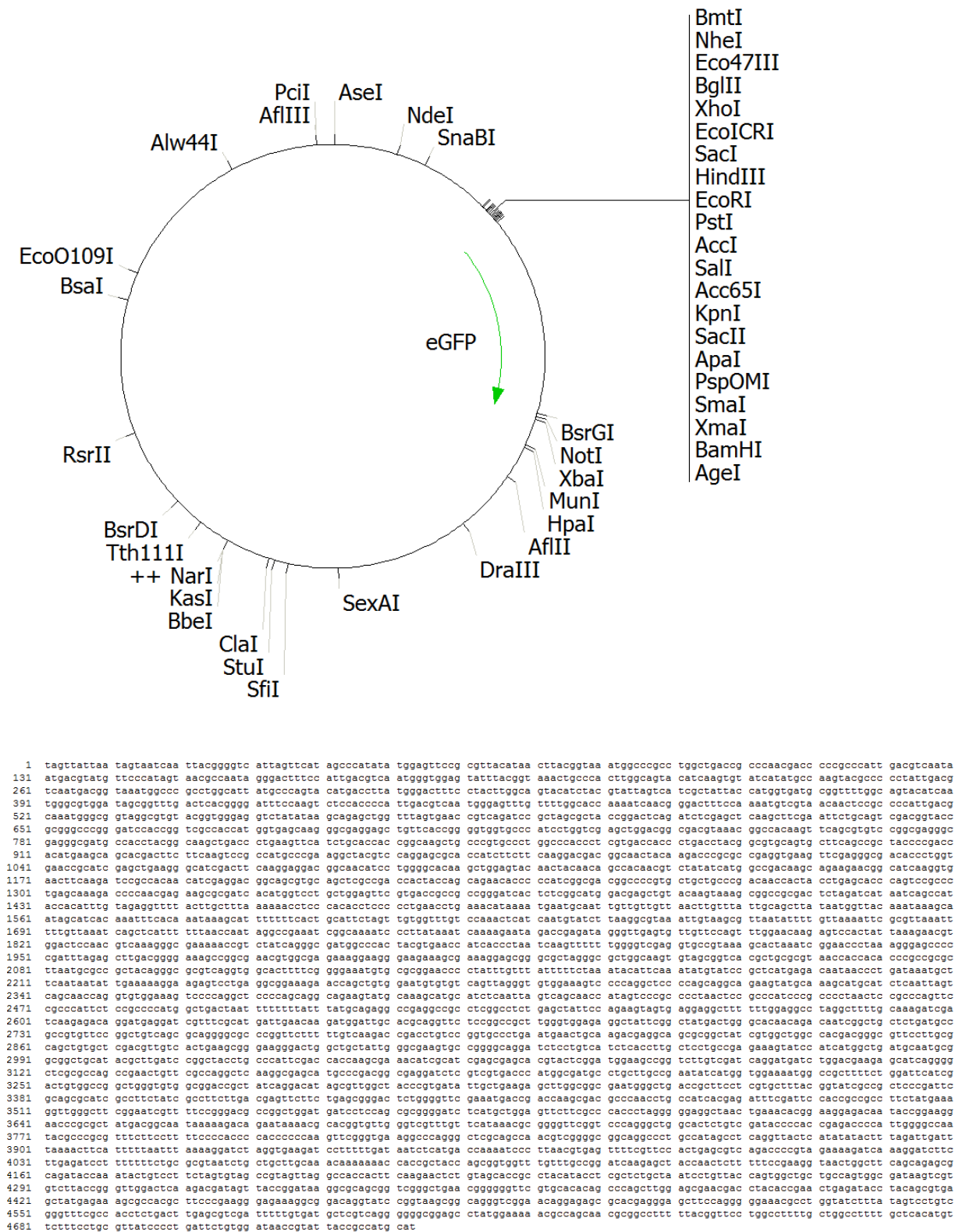
Abb. 1-1 Signaltransduktionsweg der DNA-Schadensantwort.....	5
Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Ursachen von DNA-Schäden und der Zellantwort.....	7
Abb. 1-3 Schematische Darstellung des menschlichen α -Synuclein.....	10
Abb. 1-4 Lewy-Körper und Lewy-Neuriten.....	14
Abb. 1-5 Aggregatbildung von α -Synuclein.....	16
Abb. 1-6 Schematische Darstellung der drei MAPK-Signalwege.....	19
Abb. 1-7 Schematische Darstellung der ERK1/2-MAPK-vermittelten Signalweiterleitung.....	20
Abb. 3-1: Wachstumskurve der IMR-90-Fibroblasten.....	50
Abb. 3-2: Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in seneszenten Fibroblasten.....	51
Abb. 3-3: Expressionsunterschiede von Caveolin-1 in jungen und seneszenten IMR-90-Fibroblasten.....	52
Abb. 3-4: Analyse der α -Synuclein-Expression während der zellulären Alterung.....	53
Abb. 3-5: Untersuchung der Löslichkeit von α -Synuclein während der zellulären Alterung.....	54
Abb. 3-6: Vergleich der SIRT6-Expression in jungen und alten Fibroblasten.....	55
Abb. 3-7: Einfluss von Etoposid auf die Morphologie von jungen IMR-90-Fibroblasten.....	56
Abb. 3-8: Einfluss von Etoposid auf die Expression von α -Synuclein.....	57
Abb. 3-9: Wirkung verschiedener Stressfaktoren auf die Expression von α -Synuclein.....	59
Abb. 3-10: Einfluss von α -Synuclein auf den Grad des DNA-Schadens nach Behandlung mit Etoposid.....	60
Abb. 3-11: Einfluss von DNA-Schädigung auf die Lokalisation von α -Synuclein in jungen und seneszenten Fibroblasten.....	62
Abb. 3-12: Einfluss von Staurosporin auf die intrazelluläre Lokalisation von α -Synuclein.....	63
Abb. 3-13: Wirkung von U0126 auf die Expression von α -Synuclein.....	65
Abb. 3-14: Wirkung von U0126 auf die α -Synuclein-Expression in seneszenten Zellen.....	67
Abb. 3-15: Expression der Komponenten des ERK1/2-MAPK-Signalweges in alternden Fibroblasten.....	68
Abb. 3-16: Expression von MKP-3 im Vergleich von jungen und seneszenten Fibroblasten.....	69

8.2 Tabellenverzeichnis

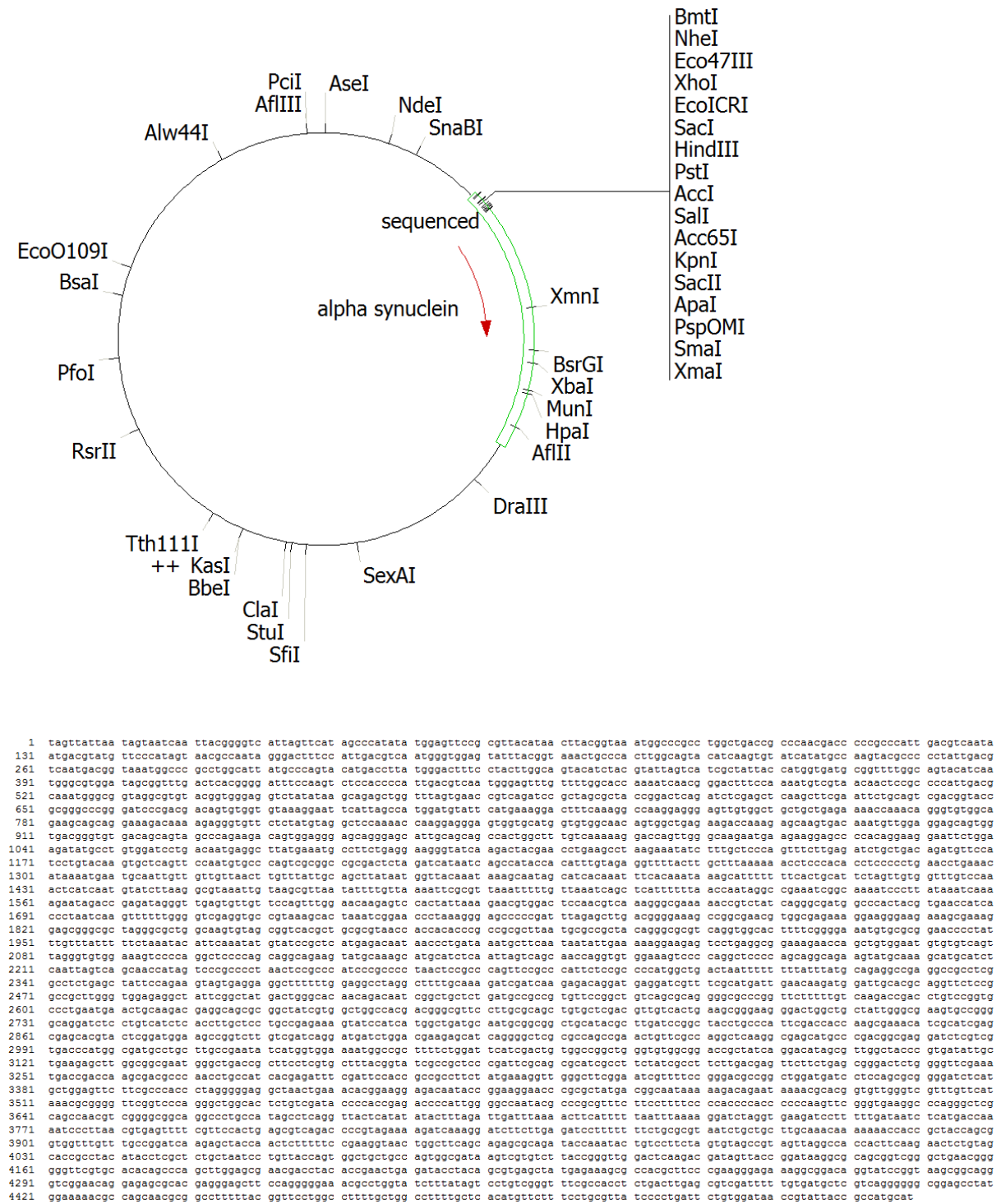
Tab. 1-1 Liste der unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen	6
Tab. 1-2 Liste der bislang bekannten Parkinson-auslösenden Gene	17
Tab. 2-1: Plasmide.....	23
Tab. 2-2: Primer für die PCR unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase	23
Tab. 2-3: Primer für quantitative <i>Real-Time</i> -PCR-Analysen	24
Tab. 2-4: Primer für Sequenzierungen.....	24
Tab. 2-5: siRNA-Sequenzen	24
Tab. 2-6: Restriktionsenzyme	24
Tab. 2-7: sonstige Enzyme.....	24
Tab. 2-8: Primärantikörper für Western Blot-Analysen (WB) und Immunhistochemie (I)	25
Tab. 2-9: Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen und Immunhistochemie	25
Tab. 2-10: Protein- und DNA-Größenmarker	26
Tab. 2-11: verwendete Chemikalien.....	26
Tab. 2-12: Reagenzienansätze.....	28
Tab. 2-13: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	29
Tab. 2-14: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte	29
Tab. 2-15: Liste der in dieser Arbeit verwendeten EDV-Programme.....	31
Tab. 2-16: Pipettierschema Bis-Tris-Gele.....	37

8.3 Vektorkarten

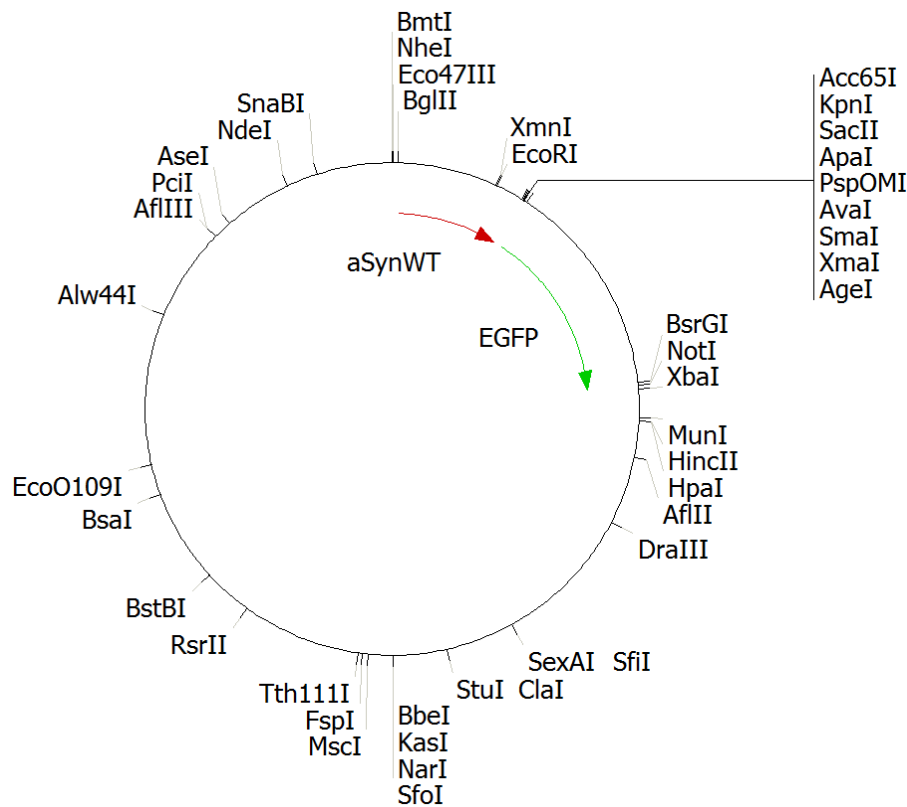
8.3.1 Vektorkarte und Sequenz von pGPF-N1



8.3.2 Vektorkarte und Sequenz von α SynWT-N1



8.3.3 Vektorkarte und Sequenz von α SynWT.GFP-N1



```

1  gctagcgcta cggagctacg atcttcctag atgtattcat gaaaggactt tcaaaaggcca agggaggagat tgtggctgct gctgagaaaa ccaaacaggg tgtggcagaa gacgaggaa agacaaaaa
131  ggggtattctc tatgtagctg ccaaaaaccaa ggaaggagtg gtgcattggg ttgcaaacagt ggctgagaa gctgagaa ccaagacaaa tggctggaga gcaagtgtga cgggtgtgac agcagtagc
261  cagaagacag tgaaggggag agggagcatt gcagcagcca ctggctttgt caaaaaggagc cagctgggca agaataaga aggagcccca caggaaagaa ttctggagaa tatgctctga gatcctgac
391  atgaggctta tgaaatggct tctgaggaag ggtatcaaga ctaogaaact ctaacogggg taocogcgggc cggggatcca ccggtcgcca caatggtag caaggcgca gactgttca ccgggtgtg
521  gccatccctg gtocagctgg acggcgagct aaaacggcac aagtccagcg tgcctcggca gggcgagggc gatgccact acggcaagc gacctgaag ttoatctgca ccacgggcaa gctgcccgt
651  ccttgcccca cctcgtgtag caacctgacc taocgggtgc agtgcctcag ccgctaacco gaccacatga agcagcaaga ctctttcaa tcccgcatg tccgaggga cgtccaggag cgaacctct
781  tottoaagga cgaaggcaac taacaagacc gcgcgcaggt gaagctcag ggcgacacc ttgtgaacc catcgagct aaggccatg acttcaagga ggacggcaac atctcggggc aagaactga
911  gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccagc aagcagaaga aagcagatca ccgctaccca ggtagaactc aagatccgct acaacatga ggaacggcag ggaacggca ccagaccact cgaaccatct
1041  acccccatcg gogaagcccc cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caaccagttc gcctcgagca aagaccocaa cgagaagcgc gatcacatg tctgctgga gttcgtgacc ccgcgggga
1171  tcaactctcg catggagcag ctgtacaagt aaagcggcgc cgaactctaga taataatcag caataaccac tttgtagagg ttttaactgc tttaaaaaac ctcccaacc tcccccctga cctgaaacat
1301  aaaaatgagt caattgttgt tgttaactgt tttattgtag cttataatgg ttacaataa agcaataga tocaaat tcaaaataa gaatttttt caactgactc atttttaac caataggccg aaatcgga aatcccttat aatcaaaag
1431  tcaatcaatg atottaaggc gtaaatgta tttgtttaa attcgcgta aatttttgt aaatcagctc atttttaac caataggccg aaatcgga aatcccttat aatcaaaag
1561  aatagaccga gatagggttg agtgtgttgc cagtgtgaa caagagttca ctattaaaga acgtgactc caactgaa ggcgaaaaa ccgtctaca gggcgtgac ccaactgctg aacctcacc
1691  ctaatcaagt tttttgggtt cagaggtgcc taaagcacta aatcggaaac ctaaagggag cccccgatt agagctgac ggggaaagc ggcgaaactg gcgaaaagaa aaggaaagaa agcgaagga
1821  gggggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gctgaaccac cacaccgcc gcgcttaagt ccgcgtaca gggcgcgtca ggtgcaact ttgggaaaa tgtgcgga accctatct
1951  gtttattttt ctaaatatct tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa tgcttcaata atattgaaa agaaagactc ctgaggcgga aagaaccagc tgtgaaatg gtgtcagta
2081  ggggtggaaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaacat gaactcaat tagtcagcaa ccagggtgg aaagtcocca ggtccccag caggcagaag tatgaaagc atgcaactca
2211  attagtoagc aaactatgtc ccgcccctaa ctccgccat ctccgccct cccgccctca actccgccca gttccgccca ttctccgcc caatggctgac taatttttt tattatgca gaggccgag ccgctcggc
2341  ctctgagcta ttccagaagt agtgaggag cttttttgga ggcctaggct tttgcaaa gaactcaaga gacagatga ggatcgttc gaatgatga acaagatga ttgcacgag gttctccgc
2471  cgcttgggtg gagagctat tggctatga ctgggcaca cagacaatcg gctgcttga tgccgcgtg ttccgcgtg cagcgcagg ggcggcggt cttttggca agaccgact tcccggtgc
2601  ctgaatgaac tgaagacga ggcagcgccg ctactgtgac tggccaagc gggcgtctct tgccgcgtg tgcctgact gctcactgaa cgggaaagg actggtgct attggggaa gttccggggc
2731  aggatctctc gtcactcac cttgctcctg ccgagaaaat atccatcat gctgatgcaa tggcggcgct gaatacgtt gatccggcta cctgcccatt cgaccocaa gogaaacatc gactcgagc
2861  agcaactact cgtatggaag ccgctcttgg cgtacagat gatctggag aagagatca gggcctcggc ccagcgaac tgttcgccc gctcaaggg agcatcgcc agggcgagga tctcgtgct
2991  accatggcg atgctcgtct ccogaatca atggtgaaa atggcgcct ttctggattc atcgactgtg ccggcgtgg tgtggggag cgtatacag acatagcgt ggctaccgt gatattgct
3121  aagactgtgg cggcgaatgg cctgaccctc tctcgtgtg ttacggtatc gccctctccg attcgagcg catcgcttc tatcgcttc ttgacagat ctctgagcg ggactcctgg gttcgaatg
3251  accgaccaaag cgaagcccaa cctgccaatc cgaatattgt atccaccgc cgcctctcat gaaaggttg gcttcggaat cgtttccgg gacgcggct gttttccgg actccatgc
3381  tggagtctct cggccaccct agggggagcg taactgaaac ccggaaggag caaatccgg aagaaaccgc cgtctgagc gcaataaaaa gacagaataa aacgcagct gttgggtgt ttgtcataa
3511  acggggggtt cgttcccagg gctggcactc tgtcgatacc ccaccagacc cccattggg gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggta agatccttt tgaatactc atgacaaaa
3641  gccaacgtcg gggcgccagg cctcgcata gctcaggtt actcatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctaggta agatccttt tgaatactc atgacaaaa
3771  tcccttaacg tgaattttcg tccactgag cgtagacc ccgtagaaa gctcaaaagg atttctgaga tctctttttt ctgoggttaa tctgctgct ttgctgctg taagccacc actcaagaa ctctgagca
4301  ggtttgtttg ccggatcaa agtaccac tctttttccg aagtaactg gcttcaag agcgagata ccaaatattt tctctagt gtgactgt tagggccac actcaagaa ctctgagca
4931  ccgctcaact acctcctct ctaaatcctg ttaccagtg ctgctccc agtgcagag tgcgtacta ccaggttga ccgggttga ctaagacga tagttaccg ataaggcga taggtcggc tgaacgggg
4161  gttcgtgac acagccacg ttggagcga cgaactcac cgaactgaga tacctaacg gtgactgat agaaagcgc acgttccc aaggagaaa ggcggcagg tatccgtaa cggcaggtt
4291  cggaacagga gagcgcaga gggagcttc aggggaaac cctcgtatc ttatagtc ttctgggtt gctcggctg atcgactgt cccaactct ctgacctct cctgattct gggataaac gttattcgc catgactag gagcctatg
4421  aaaaaccca cgaacgcagg ctttttagc ttccgtgct ttgctggcc ttttgcact atgttcttc cctggttatc cctgattct gggataaac gttattcgc catgactag gagcctatg
4551  taactcaata cgggtcact caatatag agtccoggt caataatc taactaact accgttaact ccaactaact cctgactgg ctaactatg gaaacccc gccattgac gtaactatg atcaatag atctatgtc
4681  coataagaa gccaatagg acttccact gaactaat ggtggagtt ttaacgtaa ctccaccat ggcagatcat caagtatc atagccaa tagccccc attagctca atgacgtaa
4811  atggcccctc tggcattat ccaagctac gaactatg gaacttca ctctggaga catctacga ttagtatg ctattacc ggtgatcgg tttggcaat atcaaatg cgtggatg
4941  cggttccag caacgggat tccaaagtc caacccatg acgtcaatg gactttgtt tggcaccaaa atcaacggga ctttcaaaa tgtcgaata attagccac attagccaa atggcggtg
5071  ggcgtgtag gttgggagtc tataataaga gactggtt agtgaacct cagatcc

```

8.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
4-HNE	4-Hydroxynonenal
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Abb.	Abbildung
ad	Latein: bis
AD	autosomal dominant
Aphi	Aphidicolin
AP-Läsion	aprimidinische/apurinische Läsion
APS	Ammoniumpersulfat
AR	autosomal rezessiv
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>ATP13A2</i>	ATPase Typ 13A2
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
Aβ	Amyloid beta
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> ; Bicinchoninsäure
BCSG-1	<i>Breast cancer-specific gene-1</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängigen Kinase
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
CSPα	Cysteine string protein α
<i>Ct</i>	<i>Cycle threshold</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
Cu ¹⁺	einfach positiv geladener Kupfer
Cu ²⁺	Zweifach positiv geladener Kupfer
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DDR	<i>DNA damage response</i> ; DNA-Schadensantwort
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
<i>DJ-1</i>	DJ-1
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNAse	Desoxyribonuklease
Dnmt1	DNA-Methyltransferase 1
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch

dT	Desoxythymidin
DUSP	dual spezifische Phosphatase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> ; verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> ; Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
<i>EIF4G1</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1</i>
engl.	<i>Englisch</i>
ERK1/2	extrazellulär-Signal regulierte Kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae</i> (Latein: und andere)
Eto	Etoposid
EtOH	Ethanol
<i>FBXO7</i>	F-box Protein 7
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
Fe	Eisen
g	Gramm
g	<i>gravitation</i> ; Erdbeschleunigung
G	Gauge (Außendurchmesser der Kanüle)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> ; Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> ; verstärkt grün fluoreszierendes Protein
<i>GIGYF2</i>	<i>Grb10 interacting GYF Protein2</i>
Glu	Glutaminsäure
G-Phase	<i>gap</i> Phase; Lückenphase
GRB2	<i>growth factor receptor-bound factor 2</i>
GTP	Guanosin-Trisphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrogenchlorid
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hEXO1	Exonuklease 1
HR	homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
<i>HTRA2</i>	HtrA Serin Peptidase 2
I	Immunhistochemie
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
log	Logarithmus
<i>LRRK2</i>	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LSM	<i>Laser scanning microscope</i> ; Laser-Scanning-Mikroskop
M	Molar

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK1/2	Mitogen-aktivierte, extrazellulär-Signal-regulierte Kinase 1/2 (MAPK/ERK1/2 kinase)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MKP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Phosphatase
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMR	<i>mismatch repair</i> ; Fehlpaarungsreparatur
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NAC	<i>non-amyloid-β-component of Alzheimer's disease amyloid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NACP	<i>precursor protein of the NAC</i> ; NAC-Vorläuferprotein
NaOH	Natriumhydroxid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	nukleärer Faktor ' <i>kappa-light-chain-enhancer</i> ' von aktivierten B-Zellen
ng	Nanogramm
NHEJ	<i>non homologous end joining</i> ; nicht-homologe Endverknüpfung
nm	Nanometer
nons	<i>nonsense</i>
NP-40	Nonidet P-40; Octylphenoxyethoxyethanol
N-terminal	Amino-terminal
∅	Durchmesser
OH•	Hydroxylradikal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARK	Gene der Parkinson-Krankheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS mit Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PD	<i>Parkinson's disease</i> ; Parkinson-Krankheit
PDL	<i>population doubling level</i> ; Populationsverdopplung
p-ERK1/2	phosphorylierte extrazellulär-Signal-regulierte Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PGC1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
pH	pondus Hydrogenii
<i>PINK1</i>	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>
PKC	Proteinkinase C
PKCδ	Proteinkinase C delta
<i>PLA2G6</i>	Phospholipase A2
PLD2	Phospholipase D2
p-MEK1/2	phosphorylierte Mitogen-aktivierte, extrazellulär-Signal-regulierte Kinase 1/2
pmol	Pikomol
<i>PRKN</i>	Parkin
qPCR	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR; quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>

RAS	<i>Rat sarcoma</i>
REST	<i>relative expression software tools</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNR	Ribonukleotidreduktase
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s. u.	siehe unten
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
senes.	seneszent
Ser	Serin
SIPS	<i>stress-induced premature senescence</i> ; Stress induzierte, vorzeitige Seneszenz
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i> ; kurze, interferierende RNA-Moleküle
SIRT	Sirtuin
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor</i>
SNCA	α -Synuclein
SOD-1	Superoxiddismutase 1
SOS	<i>son of sevenless</i>
S-Phase	Synthesephase
Stauro	Staurosporin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TH	Tyrosin-Hydroxylase
Thr	Threonin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	<i>Unit</i> ; Einheit
u. a.	unter anderem
UCHL1	Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase L1
UV	Ultraviolett
V	Volt
VPS35	<i>Vacuolar protein sorting 35 homolog</i>
vs.	<i>versus</i> ; gegenübergestellt
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
Zytopl.	Zytoplasma
α	Alpha
α -Syn	alpha Synuclein
β	Beta
γ	Gamma
ϵ	Epsilon

8.5 Lebenslauf

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den

Verena Schmitt

8.7 Danksagung