

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Quantitative Genexpressionsanalysen humaner dopaminerger Neurone nach Lasermikrodissektion aus *post-mortem* Mittelhirngewebe von Morbus Parkinson Patienten und Kontrollen

eingereicht von
Falk Schlaudraff
aus Lüneburg

Ulm, 2010

durchgeführt am
Institut für Allgemeine Physiologie (Leitung Prof. Paul Dietl)
Arbeitsgruppe Molekulare Neurophysiologie
unter Leitung und Betreuung von **Prof. Dr. Birgit Liss**
an der **Universität Ulm**

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Birgit Liss
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dietmar Thal

Tag der Promotion: 26.07.2010

Widmung

für meine lieben Eltern
und Jessica

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | i |
| Abkürzungsverzeichnis | vi |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Morbus Parkinson | 1 |
| 1.2 Physiologie und Pathophysiologie des Morbus Parkinson | 2 |
| 1.2.1 Der Neurotransmitter Dopamin | 2 |
| 1.2.2 Aufbau und Funktion des dopaminergen Systems | 2 |
| 1.2.2.1 Aufbau des humanen dopaminergen Mittelhirnsystems | 3 |
| 1.2.2.2 Neuroanatomie des murinen dopaminergen Mittelhirnsystems | 4 |
| 1.2.2.3 Die Basalganglienschleife und Dopamin | 5 |
| 1.2.3 Differentielle Vulnerabilität dopaminergere Mittelhirnneurone | 7 |
| 1.3 Ursachen und Pathomechanismen des PD | 8 |
| 1.3.1 Auswahl der Kandidatengene für die Genexpressionsstudien des PD | 9 |
| 1.3.1.1 Monogenetische Formen des PD | 9 |
| 1.3.1.2 Dopamin-assoziierte Gene | 12 |
| 1.3.1.3 Mikro RNA und Genregulation | 16 |
| 1.3.1.4 Aktivitätskontrolle dopaminergere Mittehirnneurone | 17 |
| 1.3.1.5 Markergene: PD und DA unabhängig, Vulnerabilität und neuronal | 21 |
| 1.3.1.6 Kandidatengene aus Mausmodellen mit PD-assoziiierter dysregulierter mRNA-Expression | 21 |
| 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 24 |
| 2. Material und Methoden | 26 |
| 2.1 Material | 26 |
| 2.1.1 Geräte und Hardware | 26 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterial | 27 |
| 2.1.3 Verwendete Chemikalien | 27 |
| 2.1.4 Geninformationen | 28 |
| 2.1.5 Oligonukleotide (Primer, Probes) | 30 |
| 2.1.5.1 Humane TaqMan Assays und miScript-SYBRgreen Assay | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.1.5.2 Murine TaqMan-, miScript- und SYBRgreen-Assays _____ | 32 |
| 2.1.5.3 Murine Primer für die qualitative Multiplex-Nested PCR _____ | 33 |
| 2.1.6 Lösungen und Masteransätze _____ | 34 |
| 2.1.7 Humanes Hirngewebe _____ | 36 |
| 2.1.8 Murines Hirngewebe _____ | 39 |
| 2.2 Methoden _____ | 40 |
| 2.2.1 Generelles Schema zur <i>real-time</i> qPCR individueller Zellen nach UV-LMD _____ | 40 |
| 2.2.2 Hirngewebepräparation _____ | 42 |
| 2.2.2.1 Präparation von nativem, murinem Hirngewebe _____ | 42 |
| 2.2.2.1a Cochlea-Präparation _____ | 42 |
| 2.2.2.2 Präparation von humanem Hirngewebe _____ | 43 |
| 2.2.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten mittels eines Gefriermikrotoms _____ | 43 |
| 2.2.2.4 Fixieren und Färben von Gefrierschnitten _____ | 44 |
| 2.2.2.5 Kryoasservieren von Gefrierschnitten _____ | 44 |
| 2.2.3 Kontaktfreie UV-Lasermikrodissektion (UV-LMD) _____ | 45 |
| 2.2.4 Molekularbiologische Methoden zur <i>real-time</i> qPCR-basierter Genexpressionsanalyse _____ | 48 |
| 2.2.4.1 pH-Wertbestimmung von Hirngewebe _____ | 48 |
| 2.2.4.2 Nukleinsäure-Isolation _____ | 49 |
| 2.2.4.2a Isolation totaler RNA _____ | 49 |
| 2.2.4.2b Isolation kleiner RNAs (miRNA) _____ | 50 |
| 2.2.4.2c Nukleinsäureisolation aus PFA-fixiertem Gewebe _____ | 50 |
| 2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren _____ | 51 |
| 2.2.4.4 RNA-Qualitätsbestimmung: RIN-Analyse und <i>Small RNA</i> Analyse mittels Agilent- Technologie _____ | 52 |
| 2.2.4.5 Zelllyse von UV-LMD Proben und cDNA-Synthese aus mRNAs und miRNAs _____ | 54 |
| 2.2.4.6 Präzipitation zur Aufreinigung von RNA und cDNA _____ | 55 |
| 2.2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion _____ | 55 |
| 2.2.4.7a qualitative Multiplex-Nested PCR _____ | 56 |
| 2.2.4.7b Agarose-Gelelektrophorese _____ | 57 |
| 2.2.4.7c Quantitative <i>real-time</i> PCR _____ | 58 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.4.7c-1 Sondenspezifische Detektion | 59 |
| 2.2.4.7c-2 Fluoreszenzdetektion mittels SYBRgreen <i>real-time</i> PCR | 60 |
| 2.3 Datenverarbeitung, Datenanalyse und Statistik | 63 |
| 2.3.1 Primerdesign mit Oligo 6 | 63 |
| 2.3.2 Auswertung von <i>real-time</i> qPCR Daten | 64 |
| 2.3.2.1 Verwendete Standards und Standardkurven | 64 |
| 2.3.2.2 Assayperformance-Analysen | 65 |
| 2.3.2.3 Berechnung der relativen Quantität aus <i>real-time</i> qPCR-Daten | 66 |
| 2.3.2.4 Berechnung der Relation und <i>fold difference</i> aus <i>real-time</i> qPCR Daten | 67 |
| 2.3.3 Datenanalyse und Software für die Datenanalyse (Excel und R) | 68 |
| 3. Ergebnisse | 69 |
| 3.1 Charakterisierung und Qualitätskontrolle des humanen Hirngewebes | 69 |
| 3.2 Optimierung der UV-LMD Methodik | 73 |
| 3.2.1 Vergleich verschiedener Ablationsmethoden und Objektträger | 74 |
| 3.2.2 Erweiterung der UV-LMD-Methodik | 76 |
| 3.2.2.1 Genexpression muriner Girk-Kanäle im <i>Cerebellum</i> | 76 |
| 3.2.2.2 UV-LMD muriner Darmkrypten für CGH-Analysen | 78 |
| 3.2.3 Etablierung der UV-LMD-Methodik für Einzelzellen aus PFA-fixiertem Gewebe | 79 |
| 3.2.4 Etablierung paralleler mRNA- und miRNA-Expressionsanalyse | 82 |
| 3.4 <i>Real-time</i> qPCR Assay-Etablierung für standardisierte Analysen humaner Einzelzellen | 84 |
| 3.4.1 Performance humaner <i>real-time</i> qPCR-Assays | 84 |
| 3.4.2 Untersuchung des Einflusses von Fixier- und Färbeprozedur auf die RNA-Qualität von Hirngewebeschnitten | 87 |
| 3.4.3 Evaluation von Sensitivität und Spezifität der <i>real-time</i> qPCR-Assays | 88 |
| 3.5 Genexpressionsanalyse individueller humaner dopaminerge Mittelhirnneurone | 90 |
| 3.5.1 Evaluation der TH-Genexpression verschiedener Assayserien | 90 |
| 3.5.2 Vergleichende Expressionsanalysen von Mittelhirngewebe versus UV-LMD-dissektierte NM-positive DA Mittelhirnneurone | 94 |
| 3.5.3 Expressionsanalysen Dopamin-assoziiertes Gene | 96 |
| 3.5.4 Expressionsanalysen von Ionenkanälen | 99 |

| | |
|--|------------|
| 3.5.5 Genexpressionsanalysen von PARK-Genen und Genen, die in anderen Studien zur PD-Pathogenese identifiziert wurden | 102 |
| 3.5.6 Genexpressionsratios von Genen mit verwandter Funktion | 104 |
| 3.5.7 Geschlechtsspezifische Genexpressionsunterschiede in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten und Kontrollen | 106 |
| 4. Diskussion | 107 |
| 4.1 Methodische Aspekte | 108 |
| 4.1.1 Makroskopie des humanen Mittelhirngewebes | 108 |
| 4.1.2 Gewebezusammenstellung für die humanen Studien | 108 |
| 4.1.3 Qualitätsmerkmale des Ausgangsmaterials | 109 |
| 4.1.3.1 Der RIN-Wert als RNA-Qualitätsmaßstab | 109 |
| 4.1.3.2 pH-Wert, PMI, Anteil kleiner RNAs und RIN-Wert-Korrelationen | 111 |
| 4.1.3.3 Ausschluss von Gewebematerial von den Genexpressionsanalysen | 112 |
| 4.2 Optimierung der UV-LMD <i>real-time</i> qPCR Methodik für die Genexpressionsanalysen von UV-LMD-dissektierten Proben | 113 |
| 4.2.1 Optimierung, Erweiterung und Validierung der UV-LMD-Methode | 113 |
| 4.2.2.1 Erweiterte Anwendung der UV-LMD-Methode | 114 |
| 4.2.2.1a Validierung der UV-LMD-Methode | 114 |
| 4.2.2.1b UV-LMD von PFA-fixiertem Gewebe | 114 |
| 4.2.2.1c Parallele mRNA- und miRNA-Expressionsanalyse nach UV-LMD | 115 |
| 4.3 Assay-Auswahl für humanes <i>post-mortem</i> Material | 115 |
| 4.4 Vergleichende Genexpressionanalysen humaner NM-positiver DA Mittelhirnneurone in PD und Kontrollen | 116 |
| 4.4.1 Gewebebasierte Genexpressionsstudien von Morbus Parkinson | 116 |
| 4.4.2 Dopamin-Marker und -Metabolismus Gene in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen | 119 |
| 4.4.3 Aktivitätsregulation DA Mittelhirnneurone in PD | 120 |
| 4.4.3 Die PARK-Gene α -SYN und LRRK2 im Zusammenhang mit der PD-Pathogenese | 123 |
| 4.4.3 In Mausmodellen identifizierte Kandidatengene für den PD-Pathomechanismus | 124 |
| 4.4.4 Abschließende Bemerkungen der Genexpressionsanalysen von humanem <i>post-mortem</i> Material | 126 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| 4.5 Ausblick | 128 |
| 5. Zusammenfassung | 130 |
| Abbildungsverzeichnis | 132 |
| Tabellenverzeichnis | 134 |
| 6. Literaturverzeichnis | 135 |
| Anhang | 147 |
| Danksagung | 158 |
| Lebenslauf | 160 |
| Publikationsliste | 161 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| % | Prozent |
| +, (+) | positive |
| ΔR_n | relatives Fluoreszenzsignal (R_n der Sonde bzw. SYBRgreen - R_n von ROX) |
| μ l | Mikro-Liter |
| 7TM | sieben Trans-Membran |
| 18 S | 18 Svedberg (Sedimentationsmass in der Ultrazentrifugation von rRNA) |
| 28 S | 28 Svedberg (Sedimentationsmass in der Ultrazentrifugation von rRNA) |
| a | Jahre (franz. <i>ans</i>) |
| A8, A9, A10 | Hirnareal, Areal 8, 9, 10 |
| Abb. | Abbildung |
| AChE | Acetylcholinesterase |
| ad | autosomal dominant |
| AD | Morbus Alzheimer (engl. <i>Alzheimer Disease</i>) |
| ADHS | Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom |
| AHP | Nachhyperpolarisation (engl. <i>after hyperpolarisation</i>) |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklerose |
| ANOVA | einfaktorielle Varianzanalyse (engl. <i>Analysis of Variance</i>) |
| ar | autosomal rezessiv |
| ARDS | Akutes respiratorisches Distresssymptom |
| AS | Aminosäuren |
| BBC | Brain-Bank-Code |
| BHQ | nichtfluoreszierender Quencher (engl. <i>black hole quencher</i>) |
| bp | Basenpaare (engl. <i>basepairs</i>) |
| bspw. | beispielsweise |
| bzw. | beziehungsweise |
| CAA | zerebrale Amyloidangiopathie (engl. <i>cerebral amyloid angiopathy</i>) |
| cAMP | cyclisches Amino-Monophosphat |
| CCD | ladungsträgergekoppelte Schaltung (engl. <i>charge-coupled device</i>) |
| CDK | Cyclin-abhängige Proteinkinase |
| cDNA | komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>) |
| CERAD | <i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i> |
| CGH | <i>comparative genome hybridisation</i> |

| | |
|-------------------|--|
| cGMP | cyclisches Guanosin-Monophosphat |
| CMA | Chaperon-vermittelte Autophagie (engl. <i>Chaperone-Mediated Autophagy</i>) |
| CMML | chronische myelomonozytäre Leukämie (engl. <i>chronic myelogenous leukemia</i>) |
| CMV | Cytomegalie-Virus |
| coin | <i>Conditional Inference Procedures in a Permutation Test Framework</i> |
| COPD | chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. <i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>) |
| cp | <i>Cerebral peduncle</i> |
| Ct | Zyklus beim Schwellenwert (engl. <i>cycle at threshold</i>) |
| Ctmax | maximaler Zyklus beim Schwellenwert, Y-Achsenabschnitt, Y-Intercept |
| d.h. | das heißt |
| DA | dopaminerg |
| DHP | 1,4-Di-Hydropyridin |
| diff. | Unterschied (engl. <i>difference</i>) |
| DKC | <i>Dyskeratosis Congenita</i> |
| DNA | Desoxy-Ribo-Nukleinsäure (engl. <i>deoxyribonuclein acid</i>) |
| ds | doppelsträngig (engl. <i>double stranded</i>) |
| Dyn | Dynorphin |
| E | Effizienz |
| EDTA | Ethylen-Di-Amin-Tetra-Essigsäure |
| EF-Hand | spezifisches Aminosäuremotiv in Proteinen (Helix-Schleife Helix) |
| engl. | englisch |
| EO | frühes Auftreten von PD-Symptomen (engl. <i>early onset</i>) |
| EPMS | Extra-Pyramidal-Motorischen Systems |
| EP-Slides | DIRECTOR-Objektträger von Expression Pathology Inc. |
| EW, Ew | Einzelwert |
| Ex | Exon |
| f | folgend |
| ff | fortfolgend |
| F-Test | Fisher-Test |
| FAM | Fluoreszenzfarbstoff, Phosphoramidit-Derivat von 6-Carboxyfluorescein |
| <i>fold diff.</i> | Unterschied in Vielfachen von einer Bezugsgröße (engl. <i>fold difference</i>) |
| franz. | französisch |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer |

| | |
|-------------|---|
| FU | Fluoreszenzeinheiten (engl. <i>fluorescent units</i>) |
| GABA | γ -Amino-Buttersäure (engl. <i>γ-amino butyric acid</i>) |
| gDNA | genomische DNA |
| GDP | Guanosin-Di-Phosphat |
| Gp | <i>Globus pallidus</i> |
| Gpe | <i>Globus pallidus externus</i> |
| Gpi | <i>Globus pallidus internus</i> |
| Gpl | <i>Globus pallidus lateralis</i> |
| Gpm | <i>Globus pallidus medialis</i> |
| GSK3B | GSK3 β |
| GTP | Guanosin-5'-Tris-Phosphat |
| h | Stunden (engl. <i>hours</i>) |
| HPLC | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>) |
| hsa | <i>homo sapiens</i> |
| Hz | Hertz, [1/s] |
| Ia | A-Strom |
| idR, i.d.R. | in der Regel |
| iG4 | 4. Generation |
| Ih | H-Strom |
| IHC | innere Haarzelle (engl. <i>inner hair cell</i>) |
| iHet | heterozygot |
| IPS | idiopathisches Parkinson-Syndrom |
| ISI | Interspike-Intervall |
| IUBMB | <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| K | Kontrolle |
| Kat. | Kategorie |
| Kir | Kalium-Einwärtsrektifizierer (engl. <i>potassium inwardly rectifier</i>) |
| KO | Knock-Out, engl. <i>knock out</i> |
| L-DOPA | Levodopa; L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| lat. | Latein, lateinisch |
| LMD | Lasermikrodissektion |
| LO | spätes Auftreten von PD-Symptomen (engl. <i>late onset</i>) |

| | |
|-----------|--|
| LP | Laserpower |
| m | männlich |
| M | molare Masse (Einheit g/mol) |
| MALDI-TOF | Matrix-assoziierte Laser-Desorption/Ionisation (engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – time of light</i>) |
| MAO | Mono-Amino-Oxidase |
| mRNA | Boten-Ribo-Nukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| miRNA | Mikro Ribo-Nukleinsäure (engl. <i>micro ribonucleic acid</i>) |
| min | Minute(n) |
| mind. | mindestens |
| ml | Milli-Liter |
| MPP+ | 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridin |
| MPTP | 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydro-Pyridin |
| MRF | midbrain reticular formation |
| mRNA | Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>) |
| MSN | Medium Spiny Neurone (engl. <i>medium spiny neurons</i>) |
| mt | mitochondrial |
| mV | milli Volt |
| MW, Mw | Mittelwert |
| NAC | Nicht-Amyloide Komponente (engl. <i>Non-Amyloid component</i>) |
| NAcb | <i>Nucleus Accumbens</i> |
| NAcbC | Kern des <i>Nucleus Accumbens</i> (von engl. <i>core</i>) |
| NAcbS | Hülle des <i>Nucleus Accumbens</i> (von engl. <i>shell</i>) |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| Ncl. | Nucleus (Kern, Ansammlung von Nervenzellen) |
| Nd | nicht bestimmt (engl. <i>not determined</i>) |
| NFT | neurofibrilläre Tangles |
| NFQ | nichtfluoreszierender Quencher (engl. <i>non-fluorescent quencher</i>) |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| NM | Neuromelanin |
| NST | <i>Nucleus Subthalamicus</i> (STN) |
| NT | Neuropilfäden (engl. <i>neuropil threads</i>) |
| nt | Nukleotide (engl. <i>nucleotides</i>) |

| | |
|----------------|---|
| OD | optische Dichte |
| OHC | äußere Haarzelle (engl. <i>outer hair cell</i>) |
| p-Arm | kürzerer Arm eines Chromosomen (franz. <i>petit</i>) |
| pA | pico Ampere |
| PBP | <i>Nucleus parabrachialis pigmentosum</i> |
| PBS | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>) |
| PC | Hirnschenkel (lat. <i>Pedunculus cerebri</i>) |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PCS | lat. <i>Pedunculus cerebellaris superior</i> |
| PD | Morbus Parkinson (engl. <i>Parkinson Disease</i>) |
| PEN | Poly-Ethylen-Naphthalat |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PFC | Präfrontaler Kortex (engl. <i>prefrontal cortex</i>) |
| pH | pondus Hydrogenii (lat. <i>pondus</i> = Gewicht und <i>hydrogenium</i> = Wasserstoff) |
| PMA | Prämotorische Rinde |
| PMI | <i>post-mortem</i> Intervall (Zeit vom Eintritt des Todes bis zur Asservierung) |
| PN | <i>Nucleus paranigralis</i> |
| PNA | Peptid-Nukleinsäure (engl. <i>peptide nucleic acid</i>) |
| q-Arm | längerer Arm eines Chromosomen (q folgt im Alphabet auf p) |
| qPCR | quantitative PCR |
| R ² | Bestimmtheitsmaß |
| rel. Expr. | relative Expression (zu Standard cDNA) |
| rfu | relative Fluoreszenzeinheit (engl. <i>relative fluorescent unit</i>) |
| RIN | RNA Integritätsnummer (engl. <i>RNA integrity number</i>) |
| RING | <i>Really Interesting New Gene</i> |
| RLi | <i>rostral linear nucleus</i> |
| Rn | Fluoreszenzsignal |
| RNA | Ribo-Nukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (Zentrifugation, engl. <i>rounds per minute</i>) |
| RRF | retroribales Feld |
| rRNA | ribosomale RNA |
| rxn | Reaktion (engl. <i>reaction</i>) |
| s, sek. | Sekunde(n) |
| s.o. | siehe oben |

| | |
|----------|---|
| s.u. | siehe unten |
| SD | Standardabweichung (engl. <i>Standard Deviation</i>) |
| SEM | Standardfehler (engl. <i>Standard Error of the Mean</i>) |
| SMA | Supplementär-motorische Rinde |
| SNc | <i>Substantia Nigra compacta</i> |
| SNd | <i>Substantia Nigra dorsalis</i> |
| SNI | <i>Substantia Nigra lateralis</i> |
| SNm | <i>Substantia Nigra medialis</i> |
| SNpc | <i>Substantia Nigra pars compacta</i> |
| SNpr | <i>Substantia Nigra pars reticulata</i> |
| SNr | <i>Substantia Nigra reticularis</i> |
| SNv | <i>Substantia Nigra ventralis</i> |
| ss | einzelsträngig (engl. <i>single stranded</i>) |
| Subst. P | Substanz P (Cotransmitter) |
| T-Test | <i>Student's T-Test</i> |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA Puffer |
| TERRA | Telomerwiederholungen enthaltende RNA (engl. <i>telomeric repeat containing RNA</i>) |
| TRF | terminale Restriktionsfragmente |
| Tris | Tris-(Hydroxy-Methyl)-Amino-Methan |
| tts | Zeit bis zum nächsten Spike (engl. <i>time to spike</i>) |
| TTX | Tetrodotoxin, Nervengift |
| u.a. | unter anderem |
| UTR | untranslatierte Region (engl. <i>untranslated region</i>) |
| UV | Ultra-Violett |
| V | Volt |
| Verd. | Verdünnung |
| VA | ventro-anterior |
| VL | ventro-lateral |
| VTA | Ventrales Tegmentales Areal |
| w | weiblich |
| Wdh. | Wiederholung |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |

| | |
|------------------|---|
| ZNS | Zentralnervensystem, zentrales Nervensystem |
| λ_{\max} | Wellenlänge, Maximum der Wellenlänge |

Chemische Symbole, Struktur- und Summenformeln sind nach IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) und IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) Nomenklatur angegeben. Nicht-deutschsprachige Begriffe sind kursiv geschrieben. Genabkürzungen humaner Gene sind mit Großbuchstaben, tierische (meist murine) Gennamen sind klein, beginnend mit einem Großbuchstaben geschrieben, und im Text beschrieben.

Länder-, Staats- und Bundeslandabkürzungen sind nach internationalen Ländercodes (<http://www.box24.ch/public/polizei/laendercodes.wct>) angegeben.

Weiterführende Angaben sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.

1. Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Die Parkinsonsche Krankheit (Morbus Parkinson, engl. *Parkinson Disease*, PD) wurde nach dem englischen Arzt James Parkinson benannt, der diese Erkrankung 1817 erstmals beschrieb („*An Essay on the Shaking Palsy*“, (Parkinson, 2002)). Nach Morbus Alzheimer ist PD die zweithäufigste progressive neurodegenerative Erkrankung mit einer Prävalenz der Gesamtbevölkerung von bis zu 200 pro 100.000 Einwohner, bei Personen, die älter als 85 Jahre sind, liegt die Prävalenz bei 2,2 % (<http://www.kompetenznetz-parkinson.de>). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 50 und 60 Jahren, nach dem 30 Lebensjahr nimmt die Inzidenz stark mit dem Alter zu (Lee and Andersen, 2010). Die PD-Erkrankung ist in Deutschland auch unter dem Namen Schüttellähmung bekannt, was die charakteristischen Symptome zu beschreiben versucht. Man unterscheidet vier klinische Kardinalsymptome des PD: Ruhetremor (Zittern), Rigor (Muskelsteifheit), Bradykinesie (verlangsamte Bewegung/Bewegungsinitiation) und posturale Instabilität (Verlust der Haltungskontrolle) (Halliday and McCann, 2010).

Oft beginnen diese Kardinalsymptome zunächst asymmetrisch, d.h. eine Körperhälfte ist stärker betroffen als die andere. Zudem kann sich die multisystemische Ausbreitung von PD in zusätzlichen Krankheitseigenschaften wie Schlafstörungen, olfaktorischen Dysfunktionen, sympathischer Denervation des Herzens, Angst, Depression, Konstipationsstörungen, Dystonie, Halluzinationen, Demenz, supranukleäre Blickparese und weiteren autonomen Störungen widerspiegeln, die z.T. auch als Folge der Medikation oder in späten Stadien auftreten (Klein, 2006; Langston, 2006). Somit ergibt sich aus dem Zusammenspiel von motorischen und multisystemischen Defiziten eine komplexe Symptomatik des Krankheitsbilds PD (Fahn, 2003).

Pathologisch kennzeichnend für die Hauptsymptome von PD ist das Absterben von Dopamin-ausschüttenden dopaminergen (DA) Neuronen im Mittelhirn, insbesondere in der schwarzen Substanz (*Substantia nigra*, SN), welche für die Feinsteuerung von Bewegungsabläufen zuständig sind (von Campenhausen et al., 2005). Eine selektive Degeneration Neuro-Melanin-positiver (NM(+)) SN Neurone im Zusammenhang mit Parkinsonismus ist lange bekannt (Foix and Nicolesco, 1925; Hassler, 1938). Aus dem Absterben dieser Neuronenpopulation resultiert ein Mangel des Neurotransmitters Dopamin, was schon in den 60er Jahren als mögliche Ursache für die Kernsymptomatik des PD vermutet wurde (Carlsson, 1959), wobei

DA Mittelhirnneurone nicht im gleichen Maße von der fortschreitenden Neurodegeneration betroffen sind.

1.2 Physiologie und Pathophysiologie des Morbus Parkinson

1.2.1 Der Neurotransmitter Dopamin

Der Neurotransmitter Dopamin ist ein biogenes Katecholamin, welches aus der Aminosäure L-Tyrosin entsteht. Die Tyrosin-Hydroxylase (TH) ist das Schlüsselenzym für die Synthese der Katecholamine und somit auch der Dopaminsynthese. Es wandelt die Aminosäure L-Tyrosin in Levodopa (L-DOPA) um, indem das Enzym an den aromatischen Ring des Tyrosins eine weitere Hydroxy-Gruppe anfügt. Levodopa wird von der Aromatischen-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) durch Entfernen der Carboxy- (COOH-) Gruppe am Seitenarm zu Dopamin umgewandelt (Abb. 1 & 8).

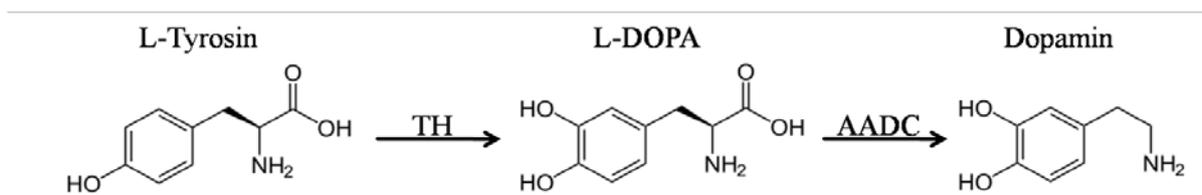


Abbildung 1 – Dopaminsynthese.

Die Zwischenschritte der Katecholaminsynthese bis zum Dopamin: Die Aminosäure L-Tyrosin wird durch Hydroxylierung am C3-Atom des aromatischen Rings durch die Tyrosin-Hydroxylase (TH) in L-DOPA umgewandelt. Aus L-DOPA entsteht durch Decarboxylierung unter Katalyse von AADC (Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase) der Neurotransmitter Dopamin.

Neurone, die Dopamin produzieren und ausschütten, werden dopaminerg (DA) genannt. Der Neurotransmitter Dopamin kann durch weitere Enzyme zu Noradrenalin und zu Adrenalin konvertiert werden. Im Gehirn wird TH als Markerenzym für DA Neurone, welche sich hauptsächlich im Mittelhirn befinden, verwendet (Nagatsu and Ichinose, 1991).

1.2.2 Aufbau und Funktion des dopaminergen Systems

Zum Verständnis einer Erkrankung gehört das Verständnis der zugrundeliegenden Physiologie und Pathophysiologie. Thema der vorliegenden Arbeit ist Morbus Parkinson (PD), somit muss in diesem Fall ein besonderes Augenmerk auf das DA System der Mittelhirnneurone und auf die Basalganglien als zentrale Steuerung der Willkürmotorik gelegt werden, da diese Systeme, insbesondere im Verlauf der Erkrankung an PD, in ihrer Funktion gestört sind.

1.2.2.1 Aufbau des humanen dopaminergen Mittelhirnsystems

Das humane Gehirn wird in fünf Strukturen eingeteilt: Großhirn (*Telencephalon*), Zwischenhirn (*Diencephalon*), Mittelhirn (*Mesencephalon*), Kleinhirn (*Cerebellum*) und Brücke (*Pons*) mit verlängertem Mark (*Medulla oblongata*) (Abb. 2). Das humane dopaminerge Mittelhirnsystem wird nach Dahlstrom und Fuxe neuroanatomisch in eine Area 8 (retrobruales Feld (RRF), retikuläres Feld des Mittelhirns), Area 9 (*Substantia Nigra*, SN) und Area 10 (Ventrales Tegmentales Areal (VTA), dieses wird in weitere Subnuklei unterteilt: *Ncl. Parabrachialis Pigmentosum*, *Ncl. Paranigralis*, *Ncl. Interfascicularis*, *Ncl. Parapeduncularis*, *Ncl. Lineares Centralis*, *Ncl. Lineares Rostralis*) unterteilt (Abb. 3) (Dahlstrom and Fuxe, 1964; McRitchie et al., 1996).

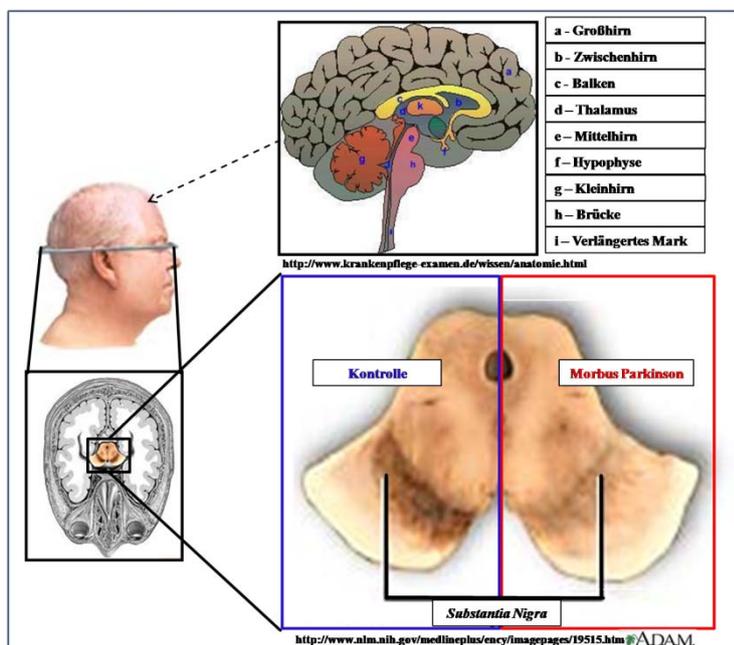


Abbildung 2 – Humanes Gehirn und Lage der *Substantia Nigra*.

Die *Substantia Nigra* (SN) befindet sich im Mittelhirn und ist bei horizontalem Anschnitt deutlich zu erkennen (unten links, blauer Kasten). Im Falle von Morbus Parkinson ist die Depigmentierung des Mittelhirns deutlich zu erkennen (unten rechts, roter Kasten). (eigene Illustration in Anlehnung an <http://www.krankenpflege-examen.de/wissen/anatomic.html> und <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/19515.htm>).

Die dopaminergen Neurone kennzeichnen sich im adulten humanen Mittelhirn durch Neuromelanin- (NM-) Ablagerungen im Zellkörper. Diese NM-Ablagerungen bestehen u.a. aus oxidiertem Dopamin und anderen oxidierten, zytosolischen Katecholaminen, wodurch eine Schwarzfärbung der Zellkörper dopaminergener Neurone entsteht (Hirsch et al., 1989). Durch den Neuromelaningehalt und die hohe Neuronendichte dopaminergener Neurone im Kerngebiet der *Substantia Nigra* lässt sich diese in Mittelhirnschnitten gut abgrenzen, daher leitet sich auch der Name *Substantia Nigra* aus dem lateinischen für „schwarze Substanz“ ab (Abb. 2 & 3) (Gibb and Lees, 1991).

Die SN wird in zwei Subregionen unterteilt: die dorsomedial gelegene *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) und die ventrolateral gelegene *Substantia Nigra pars reticulata* (SNpr),

wobei die Projektionsgebiete der SNpc u.a. im Striatum und die der SNpr u.a. im Thalamus liegen (Abb. 3) (Schünke, 2006; Trepel, 2004).

Die SNpr enthält überwiegend nicht-dopaminerge Neurone. Die Struktur der SNpr ist faserartig und im humanen Hirn wenig ausgeprägt (McRitchie et al., 1996).

Hauptprojektionsgebiete der DA Neurone der verschiedenen Kerne der Area 10 (VTA) sind das limbische System (*Amygdala, Ncl. Accumbens, Septumregion*) und der limbische Kortex (*Gyrus Cinguli, entorhinaler Cortex, Hippocampus*), sowie der präfrontale Kortex (*Pre-frontal Cortex, PFC*) und motorische und sensorische Hirnrindengebiete (Marinkovic, 1990; Oades and Halliday, 1987).

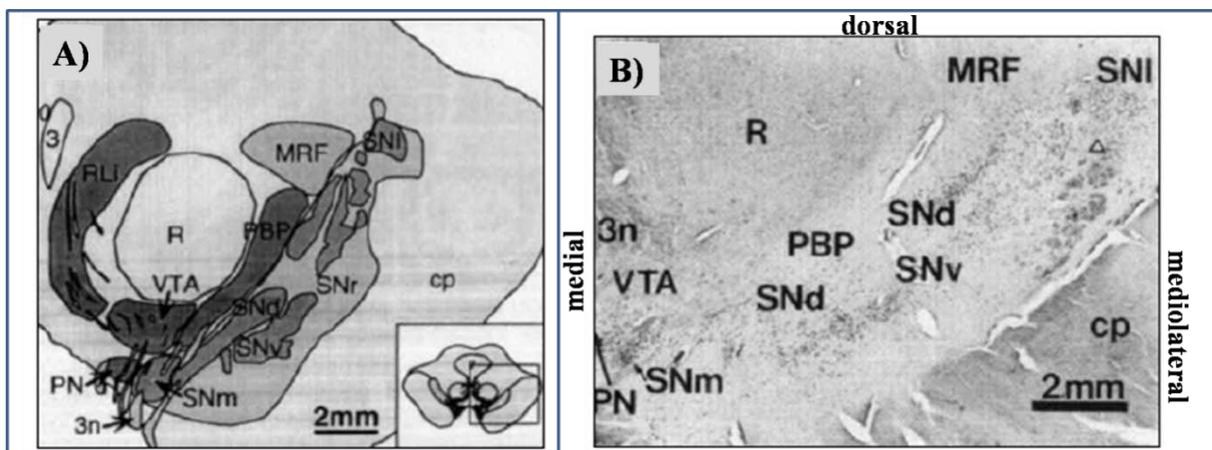


Abbildung 3 – Neuroanatomie des menschlichen dopaminergen Mittelhirnsystems.

Schematische Darstellung (A) und Cresylviolettgefärbung (B) des humanen Mittelhirns auf Höhe des 3. Hirnnervs (3n). Die Übersicht in A zeigt schematisch die Zellkompartimente des dopaminergen Mittelhirnsystems, die auf dem Gewebeschnitt ebenfalls erkennbar sind: *rostral linear nucleus (RLi), Nucleus ruber (R), Ventrales Tegmentales Areal (VTA), midbrain reticular formation (MRF), Nucleus parabrachialis pigmentosus (PBP) und paranigralis (PN), Cerebral peduncle (cp) und die Substantia nigra (SN) in den Unterteilungen ventralis (SNv), dorsalis (SNd), medialis (SNm) und lateralis (SNI) und reticularis (SNr)* (nach (McRitchie et al., 1996)).

1.2.2.2 Neuroanatomie des murinen dopaminergen Mittelhirnsystems

Für die vorliegende Arbeit diente die molekularbiologische Analyse muriner DA-Mittelhirnneurone, insbesondere der SN zur Etablierung neuer Methoden. Das Mittelhirn der Maus enthält drei Populationen dopaminergener Neurone: kaudal das retrorubale Feld (Areal 8, A8), weiter rostral die *Substantia nigra compacta* (SNc, Areal 9, A9) und das Ventrale Tegmentale Areal (VTA, Areal 10, A10).

Die Ablagerung von oxidierten Produkten und Neuromelanin ist auf höhere Säuger beschränkt, murine dopaminerge Mittelhirnneuronen weisen kein Neuromelanin auf, daher erscheinen diese mikroskopisch nicht schwarz (Marsden, 1961; Zecca et al., 2001). Dopaminerge SN und VTA Neurone lassen sich durch Nisslfärbungen wie z.B. mit

Cresylviolett anhand anatomischer Lage und Morphologie in coronalen Mittelhirnschnitten gut identifizieren (Abb. 4).

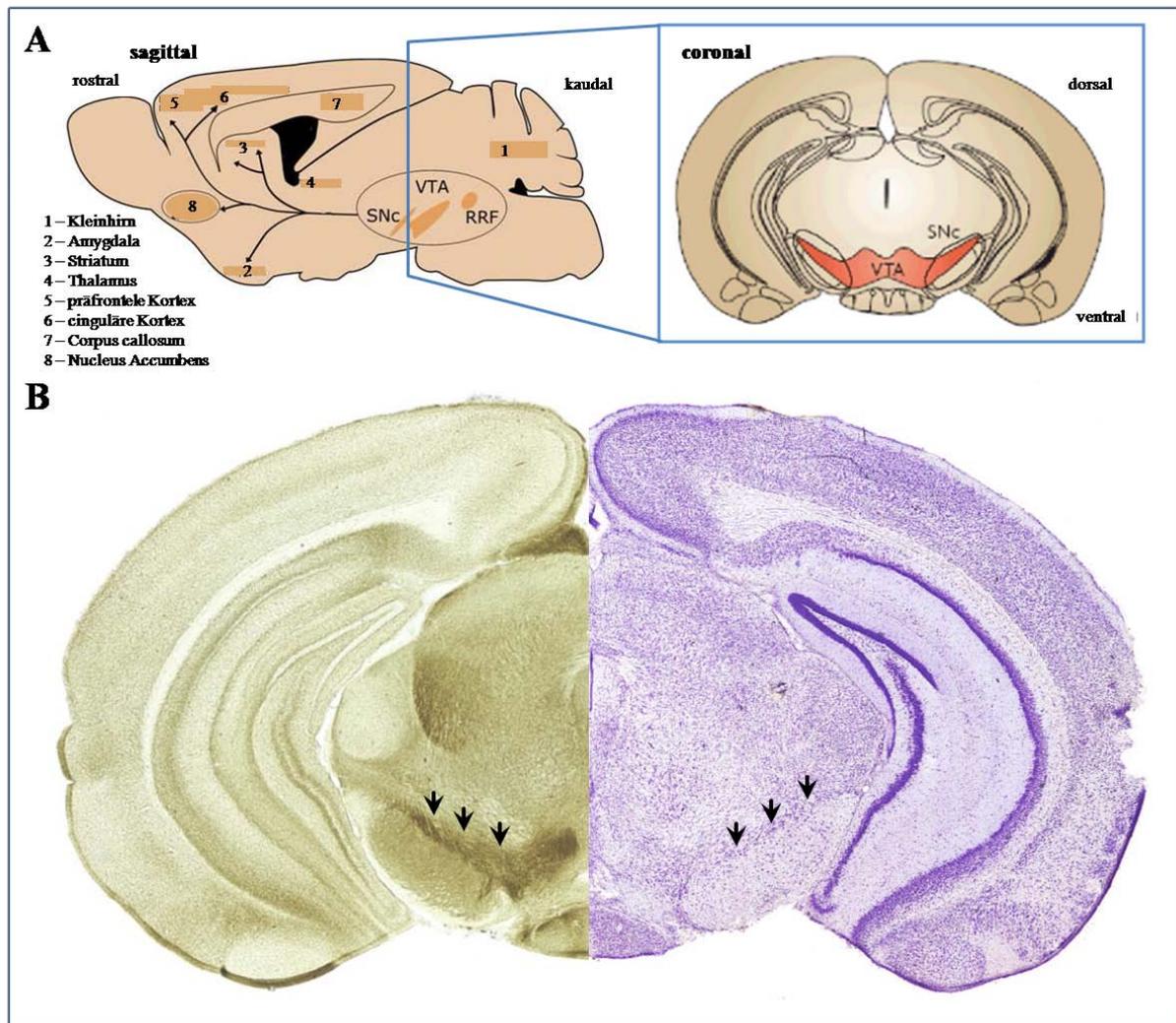


Abbildung 4 – Neuroanatomie des murinen dopaminergen Mittelhirnsystems.

Das Mittelhirn der Maus umfasst drei Populationen dopaminergener Neurone: kaudal liegend das retrorubale Feld (RRF), rostral folgend das Ventrale Tegmentale Areal (VTA) und die *Substantia nigra compacta* (SNc). Das dorsale Striatum erhält Afferenzen von den dopaminergen Neuronen der SN und der VTA. VTA-Neurone projizieren in den präfrontalen Kortex, in die basolaterale Amygdala und in Kern- und Hüllregionen des *Nucleus accumbens* (A, links). Die blau eingezeichnete Schnittebene stellt einen coronalen Mittelhirnschnitt mit SNC und VTA als Schema dar (A, rechts). Die Lage von SN DA Neuronen lässt sich mit Hilfe von Nisslfärbungen erkennen (B, rechts). Das Areal der SNc ist gekennzeichnet (Pfeilspitzen). Links ist eine entsprechende TH-Färbung gezeigt (B). Die SNc ist aufgrund des DA Faserverlaufs als dunkle Struktur sichtbar (Pfeilspitzen), benachbart ist die VTA deutlich zu erkennen. (A modifiziert nach (Bjorklund and Dunnett, 2007); B modifiziert nach (Paxinos and Keith, 2001))

1.2.2.3 Die Basalganglienschleife und Dopamin

Die Basalganglien umfassen das Striatum, den *Globus pallidus* (Gp), den *Nucleus Subthalamicus* (NST) und dopaminerge Mittelhirnneurone (SN und VTA). Beim Gp unterscheidet man ein internes oder mediales (Gpi oder Gpm) und ein externes oder laterales (Gpe oder Gpl) Segment.

Das Striatum, welches sich aus dem *Nucleus caudatus* und dem Putamen zusammensetzt, bildet den Eingangskern der Basalganglien. Hier erhalten die Hauptafferenzen des Striatums, die sogenannten *Medium Spiny Neurons* (MSN), glutamaterge, erregende Eingänge aus den Assoziationskortex des Frontal- und Parietallappens und aus dem Thalamus, sowie dopaminerge Eingänge aus der SNpc. Zu diesen Eingangssignalen kommen weitere Afferenzen aus dem Temporallappen, der Inselrinde und dem *Gyrus cinguli* (Deetjen, 2005; Trepel, 2004).

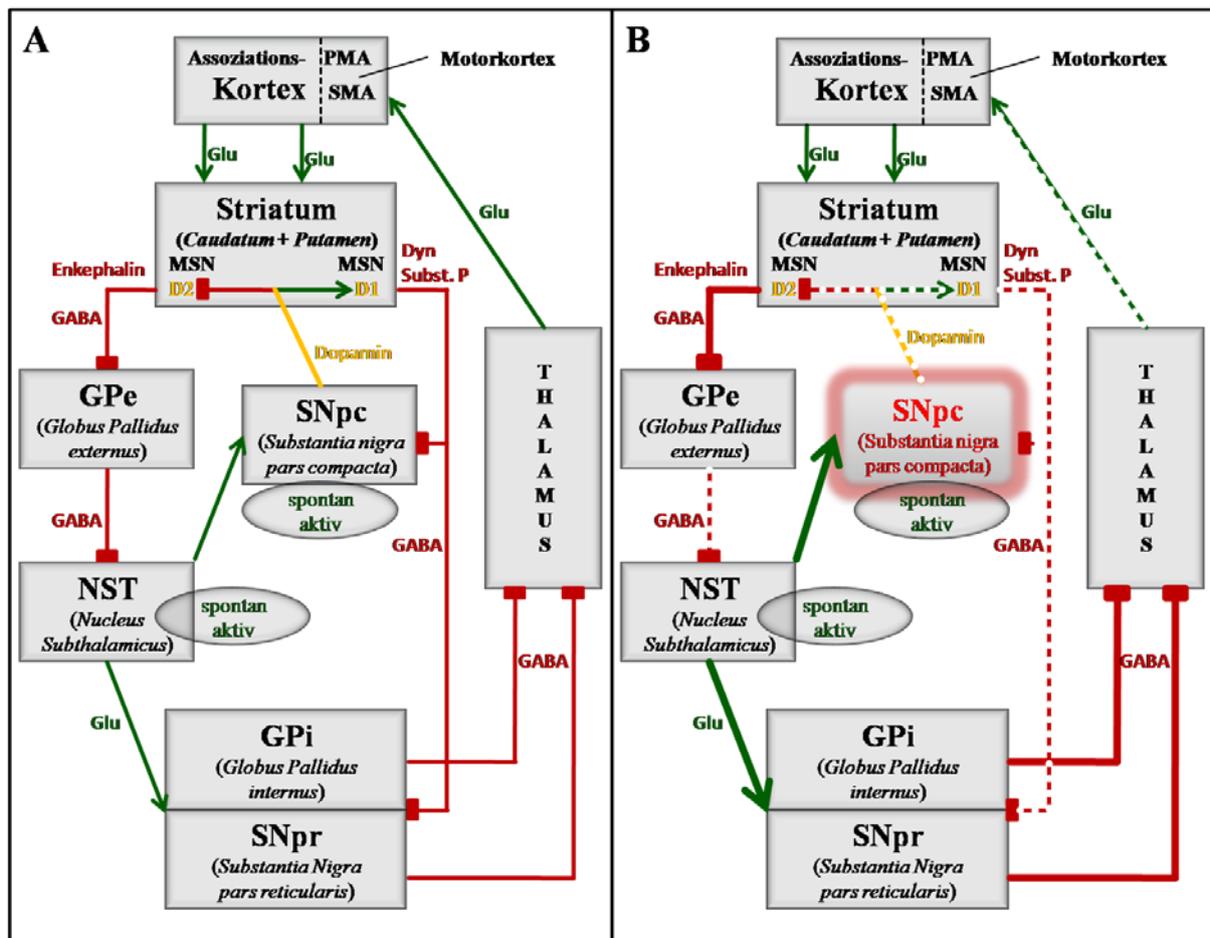


Abbildung 5 – Vereinfachtes Schema der Basalganglienschleifen.

A: Physiologie der Basalganglienschleife mit dem direkten Weg vom Striatum (MSN – Medium Spiny Neurone) zu Gpi und SNpr und dem indirekten Weg von Striatum zu Gpi und SNpr über den Gpe und NST. Erregende Bahnen und Transmitter sind grün, inhibierende rot dargestellt (dopaminerge Projektionen gelb). B: Pathophysiologie durch abgestorbene dopaminerge Neurone in der SNpc bei Morbus Parkinson. Die Stimulation des Thalamus über den direkten Weg ist zunehmend vermindert (gestrichelte Linie), während die Aktivierung von Gpi und SNpr durch den indirekten Weg zunimmt. Aus diesem Ungleichgewicht der Signale folgt eine zunehmend erschwerte Disinhibition des Thalamus. (PMA – Prämotorisches Areal; SMA – Supplementär-motorisches Areal; Dyn – Dynorphin, Subst. P – Substanz P)

Der Hauptausgang der Basalganglien erfolgt über erregende, glutamaterge Neurone der Thalamuskern. Auf diese bewegungsfördernden Thalamuskern wirken der Gpi und die SNpr hemmend. Die physiologische Hauptaufgabe der Basalganglienschleife liegt darin, die

Aktivität der hemmenden Neurone zu kontrollieren, bzw. zu modulieren und so Willkürbewegungen zu ermöglichen (Abb. 5).

Die striatalen MSNs können über inhibierende GABAerge Projektionen (Cotransmitter Substanz P, Dynorphin) den Gpi und die SNpr direkt hemmen (direkter Weg) und dadurch die Inhibition des Thalamus aufheben. Eine zusätzliche Stimulierung dieses direkten Wegs erfolgt über dopaminvermittelte D1 Rezeptorstimulation der MSNs.

Des Weiteren führen GABAerge MSNs (Cotransmitter Enkephalin) zur Inhibition des Gpe und somit zur Aktivierung des Gpi über die verstärkte Aktivierung des glutamatergen NST. Dieser indirekte Weg wird von Dopamin über D2 Rezeptoren auf den MSNs inhibiert, wirkt, mit der Zwischenschaltung von Gpe und NST, als Bremse dem direkten Weg entgegen und hemmt somit die Bewegungsbahnung. Durch die dopaminabhängige Stimulierung (D1) des direkten Wegs und D2 Inhibition des indirekten Wegs bewirkt Dopamin kontextabhängig eine netto Thalamus-Disinhibition (Abb. 5 A).

Aus dem fortschreitenden Verlust dopaminerger Mittelhirnneurone von PD-Patienten erfolgt ein Dopaminmangel im Striatum. Dieser Mangel reduziert die Aktivierung des direkten Weges (D1) und schwächt gleichzeitig die Inhibition des indirekten Weges (D2), was insgesamt die Aktivität von Gpi und SNpr erhöht. Aus dieser pathophysiologischen Imbalance der Basalganglien resultiert eine zunehmend erschwerte Disinhibition der Thalamuskern, womit der Hauptoutput der Basalganglien zu den motorischen Feldern des Kortex zunehmend erschwert wird (Abb. 5 B). Die Folge ist an PD-Patienten sichtbar: auszuführende Bewegungen werden ohne dopaminerge Modulation schwerer gebahnt und führen zur PD-typischen eingeschränkten Bewegungssymptomatik.

1.2.3 Differentielle Vulnerabilität dopaminerger Mittelhirnneurone

Erst nach einem Verlust von über 70 % der DA SN Neurone (Langston, 1990) oder einem Verlust von 70-80 % des striatalen Dopamins (Bernheimer et al., 1973) sind erste Kardinalsymptome von PD zu erkennen, die zumeist asymmetrisch beginnen und sich progressiv ausweiten (Klein and Schlossmacher, 2006).

Da bei PD weitere Systeme des Körpers betroffen sind, wird die Erkrankung zur Beschreibung dieses multisystemischen Charakters auch als zentrosympathomyenterische Neuronopathie bezeichnet (Langston, 2006). Zu den betroffenen Systemen neben der SN gehören Gebiete des Zentralnervensystems (ZNS) wie der *Nucleus basalis Meynert*, der Hypothalamus, die dorsalen motorischen Kerne des *Nervus vagus* wie der untere Hirnstamm, der *Bulbus Olfactorius*, die Brückenregion, der Neo- und Temporalkortex, die *Amygdala* und

das periphere autonome Nervensystem (Braak et al., 2001; Braak et al., 2003; Langston, 2006).

Die unterschiedlich starken Degenerationsherde dopaminerg, NM-positiver Mittelhirnneurone im Morbus Parkinson lassen sich wie folgt beschreiben: am häufigsten, mit etwa 71-100 %, sterben diese in der SNpc *ventralis*, in der SNpc *dorsalis* sterben ca. 56 %, während in der lateralen SN nur ein Anteil von ca. 31 % sterben (Fearnley and Lees, 1991; Gibb and Lees, 1991; Hassler, 1938; Hirsch et al., 1989). Diese selektive Neurodegeneration innerhalb der SN ist spezifisch für PD und korreliert nicht mit der altersbedingten allgemeinen Degeneration der SN, bei welcher am häufigsten die dopaminergen NM(+) SN Neurone in der dorsalen SNpc (ca. 6,9 % / Dekade) sterben, während in der ventralen SNpc weniger (ca. 2,1 % / Dekade) zu Grunde gehen (Damier et al., 1999a, b; Fearnley and Lees, 1991). Des Weiteren sterben auch etwa die Hälfte der dopaminergen Neurone des *Nucleus parabrachialis pigmentosum* (PBP) und des *Nucleus parapeduncularis* (McRitchie et al., 1997). In den übrigen Kernen der Area 10 (*Nucleus rostralis linearis*, *Nucleus centralis linearis*, *Nucleus interfascicularis*, *Nucleus paranigralis*, Ventrales Tegmentales Areal - VTA) und in der Area 8 (retro rubales Feld) ist im PD nur eine geringe dopaminerge Neurodegeneration zu beobachten (Damier et al., 1999a, b; Hirsch et al., 1989; McRitchie et al., 1997).

Ein Marker für weniger vulnerable DA Mittelhirnneurone ist das Ca²⁺-bindende Protein Calbindin-D28k (CB). Weiterhin ist bekannt, dass CB insbesondere in dopaminergen Neuronen der VTA exprimiert wird, und nur zu etwa 10 % in den DA Neuronen der SN (Kim et al., 2009).

1.3 Ursachen und Pathomechanismen des PD

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) macht ca. 75 % der Gesamtfälle von Parkinsonismus aus. Synonyme Begriffe sind Morbus Parkinson, primärer und idiopathischer Parkinsonismus. Neben dem IPS sind familiäre, monogenetische Parkinsonsyndrome bekannt. Des Weiteren unterscheidet man von PD ähnliche Krankheitsbilder der gleichen Symptomatik mit bekannten Ursachen der Krankheitsentstehung wie sekundären Parkinsonismus, monogenetischen Parkinson, Parkinson-Plus Syndrome und Heredodegenerative Erkrankungen (Diaz and Waters, 2009).

Einige Ursachen und Auslöser von Parkinsonismus und PD sind bisher identifiziert. Bislang ist beschrieben, dass Umwelteinflüsse wie Medikamente (z.B. Neuroleptika) und Toxine (CO, MPTP, 6-OHDA, Mangan, Zyanid), Krankheiten wie Enzephalitis oder Hirntumore, sowie Genmutationen und genetische Prädisposition die Krankheit hervorrufen können

(„*Multiple Hit Theory*“ (Bueler, 2009; Sulzer, 2007)). Zudem wird die Möglichkeit eines bislang unbekanntes Pathogens diskutiert, welches über die Nase und den Verdauungstrakt in den Körper gelangt und dort die Parkinsonsymptome auslöst („*Dual Hit Theory*“ (Hawkes et al., 2009)). Entsprechend liegt nahe, dass eine Kombination von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren für den Großteil der idiopathischen PD-Fälle verantwortlich ist.

Bislang sind genetische und Umweltfaktoren beschrieben, die auf zwei verschiedene intrazelluläre Stoffwechselwege weisen, die mit dem Auslösen von PD zusammenhängen. Zum einen ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) beteiligt, welches zur Degradation zellulärer Abbauprodukte benötigt wird, zum anderen die Atmungskette der Mitochondrien, welche die Energieversorgung der Zelle sichert. Dennoch sind die distinkten, molekularbiologischen Mechanismen und Ursachen die zur Degeneration der DA SN Neurone führen und unweigerlich PD verursachen, immer noch unklar (Lee and Andersen, 2010).

1.3.1 Auswahl der Kandidatengene für die Genexpressionsstudien des PD

Diese Arbeit soll durch die Untersuchung der Genexpression individueller DA Mittelhirnneurone aus *post-mortem* Mittelhirngewebe von PD (Morbus Parkinson)-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen zum Verständnis der molekularen Pathomechanismen von PD beitragen. Die Auswahl der untersuchten Gene erfolgte systematisch. Zunächst wurden die mRNA-Level von Markergenen untersucht: ENO2 als Neuronenmarker, CB als Marker weniger vulnerabler Neurone und JMJD1C als Dopamin- und PD-unabhängige Kontrolle. Weiterhin wurden die mRNA-Level der Dopamin-assoziierten Gene TH, DAT, VMAT2, D2, NURR1, PITX3, sowie die miRNA mi-R133b; der aktivitätskontrollierenden Ionenkanäle GIRK2, spannungsabhängige A-Typ Kaliumkanäle, HCN-Kationen-Kanäle, spannungsabhängiger Calcium-Kanäle, SK3-Kaliumkanäle, K_{ATP}-Kanäle und NMDAR1, sowie der PARK-Gene LRRK2, α -SYN und PARKIN untersucht. Zusätzlich wurden Kandidatengene auf Grundlage von Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe (Milani et al., in preparation) und von Kooperationspartnern (Gispert et al., 2003; Hoepken et al., 2008); Auburger et al., unpublished) in die Studien miteinbezogen.

1.3.1.1 Monogenetische Formen des PD

Seit 1997 wurden diverse Gene identifiziert, bei denen Gendosisveränderungen oder Mutationen zu erblichen Formen des Morbus Parkinson führen können. Diese monogenen Formen der Parkinsonerkrankung erklären bislang ~10 % aller Parkinsonfälle (Gasser, 2009). In Tabelle 1 sind die bislang bekannten Gene zusammengefasst.

| Gen | Lokus | PD-Form | Lewy-Bodies | Mutationen | Entdecker |
|--|---------|----------------|-------------|------------|---|
| α -Synuclein | PARK1/4 | 4q21-q23 | EO, ad | + | genom. Dupli-/Triplikation, Punktmutationen (Polymeropoulos et al. 1997) |
| Parkin | PARK2 | 6q25.2-q27 | EO, ar | - | Punktmutationen, Exon-Rearrangements (Kitada et al. 1998) |
| ? | PARK3 | 2p13 | ad | ? | (Klein et al. 1999) |
| UCHL-1 | PARK5 | 4p14 | LO, ad | ? | bislang nur eine Mutation (S18Y) bei einem PD-Geschwisterpaar bekannt (Leroy et al. 1998) |
| PINK1 | PARK6 | 1p35-p36 | ar | ? | Punktmutationen (Teildeletionen) (Valente et al. 2001) |
| DJ-1 | PARK7 | 1p36.23 | EO, ar | ? | Punktmutationen, Teildeletionen (van Duijn et al. 2001) |
| LRRK2 | PARK8 | 12q11.2-q13.12 | LO, ad | +/- | Punktmutationen, Missensmutationen (Funayama et al. 2002) (Paisan-Ruiz et al. 2004) |
| ATP13A2 | PARK9 | 1p36 | EO, ar | ? | Punktmutationen (Ramirez et al. 2006) |
| ? | PARK10 | 1p32 | ? | ? | (Hicks et al. 2002) |
| ? | PARK11 | 2q36-37 | ? | ? | (Maraganore et al. 2005) (Prestel et al. 2005) |
| ? | PARK12 | Xq21-q25 | ? | ? | (Pankratz et al. 2003) |
| OMI/HTRA2 | PARK13 | 2p12 | ad? | ? | (Strauss et al. 2005) |
| PLA2G6 | PARK14 | 22q13.1 | ar | ? | (Paisan-Ruiz et al. 2009) |
| FBX07 | PARK15 | 22q12-q13 | ar | ? | (Di Fonzo et al. 2009) |
| SLC45A3, NUCKS1, RAB7L1, SLC41A1, PM20D1 | PARK16 | 1q32 | ? | ? | (Simon-Sanchez et al. 2009) (Satake et al. 2009) |

Tabelle 1 – PD-assoziierte Gene.

Zusammenstellung der PD-assoziierten Gene und Gen-Loki (PARK1-16) mit ihren zugeordneten Krankheitsbeginn (EO - *early onset*/frühes Auftreten von PD-Symptomen, LO – *late onset*/spätes Auftreten von PD-Symptomen), Vererbungsmuster (ad – autosomal dominant, ar – autosomal rezessiv), Mutationstypus und dem Vorkommen von Lewy-Bodies, soweit bekannt. Die Fragezeichen (?) dienen als Platzhalter für bislang noch unbekannt Einträge. Die Gene und Genabkürzungen sind im Folgenden näher beschrieben.

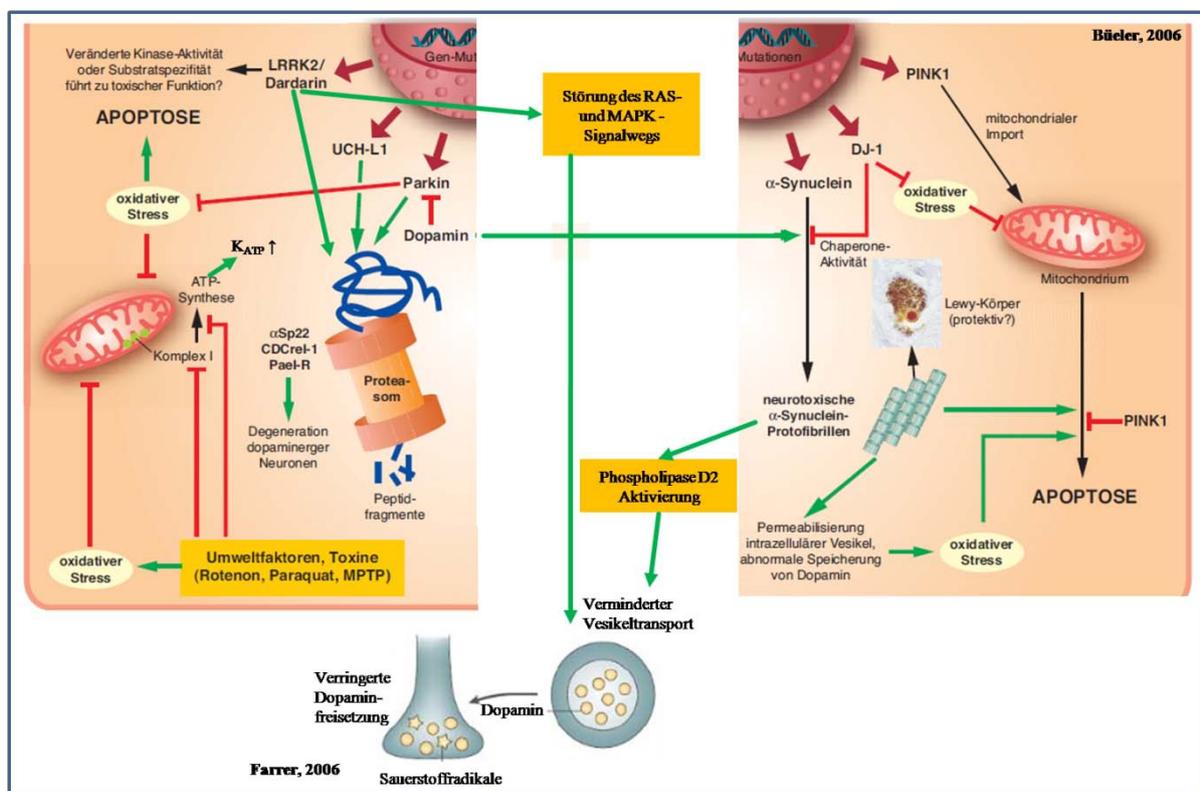


Abbildung 6 – Molekulare Pathomechanismen des PD.

Die PARK-Gene sind an mitochondrialen Defekte, oxidativem Stress und einer verminderten Fähigkeit der Neuronen, bestimmte Proteine abzubauen, beteiligt. Diese Mechanismen liegen der Neurodegeneration DA Mittelhirnneurone zugrunde (verändert nach (Bueler, 2006) und (Farrer, 2006), Details siehe Text).

Das Parkinsongen α -Synuclein (α -SYN, PARK1 & 4)

α -Synuclein (α -SYN) ist ein präsynaptisches Protein und das erste bekannte Gen, das durch *missense* Punktmutationen (Polymeropoulos et al., 1997) und Gendosisveränderungen wie Duplikation (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004) oder Triplikation (Singleton et al., 2003) zu dominanten, familiären Formen des PD führt (PARK1 & 4). Neben dem hauptsächlich exprimierten *full-length* α -Synuclein (NACP140) existieren die Splicevarianten NACP126 (kein Exon 3) und NACP112 (kein Exon 5) (Ueda et al., 1994). Das Protein liegt im Zytosol als globuläres Monomer vor und hat eine α -helikale Struktur wenn es Membran-assoziiert ist, wobei es zur Oligomerisierung neigt (Halliday and McCann, 2008). Mutationen des α -SYN Gens verändern die Struktur des Proteins und inhibieren den lysosomalen und Chaperon-vermittelten (*CMA-Chaperone-Mediated Autophagy*) Abbau des fehlgefalteten Proteins, was zu oxidativem Stress der Zelle führt (Xilouri et al., 2009) (Abb. 6). Die Expression des α -SYN Gens wurde in Neuronen, Glia- und Endothelzellen nachgewiesen (Halliday and McCann, 2008). Mit Hilfe eines Mausmodells (α - und β -Synuclein Knock-Out Mäusen) konnte gezeigt werden, dass α -SYN nicht essentiell für die normale Hirn- und Synapsenfunktion ist, aber in *double knock-out* (α - und β -Synuclein) Mäusen die Dopaminlevel um 20 % verringert sind (Chandra et al., 2004), was mit einem verminderten Vesikeltransport assoziiert ist (Farrer, 2006) (Abb. 6). Des Weiteren ist α -SYN Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen (Dickson et al., 2009; Spillantini et al., 1997). Ob α -SYN-Ablagerungen bzw. Lewy-Körperchen protektiv (Kramer and Schulz-Schaeffer, 2007) oder schadhaft sind (Conway et al., 2000), ist umstritten (Halliday and McCann, 2008) (Abb. 6).

Funktionell wird α -SYN Chaperon-Aktivität zugeschrieben. Es enthält N-terminal eine Apolipoprotein-ähnliche A2-Helix, eine Lipidbindedomäne und eine hydrophobe *Non-Amyloid Component* (NAC)-Region, welche die Aggregatbildung erleichtert. Der C-Terminus kann vermutlich andere Proteine binden, sowie Chaperon-ähnliche Funktion tragen (Halliday and McCann, 2008). Aktuelle Studien zeigen eine Interaktion von α -SYN mit dem Parkinsongen ATP13A2, wobei ATP13A2 der α -SYN-Toxizität entgegenwirken kann (Gitler et al., 2009).

Das Parkinsongen Leuzin-reiche Repeat Kinase 2 (LRRK2, PARK8)

Aus der Familie der *leucine-rich repeat* Kinasen gehört LRRK2 (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2*) zu den Proteinen, von denen Mutationen zu dominant vererbter Form des PD führen (PARK8) (Funayama et al., 2002).

Erstmals beschrieben wurde der Genlocus von LRRK2 2002 (Funayama et al., 2002) und das Gen 2004 (Paisan-Ruiz et al., 2004) und von diesen nach dem baskischen Wort für Tremor „*dardara*“ DARDARIN genannt. LRRK2 ist ein multifunktionelles Protein. Folgende Funktionen von LRRK2 sind beschrieben: Kinase-Aktivität, Autophosphorylierung-Aktivität (West et al., 2005), Induktion von Apoptose durch mutiertes LRRK2 in Neuronen (Smith et al., 2005), GTPase-Aktivität (Deng et al., 2008) und diverse Interaktionen mit anderen Proteinen, z.B. PARKIN (mittels der ROC-Domäne an der C-terminalen R2 RING-Finger Domäne von PARKIN) (Smith et al., 2005), sowie Störung des RAS- und MAPK-Signalwegs, was wiederum zu einem verminderten Vesikeltransport führt (Farrer, 2006) (Abb. 6).

Das Parkinsongen PARKIN (PARK2)

Mutationen von PARKIN führen zu rezessiven vererbten Formen des PD (Klein and Lohmann, 2009). Innerhalb des Gehirns findet die PARKIN-Expression hauptsächlich in Zellkörpern (mit Ausnahme von Glia-Zellen) von Zellen im Mittelhirn, den Basalganglien, cerebralen *Cortex* und *Cerebellum* statt. Innerhalb der Zellen scheint PARKIN mit dem zytoskelettalen Kompartiment zu interagieren. Aktuelle Studien zeigen, dass PARKIN mitochondrielle DNA (mtDNA) vor oxidativem Stress schützt und mtDNA-Reparatur-Mechanismen stimuliert (Rothfuss et al., 2009) (Abb. 6).

Das PARKIN-Protein trägt N-terminal Ubiquitin E3-Ligaseaktivität und kann zum *Targeting* von Substraten für den proteasomalen Abbau beitragen (Bueler, 2006) (Abb. 6).

1.3.1.2 Dopamin-assoziierte Gene

Die Genregulation, die zur Ausdifferenzierung dopaminerger Mittelhirnneurone führt, ist komplex. Für die Entwicklung dopaminerger Mittelhirnneurone sind verschiedene Gene identifiziert, die im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren zur Anlage und Ausdifferenzierung dopaminerger Mittelhirnneurone führen (Iversen et al., 2010; Martinat et al., 2006). Abbildung 7 fasst die in dieser Studie untersuchten dopaminergen Entwicklungs-, Differenzierungs- und Maintenancegene nach deren Auftreten in der Entwicklung zusammen. NURR1, PITX3 und D2 sind für die Spezifizierung, die Differenzierung und den Erhalt dopaminerger Neurone essentiell. Die DA Markergene TH, DAT und VMAT2 sind nicht für die Entwicklung der DA Mittelhirnneurone notwendig.

PITX3 und NURR1

NURR1 oder NR4A2 (Nuklearer Rezeptor Subfamilie 4, Gruppe A, Mitglied 2) ist ein Mitglied der Hormon (Steroid, Thyroid, Retinoid)-Rezeptor Superfamilie. Die längste Isoform A (3447 bp) ist eingehend untersucht (Michelhaugh et al., 2005; Smidt and Burbach, 2009). Im Modellorganismus Maus konnte eine entscheidende Rolle von Nurr1 für die Entwicklung dopaminerger Mittelhirnneurone in SN und VTA nachgewiesen und zudem gezeigt werden, dass Nurr1 schon vor nachweisbarer Expression dopaminerger Markergene wie z.B. Th exprimiert wird und die Expression bis ins Erwachsenenalter eine wichtige Rolle für die Differenzierung dopaminerger Neurone spielt (Abb. 7 (Iversen et al., 2010)). Zusammen mit PITX3 nimmt NURR1 eine Schlüsselrolle für die Entwicklung, Differenzierung und Reifung von Stammzellen zu dopaminergen Mittelhirnneuronen ein (Martinat et al., 2006; Wurst and Prakash, 2010). Mutationen von NURR1 und PITX3 sind mit seltenen familiären Formen des PD assoziiert, sowie mit einem erhöhten Risiko, an PD zu erkranken (Fuchs et al., 2009; Le et al., 2003).

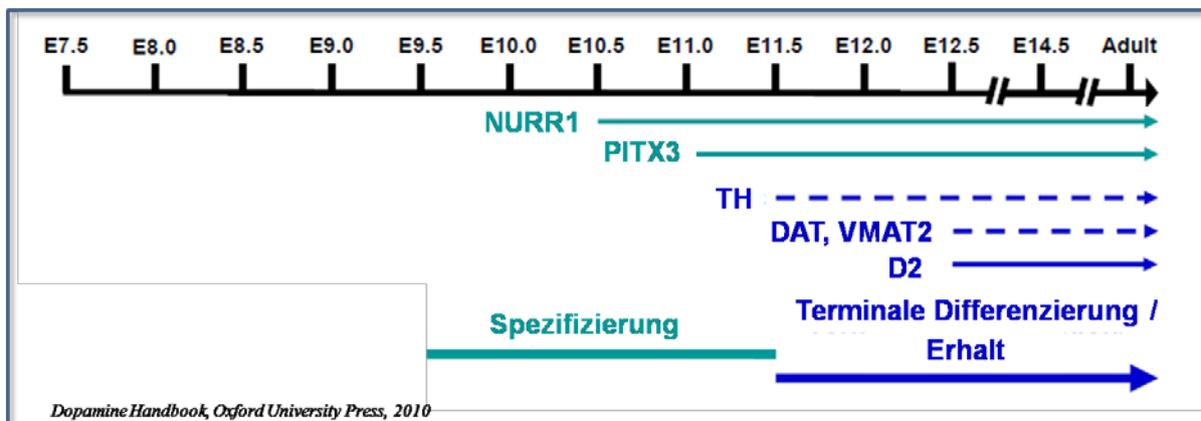


Abbildung 7 – Dopaminerge Markergene.

Zeitlicher Ablauf der Expression ausgewählter dopaminerger Differenzierungs- und Markergene im Mittelhirn. Aufgeführt sind die in dieser Arbeit untersuchten Gene (Abbildung verändert nach (Iversen et al., 2010), Zeitliche Achse: E – Embryonaltag).

PITX3 (*Paired-like Homeodomain Transcription Factor 3*) gehört zur RIEG(Rieger-Syndrom Gen)/PITX-Homeobox Familie. Insbesondere im Zusammenhang mit der Regulation von Reifung und Funktion dopaminerger Mittelhirnneurone ist PITX3 wichtig. Es ist postuliert, dass die Mikro-RNA (miRNA) miR-133b die Reifung DA Neurone durch eine negative Wechselwirkung mit PITX3 hemmt (Kim et al., 2007).

DAT

Der Dopamintransporter (DAT) vermittelt die Wiederaufnahme von Dopamin in die präsynaptische Zelle (z.B. nach synaptischer Freisetzung von Dopamin) und ist ein wesentlicher Regulator der dopaminergen Neurotransmission. Weiterhin wird DAT-Aktivität mit Erkrankungen wie Parkinsonismus, ADHS (Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom), Tourette-Syndrom und Drogenmissbrauch in Verbindung gebracht (Zhu and Reith, 2008). Wie auch TH dient DAT als Marker für dopaminerge Neurone.

DAT vermittelt auch den Transport von MPP⁺ (1-Methyl-4-Phenyl-Pyridin) ins Zellinnere dopaminergener Neurone, wo MPP⁺ irreversibel den Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette inhibiert, was wiederum zum Absterben der DA Neurone und Parkinsonismus führt (Storch et al., 2004). MPP⁺ entsteht im Gehirn aus MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydro-Pyridin) durch die Mono-Amino-Oxidase-B (MAO-B).

VMAT2

Das VMAT2-Gen kodiert für ein intrazelluläres, vesikelmembrangebundenes Transportprotein, welches Monoamine (u.a. auch Dopamin) unter ATP-Verbrauch in synaptische Vesikel transportiert (Sora et al., 2009).

Die funktionelle Expression von TH, DAT und VMAT2 definiert entsprechend die Bioverfügbarkeit von Dopamin im Zytosol und in Vesikeln.

D2 und GIRK2

Wie alle Dopamin-Rezeptoren gehört der Dopamin-Rezeptor vom Typ 2 (D2) zu den 7TM-Rezeptoren (sieben Trans-Membran-Helices). Die Dopamin-Rezeptoren werden in D2-Typ (D2, D3 und D4) und D1-Typ (D1 und D5) unterteilt. Der D2-Rezeptor findet sich sowohl postsynaptisch von dopaminergen Neuronen, als auch präsynaptisch und somatodendritisch als Autorezeptor. Es sind 2 Splicevarianten des D2-Rezeptors beschrieben, die kurze Variante D2s (*short*) und die lange Variante D2l (*long*) (Abb. 8, (De Mei et al., 2009)).

Nach Aktivierung durch eine extrazelluläre Dopaminbindung an D2, inhibiert die α -Untereinheit des durch den Rezeptor aktivierten G-Proteins die intrazelluläre Adenylat-Cyclase (AC)-Aktivität und die $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert u.a. direkt G-Protein gekoppelte Kaliumkanäle der Kir-Familie (GIRK2). Die Öffnung von GIRK2 führt zur Hyperpolarisation und somit zur Inhibition der Aktivität der Zelle (Abb. 8 (De Mei et al., 2009; Usiello et al., 2000)). Die Kombination D2-GIRK2 bietet also einen *feedback-loop* für die Aktivität

somatodendritischer DA Neurone. D2 ist ein später Marker und wichtig für die Entwicklung und dem Erhalt des Phänotyps dopaminerger Mittelhirnneurone (Iversen et al., 2010).

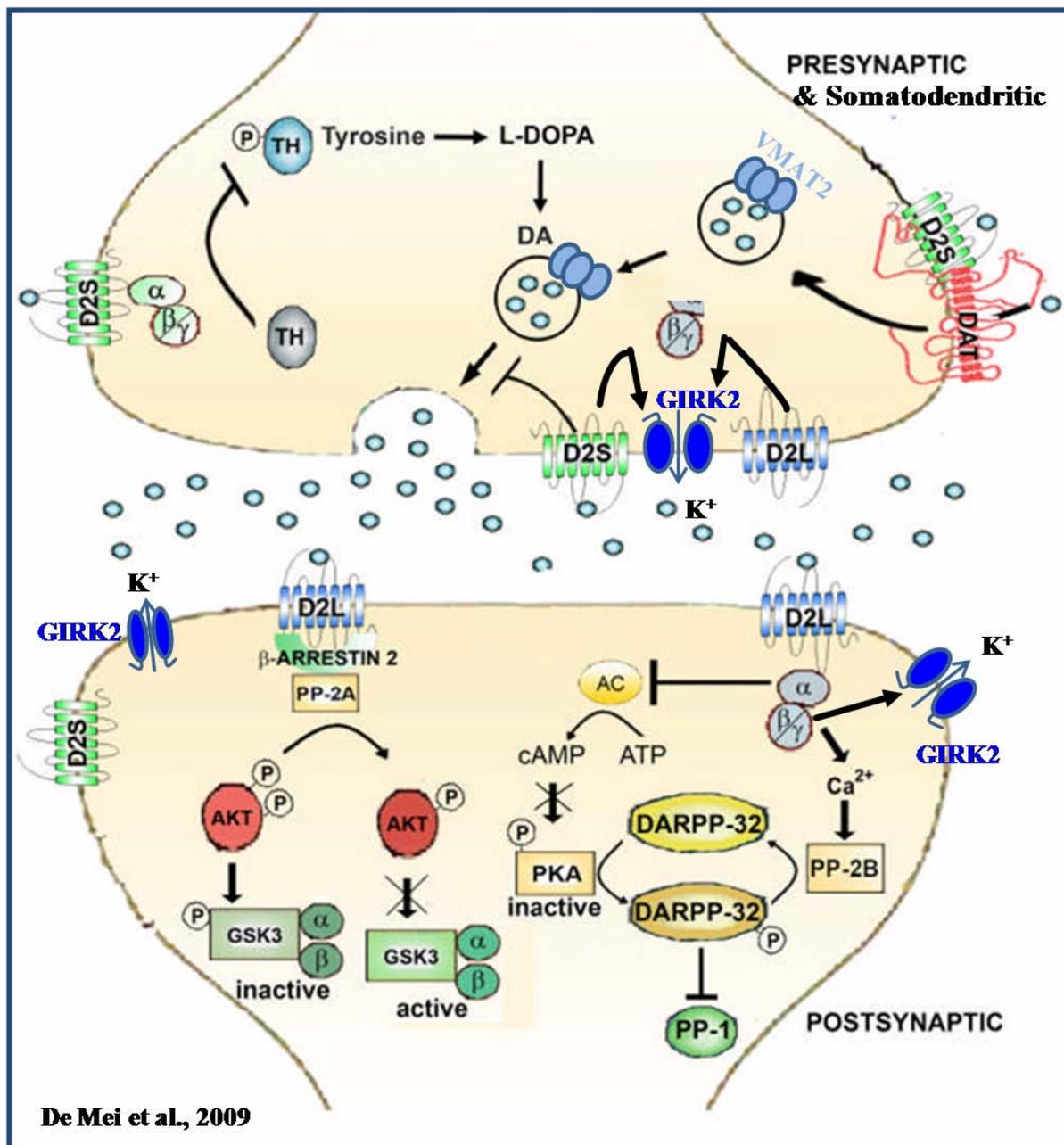


Abbildung 8 – D2-vermittelte prä- und postsynaptische Signale.

Schematische Darstellung der D2-vermittelten prä- und postsynaptischen Signalvermittlung. Präsynaptisch reguliert der D2-Rezeptor die DA Aktivität, Dopamin-Synthese und –Ausschüttung. Die kurze Isoform D2s (*D2 short*) moduliert die TH-Phosphorylierung und durch direkte Protein-Proteininteraktion die DAT-Aktivität. Vereinfacht sind die D2-vermittelten Effekte auf GIRK2-Kanäle, sowie auf den PKA (Proteinkinase A)- und den AKT (Proteinkinase B)-Signalweg illustriert. Durch die Aktivierung des D2-Rezeptors und somit Inhibition der Adenylatcyclase (AC) wird die Phosphorylierungsrate von DARPP-32 (Dopamin und cAMP reguliertes Phosphoprotein von 32 kDa) verringert. Zusätzlich stimuliert die D2-Aktivierung die Kalzium(Ca^{2+})-abhängige PP-2B-Aktivität, was die De-Phosphorylierung von DARPP-32 erhöht. Beide Signalwege führen zu eine Dis-Inhibition der PP-1-Phosphataseaktivität. Des Weiteren führt die D2-Aktivierung über β -Arrestin 2 und PP-2A zu einer De-phosphorylierung und Inaktivierung von AKT. Die Inaktivierung von AKT als Antwort auf Dopamin führt zur Inaktivierung von GSK3 β . (Abbildung in Anlehnung an (De Mei et al., 2009))

1.3.1.3 Mikro RNA und Genregulation

miRNAs (micro RNAs) sind kurze, i.d.R. 17-25 nt umfassende, endogene, nicht kodierende und hochkonservierte RNA-Moleküle (He and Hannon, 2004). Zusammen mit Argonaut-Proteinen bildet eine reife, einzelsträngige miRNA den RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*)-Komplex, welcher sequenzspezifisch mRNAs erkennt. Im RISC-Komplex hemmen miRNAs die Translation der Ziel-mRNA oder degradieren die Ziel-mRNA, je nachdem ob diese vollkommen komplementär zur Zielsequenz ist oder nicht (für Details siehe Abb. 9).

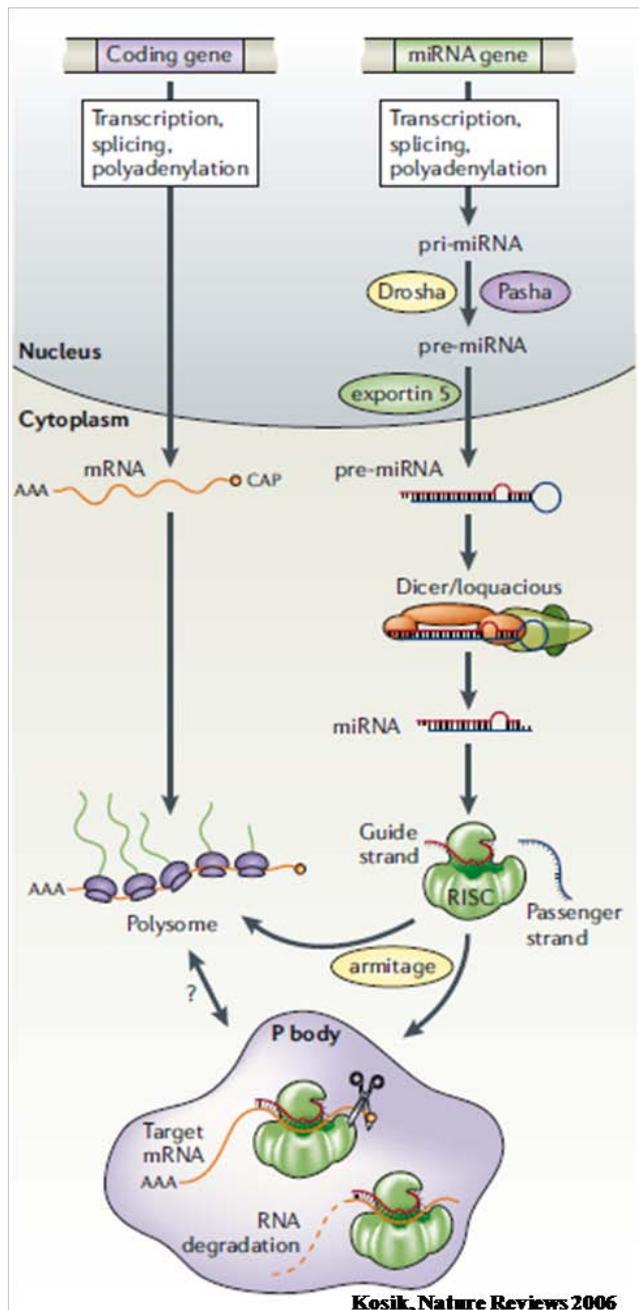


Abbildung 9 – Biogenese und Signalweg von miRNAs im Vergleich zu mRNAs.

MiKro RNAs (miRNAs) sind genomisch kodiert und haben RNA-Polymerase Pol II Promotoren. Das primäre Transkript wird als pri-miRNA bezeichnet. Pri-miRNAs werden im Nucleus durch das Rnase III Enzym Drosha, das im Enzymkomplex mit dem RNA-doppelstrangbindenden Protein Pasha vorliegt, zu Vorläufer-miRNAs (pre-miRNAs, engl. *precursor*) gespalten. Pre-miRNAs werden durch Exportin 5 aus dem Zellkern transportiert, wo diese durch einen Enzymkomplex, der die Enzyme Dicer und Loquacious enthält, gespalten werden. Das resultierende miRNA-Duplex wird aufgewunden (vermutlich durch die Helikase Armitage) und der Leitstrang (*Guide strand*) zum RISC (RNA-induzierter Silencing Komplex) transloziert. Im Komplex mit RISC bindet die miRNA ihre Ziel-mRNA und hemmt oder degradiert diese. Lichtmikroskopisch sind sogenannte P-bodies und Polysome als RISC-assoziierte zelluläre Strukturen zu erkennen (Abbildung von (Kosik, 2006), Nature Reviews).

Eine mRNA kann dabei von mehreren miRNAs reguliert werden, eine miRNA wiederum kann die Expression mehrerer hundert mRNAs regulieren (Fineberg et al., 2009).

Im Zusammenhang mit PD sind einige humane miRNAs beschrieben. Dabei ist die miRNA hsa-miR-133b bislang am besten charakterisiert (Hebert and De Strooper, 2007; Kim et al., 2007). Die humane hsa-miRNA-133b (hsa-miR-133b) ist mit stark reduzierten Leveln im Mittelhirn von PD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen in Zusammenhang gebracht. Es wurde postuliert, dass die Expression der hsa-miR-133b in DA Neuronen transkriptionell von PITX3 getriggert und die reife hsa-miR-133b wiederum Reifung und Funktion dopaminerger Mittelhirnneurone u.a. durch Inhibition der PITX3-mRNA beeinflusst (Hebert and De Strooper, 2007; Kim et al., 2007).

1.3.1.4 Aktivitätskontrolle dopaminerger Mittelhirnneurone

Die Aktivitätsmuster dopaminerger Mittelhirnneurone *in vitro* werden in Schrittmacheraktivität (*pacemaker*), „Burstaktivität“ und „still“ („*silent*“) unterschieden (Liss and Roeper, 2010). Schrittmacheraktivität bedeutet, dass Zellen Aktionspotentiale spontan intrinsisch generieren. Das Feuern einer hochfrequenten Abfolge von Aktionspotentialen gefolgt von einer Aktivitätspause wird als „Burstaktivität“ bezeichnet. Als „*silent*“ werden Neurone bezeichnet, die ein konstantes Membranpotential aufweisen. Die Aktivitätsmuster dopaminerger Neurone sind wichtig für die Menge und Kinetik der präsynaptischen und somatodendritischen Dopaminfreisetzung und damit der von Dopamin vermittelten Funktion. Für die Generation und Modulation der Aktivitätsmuster konnten mit Hilfe funktioneller und molekularbiologischer Einzelzellstudien eine Reihe von Ionenkanälen identifiziert werden. Unterschiede in der Expression und in der molekularen Zusammensetzung dieser Kanäle führen zu funktionellen Aktivitätsunterschieden in Hinsicht auf Aktionspotentiale und deren Verlauf, hyperpolarisierendes Nachpotential (AHP - *After Hyperpolarization*, Nachhyperpolarisation), ISI (Interspike Intervall), Frequenz, und sag-Komponente (Abb. 10) (Liss and Roeper, 2010).

Ausgewählte Ionenkanäle wurden in dieser Arbeit in Hinsicht auf Genexpressionsunterschiede untersucht.

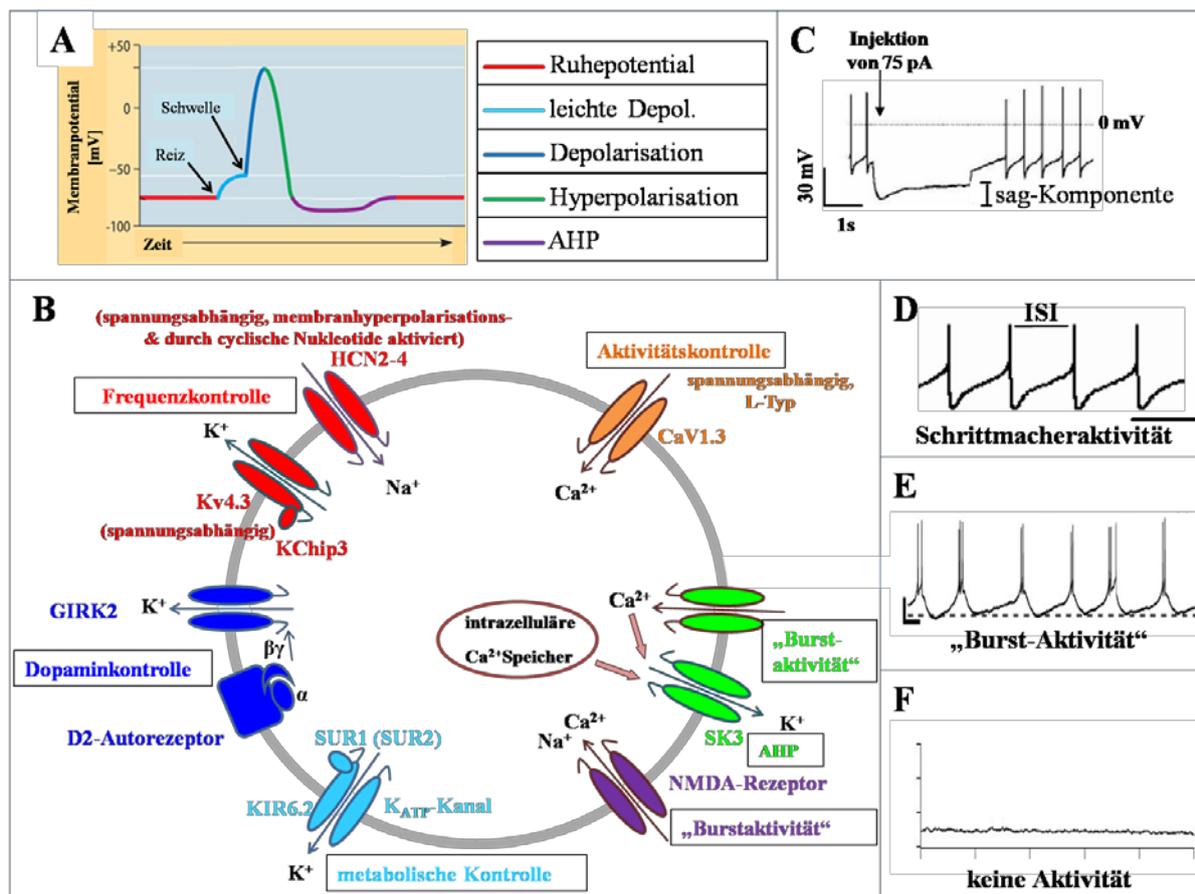


Abbildung 10 – Aktionspotentiale, Aktivitätsmuster und ausgewählte Ionenkanäle.

Übersicht von Aktionspotential, Ionenkanälen dopaminergere Mittelhirnneurone und funktioneller Aktivitätsmuster. A) Skizze eines Aktionspotentials mit dazugehörigen Aktionspotentialphasen. (AHP - hyperpolarisierendes Nachpotential; in Anlehnung an (Campbell and Reece, 2003)). B) Schematischer Überblick einer Auswahl relevanter Ionenkanäle, die Gegenstand dieser Arbeit sind und die in DA Mittelhirnneuronen Aktivitätsmuster modulieren: HCN-, A-Typ K^+ -Kanäle (Kv4.3/KChip3) (rot) und L-Typ- Ca^{2+} (CaV1.3)-Kanäle (orange), T-Typ Ca^{2+} -Kanal gekoppelte SK3-Kanäle (grün), K_{ATP} -Kanäle, der u.a. durch den Dopaminrezeptor (D2R) aktivierte GIRK2-Kanal und der NMDA-Rezeptor (modifiziert nach (Liss and Roeper, 2010)). C) Durch Hyperpolarisation der Zelle und durch Aktivierung von HCN-Kanälen vermittelte sag-Komponente von DA SN Neuronen (modifiziert nach (Lammel et al., 2008)). D-E) Beispiel für die Schrittmacheraktivität (Interspike Intervall (ISI)) und Burstaktivität (jeweils *in vitro current-clamp*-Messung, D: Skalierungsbalken: 0,5 s und 25 mV; modifiziert nach (Liss and Roeper, 2008); E: Skalierungsbalken: 1 s und 10 mV; (Wolfart and Roeper, 2002)). F) Neuron mit keiner messbaren Aktivität.

Spannungsabhängige A-Typ K^+ -Kanäle (Kv4.3 und KChip3)

Spannungsabhängige A-Typ Kalium-Kanäle sind Proteinkomplexe aus mindestens drei unterschiedlichen Untereinheiten: α -Untereinheiten, die die Kanalpore aus viermal sechs Transmembransegmenten bilden und β -Untereinheiten mit regulatorischer Funktion und calmodulinähnliche Untereinheiten KChip1-4 (An et al., 2000). A-Typ bedeutet, dass dieser Kanaltyp einen transienten Kaliumstrom vermittelt (A-Strom).

In adulten dopaminergere Mittelhirnneuronen werden A-Typ Kalium-Kanäle des Typs Kv4 und KChip3.1 exprimiert, die das Interspike Intervall verlängern und damit die Schrittmacherfrequenz bis zu einem gewissen Grad erniedrigen (Liss et al., 2001) (Abb. 10).

Der Calciumsensor Frequenin (FREQ)

Frequenin (FREQ) wird überwiegend in Neuronen exprimiert, bindet Calcium, reguliert calciumabhängige, G-Protein aktivierte Rezeptorphosphorylierungen und kann Calmodulin ersetzen. Das Frequenin-Protein ist mit sekretorischen Granula assoziiert und moduliert die synaptische Signalübertragung und Plastizität (Bourne et al., 2001). FREQ moduliert spezifisch Kv4 Kanäle (Bourne et al., 2001; Nakamura et al., 2001) und ähnelt auch vom strukturellen Aufbau der KChip-Familie (s.o.). Zudem fiel eine veränderte Genexpression von Freq im Mausmodell bei Überexpression von A53T- α -Syn auf (Gispert et al., 2003; Auburger et al., unpublished).

HCN-Kationen-Kanäle (HCN1-4, Trip8b)

HCN-Kanäle (*hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channels*) stimulieren die Frequenz der Schrittmacheraktivität (*pacemaker*) dopaminerger Mittelhirnneurone bis zu einem gewissen Grad. Sie werden durch Membranhypervolarisation aktiviert, sind für Natrium- wie Kaliumionen permeabel und bewirken unter physiologischen Bedingungen einen Netto-Natrium-Einstrom, was zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt. Des Weiteren regulieren zyklische Nukleotide (cAMP und cGMP) das spannungsabhängige Öffnen der HCN-Kanäle positiv durch direkte Bindung (Franz et al., 2000; Neuhoff et al., 2002).

Im murinen Mittelhirn wurde gezeigt, dass HCN-Kanäle in dopaminergen SN-Neuronen, aber nicht in dopaminergen VTA-Neuronen, aktiv an der Frequenzkontrolle der Schrittmacheraktivität beteiligt sind. (Neuhoff et al., 2002) (Abb. 10).

Ein funktioneller HCN-Kanal setzt sich aus vier Untereinheiten (HCN1-4) zusammen. Jede Untereinheit besteht aus zwei Hauptstrukturmodulen: der Transmembrandomäne aus sechs alpha-helikalen Transmembransegmenten und der C-terminalen Bindungsdomäne zyklischer Nukleotide (CNBD – *carboxy-terminal cyclic nucleotide-binding domain*) (Wahl-Schott and Biel, 2009). In dopaminergen Mittelhirnneuronen werden die Gene HCN2, HCN3 und HCN4 exprimiert (Franz et al., 2000).

Neue Erkenntnisse beschreiben **PEX5L** (*peroxisomal biogenesis factor 5-like*, murin **Trip8b**) als regulatorische β -Untereinheit von HCN-Kanälen. Coassemblierung von Trip8b mit HCN2 wirkt der Modulation des zyklischen Nukleotid-vermittelten Takts des HCN2 Kanals entgegen und stellt somit einen Kontrollmechanismus von HCN-Kanälen dar (Zolles et al., 2009).

Spannungsabhängige L-Typ Calcium-Kanäle (CaV1.2/3)

Funktionsfähige Calcium-Kanäle bestehen aus einem Proteinkomplex aus $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, δ - und γ -Untereinheiten im Verhältnis 1:1:1:1:1. Die $\alpha 1$ -Untereinheit bildet die Kanalpore, die anderen Untereinheiten haben modulatorische Eigenschaften. Die Einteilung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle erfolgt nach ihren $\alpha 1$ -Untereinheiten (Catterall et al., 2005).

CaV1.3 ist als Vulnerabilitätsgen für SN DA Neurone in PD Modellen identifiziert (Chan et al., 2009), weiterhin tragen spannungsabhängige Calcium-Kanäle zur Aktivitätskontrolle DA Mittelhirnneurone bei (Putzier et al., 2009) (Abb. 10).

Der SK3-Kaliumkanal (KCNN3)

In dopaminergen SN Neuronen ist der SK3-Kanal (*potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3*, humaner Genname KCNN3) an der Modulation von Frequenz und Kinetik der Schrittmacheraktivität beteiligt. Zudem bestimmt dieser maßgeblich das AHP (*after hyperpolarisation potential*). Diese Modulation von Erregbarkeit und Aktivität dopaminergener Neurone macht SK3-Kanäle zu einem möglichen Schlüsselgen bei der Entstehung von PD (Pedarzani and Stocker, 2008) (Abb. 10).

Der ATP-sensitive Kaliumkanal (K_{ATP} -Kanal; SUR1, SUR2, Kir6.2)

Der ATP-sensitive Kaliumkanal (K_{ATP} -Kanal) setzt sich in DA Mittelhirnneuronen aus der porenbildenden Kir6-Untereinheit und der regulatorischen SUR-Untereinheit jeweils im Verhältnis 4:4 zusammen (Liss et al., 2005). Die SUR1 und SUR2 (Sulfonyl-Urea-Rezeptor 1 und 2 oder ABCC8/9 - *ATP-Binding Cassette, sub-family C, member 8/9*)-Proteine gehören zur Superfamilie der ATP-Bindungs-Cassetten (ABC) Transporter.

K_{ATP} -Kanäle dienen für eine Vielzahl metabolischer Signale als Sensor und beeinflussen die Aktivität von DA Neuronen (Abb. 10). Diese Aktivität des Kanals bedingt in Mausmodellen des PD die erhöhte Vulnerabilität von DA SN Mittelhirnneuronen (Liss et al., 2005; Liss and Roeper, 2010).

Der Neurotransmitter-gesteuerte NMDA-Rezeptor (NMDAR1)

Der NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor - NMDAR) gehört zu den Glutamat-Rezeptoren. Dieser tritt bei schwachen synaptischen Wirkungen nicht in Aktion und steht in Verbindung mit dem Calciumhaushalt von Neuronen. In der *Substantia Nigra* reguliert der NMDAR die Aktivität dopaminergener Neurone (Fiorentini et al., 2008) (Abb. 10).

1.3.1.5 Markergene: PD und Dopamin unabhängig, Vulnerabilität und neuronal

Das Thyroid interagierende Protein 8 (JMJD1C)

Das JMJD1C (*jumonji domain containing 1C*)-Gen wird ubiquitär exprimiert. JMJD1C wird auch als TRIP-8 bezeichnet, diese Bezeichnung leitet sich von der Funktion des Proteins ab: *thyroid receptor-interacting protein 8*. Zusammenhänge von JMJD1C mit dem dopaminergen System oder PD sind nicht bekannt, daher wurde dieses Gen in die vorliegenden Studien als Dopamin- und PD-unabhängige Kontrollgen mit einbezogen.

Das Ca²⁺-bindende Protein Calbindin-D28k (CB)

Das Ca²⁺-bindende Protein Calbindin 1 (CB) gehört zur Troponin C Superfamilie. Jedes CB-Protein enthält vier aktive Ca²⁺-Bindungsdomänen (EF-Hand Motiv), die Ca²⁺-Bindung dient der Regulation des Ca²⁺-Haushalts der Zelle (Zhang et al., 2008). CB dient als Marker für weniger vulnerable DA Mittelhirnneurone (vgl. 1.2.3 & (Kim et al., 2009)).

Die neuronenspezifische Enolase 2 (ENO2)

ENO2 stellt die neuronenspezifische Form der Enolasen dar (auch NSE - Neuronen Spezifische Enolase genannt) (Oliva et al., 1991).

Enolasen (Phosphopyruvat Hydratasen) katalysieren die gegenseitige Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat während der Glykolyse. Somit ist ENO2 am Metabolismus von Neuronen direkt beteiligt und eignet sich als Marker für Neurone, da es in allen Neuronen exprimiert wird.

1.3.1.6 Kandidatengene aus Mausmodellen mit PD-assoziierter dysregulierter mRNA-Expression

Weitere Kandidatengene, die in der vorliegenden Studie hinsichtlich ihrer mRNA-Levels untersucht wurden, sind in Studien zur PD-Pathologie aufgefallen. Die Gene LDH-B, IGSF-4 und GSK3 β sind von der eigenen Arbeitsgruppe mit veränderter Genexpression zwischen weniger vulnerablen, murinen DA VTA und vulnerableren DA SN Neuronen identifiziert worden (Milani et al., in preparation), IGSF-4 ist weiterhin zusammen mit WNT5A mit veränderter Genexpression von PD-Patienten mit familiärem Parkinson (PINK1-Mutation) als verändert aufgefallen (Hoepken et al., 2008), weiterhin sind FREQ (s.o.) und HOMER1 mit veränderter Expression im Zusammenhang mit der PD-Pathogenese in Gewebestudien von Mäusen mit einer Überexpression einer mutierten alpha-Synuclein-Variante (A53T) im Vergleich von Mittelhirngewebe zu striatalem Gewebe als verändert aufgefallen (Auburger et al., unpublished).

Die Laktat-Dehydrogenase B (LDH-B)

Die Laktat-Dehydrogenase B (LDH-B) gehört zur Familie der NAD-abhängigen 2-Hydroxycarboxylase Dehydrogenasen. Die LDH-Enzyme katalysieren den letzten Schritt der Glykolyse (Pyruvat \leftrightarrow L-Laktat).

Von Laktat-Dehydrogenasen ist bekannt, dass diese die K_{ATP} -Kanaluntereinheiten KIR6.2 und SUR2 direkt binden und dadurch die Aktivität des Kanals steuern können (Crawford et al., 2002). Ferner ist in SN DA Neuronen im Vergleich zu den resistenteren VTA DA Neuronen eine erhöhte Genexpression von LDH-B im Mausmodell gefunden (Milani et al., in preparation).

Die Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β , GSK3B)

Die Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β , Abb. 8) gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen und ist ein multifunktionelles Protein, das an vielen Signalkaskaden, wie z.B. dem *Wnt-Pathway*, beteiligt ist, welcher GSK3 β inhibiert, was wichtig für die DA Neurogenese ist (Rayasam et al., 2009). Durch die Proteinkinase B kann GSK3 β phosphoryliert und somit deaktiviert werden. Auch in der D2-Signaltransduktion ist GSK3 β involviert (s.o., Abb. 8). GSK3 β kann zudem durch α -SYN aktiviert werden und hyperphosphoryliert in PD-Modellen Tau (p-Tau, Protein, das für Tauopathien verantwortlich ist), was zu Tau-Ablagerungen führt (Duka et al., 2009). Zudem ist ein regulatorischer Einfluss von PARKIN auf GSK3 β beschrieben (Moussa, 2009). Weiterhin konnte GSK3 β im Zusammenhang mit PD in Lewy-Körperchen nachgewiesen werden und wird zudem mit der Pathogenese der Erkrankung in Verbindung gebracht (Nagao and Hayashi, 2009).

In SNP- (*single nucleotide polymorphism*-) Analysen konnten bestimmte Haplotypen von GSK3 β mit einem erhöhten Risiko für die Pathogenese von AD und PD in Verbindung gebracht werden (Garcia-Gorostiaga et al., 2009; Kwok et al., 2005).

Das Immunglobulin der Super-Familie 4 (IGSF4)

IGSF4 gehört zur Immunglobulin Super-Familie 4 (IGSF4, SYNCAM1). Zu den bekannten Funktionen gehören Tumor-Suppressor-Eigenschaften, Zell-Adhäsion und Synapsen-ausbildung von Neuronen (Watabe et al., 2003). Transkriptionelle Veränderungen von IGSF4 wurden in Hautfibroblasten von PD-Patienten mit PINK1-Mutationen beschrieben (Hoepken et al., 2008).

Das humane Drosophila-Homolog zu Homer (HOMER1)

HOMER1 gehört zur HOMER-Familie dendritischer Proteine und ist mit veränderter Expression im Zusammenhang mit der PD-Pathogenese in Gewebestudien von Mäusen mit einer Überexpression einer mutierten alpha-Synuclein-Variante im Vergleich von Mittelhirngewebe zu striatalem Gewebe als verändert aufgefallen (Auburger et al., in preparation).

Das Signalprotein WNT5A

Die WNT-Genfamilie setzt sich aus strukturell verwandten Genen zusammen, die sekretierte Signalproteine kodieren. Proteine der WNT-Genfamilie (*wingless-type MMTV integration site family*, Protoonkogene) spielen eine Rolle bei Onkogenese und bei einigen Entwicklungsprozessen, wie beispielsweise der Regulation der Zellentwicklung und der Strukturierung während der Embryogenese (Witze et al., 2008). In Zusammenhang mit PD ist bei WNT5A eine transkriptionelle Veränderung in Fibroblasten von Patienten mit PINK1-Mutation beobachtet worden (Hoepken et al., 2008). Erhöhte Expressionslevel von WNT5A sind förderlich für die Entwicklung dopaminerger Mittelhirnneurone (Parish et al., 2008; Rayasam et al., 2009).

PARKIN kann Multi-Proteinkomplexe eingehen, Interaktionspartner sind unter anderem CHIP (*Carboxyl Terminus of the Hsc70-Interacting Protein*), HSP70 (*Heat Shock Protein 70*), PAEL-R, UBC7 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3*), α -SYN (s.o.), Synphilin-1 und Ubiquitin (Chung et al., 2001; Imai et al., 2002; Shimura et al., 2001).

In *Drosophila*-Studien konnte gezeigt werden, dass PARKIN und PINK1 in einem gemeinsamen Signalweg vor oxidativem Stress schützen, wobei PARKIN *downstream* von PINK1 agiert (Clark et al., 2006; Park et al., 2006; Poole et al., 2008).

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die gegenwärtige Situation der Erforschung der Pathomechanismen des PD gleicht einem Puzzle, bei dem viele Teile bekannt sind, aber das Gesamtbild sich noch nicht erschließt. Vergleichende Genexpressionsanalysen von PD-Patienten und gesunden Kontrollen leisten hier einen bedeutenden Beitrag, da von den Kontrollen abweichend regulierte Gene weitere Puzzlestücke darstellen und die in Kombination mit komplementären Mausmodellanalysen und genomweiten Genassoziationsstudien zum Gesamtbild der PD-Pathogenese beitragen können. Die vorliegende Studie soll zu einem besseren Verständnis der ursächlichen oder möglicherweise kompensatorischen Mechanismen des PD beitragen, und so idealerweise neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien des PD molekular definieren. Zur Erreichung dieses Ziels wurden mittels geeigneter Einzelzelltechniken (UV-LMD und *real-time* qPCR) die mRNA-Level von in diesem Kontext relevanten Kandidatengenen (mit Fokus auf DA Markergene und aktivitätsregulatorische Ionenkanäle) in DA *post-mortem* Mittelhirnneuronen von PD-Patienten und gematchten, nicht an PD erkrankten Kontrollen quantifiziert und verglichen.

Um die Analyse der Genexpression einzelner DA Mittelhirnneurone aus humanem *post-mortem* Material auch bei signifikanten Gewebe und RNA-Qualitätsunterschieden zu ermöglichen, sollte methodisch die UV-LMD *real-time* qPCR Einzelzelltechnik entsprechend optimiert werden, und darüberhinaus auf die Analyse von PFA-fixiertem Gewebe, sowie auf die Analyse von Mikro RNA (miRNA) erweitert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten vier Klassen von Kandidatengenen wurden in komplementären Mausansätzen mit ähnlicher Fragestellung in der eigenen Arbeitsgruppe selbst, oder von unseren Kooperationspartnern oder humanen, genomweiten Assoziationsstudien identifiziert.

Im speziellen wurde die Expression der

- DA Markergene TH, DAT, VMAT2, D2, ENO2, CB, NURR1, PITX3, sowie der miRNA miR-133b
- der Ionenkanalgene KIR6.2, SUR1, SUR2, NMDAR1, GIRK2, CaV1.3, Kv4.3, HCN2 und TRIP8B
- der für die meisten familiären Formen des PD kausalen Gene alpha-Synuclein (PARK1&4) und LRRK2 (PARK8)
- sowie der von uns oder unseren Kooperationspartnern im Mausmodellansätzen identifizierten Kandidatengene LDH-B, GSK3 β und IGSF-4, bzw. FREQ und HOMER1

erfolgreich untersucht.

Folgende spezifische Fragen sollten geklärt werden:

- A) Findet sich eine ggf. orchestrierte mRNA-Expressionsänderung in diesen vier Klassen von Kandidatengen in individuellen DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen?
- B) Ist eine ggf. geänderte Genexpression auf Einzelzellebene mit einer Expressionsänderung der miRNA miR-133b assoziiert, wie vor kurzem mittels Gewebeanalysen vorgeschlagen wurde?
- C) Liefert eine detektierte Expressionsänderung ggf. Hinweise auf neue ursächliche oder kompensatorische, zellspezifische Pathomechanismen des PD?

Alle methodischen und inhaltlichen Zielsetzungen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfüllt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hardware

Alle Geräte, die zur Versuchsdurchführung eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Standard-Laborgeräte werden nicht gesondert aufgeführt. Besonderheiten und Funktionsweisen spezieller Geräte, sowie in Verbindung mit Geräten eingesetzte Computer und Software werden im Folgenden näher beschrieben.

Zur Steuerung einiger Laborgeräte, zur Datenaufnahme und zur Auswertung wurde spezielle Software (Tab. 2) eingesetzt. Alle verwendeten Programme liefen unter dem Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional, die Auswertung auf der x64 Edition, Version 2003 mit Service Pack 2. Die Datenaufnahme erfolgte unter Verwendung der zu den jeweilig verwendeten Geräten mitgelieferten Softwarepakete.

| Software | Version | Verwendung | Hersteller |
|----------------------------------|------------------|--------------------------|--|
| 2100 Expert Software | B02.05.SI360 | RNA-Qualitätsbestimmung | Agilent, Böblingen/Waldbronn, DE |
| Excel | 10.6856.6858 SP3 | Statistik / Analyse | Microsoft, Redmond, USA |
| File Builder | 3.1 | custom assay design | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| IM1000 | V 5 R 190 | Bildarchivierung LMD | Leica Microsystems, Wetzlar, DE |
| LMD6000 | 6.6.3.3564 | Lasermikrodissektion | Leica Microsystems, Wetzlar, DE |
| Oligo 6 Primer Analysis Software | 6.71 | Primerdesign | Medprobe, Oslo, N |
| pHOptica Software | 1.01 | pH-Wert Bestimmung | WPI, Sarasota, USA |
| Picodrop Software | 2.06 | Konzentrationsbestimmung | Biozym, Hess. Oldendorf, DE |
| R | 2.8.1 | Statistik / Analyse | <i>open source</i> , http://www.r-project.org/ |
| SDS | 2.3 /2.1 | <i>real-time</i> qPCR | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Statistikpaket coin | 1.0-10 | Statistik / Analyse | <i>open source</i> , http://www.r-project.org/ |

Tabelle 2 – Software.

Auflistung der verwendeten Software und zugehöriger Versionsnummer. Alle Software wurde unter dem Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional verwendet.

Alle PCs (Arbeitsplatzcomputer, engl. *personal computer*, x86-Prozessoren, 32 Bit-Systeme) zur Steuerung und Datenaufnahme der computergesteuerten Geräte erfüllten die Systemmindestanforderungen für den Anschluss der Geräte (ggf. mit benötigten Zusatzmodulen) und für die entsprechende Software. Das Auslesen von Daten und die späteren Analysen erfolgten auf einem DELL Precision 390 mit Intel Core2 CPU 6700 Prozessor (Leistung: 2,66 GHz, DELL, Limerick, IRL).

| Gerätbezeichnung | Verwendungszweck | Hersteller, Ort |
|---|--|--|
| -80er Gefrierschrank | Kryoasservierung | NationalLabs, Mölln, DE |
| -80er Gefriertruhe | Kryoasservierung | NationalLabs, Mölln, DE |
| Agilent Bioanalyzer 2100 Chip-Vortexer | RNA-Integritätsbestimmung Vortexen von Agilent Chips | Agilent, Böblingen/Waldbronn, DE Agilent, Böblingen/Waldbronn, DE |
| Ausbackofen MINO/50/F | Hitzeesterilisation (Glas/Keramik 175°C; Metall 225°C) | GENLAB, Widnes, UK |
| Centrifuge 5840R | Zentrifugation | Eppendorf, Hamburg, DE |
| DMC-TZ2 Lumix Digitalkamera | Dokumentation von Gewebe | Panasonic, Kadoma/Osaka, JP |
| Feinwaage CPA 124S | Wiegen | Satorius, Göttingen, DE |
| Galaxy Mini Centrifuge | Zentrifugation | VWR, West Chester (PA), USA |
| Gefriermikrotom, Kryotom, Kryostat CM 1850 | Gefrierschnittanfertigung | Leica, Nussloch, DE |
| Geldokumentationssystem BioDoc II | Gelelektropherogramm-Dokumentation | Analytik Jena/Biometra, Jena, DE |
| Gelkammer | DNA-Gelelektrophorese | selbst gebaut, Werkstatt, Universität Marburg/Ulm, DE |
| GeneAmp 7900HT | real-time qPCR | Applied Biosystems, Foster City (CA), USA |
| Leica LMD6000 | Lasermikrodissektion | Leica microsystems, Wetzlar, DE |
| Magnetrührer mit integrierter Heizplatte (RCT classic) | Ansetzen von Lösungen | IKA, Staufen, DE |
| Mikrowelle Family 1 | Aufkochen von Agarose in TAE | Privileg, München, DE |
| MiniSpin plus | Zentrifugation | Eppendorf, Hamburg, DE |
| PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 | qualitative PCR | Applied Biosystems, Foster City (CA), USA |
| pH-Meter pHOptica | pH-Bestimmung in Geweben und von Lösungen | World Precision Instruments (WPI), Sarasota (FL), USA |
| Picodrop | Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA | Biozym, Hessisch Oldendorf, DE |
| Pipet-Boy Pipetus-Akku | Pipettieren | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE |
| Spannungsquelle (Power Supply) | Spannungsversorgung Gelkammern | Analytik Jena/Biometra, Jena, DE |
| Stereomikroskop M165 C | Mikroskopie/Präparation | Leica microsystems, Wetzlar, DE |
| Sterilwerkbank mit UV-C Sterilisationslichtquelle | Ansetzen aller Einzelzellreaktionen, steriles Arbeiten UV-C-Sterilisation | Heraeus, Hanau, DE |
| Techfreeze, -20°C Tischgefriergerät | Kühlung von Enzymen | Techne, Jahnsdorf, DE |
| Thermomixer Comfort | Probeninkubation unter Schütteln | Eppendorf, Hamburg, DE |
| ThermoStat | Probeninkubation | Eppendorf, Hamburg, DE |

Tabelle 3 – Laborgeräte.

Übersichtstabelle von Geräten, die im Verlauf dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Standard-Laborgeräte werden nicht gesondert aufgeführt.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 4 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien zusammengestellt. Standardartikel sind nicht gesondert aufgeführt.

| Materialbezeichnung | Hersteller, Ort |
|--|---|
| Inorganic Membrane Filter, Anotop10, 0,02µm, 10mm, 50Units-sterile | Whatman, Maidstone, UK |
| 0,5 ml Reaktionsgefäße: <i>single sealed safe lock tubes</i> | Eppendorf, Hamburg, DE |
| 0,5 ml Reaktionsgefäße: <i>thin walled PCR-tubes with flat cap</i> | Eppendorf, Hamburg, DE |
| 1,5 ml Reaktionsgefäße: <i>single sealed</i> | Eppendorf, Hamburg, DE |
| MicroAmp, Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, PCR Compatible, DNA/ RNA/ RNase | Applied Biosystems, Foster City (CA), USA |
| Apollo Ever-Sharp-Blades, 5 Klingen, Herkenrath- Solingen | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE |
| Director Laser Microdissection Slides | Expression Pathology Inc., Rockville (MD), USA |
| Falcon-Siebe | Werkstatt, Universität Marburg/Ulm, DE |
| Superfrost-Objektträger, Menzel-Gläser, geputzt, gebrauchsfertig, geschnitten, 76x26mm | Menzelgläser (Thermo Fisher Scientific), Braunschweig, DE |
| Leica Disposable Mictome Blades 819, Model:819 | Leica, Wetzlar, DE |
| MicroAmp Optical Adhesive Film, PCR Comatable, DNA/ RNA/ RNase Free | Applied Biosystems, Foster City (CA), USA |
| Parafilm | Brand, Wertheim, DE |
| PCR-Stripes | Biozym, Hessisch Oldendorf, DE |
| PEN-Slides, Nuclease and Human Nucleic Acide Free, PEN Membrane 2 µm, Certified DNA/ RNase/ DNase Free (PEN – Poly-Ethylen-Naphthalat) | MicroDissect, Mittenaar, DE |
| Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000 µl – low retention, Nuklease-frei) | Kobe, Marburg, DE |
| Wischtücher, Kim Wipes KimTech science, Precision Wipes, 4,4x8,4in./po (11x21cm), white | Marco-Martin GmbH & Co, Freiburg im Breisgau, DE |

Tabelle 4 – Verbrauchsmaterialien.

Übersicht der eingesetzten Verbrauchsmaterialien. Standardartikel sind nicht gesondert aufgeführt.

2.1.3 Verwendete Chemikalien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Chemikalien und Kits sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet (Tab. 5). Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma (München, DE) bezogen.

| Chemikalien- / Kit-Bezeichnung | Hersteller, Ort |
|--|--|
| 10x RT Puffer aus TrisHCl, pH 8 [100 mM] dNTPs [je 20 mM] random Hexamere [1 mM] | Sigma, München, DE GE Healthcare, Freiburg, DE Roche, Mannheim, DE |
| 10x TAE (Tris-Acetat-EDTA) | Eppendorf, Hamburg, DE |
| 2-Mercaptoethanol, β -Mercaptoethanol | Sigma, München, DE |
| Agarose | Biozym, Hess. Oldendorf, DE |
| Agilent (Nano/small Chips + Kits) | Agilent, Böblingen, DE |
| Cresylviolett-Acetat, 68 % Dye | Sigma, München, DE |
| Einbettmedium, TissueTec (tissue freezing medium) | Leica, Nussloch, DE |
| Ethanol absolut, puriss p.a. | Sigma, München, DE |
| Ethanol, anhydrous | Alfa Aesar, Karlsruhe, DE |
| Ethidiumbromid, EtBr [10 mg/ml] | Sigma, München, DE |
| Glycogen [5 mg/ml] | Ambion, Huntington, UK |
| Größenmarker, 100 bp Leiter | Fermentas, St. Leon-Rot, DE |
| HotStar-Taq-PCR-Mix | Qiagen, Hilden, DE |
| Human Substantia Nigra Total RNA Cat# AM6866; 1 mg/ml; pH 6,4; RIN 6,3 | Ambion, Huntington, UK |
| Isofluran, Forene | Abbott, Wiesbaden, DE |
| Isopropanol, 99 % | Sigma, München, DE |
| Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator | Merck, Darmstadt, DE |
| loading dye (Ladepuffer, 6x) | Fermentas, St. Leon-Rot, DE |
| miScript PCR System | Qiagen, Hilden, DE |
| miScript Precursor Assay | Qiagen, Hilden, DE |
| miScript Primer Assay | Qiagen, Hilden, DE |
| miScript Universal Primer | Qiagen, Hilden, DE |
| Molekularsieb, 0.3 nm | Merck, Darmstadt, DE |
| Natrium-Acetat, NaAc, pH 5.5 [3 M] | Ambion, Huntington, UK |
| Nonidet P40, NP40, 10 % | Roche, Mannheim, DE |
| Paraformaldehyd, PFA (37%) | J.T. Baker, Phillipsburg (NY), USA |
| polydC [1 μ g/ μ l] | Amersham Biosciences, Freiburg, DE |
| polyI [1 μ g/ μ l] | Sigma, München, DE |
| Proteinase K [2,5 U/ μ l] | Roche, Mannheim, DE |
| QuantiTect Probe qPCR Master Mix | Qiagen, Hilden, DE |
| QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix | Qiagen, Hilden, DE |
| QuantiTect Probe qPCR Master Mix | Qiagen, Hilden, DE |
| QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix | Qiagen, Hilden, DE |
| RedTaq-PCR Mix | Sigma, St. Louis, DE |
| RNase-ExitusPlus, flüssig | Applichem, Darmstadt, DE |
| RNase-Zap, Wischtücher | Ambion, Huntington, UK |
| RNeasy FFPE Kit | Qiagen, Hilden, DE |
| RNeasy MINI Kit | Qiagen, Hilden, DE |
| SuperRNasin, SRS [20 U/ μ l] | Ambion, Huntington, UK |
| SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Komponenten: 5xFirst-Strand Buffer und DTT [0,1 M]) | Invitrogen (ABi), Karlsruhe, DE |
| Wasser (Molekularbiology Grade 1L+5L) | Eppendorf/5Prime, Hamburg, DE |
| Universal Human Reference RNA (Cat#740000) | Stratagene/Agilent, Böblingen, DE |
| UVpette tip, 10 μ l Pippetenspitze | Biozym, Hess. Oldendorf, DE |
| Xylen, 99% | Sigma, München, DE |

Tabelle 5 – Chemikalien und Kits.

Übersichtstabelle von im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und Kits. Kitbeschreibungen und Inhalte siehe Text. Alle nicht aufgeführten Chemikalien waren von Sigma, München, DE.

2.1.4 Geninformationen

Geninformationen wie Exonnomenklatur, Basenpaaranzahl (bp) und Aminosäureanzahl sind der Nukleotiddatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) vom Stand des 15.11.2009 entnommen und in Tabelle 6 zusammengestellt.

| Gen | vollständiger Name & weitere Abkürzungen | kodiert auf Chromosom | Anzahl Exons | Splicevarianten | mRNA Länge [bp] Transkriptlänge | Proteingröße (Anzahl AS) | Acc. No. (NCBI) |
|--|--|-------------------------|--------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| TH | Tyrosin-Hydroxylase, TYH | 11p15.5 | 14 | Isoform A | 1910 | 528 | NM_199292 |
| | | | 13 | Isoform B | 1817 | 497 | NM_000360 |
| | | | 14 | Isoform C | 1898 | 524 | NM_199293 |
| DAT | Dopamintransporter, SLC6A3, DAT1 | 5p15.3 | 15 | | 3925 | 620 | NM_001044 |
| VMAT2 | vesikulärer Monoamintransporter, SVAT, SVMT, VAT2, SLC18A2 | 10q25 | 16 | | 1894 | 514 | NM_003054 |
| GIRK2 | G-Protein aktivierter, einwärtsgerichteter Kaliumkanal, KCNJ6, BIR1, KATP2, KCNJ7, Kir3.2 | 21q22.1; 21q22.13-q22.2 | 4 | | 2485 | 423 | NM_002240 |
| D2 | Dopamin-Rezeptor vom Typ 2, D2R, D2DR, DRD2 | 11q23 | 8 | Isoform A (long) | 2643 | 443 | NM_000795 |
| | | | 8 | Isoform B (short) | 2556 | 414 | NM_016574 |
| NR4A2 | nuklearer Rezeptor, NOT, RNR1, HZF3, TINUR, NURR1 | 2q22-q23 | 8 | Isoform A | 3447 | 598 | NM_006186 |
| | | | 8 | Isoform B | 3393 | 580 | NM_173171 |
| | | | 8 | Isoform C | 3326 | 455 | NM_173172 |
| | | | 8 | Isoform D | 3269 | 535 | NM_173173 |
| PITX3 | Paired-like Homeodomänen Transkriptionsfaktor 3, PTX3, CTPP4 | 10q25 | 4 | | 1407 | 302 | NM_005029 |
| miR-133b | miRNA 133b | 6p21 | - | | 22 | - | MIMAT0000770 |
| CB | Calbindin, CALB1, CALB | 8q21.3-q22.1 | 11 | | 2531 | 261 | NM_004929 |
| α-SYN (NACP140, PARK 1, PARK 4) | α-Synuklein, PARK1, PARK4, SNCA, PD1, NACP, MGC110988 | 4q21 | 6 | NACP140 | 1534 | 140 | NM_000345 |
| | | | 5 | NACP126 | 1492 | 126 | |
| | | | 5 | NACP112 | 1450 | 112 | NM_007308 |
| | | | 4 | NACP98 | 1408 | 98 | |
| LRRK2 (PARK 8) | Leuzin-reiche Repeat Kinase 2, PARK8, RIPK7, ROCO2, AURA17, DARDARIN | 12q12 | 51 | | 9234 | 2527 | NM_198578 |
| | | | | | | | |
| PARKIN (PARK 2) | Parkin, PARK2, PDJ, PRKN, AR-JP, LPRS2 | 6q25.2-q27 | 12 | Isoform 1 | 2960 | 465 | NM_004562 |
| | | | 11 | Isoform 2 | 2876 | 437 | NM_013987 |
| | | | 9 | Isoform 3 | 2513 | 316 | NM_013988 |
| KCND3 | α-Untereinheit spannungsabhängiger A-Typ-Kaliumkanäle Kv4.3, KCND3L, KCND3S, KSHIVB, MGC142035, MGC142037 | 1p13.3 | 8 | Isoform 1 | 2693 | 655 | NM_004980 |
| | | | 7 | Isoform 2 | 2636 | 636 | NM_172198 |
| KCNIP3 | β-Untereinheit spannungsabhängiger A-Typ-Kaliumkanäle KChip3, Calsenilin, KCHIP3, CSEN, DREAM, MGC18289 | 2q21.1 | 9 | Isoform 1 | 2928 | 256 | NM_013434 |
| | | | 8 | Isoform 2 | 2735 | 230 | NM_001034914 |
| HCN2 | Hyperpolarisations- und cyclische Nukleotid-gesteuerter Kationen Kanal HCN 2, BCNG2, HAC-1, BCNG-2 | 19p13.3 | 8 | | 3459 | 889 | NM_001194 |
| HCN3 | Hyperpolarisations- und cyclische Nukleotid-gesteuerter Kationen Kanal HCN 3, KIAA1535, MGC131493 | 1q22 | 8 | | 3717 | 774 | NM_020897 |
| HCN4 | Hyperpolarisations- und cyclische Nukleotid-gesteuerter Kationen Kanal HCN 4 | 15q24-q25 | 8 | | 5065 | 1203 | NM_005477 |
| PEXSL | Peroxisomaler Begenesefaktor 5-ähnliche β-Untereinheit von HCN-Kanälen, TRIP8β, TRIP8b, PXR2, PEX5R, PXR2B | 3q26.33 | 15 | | 3577 | 626 | NM_016559 |
| KCNN3 | SK3 Kaliumkanal, hSK3, SKCA3, KCa2.3 | 1q21.3 | 8 | Isoform 1 | 3060 | 731 | NM_002249 |
| | | | 8 | Isoform 2 | 1981 | 426 | NM_170782 |
| CaV1.2 | α1-Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle CACNA1C, TS, CACH2, CACN2, CCHL1A1, CACNL1A1, MGC120730 | 12p13.3 | 50 | Isoform 1 | 13729 | 2221 | NM_199460 |
| | | | 50 | Isoform 2 | 13624 | 2186 | NM_001129827 |
| | | | 46-48 | Isoform 3-20 | 13447-13603 | 2127-2179 | NM_001129829-NM001129843 |
| CaV1.3 | α1-Untereinheit spannungsabhängiger Calciumkanäle CACNA1D, CACH3, CACN4, CCHL1A2, CACNL1A2 | 3p14.3 | 49 | Isoform 1 | 7771 | 2181 | NM_000720 |
| | | | 49 | Isoform 2 | 7711 | 2161 | NM_001128840 |
| | | | 45 | Isoform 3 | 7639 | 2137 | NM_001128839 |
| KIR6.2 | ATP-sensitive Kaliumkanaluntereinheit KCNJ11, BIR, HHF2, PHHI, IKATP, TNDM3, MGC133230 | 11p15.1 | 1 | | 3418 | 390 | NM_000525 |

Tabelle 6 – Tabellarische Zusammenstellung der wichtigsten Genbank-Informationen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene.

| Gen | vollständiger Name & weitere Abkürzungen | kodiert auf Chromosom | Anzahl Exons | Splicevarianten | mRNA Länge [bp] Transkriptlänge | Proteingröße (Anzahl AS) | Acc. No. (NCBI) |
|-----------------------------|---|-----------------------|--------------|------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------|
| SUR1 | ATP-sensitive Kaliumkanaluntereinheit ABCC8, HI, SUR, HHHF1, MRP8, PHHL, ABC36, HRINS, TNDM2 | 11p15.1 | 39 | | 4980 | 1581 | NM_000352 |
| SUR2 | ATP-sensitive Kaliumkanaluntereinheit ABCC9, ABC37, CMD10, FLJ36852 | 12p12.1 | 38 | Isoform 1 (A) | 4670 | 1549 | NM_005691 |
| | | | 38 | Isoform 2 (B) | 8325 | 1549 | NM_020297 |
| | | | 37 | Isoform 3 (Aδ14) | 4562 | 1513 | NM_020298 |
| NMDAR1 | Neurtransmitter-gesteuerter NMDA-Rezeptor, GRIN1, NR1, NMDA1 | 9q34.3 | 19 | Isoform 1 | 3902 | 885 | NM_000832 |
| | | | 19 | Isoform 2 | 4265 | 901 | NM_021569 |
| | | | 20 | Isoform 3 | 4376 | 938 | NM_007327 |
| CCND1 | Cyclin D1, PRAD1, BCL1, U21B31, D11S287E | 11q3 | 5 | | 4304 | 295 | NM_053056 |
| TIF-1A | RNA-Polymerase I Transkriptionsfaktor, RRN3 | 16p12 | 18 | | 3762 | 651 | NM_018427 |
| ATM | Ataxia telangiectasia mutated, AT1, ATA, ATC, ATD, ATE, ATDC, TEL1, TEO1, MGC74674, DKFZp781A0353 | 11q22-q23 | 63 | Isoform 1 | 13147 | 3056 | NM_000051 |
| | | | 37 | Isoform 2 | 8977 | | NM_138292 |
| LDH-B | Laktat-Dehydrogenase B | 12p12.2-p12.1 | 8 | | 1321 | 334 | NM_002300 |
| FREQ | Calciumsensor Frequenin, FLUP, NCS1, DKFZp761L1223 | 9q34 | 8 | Isoform 1 | 5009 | 190 | NM_014286 |
| | | | 8 | Isoform 2 | 4878 | 172 | NM_001128826 |
| IGSF4 | Immunglobulin-Serumfaktor 4, CADM1, BL2, ST17, NECL2, RA175, TSLC1, IGSF4A, SYNCAM | 11q23.2 | 10 | Isoform 1 | 4324 | 442 | NM_014333 |
| | | | 9 | Isoform 2 | 4240 | 414 | NM_001098517 |
| HOMER1 | humanes Drosophila-Homolog zu Homer, SYN47, VES-1 | 5q14.2 | 9 | | 4228 | 354 | NM_004272 |
| WNT5A | Signalprotein Wnt-Pathway | 3p21-p14 | 5 | | 5855 | 380 | NM_003392 |
| ENO2 | neuronspezifische Enolase 2, NSE | 12p13 | 12 | | 2423 | 434 | NM_001975 |
| GSK3B | Glycogen-Synthase-Kinase 3β | 3q13.3 | 12 | | 1639 | 433 | NM_002093 |
| JMJD1C | Thyroid interagierende Protein 8, TRIP8, FLJ14374, KIAA1380, RP11-10C13.2, DKFZp761F0118 | 10q21.2-q21.3 | 27 | Isoform 1 | 8762 | 2540 | NM_032776 |
| | | | 27 | Isoform 2 | 8415 | 2303 | NM_004241 |
| ACTB | β-Actin, PS1TP5BP1 | 7p15-p12 | 6 | | 1852 | 375 | NM_001101 |
| miR-133a | miRNA 133a | 18q11.2 | - | Isoform 1 | 22 | - | MIMAT0000427 |
| | | 20q13.33 | - | Isoform 2 | | | (Pre: MI0000450/1) |
| Pre-miR-133b (human) | Prä miRNA 133b | 6p21 | - | | 119 | - | MI0000822 |

(Fortsetzung) Tabelle 6 – Tabellarische Zusammenstellung der wichtigsten Genbank-Informationen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene.

2.1.5 Oligonukleotide (Primer, Probes)

Im Folgenden sind die für die quantitative *real-time* PCR verwendeten Primer (SYBRgreen) und Primer-Probe-TaqMan-Assays, sowie für die qualitative Multiplex-Nested-PCR verwendeten Primer tabellarisch aufgelistet (Tab. 7 - 9).

2.1.5.1 Humane TaqMan Assays und miScript-SYBRgreen Assay

| Assay ID | Gen Reporter-Kontextsequenz-Quencher (ggf. Primersequenzen) | Genbank Accession No. (NCBI) | Assaylänge [bp] | Ex-Ex-Übergang |
|---------------|--|------------------------------|-----------------|----------------|
| custom assay | α-SYN (NACP112) Probe: FAM-ACCCTTCCTTGCCCAACTG-NFQ Primer F: CCACTGGCTTTGTCAAAAAGGA Primer R: GGCTTCAGGTCGTAGTCTTGAT | NM_007308 | 65 | x4-x6 |
| Hs00240906_m1 | α-SYN (NACP112, NACP140) Probe: FAM-TGGCAACAGTGGCTGAGAAGACAA-NFQ | NM_000345, NM_007308 | 62 | x3-x4 |
| custom assay | α-SYN (NACP126) Probe: FAM-CAGCCACTACATAGAGAACA-NFQ Primer F: GCAGCAGGAAAGACAAAAGAGG Primer R: TTGTCCTTGCTCTTTGGTCTTCT | NM_000345.2 ohne Exon 3 | 80 | x2-x4 |
| custom Assay | ACTB, β-Actin Probe: FAM-CACGCCCTGGTGCCTG-NFQ Primer F: GCCGTCTTCCCTCCAT Primer R: CTGACCCATGCCACCAT | NM_001101 | 63 | x2-x3 |

Tabelle 7 – Humane TaqMan- und miScript-SYBRgreen-Assays.

| Assay ID | Gen Reporter-Kontextsequenz-Quencher (ggf. Primersequenzen) | Genbank Accession No. (NCBI) | Assaylänge [bp] | Ex-Ex-Übergang |
|---------------|---|---|-----------------|-------------------------|
| Hs00930499_m1 | CACNA1C, CaV1.2 Probe: FAM-GGCTCACAGAAGTCCAAGACACGGC-NFQ | NM_000719.5 | 62 | x44-x45 |
| Hs01073331_m1 | CACNA1D, CaV1.3 Probe: FAM-AAGATCAAGACCGAAGGGAACCTGG-NFQ | NM_000720.2, NM_001128840.1, NM_001128839.1 | 68 | x37-x38 |
| Hs01073340_m1 | CACNA1D, CaV1.3 Probe: FAM-TAATGCAGCAACAGATCATGGCAGT-NFQ | NM_000720.1 | 57 | x12-x13 |
| Hs01077193_m1 | CB Probe: FAM-CGAAAGAAGGCTGGATTGGAGTTAT-NFQ | NM_004929 | 72 | x2-x3 |
| Hs01014209_m1 | D2 Probe: FAM-ATAACGCAGACCAGAACGAGTGCAT-NFQ | NM_000795, NM_016574 | 58 | x4-x5 |
| custom assay | D21 Probe: FAM-CCACTAAAGGGCAACTGT-NFQ Primer F: GCTTTCAGGGCCACCT Primer R: CGGTGCAGAGTTTCATGTCCT | NM_000795 | 72 | x5-x6 |
| custom assay | D2s Probe: FAM-CCACTAAAGGAGGCTGCCG-NFQ Primer F: GCTTTCAGGGCCACCT Primer R: CATCTCCATCTCCAGTCTCTG | NM_016574 | 73 | x5-x7 |
| Hs00997374_m1 | DAT Probe: FAM-TATCGACAGCCATGGTGGTATG-NFQ | NM_001044 | 56 | x9-x10 |
| Hs00157360_m1 | ENO2 Probe: FAM-CCTGGAGAACAGTGAAGCCTTGGAG-NFQ | NM_001975.2 | 77 | x7-x8 |
| Hs00977274_m1 | FREQ Probe: FAM-TACGGTGGCCTTCAAGCTCTACGA-NFQ | NM_014286 | 60 | x4-x5 |
| custom assay | GIRK2 Probe: FAM-CTCCAGGACGTTAGTCATG-NFQ Primer F: CAATGGCCAAGCTGACAGAATC Primer R: GCTTTCGACGTCCTGATCCAT | NM_002240 | 71 | x2-x3 |
| Hs01047719_m1 | GSK3β Probe: FAM-CATGAAAGTTAGCAGAGACAAGGAC-NFQ | NM_002093.2 | 65 | x1-x2 |
| custom assay | HCN2 Probe: FAM-CATGTGGAAGATCTCCTCCC-NFQ Primer F: GCCTGATCCGCTACATCCAT Primer R: GCTGGCCAGGTCATAGGT | NM_001194 | 62 | x2-x3 |
| Hs00380018_m1 | HCN3 Probe: FAM-ATGGATCCTACTTTGGGGAGATCTG-NFQ | NM_020897.1 | 69 | x6-x7 |
| Hs00975492_m1 | HCN4 Probe: FAM-AACATGGTGAACAACCTCTGGGGGA-NFQ | NM_005477.1 | 62 | x3-x4 |
| Hs01029336_m1 | HOMER1 Probe: FAM-CATTTTCACATAGTTCAGCAATCAG-NFQ | NM_004272 | 71 | x5-x6 |
| Hs00204937_m1 | IGSF-4 Probe: FAM-TGATCCCCACAGGTGATGGGCAGAA-NFQ | NM_014333 | 63 | x1-x2 |
| custom assay | JMJD1C Probe: FAM-ATTTGCCAGGATTTTIT-NFQ Primer F: CAGAAGGAAAATCAATTTGGCCTCT Primer R: CACAACCTGGGTCTAGATCAG | NM_004241 | 73 | x12-x13 |
| Hs00542597_m1 | KCNB3, Kv4.3 Probe: FAM-TCACAACCAGTCGCTCCAGCCTTAA-NFQ | NM_172198.1, NM_004980.3 | 74 | x6-x7 x7-x8 |
| Hs00173310_m1 | KCNIP3, KChip3.1 Probe: FAM-CCATCCACTTTGAGGACTTTGTGGT-NFQ | NM_001034914.1, NM_013434.4 | 80 | x4-x5 x5-x6 |
| Hs01546817_m1 | KCNN3, SK3 Probe: FAM-TGTCTGTGAAAGGTACCATGACCAG-NFQ | NM_170782.1, NM_002249.4 | 68 | x3-x4 |
| Hs00265026_s1 | KIR6.2 Probe: FAM-AGAACCGCGTGGTGGCAACAGCAT-NFQ | NM_000525.3 | 55 | - |
| custom Assay | LDH-B Probe: FAM-TCAGCCAGAGACTTTC-NFQ Primer F: TGGTATGGCGTGTGCTATCAG Primer R: CAAAACATCCACAAGAGCAAGTTCA | NM_002300 | 70 | x2-x3 |
| Hs00968187_m1 | LRRK2 Probe: FAM-AAAATCATGGCACAGATTTTGACAG-NFQ | NM_198578 | 63 | x33-x34 |
| MS00007385 | miR-133b Sequenz: 66 - uuuggucccucaaccagcua - 87 | MIMAT0000770 | - | - |
| Hs00609557_m1 | NMDAR1 Probe: FAM-CTCCAGCCAGGTCTACGCCATCCTA-NFQ | NM_000832.5, NM_021569.2, NM_007327.2 | 61 | x1-x2 |
| Hs00428691_m1 | NR4A2 Probe: FAM-GGACTATCCAGGTTCCAGGCGAAC-NFQ | NM_173171, NM_173172, NM_173173, NM_006186 | 69 | x5-x6 |
| Hs01038322_m1 | PARKIN Probe: FAM-CGTGCACAGACGTCAGGAGCCCGT-NFQ | NM_013987, NM_013988, NM_004562 | 68 | x5-x6 x3-x4 x6-x7 |
| Hs00912929_m1 | PEX5L, TRIP8B Probe: FAM-TTACTATGACATCACAGCTGGTGAA-NFQ | NM_016559.1 | 64 | x3-x4 |
| custom Assay | PITX3 Probe: FAM-CTGAGTCGCTGTGCTCC -NFQ Primer F: GCACGGCTGCAAGGG Primer R: GCGAAGCCGAGGCCTTT | NM_005029.3 | 53 | x2-x3 |

(Fortsetzung) Tabelle 7 – Humane TaqMan- und miScript-SYBRgreen-Assays.

| Assay ID | Gen Reporter-Kontextsequenz-Quencher (ggf. Primersequenzen) | Genbank Accession No. (NCBI) | Assaylänge [bp] | Ex-Ex-Übergang |
|---------------|--|---|-----------------|-------------------------------|
| Hs01093770_m1 | SUR1 Probe: FAM-AGCTGCTAATGCCCCTGCTGGTGTA-NFQ | NM_000352.3 | 57 | x3-x4 |
| Hs01093743_m1 | SUR1 Probe: FAM-GTCAAAGCTCTAGTGAGCGTGCAAA-NFQ | NM_000352.3 | 64 | x12-x13 |
| Hs01074087_m1 | SUR2 Probe: FAM-CATTGCAATAAAGGTCACAAATGGA-NFQ | NM_005691.2, NM_020297.2, NM_020298.2 | 64 | x14-x15 |
| Hs01072311_m1 | SUR2 Probe: FAM-TGGACAAAAGGTGGGCATATGTGGT-NFQ | NM_005691.2, NM_020297.2, NM_020298.2 | 57 | x32-x33 x32-x33 x31-x32 |
| Hs00165941_m1 | TH Probe: FAM-AAGGTGTTTGTGACGCTTTGAAGCCA-NFQ | NM_199292, NM_199293, NM_000360 | 63 | x3-x4 |
| Hs00996838_m1 | VMAT2 Probe: FAM-ATAGGACTACTGACCAACAGAATTG-NFQ | NM_003054 | 67 | x3-x4 |
| Hs00998537_m1 | WNT5A Probe: FAM-CGGCCGACAGGACGGTGTACAACCTG-NFQ | NM_003392 | 61 | x4-x5 |

(Fortsetzung) Tabelle 7 – Humane TaqMan- und miScript-SYBRgreen-Assays.

In der Tabelle sind alle verwendeten, humanen *real-time* qPCR Assays aufgeführt. In der ersten Spalte ist der Assay-Identifikationsname (ID) von Applied Biosystems oder Qiagen (miScript) angegeben, bzw. aufgeführt, ob es sich um einen selbst designten Assay (custom Assay) handelt. In der zweiten Spalte sind das detektierte Gen und die Primer- und Probesequenzen mit dazugehörigem Label angegeben (FAM – Fluoreszenzfarbstoff, Phosphoramidit-Derivat von 6-Carboxyfluorescein, NFQ – *non-fluorescent quencher*). Die letzte Spalte gibt den Exonübergang des Assays an. Von vorgefertigten Assays mit ID wurde nur die Reportersequenz (Probe) bekanntgegeben. Der aufgeführte miScript Assay ist kein TaqMan Assay, sondern ein SYBRgreen Assay (Ex, x – Exon; NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, bp – Basenpaare).

2.1.5.2 Murine TaqMan-, miScript- und SYBRgreen-Assays

| Assay ID | Gen Reporter-Kontextsequenz-Quencher (ggf. Primersequenzen) | Genbank Accession No. (NCBI) | Assaylänge [bp] | Ex-Ex-Übergang |
|---------------|---|---|-----------------|--------------------|
| custom Assay | β-Actin Probe: FAM-ATGACCCAGATCATGTTTGTGACCTTCAACAC-NFQ Primer F: CCCTAAGGCCAACCGTGAA Primer R: CAGCCTGGATGGCTACGTACA | NM_007393.3 | 83 | x3-4 |
| Mm00469062_m1 | Eno2 Probe: FAM-TCCTGGAGAACAGCGAAGCCTTGGGA-NFQ | NM_013509.2 | 76 | x7-x8 |
| Mm00440050_s1 | Kir6.2 AGCGCAGTGTGGCTGTGGCGAAGGC | NM_010602 | 129 | - |
| Mm00493146_m1 | Ldh-2 Probe: FAM-TACCATGGTGAAGGGAATGTACGGC-NFQ | NM_008492.2 | 72 | x7-x8 |
| MS00007378 | miR-133a (1 und 2) Sequenz (miR-133a1): 53 - uuugucccucaaccagcug - 74 Sequenz (miR-133a2): 59 - uuugucccucaaccagcug - 80 | MIMAT0000427 | - | - |
| MS00007385 | miR-133b Sequenz: 66 - uuugucccucaaccageua - 87 | MIMAT0000770 | - | - |
| Mm01210756_m1 | Otoferlin Probe: FAM-ATGGATTACCAGGTACAGCATCACAG-NFQ | NM_031875.2, NM_001100395.1 | 62 | x8-x9 x9-x10 |
| Mm01167272_m1 | Prestin: Probe: FAM-GCTGTACGTTGGATCTAGTGCCAT-NFQ | NM_030727.4 | 60 | x2-x3 |
| Mm00803450_m1 | Sur1 GTCCAGGGACCTGCAGCAGCTGGAT | NM_011510.3 | 77 | x28-x29 |
| Mm00441638_m1 | Sur2 GGAGGTCAGGACGACTATCTGGGA | NM_011511, NM_021043, NM_021041, NM_021042 | 73 | x30-x31 x31-x32 |
| custom Assay | Th Probe: FAM-CTATGGAGAGCTCCTGCACTCCCTGTCA-NFQ Primer F: GAATGGGGAGCTGAAGGCTTA Primer R: CTGCTGTCTGGGTCAAAGG | NM_009377.1 | 110 | x11-x12 |

Tabelle 8 – Murine TaqMan-, miScript- und SYBRgreen-Assays.

In der Tabelle sind die verwendeten murinen TaqMan Primer-Probe-Assays, selbstdesignten SYBRgreen Assays und miScript miRNA Assays aufgeführt. (Assay-Identifikationsname (ID) bzw. custom Assay für selbst designte Assays; detektiertes Gen und Primer- und Probesequenzen (FAM – Fluoreszenzfarbstoff, Phosphoramidit-Derivat von 6-Carboxyfluorescein, NFQ – *non-fluorescent quencher*), miScript Assays mit Sequenz der miRNAs (Primersequenzen wurden von der Firma nicht genannt); Exonübergang des jeweiligen Assays; von vorgefertigten Assays mit ID wurde nur die Reportersequenz (Probe) bekanntgegeben).

| Selbstdesignte SYBRgreen qPCR Assays (Oligo 6) | | | | | |
|--|-----------------------------------|------------------------------|-----------------|----------------|--|
| Gen | Primersequenz | Genbank Accession No. (NCBI) | Assaylänge [bp] | Ex-Ex-Übergang | |
| Girk1 | Primer F: GAGGGACGGAAAACACTCACTCT | NM_008426 | 109 | x1-x2 | |
| | Primer R: TCAGGTGCTGCCGAGATT | | | | |
| Girk2 | Primer F: CGTGGAGTGAATTATTGAATCT | NM_010606 | 103 | x1-x2 | |
| | Primer R: GTCATTTCTCTTTGTGCTTTT | | | | |
| Girk3 | Primer F: CAGAGGGAACCTAGGGTACTG | NM_008429 | 118 | x1-x2 | |
| | Primer R: TTCCTAGGCTTTCAGGGTC | | | | |
| Girk4 | Primer F: AAGTTAGCCCAAGGGTTCCG | NM_010605 | 102 | x1-x2 | |
| | Primer R: CTGCCATGCTCCCAAGTACAC | | | | |

(Fortsetzung) Tabelle 8 – Murine TaqMan-, miScript- und SYBRgreen-Assays.

In der Tabelle sind die verwendeten murinen TaqMan Primer-Probe-Assays, selbstdesignten SYBRgreen Assays und miScript miRNA Assays aufgeführt. (Assay-Identifikationsname (ID) bzw. custom Assay für selbst designte Assays; detektiertes Gen und Primer- und Probesequenzen (FAM – Fluoreszenzfarbstoff, Phosphoramidit-Derivat von 6-Carboxyfluorescein, NFQ – *non-fluorescent quencher*), miScript Assays mit Sequenz der miRNAs (Primersequenzen wurden von der Firma nicht genannt); Exonübergang des jeweiligen Assays; von vorgefertigten Assays mit ID wurde nur die Reportersequenz (Probe) bekanntgegeben).

2.1.5.3 Murine Primer für die qualitative Multiplex-Nested PCR

| Gen | Primer (F-Forward, R-Reverse) | Sequenz (5'-3') | Genbank Acc. No. (NCBI) | Lage bp (F 5', R 3') | Fragmentgröße [bp] | |
|---------|----------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|---------|
| Cb | F-außen | CGCACTCTCAAAGTAGCCG | M21531 | 87 | 891 | |
| | R-außen | CAGCCTACTTCTTTATAGCGCA | | 977 | | |
| | F-innen | GAGATCTGGCTTCATTTCGAC | | 167 | | 440 |
| | R-innen | AGTTCCAGCTTCCGTCATTA | | 606 | | |
| D2s1 | F-außen | CTGGTGTGCATGGCTGTATC | NM_010077 | 289 | 821/908 | |
| | R-außen | AGGGAGGTCCGGGTTTT | | 1196 | | |
| | F-innen | TTCTACGTGCCCTTCATCG | | 721 | | 338/425 |
| Dat | R-innen | GCAATCCTGGATTGACAAT | | 1145 | | |
| | F-außen | TTCTCCTCTGGCTTCGTTGT | AF109072 | 1149 | 962 | |
| | R-außen | TGGATTGGGTGTGAACAGTC | | 2110 | | |
| F-innen | CAACCTGTACTGGCGGCTAT | 1625 | | 234 | | |
| Gad65 | R-innen | GCATAGGCCAGTTTCTCTCG | | 1858 | | |
| | F-außen | CATACGCAGACAGCACGTTT | NM_008078 | 166 | 905 | |
| | R-außen | AAAAGATTCCATCGCCAGAG | | 1070 | | |
| F-innen | GGGATGTCAACTACGCGTTT | 606 | | 389 | | |
| Gad67 | R-innen | CACAAATACAGGGGCGATCT | | 994 | | |
| | F-außen | TGACATCGACTGCCAATACC | Z49976 | 731 | 1105 | |
| | R-außen | GGGTTAGAGATGACCATCCG | | 1835 | | |
| F-innen | CATATGAAATTGCACCCGTG | 761 | | 702 | | |
| Gfap | R-innen | CGGTGTCATAGGAGAGCTCA | | 1462 | | |
| | F-außen | AGAACAACCTGGTGCAT | K01347 | 407 | 786 | |
| | R-außen | GCTCCTGCTTCGAGTCCTTA | | 1192 | | |
| F-innen | AGAAAGGTTGAATCGCTGGA | 472 | | 517 | | |
| Girk2 | R-innen | CCAGGGCTAGCTTAACGTTG | | 988 | | |
| | F-außen | GAGGCGATCAGGATGGAGT | U11859 | 421 | 827 | |
| | R-außen | GGAATAAACTCCCCTCTGAA | | 1247 | | |
| F-innen | AGAAGAAATGACAATGGCCAA | 474 | | 766 | | |
| Th | R-innen | CTCCCCTCTGAAGTCTGTTT | | 1239 | | |
| | F-außen | CACCTGGAGTACTTTGTGCG | M69200 | 387 | 1139 | |
| | R-außen | CCTGTGGGTGGTACCCTATG | | 1525 | | |
| F-innen | TGCACACAGTACATCCGTC | 936 | | 377 | | |
| vGlut1 | R-innen | TCTGACACGAAGTACACCGG | | 1312 | | |
| | F-außen | TTGCGCAGTCGTCACATAAT | NM_182993 | 1037 | 896 | |
| | R-außen | GAGGTTGAACTGTCCTCCA | | 1932 | | |
| F-innen | GCAGTTTCCAGGACTTCCAC | 1649 | | 207 | | |
| | R-innen | ACTTTCAGGGGAGTCTGGGTA | | 1855 | | |

Tabelle 9 – Murine Primer für die Multiplex-Nested-PCR.

In der Tabelle sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten murinen Primer für qualitative Multiplex-Nested PCR aufgeführt. Außenprimerpaare werden für eine Multiplex-PCR, Innenprimer für die Nested-PCR verwendet. Alle Primer waren bereits im Labor etabliert (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, bp – Basenpaare).

2.1.6 Lösungen und Masteransätze

Die Zusammensetzung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Mastermixe ist im Folgenden aufgelistet. Angaben (μ l) beziehen sich auf eine Reaktion. Masteransätze wurden mit jeweils 5 % mehr an Gesamtvolumen angesetzt. Es wurden, wenn möglich, immer Nukleinsäure-freie, zertifizierte Chemikalien derselben Lot-Nummer verwendet. Auch das verwendete Wasser war stets zertifiziert Nukleinsäure- und Nuklease-frei (*Molecular Biology grade*, Eppendorf/5Prime).

CV-Färbelösung (1% CV in 100% EtOH) für Präparatefärbung (50 ml stock-Lösung):

0,5 mg Cresylviolett-Acetat
auf 50 ml mit Ethanol absolut auffüllen

EtOH-Verdünnungen für Fixierreihe (je 50 ml Falcon):

75 % - 37,5 ml Ethanol + 12,5 ml Wasser
95 % - 47,5 ml Ethanol + 2,5 ml Wasser
100 % - 50 ml Ethanol
100 % - 50 ml Ethanol, anhydrous aus 1 l gesamt mit 25 g Molekularsieb

PFA-Fixierlösung für *Cochlea*-Fixierung (200 ml stock-Lösung):

PFA-Lösung:

8 g Paraformaldehyd
70 ml Wasser (PFA vorsichtig bei 60°C unter Abzug gelöst, 30 min gerührt)
pH mittels NaOH und HCl auf 4,7 eingestellt, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt

Lösung A:

3,561 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
100 ml Wasser

Lösung B:

2,76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
100 ml Wasser

4% ige PFA-Fixierlösung:

81 ml Lösung A
19 ml Lösung B
100 ml PFA-Lösung

10x RT-Puffer (für Laser-Reaktionsmix, RT – reverse Transkriptase):

dNTPs (je 20 mM -> für Endkonzentration 2 mM)

random Hexamere (1 mM -> für Endkonzentration 0,1 mM)

Tris HCl (100 mM -> für Endkonzentration 10 mM, pH = 8)

Laser-Reaktionsmix (für Zelllyse und cDNA-Synthese von Lasermikrodissektaten):

1 µl 5x FSB (5x *First Strand Buffer*, 250 mM TrisHCl pH 8.3, 375 mM KCl,
15 mM MgCl₂)

0,5 µl 10x RT-Puffer

0,5 µl DTT (100 mM)

0,5 µl polyI (Poly-Inositol, 1µg/µl)

0,25 µl NP40 (1:10 Nonidet P40, finale Konzentration 0,5%)

0,25 µl SRS (SuperRNasin, 20 U/µl)

1,7 µl Wasser

nach Zelllyse + 0,3 µl reverse Transkriptase (200 U/µl SuperScript II))

cDNA-Synthesemix (für 10 µl totale RNA (bis 5 µg) in Wasser nach Isolation aus Gewebe):

4 µl 5x FSB (*First Strand Buffer*, 250 mM TrisHCl pH 8.3, 375 mM KCl,
15 mM MgCl₂)

2 µl 10x RT-Puffer

2 µl DTT (100 mM)

1 µl SRS (SuperRNasin, 20 U/µl)

1 µl reverse Transkriptase (200 U/µl SuperScript II)

Präzipitationsmix (für Nukleinsäurepräzipitation):

1 µl Glycogen (1 µg/µl)

0,35 µl polydC (1 µg/µl)

0,35 µl polyI (1µg/µl, falls nicht schon vorhanden, z.B. Laser-Reaktionsmix)

1,2 µl (bzw. 1/10 des Präzipitationsvolumens) Na-Acetat (3 M, pH = 5,5)

10 µl Wasser (bzw. 5 µl H₂O + 5 µl Nukleinsäurelösung)

1x TAE (Tris-Acetat-EDTA) für Gelelektrophorese und Agarosegele (1 l stock-Lösung):

100 ml 10x TAE (Tris-Acetat-EDTA)

900 ml Wasser

Lösungen für parallele cDNA-Synthese aus miRNA und mRNA

Lysemix (für Zellyse von Lasermikrodissektaten):

0,5 µl polyI (1µg/µl)

0,5 µl SRS (SuperRNasin, 20 U/µl)

0,25 µl NP40 (1:10 Nonidet P40, finale Konzentration 0,25%)

3,75 µl Wasser

miScript-Puffermix:

2 µl 5x miScript RT Buffer (aus miScript Reverse Transcription Kit)*

2,5 µl Wasser

separat dazu 0,5 µl miScript RT Mix*

*genaue Konzentrationen der Inhaltsstoffe von Qiagen nicht genannt.

2.1.7 Humanes Hirngewebe

Für die vorliegende Arbeit wurde humanes natives, kryoasserviertes Mittelhirngewebe durch das BrainNet entsprechend Antrag GA 28 zur Verfügung gestellt (11 Mittelhirnstücke, davon 6 Kontrollen und 5 PDs, Tab. 9) und weitere 4 Kontrollgewebestücke von Prof. Dietmar Thal (Sektion Neuropathologie am Institut für Pathologie, Universität Ulm), sodass insgesamt 15 Mittelhirngewebeblöcke, davon 10 Kontrollen und 5 PDs zur Verfügung standen (Tab. 9). Das humane Hirngewebe wurde entsprechend der BrainNet-Protokolle (http://www.brain-net.net/german/html/4/4a/4a0/fs_4a_0.html) postmortal dissektiert und eine Hälfte des Gewebes direkt nach Horizontal- und Sagittalschnitt bei -80°C kryoasserviert.

Das BrainNet Mittelhirngewebe stand durch die Vorarbeiten von Jan Gründemann kryoasserviert und getrimmt bei -80°C zur Verfügung (Gründemann, 2006). Diese Gewebestücke waren bereits mittels TissueTec auf Korkplatten aufgebracht und im Kryostaten (Leica Microsystems CM 1850, Wetzlar) angeschnitten, sowie bereits erfolgreich für die Lasermikrodissektion aufgearbeitet und für Genexpressionsanalysen verwendet worden (Gründemann, 2006; Ramirez et al., 2006). Die 4 zusätzlichen dieser Studie hinzugefügten Kontrollmittelhirngewebestücke wurden alle von Prof. Dietmar Thal zur Verfügung gestellt und bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung kryoasserviert.

Im Folgenden sind die Einstufungskriterien und humanen Mittelhirngewebestücke, welche für die vorliegende Arbeit zur Verfügung standen, zusammengefasst (Tab. 10). Alle mit diesem humanen Material durchgeführten Versuche sind von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Universität Ulm entsprechend Antrag AZ 35/06 genehmigt.

Das humane *post-mortem* Mittelhirngewebe wurde nach CERAD-Kriterien (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*, <http://cerad.mc.duke.edu/Neuropathology.htm>, (Cochran et al., 1995)) und Braak-Stadien (Braak and Braak, 1986, 1991) klassifiziert.

Die Klassifizierung der CERAD-Stadien wird zur neuropathologischen Diagnose des Morbus Alzheimer verwendet (Mirra et al., 1991). Dazu wird die Dichte von Ablagerungen neuritischer Plaques in den drei neokortikalen Arealen *Gyrus temporalis superior* und *mediales*, *Gyrus frontalis medius* und *Globulus parietalis inferior* herangezogen, indem durch Silber- oder Thioflavin-färbung die Plaquedichte mit vorgegebenen Standards verglichen wird. Die Standards geben eine semiquantitative alterskorrelierte Einschätzung der Plaquedichte in fehlend, spärlich, mäßig und ausgeprägt vor. Unter Berücksichtigung der Korrelation mit dem Todesalter (unter 50, zwischen 50 und 75 und älter als 75 Jahre) wird anhand der Plaquedichte somit folgende Einstufung der CERAD-Stadien vorgenommen:

| Häufigkeit neuritischer Plaques | fehlend | spärlich | mäßig | ausgeprägt |
|---------------------------------|---------|----------|-------|------------|
| Todesalter unter 50 Jahren | 0 | C | C | C |
| Todesalter 50-75 Jahre | 0 | B | C | C |
| Todesalter über 75 Jahre | 0 | A | B | C |

Anhand dieser Einstufung lässt sich eine Erkrankung an Morbus Alzheimer abschätzen:

CERAD 0 bedeutet, dass keine histologischen Hinweise auf eine AD-Erkrankung vorliegen;

CERAD A deutet histologisch auf eine mögliche AD-Erkrankung hin;

CERAD B legen histologisch eine mögliche Erkrankung an AD nahe und

CERAD C bedeutet, dass die histologischen Befunde eine Erkrankung an AD indizieren.

Diese Einstufung der altersbezogenen Plaquedichte distinkter Areal nach CERAD hat sich als derzeit gültiger neuropathologischer Diagnosestandard (Fillenbaum et al., 2008; Hulette et al., 1995; Mirra et al., 1991) zusammen mit dem Verteilungsmuster von neurofibrillären Veränderungen nach Braak und Braak (Braak and Braak, 1986, 1991) durchgesetzt.

Die Einteilung nach Braak erfolgt in Stadien nach Sichtbarkeit und Häufigkeit von Proteinablagerungen in bestimmten Hirnarealen. Hierzu werden Vorkommen und Verteilung von neurofibrillären Tangles (NFTs) und Neuropilfäden (*neuropil threads*, NTs) mit tau-Protein-Antikörpern oder Versilberungsmethoden immunhistochemisch charakterisiert. Dabei entsprechen Braak-Stadium 0 keinem, Braak-Stadien I und II spärlichem, Braak-Stadien III und IV mäßig häufigem und Braak-Stadien V und VI zahlreich nachweisbaren Vorkommen von NFTs und NTs in kortikalen und subkortikalen Arealen (bezogen auf Morbus Alzheimer

(Braak and Braak, 1986, 1991)). Neben diesen hier angegebenen Braak-Stadien bezogen auf AD, wäre eine Klassifizierung des Hirngewebes nach Braak-Stadien bezogen auf PD (Braak et al., 2003) für die vorliegende Studie wünschenswert gewesen. Die entsprechende Klassifizierung stand jedoch nicht zur Verfügung.

Das von der Deutschen BrainBank bereitgestellte Mittelhirngewebe sollte folgende Kriterien erfüllen (gemäß Antrag GA 28):

Hirnregion:

- möglichst vollständige, gefrorene Mittelhirngewebeblöcke (Mesencephalon, Ausdehnung von rostral nach kaudal über gesamte SNpc (dorsal und ventral) und die VTA

Gewebe der PD-Gruppe:

- nachgewiesener Morbus Parkinson
- nach Möglichkeit Übereinstimmung von Todesalter, Geschlecht, CERAD- und Braak-Stadien, sowie PMI
- *post-mortem* Index (PMI) maximal 24 h

Gewebe der Kontrollgruppe:

- nachweislich keine Parkinson-Syndrome
- nach Möglichkeit Übereinstimmung von Todesalter, Geschlecht, CERAD- und Braak-Stadien, sowie *post-mortem* Index (max. 24 h) mit der PD-Gruppe

Abweichungen von diesen Kriterien ließen sich nicht in allen Punkten vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anschnittebene der SN in Anlehnung an van Domburg et al. (van Domburg and ten Donkelaar, 1991) verwendet, um die unterschiedlichen Mittelhirngewebe von den Schnittebenen her vergleichen zu können.

| Code/ Bezeichnung | Alter [a] | Geschlecht | PMI [h] | CERAD | Braak | Krankheitsstatus | Herkunfts- zentrum (BB / Ulm) |
|-----------------------|--------------|------------|------------|-------|--------|--|-------------------------------------|
| PD-Gewebe | | | | | | | |
| PD-SN 1 | 80 | männlich | 7 | 0 | II | PD, Multisystematrophie | BB |
| PD-SN 2 | 80 | männlich | 23 | B | III-IV | PD, (AD ¹ .) Hypertonie, Pneumonie | BB |
| PD-SN 3 | 79 | weiblich | 17 | 0 | II | PD | BB |
| PD-SN 4 | 79 | männlich | 23 | 0 | 0 | PD, AD, Herzinfarkt, Lungenkarzinom | BB |
| PD-SN 5 | 73 | weiblich | 11 | 0 | V | PD, Ovarialkarzinom, Sudeck | BB |
| Kontrollgewebe | | | | | | | |
| K-SN 1 | 62 | männlich | 31 | 0 | I | Hypertonie, Koronarinfarkt | BB |
| K-SN 2 | 72 | männlich | 6 | 0 | II | CMV, Diabetes, Nephritis, Nierentransplantation | BB |
| K-SN 3 | 69 | weiblich | 14 | A | I | Diabetes, Hypertonie, Pneumonie, ARDS | BB |
| K-SN 4* | 61 | männlich | 6,5 | 0 | 0 | Adenokarzinom, Peritonalkarzinose | BB |
| K-SN 5 | 75 | weiblich | 24 | 0 | I | Arteriosklerose | BB |
| K-SN 6 | 63 | männlich | 24 | 0 | 0 | Leberkarzinom, Hepatorenales Syndrom | BB |
| K-SN 7** | 69 | weiblich | 24 | 0 | I | Cholechololithiasis und Cholangiosepsis, Hyperthyreose, chron. Niereninsuffizienz, Arrhythmia absoluta, arterielle Hypertonie, Hypertone Arteriopathie | Ulm |
| K-SN 8 | 68 | weiblich | 120 | 0 | II | Sepsis, Mammacarcinom ZNS-Mikroabszesse | Ulm |
| K-SN 9 | 71 | weiblich | 72 | 0 | I | Cerviccarcinom, art. Hypertonie, COPD, Lungenembolie, alter frontaler Mikroinfarkt | Ulm |
| K-SN 10 | 72 | männlich | 24 | 0 | I | Lymphom-NHL-hohe Malignität, Bergmann Zell Gliose | Ulm |

Tabelle 10 - Übersicht natives humanes Hirngewebe.

Aufgelistet sind alle durch das BrainNet (Brain-Bank – BB) und durch Prof. Thal (Ulm) zur Verfügung gestellten Hirngewebe mit kodierter Bezeichnung (Code), bzw. Bezeichnungen und Angaben zum Alter in Jahren (a), Geschlecht, *post-mortem* Intervall (PMI), Braak-Stadium (Braak and Braak, 1991), CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*)-Stadium und allgemeinem Krankheitsstatus der Spender (PD = Morbus Parkinson, AD = Morbus Alzheimer, CMV = Cytomegalie-Virus, ARDS = Akutes respiratorisches Distresssyndrom, ZNS = zentrales Nervensystem, COPD = chronisch obstruktive Lungenerkrankung, NHL = Non-Hodgkin-Lymphom; *Probe wurden aufgrund schlechter RNA-Qualität nicht mit in Genexpressionsanalysen einbezogen; **Probe wurde trotz guter Qualität aufgrund signifikant abweichender Genexpression aus den Analysen ausgeschlossen, ¹histologischer AD, nicht von BB als Diagnose angegeben).

2.1.8 Murines Hirngewebe

Mäuse des Stamms C57/BL6 aus eigener Zucht wurden zur Organentnahme eingesetzt. Die eigene Zucht erfolgte in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus im universitätseigenem Tierhaus in Standardkäfigen (Makrolon Typ II oder III) in Kohorten von 2 bis 5 Tieren unter sterilen Bedingungen (gefilterte Zu- und Abluft). Die Versorgung der Tiere erfolgte im

Rahmen der universitären Tierzucht mit *ad libitum* Fütterung (Standarddiät, Lage, DE) und *ad libitum* Wasser (pH 2.8), zudem erfolgte eine wöchentliche Umsetzung der Tiere in saubere Käfige.

Für Versuchsreihen wurden i.d.R. 3 Wochen alte Tiere männlichen Geschlechts, nach Möglichkeit aus demselben Wurf verwendet.

Die Tötung zur Organentnahme erfolgte gemäß der entsprechenden Anzeige Aktenzeichen 35/9185.81-3 beim Regierungspräsidium Tübingen.

2.2 Methoden

2.2.1 Generelles Schema zur *real-time* qPCR individueller Zellen nach UV-LMD

Eine Übersicht des generellen Versuchsablaufs ist in Abbildung 11 als schematisches Flussdiagramm wiedergegeben, die Methoden und Techniken werden in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert.

Als Ausgangsmaterial für die mRNA-Analysen einzelner Neurone aus humanem *post-mortem* Mittelhirngewebe dienten bei -80°C kryoasservierte horizontale Mittelhirnblöcke. Zur ersten Kontrolle der RNA-Integrität und des pH-Werts dienten unfixierte Gewebeschnitte, die beim Gefrierschneiden entstanden. Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms CM1850 wurden 12 µm dünne Sektionen des Gewebes geschnitten, auf PEN-Objektträger aufgezogen, mit Cresylviolett (CV) gefärbt, mit Ethanol fixiert und getrocknet. Die gefärbten Schnitte wurden entweder sofort für die Lasermikrodissektion verwendet oder bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung aufbewahrt. Mittels UV-Lasermikrodissektion (LMD6000) wurden von diesen Gefrierschnitten anschließend Gewebestücke (zur weiteren RNA-Qualitätskontrolle) oder Einzelzellen isoliert. Diese wurden direkt im Anschluss (ohne diskreten RNA-Isolationsschritt) lysiert und die RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die genspezifische cDNA-Quantifizierung erfolgte mittels *real-time* qPCR.

Zur Optimierung und Weiterentwicklung dieses bereits im Labor etablierten Protokolls wurden entsprechend Maushirnschnitte eingesetzt (Abb. 11).

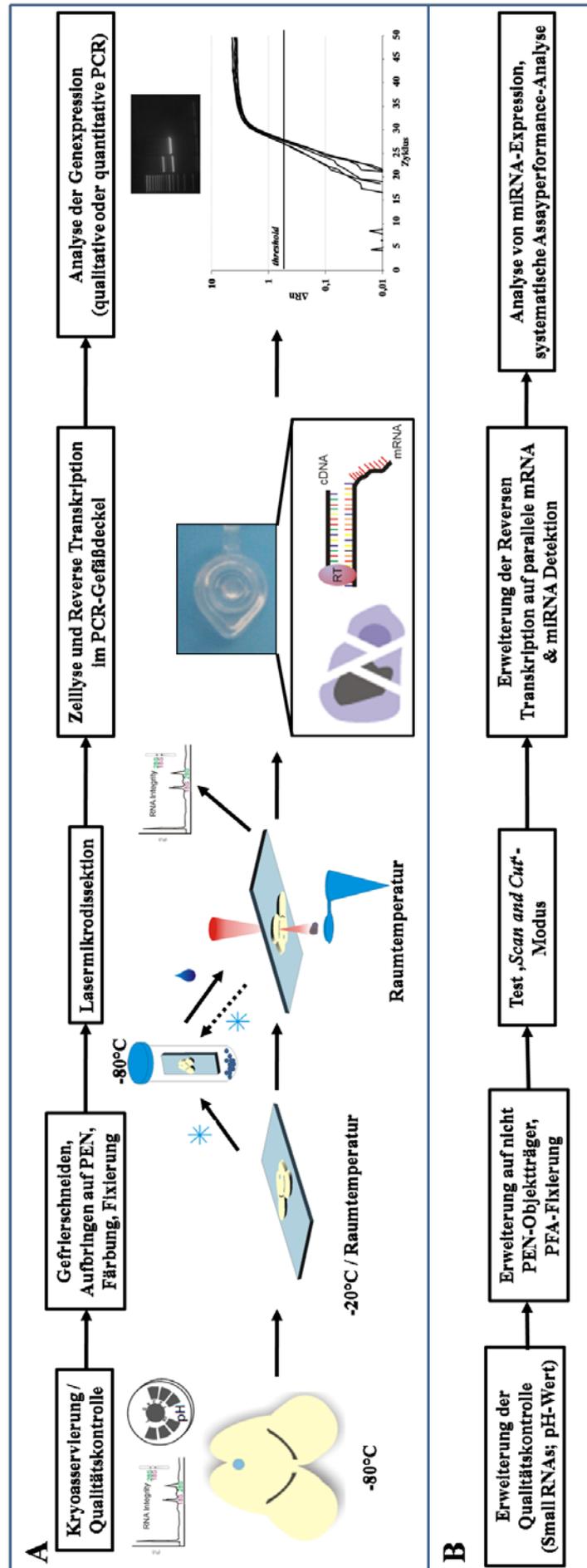


Abbildung 11 – UV-LMD Methodik. Flussdiagramm der UV-Lasermikrodisektionstechnik mit anschließender *real-time* qPCR basierter Genexpressionsanalyse (A). Die im Labor etablierte Technik (Grundemann et al., 2008) wurde gemäß Angaben unter B systematisch optimiert und erweitert (Details siehe Text).

2.2.2 Hirngewebepräparation

Zur Vorbereitung sämtlicher Arbeiten gehörte die Gewährleistung eines sterilen, Nukleinsäure- und Nuklease-kontaminationsfreien Arbeitens. Zur Erlangung möglichst RNase-freier Bedingungen standen die chemische Sterilisation mit RNase-Zap, Hitzesterilisation bei 175°C (Glas- und Keramikwaren) bzw. 225°C (Metallwaren) und UV-C-Licht zur Verfügung. Alle verwendeten Plastikwaren (Pipettenspitzen, PCR-Tubes), Objektträger (PEN-Slides), Lösungen und Chemikalien wurden zudem, wenn möglich, als Nukleinsäure-, RNase- und DNase-frei zertifiziert bezogen.

2.2.2.1 Präparation von nativem, murinem Hirngewebe

Native, murine koronale Mittelhirnblöcke wurden nach obiger Vorbereitung frisch präpariert. Dazu wurde eine Maus zunächst mit Isofluran narkotisiert. Areflexive, narkotisierte Mäuse wurden mittels einer Präparierschere dekapitiert und das Gehirn mittels Rasierklinge, Präparationsbesteck, Schere, Pinzetten und Spatel auf eiskaltem Metallblock freipräpariert. Um eine geeignete Fläche zum Einbetten des Gehirns auf der rostralen Seite im Einbettmedium zu erreichen, wurde mit einer Rasierklinge der Frontalkortex mittels Koronalschnitt entfernt. Auch wurde das Kleinhirn, wenn nicht benötigt, mittels Koronalschnitt entfernt. Das Aufbringen und Einbetten des koronalen Gewebeblocks erfolgte auf der rostralen Seite mit Einbettmedium auf einem Objekthalter mit 2,5 cm Durchmesser für die sofortige Verwendung. Unverzüglich nach dem Aufbringen von angeschnittenen Mittelhirnstücken auf mit Einbettmedium (TissueTec, Leica, Nussloch, DE) vorbereitete Träger (Korkplatte oder Objekthalter), wurden die Proben in das Gefriermikrotom bei -27°C in die Schnellgefrierleiste eingesetzt. Das Gehirn wurde für 10 min bei -35°C eingefroren, für weitere 10 min auf -27°C gebracht und anschließend für weitere 45 min bei -18°C äquilibriert.

2.2.2.1a Cochlea-Präparation

Die Präparation muriner *Cochlea* erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Jochen Roeper (Institut für Neurophysiologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main) stets frisch unter sterilen Bedingungen. Dazu wurde zunächst eine Maus mittels Isofluran betäubt, dekapitiert und das Innenohr herauspräpariert. Unter einem Stereomikroskop M165 C (Leica Microsystems, Wetzlar, DE) wurde die *Cochlea* aus der knöchernen Ohrschnecke in 4%iger PFA-Fixierlösung herauspräpariert und auf ein PEN-Slide aufgebracht (*whole-mount*). Nach Antrocknen der *Cochlea* wurde diese wie unter 2.2.2.4 beschrieben nochmals fixiert und mit Cresylviolett gefärbt.

2.2.2.2 Präparation von humanem Hirngewebe

Humanes Hirngewebe stand teilweise bereits kryoasserviert, mittels Einbettmedium auf UV-C-sterilen Korkscheiben mit einem Durchmesser von 4,8 cm aufgebracht, in geeigneten Boxen bei -80°C gelagert, zur Verfügung (etabliert durch Jan Gründemann (Gründemann, 2006)).

Frisches humanes Hirnmaterial, bereitgestellt durch Prof. Dr. med. Dietmar Thal (Sektion Neuropathologie am Institut für Pathologie, Universität Ulm), wurde auf Trockeneis ins Molekularbiologie-Labor der AG Molekulare Neurophysiologie, Universität Ulm, überführt und kryoasserviert. Dazu wurden die horizontalen Mittelhirngewebeblöcke mit Einbettmedium auf UV-C-behandelte, vorgekühlte Korkscheiben aufgebracht, im Gefriermikrotom bei -35°C eingefroren, anschließend in hitzesterilisierte, vorgekühlte Alufolie eingewickelt und bei -80°C zur Aufbewahrung in sterilen Boxen kryoasserviert.

2.2.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten mittels eines Gefriermikrotoms

Das Gefriermikrotom CM 1850 (Leica, Nussloch) dient dem Anfertigen von dünnen Gefrierschnitten. In Abbildung 12 ist eine Übersicht des Aufbaus und der Funktionsweise des Gefriermikrotoms dargestellt.

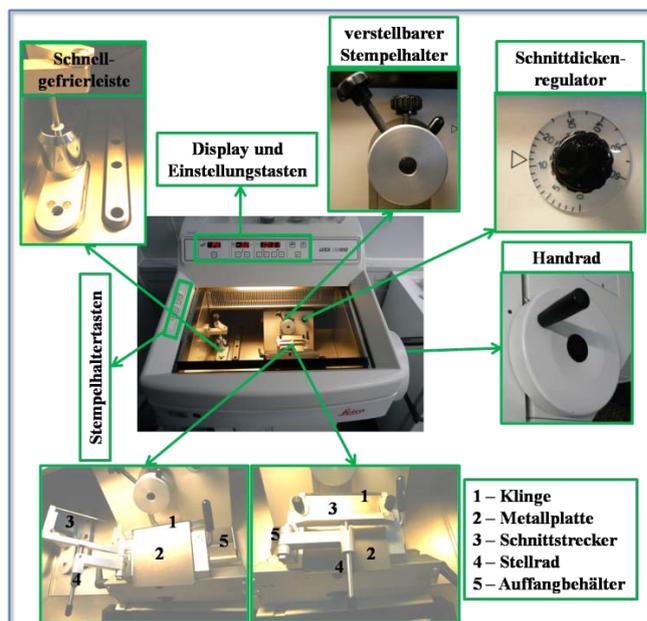


Abbildung 12 – Gefriermikrotom CM 1850. In der Mitte ist die Aufsicht auf den Arbeitsbereich des Gefriermikrotoms CM 1850 gezeigt. Die Temperatur des Innenraums, in dem sich Schnellgefrierleiste, Stempelhalter, Schnittdickenregulator etc. befinden, ist bis -35°C gradweise (1°C Schritte) regulierbar. Die Schnellgefrierleiste kann zudem separat auf -35°C gekühlt werden und dabei bis zu 5 Objekthalter mit Gewebe aufnehmen. Der verstellbare Stempelhalter nimmt den Objekthalter für den Schneidevorgang auf und bietet die Möglichkeit der Schnittflächenjustierung in alle Richtungen. Mit dem Schnittdickenregulator kann die gewünschte Schnittdicke zwischen 0 und $60\ \mu\text{m}$ angegeben werden. Das Handrad bewegt den Stempelhalter bei einer kompletten 360° -Drehung um die eingestellte Schnittdicke nach vorn. Der

Schnitt wird durch die Klinge (1, unten) zwischen der Metallplatte (2, unten) und dem gläsernen Schnittstrecker (3, unten) erzeugt. Der Schnittstrecker kann mit dem Stellrad (4, unten) für möglichst optimale, glatte Anschnitte justiert werden. Nicht aufgezone Schnitte werden im Auffangbehälter (5, unten) aufgefangen und wurden für Kontrollexperimente verwendet. Einstellungsstasten dienen der Temperaturregulation und Wartung, das Display zur Kontrolle der Einstellungen. Mit den Stempelhaltertasten kann der Stempelhalter schnell vor und zurück gefahren werden.

Zur Vorbereitung von kryoasservierten, auf Kork aufgebrauchten humanen Mittelhirnstücken, wurden diese auf Trockeneis zum Gefriermikrotom transportiert, von Alufolie befreit und der Korken mit dem aufgebrauchten Gehirn mittels eines Tropfens sterilen Wassers auf einen Objekthalter mit 5,5 cm Durchmesser geklebt. Im Gefriermikrotom äquilibrierte das Gewebestück für 20 min bei -35°C und im Anschluss für 45 min bei -18°C . Zum Schneiden wurde der Objekthalter mit Gewebestück in den Schneideapparat eingesetzt und das Gewebestück so austariert, dass die horizontale Anschnittfläche nach visueller Kontrolle parallel zur Klinge ausgerichtet war, um Verluste an humanem Hirnmaterial zu vermeiden. Von jedem Mittelhirnstück wurden anschließend $12\ \mu\text{m}$ dünne Sektionen geschnitten und aufgezogen. Vor und nach dem Trimmen am Gefriermikrotom wurden zur Dokumentation Fotos der humanen Gewebestücke gemacht und das Gewebe wieder bei -80°C kryoasserviert. Zum Schneiden von murinem Hirnmaterial wurde der Objekthalter mit gefrorenem Gehirnstück in den Schneideapparat eingesetzt und das Gehirn ausgerichtet, sodass die Schnittfläche koronal vorlag und das Gehirn nach visueller Kontrolle nach kurzem Anschneiden symmetrisch ausgerichtet war. Für die durchgeführten Versuche wurden $12\ \mu\text{m}$ dünne koronale Schnitte angefertigt und aufgezogen. Das Aufziehen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf UV-C behandelte (20 min), sterile PEN-Membran-beschichtete Objektträger (PEN-Slides). Nicht aufgezogene Hirnspäne wurden in flüssigem Stickstoff gesammelt und bei -80°C weggefroren.

2.2.2.4 Fixieren und Färben von Gefrierschnitten

Im Anschluss an die Präparation wurde das Gewebe für 1 min in 75 % EtOH (Sigma, München, DE) bei -20°C initial fixiert, durch Überschichten mit sterilgefilterter 1 % CV-Färbelösung 45 s gefärbt, in aufsteigender EtOH-Reihe (75 %, 95 % und 100 % EtOH) inkubiert und abschließend 1 min mit Mischalkohol (90 % Ethanol (wasserfrei), 5 % Methanol, 5 % Isopropanol, HPLC-rein, denaturiert; Alfa Aesar, Karlsruhe, DE, mit Molekularsieb, 0,3 nm; Merck, Darmstadt, DE, versetzt) dehydriert und fixiert.

Dieses für die UV-LMD mit anschließender *real-time* qPCR optimierte Protokoll liefert hinreichende Färbungen bei maximaler RNase-Inhibition.

2.2.2.5 Kryoasservieren von Gefrierschnitten

Das Einfrieren bei -80°C zur dauerhaften Lagerung gefärbter und fixierter Schnitte auf PEN-Slides erfolgte in 50 ml Falcon-Röhrchen, auf dessen Boden Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator, abgetrennt durch ein Sieb (Plexiglasring mit feinem Drahtgitter), zur Gewährleistung einer trockenen und damit RNase-inaktiven Atmosphäre vorgelegt war. In ein 50 ml

Falcon-Röhrchen wurden jeweils zwei, glasseitig aneinandergelehnte Objektträger aufrecht hineingegeben und das Falcon-Röhrchen mit Parafilm versiegelt (Gründemann, 2006).

2.2.3 Kontaktfreie UV-Lasermikrodissektion (UV-LMD)

Zur kontaktfreien Isolation von einzelnen Zellen oder distinkten Arealen aus Gewebstücken stand ein computergesteuertes Lasermikrodissektionssystem LMD6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, DE) zur Verfügung (Abb. 13). Dabei handelt es sich um ein automatisiertes, aufrechtes Digitalmikroskop, in Verbindung mit einem motorisierten Objektisch, das an einen UV-Diodenlaser mit einer Emissionswellenlänge von 355 nm gekoppelt ist. Zur Visualisierung dient eine analoge Kamera (HV-D20 3 CCD, Hitachi, Maidenhead, UK).

Zur Vorbereitung von Zell- oder Gewebeanisolationen wurden alle metallischen, ablösbaren Teile des LMD6000 bei 225°C hitzesterilisiert.

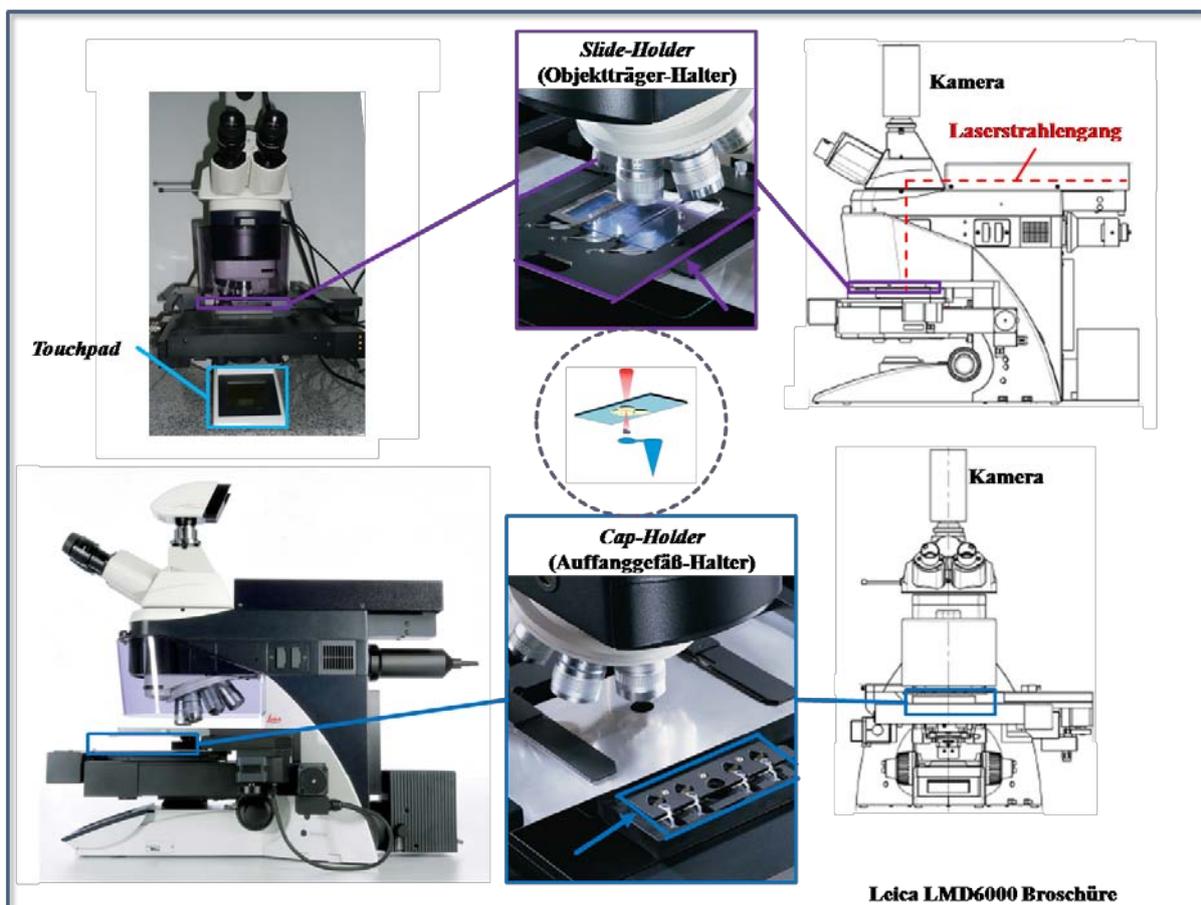


Abbildung 13 – Das UV-Lasermikrodissektionsmikroskop LMD6000.

Das Lasermikrodissektionsmikroskop LMD6000 ist ein aufrechtes, an einen UV-Diodenlaser gekoppeltes, Mikroskop. Ein *Touchpad* vereinfacht die Bedienung. Das Gerät verfügt über je einen ausfahrbaren *Slide-Holder* und *Cap-Holder*, die Objektträger werden mit dem aufgebracht Objekt nach unten eingelegt und befinden sich nach Einfahren der *Holder* direkt über dem Deckel des Auffanggefäßes. Die μm -genaue Lenkung von Laser und Objektisch erfolgt computergesteuert (Abbildung in Anlehnung an die Leica LMD6000 Broschüre).

Objektträger- und Auffanggefäß-Halter können computergesteuert ausgefahren werden. Der Objektträgerbereich im Mikroskopfokus befindet sich im eingefahrenen Zustand direkt über dem Deckel des Auffanggefäßes und kann über die Objektive kameragestützt visualisiert werden. Der motorisierte Objektstisch ermöglicht μm -genaue Bewegungen. Der an das Mikroskop gekoppelte UV-Dioden-Laser kann computergesteuert durch die Objektive im Sichtfeld fokussiert werden, dadurch wird das Schneiden von PEN-Folie und Photoablatieren, bzw. Vaporisieren von Gewebe im μm -Bereich möglich. Abbildung 13 veranschaulicht den Aufbau des Mikroskops. Zur Steuerung des Lasermikrodissektionsmikroskops diente die LMD6000-Software (Version 6.6.3.3564, Leica Microsystems, Wetzlar, DE), zum Archivieren der Laserbilder die IM1000-Software (Version 5 Release 190, Leica Microsystems, Wetzlar, DE).

Mit der LMD6000-Software wird das Mikroskop vollautomatisch angesteuert und es können Lichtintensität, Objektive, Lasereigenschaften, *Slide-* und *Cap-Holder*-Positionierungen, Datenbanksteuerung und weitere Bedienelemente angesteuert und verändert werden (Abb. 14, 6-7). Neben der Lasermikrodissektion bietet das LMD6000 die Möglichkeit Zellflächen auszumessen und Bilder mit Messbalken (*Scalebars*) zu dokumentieren. Die IM1000-Software erstellt und archiviert automatisch Bilder vor und nach dem Schneidevorgang, zusätzlich können Auffanggefäßkontrollbilder und Übersichtsaufnahmen aufgenommen werden (Abb. 14, 4).

Zur Ansteuerung einzelner Bedienelemente bietet das Hauptfenster der LMD6000-Software verschiedene Bedienfelder, sowie Menüleisten (Abb. 14). Über den Unterpunkt *Laser* (Abb. 14, rote Markierung) wird die Laserkontrolle angewählt, in der Laserpower (*Power*), Apertur (*Aperture*), Schneidegeschwindigkeit (*Speed*), interner Linsenabstand (*Offset*) und finale Pulsstärke (*Specimen Balance*) durch dimensionslose Regler eingestellt werden können. Die Laserpower entspricht dabei der Energie des Lasers, die Apertur beschreibt die Öffnung der Aperturblende, die Schneidegeschwindigkeit legt fest, wie lange der Laser auf einem Punkt fixiert bleibt, der interne Linsenabstand dient zur Anpassung der Laserlinsen auf das Objekt und den Objektträger und die finale Pulsstärke ermöglicht eine Erhöhung der Energie der letzten Laserpulse, um das Fallen des ausgelaserten Objekts zu erleichtern (Abb. 14, rote Markierung).

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich folgende Einstellungen für das 63x Objektiv und PEN-Objektträger mit 12 μm EtOH-fixierten Hirnschnitten von Maus und Mensch als optimal für die Schnitte: Laserpower = 50, Apertur = 1, Schneidegeschwindigkeit = 39, interner Linsenabstand = 130 und die finale Pulsstärke = 0. Für bestimmte Anwendungen (RIN-

Vergleich, vgl. 3.5.2) wurde im 4x Objektiv mit den Einstellungen Laserpower = 61, Apertur = 1, Schneidgeschwindigkeit = 45, interner Linsenabstand = 80 und finaler Pulsstärke = 0 gearbeitet.

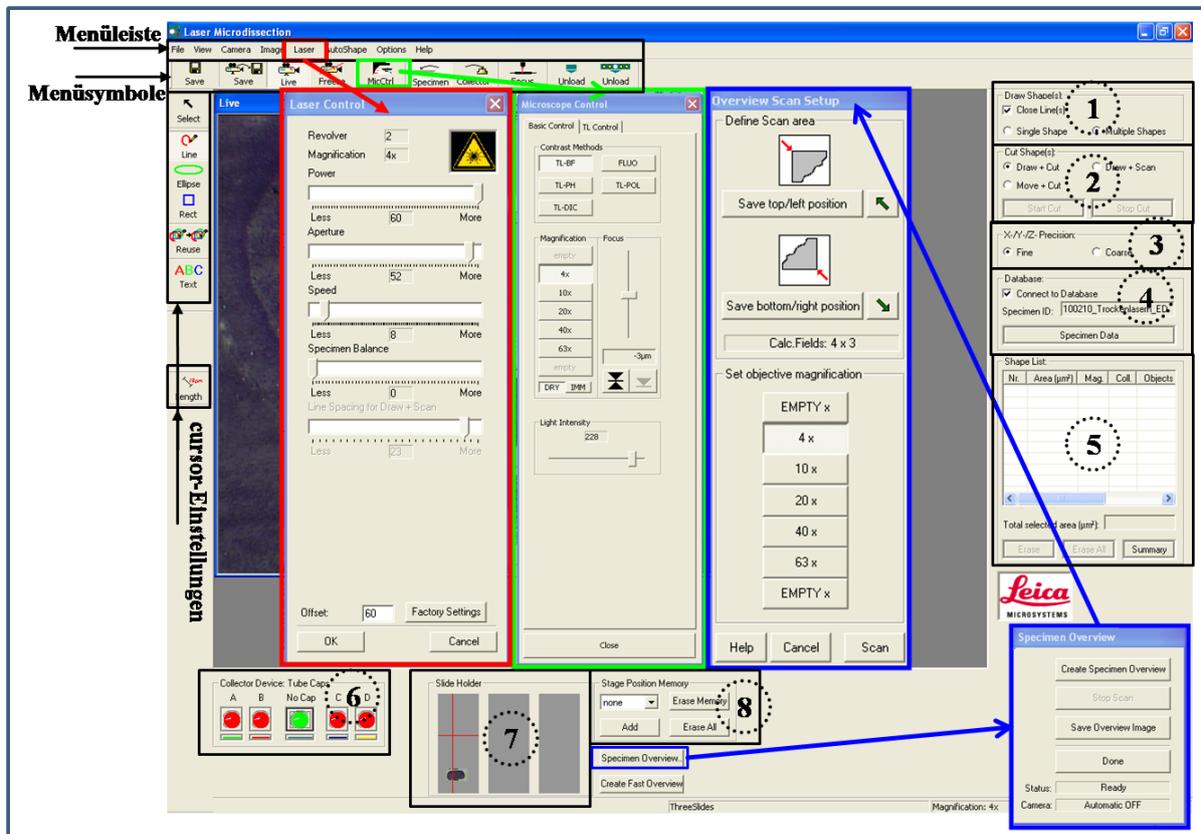


Abbildung 14 – Hauptbedienfelder der LMD6000-Software.

Im Hintergrund das LMD-Hauptfenster mit Menüleiste, Menüsymbolleiste, Cursoreinstellungen und den Bedienfeldern 1-8. Von der Menüleiste aus können das Laserkontrollfenster aufgerufen und die Lasereinstellungen angepasst werden (rote Markierungen). Aus der Menüsymbolleiste kann die Mikroskopkontrolle aufgerufen und angepasst werden (grüne Markierung). Zudem bietet die Software eine Möglichkeit, Objektträger- oder Teilübersichten zu erstellen (blaue Markierung). Die weiteren Bedienfelder dienen zur Auswahl einzelner oder mehrerer Formen mit oder ohne automatischer Start- und Endpunktverknüpfung (1), zum Wechsel zwischen „Draw + Cut“, „Draw + Scan“ und „Move + Cut“ und zum Starten und Stoppen des Lasers (2), zum Wechsel zwischen Grob- und Feintrieb des Mikroskops (3), zur Verbindung mit einer IM1000-Bildspeicherdatenbank (4), der tabellarischen Übersicht, Ansteuerung und Löschen markierter Positionen (5), zum Verwalten des *cap-holders* (6), zum Verwalten des *slide-holders* (7) und der Positionsspeicherung (8) (Details siehe Text).

Die Mikroskopkontrolle erlaubt die Ansteuerung des Mikroskops durch die Software, hier können die Objektive gewechselt, die Lichtintensität und der Fokus eingestellt und die Beleuchtungsart (z.B. Hellfeld, Fluoreszenz oder Nomarski-Optik) gewählt werden (Abb. 14, grüne Markierung). Des Weiteren kann zur besseren Orientierung eine Übersicht eines ganzen Objektträgers oder Ausschnitts mittels des „*Specimen Overview*“ angefertigt werden (Abb. 14, blaue Markierung). Eine erstellte Übersicht bleibt bei Objektivwechsel erhalten und markierte Positionen werden in dieser angezeigt, was Orientierung und Markierung auf Einzelzellniveau erleichtert.

Weitere Bedienfelder dienen zur Auswahl, ob einzelne oder mehrere Formen markiert werden sollen und bieten die Möglichkeit einer automatischen Start- und Endpunktverknüpfung. Der Lasermodus kann als „*Draw + Cut*“, „*Draw + Scan*“ oder „*Move + Cut*“ ausgewählt werden. „*Draw + Cut*“ bedeutet, dass der Laser entlang der manuell eingezeichneten Markierungslinie schneidet, während im „*Draw + Scan*“-Modus die Fläche im markierten Bereich durch den Laser ablatiert wird. Mit „*Move + Cut*“ kann der Laser direkt manuell gestartet werden, was beispielsweise Korrekturen bei unzureichend geschnittenem Material zulässt. Alle Einstellungen und markierten Bereiche (in μm^2) werden nach dem Markieren angezeigt und nach erfolgreichem Lasern automatisch im Excelformat zur Verfügung gestellt (Abb. 14, 1-8). Der Objektträgerhalter kann maximal drei Objektträger gleichzeitig aufnehmen, wird in die Halterung am Mikroskop eingelegt und softwaregesteuert unter den Objektivrevolver gefahren. Unter dem Objektträgerhalter, abgetrennt durch ein Blech, befindet sich die Halterung für den PCR-Reaktionsgefäß-Halter (*Cap holder*, selbst gebaut, Werkstatt Universität Marburg/Ulm). In diesen können maximal vier PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml *thin walled PCR reaction tubes with flat cap*, Eppendorf) parallel eingelegt werden. Durch Anwahl der entsprechenden Halterposition wurde der Deckel unmittelbar zum Auffangen unter das zu dissektierende Gewebe gefahren (Abb. 13).

Zur Isolation der untersuchten Zellen bzw. Gewebestücke wurden diese am LMD6000 mittels Computermaus von Hand markiert. Zur besseren Orientierung und zur Dokumentation wurden vor und nach Dissektion mit dem LMD6000 Übersichtsaufnahmen („*Specimen overview*“) erstellt. Zellen bzw. Gewebestücke waren nach Photoablation des umliegenden Gewebes isoliert („*Draw + Cut*“) und fielen durch die Schwerkraft in den Reaktionsgefäßdeckel, was mittels des 4x Objektivs visuell überprüft wurde.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden zur *real-time* qPCR-basierter Genexpressionsanalyse

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen, Kontaminations- und Nuklease-freien Bedingungen (vgl. 2.2.2) durchgeführt.

2.2.4.1 pH-Wertbestimmung von Hirngewebe

Der pH (*pondus Hydrogenii*)-Wert ist definiert als der negative, dekadische Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration:

$$\text{pH} = -\log_{10}(\text{H}_3\text{O}^+).$$

Zur Bestimmung des pH-Wertes des humanen *post-mortem* Hirnmaterials wurden 300 µg gefrorener, unfixierter Hirnschnitte gewogen und mit 3 ml Reinstwasser (*molecular biology grade*) gevortext. Anschließend wurde die Gewebesuspension für 1 h bei Raumtemperatur (24°C) äquilibriert (Mexal et al., 2006). Das Messen des pH-Werts der wässrigen Hirnlösung erfolgte mit einer elektronischen pH-Elektrode (pH-Meter: pHOptica; Sensor: *pH MicroTip fiber optic pH sensor*, 140µm OD; World Precision Instruments (WPI), Sarasota, USA). Alle Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.4.2 Nukleinsäure-Isolation

Zur Isolierung von totaler RNA aus Gewebeschnitten (entstanden beim Trimmen der Mittelhirngewebeblöcke), sowie aus murinen Mittelhirnstücken und aus Ethanol-fixierten, Cresylviolett-gefärbten und ausgelaserten murinen Hirnsektionen wurde das RNeasy MINI Kit (Qiagen, Hilden, DE) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.4.2a Isolation totaler RNA

Murine Mittelhirnstücke mussten zur Isolation totaler RNA zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert werden. Humane oder murine Gewebeschnitte, ausgelaserte Hirnsektionen oder gemörsertes murines Mittelhirn wurden direkt in den Lysepuffer des Kits überführt und mittels einer Nadel (Typ 19 gauge) und 2 ml Spritze homogenisiert.

Im Lysepuffer des RNeasy MINI Kits ist das chaotrope Salz Guanidin-Iso-Thio-Cyanat enthalten, das durch Spaltung von Disulfidbrücken zur Zellyse und Proteindenaturierung führt und dadurch gleichzeitig RNase-inhibierend wirkt. Das Homogenisieren trägt mechanisch zur Zellyse bei und degradiert durch Scherkräfte DNA-Moleküle. Weiterhin befindet sich im Lysepuffer β -Mercapto-Ethanol, welches vor jedem Versuch frisch zugegeben wurde und ebenfalls Proteine durch Reduktion von Disulfidbrücken zu freien Thiolen denaturiert. Zur Phasentrennung und zum Pelletieren der lysierten Zellreste folgt ein Zentrifugationsschritt, wobei die Nukleinsäuren in Lösung über pelletierten Proteinen und unter einer fettigen Phase aus Lipiden bleiben. Diese nukleinsäurehaltige, flüssige Phase wird mit 75 % Ethanol versetzt und auf eine Silicamembran überführt. Hierdurch werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen RNA-Molekülen und der Silikagel-Membran ausgebildet und somit die Nukleinsäuren an die Membran gebunden. Die noch in der Lösung enthaltenen Proteine und Zellreste werden durch mehrere Zentrifugations- und Waschschrte entfernt. Die Elution der gebundenen Nukleinsäuren erfolgte mittels mind. 30 µl Nuklease-freien Wassers in einzeln verpackte, zertifizierte Nuklease-freie 1,5 ml Reaktionsgefäße. Alle

Schritte der Aufarbeitung erfolgten bei Raumtemperatur. Eluierte RNA wurde nach Konzentrationsbestimmung (vgl. 2.2.4.3) präzipitiert (vgl. 2.2.4.6) oder bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.4.2b Isolation kleiner RNAs (miRNA)

Zur Isolation von miRNA standen Kits verschiedener Firmen (innuPREP micro RNA Kit von analytikjena, Absolutely RNA miRNA Kit von Stratagene und der RNeasy MINI Kit für mRNA von Qiagen) zum Testen zur Verfügung. Alle Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet und basieren wie der bereits beschriebene RNeasy Kit auf der Verwendung einer Silicamembran, an welche die RNA gebunden und nach Waschschritten eluiert wird.

Letztlich wurde zur miRNA-Isolation das RNeasy MINI Kit eingesetzt, da sich die speziellen miRNA-Kits in der Ausbeute nicht von der des RNeasy MINI Kits unterscheiden.

2.2.4.2c Nukleinsäureisolation aus PFA-fixiertem Gewebe

Die Isolation von RNA aus (Paraformaldehyd-) PFA-fixiertem Gewebe erfolgte unter Verwendung des RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, DE) mit Anpassungen der Herstellerangaben auf lasermikrodissektierte Proben. Das veränderte Durchführungsprotokoll ist nachfolgend beschrieben.

Zuerst wurden die lasermikrodissektierten PFA-Proben durch Zentrifugation bei 14000 rpm für eine Minute vom Deckel in das Auffanggefäß gebracht. Nach Zugabe von 200 μl Xylen als Lösungsmittel und Vortexen für 10 s wurde die Probe durch zweiminütige Zentrifugation bei 13200 rpm pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Zum Entfernen des Xylens wurde 200 μl Ethanol (100 %) auf die Probe gegeben und erneut für 10 s gevortext. Daraufhin wurde erneut 2 min bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Ethanolreste wurden 10 min bei 37°C verdampft. Das trockene Pellet wurde in 150 μl PKD-Puffer aufgenommen und 0,5 μl Proteinase K zum Abbau von Proteinbindungen zugegeben. **WICHTIG:** Aufgrund der in der qPCR nachweisbaren Kontamination des Enzyms musste die Proteinase K des Kits getauscht werden. Bei Benutzung von lyophilisierter Proteinase K (Roche) wurde keine Kontamination der Proteinase K in der Negativkontrolle mehr detektiert. Die Lösung wurde kurz durch Vortexen gemischt und für 15 min zunächst bei 55°C und im Anschluss 15 min bei 80°C inkubiert. Nach Zugabe von 320 μl RBC-Puffer zur Lösung wurde das Lysat gemischt, bevor dies zum Entfernen genomischer DNA auf eine gDNA Eliminator Säule mit Auffangtube gegeben und bei 13200 rpm für 2 min zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde mit 720 μl Ethanol (100 %) zur Nukleinsäurefällung gemischt und zweimal nacheinander je 700 μl des Gemischs auf

eine RNeasy MinElute Säule gegeben. Durch kurze Zentrifugation (15 s) bei 13200 rpm wurde die RNA aus dem Gemisch an die Säule gebunden, dort zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen und im Anschluss 5 min bei 13200 rpm zentrifugiert.

Die gebundene RNA wurde in 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert oder direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt. Zur Aufreinigung und Aufkonzentration konnte die RNA präzipitiert werden (vgl. 2.2.4.6).

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA stand ein Picodrop (Biozym, Hess. Oldendorf, DE) zur Verfügung. Das System arbeitet basierend auf dem Prinzip der UV-Lichtabsorption von Nukleinsäuren (260 nm) und ermöglicht Konzentrationsbestimmungen von RNA und cDNA im Bereich von 0,3 ng/µl bis 1 mg/µl in Volumina von 2 µl. Als Küvette dient eine spezielle, sterile 10 µl Pipettenspitze (UVpette tip, Biozym). Die Küvetten spitze wird mit der Pipette (10 µl, Gilson) in den speziellen Halter eingesetzt, sodass die Spitze im Strahlengang für die Absorptionsmessung und Konzentrationsbestimmung sitzt (Abb. 15). Die Absorptionsmessungen und Konzentrationsbestimmungen erfolgen computergestützt im Vergleich zum gemessenen Leerwert per Knopfdruck mit der Picodrop-Software (Version 2.06, Biozym). Im Anschluss an die Messung konnte das eingesetzte Volumen zurückgewonnen werden, sodass kein Materialverlust entstand.

Die Software zeichnete Absorptionsspektren der angewählten Wellenlänge (230-850 nm) auf, berechnete automatisch die Konzentration nach Abzug des Leerwerts (Wasser) und stellte alle Messergebnisse direkt bereit, mit der Möglichkeit, diese im Excel-Format zu speichern.

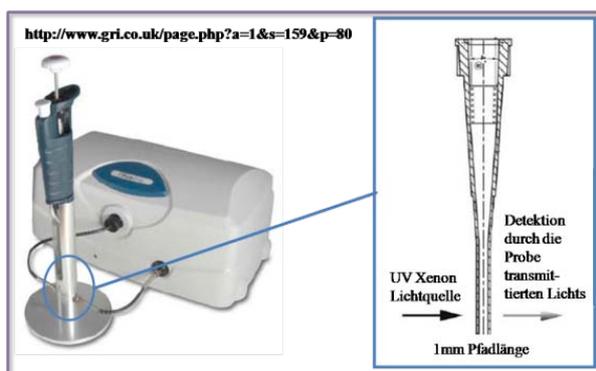


Abbildung 15 – Das Picodrop-Photometer.

Dargestellt sind eine Aufnahme des Picodrops mit eingesetzter Gilson-Pipette und eine schematische Vergrößerung der als Küvette dienenden Pipettenspitze. Die Pipettenspitze kann bis 2-10 µl Flüssigkeit aufnehmen und verlässlich quantifizieren. Durch die Probe transmittiertes Licht wurde mit einem Detektor computergestützt ausgewertet (verändert nach:

<http://www.gri.co.uk/page.php?a=1&s=159&p=80>).

2.2.4.4 RNA-Qualitätsbestimmung: RIN-Analyse und *Small RNA* Analyse mittels Agilent-Technologie

Zur Bestimmung der RNA-Qualität hat sich die RIN (RNA-Integritäts-Nummer) als internationaler Standard durchgesetzt (Harrington et al., 2009). Mit der RIN-Nummer wird RNA nach Grad der Degradierung durch eine patentierte Software von Agilent klassifiziert.

Zur Bestimmung der RNA-Integrität, als Maß für die RNA-Qualität, diente das „*lab-on-a-chip*“-System in Kombination mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent). Kits und Chips (RNA 6000 Nano, small RNA; Agilent) dienen zur Auftrennung von Gesamt-RNA in einem Mikrokapillarsystem, welches in die Glaskomponente des Chips eingefräst ist. Die Methodik basiert auf einer Fluoreszenzmarkierung der RNA-Proben, die kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Fluoreszenzdetektor nach Laufzeit detektiert werden (Abb. 16).

Zur Bestimmung der mRNA-Integrität wurde das chipbasierte Agilent 2100 Bioanalyzersystem in Kombination mit dem Agilent RNA 6000 Nano-Kit (Agilent, Böblingen, DE) benutzt, um Gesamt-RNA-Proben im Bereich von 5-500 ng/µl auf deren Quantität und Qualität zu überprüfen. Die nach Größe kapillarelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Fragmente detektierte ein Fluoreszenzdetektor in der Kapillare und das Detektionsmuster diente als Analysegrundlage. Ein Algorithmus (genaue Funktion wird von Agilent nicht genannt) berechnete aus den Messdaten einen Wert zwischen 1 und 10 (RIN-Nummer), wobei 1 komplett degradiert und 10 vollständig intakte RNA entspricht.

Der Nano-Chip wird mit einem Polymergel, das mit nukleinsäureinterkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen versetzt ist, beladen und in die zum Bioanalyzersystem gehörende Priming Station eingesetzt. In der Priming Station befindet sich eine 1 ml Spritze, mit welcher das vorbereitete Polymergel in die Kapillaren gedrückt wird. 1,5 µl jeder Probe werden mit 5 µl Fluoreszenz-Marker gemischt und auf den Chip (6 µl) geladen. Der Fluoreszenzmarker dient als Lauffront für die Zuordnung der Proben durch den Algorithmus. Als Kontrolle dient ein Marker (*Nano ladder*), welcher bei jedem Chip-Lauf zusätzlich zu den Proben geladen wird. Vor dem Chip-Lauf wird der beladene Chip zum Entfernen von Luftbläschen gevortext. Der Bioanalyzer wird mit dem Programm „*Eukaryote Total RNA Nano*“ zur Gesamt-RNA-Analyse gestartet, die RNA-Proben durch Anlegen einer Spannung kapillarelektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und in ein Elektropherogramm übersetzt. Zusätzlich wird die Intensität des Fluoreszenzsignals gemessen und im Vergleich zum Marker die Quantität jedes Fragments und jeder Probe insgesamt ermittelt.

Zur Analyse der Daten des Bioanalyzers 2100 diente die 2100 Expert Software (Version B02.05.SI360). Die Software ermöglicht die Anwahl des „*Eukaryote Total RNA Nano*“-

Programms zur Analyse der Qualität von eukaryotischen RNA-Proben. Die Ergebnisse werden automatisch als Elektropherogramme erstellt und die RIN und Konzentration der Proben berechnet.

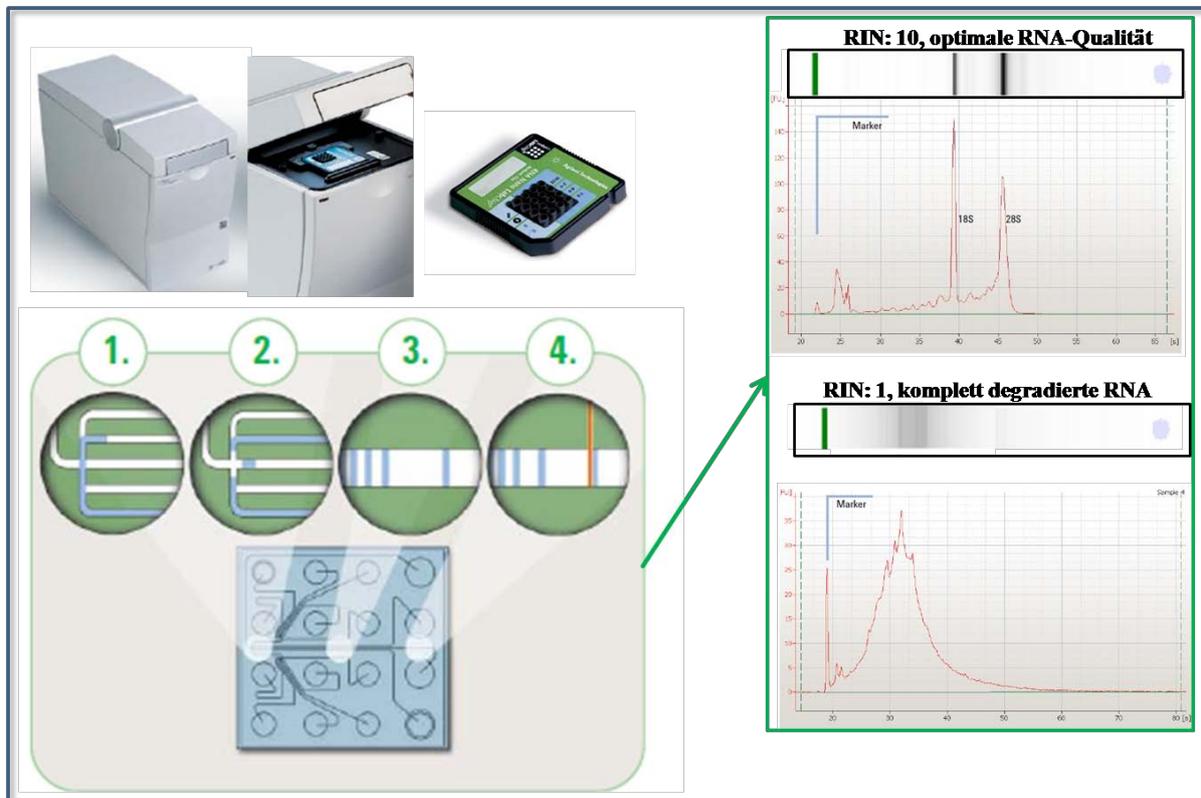


Abbildung 16 – Die Funktionsweise des Bioanalyzers 2100.

Der Agilent Bioanalyzer 2100 ermöglicht eine Chip-basierte, kapillarelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA. Links: Zur elektrophoretischen Auftrennung tauchen Elektrodenpins des Bioanalyzers 2100 in die Proben auf dem Chip. Durch Anlegen von Strom an die Elektrodenpins werden die RNA-Proben durch die Mikrokanäle bewegt (1.). Nach definierten Zeitpunkten werden die unterschiedlichen RNA-Proben separat in einen Trennkanaal injiziert (2.). Im Trennkanaal werden die Proben elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt (3.) und von einem Detektor registriert (4.). Die registrierten Signale werden von der 2100 Expert Software sowohl als Elektrophoresegele (rechts: schwarze Kästen) angegeben als auch als Elektropherogramme (rechts: grüner Kasten) dargestellt. Rechts: Beispiele einer RNA-Probe optimaler Qualität (oben) und einer komplett degradierten RNA-Probe (unten). (RIN – RNA Integritätsnummer, Verändert nach Agilent 2100 Bioanalyzer Broschüre und RNA 6000 Kit Guide)

Zur Analyse von miRNAs wurde der *Small RNA* Chip-Kit (Agilent) eingesetzt, um Proben im Bereich von 5-20 ng/µl Gesamt-RNA zu untersuchen. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung und Detektion der Proben verläuft analog zum Nano Kit. Das Detektionsmuster gibt Aufschluss über die Quantität von kurzen RNAs (6 bis 150 nt). Besonderes Augenmerk wird hierbei auf den Anteil der miRNAs (15-35 nt) in der Probe gelegt.

Der *Small RNA* Chip ist mit einem feinmaschigerem Polymergel beladen im Vergleich zu dem RNA 6000 Nano Chip. Zusätzlich werden für die Auftrennung 9 µl *condition solution* (im *Small RNA* Kit enthalten) benötigt, die separat in einen vorgesehenen Slot geladen werden und zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals dienen. Als Kontrolle dient ein Marker

(*small RNA ladder*), welcher bei jedem Chip-Lauf ebenfalls wie die Proben behandelt und aufgetragen wird. Anstelle des „*Eukaryote Total RNA Nano*“-Programms wird das Programm „*Small RNA Series II*“ zur Analyse kurzer RNA-Fragmente verwendet. Die Software erstellt aus den Messdaten wiederum Elektropherogramme und errechnet automatisch die Konzentration von miRNA und kurzen RNA Fragmenten insgesamt, sowie deren Verhältnis (in % miRNA-Anteil an kurzen RNAs).

2.2.4.5 Zellyse von UV-LMD Proben und cDNA-Synthese aus mRNAs und miRNAs

RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und *random* Hexamer-Primern in stabile komplementäre DNA (cDNA – engl. *complementary DNA*) übersetzt. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA anhängige DNA-Polymerase, die beginnend an einem kurzen Oligonukleotid (Primer) mit Hilfe von Desoxy-Ribo-Nuklein-Triphosphaten (dNTPs) durch Elongation des Primers einen Hybridstrang aus RNA und DNA erstellt. Der Prozess des Erstellens von cDNA aus RNA wird Reverse Transkription genannt.

Da miRNAs aufgrund ihrer Kürze nicht durch Primerbindung und Elongation einfach in cDNA übersetzt werden können, wurden diese zuvor durch das Enzym Adenylase, die an das 3'-Ende Desoxy-Ribo-Adenosin-Triphosphate (dATPs) anfügt, verlängert (Kit-System miScript, Qiagen, Hilden, DE).

Die cDNA-Synthese von totaler RNA aus laserdissektierten Zellen erfolgte direkt nach der UV-LMD und Zellyse bei 72°C (ThermoStat plus) ohne separate RNA Isolation.

Dazu wurde auf die Mikrodisektate 4,7 µl Laser-Reaktionsmix (vgl. 2.1.6) ins Cap gegeben, welcher sich in finaler Konzentration aus je 0,2 mM dNTPs, 10 µM *random* Hexamer-Primern, 1 mM Tris HCl (pH 8) (Reverse Transkriptase Puffer, RT-Puffer), 1x Erst-Strang Puffer (*First Strand Buffer*, FSB), 10 mM Di-Thio-Threitol (DTT), 500 ng Poly-Inositol (polyI), 0,5 % Detergenz (NP40), 5 U RNase-Inhibitor (Super RNasin, SRS) in RNase-freiem Wasser zusammensetzte. PolyI dient als RNA-Trägermaterial (*Carrier*) zur Vermeidung von RNA-Degradation. Alle Agenzien für den Laser-Reaktionsmix wurden in entsprechenden Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Der Laser-Reaktionsmix wurde für jeden Experimenttag frisch zusammenpipettiert und während des gesamten Versuchs lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Im Anschluss an die Lyse wurde die Probe 1 min auf Eis gekühlt und 1 min mit 13.200 rpm zentrifugiert (MiniSpin plus, Eppendorf), um die Probe aus dem *Cap* des Reaktionsgefäßes ins *Tube* zu befördern. Danach wurden 100 U (0,3 µl) Reverse Transkriptase (SuperScript II, Invitrogen) hinzugegeben und die Probe zur cDNA-Synthese für zunächst 2 h bei 38°C und 350 rpm

Intervallmix für 10 s alle 10 min in einen Thermoschüttler und abschließend bei 39°C über Nacht in einen ThermoStat plus inkubiert. Während des gesamten Versuchs wurde die Reverse Transkriptase bei -20°C in einem Tischgefrierer (Techfreeze) direkt am Laser-Arbeitsplatz aufbewahrt.

Die cDNA-Synthese aus Gewebe-RNA erfolgte nach Zugabe des cDNA-Synthesemixes 2 h im Thermoschüttler bei 38°C und 350 rpm Intervallmix alle 10 min.

Der miScript Kit (Qiagen) ermöglicht eine parallele Detektion von mRNA und miRNA nach entsprechender cDNA-Synthese. Zunächst werden unselektiv kurze RNA-Fragmente (auch miRNAs) einer Probe polyadenyliert. Parallel dazu werden RNA und polyadenylierte RNA mit Hilfe von random Hexameren und poly-dT Primern in cDNA umgeschrieben (Details vgl. 3.2.4). Nach der Reversen Transkription wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.4.6 Präzipitation zur Aufreinigung von RNA und cDNA

RNA bzw. cDNA wurden mittels eines modifizierten NaAc/EtOH-Protokolls, wie beschrieben (Liss, 2002), präzipitiert und in Wasser aufgenommen. Die Präzipitation dient der Aufkonzentration der Proben und der Aufreinigung zur Vermeidung von Artefakten in nachfolgenden Reaktionen.

Zunächst wurde 5 µl Probe zur Nukleinsäurefällung mit 7,35 µl Präzipitationsmix gemischt und gevortext. Durch Zugabe von 37 µl 100 % Ethanol (AppliChem, Darmstadt, DE) und Vortexen wurden die Proben über Nacht bei -20°C gefällt. Mittels zweistündiger Zentrifugation bei 13.200 rpm bei 0°C wurden die Nukleinsäuren pelletiert, der Überstand großzügig abgenommen und mit 100 µl 75 % Ethanol zum Entfernen von Salzen und anderen Rückständen gewaschen (erneute Zentrifugation für 15 min bei 0°C und 13.200 rpm).

Bei der Präzipitation von cDNA wurde das Pellet nach sorgfältigem Abnehmen des Überstands bei 45°C getrocknet, bis der Alkohol evaporiert war. Die cDNA wurde im gewünschten Volumen Wasser aufgenommen, für 2 h bei 45°C und 350 rpm Intervall-schütteln alle 10 min im Thermomixer inkubiert und bei -20°C gelagert.

Zur RNA-Präzipitation wurde der Waschethanol vollständig abgenommen, das Pellet zur Vermeidung von Thermodegradation bei -20°C getrocknet (ca. 5 min), im gewünschten Volumen Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) dient zur gezielten Amplifikation distinkter Sequenzabschnitte von DNA-Einzelsträngen. Das Prinzip der PCR basiert auf drei sich zyklisch wiederholenden Phasen: der Denaturierung, der

Primeranlagerung (*Annealing*) und der Primerverlängerung anhand des Matrizenstrangs (Elongation) (Lottspeich and Zorbas, 1998).

Das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist eine hitzebeständige DNA-abhängige DNA-Polymerase (i.d.R. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*). Als Startpunkt der Kopie dient das 3'-OH-Ende eines kurzen, zum Matrizenstrang komplementären Oligonukleotids (Primers), welches mittels dNTPs zu einem DNA-Doppelstrang (dsDNA) verlängert wird. Die Denaturierung der dsDNA erfolgt bei hohen Temperaturen (94 oder 95°C). Anschließend wird auf eine primerspezifische Temperatur (i.d.R. 50-70°C) gekühlt, bei der sich die spezifischen Primer an ihre Zielsequenz auf dem Haupt- und Gegenstrang der getrennten Einzelstränge anlagerten. Die Elongation erfolgte i.d.R. bei 60°C oder 72°C. Die ideale exponentielle PCR-Amplifikation entspricht einer Vordopplung der Zielsequenzen pro Zyklus.

Alle PCR-Läufe dieser Arbeit wurden mit entsprechend geeigneten PCR-Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt.

Die genauen Temperaturzyklen der unterschiedlichen PCRs sind in den entsprechenden Kapiteln (s.u.) angegeben, die eingesetzten Primer und Assays sind in den Tabellen 7-9 aufgeführt.

2.2.4.7a qualitative Multiplex-Nested PCR

Eine Multiplex-Nested PCR besteht aus zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen. Das Zweistufensystem erhöht die Sensitivität und Spezifität der PCR (Lottspeich and Zorbas, 1998).

In einer Multiplex-PCR werden parallel mehrere Zielsequenzen amplifiziert, indem Primerpaare für verschiedene Zielsequenzen in derselben PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Die Multiplex-PCR wurde in 50 µl Gesamtvolumen unter Verwendung von 25 µl 2x HotStarTaqTM Master Mix (Qiagen) in einem Thermocycler (9700 GeneAmp PCR System mit Goldblock, Applied Biosystems) durchgeführt.

Multiplex-PCR Mastermix (je 50 µl Reaktionsvolumen, davon 5 µl *Template*):

25 µl 2x HotStarTaq Master Mix*

1 µl je Primerpaar (*Forward & Reverse* gemischt, je 50 pmol/µl = 50 µM)

mit Wasser auf 45 µl aufgefüllt

*enthält HotStarTaq DNA Polymerase (finale Konzentration 0,01-0,1 U), PCR Puffer mit 3 mM MgCl₂, 400 mM je dNTP.

PCR-Programm Multiplex-PCR:

95°C – 15 min (zum Aktivieren der HotStarTaq-Polymerase)
 94°C – 30 sek }
 58°C – 1 min } 35 Zyklen
 72°C – 3 min }
 72°C – 7 min
 4°C - ∞

Die PCR-Produkte der Multiplex-PCR dienen als *Template* für nachfolgende Nested-PCR-Reaktionen. In einer Nested-PCR wird jeweils ein Primerpaar verwendet, welches innerhalb der jeweiligen Zielsequenz des 1. Primerpaares aus der Multiplex-PCR liegt. Die Nested PCR wurde in 25 µl Gesamtvolumen unter Verwendung von 12,5 µl 2x ReadyMix™ redtaq™ PCR reaction mix mit 3 mM MgCl₂ (Sigma) in einem Thermocycler (9700 GeneAmp PCR System mit Goldblock, Applied Biosystems) durchgeführt.

Nested-PCR Mastermix (je 25 µl Reaktionsvolumen, davon 1 µl *Template*):

12,5 µl 2x ReadyMix™ redtaq™ PCR reaction mix *
 0,5 µl je Primerpaar (*Forward & Reverse* gemischt, je 50 pmol/µl = 50 µM)
 mit Wasser auf 24 µl aufgefüllt

* genaue Konzentrationen der Inhaltsstoffe von Sigma nicht genannt.

PCR-Programm Nested-PCR:

94°C – 3 min
 94°C – 30 sek }
 59°C – 1 min } 35 Zyklen
 72°C – 1 min }
 72°C – 7 min
 4°C - ∞

2.2.4.7b Agarose-Gelelektrophorese

Durch Anlegen einer Spannung (5 V/cm-Agarosegellaufänge) werden die DNA-Proben mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. DNA-Moleküle sind negativ geladen und wandern zur Anode, wobei kleine DNA-Fragmente schneller durch die Poren des Agarosegels gelangen als größere Fragmente. Das im Gel enthaltene Ethidium-Bromid (EtBr) interkaliert in die DNA-Stränge und kann später unter UV-Licht sichtbar gemacht

werden (Lottspeich and Zorbas, 1998). Die Zuordnung der Fragmentgrößen erfolgte mit Hilfe des Größenmarkers.

Die PCR-Produkte der Nested-PCR-Reaktionen wurden entsprechend ihrer Größe mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Zur Auftrennung diente i.d.R. ein 2 %iges Agarosegel aus 2 % Agarose in 1x TAE-Puffer und Zusatz von EtBr (1 ng/ml-Agarosegel) angefertigt.

Nested-PCR-Proben (*loading dye* bereits im ReadyMix™ redtaq™ PCR reaction mix (Sigma) enthalten) und zusätzlich ein Größenmarker (100 bp Leiter mit *loading dye* (Fermentas)) wurden auf das Gel aufgetragen. Nach Auftrennung wurde das Gel in einer Geldokumentationskammer (Biodoc, Biometra) mit UV (312 nm Wellenlänge) angeregt und fotografiert.

2.2.4.7c Quantitative *real-time* PCR

Für die quantitative *real-time* PCR-Reaktionen wurde eine *real-time* qPCR-Maschine GeneAmp 7900HT (Applied Biosystems) in Kombination mit einem 96-well-Block gemäß Herstellerangaben benutzt (Abb. 17). Mit einem Einsatz an einem Schwenkarm des Platten-Handling-Systems wird eine 96-well-Platte in das Probenblock Modul eingefahren. Über einen Laser erfolgte die Anregung und über ein optisches System das Auslesen der Fluoreszenzsignale der qPCR und die Aufzeichnung in *real-time*. Zur Steuerung diente die SDS-Software (Version 2.3), mit welcher das Gerät programmiert, die Daten verarbeitet und analysiert wurden konnten.

Alle *real-time* qPCR Reaktionen (Assays) wiesen aufgrund des chemischen Sondendesigns (z.B. TaqMan-Prinzip) oder des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs (SYBRgreen-Prinzip) eine basale Hintergrundfluoreszenz auf. Zur Trennung der Hintergrundfluoreszenz von der amplifikationsspezifischen Fluoreszenz wurde der Wert für die Basalfluoreszenz aus den initialen Zyklen jeder Reaktion bestimmt (*Baseline Value*). Für TaqMan-Assays wurde hierzu eine *Baseline* von Zyklus 3 bis Zyklus 15 verwendet, für miScript SYBRgreen-Assays von Zyklus 1 bis Zyklus 5.

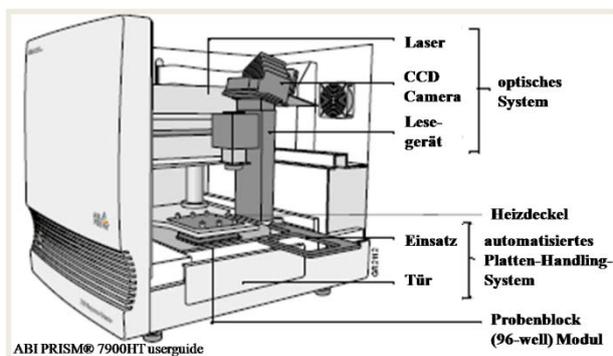


Abbildung 17 – Schematische Darstellung der *real-time* qPCR Maschine GeneAmp 7900 HT. Die qPCR-Reaktion findet im 96-well Probenblock statt. Mit Hilfe eines 488 nm Argon-Ionenlasers werden die Proben angeregt und die resultierenden Signale von einer CCD (ladungsträgergekoppelte Schaltung, engl. *charge-coupled device*) Kamera aufgenommen (ins Deutsche übersetzte Abbildung aus dem ABI PRISM® 7900HT userguide).

Eine Amplifikation während der *real-time* qPCR ist messbar, wenn ein Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal signifikant überstieg. Für jeden Assay wurde ein entsprechender Schwellenwert (*threshold*) gesetzt, an den sich alle amplifizierten Proben in der exponentiellen Amplifikationsphase befanden und die Fluoreszenzsignale signifikant über dem Hintergrundsignal lagen.

2.2.4.7c-1 Sondenspezifische Detektion

Das TaqMan-Prinzip der drei Oligonukleotide; zwei Primer und eine Sonde, die innerhalb der Zielsequenz zwischen den Primern bindet (Applied Biosystems bzw. Metabion), basiert auf Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-(FRET)-Quenching, wobei sequenzspezifische Sonden, bestehend aus einem Oligonukleotid, das mit einem Fluoreszenzreporter (FAM, Phosphoramidit-Derivat von 6-Carboxyfluorescein) am 5'-Phosphat-Ende und einem entsprechenden nichtfluoreszierenden Quencher (BHQ, *black hole quencher*) am 3'-OH-Ende, der das Fluoreszenzsignal des Reporters durch die räumliche Nähe unterdrückt (FRET-Quenching). Ungequenchtetes FAM emittiert Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 522$ nm nach Anregung durch die Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494$ nm. Zusätzlich ist am 3'-OH-Ende der Sonde ein *minor groove binder* (MGB) lokalisiert, der es ermöglicht, kürzere Sonden zu designen, die dennoch an die Zielsequenz stabil binden. Kürzere Sonden sind von Vorteil, um die Amplikonlänge kurz zu halten.

Die Sonde ist so gewählt, dass diese innerhalb der amplifizierten Zielsequenz zwischen den beiden PCR-Primern bindet. Während der Elongation wird die gebundene Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der HotStarTaq-DNA-Polymerase (Qiagen) abgebaut, wodurch die physikalische Verbindung und räumliche Nähe von Quencher und Fluoreszenzreporter aufgehoben und das Fluoreszenzsignal des Reporters detektierbar wird. Das Fluoreszenzsignal des Reporters ist somit proportional zum PCR-Amplifikat (Abb. 18).

Alle sondenbasierten *real-time* qPCR-Reaktionen in der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung des QuantiTectTM Probe PCR Master Mix (Qiagen) durchgeführt. Dieser Mix enthält außer Primern (0,5 μ M), Probe (0,2 μ M) und *Template*-DNA: qPCR-Puffer (enthält TrisCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgCl₂, pH 8.7), Nukleotide (dNTPs: dATPs, dCTPs, dGTPs & dUTPs), HotStarTaq DNA Polymerase und ROXTM als passiven Referenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz während der qPCR-Reaktion passiv abnimmt und als Referenz für den entsprechenden passiven Fluoreszenzabfall der TaqMan-Sonden zur Berechnung der *Baseline*-Korrektur dient.

Das finale Reaktionsvolumen betrug 20 μl . Die 96-well-Platte mit den *real-time* qPCR-Reaktionsansätzen wurde vor Eingabe in das 7900 HT-Gerät 2 min bei 2500 rpm bei 4°C zentrifugiert.

real-time qPCR-Mastermix (je 20 μl Reaktionsvolumen für TaqMan, davon 5 μl *Template*):

- 10 μl 2x QuantiTect Probe qPCR Master Mix*
- 1 μl 20x Primer Probe Mix**
- 4 μl Wasser

*genaue Konzentrationen der Inhaltsstoffe von Qiagen nicht genannt.

**genaue Konzentration von Applied Biosystems nicht genannt.

real-time qPCR-Mastermix (je 20 μl Reaktionsvolumen für TaqMan, Primer und Probe getrennt von Metabion, davon 5 μl *Template*):

- 10 μl 2x QuantiTect Probe qPCR Master Mix*
- 1 μl je Primer (10 pmol/ μl = 10 μM) -> Endkonzentration 0,5 μM
- 0,5 μl Probe (10 pmol/ μl = 10 μM) -> Endkonzentration 0,25 μM
- 2,5 μl Wasser

*genaue Konzentrationen der Inhaltsstoffe von Qiagen nicht genannt.

TaqMan *real-time* qPCR-Programm:

- 60°C – 2 min
 - 95°C – 15 min
 - 94°C – 15 sek
 - 60°C – 1 min
- } 50 Zyklen

2.2.4.7c-2 Fluoreszenzdetektion mittels SYBRgreen *real-time* PCR

Das Prinzip der quantitativen *real-time* SYBRgreen-PCR basiert auf dem Zusatz des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBRgreen in jeder PCR-Reaktion. Der Interkalator bindet an doppelsträngige DNA und bildet mit dieser einen Komplex, der durch Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 494 \text{ nm}$ angeregt werden kann und Licht bei $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ emittiert. Das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs SYBRgreen ist proportional zur Menge des Amplikons (Abb. 18).

Aufgrund der kurzen Basensequenz der miRNAs von weniger als 25 Nukleotiden ist die Primer-Probe basierende TaqMan *real-time* PCR zur Quantifizierung nicht direkt möglich. In

der vorliegenden Arbeit wurde eine flexible Variante (miScript Kit, Qiagen) verwendet. Mit Hilfe spezieller Universalprimer (Firmengeheimnis Qiagen) und sequenzspezifischer miRNA-Primer kann nach cDNA-Synthese jede beliebige miRNA einer Probe mittels SYBRgreen qPCR quantifiziert werden.

Alle SYBRgreen *real-time* qPCR-Reaktionen der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung des QuantiTect™ SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, DE) durchgeführt. Dieser Mix enthielt (außer Primern (0,3 µM) und 5 µl *Template*-DNA): qPCR-Puffer (enthält TrisCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgCl₂, pH 8.7), Nukleotide (dNTPs: dATPs, dCTPs, dGTPs & dUTPs), HotStarTaq DNA Polymerase, SYBR Green I Farbstoff und ROX™ als passiven Referenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz während der qPCR-Reaktion passiv abnimmt und als Referenz für den entsprechenden passiven Fluoreszenzabfall des SYBRgreens zur Berechnung der *Baseline*-Korrektur dient.

Das finale Reaktionsvolumen betrug stets 25 µl. Die 96-well-Platte mit den *real-time* qPCR-Reaktionsansätzen wurde vor Eingabe in das 7900 HT-Gerät 2 min bei 2500 rpm bei 4°C zentrifugiert.

real-time qPCR-Mastermix (je 25 µl Reaktionsvolumen für SYBRgreen, davon 5 µl *Template*):

12,5 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*
 1,25 µl je Primer (6 pmol/µl = 6 µM) -> Endkonzentration 0,3 µM
 5 µl Wasser

*genaue Konzentrationen der Inhaltsstoffe von Qiagen nicht genannt.

PCR-Programm SYBRgreen-PCR:

| | | |
|------------------------|---|-----------|
| 95°C – 15 min | } | 50 Zyklen |
| 94°C – 15 sek | | |
| x°C – 30 sek | | |
| 72°C – 30 sek | | |
| y°C – 15 sek | | |
| Schmelzkurvenanalyse** | | |

Annealing-Temperatur x und Temperatur zum Auslesen des Fluoreszenzsignals y (4. Segment) sind primerspezifisch und der Tabellen 13 der verwendeten SYBRgreen Primer zu entnehmen.

real-time qPCR-Mastermix (je 25 µl Reaktionsvolumen für SYBRgreen miScript Kit, davon 5 µl *Template*):

- 12,5 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*
- 2,5 µl miScript Universal Primer*
- 2,5 µl 10x miScript Assay (in 1x Tris-EDTA, pH 8)*
- 2,5 µl Wasser

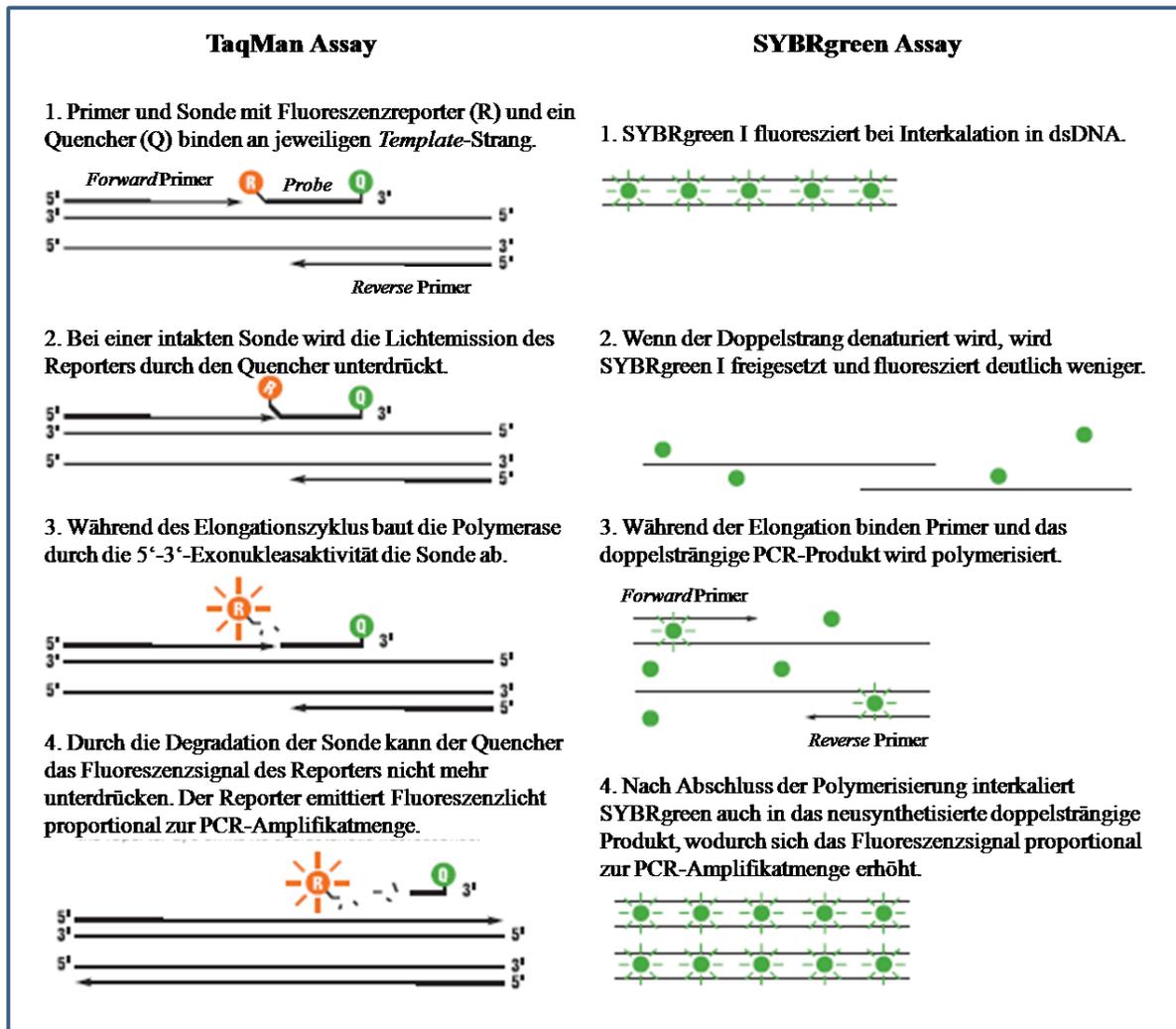
*genaue Konzentrationen der Inhaltsstoffe von Qiagen nicht genannt.

PCR-Programm miScript SYBRgreen-PCR (miR-133a/b):

- 95°C – 15 min
 - 94°C – 15 sek
 - 55°C – 30 sek
 - 70°C – 30 sek
 - 73°C – 15 sek
- } 50 Zyklen
- Schmelzkurvenanalyse**

** Im Anschluss an die SYBRgreen qPCR-Reaktionen wurde eine Schmelzkurvenanalyse gemacht. Dazu wurden die PCR-Produkte für 15 s bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die Temperatur für 15 s auf 60°C gebracht und kontinuierlich (1°C alle 15 s) auf 95°C unter Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals erhöht.

Die Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Temperatur gab Aufschluss über die Denaturierungstemperatur der PCR-Produkte und damit über das Vorhandensein möglicher PCR-Nebenprodukte oder Primer-Dimere. In Abhängigkeit der Schmelzkurvenanalyse wurde die optimale Temperatur zum Auslesen des Fluoreszenzsignals bestimmt. Zusätzlich wurden die SYBRgreen-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese auf korrekte Produktlänge überprüft.

Abbildung 18 – Prinzipien der *real-time* qPCR.

Links das Prinzip der Fluoreszenzsignalentstehung des sondenbasierten TaqMan-Assays (Sonde mit Fluoreszenzreporter R an 5'-Ende und Quencher Q am 3'-Ende der Sonde), rechts das Prinzip der Fluoreszenzsignalentstehung von SYBRgreen-Assays (SYBRgreen I Interkalator). (verändert nach: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/portal/documents/web_content/cms_052221.png).

2.3 Datenverarbeitung, Datenanalyse und Statistik

2.3.1 Primerdesign mit Oligo 6

Zum Design der Primer für SYBRgreen qPCR wurde die Oligo 6 Primer Analysis Software (Version 6.71, Medprobe Oslo, N) eingesetzt. Die Software ermöglicht das Einlesen von Sequenzen im FASTA- oder Genbank-Format und die manuelle Angabe von Primerkriterien in Form von gewünschter Position, Amplikonlänge, *Annealing*-Temperatur, Amplikonschmelztemperatur und weiterer Parameter (maximale Länge und Energie von Primerdimeren, 3'-Stabilität, keine Dimere an 3', GC-Klammer Stabilität, maximale Schleifen- und *Hairpin*-Bildungsenergie, maximale Falschprimingeffizienz, minimale Konsensusprimingeffizienz, Homologieeigenschaften, maximale nt-Repeat-Anzahl). Alle

Parameter können separat angepasst oder stufenweise (*Very High, High, Moderate, Fair, Low* und *Very Low*) orchestriert geändert werden. Es können homologe Sequenzen zum Ausschluss oder zum Design von Alignment-Primern angegeben werden.

Das Programm diente zum Design von sequenzdiskriminierenden SYBRgreen qPCR Girk-Primern für die murinen Girk-Kanäle 1-4 im Rahmen eines Kooperationsprojekts (vgl. 3.2.2.1) mit Prof. Rafael Luján (Institut für Medizinwissenschaften, Universität Castilla-La Mancha, Campus Biosanitario, Albacete, Spanien). Die Primer sind in Tabelle 8 und die *Annealing*-Temperatur und Standardkurvendaten in Tabelle 13 aufgeführt.

2.3.2 Auswertung von *real-time* qPCR Daten

Die SDS-Software (Version 2.1, Applied Biosystems) lieferte von jeder PCR-Reaktion absolute Fluoreszenzdaten R_n , bzw. ΔR_n (normalisiert zu ROX) und diente zur Darstellung und zum Auslesen der Daten. Die Auswertung von *real-time* qPCR Daten von TaqMan-Assays erfolgte in folgenden Schritten:

- 1.) R_n - & ΔR_n -Analyse der Plots (*signal to noise ratio*)
- 2.) Setzen der Basislinie (*baseline*)
- 3.) Identifikation der exponentiellen Phase und Setzen der *threshold*-Linie
- 4.) Assayperformance-Test mittels Generation und Analyse von Standardkurven aus 10fach seriell verdünnter cDNA (Steigung & Reproduzierbarkeit)
- 5.) Statistische Analysen (Mittelwerte, SEM, Signifikanztests, ANOVA)

2.3.2.1 Verwendete Standards und Standardkurven

Für die Vergleichbarkeit der Daten war es notwendig, diese auf einheitliche Standards zu beziehen.

Alle humanen Daten (bis auf die miR-133b) wurden auf einen Standard bezogen, der aus Verdünnungen in Zehnerschritten von SN cDNA bestand. Diese cDNA wurde aus totaler humaner SN-Gewebe RNA (Cat# AM6866, 1 mg/ml, pH 6.4, RIN 6.3, Ambion) mit Hilfe von random Hexameren synthetisiert. Als Standard für den miR-133b Assay wurde mit Hilfe des miScript RT Systems cDNA aus Universal human RNA (Cat# 750700, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Stratagene) synthetisiert.

Für murine Analysen wurde RNA aus Mittelhirngewebe von 3 Wochen alten Mäusen isoliert und diese mit random Hexameren in cDNA umgeschrieben.

2.3.2.2 Assayperformance-Analysen

Zunächst wurden die R_n- und ΔR_n-Daten linear gegen die PCR-Zyklusanzahl aufgetragen und beurteilt, ob die Signalstärke der Fluoreszenz im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz (*signal to noise ratio*) homogen und hinreichend für weitere Analysen war. Der Fluoreszenzunterschied gibt Auskunft über Hintergrund- und Sondenlabel- bzw. SYBRgreen-spezifische Signale. Dabei wurde empirisch beobachtet, dass bei absoluten Fluoreszenzunterschieden von mind. 4 R_n eine exponentielle Phase zu finden und sinnvolle Auswertungen möglich waren. Dann wurden die Zyklen für die *Baseline*-Korrektur festgelegt. Bei SYBRgreen-Reaktionen wurde weiterhin die Schmelzkurve (engl. *dissociation curve*) analysiert und Proben mit Nebenprodukten eliminiert.

Die ΔR_n-Daten wurden logarithmisch gegen die PCR-Zyklusanzahl aufgetragen, um die exponentielle Phase der PCR-Reaktion zu erfüllen, in der alle PCR-Kurven eine möglichst identische Steigung aufwiesen. In die exponentielle Phase wurde eine Schwellenwertlinie (engl. *threshold line*, im Folgenden kurz als *threshold* bezeichnet) gelegt, anhand der R_n-Daten kontrolliert und die Schnittpunkte mit dieser Linie jedes individuellen ΔR_n-Fluoreszenzplots als Ct-Wert (Ct = „*cycle at threshold*“) der betreffenden Probe ausgelesen (Abb. 19). Diese Ct-Werte wurden für statistische Analysen und zur Berechnung der relativen Expression bezogen auf einen gemeinsamen Standard verwendet.

Die ideale Steigung von -3,32 der Standardkurven aus 10fach stufenweiser, seriell verdünnter cDNA ergibt sich aus der Formel für die Effizienz *real-time* qPCRs (Tichopad et al., 2010): Effizienz E = seriellen Verdünnungsfaktor^{-1/Steigung}-1. Bei 100 % Effizienz und einem seriellen Verdünnungsfaktor von 10 ergibt sich: $1 = 10^{-1/Steigung} - 1$ und somit eine ideale Steigung von etwa -3,32. Anhand dieser Steigung lassen sich Aussagen über den Verlauf der qPCR-Reaktion machen (Liss, 2002).

Als Minimalanforderung der Performance an einen hinreichend guten Assay galt mindestens eine erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz aus drei hinreichend hohen 10er-Verdünnungsstufen des verwendeten Standards, eine Steigung der Standardgeraden von -3,32 ± 0,1, ein absoluter Fluoreszenzunterschied (*signal to noise ratio*) von mind. 4 R_n und eine robuste Reproduzierbarkeit der Standardkurven ohne signifikante Abweichungen der Ct-Werte (< 0,3 Ct) einzelner Verdünnungsstufen. Bei Abweichungen von mehr als 0,1 in der Steigung, mehr als 0,3 Ct des *Y-Intercept* oder unzureichendem R² (< 99 %) wurde mindestens eine weitere Verdünnungsreihe in Duplikaten pipettiert, um Pipettierfehler auszuschließen. SYBRgreen Assays sollten zudem nach Schmelzkurvenanalyse frei von Nebenprodukten und Primerdimeren sein.

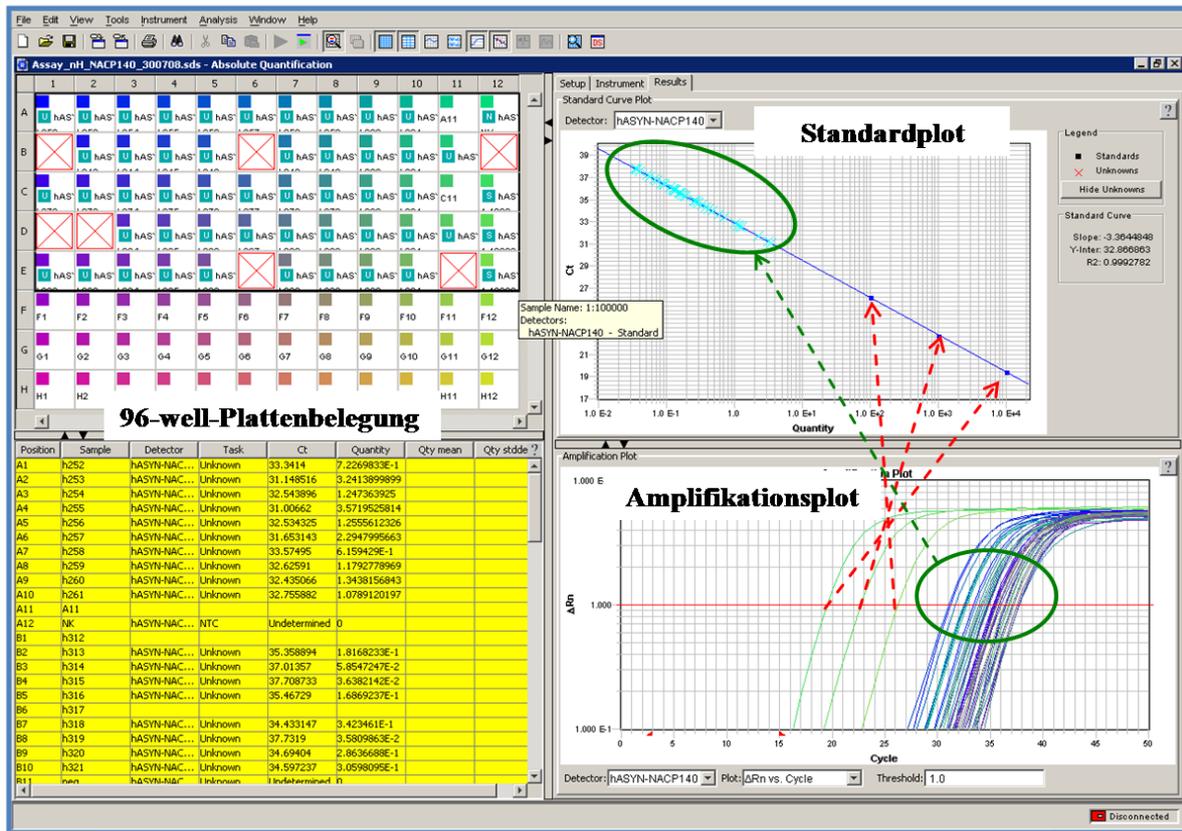


Abbildung 19 – Ct-Werte und Standardkurve von humanem α -Synuclein.

Beispiel-Screenshot der SDS-Software nach *real-time* qPCR Lauf laserdissektierter Zellen und SN cDNA Standard in einer 96-well Platte. In der 96-well-Plattenbelegung (links) werden den wells der 96-well-Platte (links oben) Probennummern, Standardverdünnungsstufen in μ g und Detektoren zugewiesen. Die Belegung der Platte und die Messergebnisse werden zudem tabellarisch angegeben (links, unten). Im Amplifikationsplot werden Fluoreszenzsignale gegen Zyklen aufgetragen und ein *threshold* bestimmt (rote Linie). Anhand der Standardverdünnungen wird eine Standardkurve (Ct gegen Quantität) generiert (rote Pfeile) und die Proben entsprechend aufgetragen (grüne Pfeile).

Bemerkung: Diese Beispielstandardkurven dienen der einfachen Visualisierung; i.d.R. sollen die Verdünnungen der Standardkurven immer das Spektrum der Proben abdecken.

Erfüllte ein Assay die Kriterien nicht, wurde dieser i.d.R. nicht für Einzelzell-Genexpressionsanalysen eingesetzt. Wenn möglich, wurde die Zielsequenz auf einen anderen Exon-Exon-Übergang desselben Gens verlegt, um eventuell eine bessere Performance für ein Gen zu erreichen. Einige Assays, wie z.B. splicevariantenspezifische Assays, mussten trotz unzureichender Performance verwendet werden, da keine andere Designmöglichkeit gegeben war (z.B. NACP126-Splicevariante von α -Synuclein).

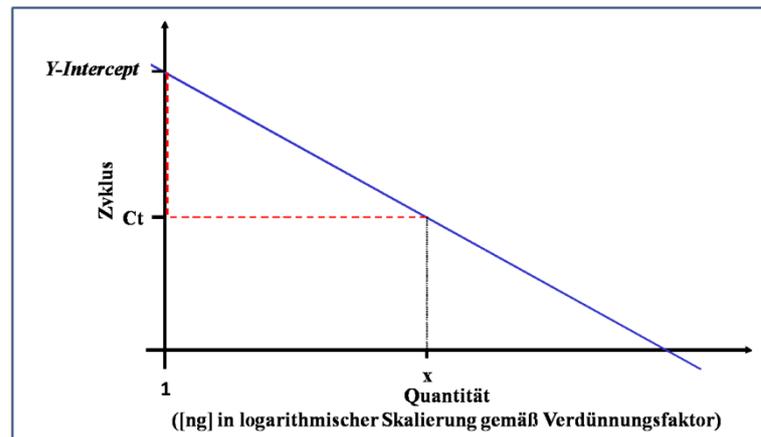
2.3.2.3 Berechnung der relativen Quantität aus *real-time* qPCR-Daten

Aus den Ct-Werten der UV-LMD-Proben und der realen Steigung, sowie dem Y-Achsenabschnitt einer entsprechend geeigneten Standardkurve (cDNA aus Gewebe), konnte die relative Quantität der Probe berechnet werden.

Aus dem Steigungsdreieck und der Geradengleichung mit der X-Achse in logarithmischer Skalierung ergibt sich die Formel: $Ct = \text{Steigung} * x + Ct_{\text{max}}$, wobei x die gesuchte relative

Quantität der Probe (in Bezug auf den verwendeten Standard), Ct der zu x gehörende Ct-Wert, Steigung die Steigung der Standardgeraden und Ctmax der maximale Ct-Wert bzw. der Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse (*Y-Intercept*) ist (Abb. 20). Steigung, *Y-Intercept* und Ct-Werte liefert die SDS-Software. Um die relative Quantität der Probe zu bestimmen, wurde daher die Geradengleichung nach x aufgelöst: $x = \text{relative Quantität} = (\text{Ct} - \text{Ctmax}) / \text{Steigung}$.

Abbildung 20 –
Quantitätsberechnung anhand
einer Standardreihe.
 Anhand der Standardkurve und den bekannten Parametern Steigung, Ctmax (*Y-Intercept*) und Ct der Probe kann die Quantität gegenüber dem verwendeten Standard über das Steigungsdreieck berechnet werden (Details siehe Text).



Da die Auftragung der X-Achse in Abhängigkeit des seriellen Verdünnungsfaktors logarithmisch ist, musste die Formel entlogarithmiert (hier zur Basis 10, s.u.) und umgestellt werden. Daraus ergibt sich die relative Expression die Formel:

$$x = \text{relative Quantität} = \frac{\text{Ct} - \text{Y-Intercept}}{\text{Steigung}} \cdot \frac{\text{seriellen Verdünnungsfaktor}}{\text{Zellzahl} * \text{Zellverdünnung}}$$

Das Entlogarithmieren bezieht sich auf den seriellen Verdünnungsfaktor. In der vorliegenden Arbeit wurden zehnfach Verdünnungsstufen verwendet, daher wurde zur Basis 10 entlogarithmiert. Die Zellzahl entspricht in der vorliegenden Arbeit i.d.R. 15 und die Zellverdünnung 5 µl Volumen in der real-time qPCR aus 55 µl Gesamtvolumen:

$$x = \text{relative Quantität} = \frac{\text{Ct} - \text{Y-Intercept}}{\text{Steigung}} \cdot \frac{10}{1,36}$$

Die Einheit der relativen Quantität entspricht der des cDNA-Standards (pg Äquivalent zur Standard-cDNA pro Zelle oder pg \equiv zu Standard/Zelle).

2.3.2.4 Berechnung der Relation und *fold difference* aus *real-time* qPCR Daten

Zur Berechnung der relativen Expression aus Ct-Werten von Gewebe wurden die Daten mit der $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Methode auf β -Actin normalisiert. Dazu wurde vom gemessenen Ct-Wert der Ct-

Wert von β -Actin abgezogen ($\Delta Ct = Ct(\text{Gen}) - Ct(\beta\text{-Actin})$) und der erhaltene Wert als Potenz der Basis zwei entlogarithmisiert (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008).

Zur Berechnung der relativen Expression von Gesamtgewebe wurden die Daten auf β -Actin normalisiert. Dazu wurde das Verhältnis der relativen Expression nach obiger Formel ins Verhältnis zur relativen Expression des Haushaltsgens (β -Actin) gesetzt, indem die relativen Expressionen durcheinander geteilt wurden. Dies bezog die Steigung mit ein und berücksichtigte somit die Assayperformance. Analog berechnete sich die *fold difference*, die Veränderung eines Gens gemessen als Vielfaches eines anderen Gens.

2.3.3 Datenanalyse und Software für die Datenanalyse (Excel und R)

Für statistische Analysen wurden Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA, Version 10.6856.6858 SP3), sowie die statistische Programmiersprache R (*open source*, <http://www.r-project.org/>, Version 2.8.1) mit dem Statistikpaket coin (*Conditional Inference Procedures in a Permutation Test Framework*, Version 1.0-10) und selbstprogrammierte R-Routinen verwendet.

Datenanalysen von Messreihen wie Mehrfachmessungen von Konzentrationen, RIN-Werten und Ct-Werten erfolgten, indem Mittelwerte (M_w , arithmetisches Mittel), Standardabweichung (Sd, engl. *Standard Deviation*), Standardfehler (SEM, engl. *Standard Error of the Mean*), p-Werte aus F-Test (Fisher-Test) und geeignetem T-Test (Student's T-Test) bzw. Wilcoxon-Rank-Test (mit Programmiersprache R) ermittelt wurden.

Die Nullhypothese nach Signifikanztest wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ zurückgewiesen. In den Abbildungen wurden p-Werte wie folgt gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant ($p \geq 0,05$); *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ und ***: $p < 0,001$. Signifikante Unterschiede zwischen Datengruppen wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA (*Analysis Of Variance*) betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Qualitätskontrolle des humanen Hirngewebes

Das vorwiegend humane Ausgangsmaterial wurde zunächst makroskopisch, histologisch und morphologisch charakterisiert und die zugehörigen, relevanten und bekannten Daten des Spendermaterials und Informationen zu den Spendern zusammengetragen. Des Weiteren wurden der pH-Wert des Gewebes, sowie die RNA-Integrität und der Anteil an kurzen RNAs (6-150 nt) bestimmt. Nach dieser sorgfältigen Begutachtung wurden die Proben lasermikrodissektiert und im Anschluss die Genexpression individueller NM- und TH-positiver SN Neurone untersucht.

Zur Dokumentation wurden alle Gewebestücke vor und nach dem Trimmen am Gefriermikrotom und während der Lasermikrodissektion digital fotografiert und dokumentiert. Die Abbildungen 21 und 22 zeigen beispielhaft die Charakterisierung für einen Mittelhirnblock eines Kontrollgewebestücks (K-SN 9, Abb. 21), sowie eines PD-Gewebestücks (PD-SN 1, Abb. 22). Zusammenstellungen aller Gewebestücke befinden sich im Anhang.

Das Hirnmaterial mit den Nummern K-SN 1, K-SN 2, K-SN 3, K-SN 4, K-SN 5, K-SN 6, PD-SN 1, PD-SN 2, PD-SN 3, PD-SN 4 und PD-SN 5 lag zu Beginn der Arbeit bereits kryoasserviert vor und wurde schon von Jan Gründemann beschrieben und eingesetzt (Gründemann, 2006; Ramirez et al., 2006). Im Laufe der Studien wurden weitere Kontrollgewebeproben bereitgestellt (Prof. Dietmar Thal, Sektion Neuropathologie am Institut für Pathologie, Universität Ulm) und in die Studien aufgenommen (K-SN 7, K-SN 8, K-SN 9 (Abb. 21) und K-SN 10; Tab. 11).

Das Kontrollmittelhirnkollektiv setzte sich aus *post-mortem* Gewebe von fünf weiblichen und fünf männlichen Spendern zusammen. Die fünf PD-Gewebeproben stammten von drei männlichen und zwei weiblichen Spendern (Tab. 10 & 11).

Die Kontrollprobe K-SN 9 (Abb. 21) zeigt die typischen Eigenschaften von *post-mortem* SN Kontrollproben. In der Makroskopie ist deutlich die dunkle SN-Struktur zu erkennen. Im histologischen Überblick sind mikroskopisch rissige Strukturen im Bereich der SN und ein allgemein hoher Anteil von Mikrorissen in höheren Vergrößerungen zu erkennen (Abb. 21 & 32). Diese rissigen Strukturen erschwerten bei einigen Proben die anatomische Orientierung und Differenzierung distinkter Subpopulationen wie beispielsweise die Unterscheidung zwischen SNpc *dorsalis* und *ventralis*. Die Zellmorphologie in höheren Vergrößerungen NM-

positiver SN Neurone des humanen Gewebes der Kontroll- und PD-Gruppe erlaubte definierte, eindeutige Zellabgrenzungen in allen Proben.

Die Zellen einzelner NM-positiver Neurone im Bereich der medialen SN variierten stark in Form (rundlich bis sehr langgestreckt), Neuromelaningehalt (wenig bis vollständig gefüllt) und in ihrer Größe (Kontrollen ϕ : $1027 \pm 23 \mu\text{m}^2$ und PD ϕ : $1085 \pm 29 \mu\text{m}^2$; $p = 0,17$ (T-Test); n Kontrollen = 1170, n PD = 531).

Aufgrund der Degeneration der NM-positiven Neurone war insbesondere in den PD-Proben die Unterscheidung dorsaler und ventraler SN kaum möglich. Im medialen SN-Bereich wiesen die PD-Proben NM-positive Neurone in vergleichbaren Größen zu den Kontrollzellen auf.

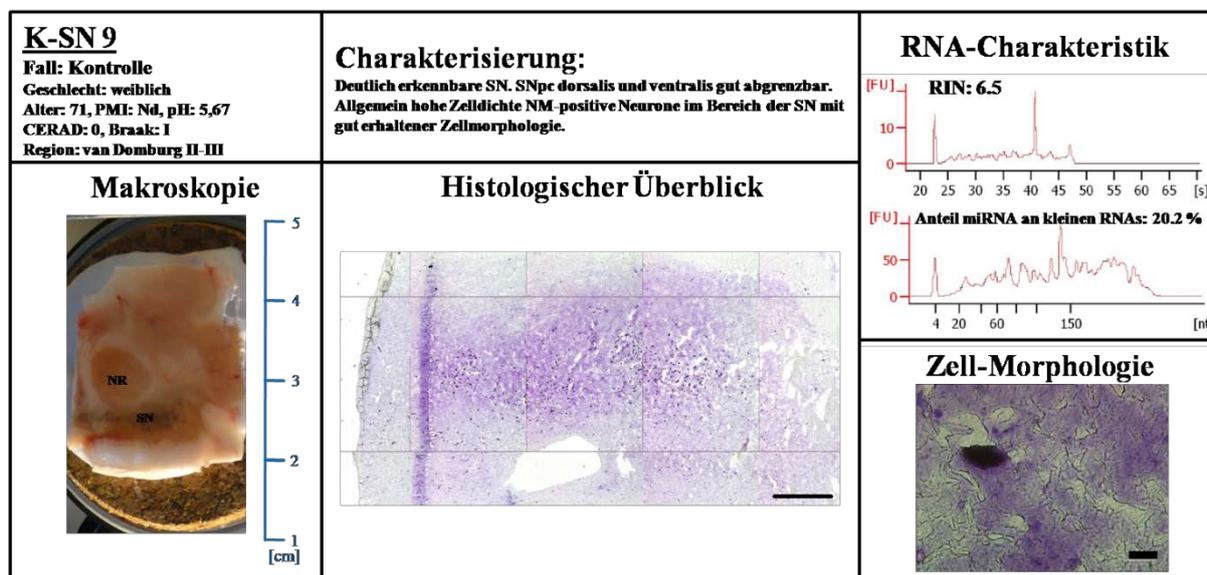


Abbildung 21 – Übersicht des humanen Mittelhirngewebeblocks der Kontrollprobe K-SN 9. Beispielhafte Zusammenfassung der erfassten Eigenschaften der Gewebeprobe K-SN 9. Der Größenbalken des histologischen Überblicks entspricht $1000 \mu\text{m}$, der der Zellmorphologie $25 \mu\text{m}$. Unter RNA-Charakteristik ist die RIN, welche Aufschluss über die RNA-Qualität gibt, und der miRNA-Anteil an kleinen RNAs mit dazugehörigen Elektropherogrammen dargestellt. (SN - *Substantia Nigra*, NR – *Nucleus Ruber*, PMI – *post-mortem Index*, pH – *pondus hydrogenii*, CERAD – *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*, FU – *Fluoreszenzeinheiten*, nt – *Nukleotide*, s – *Sekunden*)

Die Kontrollgewebeprobe (K-SN 10) wies vergleichbare Makroskopie, Histologie, Zellmorphologie und RNA-Qualität auf (Tab. 10 & 11), wurde jedoch aufgrund stark abweichender Genexpressionsdaten im Vergleich zu anderen Kontrollen nicht in die Genexpressionsstudien einbezogen.

Anhand der Probe PD-SN 1 sind in Abbildung 22 die typischen Eigenschaften von *post-mortem* SN PD-Gewebeproben dargestellt. In der Makroskopie war die Degeneration NM-positiven Neuronen anhand der im Vergleich zu den Kontrollen schwächer pigmentierten SN zu erkennen. Der Anteil an NM-positiven Neuronen im Bereich der SN in den histologischen

Übersichten und das Auftreten von Mikrorissen bei höheren Vergrößerungen waren hier im Vergleich zu Kontrollen deutlich geringer.

Während der Isolation individueller NM-positiver Mittelhirnneurone wurde versucht, mediale SN Neurone mit Hilfe der UV-LMD zu sammeln und dabei darauf geachtet, dass, soweit möglich, in vergleichbaren Regionen wie bei den Kontrollen gesammelt wurde. Des Weiteren wurden nur intakt wirkende, NM-positive Neurone mit definiertem Zellrand dissektiert.

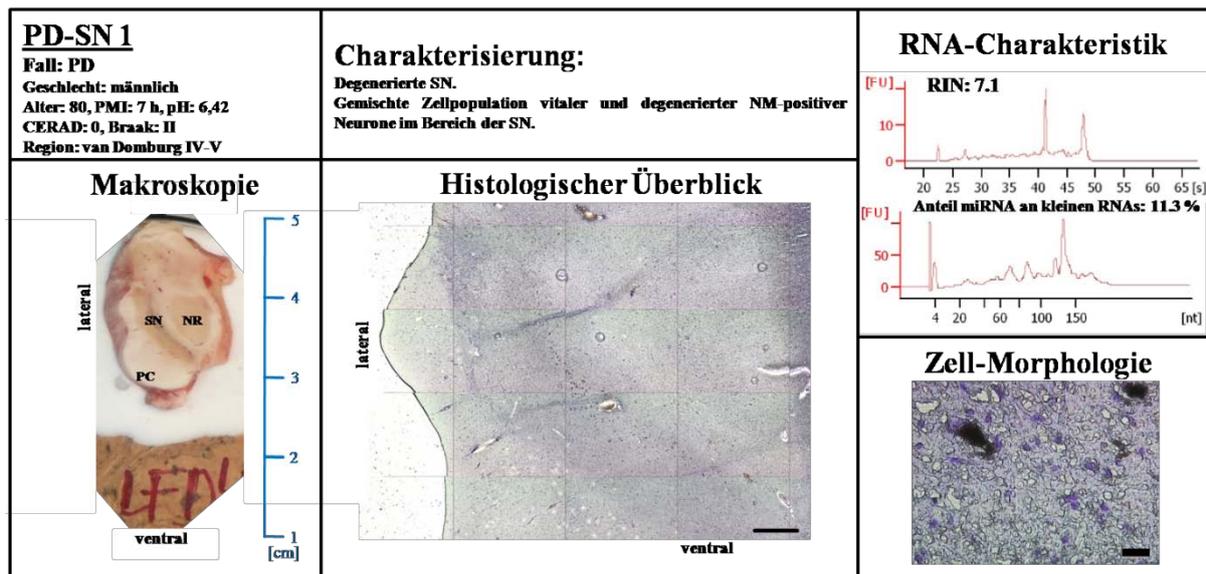


Abbildung 22 – Übersicht des humanen Mittelhirngewebeblocks der PD-Probe PD-SN 1.

Zusammenfassung der erfassten Eigenschaften der Gewebeprobe PD-SN 1. Der Größenbalken des histologischen Überblicks entspricht 1000 μm , der der Zellmorphologie 25 μm . Unter RNA-Charakteristik sind die RIN, welche Aufschluss über die RNA-Qualität gibt, und der miRNA-Anteil an kleinen RNAs mit dazugehörigen Elektropherogrammen dargestellt. (SN - *Substantia Nigra*, NR – *Nucleus Ruber*, PC - Hirnschenkel, PMI – *post-mortem Index*, pH – *pondus hydrogenii*, CERAD – *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* FU – *Fluoreszenzeinheiten*, nt – *Nukleotide*, s - *Sekunden*)

In Tabelle 10 sind alle erfassten Informationen über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mittelhirngewebe zusammengestellt (Spenderalter, PMI, CERAD- und Braak-Stadium und van Domburg Region). Ferner ist angegeben, ob es sich um einen Kontroll- oder PD-Fall handelt. Weiterhin sind Ergebnisse der pH-Wert-Bestimmung und RNA-Qualitätsbestimmung in Form von RIN und miRNA-Anteil an *small RNAs* angegeben (Tab. 11, Abb. 21 & 22). Von den Kontrollproben wurden für die Mittelwert- und Signifikanzbestimmungen der Daten aus den Tabellen 11 (Einzelwerte) und 12 (Mittelwerte), sowie in Abbildung 23 die Kontrollgewebeproben K-SN 4 (aufgrund unzureichender RIN) und K-SN 7 (starke Abweichungen der Genexpressionsdaten im Vergleich zu anderen Kontrollen, in lila) ausgeschlossen.

| Code/ Bezeichnung | Fall | Alter [a], Geschlecht | PMI [h] | pH-Wert | RIN 2008 | 28S/18S Verhältnis | RIN 2009 | 28S/18S Verhältnis | <i>small RNA</i> [pg/ μ l] – Anteil miRNA |
|-------------------|---------|--------------------------|---------|---------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|--|
| PD-SN 1 | PD | 80, m | 7 | 6,42 | 7,1 | 0,8 | 7,4 | 0,9 | 3660,2 – 11,3 % |
| PD-SN 2 | PD | 80, m | 23 | 5,41 | 6,8 | 0,7 | 6,5 | 0,9 | 9238,5 – 15,2 % |
| PD-SN 3 | PD | 79, w | 17 | 5,79 | 7,3 | 1 | 7,4 | 0,9 | 3076,7 – 12,1 % |
| PD-SN 4 | PD | 79, m | 23 | 6,2 | 7,5 | 0,9 | 6,9 | 0,8 | 3059,2 – 12,5 % |
| PD-SN 5 | PD | 73, w | 11 | 5,51 | 7,7 | 0,9 | 6,9 | 0,8 | 5618,9 – 19,8 % |
| K-SN 1 | K | 62, m | 31 | 5,88 | 6,2 | 0,5 | 6 | 0,6 | 5076,3 – 28,0 % |
| K-SN 2 | K | 72, m | 6 | 6,42 | 6,6 | 0,7 | 6,1 | 0,6 | 5907,8 – 26,3 % |
| K-SN 3 | K | 69, w | 14 | 6,6 | 6,5 | 0,6 | 5,8 | 0,8 | 11021,8 – 17,0 % |
| K-SN 4* | K | 61, m | 6,5 | 5,49 | 2,3 | 0 | 1,9 | 0 | |
| K-SN 5 | K | 75, w | 24 | 5,54 | 6 | 0,5 | 3,4 | 0 | 13071,3 – 19,7 % |
| K-SN 6 | K | 63, m | 24 | 6,04 | 6,3 | 0,7 | 5,7 | 0,8 | 8010,3 – 26,5 % |
| K-SN 7* | K (Ulm) | 69, w | 24 | 5,73 | 6,4 | 0,5 | 6,8 | 1,1 | 2627,1 – 27,2 % |
| K-SN 8 | K (Ulm) | 68, w | 120 | 5,66 | 5,9 | 0,2 | 5,5 | 0,3 | 7104,1 – 28,6 % |
| K-SN 9 | K (Ulm) | 71, w | 72 | 5,67 | 6,5 | 0,4 | 6,3 | 0,5 | 5622,1 – 21,3 % |
| K-SN 10 | K (Ulm) | 72, m | 24 | 5,65 | 6,6 | 0,5 | 5,7 | 0,6 | 8264,3 – 31,6 % |

Tabelle 11 – Eigenschaften und Qualität aller humanen Hirngewebeproben.

Die Tabelle fasst die erfassten Daten des humanen Hirngewebes zusammen (Spenderalter, Geschlecht, *post-mortem* Index (PMI), Ergebnisse der RIN- und pH-Wert-Messungen mit Angaben des Verhältnisses der ribosomalen Untereinheiten (28S/18S) und *small RNA*-Messungen). Die mit * markierten Proben wurden in den folgenden Analysen nicht mit berücksichtigt, die letzten vier Kontrollproben wurden von Prof. Thal, Neuropathologie der Universität Ulm (Ulm) zur Verfügung gestellt (Details siehe Text).

Insgesamt sind alle fünf PD- und acht der zehn Kontrollproben nach Qualitätsanalysen in die folgenden Genexpressionsanalysen aufgenommen worden. Das mittlere Spenderalter der fünf PD-Proben lag mit $78,2 \pm 1,3$ signifikant (9 Jahre) über dem Spenderalter der mit $69,0 \pm 1,6$ jüngeren Kontrollen ($p = 0,002$; 8 Kontrollen; Abb. 23 A; Tab. 12). Die Proben K-SN 8 und K-SN 9 haben einen deutlich größeren PMI als alle anderen Kontrollen. Die Proben wurden bewusst in der Studie belassen, um den Einfluss des PMI auf die Genexpression zu untersuchen. Die PMI-Werte der Kontrollgruppe waren mit ($p = 0,32$; 10 Kontrollen) und ohne die Proben K-SN 8 und K-SN 9 ($p = 0,61$; 8 Kontrollen) nicht signifikant unterschiedlich von den PMI-Werten der PD-Gruppe (Abb. 23 B; Tab. 12).

Keine signifikanten Unterschiede konnten ebenfalls bei der Untersuchung des pH-Wertes ($p = 0,78$; 8 Kontrollen) festgestellt werden. Hierbei lag der mittlere pH-Wert des Hirngewebes von PD-Patienten bei $5,87 \pm 0,19$ und von Kontrollgewebe bei $5,91 \pm 0,12$ (Abb. 23 C; Tab. 12).

Die PD-Proben von 2008 ($p = 7,77e-5$, Abb. 23 E; Tab. 12) und von 2009 ($p = 0,0123$, Anhang) wiesen signifikant höhere RIN-Werte im Vergleich zu den Kontrollproben auf (8 Kontrollproben, 5 PD-Proben).

Insgesamt wurde festgestellt, dass sich die RNA-Qualität von humanem, bei -80°C kryoasservierten Mittelhirngewebe über mehrere Jahre nicht signifikant verringert. Die Gewebeprobe K-SN 4 wurde aufgrund von Degradierung (maximal gemessener RIN 2,3) für alle Genexpressionsstudien ausgeschlossen.

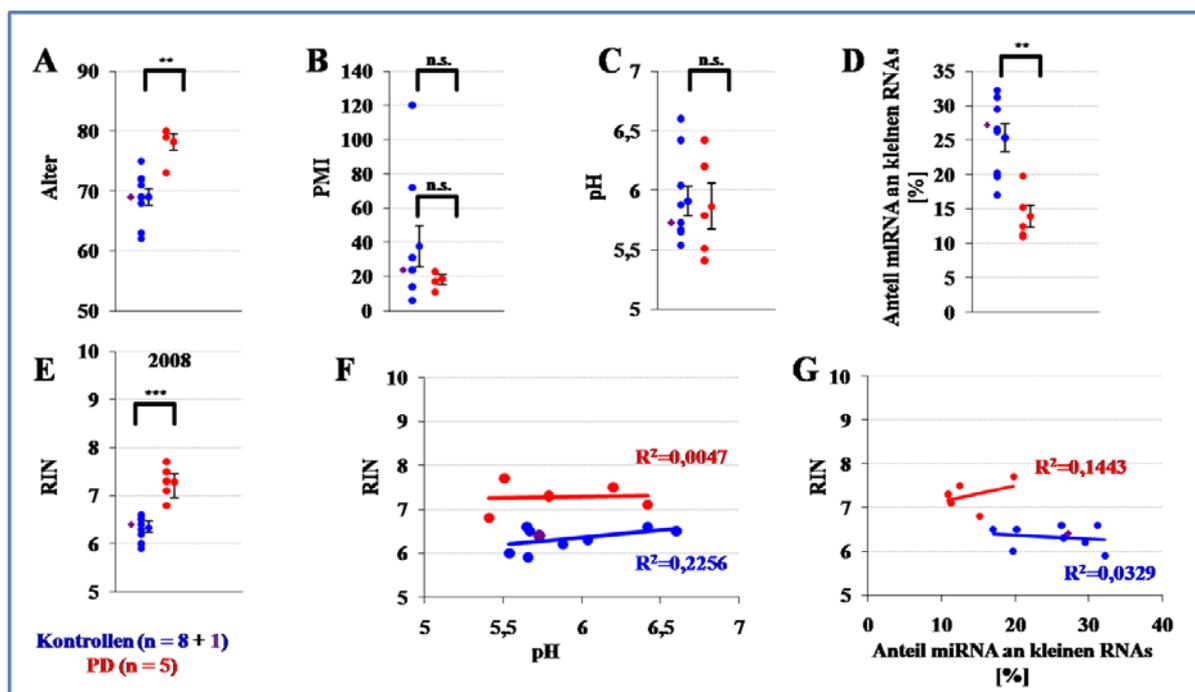


Abbildung 23 – Qualität und Homogenität der für die Genexpressionsanalysen eingesetzten Proben. Scatterplot des Alters der Gewebespende (A), des PMI (*post-mortem* Index, B), der pH-Werte (C), des miRNA-Anteils an kleinen RNAs insgesamt (Fragmentgrößen < 200 nt, D) und der RIN-Werte von 2008 (E). Die RIN-Werte von Kontrollen und PD zeigen keine Korrelation mit dem pH-Wert (F) und keine Korrelation mit dem prozentualen Anteil von miRNAs an kleinen RNAs (G). (Kontrollen jeweils in blau, PDs in rot, K-SN 7 in lila, K-SN 4 aufgrund unzureichender Qualität nicht gezeigt, weitere Details im Text und Tab. 11 und im Anhang).

| Gruppe | Anzahl n | Alter | PMI | pH-Wert | RIN 2008 | RIN 2009 | % Anteil miRNA |
|------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| Kontrollen | 8 | 69,0±1,6 | 41,9±15,6 | 5,93±0,14 | 6,33±0,10 | 5,56±0,32 | 25,34±2,0 |
| PD | 5 | 78,2±1,3 | 18,5±2,87 | 5,87±0,19 | 7,28±0,16 | 7,02±0,17 | 13,9±1,65 |
| p-Wert | | 0,002 | 0,33 | 0,78 | 0,0002 | 0,006 | 0,002 |

Tabelle 12 – Qualität und Homogenität der für die Genexpressionsanalysen eingesetzten Proben. Datentabelle der Mittelwerte ± SEM und p-Werte zu Abbildung 23.

Die RIN-Werte korrelierten weder mit dem pH-Wert (Abb. 23 F; Tab. 12), noch mit den prozentualen miRNA-Anteilen (Abb. 23 G; Tab. 12), dabei war irrelevant, welche RIN-Werte verwendet wurden (vgl. Anhang). Der miRNA-Anteil an kleinen RNAs war in den Kontrollproben signifikant im Vergleich zu den PD-Proben erhöht ($p = 0,002$, Tab. 12).

3.2 Optimierung der UV-LMD Methodik

Ein artifizieller Einfluss der RNA-Qualitätsunterschiede, sowie der angewandten Fixiertechnik und weiterer methodischer Prozessierungsschritte auf die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen sollten möglichst ausgeschlossen werden. Daher wurde im weiteren Vorgehen zunächst die Methodik im Mausmodell entsprechend optimiert und validiert. Dabei

wurde das Protokoll insbesondere auch für PFA-fixiertes Gewebe optimiert, sowie ein Protokoll zur parallelen Analyse von miRNA und mRNA etabliert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der methodischen Erweiterungen und Tests zusammengefasst.

3.2.1 Vergleich verschiedener Ablationsmethoden und Objektträger

Im Vergleich zu PEN-Objektträgern (in Kombination mit ‚*Draw and Cut*‘-Modus) und Glasobjektträgern (in Kombination mit ‚*Draw and Scan*‘-Modus) wurden mit spezieller Kristallschicht versehene DIRECTOR-Objektträger (EP-Objektträger; in Kombination mit ‚*Draw and Scan*‘-Modus) hinsichtlich der Eignung des ‚*Draw and Scan*‘-Modus für Genexpressionsanalysen getestet.

Für die jeweiligen Tests wurden abwechselnd murine Mittelhirnsektionen desselben Hirns auf die verschiedenen Objektträger aufgezogen und mit derselben etablierten CV-Färbung und Ethanolreihe gefärbt und fixiert (vgl. 2.2.2.4). Nach Trocknung der Schnitte wurden im Wechsel von den unterschiedlichen Objektträgern 5er Zellpools von Neuronen der *Substantia Nigra* mittels LMD gesammelt, davon 1/3 qualitativ mittels Multiplex-Nested PCR und 2/3 quantitativ mittels *real-time* qPCR analysiert. Somit wurden dieselben Bedingungen für alle Tests realisiert.

Die Ablation mittels des ‚*Draw and Scan*‘-Modus war auf allen Objektträgern möglich. Die Laserenergie (LP von engl. *Laserpower*) unterschied sich je nach Objektträger, wobei am meisten Energie für die Ablation von Glasobjektträgern (LP = 60) im Vergleich zu PEN-Objektträgern (LP = 53) und EP-Objektträger (LP = 25) benötigt wurde.

Mit dem ‚*Draw and Scan*‘-Modus ablatiertes Gewebe war in der Sichtkontrolle des Auffangdeckels als feine Bruchstücke wesentlich schwieriger zu visualisieren als ausgelaserte Zellen von PEN-Objektträgern (Abb. 24 A). Die Sichtkontrolle dauerte somit länger als beim ‚*Draw and Cut*‘-Modus in Kombination mit PEN-Objektträgern. Die Visualisierung der ablatierten Zellen mit dem ‚*Draw and Scan*‘-Modus in den Übersichtsaufnahmen war ebenfalls wesentlich schwieriger im Vergleich zu den ausgelaserten Zellen von PEN-Objektträgern mit dem ‚*Draw and Cut*‘-Modus (Abb. 24 B).

Nach Zellyse, cDNA-Synthese und Multiplex-Nested-PCR ließen sich keine qualitativen Unterschiede in der Materialausbeute (Sensitivität und Spezifität) feststellen (Abb. 24 C).

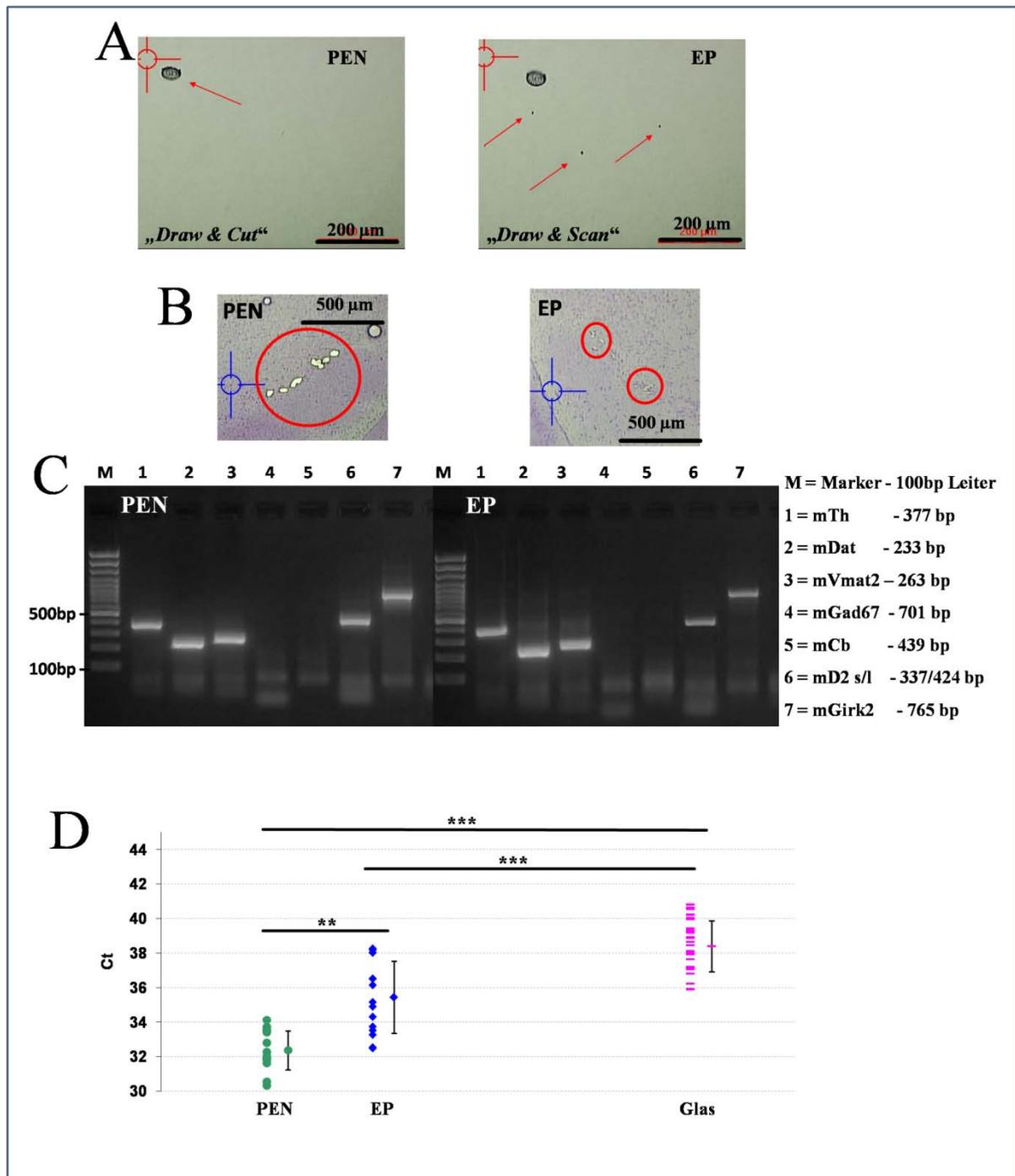


Abbildung 24 – Vergleich verschiedener Ablationsmethoden und Objektträger.

Gut zu erkennende Ablation eines Ovals ($178 \mu\text{m}^2$) von einem PEN-Objektträger mit „Draw and Cut“ (A, links, roter Pfeil). Nach Ablation von einem EP-Objektträger mit „Draw and Scan“ sind nur Krümel zu erkennen (A, rechts, rote Pfeile). In den Übersichten sind ausgelasserte Zellpools (2×5 Zellen) auf PEN besser zu erkennen als nach Ablation von EP (B). Qualitativ ergaben sich keine Unterschiede zwischen PEN und EP (C). Quantitativ lieferte der „Draw and Cut“ von PEN die besten Ergebnisse, „Draw and Scan“ von EP und Glas waren signifikant schlechter als von PEN, wobei die Ablation von Glas signifikant schlechter war als von EP. Details siehe Text.

Mit einem robusten, etablierten Neuronenmarker-TaqMan-Assay (mEno2) und *real-time* qPCR wurden die Ablationserfolge auf quantitative Unterschiede untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass nach Ablation mit dem ‚Draw and Scan‘-Modus die Ausbeute gegenüber der

etablierten LMD-Methode mit PEN-Objektträgern und ‚*Draw and Cut*‘-Modus signifikant schlechter ausfiel. Nach Sammlung von fünfzehn 5er Zellpools ergab sich mit etablierter LMD-Methode (PEN, ‚*Draw and Cut*‘) ein mittlerer Ct-Wert von $34,5 \pm 1,1$, nach Ablation mit ‚*Draw and Scan*‘-Modus von EP-Objektträger ein mittlerer Ct-Wert von $37,5 \pm 2,1$ und nach Ablation mit ‚*Draw and Scan*‘-Modus von Glasobjektträger ein mittlerer Ct-Wert von $38,8 \pm 2,6$ (MW \pm SD) nach *real-time* qPCR von je 1,7 Zellen in Duplikatreaktionen. Die Unterschiede zwischen PEN- und EP-Ablation haben eine Signifikanz von $p = 5e-5$, PEN zu Glas von $p = 7e-5$ und EP zu Glas von $p = 2,8e-11$ (Abb. 24 D). Bei der etablierten LMD-Methode mit PEN-Objektträgern waren keine Ausfälle zu beobachten, bei den EP-Objektträgern fielen 2 von 30 Duplikatreaktionen aus, bei den Glasobjektträgern 8 von 30. Entsprechend wurden für alle weiteren Arbeiten PEN-Objektträger mit dem ‚*Draw and Cut*‘-Modus verwendet.

3.2.2 Erweiterung der UV-LMD-Methodik

Zur Testung des bereits im Labor etablierten UV-LMD *real-time* qPCR Protokolls für andere Zelltypen und kleine Zellpools aus Mausgewebe wurde dieses im Rahmen von Kooperationsprojekten angewandt.

3.2.2.1 Genexpression muriner Girk-Kanäle im *Cerebellum*

In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Rafael Luján (Institut für Medizinwissenschaften, Universität Castilla-La Mancha, Campus Biosanitario, Albacete, Spanien) wurde die mRNA-Expression von Girk1-Girk4 Kaliumkanälen in verschiedenen cerebralen Zelltypen der Maus untersucht. Zunächst wurden hierfür mittels Oligo6 sequenzspezifische Primer für die murinen Girk-Kanäle Girk1-Girk4 konzipiert. Die sequenzspezifischen Primer wurden nach Design (Oligo6) und Synthese (Metabion) auf murinem Mittelhirn-cDNA-Standard etabliert. Zur Etablierung der Primer wurden diese getestet und konstante Assay-Performance in unabhängigen Verdünnungsreihen zur Generierung von Standardkurven festgestellt (Tab. 13). Es wurden von cerebralen Hirnschnitten der Maus (27 Tage alt) 25er-Zellpools individueller Zellen verschiedenen Typs (Purkinjezellen, Körnerzellen, Korbzellen, Sternzellen, Abb. 25) mittels UV-LMD gesammelt. Zur Validierung der Homogenität der Zellpools wurde mittels Multiplex-Nested PCR die Expression der Markergene Gad65/67 (Glutamatdecarboxylase – Splicevarianten 65 und 67, engl. *glutamic acid decarboxylase*), Cb (Calbindin), Gfap (Saures Gliafaserprotein, engl. *glial fibrillary acidic protein*) und vGlut1 (vesikulärer Glutamattransporter, engl. *vesicular glutamate transporter 1*) parallel zur qPCR untersucht: GABAerge Purkinjezellen sollten eine Expression von Gad und Cb, aber nicht Gfap oder

vGlut1; Körnerzellen ausschließlich eine Expression von vGlut1 zeigen. GABAerge Korbzellen und Sternzellen sollten ausschließlich eine Expression von Gad zeigen (Chung et al., 2009). Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Girk-Genexpressionsanalysen.

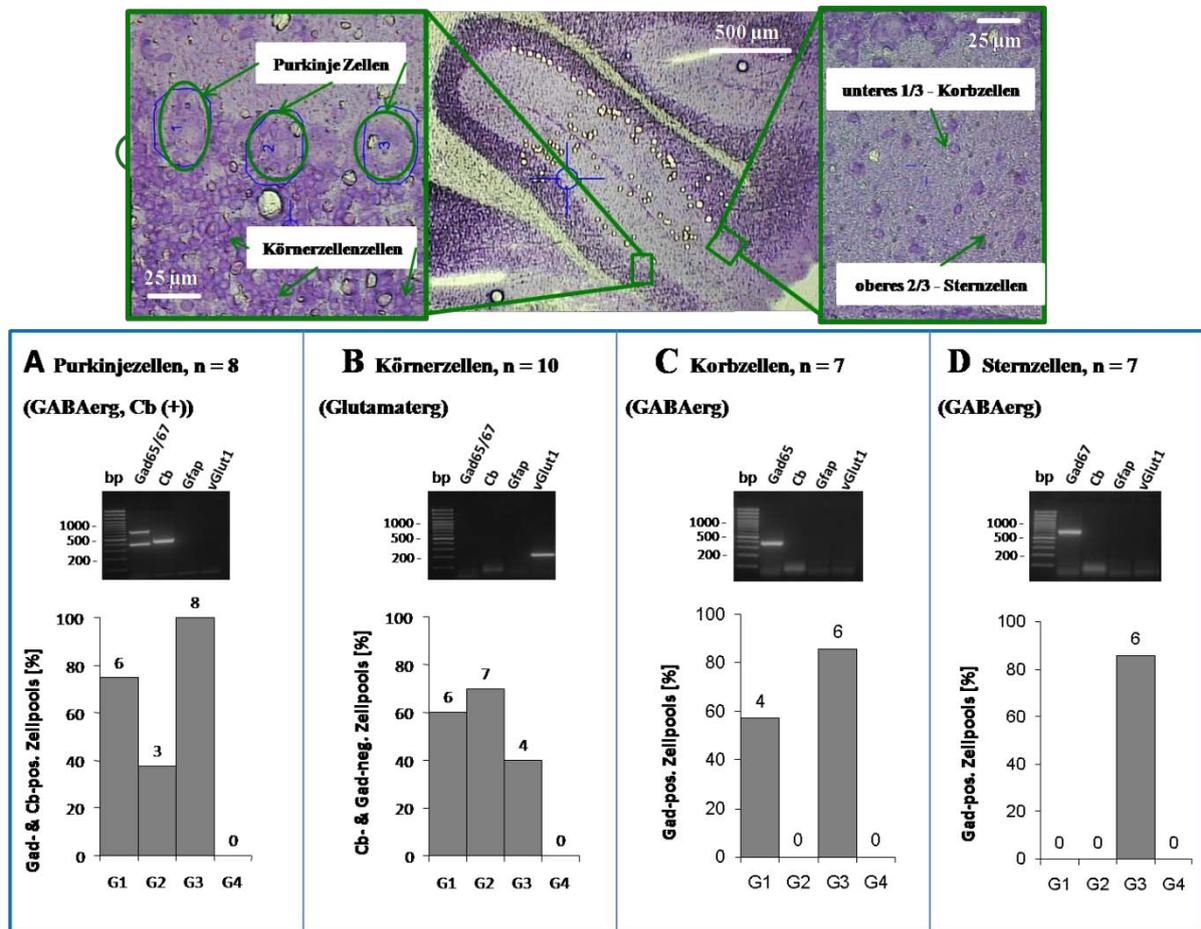


Abbildung 25 – Zellspezifische Expression von Girk-Kanälen in murinen *Cerebellum*-Zelltypen. Die Grafen illustrieren die mRNA-Expression der Girk-Kanäle (Girk1-4; G1, G2, G3, G4) in verschiedenen cerebralen Zelltypen. A) In acht Gad- und Cb-positiven Purkinjezellpools konnten sechs mit Expression von Girk1, drei mit Expression von Girk2 und acht mit Expression von Girk3 detektiert werden. B) In zehn vGlut1-positiven Körnerzellpools konnten sechs mit Expression von Girk1, sieben mit Expression von Girk2 und vier mit Expression von Girk3 detektiert werden. C) In sieben Gad-positiven Korbzellpools konnten vier mit Expression von Girk1, keine mit Expression von Girk2 und sechs mit Expression von Girk3 detektiert werden. D) In acht Gad-positiven Sternzellpools konnten keine Expression von Girk1 oder Girk2 und sechs Mal Expression von Girk3 detektiert werden. Expression von Girk 4 konnte in keinem der Zelltypen nachgewiesen werden.

Die Auswertung der SYBRgreen *real-time* qPCR erfolgte nicht quantitativ. Es wurde lediglich die Anzahl positiver Signale der sensitiven qPCR gezählt (Abb. 25), um immunhistochemische Daten und Fluoreszenzfärbungen von Prof. Rafael Luján zu bestätigen (Aguado et al., 2008).

| Gen (NCBI#) | Annealing Temp. | 4. Segment | Steigung | R2 | Y-Intercept | Fluoreszenz-unterschied | n unabhängige Standardkurvenurven |
|-------------------|-----------------|------------|------------|-----------|-------------|-------------------------|-----------------------------------|
| Girk1 (NM_008426) | 59°C | 78°C | -3,34±0,05 | 1,00±0,00 | 43,85±0,29 | 4,8 | 4 |
| Girk2 (NM_010606) | 54°C | 74°C | -3,10±0,08 | 0,98±0,01 | 42,50±0,30 | 6,4 | 4 |
| Girk3 (NM_008429) | 59°C | 78°C | -3,31±0,14 | 1,00±0,00 | 43,86±0,64 | 4,2 | 4 |
| Girk4 (NM_010605) | 59°C | 78°C | -2,91±0,30 | 0,99±0,00 | 41,05±1,87 | 4,9 | 2 |

Tabelle 13 – Murine Girk SYBRgreen qPCR-Assays.

Zusammenfassung der Standardkurvendaten der mit Oligo 6 designten SYBRgreen qPCR Assays für die murinen Girk-Kanäle 1-4 (*threshold* aller Assays = 1,0).

Girk1 wurde in 6 von 10 Purkinjezellpools, in 6 von 10 Körnerzellpools, in 4 von 10 Korbzellpools und 0 von 10 Sternzellpools nachgewiesen. Girk2 wurde in 3 von 10 Purkinjezellpools, in 7 von 10 Körnerzellpools, in 0 von 10 Korbzellpools und 0 von 10 Sternzellpools nachgewiesen. Girk3 wurde in 8 von 10 Purkinjezellpools, in 4 von 10 Körnerzellpools, in 6 von 10 Korbzellpools und 6 von 10 Sternzellpools nachgewiesen. Girk4 wurde in keinem der untersuchten Zelltypen nachgewiesen (Aguado et al., 2008).

3.2.2.2 UV-LMD muriner Darmkrypten für CGH-Analysen

In einem Kooperationsprojekt mit dem Institut für Molekulare Medizin (Prof. Karl Lenhard Rudolph, Universität Ulm) wurden Darmkrypten von vier unterschiedlichen Mauskohorten (iF1 p53 wildtyp (WT), iF1 p53 kond. KO*, iG4 p53 WT, iG4 p53 kond. KO*) isoliert. Dazu wurde intestinales Gewebe in Einbettmedium eingefroren (-80°C), am Gefriermikrotom bei -19°C in 12 µm Sektionen geschnitten, auf PEN-Objektträger aufgezogen und mit der Standard CV-/EtOH-Reihe gefärbt und fixiert (vgl. 2.2.2.4). Im Anschluss wurden einzelne Darmkrypten der vier Kohorten mittels UV-LMD isoliert und in 9 µl H₂O aufgenommen. Die Proben wurden am Institut für Humangenetik der Universität Graz (Prof. Michael Speicher) weiterprozessiert, indem zunächst die genomische DNA global amplifiziert und mittels GAPDH-PCR auf Qualität untersucht wurde. Dabei wurden bei hinreichender Qualität unterschiedliche lange, über das gesamte GAPDH-Gen verteilte Amplifikate detektiert. Produkte hinreichender Qualität wurden für die CGH-Analyse (engl. *comparative genome hybridisation*) verwendet, welche im Vergleich zu einer C57/Bl6-Kontroll-DNA durchgeführt wurde. Die Hybridisierung der drei Kohorten iF1 p53 WT, iF1 p53 kond. KO* und iG4 p53 WT zeigten stabile, vergleichbare CGH-Profile, während die CGH-Profile der Kohorte iG4 p53 kond. KO* chromosomale Veränderungen in Form von Aberrationen und Amplifikationen aufwiesen (Abb. 26; (Begus-Nahrman et al., 2009))

*(konditioneller *Knock-Out*, Villin-Cre-ER^{T2}, induziert im Alter von vier Wochen durch Tamoxifen (0,05 mg/g Körpergewicht Maus); (Begus-Nahrman et al., 2009))

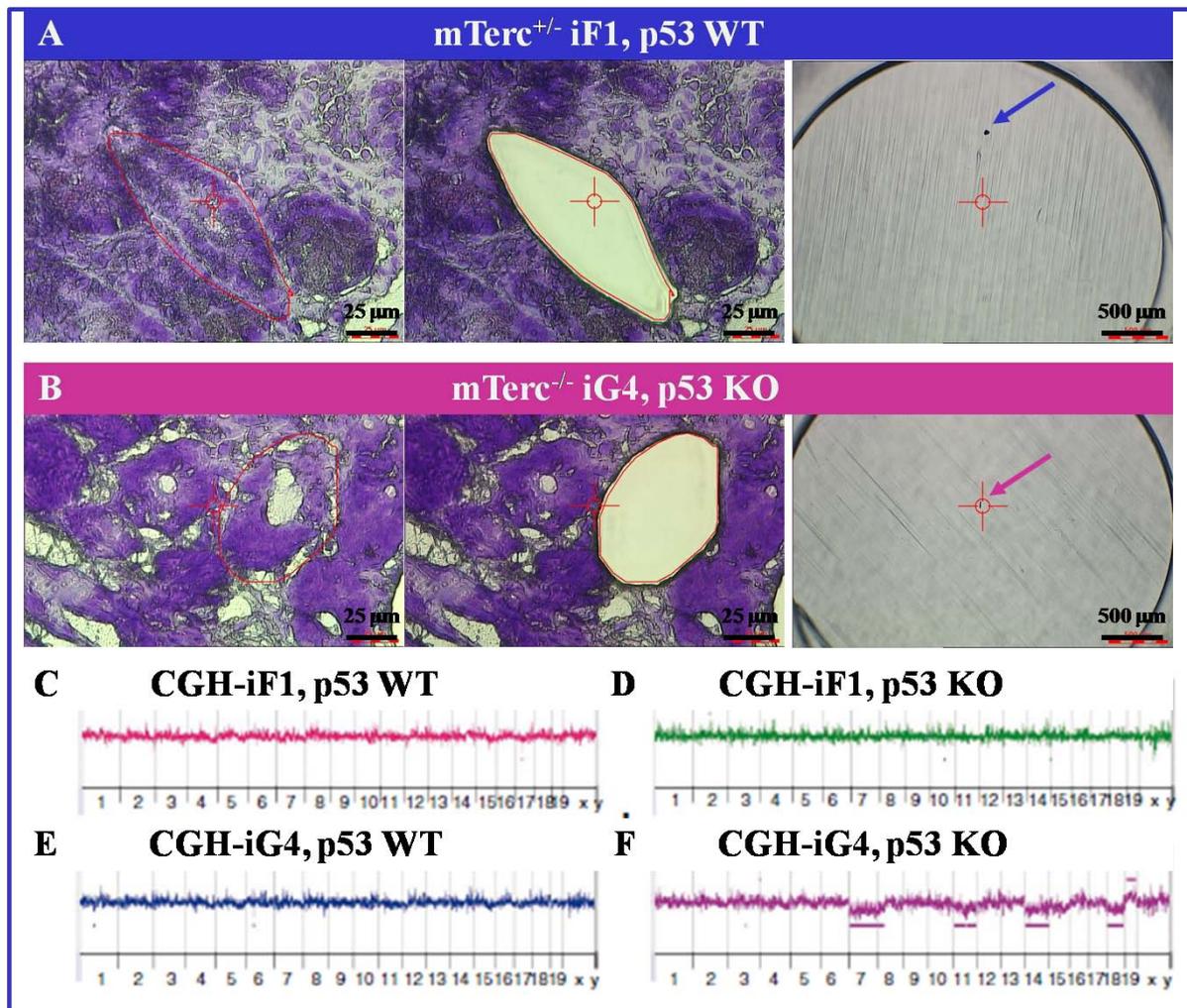


Abbildung 26 – CGH-Analyse UV-LMD isolierter muriner Darmkrypten.

Murine Darmkrypten zweier analysierter Kohorten vor und nach UV-LMD mit *cap-control* (A & B). Die Kohorten iF1 p53 WT, iF1 p53 kond. KO*, iG4 p53 WT wiesen keine chromosomalen Veränderungen im CGH-Profil auf (C-E), während in der Kohorte iG4 p53 kond. KO* chromosomale Veränderungen detektierbar waren (F, lila Balken). (C-F nach (Begus-Nahrmann et al., 2009), Details siehe Text)

3.2.3 Etablierung der UV-LMD-Methodik für Einzelzellen aus PFA-fixiertem Gewebe

Weit verbreitet ist die PFA-Fixierung von Geweben, welche Zellstrukturen durch Proteinvernetzung besser erhält als dehydrierende Ethanol-Fixierungen.

Zur Etablierung eines entsprechend geeigneten UV-LMD-Protokolls wurde im Rahmen dieser Arbeit eine PFA-Fixierung mit anschließender RNA-Isolation aus lasermikrodissektiertem, PFA-fixiertem Gewebe eingesetzt. Verwendung für die PFA-Fixierung fand eine 4 %ige PFA-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer (vgl. 2.1.6) in Kombination mit RNA-Isolation aus lasermikrodissektiertem Material mittels des RNeasy FFPE Kit (Qiagen).

Versuche zur LMD mit anschließender mRNA-Quantifizierung aus lasermikrodissektiertem, PFA-fixiertem Material wurden wie folgt durchgeführt: Zunächst wurden frisch auf PEN-Objektträger aufgezoene murine Mittelhirnsektionen 8 min in der 4%igen PFA-Lösung fixiert, direkt im Anschluss 40 s mit CV (1 % CV in 100 % EtOH, steril gefiltert) gefärbt, in der üblichen Ethanol-Reihe gewaschen, 45 min in einer Kieselgel-Trockenkammer getrocknet und nicht aufgezoene Sektionen beim Kryoschneiden zu Kontrollzwecken verwendet. Für den direkten Vergleich wurden bei den Versuchen parallel und abwechselnd Mittelhirnschnitte auf PEN-Objektträger aufgezoen, von denen jeweils ein Objektträger mittels PFA-Fixierung und der andere Objektträger mit der etablierten Methodik gefärbt und fixiert wurde. Von den bis auf die zusätzliche PFA-Fixierung gleichbehandelten Objektträgern wurden abwechselnd Zellpools und Gewebe isoliert, um zeitliche Unterschiede des Sammelns zu minimieren. Es wurden 15er Zellpools (n = 12) von DA SN Neuronen (für *real-time* qPCR) und komplette Mittelhirnsektionen (für RIN-Analysen) mit Hilfe der UV-LMD gesammelt. Aus den Gewebeproben wurde in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei unterschiedlichen Kits (RNeasy MINI und FFPE, beide Qiagen) RNA isoliert und die Qualität der RNA durch RIN-Analysen bestimmt (Tab. 14), wobei der RNeasy MINI Kit im Gegensatz zum RNeasy FFPE Kit nicht für PFA-fixiertes Gewebe spezifiziert ist.

| Probe | Fixierung | Kit | RIN | RIN | RIN |
|---------------------------------------|-----------|------|-----|-----|-----|
| gelasertes Gewebe | EtOH | FFPE | 4,5 | 4,5 | 4,6 |
| gelasertes Gewebe | EtOH | MINI | 8,4 | 8,3 | 8,9 |
| gelasertes Gewebe | PFA | FFPE | 6,8 | 6,7 | 7,0 |
| gelasertes Gewebe | PFA | MINI | - | - | - |
| Gewebeschnitte ohne Fixierung/Färbung | Keine | MINI | 8,8 | 8,6 | 9,1 |

Tabelle 14 – RNA Isolation aus PFA-fixiertem Gewebe.

Zusammenstellung der RIN-Analysen nach Lasermikrodissektion von unterschiedlich fixierten Gewebestücken und anschließender RNA-Isolation mit Hilfe verschiedener Kits (Details siehe Text, EtOH – Ethanol, PFA – Paraformaldehyd, RIN – RNA Integritätsnummer).

Die höchste RNA-Qualität mit RIN 8,6-9,1 wurde nach RNA-Isolation mit dem RNeasy MINI Kit aus Gewebespänen vom Kryoschneiden nachgewiesen, nur geringfügig schlechter mit RIN 8,3-8,9 war hier die RNA-Qualität nach Isolation mit demselben Kit aus gelasertem, Ethanol-fixiertem Gewebe. Die Qualität der RNA nach Isolation mit dem RNeasy FFPE Kit aus PFA-fixiertem Gewebe lag bei RIN 6,7-7,0. Mäßige RNA-Qualität wurde nach RNA-Isolation mittels des FFPE-Kits aus Ethanol-fixiertem Gewebe gemessen (RIN 4,5-4,6), mit dem RNeasy MINI Kit konnte, wie zu erwarten war, keine RNA und RIN aus PFA-fixiertem Gewebe nachgewiesen werden.

Die SN DA Zellpools wurden für die direkte, etablierte kombinierte milde Zelllyse und cDNA-Synthese eingesetzt bzw. zum Vergleich zunächst mittels des RNeasy FFPE Kits die enthaltene RNA isoliert, in 40 µl Wasser eluiert und nach Präzipitation das RNA-Pellet direkt in die cDNA-Synthese eingesetzt. Die 5 µl Endvolumen aus der cDNA-Synthese wurden mit 5 µl Wasser auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt und zur *real-time* qPCR-Analyse in Duplikaten eingesetzt. Für die *real-time* qPCR-Analyse wurde der murine β -Actin Assay verwendet.

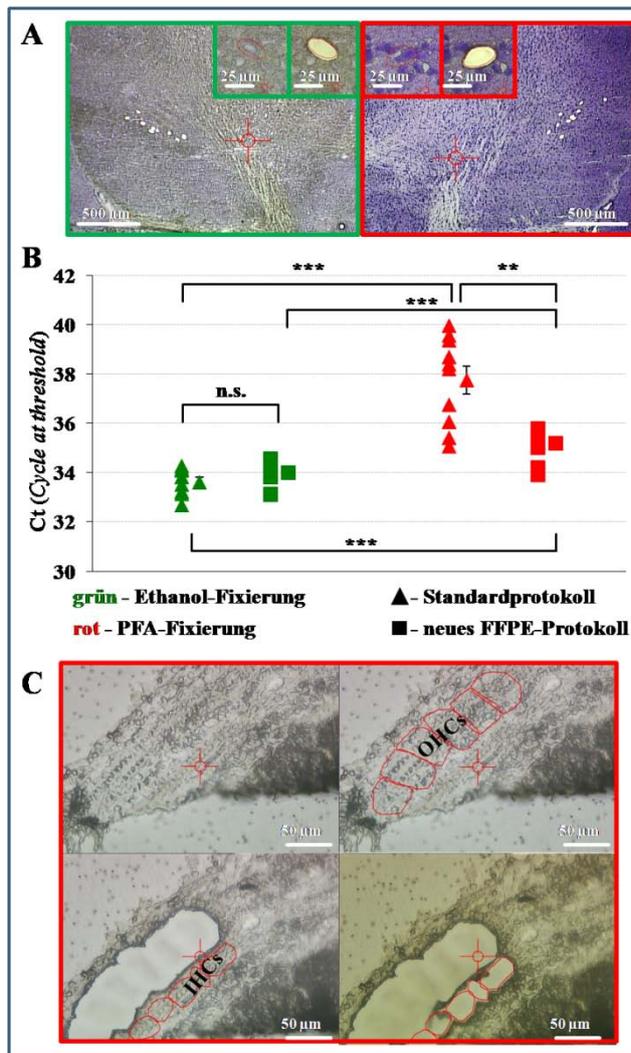


Abbildung 27 – RNA aus PFA nach UV-LMD. Zur Etablierung der RNA-Isolation aus PFA-fixiertem Gewebe wurden zunächst murine Mittelhirnschnitte mit Ethanol (A, grün) und mit PFA (A, rot) fixiert und mit Cresylviolett gefärbt. Aus dem Plot der beta-Actin qPCR-Vergleichsanalyse von fünf mittels Lasermikrodissektion isolierten murinen DA SN Neuronen je Reaktion aus den EtOH- und PFA-fixierten Gewebe und kombinierter milder Lyse und cDNA-Synthese bzw. RNA-Extraktion mit dem FFPE Kit und anschließender cDNA-Synthese ist die erfolgreiche Amplifikation beider Methoden erkennbar (B). Der Plot zeigt jeweils die Ct-Einzelwerte nach der *real-time* Reaktion und rechts daneben den Mittelwert \pm SEM. Nach EtOH-Fixierung gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen cDNA-Direktsynthese und vorheriger Aufreinigung ($p = 0,1594$). Nach PFA-Fixierung erwies sich die milde Lyse vor der cDNA-Synthese ohne vorherige Aufreinigung als ungeeignet und signifikant schlechter ($p = 0,0013$) als mit Aufreinigung mittels FFPE Kit. Nach PFA-Fixierung liegen die Ct-Werte signifikant höher als die der Proben der EtOH-Fixierung (Direktsynthese $p = 2e-5$, FFPE Kit $p = 3e-4$). Der Vergleich von EtOH-Fixierung und Direktfixierung zu PFA-Fixierung und FFPE ergab ebenfalls signifikante Unterschiede ($p = 5,7e-5$; B). Die PFA-Fixierung mit anschließender Lasermikrodissektion konnte erfolgreich zur separaten Isolation von äußeren (OHCs – engl. *outer hair cells*) und inneren Haarzellen (IHCs – engl. *inner hair cells*) angewandt werden (C). Weitere Details siehe Text.

Die Ergebnisse der *real-time* qPCR sind Abbildung 27 zusammengefasst. Nach Ethanol-Fixierung bestand kein Unterschied zwischen den Ct-Mittelwerten nach Standardprotokoll: $33,61 \pm 0,20$; $n = 12$, und den Ct-Werten nach FFPE-Protokoll: $33,99 \pm 0,17$; $n = 12$ ($p = 0,16$). Durch die PFA-Fixierung entstand offensichtlich ein RNA-Verlust, welcher sich in signifikant schlechteren Ct-Werten widerspiegelte (Ct-Mw nach Direktsynthese: $37,75 \pm 0,57$; $n = 12$ und nach vorheriger FFPE-Aufreinigung: $35,20 \pm 0,21$; $n = 12$). Das Standardprotokoll ist daher im Gegensatz zum FFPE-Protokoll nicht geeignet für eine kombinierte UV-LMD

und *real-time* qPCR einzelner Zellen aus PFA-fixiertem Gewebe, wie an den signifikant höheren Ct-Werten ($37,75 \pm 0,57$) und der hohen Streuung ersichtlich (Abb. 27 B).

Der mittlere Ct-Wert, der nach Anwenden des neuen FFPE-Protokolls für PFA-fixierte Laserproben erhalten wurde, ist zwar noch signifikant höher (mit ca. 1,5 Ct) im Vergleich zu den EtOH-fixierten Proben, aber trotz des leichten Materialverlusts (wahrscheinlich aufgrund der Fixierung) geeignet für die Analysen von PFA-fixierten Zellen und wurde schon erfolgreich im Rahmen einer Kooperation eingesetzt. In dieser Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jochen Roper (Institut für Neurophysiologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main) wurde murine *Cochlea* in 1%iger PFA-Lösung präpariert (Präparationszeit < 8 min., vgl. 2.2.2.1a; Abb. 27 C) und die Genexpression von Otoferlin, Prestin, Sur1, Sur2 und Kir6.2 mittels des neu etablierten FFPE-UV-LMD-Protokolls mit *real-time* qPCR analysiert. Es konnte die Expression von Markergenen der inneren (Otoferlin, n = 6) und der äußeren Haarzellen (Prestin, n = 10) in 100 % der analysierten Proben detektiert werden. Die K_{ATP} -Kanaluntereinheiten Kir6.2 wurde in 2 von 6 IHCs (*inner hair cells*) und 3 von 10 OHCs (*outer hair cells*), Sur1 in 2 von 6 IHCs und 3 von 10 OHCs und Sur2 in 0 von 6 IHCs und 3 von 10 OHCs detektiert.

3.2.4 Etablierung paralleler mRNA- und miRNA-Expressionsanalyse

Um mRNA und miRNA aus denselben UV-LMD-Proben parallel mittels *real-time* qPCR quantifizieren zu können, wurde das miScript-Kit (Qiagen) mit dem im Labor etablierten Einzelzell-UV-LMD Protokoll kombiniert. Das Anfertigen der Schnitte am Gefriermikrotom und die UV-LMD wurden gemäß des Standardprotokolls durchgeführt (vgl. 2.2.2.3 & 2.2.3).

Auf die Lasermikrodissektate wurde 5 μ l Lysemix aus Carrier-RNA polyI, RNase-Inhibitor SRS und Detergenz NP40 (vgl. 2.1.6) gegeben, die Zellen 2 min bei 72°C lysiert und anschließend 1 min auf Eis abgekühlt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 12.900 rpm wurden 4,5 μ l miScript-Puffermix und 0,5 μ l miScript RT Mix (enthält Polyadenylase und Reverse Transkriptase) aus dem miScript-Kit (Qiagen) zugegeben (vgl. 2.1.6) und der Reaktionsansatz über Nacht im Thermomixer bei 38°C und 350 rpm Intervallschütteln für 10 s im 10 min-Takt inkubiert.

Zum Test wurden die miRNAs miR-133a und miR-133b (Mimics, Qiagen) in Duplikaten von seriellen zehnfach Verdünnungen (0,1 bis 10 fmol *Template*) aliquotiert und nach cDNA-Synthese mit dem miScript SYBRgreen Assay für miR-133b quantifiziert. Beide *Templates* konnten mit dem Assay detektiert werden; dabei wurden die Signale der „falschen“ miRNA (Ct mit miR-133a *Template*: 0.1 fmol - $29,70 \pm 0,04$, 1 fmol - $26,20 \pm 0,01$ und 10 fmol - $22,90 \pm 0,03$; n = 2) durchschnittlich 1,52 Cts später als die Signale der miR-133b detektiert

(Cts des miR-133b *Template*: 0.1 fmol - 28.18 ± 0.02 , 1 fmol - 24.74 ± 0.01 und 10 fmol - 21.33 ± 0.08 ; n= 2) (Abb. 28 A).

Die Standardkurven des miScript-SYBRgreen-Assays für die miR-133b ließen sich mit miR-133a und miR-133b als *Template* erzeugen, wobei der *Y-Intercept* bei der Standardkurve mit miR-133a *Template* durchschnittlich 2,67 Ct später kam als mit miR-133b *Template*. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) von $0,996 \pm 0,016$ unterschied sich bei beiden *Templates* nicht. Die Steigung der Standardkurve mit miR-133a *Template* lag bei $-3,36 \pm 0,18$, mit miR-133b *Template* bei $-3,17 \pm 0,07$; n = 2 (Abb. 28 B).

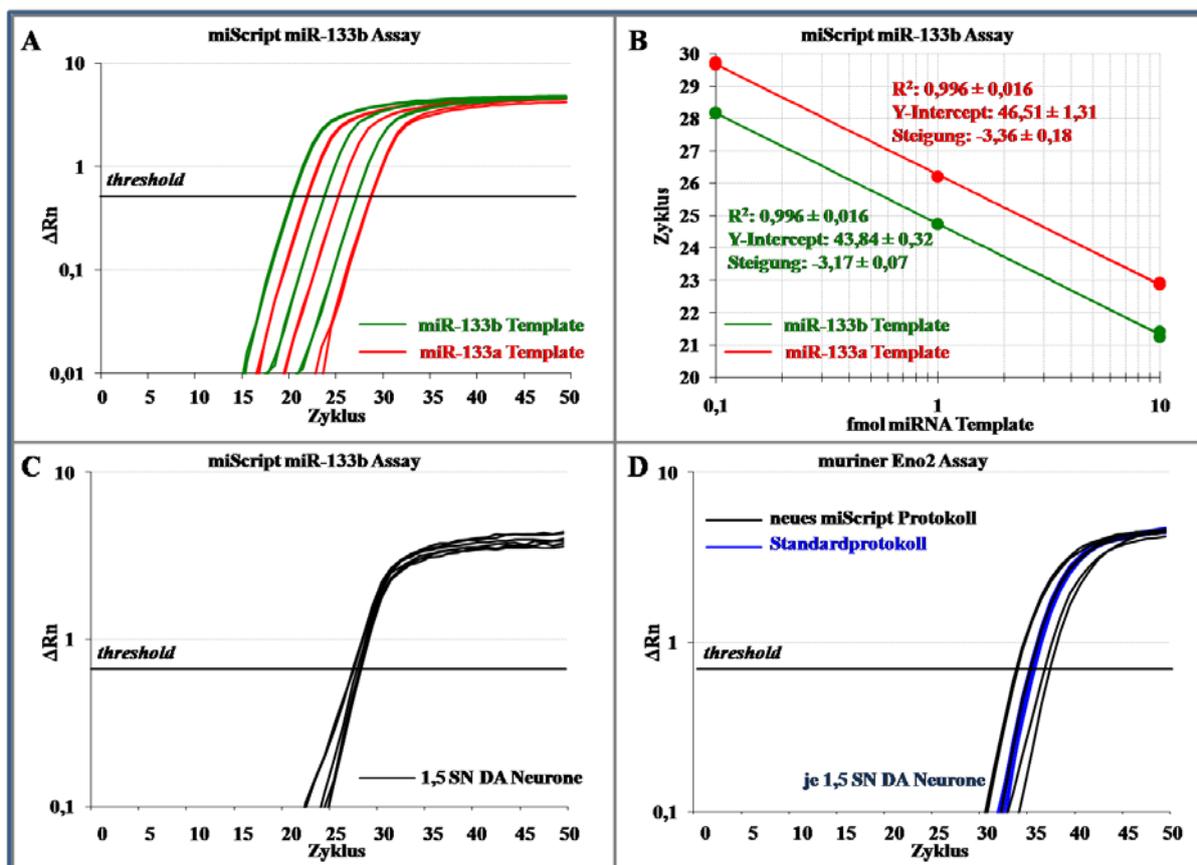


Abbildung 28 – Parallele miRNA- und mRNA-Quantifizierung.

Parallele Quantifizierung von miRNA und mRNA nach Adaption des miScript Kit (Qiagen). Testreaktionen des miScript Kits auf seriellen Verdünnungen von miR-133a und miR-133b (Mimics, je 10 – 0,1 fmol, Qiagen) *Templates* mit dem miScript-SYBRgreen-Assay für miR-133b (A & B). Der miR-133b-Assay erkennt die miR-133b durchschnittlich 1,52 Zyklen vor der miR-133a, die sich nur durch ein Nukleotid am 3'-Ende von miR-133b unterscheidet. Die Quantifizierung von miRNA (C) und mRNA (D) aus 1,5 DA SN Neuronen je Reaktion nach UV-LMD ergab für die SYBRgreen Signale des miR-133b Assays Ct-Werte von $26,30 \pm 0,05$ und für den murinen Eno2-TaqMan-Assay (neuronaler Marker) einen mittleren Ct von $33,89 \pm 0,01$ des Standardprotokolls (n = 6) und einen mittleren Ct von $33,86 \pm 0,45$ nach paralleler cDNA-Synthese mit dem neuen miScript Protokoll (n = 6) (ΔRn – relatives Fluoreszenzsignal).

Nach UV-LMD muriner DA SN Neuronen einer 21 Tage alten Maus und paralleler cDNA-Synthese von miRNA und mRNA aus diesen Neuronen, konnte die miRNA miR-133b in 1,5 SN DA Neuronen bei Ct $26,30 \pm 0,05$; n = 6 nachgewiesen werden (Abb. 28 C). Aufgrund

obiger Ergebnisse konnte nicht ausgeschlossen werden, dass in den Neuronen enthaltene miRNA-133a mit dem verwendeten miR-133b Assay mit detektiert wurde. Aus denselben Proben konnte das neuronale Markergen *Eno2* amplifiziert (Ct: $33,86 \pm 0,45$; n = 6) und im Vergleich mit dem Standardprotokoll prozessierter DA SN Neurone desselben murinen Mittelhirns vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (Ct: $33,89 \pm 0,01$; n = 6) (Abb. 28 D). Das neue, kombinierte miRNA UV-LMD Protokoll ist also vergleichbar sensitiv wie das etablierte Standardprotokoll (vgl. auch Abb. 32).

3.4 *Real-time* qPCR Assay-Etablierung für standardisierte Analysen humaner Einzelzellen

3.4.1 Performance humaner *real-time* qPCR-Assays

Alle humanen TaqMan Primer-Probe-Assays waren so gewählt, dass die Amplikonlänge der Zielsequenz so klein wie möglich war (max. 80 bp). Zur empirischen Analyse der Sensitivität und damit der Eignung zur Einzelzell-qPCR wurde jeder Assays eingehend mittels Gewebe-cDNA evaluiert. Dazu wurden Standardkurven mittels serieller Verdünnungen in Zehnerschritten aus muriner Mittelhirn-cDNA (unverdünnt 7 ng/ μ l), humaner SN cDNA (aus humaner Total SN RNA, Ambion; unverdünnt 6 bzw. 12 ng/ μ l) oder humaner miRNA und mRNA cDNA aus humaner mRNA und miRNA (Stratagene; unverdünnt 5 ng/ μ l) verwendet. Die Assays wurden in drei unabhängigen *real-time* qPCR-Reaktionen in Duplikaten für mindestens drei geeignete Verdünnungsstufen getestet und die resultierenden Standardkurven verglichen. Erfüllten die Assays die Minimalanforderungen (vgl. 2.3.2.2) nicht, wurden diese nicht für Einzelzell-Genexpressionsanalysen eingesetzt. Wenn möglich wurde die zu amplifizierende Zielsequenz auf einen anderen Exon-Exon-Übergang desselben Gens verlegt um eine bessere Performance für ein Gen zu erreichen. Einige Assays, wie z.B. splicevariantenspezifische Assays mussten trotz unzureichender Performance verwendet werden, da keine andere Designmöglichkeit gegeben war (z.B. NACP126-Splicevariante von α -Synuclein). Abbildung 29 zeigt beispielhaft die Standardkurven eines Assays mit guter und eines Assays mit schlechter Effizienz von α -Synuclein Splicevarianten.

Der Assay NACP140 erkannte die α -Synuclein-Splicevarianten NACP140 (alle 6 Exons) und NACP112 (kein Exon 5), der NACP126-Assay erkannte nur die Splicevariante ohne Exon 3. Die Verdünnungsreihe humaner SN cDNA ergab bei dem NACP140-Assay konstante Standardkurven mit hoher absoluter Fluoreszenz (7 Fluoreszenzeinheiten, nicht gezeigt) in allen vier Verdünnungsstufen von 6 bis 0,006 ng pro Reaktion eingesetzter cDNA (Abb. 29

A & C). Die *threshold*-Linie wurde für diesen Assay auf 1,0 gesetzt und ergab eine Standardkurve mit einer Steigung von -3,25, einem *Y-Intercept* von 31,36 Zyklen und einen Fehler von 0,13 % ($R^2 = 0,9987$; Abb.29 A & C). Dieselbe Verdünnungsreihe ergab für den NACP126-Assay inkonsistente Standardkurven, welche eine sehr geringe absolute Fluoreszenz (0,4 Fluoreszenzsignaleinheiten) aufwiesen und keine eindeutige Identifikation einer Phase exponentiellen Wachstums zuließen (Abb. 29 B & D). Des Weiteren war mit 0,006 ng eingesetztem cDNA-Standard keine Amplifikation möglich. Für diesen Assay musste die *threshold*-Linie auf 0,1 gesetzt werden und ergab mit -4,48 eine Steigung jenseits vom Idealwert -3,32, also eine deutlich beeinträchtigte Effizienz. Der *Y-Intercept* lag bei 29,30, das Bestimmtheitsmaß R^2 bei inakzeptablen 0,98 (Abb. 29 B & D).

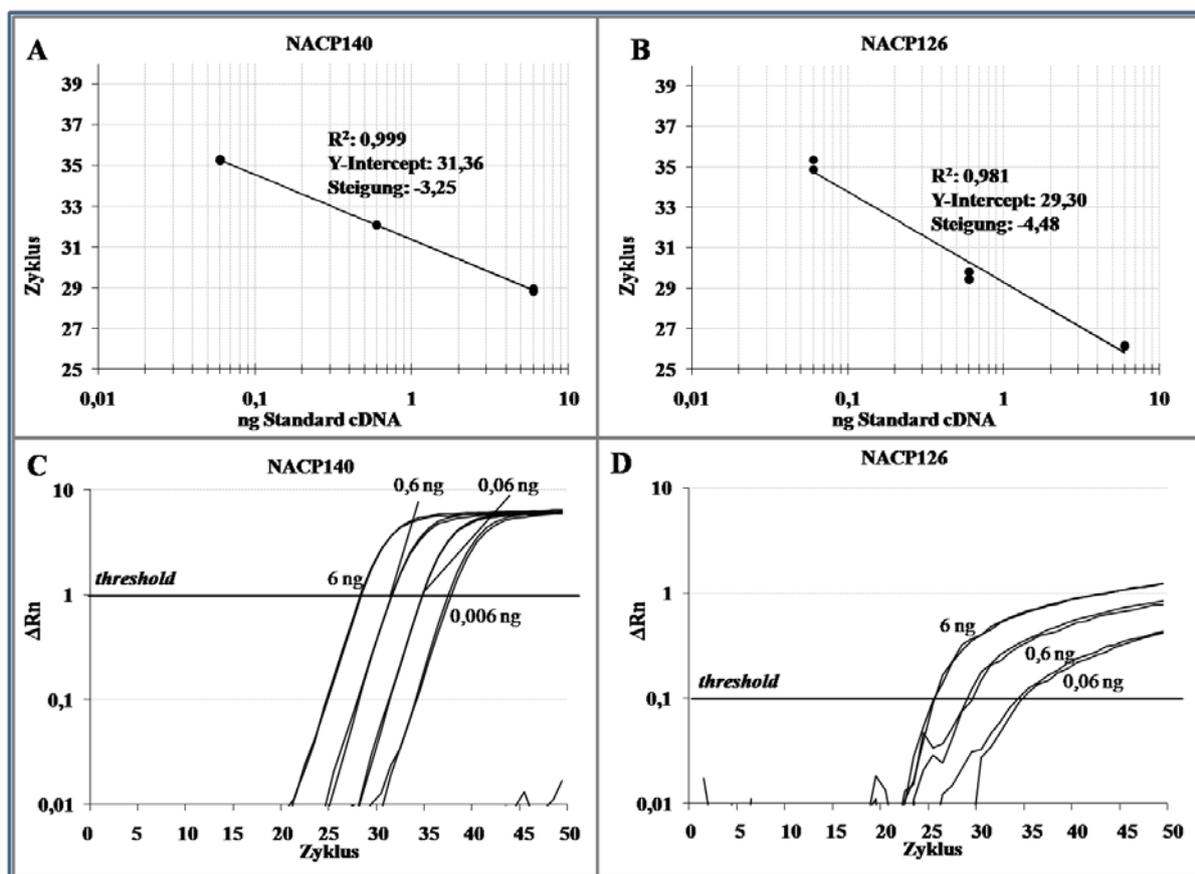


Abbildung 29 – cDNA-Standardkurven für 2 verschiedene α -Synuclein-Splicevarianten. Die Standardkurve von NACP140 bei einem gewählten *threshold* von 1,0 ergab eine Steigung von -3,25, einen *Y-Intercept* von 31,36 und ein Bestimmtheitsmaß von 99,87 % (A). Anhand der Verdünnungsreihe (0,006 ng bzw. 0,06 ng – 6 ng cDNA aus humanem SN Gewebe) ist eine deutliche exponentielle Phase im halblogarithmischen Plot der relativen Fluoreszenz (ΔRn) zu erkennen (C). Diese exponentielle Phase wird vom NACP126 kaum erreicht (D) und resultiert in einer deutlich schlechteren Standardkurve mit Steigung von -4,48 und einem Bestimmtheitsmaß von 98,13 %, was insbesondere auch durch den schlechten absolute Fluoreszenzunterschied von 0,4 zu erklären ist (B).

Für die humanen Analysen wurde aufgrund der schlechten Steigung ein neuer, selbst designter NACP126-Assay verwendet, der eine geringfügig bessere Steigung aufwies (Tab. 13).

| Assay ID (Zielgen) | threshold | Steigung | R ² | Y-Intercept | Fluoreszenz- unterschied | n unabh. Std- kurven (Menge) | Kategorie |
|--------------------------|-----------|--------------|----------------|--------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------|
| Hs00165941_m1 (TH) | 0,7 | -3,13 ± 0,02 | 0,99 ± 0,00 | 36,48 ± 0,14 | 5,6 | 12 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00997374_m1 (DAT) | 1,0 | -2,96 ± 0,08 | 0,99 ± 0,00 | 33,30 ± 0,19 | 6,2 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00996838_m1 (VMAT2) | 0,9 | -3,69 ± 0,08 | 0,99 ± 0,00 | 35,62 ± 0,17 | 6,1 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom assay (GIRK2) | 0,4 | -3,17 ± 0,07 | 0,99 ± 0,00 | 36,00 ± 0,21 | 3,4 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01014209_m1 (D2) | 0,8 | -3,37 ± 0,07 | 1,00 ± 0,01 | 36,05 ± 0,02 | 5 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom assay (D2s) | 0,7 | -3,16 ± 0,06 | 0,99 ± 0,00 | 37,86 ± 0,13 | 5,4 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom assay (D2l) | 0,7 | -3,36 ± 0,05 | 0,99 ± 0,00 | 36,29 ± 0,15 | 5,8 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01077193_m1 (CB) | 1,1 | -3,50 ± 0,02 | 0,99 ± 0,00 | 36,64 ± 0,06 | 4 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom Assay (PITX3) | 0,4 | -2,72 ± 0,24 | 0,98 ± 0,02 | 40,32 ± 0,63 | 5 | 2 (300 - 3 ng) | C |
| Hs00428691_m1 (NURR1) | 1,2 | -3,09 ± 0,05 | 0,99 ± 0,01 | 37,65 ± 0,16 | 5,4 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| MS00007385 (miR-133b) | 1,0 | -3,24 ± 0,08 | 0,99 ± 0,00 | 29,31 ± 0,15 | 4,9 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00240906_m1 (NACP140) | 1,0 | -3,27 ± 0,07 | 0,99 ± 0,01 | 33,55 ± 0,21 | 7 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01105450_m1 (NACP126)* | 0,1 | -4,48 | 0,98 | 43,72 | 0,4 | 1 (6 - 0,06 ng) | C |
| custom assay (NACP126) | 0,05 | -3,32 ± 0,22 | 0,98 ± 0,01 | 32,67 ± 0,52 | 1,1 | 2 (30 - 0,3 ng) | C |
| custom assay (NACP112) | 0,2 | -3,02 ± 0,02 | 0,99 ± 0,01 | 34,55 ± 0,18 | 4,2 | 3 (30 - 0,3 ng) | B |
| Hs00968187_m1 (LRRK2) | 1,1 | -3,28 ± 0,01 | 0,99 ± 0,01 | 34,71 ± 0,15 | 5,9 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01038322_m1 (PARKIN) | 0,7 | -3,45 ± 0,02 | 0,99 ± 0,01 | 37,16 ± 0,21 | 5,1 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00542597_m1 (Kv4.3) | 0,7 | -3,30 ± 0,06 | 0,99 ± 0,00 | 35,47 ± 0,19 | 7 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00173310_m1 (KCHIP3) | 0,9 | -3,24 ± 0,04 | 0,99 ± 0,00 | 38,66 ± 0,13 | 6,8 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00977274_m1 (FREQ) | 0,3 | -3,24 ± 0,01 | 1,00 ± 0,01 | 30,82 ± 0,34 | 6,3 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom assay (HCN2) | 0,9 | -3,27 ± 0,03 | 0,99 ± 0,01 | 33,23 ± 0,15 | 6,1 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00380018_m1 (HCN3) | 0,5 | -2,88 ± 0,04 | 0,99 ± 0,00 | 37,94 ± 0,02 | 4,1 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00975492_m1 (HCN4) | 0,7 | -3,38 ± 0,02 | 1,00 ± 0,01 | 37,86 ± 0,07 | 5,3 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00912929_m1 (TRIP8B) | 1,0 | -3,46 ± 0,02 | 0,99 ± 0,00 | 36,37 ± 0,05 | 6,2 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01546817_m1 (SK3) | 0,7 | -3,34 ± 0,01 | 1,00 ± 0,00 | 36,09 ± 0,02 | 6,5 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00930499_m1 (CaV1.2) | 0,5 | -2,73 ± 0,04 | 0,99 ± 0,01 | 36,25 ± 0,07 | 5,3 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01073331_m1 (CaV1.3) | 0,5 | -3,61 ± 0,03 | 0,99 ± 0,01 | 38,33 ± 0,09 | 5,4 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00265026_s1 (KIR6.2) | 0,4 | -3,16 ± 0,10 | 0,98 ± 0,01 | 35,35 ± 0,33 | 5,4 | 3 (3 - 0,03 ng) | B |
| Hs01093770_m1 (SUR1) | 0,3 | -3,29 ± 0,15 | 0,98 ± 0,01 | 36,96 ± 0,25 | 6,4 | 3 (30 - 0,3 ng) | A |
| Hs01074087_m1 (SUR2) | 0,4 | -3,48 ± 0,02 | 0,99 ± 0,00 | 38,17 ± 0,03 | 4,4 | 3 (3 - 0,03 ng) | B |
| Hs00609557_m1 (NMDAR1) | 0,5 | -3,21 ± 0,04 | 0,99 ± 0,01 | 32,27 ± 0,10 | 5,6 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom Assay (ACTB) | 0,5 | -3,62 ± 0,04 | 1,00 ± 0,00 | 31,77 ± 0,07 | 6,6 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom assay (JMJD1C) | 0,5 | -3,36 ± 0,01 | 0,99 ± 0,00 | 35,54 ± 0,12 | 5,4 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00157360_m1 (ENO2) | 0,2 | -3,35 ± 0,06 | 1,00 ± 0,01 | 31,25 ± 0,19 | 4,8 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00204937_m1 (IGSF-4) | 0,3 | -3,37 ± 0,08 | 0,99 ± 0,01 | 32,29 ± 0,28 | 6,8 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01029336_m1 (HOMER1) | 0,2 | -3,20 ± 0,02 | 0,99 ± 0,01 | 32,80 ± 0,25 | 6,2 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00998537_m1 (WNT5A) | 0,4 | -3,43 ± 0,12 | 0,97 ± 0,02 | 37,53 ± 0,98 | 7 | 2 (300 - 30 ng) | C |
| Hs01047719_m1 (GSK3B) | 0,4 | -3,34 ± 0,15 | 0,99 ± 0,01 | 34,14 ± 0,31 | 5,1 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| custom Assay (LDH-B) | 0,7 | -3,34 ± 0,04 | 1,00 ± 0,00 | 28,54 ± 0,22 | 7,2 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs00765553_m1 (CCND1) | 0,3 | -3,54 ± 0,06 | 0,98 ± 0,01 | 36,11 ± 0,06 | 4,9 | 4 (30 - 0,3 ng) | B |
| Hs00255800_m1 (TIF-1A) | 0,7 | -3,34 ± 0,07 | 0,99 ± 0,00 | 38,33 ± 0,04 | 5,8 | 3 (3 - 0,03 ng) | A |
| Hs01112335_m1 (ATM) | 0,7 | -3,40 ± 0,01 | 1,00 ± 0,01 | 36,00 ± 0,05 | 5,6 | 4 (3 - 0,03 ng) | A |

Tabelle 15 – Qualitätsanalyse der für die humanen Analysen verwendeten Assays.

Zusammenfassung der Standardkurvenparameter sowie die Klassifizierung nach Kategorien: Kategorie A – uneingeschränkt geeignet, B – eingeschränkt geeignet, C – nicht geeignet für Einzelzell real-time qPCR. (*Assay zur Detektion von NACP126 aus Abb. 29)

Tabelle 13 fasst alle Standardkurvencharakteristika anhand von Steigung, Bestimmtheitsmaß (R^2), *Y-Intercept*, absolutem Fluoreszenzunterschied, Anzahl der unabhängigen Evaluierungen und Kategorie der verwendeten humanen TaqMan-Assays zusammen. Assays,

die aufgrund dieser Analyse als uneingeschränkt für die *real-time* qPCR Analysen von einzelnen Zellen geeignet waren, wurden in Tabelle 15 der Kategorie A zugeordnet. Assays, die eine grenzwertige Effizienz aufwiesen, wurden der Kategorie B zugeordnet; Assays, die für die Einzelzell qPCR-Analysen aufgrund ihrer suboptimalen Effizienz oder Sensitivität als weniger geeignet erschienen, wurden der Kategorie C zugeordnet.

3.4.2 Untersuchung des Einflusses von Fixier- und Färbeprozedur auf die RNA-Qualität von Hirngewebeschnitten

Zum Vergleich der RNA-Qualität von nativen Kryo-Gewebeschnitten mit CV-gefärbten, EtOH-fixierten, UV-LMD behandelten (im 10x Objektiv mittels UV-LMD ablatiert) Schnitten wurde murine RNA aus entsprechenden Schnitten parallel mit demselben RNeasy MINI Kit isoliert und auf demselben RNA-Nano-Chip in Triplikaten aufgetragen (n = 3, Mäuse im Alter von 18, 22 und 23 Tagen).

Wie in Abbildung 30 anhand einer Beispielmessung illustriert, waren die RIN-Werte der RNA aus nativem ($9,03 \pm 0,41$) und der nach UV-LMD Standardprotokoll behandelten Schnitte ($8,97 \pm 0,34$) nicht signifikant unterschiedlich ($p = 1,00$; n = 3; Tab. 16).

Nach RNA-Präzipitation war der RIN-Wert der beiden Gewebeproben etwas niedriger, jedoch nicht signifikant (RNA aus nativem, präzipitiertem Kryogewebe: $7,83 \pm 0,20$; RNA aus CV-gefärbtem, EtOH-fixiertem, UV-LMD behandeltem Gewebe: $7,67 \pm 0,22$; p jeweils = 0,10; n = 3). Zwischen den präzipitierten RNAs ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p = 0,51$, n = 3). Die Fixierung und Färbung der Hirnschnitte, sowie ggf. eine RNA-Präzipitation hat demnach keinen negativen Einfluss auf die RNA-Qualität.

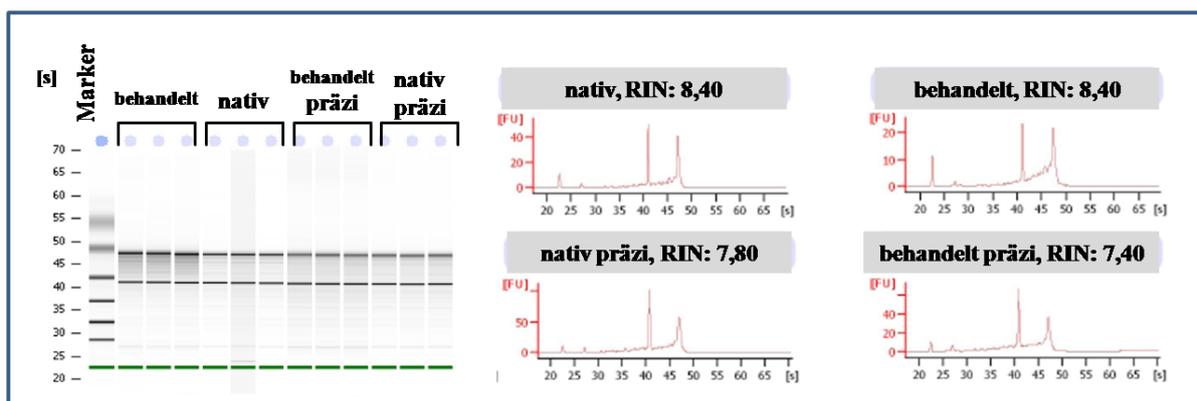


Abbildung 30 – RNA-Qualitätsvergleich von nativen und fixierten & gefärbten murinen Gewebeschnitten. Die Abbildung zeigt beispielhaft das virtuelle RNA-Gel (links) und zugehörige Elektropherogramme (rechts) eines Agilent RNA-Chips von RNA isoliert aus nativem Kryogewebe (nativ) und aus CV-gefärbtem, EtOH-fixiertem, UV-LMD behandeltem Gewebe (behandelt) desselben Maushirns vor und nach Präzipitation der RNA (präzi). Die Elektropherogramme ergeben sich aus der Auftragung fluoreszierender Einheiten (FU) gegenüber der Laufzeit (in Sekunden [s]). Details siehe Text und Tab. 16.

| Probe | RIN | p-Werte | | | |
|-------------------|-------------|---------|-----------|---------------|-------------------|
| | | nativ | behandelt | nativ, präzi. | behandelt, präzi. |
| nativ | 9,03 ± 0,41 | - | 1,00 | 0,10 | 0,10 |
| behandelt | 8,97 ± 0,34 | | - | 0,10 | 0,10 |
| nativ, präzi. | 7,83 ± 0,20 | | | - | 0,51 |
| behandelt, präzi. | 7,67 ± 0,22 | | | | - |

Tabelle 16 – RIN-Vergleich von nativem und behandeltem Gewebe.

Mittlere RIN-Werte muriner RNA nach Isolation aus nativem (nativ) und mit CV-gefärbten, EtOH-fixiertem, UV-LMD behandeltem (behandelt) Gewebe vor und nach RNA-Präzipitation (präzi.), sowie Vergleich der Daten (n = 3; p-Werte gemäß Wilcoxon-Test in R, Details vgl. Text).

3.4.3 Evaluation von Sensitivität und Spezifität der *real-time* qPCR-Assays

Da die RNA-Qualität des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten humanen Kontrollgewebes signifikant etwas niedriger als die des PD-Gewebes ist, war es essentiell, empirisch zu ermitteln, ob die eingesetzten TaqMan-Assays abhängig von der Degradationsstufe der RNA bei gleicher RNA-Menge artifiziell unterschiedliche *real-time* qPCR-Ergebnisse lieferten. Hierzu wurde frisch isolierte murine Mittelhirn-RNA kontrolliert thermisch degradiert. Von einer RNA-Probe (95 ng/μl in 200 μl H₂O) wurden 50 μl direkt bei -80°C eingefroren, jeweils 50 μl bei 70°C im Thermoblock für 30, 45 bzw. 72 min inkubiert und anschließend bei -80°C bis zur RIN-Bestimmung aufbewahrt.

In Abbildung 31 sind die RIN-Messergebnisse und die Auswertungen eines murinen TaqMan-Assays (mLdh-b, 72 bp) nach cDNA-Synthese und *real-time* qPCR dieser Proben zusammengefasst. Die RNA-Thermoinkubation ergab eine serielle Degradation der RNA von RIN 9,9 auf RIN 7,4 nach 30 min, auf RIN 6,8 nach 45 min und auf RIN 5,9 nach 72 min bei 70°C. Dieser RIN-Range entsprach der den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Proben (Abb. 23 und Tab. 11).

Die RNAs unterschiedlicher Qualität wurden sowohl mit dem etablierten Protokoll, sowie dem neu entwickelten miScript-Kombinationsprotokoll (vgl. 2.2.4.5 und 3.2.4) in cDNA übersetzt, in 10er Stufen seriell verdünnt (1:10²-1:10⁵; Standardprotokoll: 35 ng bis 0,035 ng; neues miScript-Protokoll: 50 ng bis 0,05 ng – Unterschiede in ng beruhen auf Konzentrationsbestimmung mittels Picodrop gegen Wasser, was Unterschiede in der Zusammensetzung der Synthesemixe nicht berücksichtigt) und zur Generation von Assay-Standardkurven (mLdh-b; 72 bp) in die *real-time* qPCR eingesetzt. Die Ct-Werte (*threshold* 0,5), die Steigung der Standardkurven (p = 0,34) und das Bestimmtheitsmaß R² (p = 1,00) zeigten keine signifikante Veränderung zwischen den Proben mit gleichen *Templates* aber unterschiedlichen RIN-Werten (Abb. 31, p-Werte der einzelnen Verdünnungstufen: 35 ng / 50 ng: p = 0,10; 3,5 ng / 5 ng: p = 0,38; 0,35 ng / 0,5 ng: p = 0,10; 0,035 ng / 0,05 ng: p = 0,11).

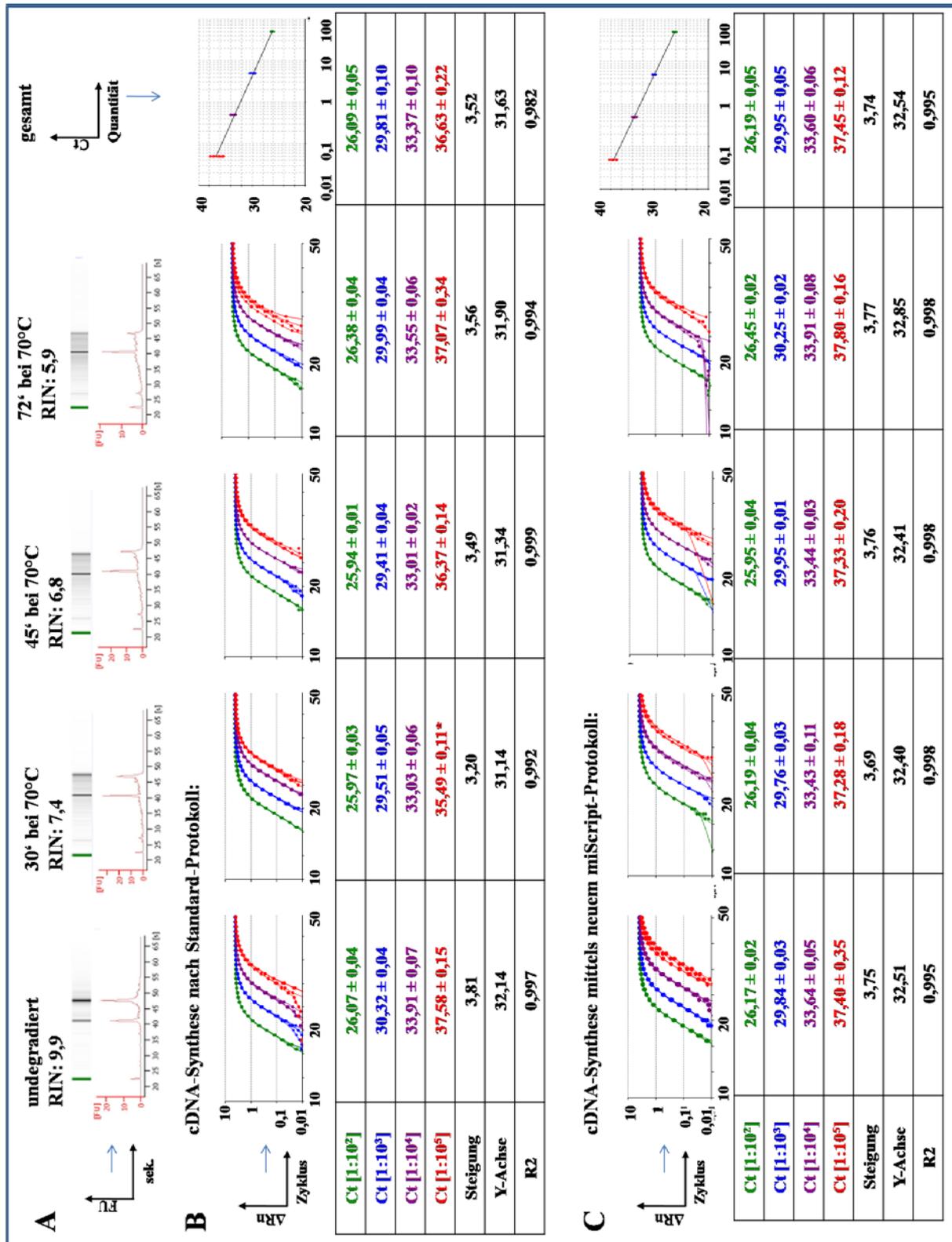


Abbildung 31 – Einfluss der RNA-Degradation auf *real-time* qPCR Ergebnisse.

Zusammenfassung der RNA-Qualitätsanalysen derselben RNA-Menge mit unterschiedlicher RIN nach Thermodegradation bei 70°C (A) und den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse (mLdh-b) nach direkter cDNA-Synthese mittels *random* Hexameren (B) und nach kombinierter cDNA-Synthese mit Polyadenylierung zur gleichzeitigen Amplifikation von mRNA und miRNA (C). Die Standardkurven aller Experimentierserien mit gleicher RNA-Menge als Template ergaben im Bereich von RIN 5,9 bis 9,9 vergleichbare *real-time* qPCR-Ergebnisse (Details siehe Text).

Besonders an der letzten Verdünnungsstufe mit durchschnittlich $36,63 \pm 0,22$ Ct ($1:10^5$ [0,035 ng]) des Standardprotokolls und $37,45 \pm 0,12$ Ct ($1:10^5$ [0,05 ng]) ist sehr gut zu erkennen, dass die *real-time* qPCR mit dem verwendeten mLdh-b-Assay robuste Ergebnisse, unabhängig von der RNA-Qualität, lieferte (Abb. 31).

Die unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen, trotz gleicher RNA-Menge für die cDNA-Synthese, beruhen höchstwahrscheinlich auf den verschiedenen cDNA-Synthesemixen, da bei der Konzentrationsbestimmung gegen Wasser gemessen wurde.

3.5 Genexpressionsanalyse individueller humaner dopaminergere Mittelhirnneurone

Die zellspezifische Untersuchung der mRNA von individuellen NM-positiven dopaminergen Mittelhirnneuronen aus Kontrollen und PD erfolgte nach UV-LMD von zehn Pools mit jeweils 15 individuellen Zellen je Gehirn und anschließender *real-time* qPCR-Analyse. Mit einem 15er Zellpool wurden zehn verschiedene Gene parallel untersucht, also pro Reaktion 1,5 Zellen eingesetzt. Für alle Poolserien wurde immer die Expression von TH-mRNA quantifiziert und im Anschluss maximal neun weitere Gene. Eine Serie von zehn Expressionsuntersuchungen wurde als Assayserie bezeichnet. Insgesamt wurden fünf Assayserien durchgeführt, die letzte Serie mit dem neu etablierten miScript Protokoll für parallele mRNA- und miRNA-Quantifizierung. In der ersten Serie wurden Daten aus fünf Kontrollhirngeweben und fünf PD-Hirngeweben verwendet und für die weiteren vier Assayserien Daten von je acht Kontrollen und fünf PDs (Details siehe Tab. 11).

Die mikrodisezierten NM-positiven Neurone des Kontrollgewebes K-SN 7 lieferten in allen Assayserien für alle Gene signifikant unterschiedliche Expressionswerte im Vergleich zu allen anderen Kontrollen und wurden daher aus der Statistik entfernt, obwohl die basale Charakterisierung keine signifikanten Auffälligkeiten zeigte (Abb. 23 & Tab. 11 & 12).

3.5.1 Evaluation der TH-Genexpression verschiedener Assayserien

Wie in Abbildung 32 ersichtlich, sind die detektierten mittleren Expressionslevel für TH in Assayserie 1 und 5 für Kontrollen und PD nicht signifikant unterschiedlich, obwohl die cDNA-Synthese der Assayserie 1 nach Standardprotokoll und die der Assayserie 5 mit dem neuen miScript-Protokoll erfolgte.

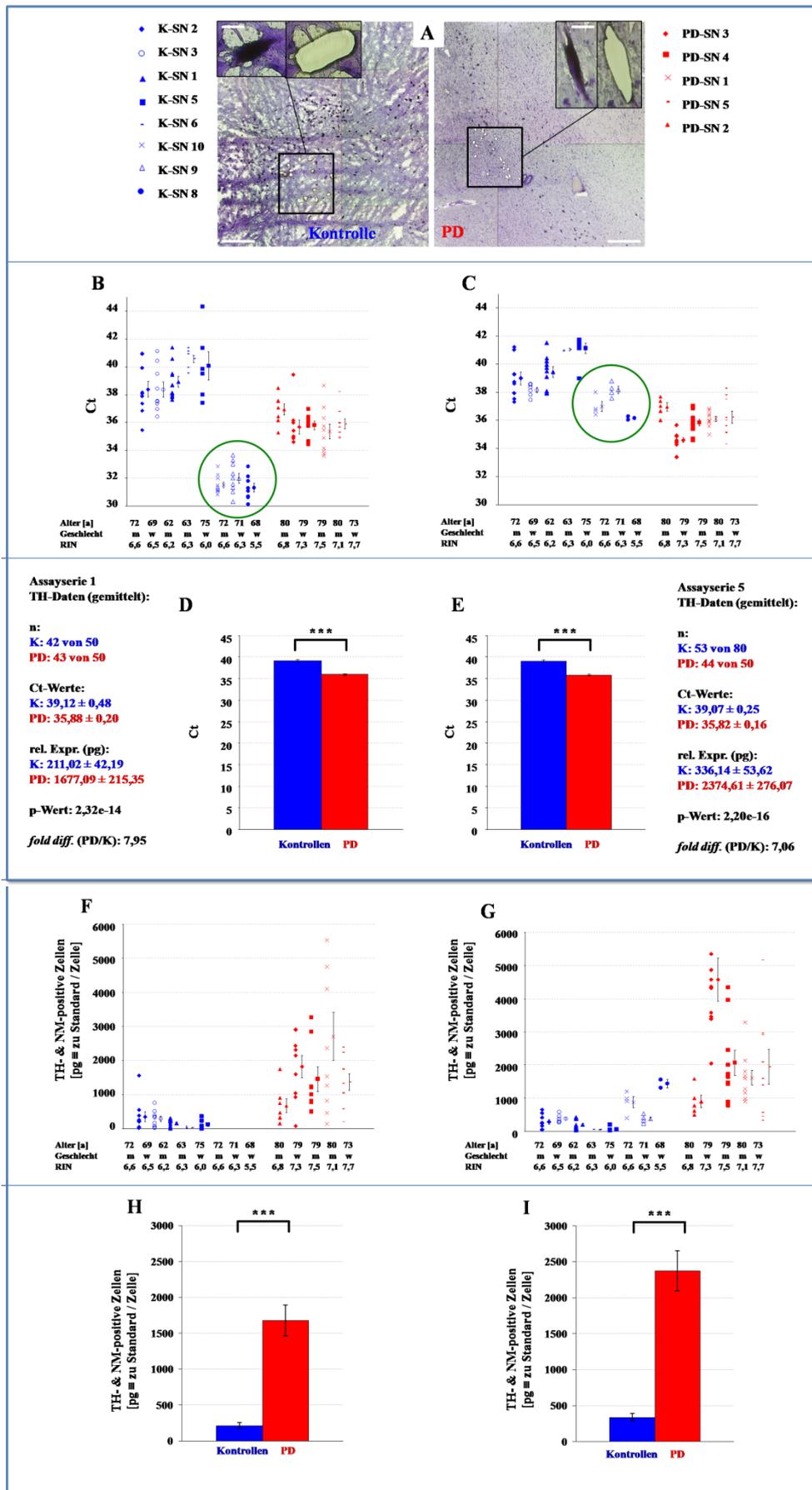


Abbildung 32 – Genexpression von TH (Assayserie 1 und 5). Beispiel der Lasermikrodissektion individueller NM-positiver SN Neurone der humanen Kontrollen (blau, A) und PD (rot, A) mit anschließender TH-Genexpressionsanalyse. (A: Größenbalken der Übersicht 500 µm und den Einzelzellen 25 µm). Scatterplots der Ct-Werte (B & C) und der relativen Expressionen (F & G) der Einzelhirne, sowie Balkendiagramme der Mittelwerte aus den Ct-Werten (D & E) und den relativen Expressionen (H & I). Die Balkendiagramme beziehen sich auf die gemittelten Daten aller Kontroll- (blau) und aller PD-Einzelwerte (rot). Zum Vergleich sind die TH-Genexpressionsergebnisse der Assayserien 1 (B, D, F & H) und 5 (C, E, G & I) gegenübergestellt. Im Scatterplot der Ct-Werte aus Assayserie 1 und 5 sind die Ergebnisse der hinzugefügten Kontroll-Mittelhirngewebe K-SN 8, K-SN 9 und K-SN 10 grün markiert (B, C).

Aus dem Scatterplot der Ct-Werte von TH der Assayserie 1 (Abb. 32 B) sind deutlich abweichende Ct-Werte der Kontrollproben K-SN 8, K-SN 9 und K-SN 10 zu erkennen (Abb. 32 B, grüne Markierung). Diese Proben wurden nachträglich und separat von den anderen Proben dieser Serie mit Chemikalien anderer Lot-Nummern untersucht.

Der Vergleich der Ct-Werte aus Assayserie 1 der unterschiedlichen Proben mit ANOVA ergab entsprechend für die BrainNet-Kontrollproben (Tab. 10) mit den neuen Proben K-SN 8, K-SN 9 und K-SN 10 (Ulm, Tab. 10) einen p-Wert von $1,53e-27$. Ein Vergleich der BrainNet-Kontrollproben mit den neuen Kontrollproben mittels Wilcoxon-Test ergab einen signifikanten Unterschied von $p = 2,2e-16$.

ANOVA-Tests der Ct-Werte der BrainNet-Kontrollproben allein ($p = 0,07$) oder der PD-Proben ($p = 18$) ergaben keine Signifikanz. Aufgrund dieser methodisch bedingten Abweichungen der Kontrollproben K-SN 8, K-SN 9 und K-SN 10 in Assayserie 1 wurden diese für die statistischen Analysen der Assayserie 1 ausgeschlossen.

Die Analysen der Ct-Werte der Assayserie 5 ergaben nach ANOVA der Kontrollproben einschließlich K-SN 8, K-SN 9 und K-SN 10 einen p-Wert von $6,5e-8$. Dies deutet zwar auf Inhomogenitäten innerhalb der Kontrollen hin, jedoch ergab ein Vergleich der BrainNet-Kontrollproben mit den neuen Kontrollproben K-SN 8, K-SN 9 und K-SN 10 mittels Wilcoxon-Test einen p-Wert von $0,12$, sodass diese für weitere Analysen verwendet werden konnten.

Wurde die Kontrollprobe K-SN 7 in die p-Wert-Berechnung mittels ANOVA oder Wilcoxon-Test mit einbezogen, ergab dies immer signifikante Abweichungen, was auf die stets deutlich niedrigeren Ct-Werte (ca. 3 Ct vor nächst niedrigerem Ct-Wert) im Vergleich zu allen anderen (auch PD-Proben) Proben zurückzuführen ist. Die Kontrollprobe K-SN 7 wurde daher, wie schon in Kapitel 3.5 beschrieben aus sämtlichen statistischen Analysen aller Assayserien ausgeschlossen.

Die *real-time* qPCR-Analyse der TH-Expression ergab insgesamt aus allen Signalen für Assayserie 1 signifikant höhere Ct-Werte, also niedrigere mRNA-Level der Kontrollproben ($39,12 \pm 0,48$; $n = 42$ von 50 analysierten Zellpools) im Vergleich zu den PD-Proben ($35,88 \pm 0,20$; $n = 43$ von 50 analysierten Zellpools; $p = 2,32e-14$; Abb. 32 B & D). Die Ct-Werte der analogen Analysen für Assayserie 5 ergaben ebenfalls signifikant spätere Ct-Werte der Kontrollproben ($39,07 \pm 0,25$; $n = 45$ von 80 analysierten Zellpools) im Vergleich zu den PD-Proben ($35,82 \pm 0,16$; $n = 44$ von 50 analysierten Zellpools; $p = 2,20e-16$; Abb. 32 C & E). Die relative Expression von TH, gemessen an SN cDNA-Standard, betrug pro Neuron der Kontrollproben der Assayserie 1 $211,02 \pm 42,19$ pg und pro Neuron der PD-Proben

1677,09 ± 215,35 pg, also 7,95fach höhere mRNA-Level in SN DA Neuronen der PD-Proben (Abb. 32 F & H). Für Assayserie 5 ergaben sich relative Expressionen der Kontrollproben von 336,14 ± 53,62 pg und 2374,61 ± 276,07 pg pro Zelle der PD-Proben, entsprechend siebenfach höhere mRNA-Level in PD (Abb. 32 G & I).

Diese signifikanten Unterschiede wurden durch Mittelwertberechnung aus den Mittelwerten jeder Gewebeprobe bestätigt (nicht gezeigt). Nach der Δ Ct-Methode war TH im Schnitt aller fünf Assayserien neunfach, nach relativer Expression zehnfach höher in PD exprimiert als in Kontrollen.

Abbildung 33 und Tabelle 19 fassen die Expression von TH aller Assayserien (1-5) individueller, lasermikrodissektierter NM-positiver SN-Neurone zusammen.

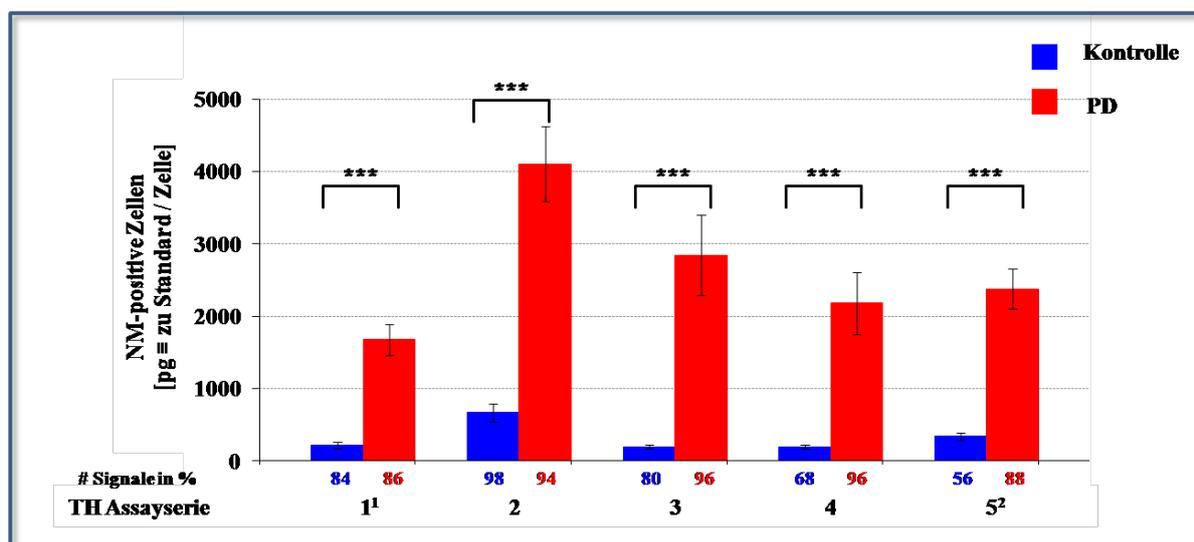


Abbildung 33 – Übersicht Genexpression von TH der 5 Assayserien.

Balkendiagramm der gemittelten mRNA-Level von TH der Assayserien 1 bis 5. In der Spalte „# Signale in %“ ist zu den jeweiligen Kontroll- und PD-Daten angegeben, wie viel Prozent von NM-positiven Proben auch TH Signale geliefert haben. Details siehe Text. (¹Daten aus Assayserie 1 ohne Daten der „neuen“ Kontrollen (Ulm); ²Daten aus Assayserie 5 mit miScript-Lasermix)

Die relativen Expressionslevel und die Ct-Werte von TH variierten zwischen den einzelnen Assayserien und innerhalb der Assayserien zwischen den verschiedenen Hirngeweben. Der Anteil an TH-positiven Signalen wurde mit späteren Assayserien geringer (Abb. 33, Tab. 18), dies traf insbesondere auf die Signale der Kontrollgruppe zu. Innerhalb der Kontrollgruppe waren die Gewebeprobe K-SN 5 und K-SN 6 diejenigen, die hauptsächlich an Signalen verloren. Insgesamt war TH signifikant höher in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen exprimiert.

3.5.2 Vergleichende Expressionsanalysen von Mittelhirngewebe versus UV-LMD-dissektierte NM-positive DA Mittelhirnneurone

Die mRNA-Genexpression der dopaminergen Marker-, Differenzierungs- und Maintenancegene, sowie des allgemeinen Neuronenmarkers ENO2 wurde zum Vergleich in Mittelhirngewebe normalisiert zu β -Actin und in UV-LMD isolierten NM-positiven DA SN Neuronen bestimmt (Abb. 34 & Tab. 17 & 19).

Der Vergleich der *real-time* qPCR-Daten aus Mittelhirngewebe mit denen aus NM-positiven DA Neuronen zeigte, dass die Gewebedaten, wie zu erwarten war, zu anderen Ergebnissen führten als die Einzelzellanalysen. Die Expression von miR-133b war in *post-mortem* SN-Gewebe von PD-Patienten signifikant reduziert ($p = 8,8e-9$), in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen jedoch nicht ($p = 0,80$) (Abb. 34 A, Tab. 17 & 19). Die Expression des Neuronenmarkers ENO2 hingegen war in Gewebe unverändert ($p = 0,45$), wies jedoch in NM-positiven DA Neuronen von PD-Patienten signifikant erhöhte (sechsfach) Expressionslevel im Vergleich zu Kontrollen auf ($p = 3,7e-9$) (Abb. 34 A, Tab. 17 & 19). ENO2 ist folglich auf Ebene einzelner DA Mittelhirnneurone nicht zur Normalisierung geeignet.

Die Expression der DA-Markergene NURR1 und PITX3 wiesen weder in Mittelhirngewebe (NURR1: $p = 0,08$; PITX3: $p = 0,13$), noch in Einzelzellen (NURR1: $p = 0,98$; PITX3: $p = 0,16$) signifikante Unterschiede auf, wobei der Nachweis von PITX3 in Einzelzellen mit 9 aus 45 Kontrollproben und 9 aus 44 PD-Proben NM-positiver DA Mittelhirnneurone generell gering ausfiel (Abb. 34 B, Tab. 17 & 19). Die DA-assoziierten Gene TH, DAT und VMAT2 wiesen bei Einzelzellanalysen jedoch alle stark und signifikant erhöhte Genexpression in PD auf (TH: $p = 1,63e-10$ bis $2,2e-16$; DAT: $p = 2,9e-10$; VMAT2: $p = 0,001$). Bei TH war diese erhöhte Genexpression in der Tat auch in Mittelhirngewebe detektierbar ($p = 0,048$), obwohl im PD-Gewebe wesentlich weniger NM-positive Neurone vorhanden waren. Bei DAT war eine erhöhte Expression im Mittelhirngewebe nicht detektierbar. VMAT2 wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei Gewebeanalysen auf ($p = 0,43$) (Abb. 34 C, Tab. 17 & 19). Das Marker- und Maintenancegen D2 und der zugehörige Ionenkanal GIRK2 zeigten ebenfalls signifikant höhere mRNA-Level in Einzelzellen (D2: $p = 9,0e-8$; GIRK2: $p = 5,6e-10$), welche in Gewebe bei beiden Genen nicht nachweisbar war (D2: $p = 0,31$; GIRK2: $p = 0,09$) (Abb. 34 D, Tab. 17 & 19).

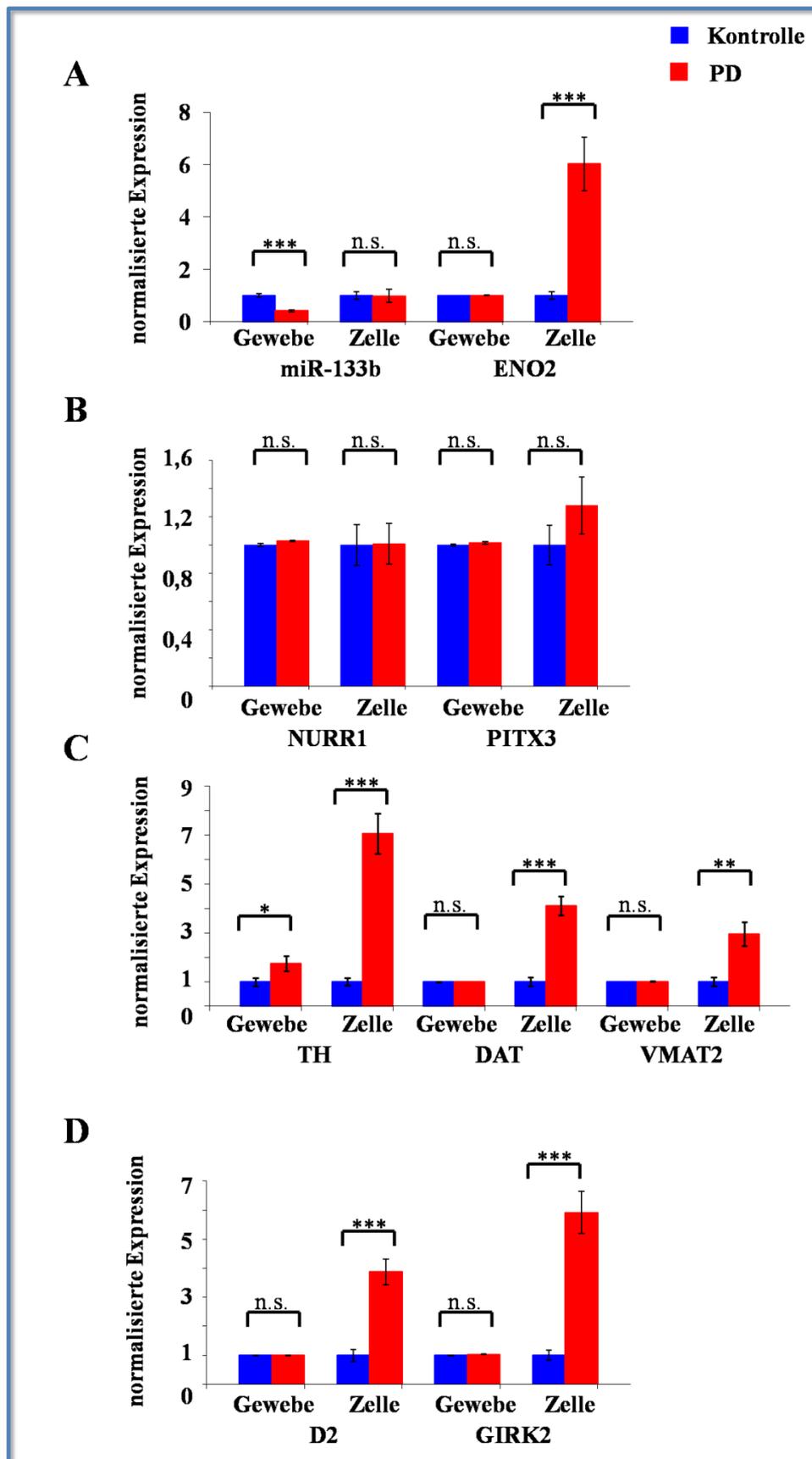


Abbildung 34 – Notwendigkeit der Zellspezifität für Genexpressionsanalysen von Gewebe unterschiedlicher Zusammensetzung (wie von z.B. PD mit Kontrollen). Vergleich der relativen *real-time* qPCR Ergebnisse der miRNA miR-133b, dem Neuronenmarker ENO2, sowie mehrerer spezifischer DA Markergene für Mittelhirngewebe und spezifisch für NM-positive DA Neurone von PD-Patienten und Kontrollen. Details siehe Text und Tabellen 17 & 19.

| Gen | normalisiert (β -Actin) | | normalisiert (Kontrolle = 1) | | <i>fold. diff.</i> (K/PD) | p-Wert | Anzahl Kontrollen | Anzahl PD |
|----------|--------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|---------|----------------------|--------------|
| | Kontrolle | PD | Kontrolle | PD | | | | |
| | MW \pm SEM | MW \pm SEM | MW \pm SEM | MW \pm SEM | | | | |
| miR-133b | 0,02 \pm 0,00 | 0,01 \pm 0,00 | 1,00 \pm 0,07 | 0,42 \pm 0,03 | 0,42 | 8,77e-9 | 32 / 32 | 20 / 20 |
| ENO2 | 1,17 \pm 0,01 | 1,18 \pm 0,00 | 1,00 \pm 0,01 | 1,01 \pm 0,00 | 1,01 | 0,4489 | 32 / 32 | 20 / 20 |
| NURR1 | 1,34 \pm 0,01 | 1,37 \pm 0,01 | 1,00 \pm 0,01 | 1,03 \pm 0,01 | 1,03 | 0,0779 | 27 / 32 | 19 / 20 |
| PITX3 | 1,39 \pm 0,01 | 1,41 \pm 0,01 | 1,00 \pm 0,01 | 1,02 \pm 0,01 | 1,02 | 0,1310 | 21 / 32 | 12 / 20 |
| TH | 0,29 \pm 0,05 | 0,51 \pm 0,09 | 1,00 \pm 0,17 | 1,75 \pm 0,32 | 1,75 | 0,0475 | 31 / 32 | 20 / 20 |
| DAT | 1,31 \pm 0,02 | 1,31 \pm 0,01 | 1,00 \pm 0,01 | 1,00 \pm 0,01 | 1,00 | 0,9026 | 26 / 32 | 19 / 20 |
| VMAT2 | 1,34 \pm 0,01 | 1,36 \pm 0,02 | 1,00 \pm 0,01 | 1,01 \pm 0,01 | 1,00 | 0,4326 | 28 / 32 | 19 / 20 |
| D2 | 1,29 \pm 0,01 | 1,28 \pm 0,01 | 1,00 \pm 0,01 | 1,00 \pm 0,01 | 1,00 | 0,3050 | 31 / 32 | 20 / 20 |
| GIRK2 | 1,45 \pm 0,02 | 1,50 \pm 0,01 | 1,00 \pm 0,01 | 1,03 \pm 0,01 | 1,03 | 0,0903 | 23 / 32 | 18 / 20 |

Tabelle 17 – Daten für Dopamin- und Neuronenmarkergene aus Gewebeanalysen.

Daten der *real-time* qPCR Genexpressionsanalysen aus SN Gewebe normalisiert auf β -Actin. Die Ct-Werte von β -Actin waren nahe an der Signifikanzgrenze, die relative Expression signifikant in den PD-Proben erhöht (Ct-Werte (β -Actin): K: 28,88 \pm 0,35, PD: 27,82 \pm 0,28, p = 0,0645; rel. Expr.: K: 7,70 \pm 0,86, PD: 13,08 \pm 0,96, p = 0,0001). Die normalisierte TH-Expression war signifikant erhöht, die miRNA miR-133b zeigte signifikant reduzierte Expression in den PD-Proben. Weitere Details siehe Text und Abb. 34.

Zusammenfassend ist die auf Einzelzellebene erhöhte mRNA-Expression von ENO2, TH, DAT, VMAT2, sowie D2 und GIRK2 nicht mit einer Reduktion der Expression von miR-133b assoziiert, sondern die detektierte Reduktion mit der unterschiedlichen zellularen Zusammensetzung von Kontrollmittelhirngewebe und PD-Mittelhirngewebe zu erklären. Diese Befunde verdeutlichen erneut die Wichtigkeit der Einzelzell-Auflösung, wenn die zu vergleichenden Gewebe zellulär deutlich unterschiedlich zusammengesetzt sind, wie es z.B. im Mittelhirngewebe von PD-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen der Fall ist. Daher wurde im Folgenden auf die Untersuchung von kompletten Mittelhirngeweben verzichtet und nur individuelle, NM-positive DA Mittelhirnneurone nach UV-LMD für die Genexpressionsstudien eingesetzt.

3.5.3 Expressionsanalysen Dopamin-assoziiertes Gene

Zunächst wurden die mRNA-Level Dopamin-assoziiertes Gene, sowie weiterer Markergene von Neuronen (ENO2), bzw. der Marker für weniger vulnerable DA Mittelhirnneurone CB und eines Dopamin und PD unabhängigen, ubiquitär exprimierten Gens (JMJD1C) untersucht. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen nach UV-LMD individueller NM-positiver DA Mittelhirnneurone sind in Abbildung 35 und Tabelle 19 zusammengefasst.

Die Genexpression des Dopamintransporters DAT zeigte signifikante Unterschiede (p = 2,92e-10) mit mehr als vierfach höherer Expression TH- und NM-positiven DA SN Neuronen von PD-Proben. Die Expression des vesikulären Mono-Amin-Transporters VMAT2 war ebenfalls signifikant (p = 0,001) ca. dreifach erhöht in PD-Proben (Abb. 35 A, Tab. 18).

Der D2 Dopamin-Autorezeptor (vierfach erhöht, p = 9e-8) und der durch diesen Rezeptor aktivierte GIRK2-Kanal (sechsfach erhöht, p = 5,6e-10) wiesen ebenfalls signifikant höhere

mRNA-Level DA Mittelhirnneurone der PD-Proben im Vergleich zu Kontrollproben auf. Weiterhin ergaben splicevariantenspezifische Untersuchungen, die Tendenz einer 1,5fachen Hochregulation, sowie der D2s- als auch der D2l-Transkripte. Diese erhöhte Expression in PD-Proben war für D2l signifikant ($p = 0,03$), bei D2s nicht ($p = 0,16$; Abb. 35 A, Tab. 18). Die DA Differenzierungs- und Maintenancegene NURR1 ($p = 0,98$) und PITX3 ($p = 0,16$), sowie die mit PITX3 in Verbindung gebrachte miRNA miR-133b (Kim et al., 2007) ($p = 0,80$) zeigten, wie schon beschrieben (s.o.), keine signifikanten Veränderungen der Genexpression, wobei PITX3 die geringste Anzahl an Signalen (18 von 99 insgesamt) aufwies (Abb. 35 B, Tab. 18).

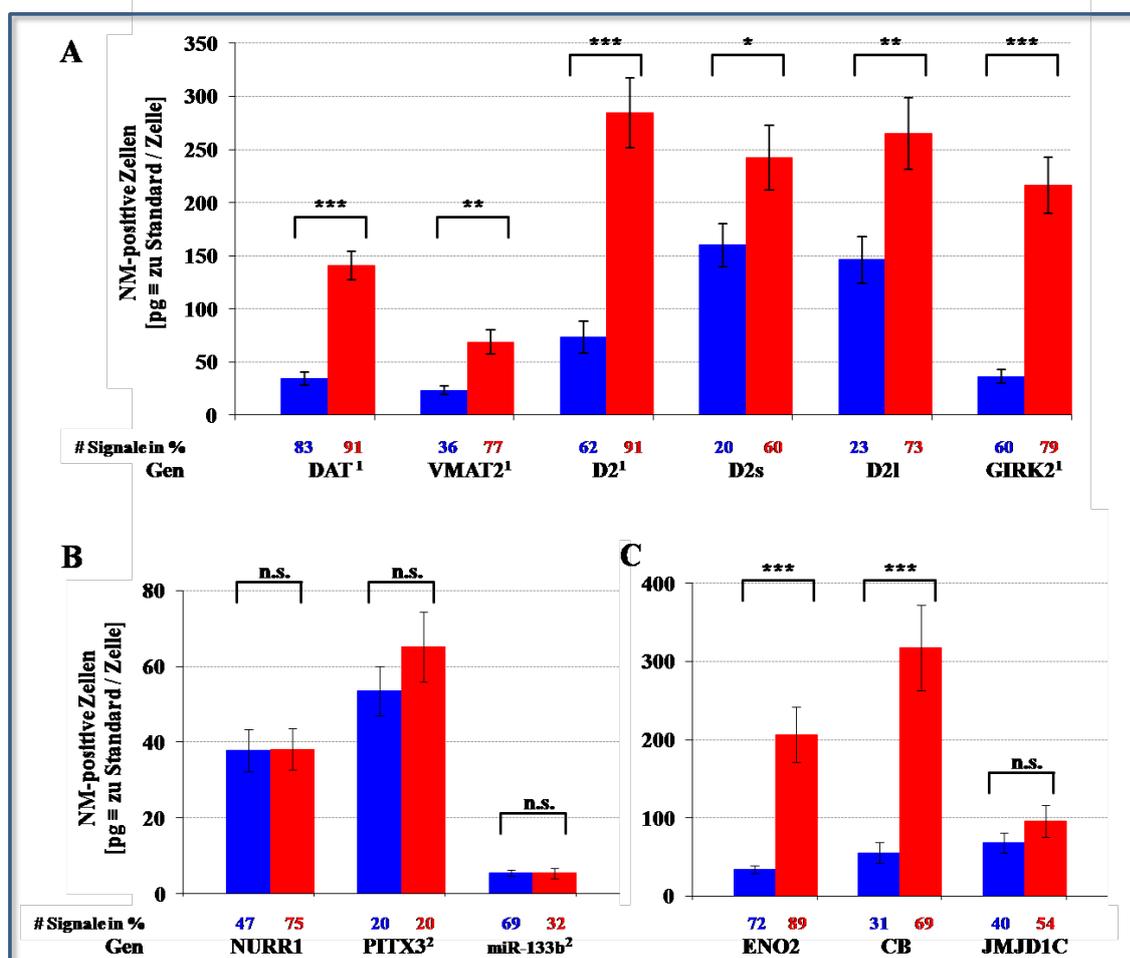


Abbildung 35 – Übersicht der mRNA-Expression dopaminerger Markergene in DA Mittelhirnneuronen. Balkendiagramm DA-Markergene (B & C), sowie weiterer Markergene (D). Die DA Markergene (DAT, VMAT2, D2 (s/l) und GIRK2) sind höher in humanen, *post-mortem*, NM-positiven SN Neuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen exprimiert (B). Die DA Markergene NURR1 und PITX3, sowie die für diese Gene als regulatorisch beschriebene miRNA miR-133b (C) und die Expression des unabhängigen Markergens JMJD1C (D) sind nicht signifikant unterschiedlich. Die mRNA des Neuronenmarkers ENO2 und des Markers für resistenterere DA Mittelhirnneurone CB sind signifikant in den PD DA Neuronen erhöht. In der Spalte „# Signale in %“ ist zu den jeweiligen Kontroll- und PD-Daten angegeben, wie viel Prozent von NM-positiven Proben auch TH Signale geliefert haben (A), bzw. wie viel Prozent von NM- und TH-positiven Proben Signale für das betreffende Gen geliefert haben (B). Details siehe Text (¹Daten aus Assayserie 1 ohne Daten der „neuen“ Kontrollen (Ulm); ²Daten aus Assayserie 5 mit miScript-Lasermix.).

| Genname | Assaylänge | Ct-Wert K rel. Expr. K | Ct-Wert PD rel. Expr. PD | fold. diff. ΔCt PD/K | p-Wert | Anzahl Kontrollen | Anzahl PD | Kategorie |
|-----------------------|------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------|----------------------|--------------|-----------|
| TH-1 ¹ | 63bp | 39,12 ± 0,27 | 35,88 ± 0,20 | 9,44 | 2,32e-14 | 42 / 50 | 43 / 50 | A |
| | | 211,02 ± 42 | 1677,09 ± 215 | 7,94 | 2,32e-14 | | | |
| TH-2 | 63bp | 37,88 ± 0,24 | 34,74 ± 0,21 | 8,81 | 1,10e-13 | 78 / 80 | 47 / 50 | A |
| | | 665,77 ± 123 | 4106,74 ± 518 | 6,17 | 1,10e-13 | | | |
| TH-3 | 63bp | 39,04 ± 0,19 | 35,63 ± 0,24 | 10,59 | 6,66e-16 | 64 / 80 | 48 / 50 | A |
| | | 195,65 ± 27 | 2844,22 ± 556 | 14,54 | 6,66e-16 | | | |
| TH-4 | 63bp | 38,93 ± 0,19 | 36,17 ± 0,28 | 6,78 | 1,63e-10 | 54 / 80 | 48 / 50 | A |
| | | 194,81 ± 26 | 2181,08 ± 428 | 11,2 | 1,63e-10 | | | |
| TH-5 ² | 63bp | 39,07 ± 0,25 | 35,82 ± 0,16 | 9,5 | 2,2e-16 | 45 / 80 | 44 / 50 | A |
| | | 336,14 ± 53 | 2374,61 ± 276 | 7,06 | 2,2e-16 | | | |
| DAT ¹ | 56bp | 37,96 ± 0,26 | 35,73 ± 0,16 | 4,7 | 2,92e-10 | 35 / 42 | 39 / 43 | A |
| | | 34,29 ± 6,23 | 140,94 ± 13,51 | 4,11 | 2,92e-10 | | | |
| VMAT ¹ | 67bp | 41,43 ± 0,24 | 40,04 ± 0,25 | 2,62 | 0,0010 | 15 / 42 | 33 / 43 | A |
| | | 23,24 ± 4,11 | 68,68 ± 11,40 | 2,95 | 0,0010 | | | |
| D2all ¹ | 58bp | 39,93 ± 0,23 | 37,89 ± 0,21 | 4,11 | 9,00e-8 | 26 / 42 | 39 / 43 | A |
| | | 73,49 ± 15,01 | 284,63 ± 32,74 | 3,87 | 9,00e-8 | | | |
| D2s | 73bp | 40,08 ± 0,19 | 39,66 ± 0,17 | 1,34 | 0,1590 | 13 / 64 | 29 / 48 | B |
| | | 160,12 ± 20 | 242,22 ± 30,31 | 1,51 | 0,1590 | | | |
| D2l | 72bp | 38,87 ± 0,23 | 38,10 ± 0,16 | 1,72 | 0,0281 | 15 / 64 | 35 / 48 | B |
| | | 146,42 ± 21 | 365,31 ± 33,55 | 1,81 | 0,0281 | | | |
| GIRK2 ¹ | 71bp | 40,62 ± 0,24 | 38,08 ± 0,20 | 5,82 | 5,60e-10 | 25 / 42 | 34 / 43 | A |
| | | 36,48 ± 6,34 | 216,26 ± 26,22 | 5,93 | 5,60e-10 | | | |
| ENO2 | 77bp | 36,56 ± 0,24 | 33,95 ± 0,26 | 6,12 | 3,69e-9 | 56 / 78 | 42 / 47 | A |
| | | 34,27 ± 4,88 | 206,61 ± 35 | 6,03 | 3,69e-9 | | | |
| CB | 72bp | 41,24 ± 0,32 | 38,62 ± 0,28 | 6,14 | 9,44e-7 | 20 / 64 | 33 / 48 | A |
| | | 55,39 ± 13,06 | 317,70 ± 54,80 | 5,74 | 9,44e-7 | | | |
| JMJD1C | 73bp | 39,46 ± 0,27 | 39,24 ± 0,29 | 1,41 | 0,6638 | 21 / 53 | 26 / 48 | A |
| | | 68,20 ± 12,38 | 96,00 ± 20,64 | 1,17 | 0,6638 | | | |
| NURR1 | 69bp | 42,09 ± 0,20 | 42,21 ± 0,24 | 0,92 | 0,9847 | 30 / 64 | 36 / 48 | A |
| | | 37,83 ± 5,49 | 38,15 ± 5,52 | 1,01 | 0,9847 | | | |
| PITX3 ² | 53bp | 40,99 ± 0,21 | 40,91 ± 0,46 | 1,05 | 0,1615 | 09 / 45 | 09 / 44 | C |
| | | 53,53 ± 6,43 | 65,11 ± 9,29 | 1,05 | 0,1615 | | | |
| miR-133b ² | - | 36,80 ± 0,29 | 36,78 ± 0,38 | 1,01 | 0,7992 | 31 / 45 | 14 / 44 | A |
| | | 5,55 ± 0,77 | 5,44 ± 1,40 | 0,98 | 0,7992 | | | |

Tabelle 18 – Datenzusammenfassung für DA-Neuronen assoziierte Markergen-mRNA-Expression.

Für jedes analysierte Gen sind die Daten der Ct-Wert-Analysen in der oberen und der Analysen der relativen Expression (rel. Expr.) zum SN cDNA Standard [pg-Anteil/Zelle] in der unteren Zeile angegeben. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die Wilcoxon-Tests berechnet aus den Einzelwerten aller Hirne. Die angegebenen Kategorien unterteilen sich wie folgt: Kategorie A – genügend Datenpunkte für eine valide Statistik; Kategorie B – wenig Daten, aber valide Statistik; Kategorie C – nur wenig Daten, daher eingeschränkt valide Statistik. (¹Daten aus Assayserie 1 ohne Daten der „neuen“ Kontrollen (Ulm); ²Daten aus Assayserie 5 mit miScript-Lasermix.)

Die Analysen der CB-mRNA als Marker weniger vulnerabler Neurone zeigte sechsfach höhere Werte in PD-Proben ($p = 4,38e-5$), wobei deutlich mehr Signale in Neuronen der PD-Proben (33 von 48 \approx 69 %) detektiert wurden als in den Kontrollproben (20 von 64 \approx 31 %). Das als PD-unabhängige Markergen gewählte JMJD1C-Gen wies erwartungsgemäß keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression zwischen NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen auf ($p = 0,66$; Abb. 35 C, Tab. 19).

Die Expressionsbestimmung von CB erfolgte in Assayserie 3. Um auszuschließen, dass die Ungleichverteilung CB-positiver Neurone in den gesammelten Proben Einfluss auf die Expressionsdaten und die Statistik nahm, wurden die Gene aus Assayserie 3 (TH, Kv4.3, KCHIP3, LRRK2, NURR1, D2s, D2l und SUR2) in Gruppen CB-negativer und CB-positiver

Neurone eingeteilt und die statistische Auswertung für die CB-negativ Gruppe durchgeführt. Die zuvor festgestellten Signifikanzen veränderten sich nicht und die *fold differences* wiesen vergleichbare Werte auf (Tab. 19).

Auf die Wiederholung der statistischen Auswertung der Gruppe CB-positiver Signale wurde verzichtet, da eine Zelle pro Zellpool ausreicht, um diesen als CB-positiv zu betrachten. D.h. hier könnten 1-15 Zellen für das Signal verantwortlich sein und die genaue Anzahl CB-positiver Zellen im Pool ist nicht bestimmbar. Die Auswertung CB-negativer Zellpools ist aussagekräftig, da sich hier jeder Pool homogen aus CB-negativen, NM-positiven DA Mittelhirnneuronen zusammensetzt.

| Genname | CB-Status | Mittelwert rel. Expr. K | Mittelwert rel. Expr. PD | fold. diff. PD/K | p-Wert | Anzahl Kontrollen | Anzahl PD |
|---------|------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|----------|----------------------|--------------|
| CB | insgesamt | 55,39 | 317,70 | 5,74 | 9,44e-7 | 20 / 64 | 33 / 48 |
| TH | CB-negativ | 143,47 | 2919,25 | 20,35 | 2,69e-10 | 5 / 20 | 15 / 33 |
| | insgesamt | 195,65 | 2844,22 | 14,54 | 6,66e-16 | 64 / 80 | 48 / 50 |
| Kv4.3 | CB-negativ | 31,94 | 234,29 | 7,34 | 6,57e-7 | 9 / 20 | 12 / 33 |
| | insgesamt | 49,67 | 235,01 | 4,73 | 3,87e-14 | 36 / 64 | 40 / 48 |
| KCHIP3 | CB-negativ | 68,14 | 38,63 | 0,57 | - | 6 / 20 | 1 / 33 |
| | insgesamt | 62,46 | 43,37 | 0,69 | 0,4351 | 8 / 64 | 5 / 48 |
| LRRK2 | CB-negativ | 5,43 | 7,73 | 1,42 | 0,0547 | 7 / 20 | 11 / 33 |
| | insgesamt | 5,07 | 6,13 | 1,21 | 0,1386 | 32 / 64 | 32 / 48 |
| NURR1 | CB-negativ | 36,85 | 51,91 | 1,41 | 0,4328 | 15 / 20 | 9 / 33 |
| | insgesamt | 37,83 | 38,15 | 1,01 | 0,9847 | 30 / 64 | 36 / 48 |
| D2s | CB-negativ | 157,29 | 293,08 | 1,86 | 0,0592 | 4 / 20 | 8 / 33 |
| | insgesamt | 160,12 | 242,22 | 1,51 | 0,1590 | 13 / 64 | 29 / 48 |
| D2l | CB-negativ | 130,14 | 240,79 | 1,85 | 0,0357 | 11 / 20 | 10 / 33 |
| | insgesamt | 146,42 | 365,31 | 1,81 | 0,0281 | 15 / 64 | 35 / 48 |
| SUR2 | CB-negativ | 59,76 | 78,85 | 1,32 | 0,3524 | 6 / 20 | 4 / 33 |
| | insgesamt | 66,62 | 78,66 | 1,18 | 0,2991 | 9 / 49 | 7 / 48 |

Tabelle 19 – Vergleich der Expressionsdaten CB-negativer und aller NM- und TH-positiven Zellpools. Die p-Werte und *fold differences* der CB-negativen Untergruppen DA SN Neurone der Assayserie 3 weisen keine Veränderungen der Aussagen hinsichtlich mRNA-Expressionsunterschieden im Vergleich zu den Gesamtergebnisse der Assayserie 3 auf.

3.5.4 Expressionsanalysen von Ionenkanälen

Die erhöhte, orchestrierte Genexpression von D2 und GIRK2 in UV-LMD dissektierten, NM-positiven DA Neuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen forderte nach eingehender Untersuchung der Ionenkanäle, die für die (patho-) physiologische Aktivität von DA Mittelhirnneuronen von besonderer Relevanz sind. Abbildung 36 und Tabelle 20 fassen die zellspezifischen Genexpressionsdaten für diese Ionenkanaluntereinheiten zusammen.

Generell fällt auf, dass die DA Mittelhirnneurone der PD-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höhere mRNA-Levels für Kaliumkanal-Untereinheiten zeigten (Kv4.3, FREQ, SUR1 und GIRK2), die Expression von stimulierend auf die Frequenz wirkenden Kanälen dagegen nicht (HCN2, TRIP8B, CaV1.3 und NMDAR1).

Kv4.3, FREQ, HCN2 und TRIP8B modulieren die Frequenz von DA Neuronen. Von diesen zeigten die porenbildende α -Untereinheit des spannungsabhängigen A-Typ Kaliumkanals Kv4.3 ~fünffach ($p = 3,87e-14$) und FREQ, eine regulatorische Untereinheit, dreifach ($p = 2,00e-7$) höhere mRNA-Levels in NM-positiven DA Neuronen aus PD-Proben im Vergleich zu Kontrollen. Ebenso waren die mRNA-Levels der regulatorischen β -Untereinheit SUR1 des metabolisch-sensorischen K_{ATP} -Kanals signifikant in DA Mittelhirnneuronen von PD-Proben im Vergleich zu Kontrollen erhöht ($p = 0,01$). Die mRNA-Levels der NMDAR1-Glutamaterezeptor-Untereinheit sind zwar leicht signifikant in den PD-Proben erhöht ($p = 0,04$), aber die Werte liegen deutlich niedriger (ein- bis zweifach) als für die Kaliumkanal-Untereinheiten (Abb. 36, Tab. 20).

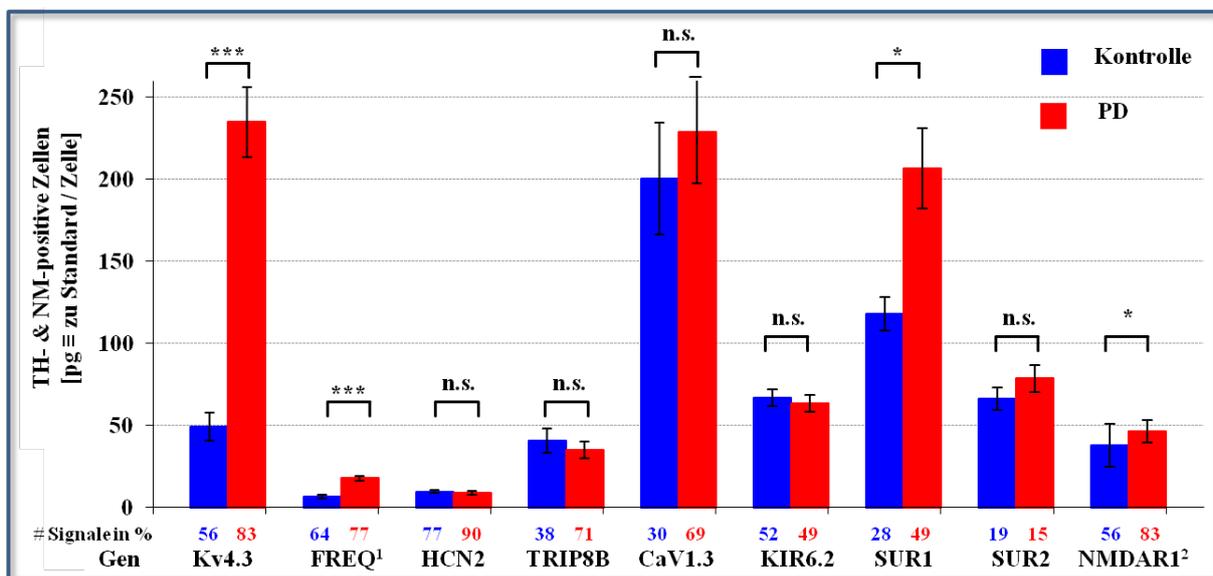


Abbildung 36 – Übersicht Genexpression aktivitätsregulierender Ionenkanalgene.

Balkendiagramm der gemittelten Genexpressionen von Ionenkanalgenen, welche maßgeblich an der Aktivität DA SN Neurone beteiligt sind. Aufgeführt sind nur vertrauenswürdige Daten der Kategorie A, mit Ausnahme von SUR2, welches zur Vollständigkeit der K_{ATP} -Untereinheiten mit aufgeführt ist, jedoch nichtkeine hinreichenden Daten für eine sicher Aussage liefert. In der Spalte „# Signale in %“ ist zu den jeweiligen Kontroll- und PD-Daten angegeben, wie viel Prozent von NM- und TH-positiven Proben Signale für das betreffende Gen geliefert haben. Weitere Details siehe Text (¹Daten aus Assayserie 1 ohne Daten der „neuen“ Kontrollen (Ulm); ²Daten aus Assayserie 5 mit miScript-Lasermix).

Die Expression der HCN-Kanaluntereinheiten HCN2 ($p = 0,37$) und TRIP8B ($p = 0,91$) wiesen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen PD- und Kontrollproben auf. Die mRNA-Level für die Calciumkanal α -Untereinheit CaV1.3 waren sowohl in DA Kontroll- und PD-Mittelhirnneuronen hoch (K: 200 ± 33 ; PD: 229 ± 31 pg an Standard SN cDNA pro Zelle), aber ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen in PD-Proben im Vergleich zu Kontrollen ($p = 0,47$). Des Weiteren wiesen auch die mRNA-Expressionslevel der K_{ATP} -Kanal α -Untereinheit KIR6.2 ($p = 1,00$) und der 2. regulatorischen β -Untereinheit SUR2 ($p = 0,30$) des metabolisch-sensorischen K_{ATP} -Kanals keine signifikanten Unterschiede zwischen PD- und Kontrollproben auf.

Neben den beschriebenen Ionenkanaluntereinheiten (Abb. 36) wurden weitere Genexpressionen von Ionenkanaluntereinheiten untersucht (Tab. 20). Die Anzahl positiver Signale war aber (z.T. trotz guter Assayqualität, vgl. Tab. 15) bei diesen Analysen sehr gering, sodass solide Aussagen über die Genexpression und Expressionsunterschiede kaum möglich waren (SUR2, KCHIP3, HCN3, HCN4, SK3 und CaV1.2). Diese Analysen wurden der Kategorie C zugeordnet. Tendenziell waren bei keinem der untersuchten Gene signifikante Genexpressionsunterschiede festzustellen (Tab. 20). Die schlechte Signalausbeute deutete bei diesen Genen auf relativ niedrige mRNA-Levels in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen hin.

| Genname | Assaylänge | Ct-Wert K rel. Expr. K | Ct-Wert PD rel. Expr. PD | fold. diff. ΔCt PD/K | p-Wert | Anzahl Kontrollen | Anzahl PD | Kategorie |
|--------------------|------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------|----------------------|--------------|-----------|
| Kv4.3 | 74bp | 39,97 ± 0,23 | 37,35 ± 0,14 | 6,18 | 3,87e-14 | 36 / 64 | 40 / 48 | A |
| | | 49,67 ± 8,53 | 235,01 ± 21 | 4,73 | 3,87e-14 | | | |
| FREQ ¹ | 60bp | 37,91 ± 0,24 | 36,25 ± 0,14 | 3,17 | 2,00e-7 | 27 / 42 | 33 / 43 | A |
| | | 6,78 ± 1,07 | 17,89 ± 1,54 | 2,64 | 2,00e-7 | | | |
| HCN2 | 62bp | 39,59 ± 0,14 | 39,87 ± 0,17 | 0,85 | 0,3728 | 41 / 53 | 43 / 48 | A |
| | | 9,70 ± 0,87 | 9,26 ± 1,17 | 0,95 | 0,3728 | | | |
| TRIP8B | 64bp | 41,17 ± 0,27 | 41,32 ± 0,18 | 0,9 | 0,9082 | 20 / 53 | 34 / 48 | A |
| | | 40,66 ± 7,41 | 35,23 ± 5,19 | 0,87 | 0,9082 | | | |
| CaV1.3 | 68bp | 40,63 ± 0,22 | 40,50 ± 0,17 | 1,1 | 0,4661 | 16 / 53 | 33 / 48 | A |
| | | 200,47 ± 33 | 229,07 ± 31 | 1,14 | 0,4661 | | | |
| KIR6.2 | 55bp | 38,77 ± 0,12 | 38,81 ± 0,12 | 0,97 | 1,00 | 30 / 58 | 23 / 47 | A |
| | | 66,98 ± 5,23 | 63,79 ± 5,08 | 0,95 | 1,00 | | | |
| SUR1 | 57bp | 39,63 ± 0,10 | 39,02 ± 0,20 | 1,52 | 0,0134 | 16 / 58 | 23 / 47 | A |
| | | 118,22 ± 10 | 206,98 ± 24 | 1,75 | 0,0134 | | | |
| NMDAR ² | 61bp | 38,26 ± 0,63 | 36,74 ± 0,23 | 2,86 | 0,0387 | 18 / 45 | 40 / 44 | A |
| | | 37,95 ± 13,00 | 46,67 ± 6,91 | 1,23 | 0,0387 | | | |
| SUR2 | 64bp | 41,90 ± 0,22 | 41,60 ± 0,17 | 1,23 | 0,2991 | 9 / 49 | 7 / 48 | C |
| | | 66,62 ± 6,76 | 78,66 ± 8,21 | 1,18 | 0,2991 | | | |
| KChip3 | 80bp | 42,36 ± 0,33 | 42,75 ± 0,27 | 0,77 | 0,4351 | 8 / 64 | 5 / 48 | C |
| | | 62,46 ± 12,56 | 43,37 ± 8,25 | 0,69 | 0,4351 | | | |
| HCN3 | 69bp | 41,55 ± 0,12 | 41,14 ± 0,34 | 1,33 | 0,4286 | 5 / 53 | 6 / 48 | C |
| | | 41,74 ± 4,43 | 68,21 ± 18,79 | 1,63 | 0,4286 | | | |
| HCN4 | 62bp | 41,63 ± 0,13 | 41,80 ± 0,60 | 0,89 | 0,5962 | 7 / 53 | 11 / 48 | C |
| | | 101,14 ± 15 | 112,05 ± 24 | 1,11 | 0,5962 | | | |
| SK3 | 68bp | 41,63 ± 0,35 | 41,80 ± 1,99 | 0,77 | 0,6590 | 7 / 53 | 10 / 48 | C |
| | | 16,49 ± 1,36 | 23,42 ± 7,75 | 1,42 | 0,6590 | | | |
| CaV1.2 | 62bp | 40,37 ± 0,03 | 40,76 ± 0,40 | 0,76 | 0,6905 | 5 / 53 | 5 / 48 | C |
| | | 22,89 ± 0,56 | 19,65 ± 4,64 | 0,86 | 0,6905 | | | |

Tabelle 20 – Datenzusammenfassung für Ionenkanal-mRNA-Expression in DA Mittelhirnneuronen. Für jedes Gen sind die Ergebnisse der Ct-Wert-Analysen in der oberen und der Analysen der relativen Expression (rel. Expr.) zum SN cDNA Standard [pg-Anteil/Zelle] in der unteren Zeile angegeben. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die Wilcoxon-Tests berechnet aus den Einzelwerten aller Hirne. Bei den Genen des K_{ATP}-Kanals (SUR1, SUR2 und KIR6.2) wurden zwei humane Hirne ausgenommen (K-SN 5 und K-SN 6, Details siehe 4.1.3.4). (¹Daten aus Assayserie 1 ohne Daten der „neuen“ Kontrollen (Ulm); ²Daten aus Assayserie 5 mit miScript-Lasermix; Kategorien gemäß Tab. 18.)

3.5.5 Genexpressionsanalysen von PARK-Genen und Genen, die in anderen Studien zur PD-Pathogenese identifiziert wurden

Abbildung 37 illustriert zellspezifische mRNA-Level von Genen, die familiären PD-Formen assoziiert sind (LRRK2, α -SYN) und die in Mausstudien (vgl. 1.3.1.6) zur PD-Pathogenese identifiziert wurden (LDH-B, GSK3B, IGSF-4 und HOMER1). Tabelle 21 fasst die Daten zusammen.

Das Parkinsongen PARK8 (LRRK2; $p = 0,14$; Abb. 37 A, Tab. 21) wies in der relativen Expression zwischen NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten und Kontrollen im Gegensatz zum Parkinsongen PARK1/4 (α -SYN; $p = 1,2e-14$) keine signifikanten Unterschiede auf. Die mRNA-Level von α -SYN waren in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten mehr als siebenmal höher im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 37 B, Tab. 21).

Das Gen IGSF-4 (SYNCAM), dessen Produkt ebenfalls (wie α -SYN) präsynaptisch lokalisiert ist, zeigte signifikant erhöhte mRNA-Level in UV-LMD-dissektierten NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ($p = 2,1e-11$; Abb. 37 C, Tab. 21). Die Expression von HOMER1 wies im Unterschied zu den murinen Gewebestudien (Auburger et al., in preparation) keine signifikanten Unterschiede zwischen NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten und Kontrollen auf ($p = 0,53$; Abb. 37 D, Tab. 21).

Die im Kontext von metabolischer Regulation und selektiver Neurodegeneration relevanten Gene LDH-B, IGSF-4 und GSK3B, die in der eigenen Arbeitsgruppe als differentiell unterschiedlich zwischen hochvulnerablen und resistenteren DA Mittelhirnneuronen der Maus identifiziert wurden (Milani et al., in preparation), wiesen alle drei ca. vierfach erhöhte mRNA-Level in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen auf (LDH-B: $p = 5,71e-7$; GSK3B: $p = 9,17e-8$; IGSF-4: $p = 2.2e-11$) (Abb. 37 E & F, Tab. 21).

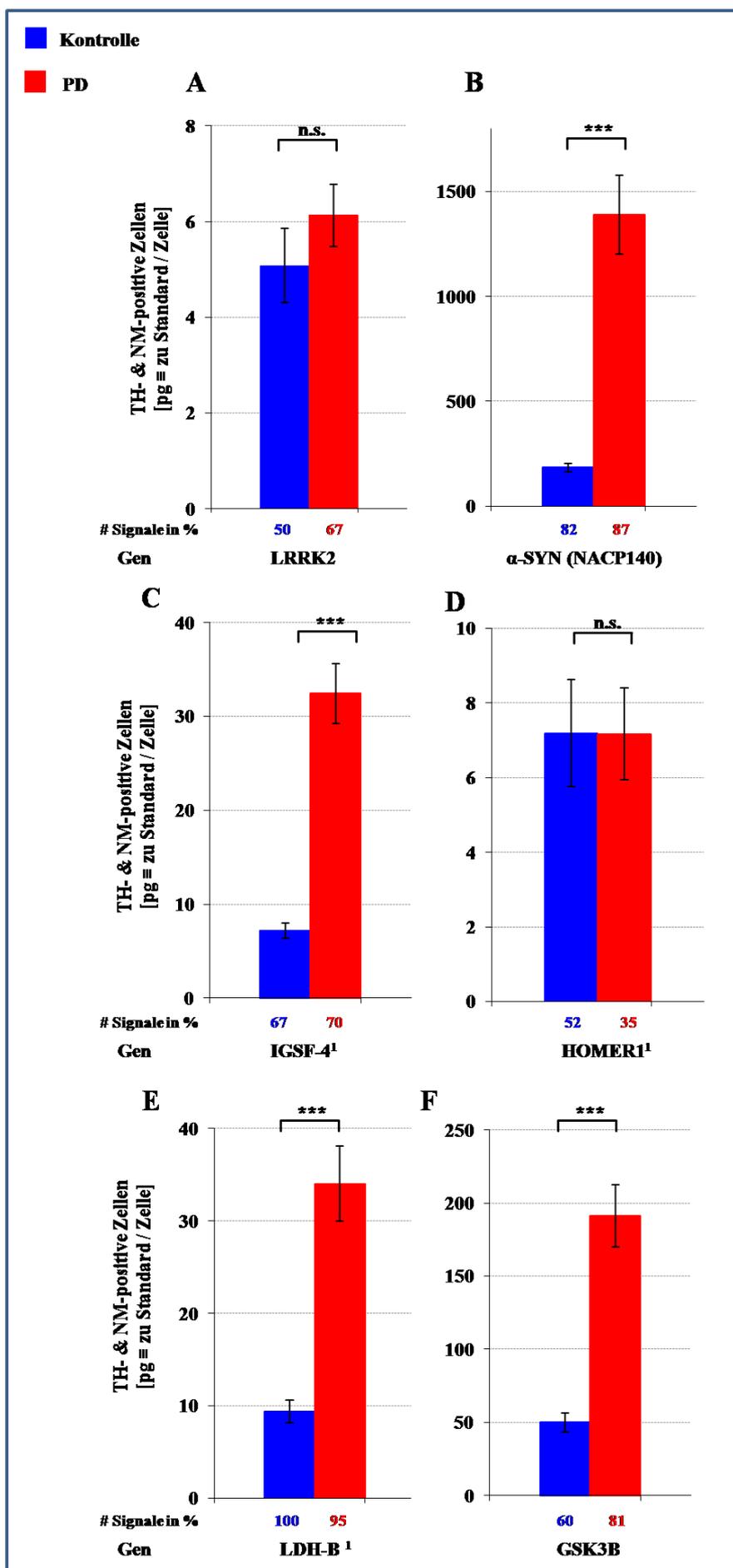


Abbildung 37 – Zellspezifische mRNA-Levels von mit familiären PD bzw. in Mausmodellen mit PD-assoziert identifizierten Genen. Dargestellt sind die mittleren mRNA-Level der Parkinsongene LRRK2 (A) und α -SYN (B) und der von unserem Kooperationspartner (IGSF-4 (C) und HOMER1 (D)) und von uns (LDH-B (E) und GSK3B (F)) in PD-Mausmodellansätzen als differentiell exprimiert identifizierten Gene. Für alle Gene, mit Ausnahme von LRRK2 und HOMER1, wurden signifikant erhöhte mRNA-Levels in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen detektiert. In der Spalte „# Signale in %“ ist zu den jeweiligen Kontroll- und PD-Daten angegeben, wie viel Prozent von NM- und TH-positiven Proben Signale für das betreffende Gen geliefert haben. Weitere Details siehe Text (¹Daten aus Assayserie 1 ohne Daten der „neuen“ Kontrollen (Ulm)).

| Genname | Assay- länge | Ct-Wert K rel. Expr. K | Ct-Wert PD rel. Expr. PD | fold. diff. ΔCt PD/K | p-Wert | Anzahl Kontrollen | Anzahl PD | Kategorie |
|---------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------|----------------------|--------------|-----------|
| LRRK2 | 63bp | 42,61 ± 0,35 | 41,81 ± 0,17 | 1,74 | 0,1386 | 32 / 64 | 32 / 48 | A |
| | | 5,07 ± 0,78 | 6,13 ± 0,65 | 1,21 | 0,1386 | | | |
| α-SYN | 62bp | 36,09 ± 0,17 | 33,21 ± 0,21 | 7,34 | 1,24e-13 | 64 / 78 | 41 / 47 | A |
| | | 184,37 ± 20 | 1388,39 ± 187 | 7,53 | 1,24e-13 | | | |
| IGSF-4 ¹ | 63bp | 39,33 ± 0,18 | 37,11 ± 0,18 | 4,64 | 2,14e-11 | 28 / 42 | 30 / 43 | A |
| | | 7,18 ± 0,18 | 32,42 ± 3,19 | 4,51 | 2,14e-11 | | | |
| HOMER1 ¹ | 71bp | 39,85 ± 0,30 | 39,56 ± 0,27 | 1,23 | 0,5306 | 22 / 42 | 15 / 43 | A |
| | | 7,19 ± 1,44 | 7,17 ± 1,23 | 1 | 0,5306 | | | |
| LDH-B ¹ | 70bp | 35,31 ± 0,18 | 33,48 ± 0,20 | 3,55 | 4,36e-9 | 42 / 42 | 41 / 43 | A |
| | | 9,39 ± 1,22 | 34,03 ± 4,08 | 3,62 | 4,36e-9 | | | |
| GSK3B | 65bp | 38,55 ± 0,18 | 36,41 ± 0,16 | 4,43 | 1,85e-12 | 47 / 78 | 38 / 47 | A |
| | | 49,97 ± 6,57 | 191,28 ± 21 | 3,83 | 1,85e-12 | | | |
| PARKIN | 68bp | 41,99 ± 0,69 | 39,96 ± 0,21 | 4,1 | 0,0036 | 8 / 78 | 11 / 47 | C |
| | | 47,68 ± 12,88 | 125,93 ± 18,93 | 2,64 | 0,0036 | | | |
| NACP112 | 65bp | 39,77 ± 0,54 | 37,92 ± 0,29 | 3,6 | 0,0027 | 17 / 78 | 18 / 47 | C |
| | | 33,37 ± 11,38 | 84,75 ± 19,82 | 2,54 | 0,0027 | | | |

Tabelle 21 – mRNA-Level Datenzusammenfassung von PARK-Genen und im Mausmodell als PD-dysreguliert identifizierte Gene in DA Mittelhirnneuronen.

Die Ergebnisse sind als Ct-Werte in der oberen und als relative Expressionen (rel. Expr.) zum SN cDNA Standard [pg-Anteil/Zelle] in der unteren Zeile angegeben. Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf die Wilcoxon-Tests berechnet aus den Einzelwerten aller Hirne. (¹Daten aus Assayserie 1 ohne Daten der „neuen“ Kontrollen (Ulm); Kategorien gemäß Tab. 18.)

3.5.6 Genexpressionsratios von Genen mit verwandter Funktion

Für diejenigen Gene, die funktionell interagieren oder für Untereinheiten, die einen gemeinsamen Proteinkomplex bilden, wurden mRNA-Expressionsratios von Kontroll- und PD-Proben verglichen. Diese Daten konnten auf Basis von Einzelwerten aus derselben Assayserie (TH, DAT, VMAT, D2, GIRK2; TRIP8b, HCN2; SUR1 und KIR6.2) ermittelt werden, d.h. hier konnten die relativen Expressionsergebnisse derselben Zellpools ins Verhältnis gesetzt werden (Tab. 22). Zusätzlich wurden die Verhältnisse der Mittelwerte der 5 (Assayserie 1) bzw. 8 Kontroll- und 5 PD-Proben ermittelt. Bei Genen, deren mRNA-Levels nicht in derselben Assayserie untersucht wurden, wurden nur die Mittelwertverhältnisse berechnet (Tab. 22).

| Verhältnis GenA zu GenB | aus Einzelwerten | | | aus Mittelwerten | | | Anzahl K Ew & Mw | Anzahl PD Ew & Mw |
|----------------------------|------------------|--------------|----------------|------------------|--------------|---------------|---------------------|----------------------|
| | ratio K | ratio PD | p-Wert | ratio K | ratio PD | p-Wert | | |
| TH / DAT | 11,76 ± 3,59 | 13,70 ± 2,35 | 0,3585 | 8,50 ± 2,10 | 12,29 ± 2,48 | 0,4206 | 35 & 5 | 39 & 5 |
| TH / VMAT | 13,25 ± 2,24 | 43,44 ± 7,17 | 5,18e-6 | 10,93 ± 3,20 | 33,55 ± 7,39 | 0,0345 | 15 & 4 | 33 & 5 |
| VMAT / DAT | 1,22 ± 0,45 | 0,54 ± 0,11 | 0,1679 | 1,21 ± 0,55 | 0,45 ± 0,15 | 0,1905 | 14 & 4 | 31 & 5 |
| GIRK2 / D2 | 0,75 ± 0,18 | 1,00 ± 0,13 | 0,1000 | 0,54 ± 0,08 | 0,80 ± 0,06 | 0,0556 | 19 & 5 | 32 & 5 |
| TRIP8b / HCN2 | 9,16 ± 1,43 | 19,14 ± 5,75 | 0,9813 | 8,17 ± 1,17 | 10,95 ± 1,92 | 0,1709 | 19 & 8 | 25 & 5 |
| SUR1 / KIR6.2 | 2,56 ± 0,70 | 4,91 ± 0,96 | 0,0125 | 1,83 ± 0,15 | 3,77 ± 0,68 | 0,0030 | 11 & 5 | 9 & 4 |
| SUR2 / KIR6.2 | | | | 0,94 ± 0,16 | 1,54 ± 0,43 | 0,2286 | 0 & 3 | 0 & 4 |
| SUR1 / SUR2 | | | | 1,88 ± 0,34 | 3,66 ± 1,62 | 0,4000 | 0 & 3 | 0 & 3 |
| Kv4.3 / HCN2 | | | | 5,53 ± 1,91 | 25,58 ± 4,95 | 0,0051 | 0 & 7 | 0 & 5 |

Tabelle 22 – mRNA-Expressionsratios für funktionelle Genpaare.

Die Daten aus Einzelwerten resultieren aus dem Expressionsverhältnis individueller Zellpools derselben Assayserie, die Mittelwertdaten basieren auf 5 bis 8 Kontrollprobe und 5 PD-Proben. (Details siehe Text.)

Das Verhältnis von TH zu DAT wies weder beim Vergleich individueller Zellpools ($p = 0,36$), noch beim Vergleich der Mittelwerte aus den fünf Kontroll- und den fünf PD-Proben ($p = 0,429$) signifikante Unterschiede zwischen PD- und Kontrollgruppe auf. Die Ratio von TH zu VMAT2 hingegen wies in den PD-Proben ein signifikant größeres Verhältnis (dreifach) im Vergleich zu Kontrollen auf (Ew: $p = 5,2e-6$; Mw: $p = 0,03$). VMAT2 zu DAT zeigte wiederum keine signifikanten Veränderungen (Ew: $p = 0,17$; Mw: $p = 0,19$). Des Weiteren lag das Verhältnis der mRNA-Expression des GIRK2-Gens zu der des D2-Gens in Kontrollen und PD nahe bei 1 : 1 ohne signifikanten Unterschied (Ew: $p = 0,10$; Mw: $p = 0,06$), was einer orchestrierten Hochregulation in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten entsprechen könnte. Diese Daten beruhen alle auf Assayserie 1 (Tab. 22).

Anhand der Einzeldaten aus Assayserie 4 konnte das Verhältnis der Genexpression von HCN2 und der zugehörigen HCN2-Kanaluntereinheit TRIP8B ermittelt werden. Dieses Verhältnis lag hier von Kontrollen zu PD bei etwa 1 : 2 und wies weder bei den Einzelwerten ($p = 0,98$), noch bei den Mittelwerten ($p = 0,17$) signifikante Unterschiede zwischen Kontrollproben und PD-Proben auf, was gemäß den Einzeldaten auch zu erwarten war (Tab. 22).

Von den Untereinheiten der K_{ATP} -Kanals konnten nur Einzelpoolexpressionsratios von SUR1 zu KIR 6.2 gemacht werden (beide Assayserie 2). Das Verhältnis der Ratios war in den PD-Proben etwa zweimal höher als in den Kontrollproben und wies sowohl bei der Berechnung aus individuellen Pools ($p = 0,01$), wie auch bei der Berechnung der Verhältnisse aus den Mittelwerten von fünf Kontroll- und vier PD-Proben ($p = 0,003$) Signifikanz auf. Dieser Unterschied reflektiert die selektiv höheren mRNA-Levels nur für SUR1, aber nicht für SUR2 oder KIR6.2 in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten. Der Vergleich der Mittelwerte mit den wenigen Daten des SUR2-Assays (Tab. 20) ergab weder beim Verhältnis der Kontroll- zu PD-Proben im Vergleich mit KIR6.2 ($p = 0,23$), noch im Vergleich mit SUR1 ($p = 0,40$) signifikante Unterschiede (Tab. 22).

Das Verhältnis des spannungsabhängigen A-Typ Kaliumkanals Kv4.3 zu dessen kompensatorischen Gegenspieler HCN2 konnte auf Basis von Mittelwerten aus sieben Kontroll- und fünf PD-Proben ermittelt werden und ergab eine signifikante, knapp fünffach höhere Ratio in PD-Proben im Vergleich zu Kontrollen, welche ebenfalls die selektiv erhöhten mRNA-Levels von Kv4.3, aber nicht HCN2, in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen widerspiegelt ($p = 0,005$) (Tab. 22).

3.5.7 Geschlechtsspezifische Genexpressionsunterschiede in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten und Kontrollen

Um die Frage von geschlechtsspezifischen Genexpressionsunterschieden von DA Mittelhirnneuronen zwischen PD-Patienten und Kontrollen zu untersuchen, wurden die Daten aus männlichen und weiblichen Spendergewebe getrennt statistisch analysiert.

Innerhalb der Kontrollgruppe konnten Einzeldaten von Gewebe drei weiblicher mit den Daten aus Gewebe fünf männlicher Spender untersucht werden. In der PD-Gruppe konnten die Einzeldaten zwei weiblicher und drei männlicher Gewebespenders verglichen werden. Dabei waren weder innerhalb der Kontrollgruppe, noch innerhalb der PD-Gruppe signifikante Unterschiede festzustellen.

Auch wurden die Daten der Kontrollgruppe mit den Daten der PD-Gruppe nach Geschlecht getrennt analysiert, wobei sich ebenfalls keine Trends für geschlechtsspezifische Unterschiede ergaben (vgl. Anhang).

4. Diskussion

Die vorliegende Studie leistet einen wichtigen Beitrag zum weiteren Verständnis der PD-Pathomechanismen durch das Aufzeigen differentiell exprimierter Gene in individuellen NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen.

In Tabelle 23 sind die insgesamt 25 verschiedenen Gene zusammengefasst, von denen elf keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression zeigten (JMJD1C, NURR1, miR-133b, HCN2, TRIP8B, CaV1.3, KIR6.2, SUR2, NMDAR1*, LRRK2 und HOMER1) und an denen bei 14 Genen signifikant erhöhte mRNA-Level in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen detektiert werden konnten (TH, DAT, VMAT, D2, GIRK2, ENO2, CB, Kv4.3, FREQ, SUR1, α -SYN, IGSF-4, LDH-B und GSK3 β).

| signifikant erhöhte mRNA-Level in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen | unveränderte mRNA-Level | mRNA-Level unterhalb des Detektionslimits |
|---|-------------------------|---|
| TH | JMJD1C | HCN3 |
| DAT | NURR1 | HCN4 |
| VMAT2 | PITX3 | KCHIP3 |
| D2 | miR-133b | SK3 |
| GIRK2 | HCN2 | WNT5A |
| ENO2 | TRIP8B | CaV1.2 |
| CB | NMDAR1* | ATM |
| Kv4.3 | CaV1.3 | TIF1A |
| SUR1 | KIR6.2 | CCND1 |
| FREQ | SUR2 | PARKIN |
| α -SYN | LRRK2 | |
| LDH-B | HOMER1 | |
| GSK3 β | | |
| IGSF-4 | | |

Tabelle 23 – mRNA-Expressionslevels in DA Neuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen.

*NMDAR1 wurde als unverändert gezählt, da der p-Wert an der Signifikanzgrenze lag und die *fold-difference* nur 1,2 betrug (vgl. 4.4.3).

Weiterhin wurden für α -SYN und D2 auch splicevariantenspezifische Assays eingesetzt, die die Befunde der unspezifischen Assays unterstützten (NACP112 (Splicevariante von α -SYN), D2s und D2l). Bei weiteren untersuchten Genen waren die mRNA-Expressionslevels zu gering für einen vergleichbaren Nachweis (z.B. SK3, WNT5A, CaV1.2, ATM, TIF-1A, NACP126, u.a.).

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Makroskopie des humanen Mittelhirngewebes

Das pathologische Hauptmerkmal von Parkinsonpatienten ist die Degeneration NM-positiver Neurone im Bereich der SN. In humanem *post-mortem* Gewebe ist dieser Zellverlust makroskopisch sichtbar und konnte bei allen horizontalen Mittelhirngewebeblöcken der PD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Mikroskopisch waren Gewebeproben der PD-Gruppe von denen der Kontrollgruppe ebenfalls zu unterscheiden.

Obwohl die SN in allen humanen Gewebeblöcken eindeutig identifiziert werden konnte, war die systematische und eindeutige Unterscheidung anatomischer Mittelhirnsubregionen aufgrund der rissigen Strukturen und unterschiedlichen Anschnitten kaum möglich. Alle gesammelten Zellpools individueller, NM- und TH-positiver Neurone der vorliegenden Studie wurden daher als gemeinsame Kohorte von NM-positiven DA Mittelhirnneuronen betrachtet. Die Ergebnisse der Untergruppen CB-negativer, also weniger vulnerabler Mittelhirnneurone (Kim et al., 2009) dieser Kohorten im Vergleich zu den Analysen der vollständigen Kohorten (CB-negative und -positive Mittelhirnneurone) ergaben keine Hinweise auf Ergebnisverfälschung durch das Sammeln unterschiedlicher Kohorten von DA NM-positiven Mittelhirnneuronen von PD-Patienten und Kontrollen.

4.1.2 Gewebezusammenstellung für die humanen Studien

Todesalter, Geschlecht, PMI, CERAD- und Braak-Stadien des verwendeten humanen *post-mortem* Gewebes von PD-Patienten und Kontrollen waren gemäß des Gewebeantrags GA 28 beim BrainNet von der eigenen Arbeitsgruppe spezifiziert worden (Tab. 3) und standen zu Beginn der Studie fest.

Das mittlere Todesalter der PD-Patienten ($78,2 \pm 1,3$) lag mit 9,2 Jahren signifikant über dem Todesalter der Kontrollgruppe ($69,0 \pm 1,6$; Tab. 11). Das Geschlecht der Gewebespende beider Gruppen war durchmischt. Einerseits ist diese Durchmischung beider Gruppen gut, da so geschlechtsspezifische Vergleiche der Genexpression in PD und Kontrollen untersucht werden konnten (vgl. 3.5.7; (Simunovic et al., 2010)), andererseits wären für beide Gruppen möglichst homogene Hirngewebe von ausschließlich männlichen Spendern ideal gewesen, um mögliche neuroprotektive Effekte von Östrogen auszuschließen (Morale et al., 2006). Geschlechtsspezifische transkriptionelle Unterschiede konnten bei den Genexpressionsanalysen der verwendeten Hirne nicht festgestellt werden, was im Widerspruch zu den Daten von Simunovic et al. steht (vgl. 3.5.7 & (Simunovic et al., 2010)). Diese widersprüchlichen Aussagen könnten zum einen auf die geringe Probenanzahl der verschiedenen Geschlechter

zurückzuführen sein (Kontrollen: vier männlich, vier weiblich; PD-Patienten: drei männlich, zwei weiblich), andererseits benutzen Simunovic et al. Genexpressionsdaten, welche diese zuvor auf Haushaltsgene normalisierten, was die abweichenden Aussagen von den in dieser Studie durchgeführten Einzelzellanalysen erklären könnte (vgl. 3.5.2). Diese Möglichkeiten der unterschiedlichen Auswertungen werden noch im Detail diskutiert (vgl. 4.4.1.1).

Die CERAD-Stadien (zur histologischen Einstufung von Morbus Alzheimer) der Proben beider Gruppen wurden bis auf zwei Ausnahmen mit 0 eingestuft, wobei sich die beiden Ausnahmen mit einer Kontrollgewebeprobe (K-SN 3, Einstufung CERAD A), sowie einer PD-Gewebeprobe (PD-SN 2, Einstufung CERAD B) auf beide Kohorten (PD und Kontrollen) gleichermaßen verteilten. Die Verteilung der Braak-Stadien, zur Beschreibung von Sichtbarkeit und Häufigkeit von Proteinablagerungen (nach AD, vgl. 2.1.7; (Braak and Braak, 1986, 1991)), hingegen war inhomogen. Die Kontrollgruppe beinhaltete die Braak-Stadien 0-II, während von den PD-Proben zwei Proben höhere Braak-Stadien aufwiesen (PD-SN 2 Braak-Stadium II-IV und PD-SN 5 Braak-Stadium V). Die *post-mortem* Zeit wies keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und PD-Gruppe auf und war beim eingesetzten Hirnmaterial nicht mit der RNA-Qualität korreliert (vgl. 4.1.3.3 & 3.1, Abb. 23), wobei zu bemerken ist, dass bewusst zwei Fälle mit sehr hohen PMI-Zeiten (K-SN 8 mit 120 h und K-SN 9 mit 72 h) in die Studie eingeschlossen wurden, um in der Literatur beschriebene Effekte auf die RNA-Qualität und Genexpression (Stan et al., 2006) auf Einzelzelleben zu untersuchen.

4.1.3 Qualitätsmerkmale des Ausgangsmaterials

4.1.3.1 Der RIN-Wert als RNA-Qualitätsmaßstab

Der RIN-Wert, das Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten 28S/18S (rRNA), und der pH-Wert, sowie der miRNA-Anteil an kleinen (*Small*) RNAs der Proben wurden für die Mittelhirngewebe beider Kohorten bestimmt (Tab. 11).

Das Verhältnis der ribosomalen RNAs wurde nicht als Qualitätsmaß verwendet, da dieses Verfahren zur Abschätzung der RNA-Qualität (Sambrook and Russel, 2001) sehr ungenau und inzwischen veraltet ist, und insbesondere durch das RIN-Analyseverfahren ersetzt wurde (Stan et al., 2006). Die RIN wird nicht nur unter Berücksichtigung des rRNA-Anteils, sondern unter Berücksichtigung des kompletten Verlaufs des Elektropherogramms berechnet. Diese Berechnung berücksichtigt somit alle detektierten, also auch degradierten RNA-Fragmente. Die RIN-Bestimmungen der humanen Hirne ergaben moderate bis degradierte RNA-Qualitäten des zur Verfügung stehenden humanen Hirngewebes, wobei die Kontrollprobe

K-SN 4 aufgrund unzureichender RNA-Qualität (RIN 2,3) aus allen Analysen ausgeschlossen wurde (vgl. 3.1, Tab. 11).

Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit und zum Ausschluss von experimentellen Artefakten wurden die RIN-Bestimmungen mehrfach wiederholt und immer in Duplikaten durchgeführt. Die RIN der PD-Proben war signifikant höher als die der Kontrollproben (vgl. 3.1). Die RIN-Werte wurden nicht mit Standardabweichungen aufgeführt, da diese als Qualitätsmerkmal eine feste Größe darstellen.

Auffällig bei den RIN-Analysen war zunächst die Verbesserung der RIN-Werte von 2006 (Gründemann, 2006) gegenüber den Messungen von 2008, welche im Fall der Kontrollhirne sogar signifikant war (vgl. Anhang). Die Messungen von 2006 wurden allerdings nicht im eigenen Labor vorgenommen, sondern extern nach RNA-Isolation und Verschicken der isolierten Gesamt-RNA. Das Verschicken beinhaltet Einfrier- und Auftauschritte, welche das Material belasteten und somit eine zusätzliche Degradation erklären könnte. Ein weiterer Grund für die geringeren RIN-Werte könnte das Material selbst sein, da 2006 der jeweilige erste Anschnitt der Hirne an den jeweiligen Gewebeoberflächen erfolgte, welche bei der Biopsieentnahme zumindest kurzzeitig der Umwelt exponiert war. Zudem wurden die Hirne 2006 erstmalig getrimmt und angeschnitten, womit die Oberfläche erneut kurzzeitig der Umwelt exponiert war und das Material mechanischem Stress ausgesetzt wurde, was zu weiterer Degeneration der RNA im Bereich der Gewebeoberflächen geführt haben könnte. Weiterhin könnte die Jahreszeit und Umgebungstemperatur der Biopsieentnahme zu Begünstigungen von RNA-Degradation beitragen. Wärme begünstigt die RNA-Degradation, was auch durch die gezielte *in vitro* RNA-Thermodegradation im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (vgl. 3.4.3).

Die Bestimmungen der RIN-Werte 2008 und 2009 erfolgten eigenständig unter kontrolliert RNase-freien Bedingungen im Anschluss an die RNA-Isolation. Insgesamt waren die RIN-Werte der PD-Proben bei allen Messungen signifikant höher als in den Kontrollproben (Tab. 11). Dieser Qualitätsunterschied könnte prinzipiell für quantitative Genexpressionsanalysen problematisch sein, da mRNA-Level der untersuchten Gene aufgrund der stärker degradierten RNA unterschätzt werden könnten (Fleige and Pfaffl, 2006). Um eine problematische Korrekturberechnung der *real-time* qPCR-Daten anhand eines Korrekturfaktors für verschiedene RIN-Werten zu vermeiden (Ragg et al., 2006), wurde der Einfluss von RNA-Degradation auf die Sensitivität und Spezifität der *real-time* qPCR im Rahmen dieser Arbeit empirisch untersucht (vgl. 3.4.3). Anhand einer kontrollierten RNA-Thermodegradation mit anschließender cDNA-Synthese und *real-time* qPCR konnte gezeigt

werden, dass die Effizienz und Sensitivität von hier verwendeten qPCR-Assays mit kurzen Amplifikaten (<80 bp) im Spektrum von RIN 5,9-9,9 (der dem RIN-Spektrum des hier verwendeten humanen *post-mortem* Materials entspricht) vergleichbar ist (vgl. 3.4.3). Mit Hilfe dieses Degradationsassays konnte sowohl für die etablierte cDNA-Direktsynthese als auch für die miScript-Kombinationssynthese gezeigt werden, dass die Ct-Werte derselben Probe bei Einsatz derselben Menge an RNA nach Thermodegradation stabil bleiben. Diese Unabhängigkeit der *real-time* qPCR von der RNA-Integrität wurde für Proben mit einer RNA-Qualität mit RIN 5,9 bis 10 unter Verwendung eines murinen Ldh-b-Assays mit einem Amplikon von 72 bp für beide Syntheseprotokolle (Standard und miScript) nachgewiesen. Die RIN der Kontrolle K-SN 5 wies eine sehr starke Differenz der RIN von 2008 (6,0) bis 2009 (3,4) auf. Da das betreffende Gewebe im Vergleich zu allen anderen Gewebeproben nicht anders behandelt und kryoasserviert wurde und die RIN-Messungen mehrfach wiederholt wurden, ist dieser drastische Qualitätsverlust nicht zu erklären.

4.1.3.2 pH-Wert, PMI, Anteil kleiner RNAs und RIN-Wert-Korrelationen

Die Mittelhirngewebe-pH-Werte der Kontrollgruppe unterschieden sich nicht signifikant von den pH-Werten der PD-Gruppe, wodurch mögliche, beschriebene Effekte aufgrund verschiedener pH-Werte auf die Genexpressionsanalysen ausgeschlossen werden konnten (Mexal et al., 2006). Zudem konnte keine Korrelation zwischen den pH-Werten und der RNA-Qualität (RIN) festgestellt werden. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen den RIN-Werten und den PMIs festgestellt werden. Das RNA-Qualität und PMI nicht zusammenhängen, wird auch im RIN- und *real-time* qPCR-Vergleich der Kontrollgewebeprobe K-SN 8 mit einem hohen PMI von 120 h und dem moderaten RIN-Wert von 5,9 mit der von den Genexpressionsanalysen ausgeschlossenen Kontrollgewebeprobe K-SN 4 mit einem kurzen PMI von 6,5 h und schlechter RNA-Qualität (RIN von 2,3) deutlich. Der auffällig hohe PMI von Probe K-SN 8 mit 120 Stunden hätte zum Ausschluss der Probe führen können (>24 h – Selektionskriterium), die Probe wurde aber bewusst für die vorliegenden Genexpressionsstudien, zunächst unter Vorbehalt, verwendet. Da die Probe nach RIN-, pH- und miRNA-Bestimmung sehr gut in die Kontrollgruppe aufgrund vergleichbar moderater RNA-Qualität passte (vgl. 3.1) und vergleichbare Genexpressionsdaten mit allen anderen eingesetzten Kontrollproben aufwies, wurde diese trotz des hohen PMI in der Studie belassen, im Gegensatz zu K-SN 7, die obwohl PMI, RIN, pH-Wert und miRNA-Anteil unauffällig waren, dramatisch abweichende Expressionslevels aufwies.

Insgesamt passen die Ergebnisse der Korrelationsanalysen von RIN-Wert, pH-Wert, PMI und Anteil von miRNAs an *Small RNAs* nur bedingt zu Ergebnissen aus der Fachliteratur, welche

zwar auch keine Korrelation von PMI (und anderen *post-mortem* Variablen) und RNA-Integrität, aber signifikante Korrelation von pH- und RIN-Wert in humanem *post-mortem* Hippocampus beschreibt (Mexal et al., 2006). pH- und RIN-Wert stehen dabei in Bezug zueinander, niedrigere pH-Werte korrelieren mit niedrigeren RIN-Werten (Becker et al., 2010b), was im Verlauf der vorliegenden Studie anhand der verwendeten humanen Gewebeproben nicht bestätigt werden konnte (vgl. 3.1). Hierbei fiel zudem auf, dass die ermittelten pH-Werte um ~ 1 pH-Wert niedriger waren als die in der Literatur angegebenen. Um einen Einfluss des verwendeten Wassers auszuschließen wurden ergänzend pH-Werte von frischem Maus-Mittelhirngewebe und in Wasser gelöstem Gewebe verglichen (Daten nicht gezeigt). Die Messungen ergaben, dass die direkt im Gewebe gemessenen pH-Werte um ca. 1 pH saurer waren als die pH-Werte des im Wasser gelösten Gewebes. Diese Ergebnisse lassen nicht auf eine Verschiebung in den saureren Bereich durch das Wasser schließen, allerdings steht der Vergleich von pH-Werten mit eingefrorenem Gewebe noch aus.

Der signifikant erhöhte prozentuale miRNA-Anteil an kleinen RNAs der humanen Kontrollproben im Vergleich zu den PD-Proben könnte auf die signifikant niedrigere RIN zurückzuführen sein (Becker et al., 2010a). Alternativ würde der Befund auf eine erhöhte Aktivität von miRNAs, also eine globale Genexpressionsänderung von DA Mittelhirnneuronen bei PD-Patienten hinweisen.

4.1.3.3 Ausschluss von Gewebematerial von den Genexpressionsanalysen

Das Fehlen von drei Kontrollhirnen in Assayserie 1 resultiert aus einem zeitlichen Faktor, die Proben K-SN 8, K-SN 9, K-SN 10 und K-SN 7 („neue“ Kontrollen, Ulm) wurden im Verlauf dieser Arbeit nach Bereitstellung durch Prof. Thal (Sektion Neuropathologie am Institut für Pathologie, Universität Ulm) in die laufenden Studien eingegliedert, nachdem Assayserie 1 bereits vollständig analysiert und ausgewertet war. Zwar wurden dieselben Gene der Assayserie 1 nachträglich in lasermikrodissektierten, NM-positiven DA Mittelhirnneuronen der „neuen“ Kontrollen untersucht, führten jedoch zu nicht vergleichbaren Daten, was auf die Verwendung von Verbrauchsmaterialien und Chemikalien mit anderen Lot-Nummern zurückzuführen ist. Ab Assayserie 2 konnten für alle Proben Verbrauchsmaterialien und Chemikalien derselben Lots verwendet werden und die „neuen“ Kontrollen (mit Ausnahme von K-SN 7, s.u.) konnten problemlos in die Studien miteinbezogen werden. Diese Abhängigkeit zeigt, wie wichtig die Verwendung von Material und Chemikalien derselben Lot für Einzelzellanalysen ist, da hier offensichtlich schon geringfügige Abweichungen der Effizienzen der eingesetzten Chemikalien einen signifikanten Einfluss auf die resultierenden Ergebnisse haben können.

Die Probe K-SN 7 wurde aus allen Analysen entfernt, obwohl sich Todesalter, PMI, CERAD- und Braak-Stadium, RIN und pH-Wert der Kontrollprobe K-SN 7 zwar in die Charakteristika der anderen Kontrollgewebe einfügten (vgl. 3.1). Jedoch wies diese Probe dramatisch abweichende Expressionslevels aller untersuchten Gene im Vergleich zu allen anderen Proben auf, so dass diese Probe aus den Statistiken der Genexpressionsanalysen entfernt wurde. Zum Teil waren die Genexpressionslevels mehr als fünffach höher als in der nächsthöher exprimierten Probe, wodurch diese stark erhöhte Genexpression verursacht wurde, bleibt spekulativ. Möglicherweise ist die erhöhte Genexpression durch die Todesursache Cholangiosepsis zu erklären (K-SN 7, Tab. 10). Allerdings zeigt diese Kontrollmittelhirngewebeprobe auch, dass die aufgeführten Charakteristika (Tab. 10 & 11, Abb. 23) allein nicht zur bedenkenlosen Aufnahme einer Probe für Genexpressionsstudien hinreichend sind, sondern immer der Einzelfall eingehend betrachtet werden muss.

4.2 Optimierung der UV-LMD *real-time* qPCR Methodik für die Genexpressionsanalysen von UV-LMD-dissektierten Proben

Die eingesetzten Techniken und Methoden wurden nach bestem Wissen und Gewissen ausgetestet, validiert, optimiert und die Reproduzierbarkeit der Experimente sichergestellt. Für alle Proben einer Versuchsreihe wurden stets Verbrauchsmaterialien und Chemikalien derselben Lot verwendet, um eine Gleichbehandlung aller Proben zu gewährleisten. Das Sammeln individueller, NM-positiver DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten und Kontrollen erfolgte in Zellpools von je 15 Neuronen (durchschnittlich $\sim 1000 \mu\text{m}^2/\text{Neuron}$), was im Mittel zu vergleichbarem Ausgangsmaterial (1,4 Neurone, vgl. 3.1) für die *real-time* qPCR-Reaktionen beitrug.

4.2.1 Optimierung, Erweiterung und Validierung der UV-LMD-Methode

Für das Färbe- und Fixierprotokoll mit CV und Ethanol konnte kein negativer Einfluss auf die RNA-Qualität im Vergleich zu unbehandelten Hirnspänen festgestellt werden, während die Fixierung von Gewebe mit PFA die RNA-Integrität und *real-time* qPCR Detektion verringerte (vgl. 3.2.3 & 3.4.2). Somit sollte nach Möglichkeit CV-Färbung und EtOH-Fixierung angewendet werden.

4.2.2.1 Erweiterte Anwendung der UV-LMD-Methode

4.2.2.1a Validierung der UV-LMD-Methode

Die Übertragung der im Labor etablierten Standard-UV-LMD-Methodik auf andere Fixiertechniken und Gewebearten ist nicht ohne weiteres durchführbar, insbesondere da es nur eine milde Zellyse beinhaltet (Liss, 2002).

Diese Lyse reichte beispielsweise nicht, um PFA-fixierte DA Mittelhirnneurone hinlänglich zu lysieren, konnte aber auf anderes Hirngewebe und Zelltypen (*Cerebellum*) und sogar andere Organe (*whole-mount Cochlea*, vgl. 3.2.3 & 4.2.2.2b) nach entsprechenden Test- und Vorbereitungsversuchen übertragen werden. Diese im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etablierte Übertragung der etablierten Methodik auf das Hirnareal *Cerebellum*, sowie die Nutzung der Färbe- und Fixiertechnik in Kombination mit der UV-LMD zur Isolation muriner Darmkrypten und die Erweiterung der LMD-Methodik auf PFA-fixierte *whole-mount Cochlea* erweitert die Einsatzmöglichkeiten dieser hochselektiven, kontaktfreien UV-LMD-Einzelzelltechnik signifikant (vgl. 3.2.2ff).

4.2.2.1b UV-LMD von PFA-fixiertem Gewebe

Für spezielle Anforderungen ist eine erfolgreiche Genexpressionsanalyse aus PFA-fixierten, lasermikrodissektierten Material möglich. Allerdings musste hierbei die RNA mittels eines Kits (RNeasy FFPE Kit, Qiagen) aufgereinigt werden, welcher einen Proteinase K-Verdau mit Temperaturschritten bei 55 und 80 °C beinhaltet. Dieser Verdau war notwendig um die Proteinvernetzung durch das PFA aufzuheben, schadet jedoch der RNA-Qualität, was der entwickelte Thermodegradationsassay mit lediglich 70 °C bewies (vgl. 3.4.3). Weiterhin war es notwendig, die Kit-Komponenten auf Kontaminationen zu überprüfen und entsprechend Negativkontrollen durchzuführen, da die Proteinase K des verwendeten RNeasy FFPE Kits Kontaminationen aufwies. Reichen die resultierenden RNA-Mengen nach Kit-Aufreinigung nicht zu einer RIN-Bestimmung aus (< 5 ng), müssen diese zur Konzentration präzipitiert werden. Bei der Präzipitation muss beachtet werden, dass die zur Präzipitation zugesetzte Träger-RNA (polyI) bei anschließenden RIN-Analysen ebenfalls mit detektiert wird. Da es sich beim verwendeten polyI um kurze RNA-Moleküle ohne ribosomale RNA-Anteile handelte, verschlechterte sich der RIN-Wert. RIN-Messungen von purem polyI zeigten ein Maximum im Bereich von 25-40 s des Elektropherogramms des RNA Nano Chip (Agilent). Glycogen, Ethanol und Natriumacetat wurden hingegen nicht detektiert (vgl. Anhang).

4.2.2.1c Parallele mRNA- und miRNA-Expressionsanalyse nach UV-LMD

Das etablierte Protokoll für die direkte Zelllyse und cDNA-Synthese nach UV-LMD-Dissektion einzelner Zellen konnte mit dem miScript-Kit so kombiniert werden, dass zusätzlich zur mRNA-Expression nun auch die Expression von regulatorischen miRNAs mit Hilfe des miScript-Systems derselben Probe quantifiziert werden kann.

Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte miR-133b-Assay erkannte allerdings auch die miRNA-133a, welche sich nur durch ein Nukleotid von der miRNA-133b unterscheidet. Der maximale Unterschied der für diese „falsch-positive“ Detektion mittels *real-time* qPCR lag bei 2 Ct-Werten. Allerdings liegt nahe, dass die miRNAs mit nur einem unterschiedlichen Nukleotid ähnliche Funktionen erfüllen und dieselben Gene regulieren können (was für die miRNAs miR-133a und -133b laut Datenbank (<http://www.mirbase.org/>) auch weitestgehend zutrifft).

Zur cDNA-Synthese aus totaler RNA inklusive miRNA nach miScript-Kit (Qiagen) und in Kombination mit der LMD-Methodik wurde die Inkubation der Polyadenylierung und reversen Transkription von einer Stunde (miScript-Kit Protokoll) auf ca. 12 h (über Nacht) verlängert. Die einstündige Synthese führte zu unspezifischen und nicht reproduzierbaren Schmelzkurvenmustern der SYBRgreen *real-time* qPCR-Amplifikation. Unspezifische Signale deuteten auf „falsch-positive“ Produkte der *real-time* qPCR, also unspezifische Primerbindungen hin. Eine Verlängerung des Inkubationsschritts auf 12 h (über Nacht), verringerte die Anzahl unspezifischer Schmelzkurvenmuster nach LMD signifikant (vgl. Anhang).

4.3 Assay-Auswahl für humanes *post-mortem* Material

Für die verwendeten humanen TaqMan-Assays wurde entsprechend Kapitel 4.1.3.1 die Amplikonlänge der Assays möglichst klein gehalten (< 80 bp). Bislang ist gezeigt, dass humane Assays mit einer Amplikonlänge von 77 bp bei einer RIN über 6,1 stabile Standardkurven liefern (Grundemann et al., 2008), aber auch, dass Assays mit einer Amplikonlänge größer 155 bp mit der RIN korrelieren (Becker et al., 2010a). Allerdings wurde diese Korrelation über das ganze Spektrum der RIN-Skala festgestellt (RIN 2,7-9,2), wobei die Abweichungen verschiedener Gene im Bereich von RIN 5,9-7,8 bei ca. 2 Ct lag und keine Abhängigkeiten bei der miRNA-Expressionsanalyse im Zusammenhang mit der RIN festgestellt wurden (Becker et al., 2010a).

Die Amplikonlänge eines Assays lässt jedoch keinen generellen Rückschluss auf seine Sensitivität und Spezifität zu. Für einige Gene funktionierten Assays mit einem längeren

Amplikon besser als mit einem Kürzeren, z.B. für CaV1.3, wo der Assay Hs01073340_m1 mit einer Amplikonlänge von 57 bp durch einen 11 bp längeren, deutlich sensitiveren Assay Hs01073331_m1 ersetzt werden konnte.

Die Konstanz der Assayperformance sollte für jeden Versuch kontrolliert und validiert werden. Ebenso wichtig wie die Kontrolle einer gleichbleibenden Performance ist die Verwendung von Negativ-, Wasser- und ggf. genomischen DNA-Kontrollen, um bei Genexpressionsanalysen Kontaminationen und „falsch-positive“ Signale ausschließen bzw. interpretieren zu können.

4.4 Vergleichende Genexpressionanalysen humaner NM-positiver DA Mittelhirnneurone in PD und Kontrollen

4.4.1 Gewebebasierte Genexpressionsstudien von Morbus Parkinson

Bei Genexpressionsstudien von SN Gesamtgewebe von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ist zu bedenken, dass hochgradig inhomogenes Material verglichen wird. Humanes SN Gewebe setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen, die Anschnitte der Mittelehirngewebe sind unterschiedlich (vgl. Abb 21 & 22, Anhang) und im Falle von Vergleichsanalysen von *post-mortem* PD-Mittelehirngewebe mit Kontrollmittelehirngewebe wird außer Acht gelassen, dass bereits bei Auftreten der PD-Kardinalsymptome ein Großteil der NM-positiven DA Mittelhirnneurone degeneriert ist (Halliday and McCann, 2010). D.h. es wird Gewebe mit einem hohen Anteil DA Mittelhirnneurone (Kontrollgruppe) mit Gewebe mit einem äußerst niedrigen Anteil DA Mittelhirnneurone (PD-Gruppe) verglichen. Entscheidend für die PD-Symptomatik ist dieses Absterben der NM-positiven DA Mittelhirnneurone, welche entsprechend ihrer Funktion und auch Genexpression direkt miteinander verglichen werden sollten. Zudem muss bei Expressionsstudien aus Gewebe gegen putative, in allen untersuchten Zelltypen gleichmäßig exprimierte Referenzgene normalisiert werden (Guenin et al., 2009). Die Auswahl solcher geeigneten Normalisierungsgene ist schwierig und die Eignung vieler zur Normalisierung verwendeter Referenzgene umstritten (Bar et al., 2009; Guenin et al., 2009). Die UV-LMD-Methode bietet den Vorteil, die Genexpression individueller Zellen ohne Normalisierung zu Referenzgenen vergleichen zu können, was technisch eine Herausforderung ist. Auf Einzelzellebene sind die „klassischen“ Referenzgene erwiesenermaßen nicht geeignet (Liss et al., 2001).

Bislang wurden unterschiedlichste Studien zur Untersuchungen der Genexpression im Zusammenhang mit PD durchgeführt. Diese variieren sehr stark in der angewandten Methodik und dem verwendeten Ausgangsmaterial. Einige Studien basieren auf Daten aus

Tiermodellen (Chan et al., 2009; Eilam et al., 1998; Kittappa et al., 2007; Neuhoff et al., 2002; Parlato et al., 2008; Sgambato-Faure et al., 2005), die nicht ohne weiteres auf humanes *post-mortem* Gewebe zu übertragen sind. Des Weiteren sind Studien basierend auf Gesamtgewebe ohne Angaben zu RNA-Qualität und pH-Wert, sowie Verwendung unterschiedlicher Referenzgene aufgeführt (Dachsel et al., 2007; Kwok et al., 2005). Kim et al. (Kim et al., 2007) greifen in ihren Studien, ähnlich wie in der vorliegenden Studie, auf unterschiedliche PD-Maus-Modelle zurück und validieren diese Daten in humanem Mittelhirngewebe unter Verwendung verschiedener Methoden (qPCR, Northern blotting, protection Assays). Die Daten von Simunovic et al. beruhen auf UV-LMD selektierten DA SN Neuronen von PD-Patienten und Kontrollen (Simunovic et al., 2009; Simunovic et al., 2010). Allerdings wurde das humane Hirnmaterial nur aufgrund des *post-mortem* Index (PMI) und dem Spenderalter ausgewählt und keine Angaben zu RNA-Qualität (RIN) und pH-Wert gegeben, was keine Aussage über die tatsächliche Vergleichbarkeit der Genexpressionsdaten zulässt (vgl. 4.1.3ff). Weiterhin wird die Poolgröße der UV-LMD-dissektierten DA SN Neurone nicht genau angegeben (300-700 Neurone) und die Daten der *real-time* qPCR-Analysen auf eine endogene Kontrolle (GUSB – Glucuronidase β) normalisiert, ohne Validierung oder Angaben, ob diese Kontrolle zur Normalisierung geeignet ist (Simunovic et al., 2009).

Die Daten der vorliegenden Studie basieren auf einheitlichen, kontrollierten Bedingungen mit Angaben von RNA-Integrität, pH-Wert, miRNA-Anteil und genauer Beschreibung der Vorgehensweise. Die reproduzierbaren Genexpressionsbefunde individueller DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen dieser Arbeit (vgl. 3.5.3 & 3.5.5, (Grundemann et al., 2008)) tragen somit nicht nur zum Verständnis der Erkrankung PD bei, sondern setzen einen methodisch wünschenswerten Standard für weitere Studien, der eine bessere Vergleichbarkeit der Befunde ermöglicht.

Die zellspezifischen Daten der Genexpression für miR-133b, PITX3 und NURR1 von PD-Patienten und Kontrollen dieser Arbeit stehen im Widerspruch zu den Befunden in Mittelhirngesamtgewebe, wie von Kim et al. (Kim et al., 2007) beschrieben, welche einen negativen *feedback loop* von miR-133b und PITX3 postulieren. Dazu zeigten diese, dass die Levels der miRNA miR-133b in humanem *post-mortem* Mittelhirngewebe von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen geringer war, ebenso wie die mRNA-Levels von TH und DAT. Es wurde postuliert, dass die miR-133b die Reifung DA Neurone hemmt und in einer negativen Wechselbeziehung zu DA Markergenen steht, was bei geringeren miR-133b-Levels zu erhöhter Expression dopaminerger Markergene führen müsste. Diese Beziehung konnte

von Kim et al. allerdings nur in Zellkultur und einem PD-Mausmodell (Aphakia-Maus) gezeigt werden. Die humanen Genexpressionsdaten bezogen sich auf RNA aus SN Gesamtgewebe, normalisiert auf das Haushaltsgen β -Actin ohne genaue Angaben zur cDNA-Synthese ((Kim et al., 2007) & *Supplement*).

Zum Vergleich wurden in der vorliegenden Studie Genexpressionsdaten selektiver NM-positiver DA Mittelhirnneurone mit Genexpressionsdaten aus humanem SN Mittelhirngewebe von PD-Patienten und Kontrollen unter gleichen, kontrollierten Bedingungen generiert (vgl. 3.5.2 & Abb. 32). Die mittelhirngewebebasierten Expressionsdaten stimmen im Fall der Expression von miR-133b mit denen von Kim et al. überein, jedoch nicht mit den dort angegebenen Expressionen von TH und DAT ((Kim et al., 2007) *Supplement*), welche dort eine leicht geringere Expression von TH und DAT im Mittelhirngewebe von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen zeigten.

In der vorliegenden Studie hingegen zeigte TH leicht erhöhte mRNA-Level in Mittelhirngewebe von PD-Proben im Vergleich zu Kontrollen, während die Genexpression von DAT keine signifikanten Unterschiede aufwies (vgl. 3.5.2 & Abb. 32 C). Diese Unterschiede können leicht durch den Einsatz von variablen Gewebeanschnitten erklärt werden. Im Falle von TH scheinen die mRNA-Level individueller NM-positiver Mittelhirnneurone bei PD-Patienten so stark erhöht (mehr als siebenfach), dass diese erhöhte Expression noch immer im Gewebe (normalisiert zu β -Actin) bemerkbar war, während die auf Ebene einzelner DA Neurone vierfach erhöhte mRNA-Expression von DAT NM-positiver Neurone im Gewebe nicht mehr sichtbar war. Ähnlich wie bei den mRNA-Leveln von DAT in individuellen Mittelhirnneuronen und Gewebe verhielt es sich mit den Expressionen der dopaminergen Markergene VMAT2, D2 und GIRK2. Diese waren alle signifikant in individuellen NM-positiven Neuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht, diese Hochregulation war allerdings nicht mehr in den Gewebeanalysen zu detektieren (vgl. 3.5.2 & 3.5.3, Abb. 32 & 33). Bei der Expression der miRNA miR-133b verhielt es sich umgekehrt, diese war im Mittelhirngewebe normalisiert zu β -Actin von PD-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen signifikant reduziert, während die miRNA-Level in UV-lasermikrodissektierten, NM-positiven DA Mittelhirnneuronen keine Unterschiede aufwiesen. Die Befunde dieser Arbeit unterstützen die Hypothese einer negativen *feedback*-Interaktion der miR-133b und der mRNAs für PITX3, TH, DAT oder anderer DA Markergene nicht. Während auf Einzelzellebene DA Mittelhirnneurone die Expression von miR-133b, PITX3 und NURR1 unverändert ist, ist diese für TH und DAT (, VMAT2 und D2) erhöht in PD im Vergleich zu Kontrollen. Die detektierte artifizielle Reduktion der miR-133b miRNA in

Mittelhirngewebe von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen illustriert eindrucksvoll die Notwendigkeit der Zellspezifität, wenn die Genexpression DA Mittelhirnneurone der SN in PD im Vergleich zu Kontrollen verglichen werden soll.

4.4.2 Dopamin-Marker und -Metabolismus Gene in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen

Die auffällige, orchestrierte, signifikante Erhöhung der mRNA-Level der DA Synthese-, Verpackungs- und *Re-uptake*-Gene (TH, DAT und VMAT2) deuten auf eine erhöhte Dopaminproduktion (TH) und -bereitstellung in Vesikel (VMAT2), sowie die Möglichkeit einer effektiveren Wiederaufnahme nach Dopaminfreisetzung hin. Diese orchestrierte erhöhte Expression dieser Dopamin assoziierten Gene individueller NM-positiver DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen könnte kompensatorischer Natur sein. Da PD-Patienten bereits ein großer Teil NM-positiver Mittelhirnneurone fehlt, besteht die Möglichkeit, dass durch die überlebenden NM-positiven DA Mittelhirnneurone versucht wird, den Verlust DA Neurone und dem damit verbundenen niedrigeren Dopaminspiegel in den Projektionsgebieten durch erhöhten Dopaminumsatz zu kompensieren.

Die signifikant erhöhte mRNA-Transkription von TH könnte durch cAMP über einen bislang unbekanntem Mechanismus unter Beteiligung der 3'-UTR (*untranslated region*) von TH, aktiviert durch Zellstress, begründet sein (Chen et al., 2008). Ebenso könnten die erhöhten TH-mRNA-Level altersassoziiert sein, wie für Mäuse beschrieben, und daher nur bedingt durch das signifikant höhere Alter der PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen, nicht durch den Krankheitsprozess, sein (Kim et al., 2006). Allerdings wurde die Genexpression von DAT und TH in neueren Studien als unverändert, mit Tendenz zu geringen Expressionsleveln in NM-positiven Mittelhirnneuronen von PD-Patienten, beschrieben (Simunovic et al., 2009). Diese Beschreibung beruht zwar auch auf individuellen, UV-lasermikrodissektierten Neuronen, allerdings wurde die Expression hierbei wiederum gegen eine Referenz (GUSB, s.o.) normalisiert, was wie diskutiert methodisch problematisch ist und diese abweichenden Ergebnisse erklären könnte (vgl. 4.4.1).

Die im Mittel neunfach höheren mRNA-Level von TH in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen lassen auch den Schluss zu, dass die wenigen überlebenden DA Neurone durch erhöhte Dopaminsynthese den Verlust der DA Mittelhirnneurone im PD zu kompensieren versuchen, um den Bedarf an Dopamin in den Projektionsgebieten zu decken. In jedem Fall deutet die erhöhte TH-Expression für die DA Mittelhirnneurone auf erhöhte zytosolische Dopamin-Level (Gavrilovic et al., 2010).

Zytosolisches Dopamin ist neurotoxisch (Caudle et al., 2008). Zur Speicherung von zytosolischem Dopamin in Vesikeln dient in DA Mittelhirnneuronen der Vesikuläre Mono-Amin-Transporter 2 (VMAT2), von welchem die mRNA-Levels ebenfalls signifikant erhöht in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen detektiert wurden (vgl. 3.5.2 & 3.5.3). Diese Erhöhung deutet nicht auf einen Einfluss des signifikanten Altersunterschieds der PD- und Kontroll-Gruppe hin, welcher mit niedrigeren VMAT2-mRNA-Levels im höheren Alter beschrieben ist (Uhl et al., 2000). Allerdings ist die signifikante, dreifache Erhöhung der mRNA-Levels von VMAT2 geringer als die neunfache Erhöhung der mRNA-Levels von TH (vgl. 3.5.6, Tab. 22). Dies lässt zwei Schlüsse zu: 1. Die erhöhten mRNA-Levels von VMAT2 reichen nicht aus, um die resultierenden Dopaminmengen der signifikant höheren TH-mRNA-Levels zu verpacken, was zu einer Erhöhung der zytosolischen Dopamin-Levels führt. Diese Situation würde einen direkten PD-Pathomechanismus im Sinne eines tödlichen positiven *feedback loops* darstellen (Caudle et al., 2008). 2. Die Effizienz von VMAT2 reicht aus, um auch die erhöhten Mengen von Dopamin in Vesikel zu verpacken. Das würde bedeuten, dass das DA Neuron mehr Dopamin zur Ausschüttung in Vesikeln bereitstellt, also zur Kompensation des Dopaminmangels aufgrund der degenerierten DA Mittelhirnneurone im PD beiträgt. Die Aktivität von VMAT2 wird u.a. durch Phosphorylierung auf Proteinebene gesteuert (Fei et al., 2008), sodass die mRNA-Menge nicht linear zur Bioverfügbarkeit und Aktivität von VMAT2 sein muss.

Die mRNA-Levels des Dopamintransporters DAT wurden als vierfach (signifikant) höher in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen detektiert und wiesen im Verhältnis zu TH und VMAT2 keine signifikanten Unterschiede auf. Diese erhöhten mRNA-Levels von DAT deuten auf eine erhöhte Wiederaufnahmekapazität von extrazellulärem, freigesetztem Dopamin hin. Zwar weist der Dopamintransport von DAT im Vergleich zur Diffusion von Dopamin eine langsame Kinetik auf, dennoch bewirkt mehr DAT (wie hier in Form der erhöhten mRNA-Levels in PD-Proben) eine effizientere Wiederaufnahme von Dopamin (Rice and Cragg, 2008).

4.4.3 Aktivitätsregulation DA Mittelhirnneurone in PD

DA Mittelhirnneurone weisen intrinsische tonische Aktivität auf (Schrittmacheraktivität) und haben die Möglichkeit zur Stimulation der Aktionspotential-Frequenz, sowie durch „Burstaktivität“ erhöhte Dopaminkonzentrationen freizusetzen (vgl. 1.3.1.4), was zu einer kompensatorischen Funktion DA Mittelhirnneurone passen würde.

Die durchgeführten Studien aktivitätsregulierender Ionenkanäle ergaben hingegen signifikant erhöhte mRNA-Levels der Gene von inhibitorisch wirkenden Kaliumkanälen GIRK2, Kv4.3 (, *FREQ*) und SUR1, was mit einer verringerten Aktivität der DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen interpretiert werden könnte. Die Gene aktivitätsfördernder Ionenkanäle HCN2 (, *TRIP8B*), CaV1.3 und NMDAR1 (s.u.) wiesen hingegen keine Signifikanzen bzw. Veränderungen der Genexpression auf.

Mit aktiviertem Dopaminrezeptor D2 werden verschiedene Signalkaskaden in Verbindung gebracht, welche beispielsweise GIRK2 oder GSK3 β involvieren (vgl. Abb. 8 und Anhang). Die signifikant erhöhten (vierfach) mRNA-Levels von D2 NM-positiver DA Neurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen wiesen auf eine verstärkte Antwort durch mehr D2-Rezeptoren nach Ausschüttung von Dopamin hin. Die Splicevarianten D2s und D2l zeigten ebenfalls jeweils 1,5fache Erhöhung in den PD-Proben, was nicht auf die bevorzugte Expression einer Variante schließen lässt (vgl. 3.5.3). Das Verhältnis von D2 zu GIRK2 war in Kontrollen und PDs nahe 1 : 1 (vgl. 3.5.6) und zwischen PD- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich, was auf eine orchestrierte Erhöhung der mRNA-Levels für diese beiden funktionell gekoppelten Gene schließen lässt. Weiterhin waren die mRNA-Levels der porenbildenden A-Typ Kaliumkanaluntereinheit Kv4.3 signifikant in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht (fünffach), ebenso die der putativ modulatorischen Untereinheit *FREQ* (vgl. 3.5.4), welche bereits bei Genexpressionsstudien im Mausmodell und Fibroblasten von PD-Patienten als verändert auffielen (Gispert et al., 2003; Auburger et al., unpublished). Diese erhöhten mRNA-Levels des A-Typ Kaliumkanals führen zu einer Verlängerung des Interspike Intervalls und damit zu einer Minderung der Schrittmacherfrequenz bis zu einem gewissen Grad (max. 2,7fach, (Floresco et al., 2003; Liss et al., 2001)) und damit direkt korreliert, soweit betrachtet, zu einer verminderten Dopaminfreisetzung (Maffie and Rudy, 2008). Letztlich zeigt auch die regulatorische, metabolisch hochsensitive β -Untereinheit SUR1 des K_{ATP} -Kanals signifikant erhöhte (zweifach) mRNA-Levels NM-positiver DA Neurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Der K_{ATP} -Kanal ist mit der PD-Pathogenese im Mausmodell assoziiert (Liss et al., 2005) und scheint auch für die Burstaktivität einer Subpopulation von SN DA Mittelhirnneuronen essentiell (Schiemann et al., in preparation).

Der für die netzwerkinduzierte „Burstaktivität“ *in vitro* essentielle Glutamatrezeptor, bzw. die mRNA-Levels der NMDAR1-Glutamatrezeptor-Untereinheit waren zwar leicht signifikant in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht (kleiner zweifach), aber die Werte lagen an der Schwelle der methodischen Unterschied-

detektierbarkeit und der mRNA-Unterschied war deutlich niedriger als der der aktivitätsmindernden Kaliumkanal-Untereinheiten (vgl. 3.5.4). Die mRNA-Levels der aktivitätsverstärkenden HCN2-Kanaluntereinheit, welche im Mausmodell in DA Mittelhirnneuronen die vorherrschende ist (Franz et al., 2000), wies keine signifikanten Veränderungen zwischen PD-Patienten und Kontrollen auf, während die HCN3 und HCN4-Untereinheiten unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Allerdings werden HCN-Kanäle insbesondere auch auf Proteinebene reguliert (Zhang et al., 2009). Die regulatorische β -Untereinheit TRIP8B des HCN2-Kanals wurde ebenfalls als nicht signifikant verändert exprimiert detektiert (vgl. 3.5.4) und ergab ein Verhältnis zur Expression der HCN2-Untereinheit von nahe 1 : 1 (vgl. 3.5.6). Weiterhin wiesen die mRNA-Levels für die Calciumkanal alpha-Untereinheit CaV1.3 keine Veränderungen der Genexpression in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen auf (vgl. 3.5.4). Befunde aus Mausmodellen, die eine erhöhte CaV1.3-Aktivität als kausal für den PD-Pathomechanismus identifiziert haben (Chan et al., 2007), stützen die Daten der vorliegende Studie an humanen DA Neuronen entsprechend nicht. Die Genexpressionslevels von CaV1.2, SK3 und KCHIP3 lagen nahe oder unterhalb der Detektionsgrenze, sodass für diese keine Aussage über einen Einfluss auf die Aktivität DA Mittelhirnneurone möglich ist.

Insgesamt lassen die detektierten mRNA-Levels von Kalium-Ionenkanälen also wieder erwarten auf eine Aktivitätsminderung schließen, wenn die Neurone isoliert betrachtet werden, was zunächst im Widerspruch zu der Hypothese steht, dass die erhöhte Aktivität der Gene TH, VMAT2 und DAT eine kompensatorische Funktion haben könnten. Diese Aktivitätsminderung der DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten könnte jedoch auch mit einem kompensatorischen Netzwerkeffekt der Basalganglien zurückzuführen sein. Durch die verminderte Dopaminausschüttung in den Projektionsgebieten der DA SN Neurone aufgrund der Neurodegeneration dieser DA Mittelhirnneurone im PD geraten der indirekte und der direkte Weg der Basalganglienschleife aus dem Gleichgewicht (vgl. 1.2.2.3, Abb. 5). Die DA Neurone der SNpc erhalten u.a. glutamaterge, erregende Eingänge des NST (*Nucleus Subthalamicus*, STN), welcher aufgrund der Deregulation im PD nicht mehr durch den Gpe gehemmt wird und eine dramatische Überaktivität aufweist (Luo et al., 2002; Shimo and Wichmann, 2009). Durch diese erhöhte NST-Aktivität sollen auch die DA Neurone im Mittelhirn in ihrer Aktivität und insbesondere auch die Burst-Frequenz dramatisch stimuliert werden. Die DA Mittelhirnneurone scheinen durch erhöhte Expression der aktivitätsmindernden Kaliumkanäle (GIRK2, Kv4.3 und K_{ATP}) diesen pathologisch verstärkten

glutamatergen Input entgegenzuwirken, um so entsprechend auch z.B. einer dadurch bedingten Excitotoxizität zu entgegenzuwirken.

4.4.3 Die PARK-Gene α -SYN und LRRK2 im Zusammenhang mit der PD-Pathogenese

Von den untersuchten PARK-Genen α -Synuclein (α -SYN), LRRK2 und PARKIN, welche mit den häufigsten familiären Formen des PD assoziiert sind, konnten für alpha-SYN signifikant erhöhte (siebenfach) mRNA-Levels in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen detektiert werden. Die mRNA-Levels von LRRK2 wiesen keine signifikanten Expressionsunterschiede auf, während die Genexpression von PARKIN und der α -SYN-Splicevariante NACP112 nahe der Detektionsgrenze mit Tendenz zu erhöhter Expression in PD-Patienten lagen und die α -SYN-Splicevariante NACP126 nicht mehr detektierbar in einzelnen Neuronen war, sodass für diese Gene keine valide Aussage hinsichtlich Expressionsunterschieden in PD-Patienten und Kontrollen und somit über eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese von PD gemacht werden kann (vgl. 3.5.5).

α -SYN kann bei Gendosiserhöhung (PARK4: Duplikation, Triplikation; (Eriksen et al., 2005)) oder PARK1: Mutation (Gasser, 2009) zu familiärem, autosomal dominantem PD führen. Erhöhte Expression oder die Expression mutierter Formen von alpha-SYN werden zudem mit Neurodegeneration und Neurotoxizität in Verbindung gebracht (Waxman and Giasson, 2009) und es wurde gezeigt, dass eine erhöhte alpha-SYN-Expression die Dopaminausschüttung durch Inhibition der synaptischen Vesikelneubildung nach Endozytose reduziert (Nemani et al., 2010). Diese Befunde in Zusammenhang mit der erhöhten Expression von alpha-SYN, sowie die verminderte Aktivität DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen deuten auf ein Abschwächen der Dopaminausschüttung hin. Weiterhin unterstützen die Befunde der erhöhten alpha-SYN-Expression in individuellen DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen die Befunde aus genomweiten Assoziationsstudien, das α -SYN-Dysregulation einen entscheidenden Pathomechanismus des PD darstellen könnte (Gasser, 2009). Durch die Kombination der erhöhten Dopaminsynthese durch die erhöhten TH-mRNA-Levels und der Inhibition der Dopaminfreisetzung durch α -Synuclein scheint α -SYN zur Neurotoxizität beizutragen.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von LRRK2 ergaben eine unveränderte Expression von LRRK2 in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen (vgl. 3.5.5). Diese Beobachtung entspricht ähnlichen Studien zur Genexpression von LRRK2 (Simunovic et al., 2009; Zimprich et al., 2004), allerdings ist auch gezeigt, dass

Überexpression von LRRK2 zur Neurotoxizität beiträgt (Lin et al., 2009). Da LRRK2 aber zumindest nicht auf mRNA-Ebene höher in PD-Patientengewebe exprimiert ist, lässt dies hinsichtlich der Beteiligung von LRRK2 am Pathomechanismus der Krankheitsentstehung von PD drei Schlüsse zu: 1. Die DA Mittelhirnneurone haben überlebt, da die LRRK2-Expression nicht erhöht ist oder 2. LRRK2 wird nicht transkriptionell reguliert oder aber 3. LRRK2 ist nicht am Pathomechanismus von idiopathischem PD beteiligt. Aktuelle genomweite Assoziationsstudien weisen aber durchaus auf eine Rolle von LRRK2 im idiopathischen PD hin (Healy et al., 2008; Simon-Sanchez et al., 2009). Eine posttranskriptionelle Regulation von LRRK2 könnte auch die erhöhten alpha-SYN-mRNA-Levels in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen erklären, da gezeigt ist, dass LRRK2 durch seine Kinase-Aktivität die Genexpression von alpha-SYN induzieren kann (Carballo-Carbajal et al., 2010). Die Kinase-Funktion von LRRK2 könnte zudem mit der Modulation von Ionenkanälen DA Neurone in Verbindung stehen, da diese durch Kinasen reguliert werden (Deetjen et al., 2005).

4.4.3 In Mausmodellen identifizierte Kandidatengene für den PD-Pathomechanismus

Von den Genen IGSF-4, LDH-B, GSK3 β , FREQ, WNT5A und HOMER1, welche durch veränderte Genexpression in zwei unabhängigen Mausmodellstudien im Zusammenhang mit der PD-Pathogenese identifiziert wurden (vgl. 1.3.1.6), konnten für IGSF-4, LDH-B, GSK3 β und FREQ signifikant erhöhte mRNA-Levels in DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen detektiert werden, während HOMER1 keine veränderte Genexpression aufwies (WNT5A lag unterhalb des Detektionslimits; vgl. 3.5.5).

Die in der Arbeitsgruppe im Mausmodell als signifikant erhöht in individuellen, weniger hochvulnerablen DA SN Neuronen identifizierten mRNAs von LDH-B, IGSF-4 und GSK3 β (Milani et al., in preparation) waren also im Vergleich zu resistenteren VTA DA Neuronen auch in humanen DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht, was eine kausale Rolle dieser Gene für den PD-Pathomechanismus, bzw. die Vulnerabilität DA Neurone unterstützt. IGSF-4 ist bereits zusammen mit WNT5A als verändert in der Genexpression in Hautfibroblasten von PD-Patienten mit familiärem Parkinson (PINK1-Mutation) im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben (Hoepken et al., 2008). WNT5A schien allerdings kaum im Mittelhirngewebe der Proben exprimiert zu sein, oder aber der verwendete TaqMan-Assay war nicht sensitiv genug für eine ausreichende Detektion (vgl. Tab. 15). Des Weiteren waren FREQ (s.o.) und

HOMER1 mit veränderter Expression im Zusammenhang mit der PD-Pathogenese in vergleichenden Gewebestudien von Wildtyp-Mäusen mit einer Überexpression einer mutierten α -Synuclein-Variante (A53T) aufgefallen. Diese wiesen unterschiedliche mRNA-Levels für HOMER1 und FREQ im striatalen Gewebe im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf (Auburger et al., in preparation). Auch hier konnte für FREQ eine veränderte Genexpression in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden, allerdings keine Genexpressionsveränderungen von HOMER1, obwohl erhöhte mRNA-Levels von HOMER1 mit Bewegungsstörungen in Verbindung stehen (De Luca et al., 2009), als Langzeitnebenwirkung von L-DOPA-Behandlung diskutiert werden (Sgambato-Faure et al., 2005) und in Fibroblasten von PD-Patienten (PINK1-Mutation) im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte Genexpression aufweisen (Hoepken et al., 2008). Die abweichenden Befunde dieser genannten Studien von der vorliegenden Studie sind vermutlich auf die unterschiedlichen verwendeten Modellsysteme Ratte (Sgambato-Faure et al., 2005) und Maus (Auburger et al., in preparation), bzw. die abweichenden Zelltypen (Hoepken et al., 2008) zurückzuführen. Unsere humanen Einzelzellbefunde könnten dahingehend interpretiert werden, dass FREQ aufgrund präsynaptischer, also erhöhtem Vorkommen in DA Mittelhirnneuronen erhöht ist, während HOMER1 ggf. aufgrund postsynaptischer Lokalisation im Striatum auffiel (Auburger et al., in preparation), aber eben nicht in der Präsynapse von DA Mittelhirnneuronen und daher nicht in der vorliegenden Studie.

IGSF-4 werden Funktionen wie Tumor-Suppressor-Eigenschaften, Zell-Adhäsion und Synapsenausbildung von Neuronen zugeordnet (Watabe et al., 2003). Zu mit IGSF4-assoziierten Erkrankungen gehören unter anderem Onkogenese, T-Zell Leukämie und Neoplasie (Murakami, 2005). Im Vergleich individueller, muriner VTA und SN Neurone, war die Expression von IGSF-4 in den weniger vulnerablen VTA Neuronen höher exprimiert (Milani et al., in preparation). Die erhöhte Genexpression von IGSF-4 in NM-positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ist insbesondere bzgl. der Synapsenausbildung interessant. Die Synapsenneuausbildung ist beispielsweise nach Nervenschädigung gezeigt (Zelano et al., 2009) und könnte in der vorliegenden Studie, im Falle einer tatsächlichen Synapsenneuausbildung DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten, die in Zusammenhang mit den Dopamin-assoziierten Genen geäußerte Kompensation stützen. Höhere Dopamin-Synthese und -Bereitstellung in Vesikeln, sowie eine größere Dichte an Synapsen in den Projektionsgebieten DA Mittelhirnneurone würden zu einer Kompensation der degenerierten Neurone beitragen.

Die Laktat-Dehydrogenase B (LDH-B) wies signifikant erhöhte (3,5fach) mRNA-Levels individueller DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen auf. Die Expression des Neuronenmarkergens ENO2 war signifikant und sechsfach höher in NM-positiven, individuellen DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Ferner konnte in Maushirnen eine spezifische Erhöhung an oxidiertes LDH-B im Zusammenhang mit PD (Überexpression von alpha-Synuclein A30P in transgenen Mäusen) (Poon et al., 2005) gezeigt werden. LDH-B ist, wie der neuronenspezifische Marker ENO2, an der Glykolyse und somit am Metabolismus der Zelle beteiligt. Die erhöhten mRNA-Levels von LDH-B in Zusammenhang mit PD deuten auf einen erhöhten Stoffwechsel und somit erhöhten Zellstress hin, was wiederum die erhöhten Genexpressionen der aktivitätsmindernden Kalium-Ionenkanäle erklären könnte (Exitotoxizität, s.o.). Interessanterweise moduliert LDH-B auch die Aktivität von K_{ATP} -Kanälen (Crawford et al., 2002), die, wie diskutiert, kausal für den Pathomechanismus von vulnerablen SN DA Neuronen der Maus sind (Liss et al., 2005).

Erhöhte Aktivität der multifunktionellen Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) steht in Verbindung mit Neurodegeneration und AD (Proctor and Gray, 2010), zudem ist ein Zusammenhang mit PD bekannt, wobei GSK3 β in Lewy-Körperchen nachgewiesen werden konnte und mit der Pathogenese von PD in Verbindung gebracht wird (Nagao and Hayashi, 2009). Weiterhin sind allelische und distinkte Splicevarianten in Zusammenhang mit PD und erhöhten mRNA-Levels von GSK3 β beschrieben (Kwok et al., 2005). Signifikant erhöhte (vierfach) mRNA-Levels wurden auch in der vorliegenden Studie individueller, NM-positiver DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen gefunden. Diese Befunde wiesen, wie auch in entsprechenden genomweiten Assoziationsstudien (Kalinderi et al., 2009), auf ein erhöhtes Risiko für PD und DA Neurodegeneration durch erhöhte GSK3 β -Aktivität hin (Infante et al., 2009). GSK3 β kann zudem durch die erhöhten alpha-SYN-Level aktiviert werden und somit verstärkt zur Neurodegeneration und tau-Proteinablagerungen führen (Duka et al., 2009). Der erhöhten GSK3 β -Aktivität kann die ebenfalls erhöhte D2-Expression entgegenwirken, denn D2 kann nach verlängerter Dopaminbindung die Inaktivierung von GSK3 β bewirken (De Mei et al., 2009).

4.4.4 Abschließende Bemerkungen der Genexpressionsanalysen von humanem *post-mortem* Material

Bei der Untersuchung von humanem *post-mortem* Gewebe muss immer beachtet werden, dass es sich um eine „Momentaufnahme“ der Genexpression (einer relativ inhomogenen Kohorte)

handelt. Auch bei den zellspezifischen Analysen dieser Arbeit stellt sich die Frage, ob die ermittelten Genexpressionsunterschiede bei PD-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen ursächlich für PD sind bzw. deren Aktivität protektiv für die DA Mittelhirnneurone sind, oder ob die detektierten Änderungen als Folge kompensatorischer Ereignisse im Verlauf der Erkrankung auftreten. Diese Frage kann nicht allein auf Basis von Genexpressionsanalysen beantwortet werden. Weitere Untersuchungen von Funktion, Protein-Leveln und -Interaktionen sind notwendig, insbesondere an geeigneten Mausmodellen.

Des Weiteren ist die mathematische Auswertung von Genexpressionsdaten, wie jede statistische Auswertung mit Vorsicht zu betrachten. Die Auswertemethode über Signifikanztests mit der willkürlichen Signifikanzgrenze von 0,05 zeigt Korrelation einiger Gendosisveränderungen mit PD. Es besteht generell die Möglichkeit einer zufälligen Korrelation, da hohe Korrelationswerte nicht gleichzusetzen sind mit kausaler Verknüpfung (Geburtenrate und Storchpopulation (Hofer et al., 2004)). Diese Einschränkungen sind besonders im Kontext der unvermeidbar hohen biologischen Variabilität der humanen *post-mortem* Gewebe und der kleinen Fallzahlen relevant. Trotz dieser Einschränkungen leisten die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie des PD, da die Expressionsveränderungen in verschiedenen Individuen mit jeweils einzigartigen Charakteristika der beiden Gruppen (Kontrollen und PD) auftraten und im Falle von TH für alle Assayserien wiederholt validiert werden konnten.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die zellspezifisch vergleichende Genexpressionsanalyse von den betroffenen DA Neuronen in humanem *post-mortem* Mittelhirngewebe von PD-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen einen geeigneten, komplementären Ansatz darstellt, um Befunde aus Mausmodell-Studien auf den humanen Morbus Parkinson zu übertragen und um z.B. genomweite Assoziationsstudien zu ergänzen. So ist entsprechend geplant, die fünf vor kurzem im PARK16 Locus identifizierten Gene in Hinblick auf ihre zellspezifische Expression in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten und Kontrollen zu untersuchen, um so ggf. Hinweise für eine genauere Identifizierung des dem PARK16 unterliegenden Gens (SLC45A3, NUCKS1, RAB7L1, SLC41A1 oder PM20D1) im PD zu bekommen. Generell wünschenswert für weitere UV-LMD-Studien humaner *post-mortem* DA Mittelhirnneurone ist möglichst homogenes Gewebe, welches die Möglichkeit der eindeutigen Unterscheidung in anatomische Subregionen aller Gewebeproben bietet und in derselben van Domburg Region mit derselben Schnittebene angeschnitten ist.

Die in der vorliegenden Studie identifizierten Gene mit orchestriert erhöhter Genexpression, insbesondere von DA Synthese- und Metabolismusgenen in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen stellen ihrer molekularen Funktion entsprechend mögliche Ziele für neue Therapieansätze dar. Dazu sollten die vorgeschlagenen Möglichkeiten der Dopamin-Kompensation durch die DA Markergene (TH, VMAT2, DAT), der Aktivitätsminderung durch die Kaliumkanäle (GIRK2, K_{ATP} , Kv4.3) als Reaktion auf den erhöhten erregenden Input der SNpc Neurone durch den NST im PD und der Einfluss und Zusammenhang mit PD der ebenfalls in der Expression veränderten Kandidatengene α -SYN, IGSF-4, LDH-B und GSK3 β funktionell evaluiert werden. Für diese weiterführenden Studien sind Tiermodellorganismen der PD-Erkrankung sinnvoll, welche auch zu definierten Zeitpunkten untersucht werden können. Mögliche Modelle sind hier beispielsweise neurotoxische Mausmodelle, bei welchen zu einem definierten Zeitpunkt die selektive DA Mittelhirnneuronendegeneration initiiert und später zu definierten Zeitpunkten die Genexpression analysiert wird (z.B. via MPTP oder 6'OHDA, wie schon in Kooperationsprojekt mit Prof. Roeper (Institut für Neurophysiologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main) angestrebt). Ebenso sollte der regulatorische Einfluss von miRNAs weiter untersucht werden. Die in dieser Studie etablierte miRNA-Detektionsmethode bietet die Möglichkeit weitere Kandidaten-miRNAs zu untersuchen und einen ggf. regulatorischen

Einfluss auf die PD-Pathogenese abzuleiten. Die entwickelte gezielte RNA-Thermodegradation sollte dazu auch auf miRNA-Assays übertragen und weiterentwickelt werden, um mögliche Einflüsse degradierteter RNA einschätzen zu können. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte System zur mRNA-Analyse aus PFA-fixiertem Gewebe bietet zudem die Möglichkeit einer vielseitigeren Nutzung der UV-LMD-Methodik.

Bei den weiterführenden Untersuchungen sollten neben der Funktion auch Protein-Levels und Proteininteraktionen mit einbezogen werden. Aus diesem Grund ist die Ausweitung der lasergestützten, zellspezifischen Expressionsanalyse auch auf die Proteinebene angestrebt, z.B. in Kombination von MALDI/SELDI-TOF mit der UV-LMD. Beispielsweise sind die getesteten EP-Objekträger für Proteomanalysen individueller DA Mittelhirnneurone geeignet. Neben der zellspezifischen Proteom- und RNA-Analyse sollte auch die DNA-Integrität einzelner DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen verglichen werden, z.B. durch zellspezifische Telomer- und CGH-Studien nach UV-LMD.

Die geplante Weiterentwicklung der verwendeten Techniken und Methodiken wird ferner einen wichtigen Beitrag zur möglichst umfassenden Einzelzellanalyse von humanen DA Mittelhirnneuronen oder auch anderer spezifischer Zellpopulationen in Krankheit und Kontrollgewebe leisten. So wird z.B. derzeit bereits in Kooperation mit Prof. D. Thal (Sektion Neuropathologie am Institut für Pathologie) und Prof. A. Ludolph (Universitätsklinik für Neurologie, beide Universität Ulm) Hirnmaterial von ALS-Patienten für eine entsprechende Studie gesammelt.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von aussichtsreichen Kandidatengenenspezifisch für DA Mittelhirnneurone von *post-mortem* Morbus Parkinson (PD)-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen untersucht. So sollten ursächliche oder möglicherweise kompensatorische Mechanismen im Zusammenhang mit der Pathogenese des Morbus Parkinson (PD) in individuellen dopaminergen (DA) Mittelhirnneuronen identifiziert oder validiert werden. Zunächst wurde dazu die Einzelzellmethodik weiterentwickelt und an die spezifischen Anforderungen zur Analyse von humanem *post-mortem* Material angepasst.

Die Resultate der Genexpressionsanalyse dieser Studie basieren auf den kombinierten Techniken der kontaktfreien Lasermikrodissektion (UV-LMD) individueller Zellen von Ethanol-fixierten und Cresylviolett gefärbten Mittelhirngewebeschnitten auf Polyethylen-Naphthalat (PEN)-beschichteten Objektträgern mit anschließender cDNA-Synthese, sowie der Quantifizierung der mRNA-Levels via quantitativer *real-time* PCR (qPCR). Diese kombinierte UV-LMD und *real-time* qPCR Einzelzellmethodik wurde auf weitere murine Gewebearten (*Cerebellum*, *Cochlea* und Darmkrypten) erfolgreich angewandt und darüber hinaus für den Einsatz von anderen Objektträgern und die alternative Paraformaldehyd (PFA)-Fixiertechniken, sowie die parallele Analyse von regulatorischen Mikro RNAs (miRNAs) erweitert.

Die Hauptbefunde dieser Arbeit sind orchestriert erhöhte mRNA-Levels von Genen, die mit Dopaminsynthese und -metabolismus assoziiert sind (TH, VMAT2, DAT, D2, CB und ENO2), in individuellen, humanen Neuromelanin- (NM-) positiven DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten im Vergleich zu nicht an PD erkrankten Kontrollen. Diese Erhöhung geht mit ebenfalls in PD erhöhten mRNA-Levels aktivitätsmindernder Kaliumkanaluntereinheiten (GIRK2, Kv4.3 und SUR1) einher, während aktivitätsfördernde Ionenkanaluntereinheiten (NMDAR1, HCN2 und CaV1.3) keine Veränderung aufwiesen. Weiterhin gaben die Untersuchungen der PARK-Gene PARK1/4 (α -SYN) und PARK8 (LRRK2) aufgrund erhöhter mRNA-Level von α -SYN, aber nicht LRRK2, in DA Mittelhirnneuronen von PD-Patienten Hinweise auf eine transkriptionelle Dysregulation von α -SYN, aber nicht LRRK2, auch im idiopathischen PD. Zudem konnten weitere Kandidatengene, welche in komplementären Ansätzen im Mausmodell identifiziert wurden (LDH-B, GSK3 β , FREQ und IGSF4) in der vorliegenden Studie auf Einzelzellebene humaner DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen als für den Pathomechanismus des PD relevant

validiert werden. Die Validierung war insbesondere für die in der eigenen Arbeitsgruppe auf Einzelzellebene im Mausmodell identifizierten Kandidatengene erfolgreich, während die Kandidatengene aus Gewebestudien von Kooperationspartner nur zum Teil gestützt werden konnten.

Die methodischen Entwicklungen der vorliegenden Arbeit liefern eine technische Plattform für die systematische, vergleichende Einzelzellexpressionsanalyse von humanem *post-mortem* Material in Krankheit und Kontrollen. Die Ergebnisse der vergleichenden humanen *post-mortem* Untersuchungen individueller DA Mittelhirnneurone von PD-Patienten und Kontrollen der vorliegenden Studie definieren neue Ansatzpunkte für die Entschlüsselung der molekularen Pathophysiologie des PD und für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 – Dopaminsynthese..... | 2 |
| Abbildung 2 – Humanes Gehirn und Lage der <i>Substantia Nigra</i> | 3 |
| Abbildung 3 – Neuroanatomie des menschlichen dopaminergen Mittelhirnsystems..... | 4 |
| Abbildung 4 – Neuroanatomie des murinen dopaminergen Mittelhirnsystems..... | 5 |
| Abbildung 5 – Vereinfachtes Schema der Basalganglienschleifen..... | 6 |
| Abbildung 6 – Molekulare Pathomechanismen des PD..... | 10 |
| Abbildung 7 – Dopaminerge Markergene..... | 13 |
| Abbildung 8 – D2-vermittelte prä- und postsynaptische Signale..... | 15 |
| Abbildung 9 – Biogenese und Signalweg von miRNAs im Vergleich zu mRNAs..... | 16 |
| Abbildung 10 – Aktionspotentiale, Aktivitätsmuster und ausgewählte Ionenkanäle..... | 18 |
| Abbildung 11 – UV-LMD Methodik..... | 41 |
| Abbildung 12 – Gefriermikrotom CM 1850..... | 43 |
| Abbildung 13 – Das UV-Lasermikrodissektionsmikroskop LMD6000..... | 45 |
| Abbildung 14 – Hauptbedienfelder der LMD6000-Software..... | 47 |
| Abbildung 15 – Das Picodrop-Photometer..... | 51 |
| Abbildung 16 – Die Funktionsweise des Bioanalyzers 2100..... | 53 |
| Abbildung 17 – Schem. Darstellung. der <i>real-time</i> qPCR Maschine GeneAmp 7900 HT...58 | |
| Abbildung 18 – Prinzipien der <i>real-time</i> qPCR..... | 63 |
| Abbildung 19 – Ct-Werte und Standardkurve von humanem α -Synuclein..... | 66 |
| Abbildung 20 – Quantitätsberechnung anhand einer Standardreihe..... | 67 |
| Abbildung 21 – Übersicht des hum. Mittelhirngewebeblocks der K-Probe K-SN 9..... | 70 |
| Abbildung 22 - Übersicht des hum. Mittelhirngewebeblocks der PD-Probe PD-SN 1..... | 71 |
| Abbildung 23 – Qualität & Homogenität der für die Genexpr.-Analysen einges. Proben.... | 73 |
| Abbildung 24 – Vergleich verschiedener Ablationsmethoden und Objektträger..... | 75 |
| Abbildung 25 – Zellspez. Expr. von Girk-Kanälen in murinem <i>Cerebellum</i> -Zelltypen..... | 77 |
| Abbildung 26 – CGH-Analyse UV-LMD isolierter muriner Darmkrypten..... | 79 |
| Abbildung 27 – RNA aus PFA nach UV-LMD..... | 81 |
| Abbildung 28 – Parallele miRNA- und mRNA-Quantifizierung..... | 83 |
| Abbildung 29 – cDNA-Standardkurven für 2 verschiedene α -Synuclein-Splicevarianten.... | 85 |
| Abbildung 30 – RNA-Qualitätsunterschiede von nativen und fixiertem & gefärbten murinen Gewebeschnitten..... | 87 |
| Abbildung 31 – Einfluss der RNA-Degradation auf <i>real-time</i> qPCR Ergebnisse..... | 89 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 32 – Genexpression von TH (Assayserie 1 und 5) | 91 |
| Abbildung 33 – Übersicht Genexpression von TH der 5 Assayserien..... | 93 |
| Abbildung 34 – Notwendigkeit der Zellspezifität für Genexpressionsanalysen von Gewebe unterschiedlicher Zusammensetzung (wie z.B. PD mit Kontrollen) | 95 |
| Abbildung 35 – Übersicht der mRNA-Expression dopaminergem Markergenen in DA Mittelhirnneuronen..... | 97 |
| Abbildung 36 – Übersicht Genexpression aktivitätsregulierender Ionenkanalgen..... | 100 |
| Abbildung 37 – Zellspezifische mRNA-Level von mit familiären PD- bzw. in Mausmodellen mit PD-assoziiert identifizierten Genen | 103 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-------|
| Tabelle 1 – PD-assoziierte Gene..... | 10 |
| Tabelle 2 – Software..... | 26 |
| Tabelle 3 – Laborgeräte..... | 27 |
| Tabelle 4 – Verbrauchsmaterialien..... | 27 |
| Tabelle 5 – Chemikalien und Kits..... | 28 |
| Tabelle 6 – Tabellarische Zusammenstellung der wichtigsten Genbankinformationen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten | 29 |
| Tabelle 7 – Humane TaqMan- und miScript-SYBRgreen-Assays..... | 30-32 |
| Tabelle 8 – Murine TaqMan-, miScript- und SYBRgreen-Assays..... | 32-33 |
| Tabelle 9 – Murine Primer für die Multiplex-Nested-PCR..... | 33 |
| Tabelle 10 – Übersicht natives humanes Hirngewebe..... | 39 |
| Tabelle 11 – Eigenschaften und Qualität aller humanen Hirngewebeproben..... | 72 |
| Tabelle 12 – Qualität und Homogenität der für die Genexpressionsanalysen eingesetzten Proben..... | 73 |
| Tabelle 13 – Murine Girk SYBRgreen qPCR-Assays..... | 78 |
| Tabelle 14 – RNA Isolation aus PFA-fixiertem Gewebe..... | 80 |
| Tabelle 15 – Qualitätsanalyse der für die humanen Analysen verwendeten Assays..... | 86 |
| Tabelle 16 – RIN-Vergleich von nativem und behandeltem Gewebe..... | 88 |
| Tabelle 17 – Daten für Dopamin- und Neuronenmarkergene aus Gewebeanalysen..... | 96 |
| Tabelle 18 – Datenzusammenfassung für DA-Neuronen assoziierte Markergen-mRNA Expression..... | 98 |
| Tabelle 19 – Vergleich der Expressionsdaten CB-negativer und aller NM-und TH-positiven Zellpools..... | 99 |
| Tabelle 20 – Datenzusammenfassung für Ionenkanal-mRNA-Expression in DA Mittelhirnneuronen..... | 101 |
| Tabelle 21 – mRNA-Level Datenzusammenfassung von PARK-Genen und im Mausmodell als PD-dysreguliert identifizierte Gene in DA Mittelhirnneuronen | 104 |
| Tabelle 22 – mRNA-Expressionsratios für funktionelle Genpaare..... | 104 |
| Tabelle 23 – mRNA-Expressionslevel in DA Neuronen von PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen..... | 107 |

6. Literaturverzeichnis

1. Aguado C, Colon J, Ciruela F, Schlaudraff F, Cabanero MJ, Perry C, Watanabe M, Liss B, Wickman K, Lujan R (2008) Cell type-specific subunit composition of G protein-gated potassium channels in the cerebellum. *J Neurochem* 105:497-511
2. An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403:553-556
3. Auburger G, et al.(to be announced) (2010) Tissue analysis of PARK4 mice. in preparation
4. Bar M, Bar D, Lehmann B (2009) Selection and validation of candidate housekeeping genes for studies of human keratinocytes--review and recommendations. *J Invest Dermatol* 129:535-537
5. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW (2010) mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*
6. Becker C, Riedmaier I, Pfaffl MW (2009) microRNA and mRNA measurements for RT-qPCR analysis. *Nature Methods* 47:112-120
7. Begus-Nahrman Y, Lechel A, Obenauf AC, Nalapareddy K, Peit E, Hoffmann E, Schlaudraff F, Liss B, Schirmacher P, Kestler H, Danenberg E, Barker N, Clevers H, Speicher MR, Rudolph KL (2009) p53 deletion impairs clearance of chromosomal-instable stem cells in aging telomere-dysfunctional mice. *Nat Genet* 41:1138-1143
8. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20:415-455
9. Bjorklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202
10. Bourne Y, Dannenberg J, Pollmann V, Marchot P, Pongs O (2001) Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). *J Biol Chem* 276:11949-11955
11. Braak E, Sandmann-Keil D, Rub U, Gai WP, de Vos RA, Steur EN, Arai K, Braak H (2001) alpha-synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. *Acta Neuropathol* 101:195-201
12. Braak H, Braak E (1986) Nuclear configuration and neuronal types of the nucleus niger in the brain of the human adult. *Hum Neurobiol* 5:71-82
13. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259
14. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211
15. Bueler H (2006) [Molecular mechanisms and genetics. Parkinson disease]. *Pharm Unserer Zeit* 35:198-203
16. Bueler H (2009) Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 218:235-246
17. Campbell NA, Reece JB (2003) *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag
18. Carballo-Carbajal I, Weber-Endress S, Rovelli G, Chan D, Wolozin B, Klein CL, Patenge N, Gasser T, Kahle PJ (2010) Leucine-rich repeat kinase 2 induces alpha-synuclein expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cell Signal* 22:821-827
19. Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11:490-493

20. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425
21. Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC, Miller GW (2008) Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends Neurosci* 31:303-308
22. Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ (2009) Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 32:249-256
23. Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447:1081-1086
24. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169
25. Chen X, Xu L, Radcliffe P, Sun B, Tank AW (2008) Activation of tyrosine hydroxylase mRNA translation by cAMP in midbrain dopaminergic neurons. *Mol Pharmacol* 73:1816-1828
26. Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2001) Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 7:1144-1150
27. Chung SH, Marzban H, Hawkes R (2009) Compartmentation of the cerebellar nuclei of the mouse. *Neuroscience* 161:123-138
28. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M (2006) *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441:1162-1166
29. Cochran EJ, Gostanian OM, Mirra SS (1995) Autopsy practices at CERAD and Alzheimer disease center sites: a survey of neuropathologists. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9:203-207
30. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:571-576
31. Crawford RM, Budas GR, Jovanovic S, Ranki HJ, Wilson TJ, Davies AM, Jovanovic A (2002) M-LDH serves as a sarcolemmal K(ATP) channel subunit essential for cell protection against ischemia. *EMBO J* 21:3936-3948
32. Dachsel JC, Lincoln SJ, Gonzalez J, Ross OA, Dickson DW, Farrer MJ (2007) The ups and downs of alpha-synuclein mRNA expression. *Mov Disord* 22:293-295
33. Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398-399
34. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain* 122 (Pt 8):1421-1436
35. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 (Pt 8):1437-1448
36. De Luca V, Annesi G, De Marco EV, de Bartolomeis A, Nicoletti G, Pugliese P, Muscettola G, Barone P, Quattrone A (2009) HOMER1 promoter analysis in

- Parkinson's disease: association study with psychotic symptoms. *Neuropsychobiology* 59:239-245
37. De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9:53-58
 38. Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J (2005) *Physiologie*. Urban und Fischer München - Jena
 39. Deetjen S, Hescheler (ed) (2005) *Physiologie*. Elsevier: Urban & Fischer München, Jena
 40. Deng J, Lewis PA, Greggio E, Sluch E, Beilina A, Cookson MR (2008) Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1499-1504
 41. Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LO, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJ, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V (2009) *FBXO7* mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 72:240-245
 42. Diaz NL, Waters CH (2009) Current strategies in the treatment of Parkinson's disease and a personalized approach to management. *Expert Rev Neurother* 9:1781-1789
 43. Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8:1150-1157
 44. Duka T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A (2009) Alpha-Synuclein contributes to GSK-3beta-catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. *FASEB J* 23:2820-2830
 45. Eilam R, Peter Y, Elson A, Rotman G, Shiloh Y, Groner Y, Segal M (1998) Selective loss of dopaminergic nigro-striatal neurons in brains of *Atm*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12653-12656
 46. Eriksen JL, Przedborski S, Petrucelli L (2005) Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 11:91-96
 47. Fahn S (2003) Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 991:1-14
 48. Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 7:306-318
 49. Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301
 50. Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE (2008) Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic* 9:1425-1436
 51. Fillenbaum GG, van Belle G, Morris JC, Mohs RC, Mirra SS, Davis PC, Tariot PN, Silverman JM, Clark CM, Welsh-Bohmer KA, Heyman A (2008) Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): the first twenty years. *Alzheimers Dement* 4:96-109
 52. Fineberg SK, Kosik KS, Davidson BL (2009) MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron* 64:303-309
 53. Fiorentini C, Busi C, Spano P, Missale C (2008) Role of receptor heterodimers in the development of L-dopa-induced dyskinesias in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14 Suppl 2:S159-164
 54. Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27:126-139

55. Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6:968-973
56. Foix C, Nicolesco I (1925) *Anatomie Cerebrale; Les Noyeux Gris Centraux et la Region Mesencephalo-Sous-Optique, Suive d'un Appendice sur l'Anatomie Pathologique de la Maledie de Parkinson*. Masson et Cie
57. Franz O, Liss B, Neu A, Roeper J (2000) Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (Ih) in central neurons. *Eur J Neurosci* 12:2685-2693
58. Fuchs J, Mueller JC, Lichtner P, Schulte C, Munz M, Berg D, Wullner U, Illig T, Sharma M, Gasser T (2009) The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 30:731-738
59. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F (2002) A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51:296-301
60. Garcia-Gorostiaga I, Sanchez-Juan P, Mateo I, Rodriguez-Rodriguez E, Sanchez-Quintana C, del Olmo SC, Vazquez-Higuera JL, Berciano J, Combarros O, Infante J (2009) Glycogen synthase kinase-3 beta and tau genes interact in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Ann Neurol* 65:759-761; author reply 761-752
61. Gasser T (2009) Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med* 11:e22
62. Gavrilovic L, Spasojevic N, Dronjak S (2010) Chronic individual housing-induced stress decreased expression of catecholamine biosynthetic enzyme genes and proteins in spleen of adult rats. *Neuroimmunomodulation* 17:265-269
63. Gibb WR, Lees AJ (1991) Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:388-396
64. Gispert S, Del Turco D, Garrett L, Chen A, Bernard DJ, Hamm-Clement J, Korf HW, Deller T, Braak H, Auburger G, Nussbaum RL (2003) Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol Cell Neurosci* 24:419-429
65. Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Cooper AA, Rochet JC, Lindquist S (2009) Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet* 41:308-315
66. Gründemann J (2006) Diplomarbeit: Vergleichende Genexpressionsanalyse humaner Dopaminergischer Mittelhirnneurone nach Lasermikrodissektion im Morbus Parkinson. *Institut für Physiologie und Pathophysiologie Philipps-Universität Marburg Marburg*, p 151
67. 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 Res* 36:e38
68. Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 60:487-493
69. Halliday GM, McCann H (2008) Human-based studies on alpha-synuclein deposition and relationship to Parkinson's disease symptoms. *Exp Neurol* 209:12-21
70. Halliday GM, McCann H (2010) The progression of pathology in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1184:188-195

71. Harrington CA, Winther M, Garred MM (2009) Use of bioanalyzer electropherograms for quality control and target evaluation in microarray expression profiling studies of ocular tissues. *J Ocul Biol Dis Infor* 2:243-249
72. Hassler R (1938) Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *Journal für Psychologie und Neurologie* 48:388-476
73. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2009) Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci* 1170:615-622
74. He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522-531
75. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 7:583-590
76. Hebert SS, De Strooper B (2007) Molecular biology. miRNAs in neurodegeneration. *Science* 317:1179-1180
77. Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S (2002) A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52:549-555
78. Hirsch EC, Graybiel AM, Agid Y (1989) Selective vulnerability of pigmented dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 126:19-22
79. Hoepken HH, Gispert S, Azizov M, Klinkenberg M, Ricciardi F, Kurz A, Morales-Gordo B, Bonin M, Riess O, Gasser T, Kogel D, Steinmetz H, Auburger G (2008) Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression. *Exp Neurol* 212:307-313
80. Hofer T, Przyrembel H, Verleger S (2004) New evidence for the theory of the stork. *Paediatr Perinat Epidemiol* 18:88-92
81. Hulette C, Mirra S, Wilkinson W, Heyman A, Fillenbaum G, Clark C (1995) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part IX. A prospective cliniconeuropathologic study of Parkinson's features in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1991-1995
82. 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
83. Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Akagi T, Hashikawa T, Nakayama KI, Takahashi R (2002) CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 10:55-67
84. Infante J, Garcia-Gorostiaga I, Sanchez-Juan P, Sierra M, Martin-Gurpegui JL, Terrazas J, Mateo I, Rodriguez-Rodriguez E, Berciano J, Combarros O (2009) Synergistic effect of two oxidative stress-related genes (heme oxygenase-1 and GSK3beta) on the risk of Parkinson's disease. *Eur J Neurol*
85. Iversen LL, Iversen SD, Dunnett SB, Björklund A (2010) *The Dopamine Handbook*. Oxford University Press
86. Kalinderi K, Fidani L, Katsarou Z, Clarimon J, Bostantjopoulou S, Kotsis A (2009) GSK3beta polymorphisms, MAPT H1 haplotype and Parkinson's disease in a Greek cohort. *Neurobiol Aging*
87. Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317:1220-1224

88. Kim ST, Choi JH, Kim D, Hwang O (2006) Increases in TH immunoreactivity, neuromelanin and degeneration in the substantia nigra of middle aged mice. *Neurosci Lett* 396:263-268
89. Kim ST, Kim EM, Choi JH, Son HJ, Ji IJ, Joh TH, Chung SJ, Hwang O (2009) Matrix metalloproteinase-3 contributes to vulnerability of the nigral dopaminergic neurons. *Neurochem Int*
90. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608
91. Kittappa R, Chang WW, Awatramani RB, McKay RD (2007) The foxa2 gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age. *PLoS Biol* 5:e325
92. Klein C (2006) Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson disease. *Arch Neurol* 63:328-334
93. Klein C, Lohmann K (2009) Parkinson disease(s): is "Parkin disease" a distinct clinical entity? *Neurology* 72:106-107
94. Klein C, Schlossmacher MG (2006) The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol* 2:136-146
95. Klein C, Vieregge P, Hagenah J, Sieberer M, Doyle E, Jacobs H, Gasser T, Breakefield XO, Risch NJ, Ozelius LJ (1999) Search for the PARK3 founder haplotype in a large cohort of patients with Parkinson's disease from northern Germany. *Ann Hum Genet* 63:285-291
96. Kosik KS (2006) The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 7:911-920
97. Kramer ML, Schulz-Schaeffer WJ (2007) Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies. *J Neurosci* 27:1405-1410
98. Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR (2005) GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 58:829-839
99. Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57:760-773
100. Langston JW (1990) Predicting Parkinson's disease. *Neurology* 40:suppl 70-74; discussion 75-76
101. Langston JW (2006) The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol* 59:591-596
102. Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, Vassilatis DK (2003) Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 33:85-89
103. Lee DW, Andersen JK (2010) Iron elevations in the aging Parkinsonian brain: a consequence of impaired iron homeostasis? *J Neurochem* 112:332-339
104. Leroy E, Boyer R, Polymeropoulos MH (1998) Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1. *DNA Res* 5:397-400
105. Lin X, Parisiadou L, Gu XL, Wang L, Shim H, Sun L, Xie C, Long CX, Yang WJ, Ding J, Chen ZZ, Gallant PE, Tao-Cheng JH, Rudow G, Troncoso JC, Liu Z, Li Z, Cai H (2009) Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron* 64:807-827
106. Liss B (2002) Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res* 30:e89
107. Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J (2001) Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J* 20:5715-5724

108. Liss B, Haeckel O, Wildmann J, Miki T, Seino S, Roeper J (2005) K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nat Neurosci* 8:1742-1751
109. Liss B, Roeper J (2008) Individual dopamine midbrain neurons: functional diversity and flexibility in health and disease. *Brain Res Rev* 58:314-321
110. Liss B, Roeper J (2010) Ion Channels and Regulation of Dopamine Neuron Activity. In: Iversen LL, Iversen SD, Dunnett SB, Bjorklund A (eds) *The Dopamine Handbook*, vol 1.0. Oxford University Press
111. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408
112. Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH
113. Luo J, Kaplitt MG, Fitzsimons HL, Zuzga DS, Liu Y, Oshinsky ML, During MJ (2002) Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* 298:425-429
114. Maffie J, Rudy B (2008) Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons. *J Physiol* 586:5609-5623
115. Maraganore DM, de Andrade M, Lesnick TG, Strain KJ, Farrer MJ, Rocca WA, Pant PV, Frazer KA, Cox DR, Ballinger DG (2005) High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 77:685-693
116. Marinkovic S (1990) Morphological characteristics of the A10 catecholaminergic group of neurons in the human midbrain. *Anat Anz* 171:115-124
117. Marsden CD (1961) Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals. *J Anat* 95:256-261
118. Martinat C, Bacci JJ, Leete T, Kim J, Vanti WB, Newman AH, Cha JH, Gether U, Wang H, Abeliovich A (2006) Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2874-2879
119. McRitchie DA, Cartwright HR, Halliday GM (1997) Specific A10 dopaminergic nuclei in the midbrain degenerate in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 144:202-213
120. McRitchie DA, Hardman CD, Halliday GM (1996) Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *J Comp Neurol* 364:121-150
121. Mexal S, Berger R, Adams CE, Ross RG, Freedman R, Leonard S (2006) Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles. *Brain Res* 1106:1-11
122. Michelhaugh SK, Vaitkevicius H, Wang J, Bouhamdan M, Krieg AR, Walker JL, Mendiratta V, Bannon MJ (2005) Dopamine neurons express multiple isoforms of the nuclear receptor nurr1 with diminished transcriptional activity. *J Neurochem* 95:1342-1350
123. Milani W, Liss B, Schlaudraff F, Roeper J (2010) SNP-Analysis of murine SN and VTA Neurons. in preparation
124. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486
125. Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B (2006) Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138:869-878
126. Moussa CE (2009) Parkin attenuates wild-type tau modification in the presence of beta-amyloid and alpha-synuclein. *J Mol Neurosci* 37:25-36

127. Murakami Y (2005) Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci* 96:543-552
128. Nagao M, Hayashi H (2009) Glycogen synthase kinase-3beta is associated with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 449:103-107
129. Nagatsu T, Ichinose H (1991) Comparative studies on the structure of human tyrosine hydroxylase with those of the enzyme of various mammals. *Comp Biochem Physiol C* 98:203-210
130. Nakamura TY, Pountney DJ, Ozaita A, Nandi S, Ueda S, Rudy B, Coetzee WA (2001) A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺-currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12808-12813
131. Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2010) Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65:66-79
132. Neuhoff H, Neu A, Liss B, Roeper J (2002) I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* 22:1290-1302
133. Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165
134. Oliva D, Cali L, Feo S, Giallongo A (1991) Complete structure of the human gene encoding neuron-specific enolase. *Genomics* 10:157-165
135. Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, Hardy J, Houlden H, Singleton A, Schneider SA (2009) Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 65:19-23
136. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44:595-600
137. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T (2003) Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 12:2599-2608
138. Parish CL, Castelo-Branco G, Rawal N, Tonnesen J, Sorensen AT, Salto C, Kokaia M, Lindvall O, Arenas E (2008) Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J Clin Invest* 118:149-160
139. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, Chung J (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441:1157-1161
140. Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223-236; discussion 222
141. Parlato R, Kreiner G, Erdmann G, Rieker C, Stotz S, Savenkova E, Berger S, Grummt I, Schutz G (2008) Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice. *J Neurosci* 28:12759-12764
142. Paxinos G, Keith F (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press
143. Pedarzani P, Stocker M (2008) Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol Life Sci* 65:3196-3217

144. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047
145. Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1638-1643
146. Poon HF, Frasier M, Shreve N, Calabrese V, Wolozin B, Butterfield DA (2005) Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice--a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 18:492-498
147. Prestel J, Sharma M, Leitner P, Zimprich A, Vaughan JR, Durr A, Bonifati V, De Michele G, Hanagasi HA, Farrer M, Hofer A, Asmus F, Volpe G, Meo G, Brice A, Wood NW, Muller-Myhsok B, Gasser T (2005) PARK11 is not linked with Parkinson's disease in European families. *Eur J Hum Genet* 13:193-197
148. Proctor CJ, Gray DA (2010) GSK3 and p53 - is there a link in Alzheimer's disease? *Mol Neurodegener* 5:7
149. Putzier I, Kullmann PH, Horn JP, Levitan ES (2009) Cav1.3 channel voltage dependence, not Ca²⁺ selectivity, drives pacemaker activity and amplifies bursts in nigral dopamine neurons. *J Neurosci* 29:15414-15419
150. Ragg T, Granzow M, Gassmann M, Jäger R, Salowsky R, Leiber M, Mueller O (2006) Generic Signal Analysis for Instrumental Analytics. ISPPP 2006 (Abstract)
151. Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat A-L, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C (2006) Hereditary Parkinsonism with Dementia is Caused by Mutations in a Lysosomal Type 5 P-Type ATPase. *Nature Genetics* im Druck
152. Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38:1184-1191
153. Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A (2009) Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 156:885-898
154. Rice ME, Cragg SJ (2008) Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev* 58:303-313
155. Rothfuss O, Fischer H, Hasegawa T, Maisel M, Leitner P, Miesel F, Sharma M, Bornemann A, Berg D, Gasser T, Patenge N (2009) Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Mol Genet* 18:3832-3850
156. Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1:7.30
157. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41:1303-1307

158. Schiemann J, Roeper J, Schlaudraff F, Liss B (2010) K_{ATP} channels in a medial subpopulation of dopaminergic substantia nigra neurons are essential for burst firing in vivo. IBAGS. (Abstract). in preparation
159. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101-1108
160. Schünke S, Schumacher, Voll, Wesker (ed) (2006) Prometheus: LernAtlas der Anatomie, Kopf und Neuroanatomie. Georg Thieme Verlag
161. Sgambato-Faure V, Buggia V, Gilbert F, Levesque D, Benabid AL, Berger F (2005) Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:936-947
162. Shimo Y, Wichmann T (2009) Neuronal activity in the subthalamic nucleus modulates the release of dopamine in the monkey striatum. *Eur J Neurosci* 29:104-113
163. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293:263-269
164. Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Kruger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41:1308-1312
165. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, Andersen SL, Stephens RM, Benes FM, Sonntag KC (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* 132:1795-1809
166. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Stephens R, Sonntag KC (2010) Evidence for gender-specific transcriptional profiles of nigral dopamine neurons in Parkinson disease. *PLoS ONE* 5:e8856
167. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841
168. Smidt MP, Burbach JP (2009) Terminal differentiation of mesodiencephalic dopaminergic neurons: the role of Nurr1 and Pitx3. *Adv Exp Med Biol* 651:47-57
169. Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2005) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18676-18681
170. Sora I, Li B, Fumushima S, Fukui A, Arime Y, Kasahara Y, Tomita H, Ikeda K (2009) Monoamine transporter as a target molecule for psychostimulants. *Int Rev Neurobiol* 85:29-33
171. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840
172. Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcuca K, Hatanpaa KJ, Tamminga CA (2006) Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Res* 1123:1-11

173. Storch A, Ludolph AC, Schwarz J (2004) Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J Neural Transm* 111:1267-1286
174. Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Muller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Kruger R (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14:2099-2111
175. Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30:244-250
176. Tichopad A, Bar T, Pecen L, Kitchen RR, Kubista M, Pfaffl MW (2010) Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. *Methods* 50:308-312
177. Trepel M (ed) (2004) *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. Elsevier: Urban & Fischer
178. Ueda K, Saitoh T, Mori H (1994) Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1366-1372
179. Uhl GR, Li S, Takahashi N, Itokawa K, Lin Z, Hazama M, Sora I (2000) The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins. *FASEB J* 14:2459-2465
180. Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203
181. Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW (2001) Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 68:895-900
182. van Domburg PH, ten Donkelaar HJ (1991) The human substantia nigra and ventral tegmental area. A neuroanatomical study with notes on aging and aging diseases. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 121:1-132
183. van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Testers L, Breedveld GJ, Horstink M, Sandkuijl LA, van Swieten JC, Oostra BA, Heutink P (2001) Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 69:629-634
184. von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:473-490
185. Wahl-Schott C, Biel M (2009) HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66:470-494
186. Watabe K, Ito A, Koma YI, Kitamura Y (2003) IGSF4: a new intercellular adhesion molecule that is called by three names, TSLC1, SgIGSF and SynCAM, by virtue of its diverse function. *Histol Histopathol* 18:1321-1329
187. Waxman EA, Giasson BI (2009) Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1792:616-624
188. West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16842-16847
189. Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT, Ahn NG (2008) Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science* 320:365-369

190. Wolfart J, Roeper J (2002) Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* 22:3404-3413
191. Wurst W, Prakash N (2010) Genetic Control of Meso-diencephalic Dopaminergic Neuron Development in Rodents. In: A. Bjorklund SD, L. Iversen, S. Iversen (ed) *The Dopamine Handbook*. Oxford University Press
192. Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Park D, Stefanis L (2009) Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS ONE* 4:e5515
193. Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D (2001) Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol* 54:414-418
194. Zelano J, Berg A, Thams S, Hailer NP, Cullheim S (2009) SynCAM1 expression correlates with restoration of central synapses on spinal motoneurons after two different models of peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 517:670-682
195. Zhang C, Sun Y, Wang W, Zhang Y, Ma M, Lou Z (2008) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of human Ca²⁺-loaded calbindin-D28k. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64:133-136
196. Zhang Q, Huang A, Lin YC, Yu HG (2009) Associated changes in HCN2 and HCN4 transcripts and I(f) pacemaker current in myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1788:1138-1147
197. Zhu J, Reith ME (2008) Role of the dopamine transporter in the action of psychostimulants, nicotine, and other drugs of abuse. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:393-409
198. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44:601-607
199. Zolles G, Wenzel D, Bildl W, Schulte U, Hofmann A, Muller CS, Thumfart JO, Vlachos A, Deller T, Pfeifer A, Fleischmann BK, Roeper J, Fakler B, Klocker N (2009) Association with the auxiliary subunit PEX5R/Trip8b controls responsiveness of HCN channels to cAMP and adrenergic stimulation. *Neuron* 62:814-825

Anhang

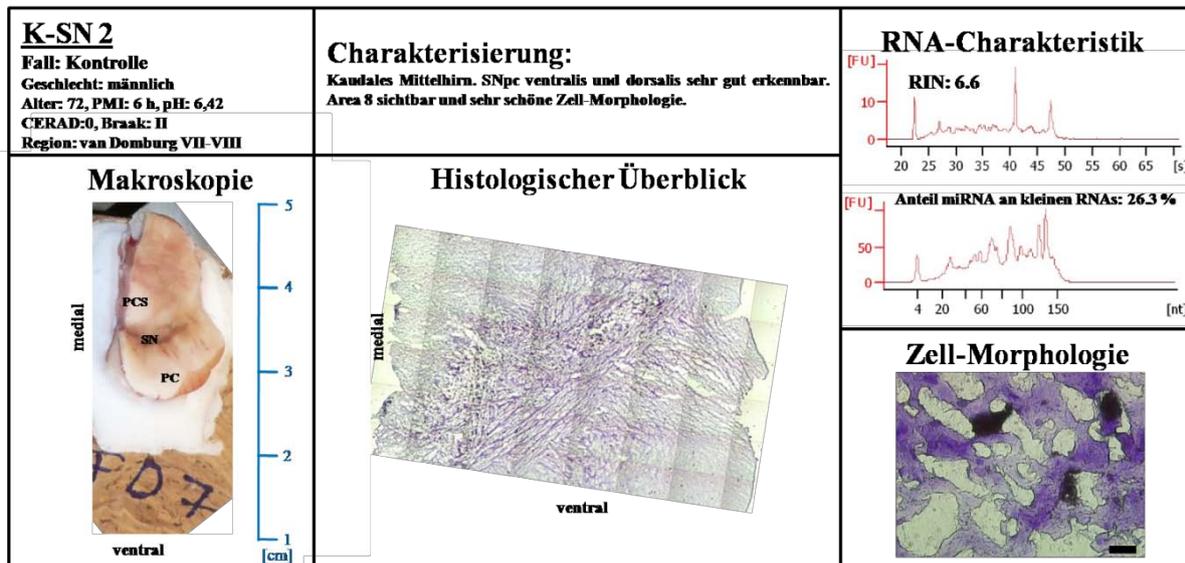


Abbildung A1 – Übersicht des humanen *Substantia nigra* Gewebes der Kontrollprobe K-SN 2. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 2. Die Größenbalken des histologischen Überblicks entsprechen 1000 μm , die der Zellmorphologie 25 μm . Unter RNA-Charakteristik sind die RIN, welche Aufschluss über die RNA-Qualität gibt und der miRNA-Anteil an kleinen RNAs mit dazugehörigen Elektropherogrammen aufgeführt.

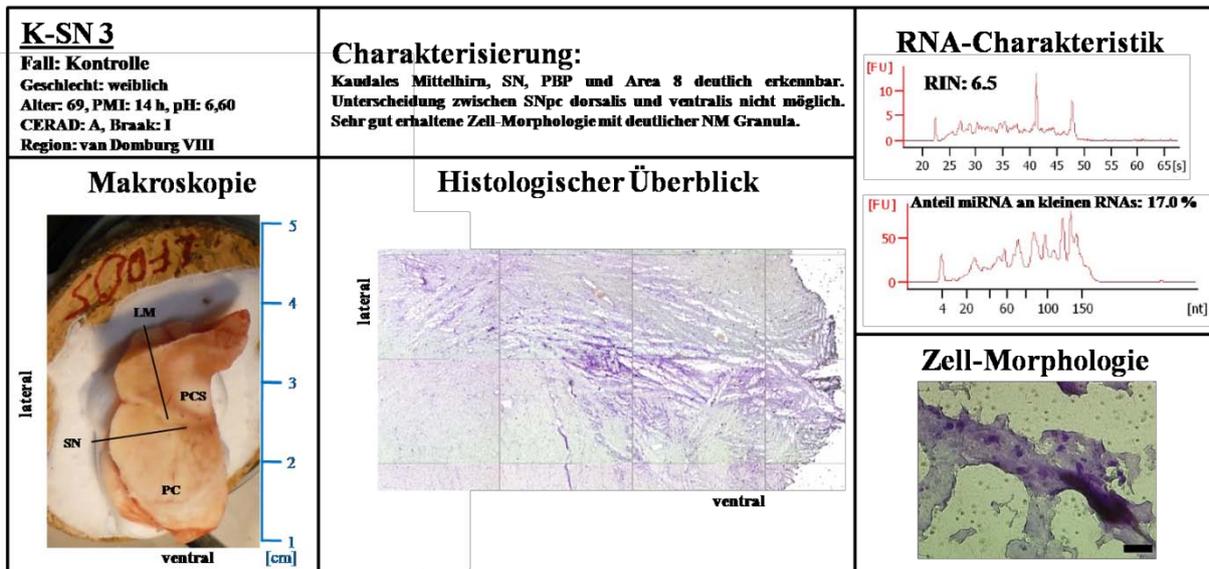


Abbildung A2 – Übersicht des humanen *Substantia nigra* Gewebes der Kontrollprobe K-SN 3. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 3.

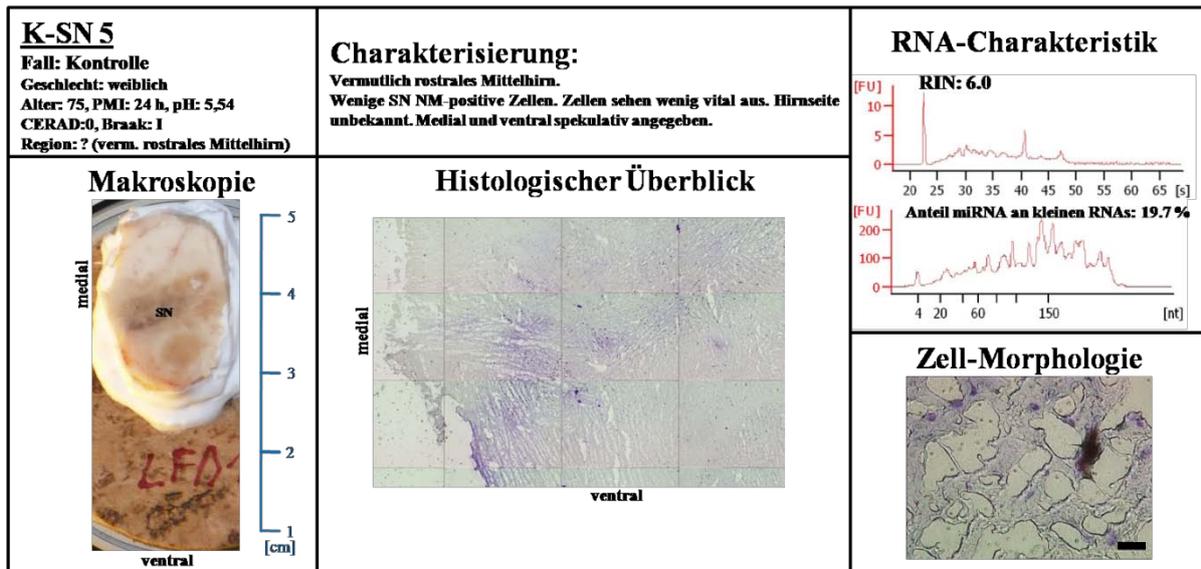


Abbildung A3 – Übersicht des humanen Substantia nigra Gewebes der Kontrollprobe K-SN 5. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 5.

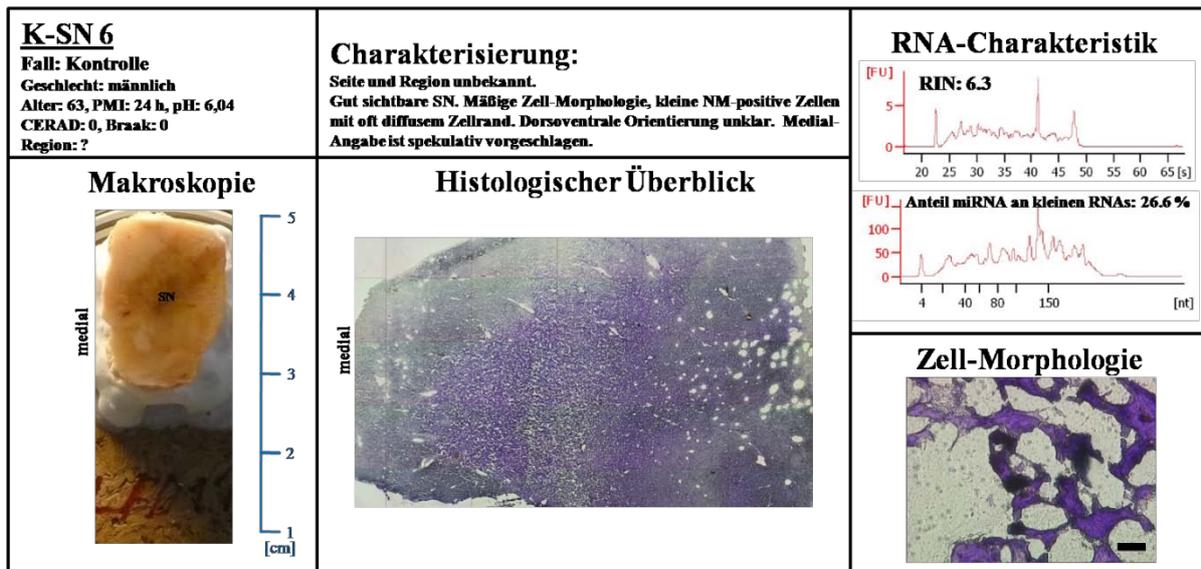


Abbildung A4 – Übersicht des humanen Substantia nigra Gewebes der Kontrollprobe K-SN 6. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 6.

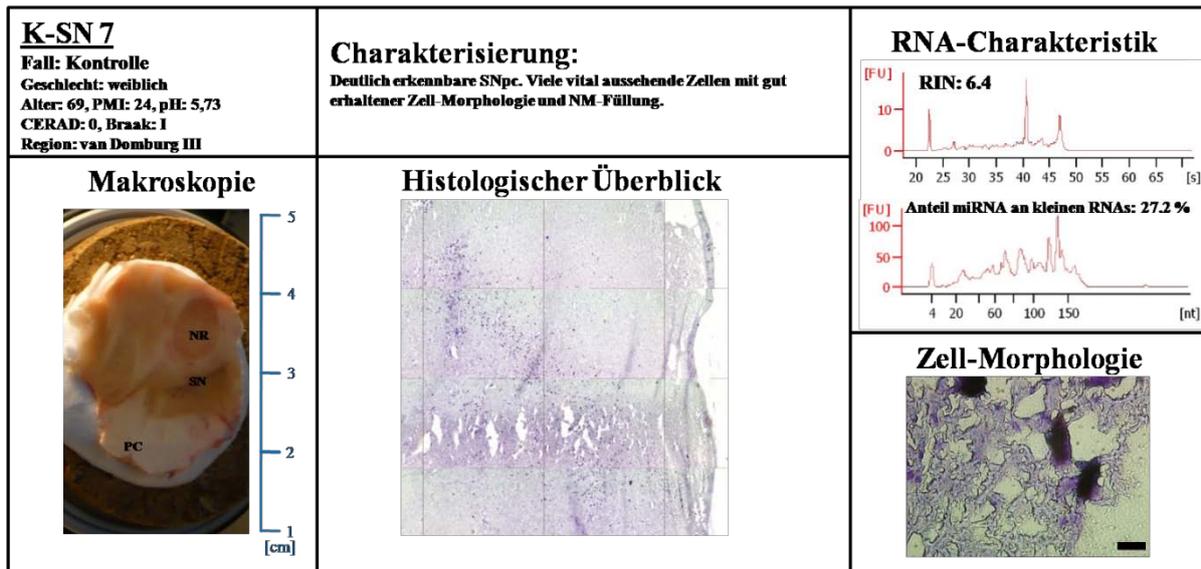


Abbildung A5 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der Kontrollprobe K-SN 7. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 7. Die Größenbalken des histologischen Überblicks entsprechen 1000 µm, die der Zellmorphologie 25 µm. Unter RNA-Charakteristik sind die RIN, welche Aufschluss über die RNA-Qualität gibt und der miRNA-Anteil an kleinen RNAs mit dazugehörigen Elektropherogrammen aufgeführt.

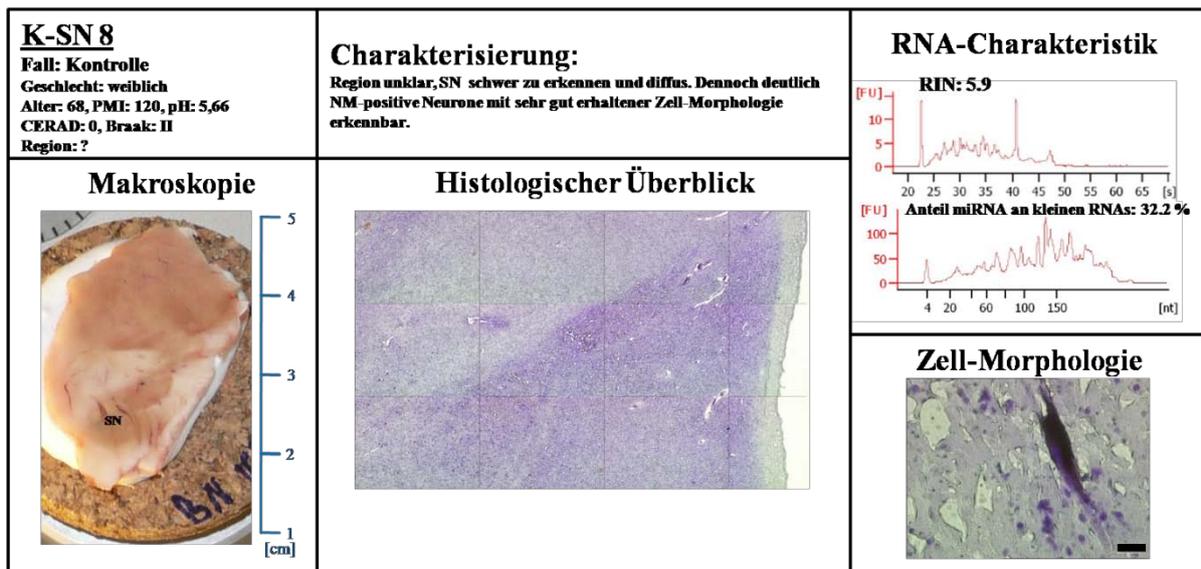


Abbildung A6 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der Kontrollprobe K-SN 8. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 8. Die Größenbalken des histologischen Überblicks entsprechen 1000 µm, die der Zellmorphologie 25 µm. Unter RNA-Charakteristik sind die RIN, welche Aufschluss über die RNA-Qualität gibt und der miRNA-Anteil an kleinen RNAs mit dazugehörigen Elektropherogrammen aufgeführt.

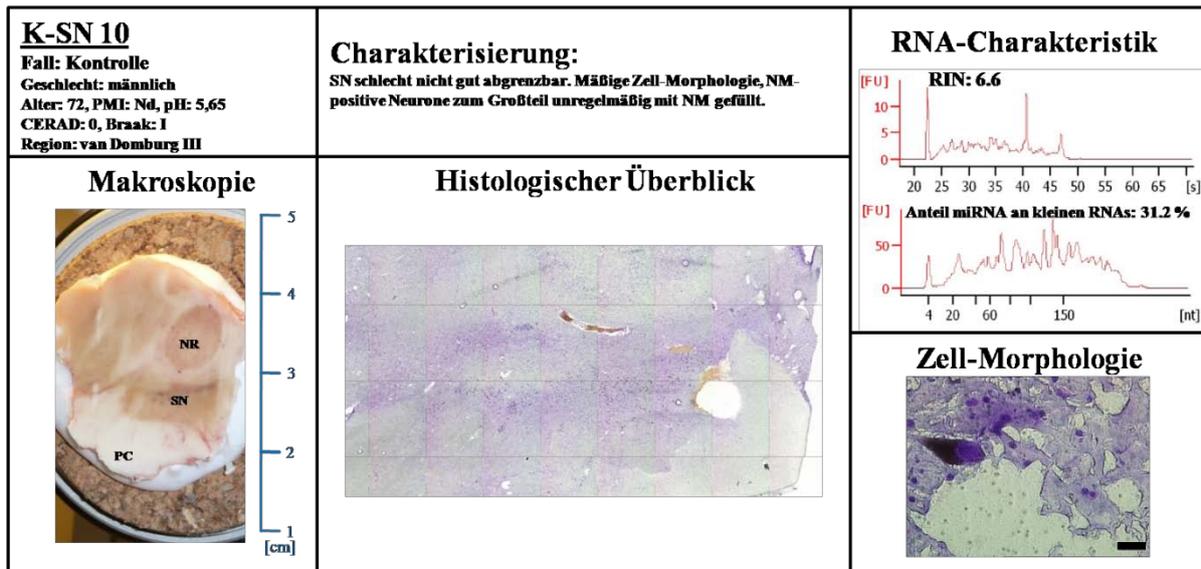


Abbildung A7 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der Kontrollprobe K-SN 10. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 10. Die Größenbalken des histologischen Überblicks entsprechen 1000 µm, die der Zellmorphologie 25 µm. Unter RNA-Charakteristik sind die RIN, welche Aufschluss über die RNA-Qualität gibt und der miRNA-Anteil an kleinen RNAs mit dazugehörigen Elektropherogrammen aufgeführt.

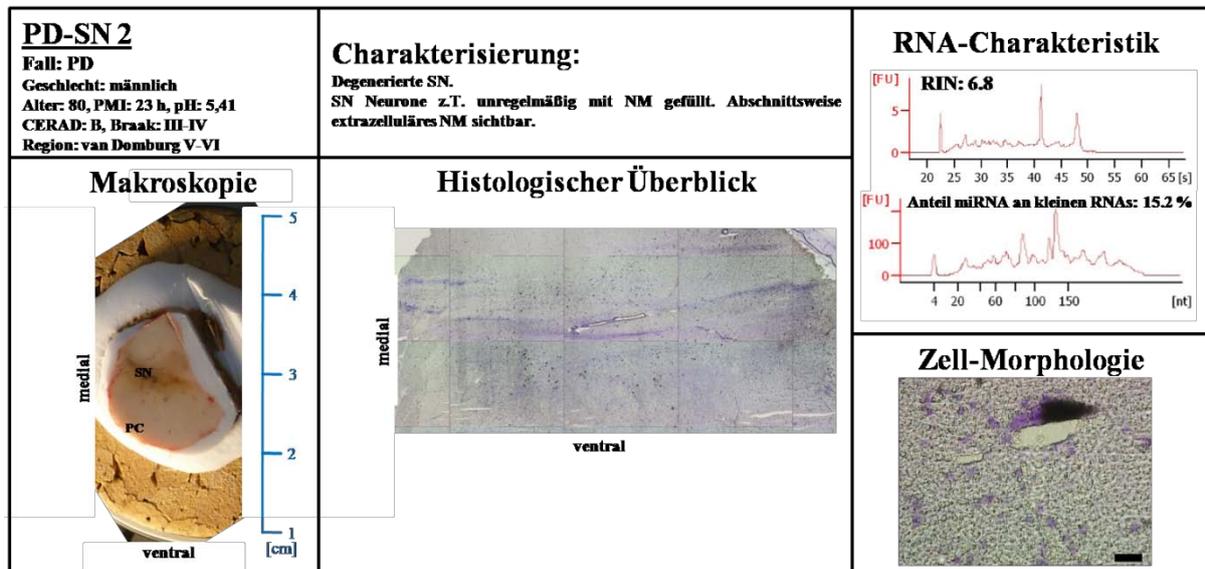


Abbildung A8 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der PD-Probe PD-SN 2. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe PD-SN 2.

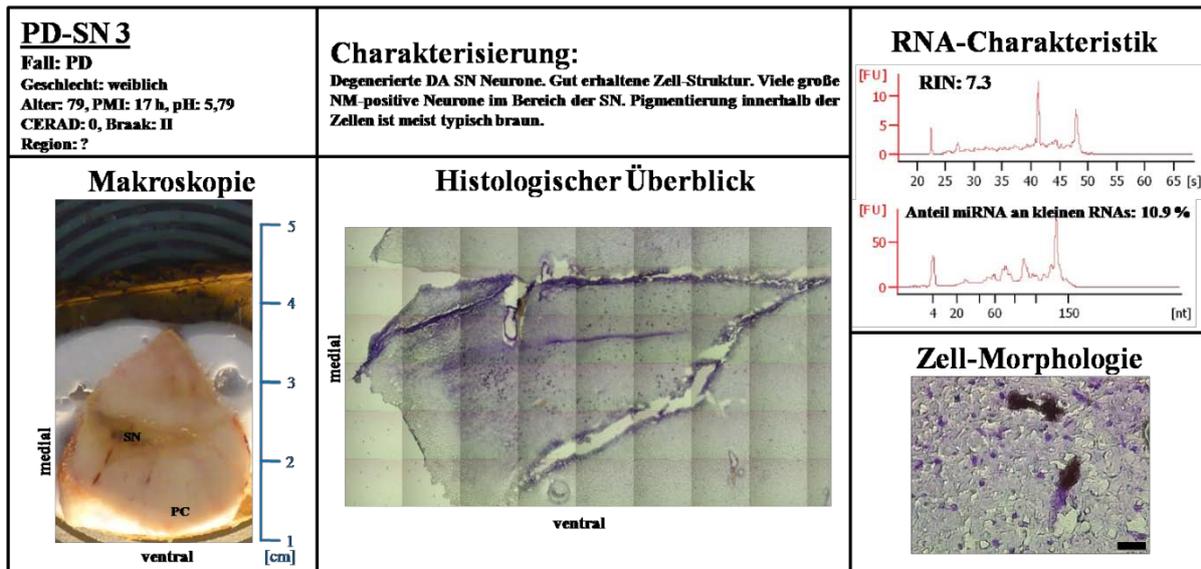


Abbildung A9 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der PD-Probe PD-SN 3. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe PD-SN 3.

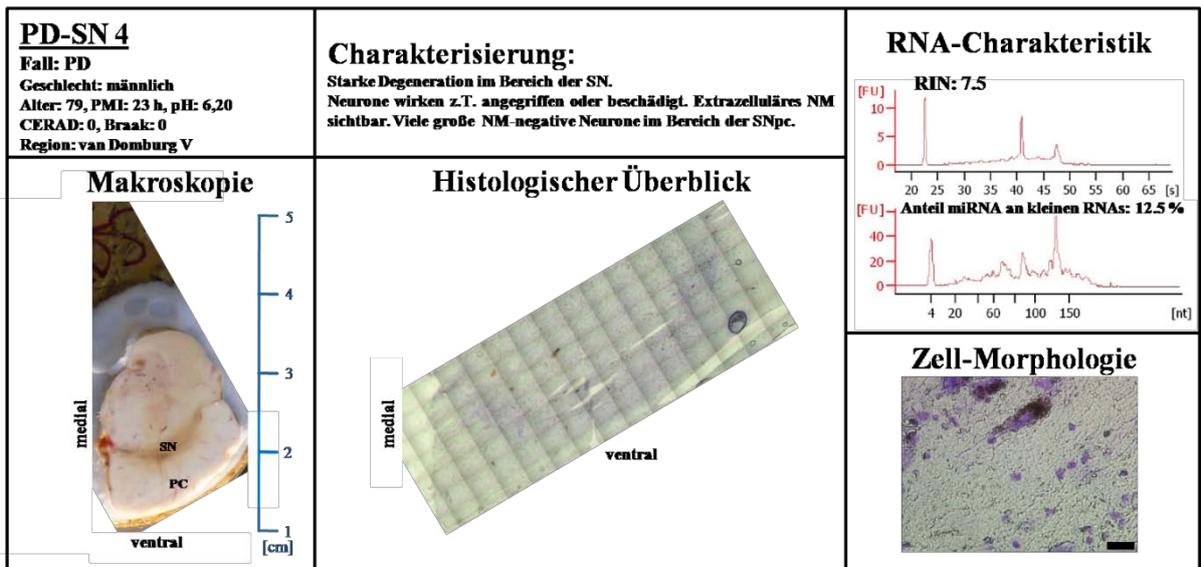


Abbildung A10 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der PD-Probe PD-SN 4. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe PD-SN 4.

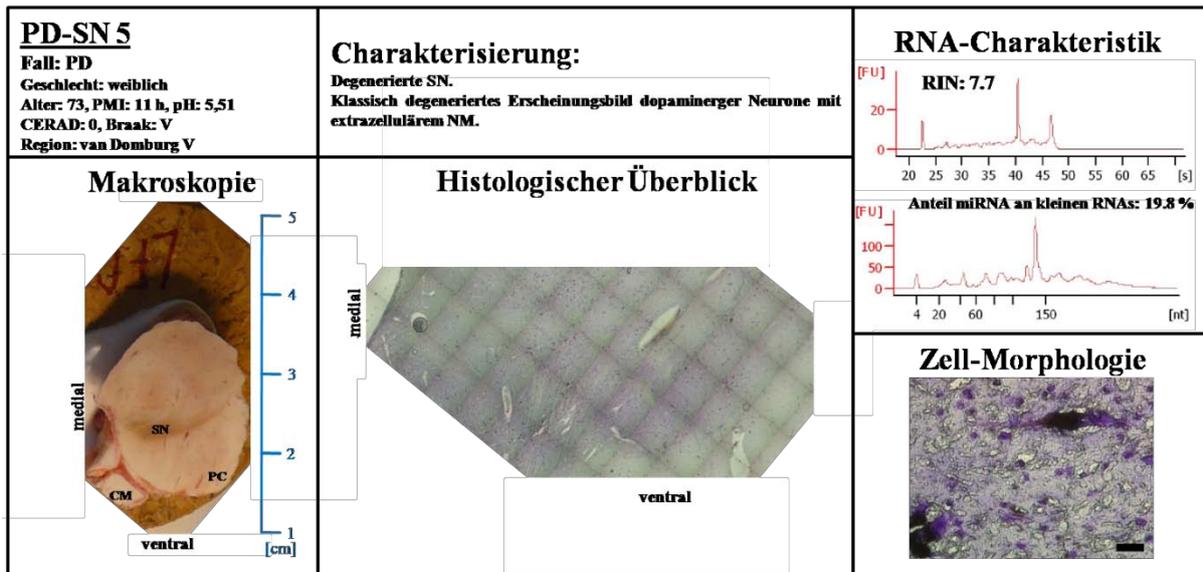


Abbildung A11 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der PD-Probe PD-SN 5. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe PD-SN 5.

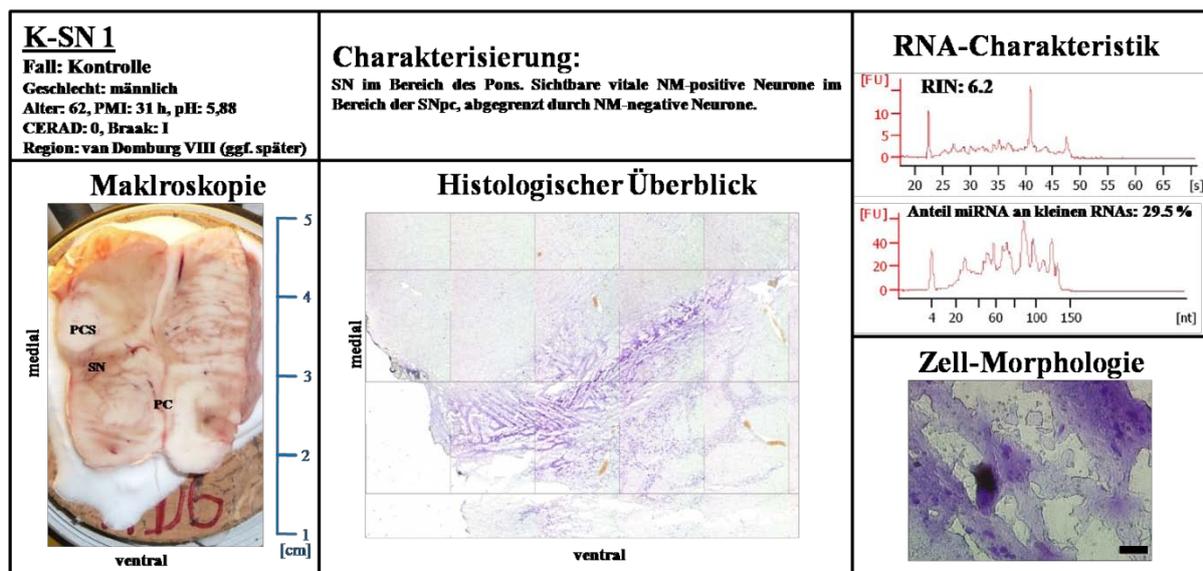


Abbildung A12 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der Kontrollprobe K-SN 1. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 1.

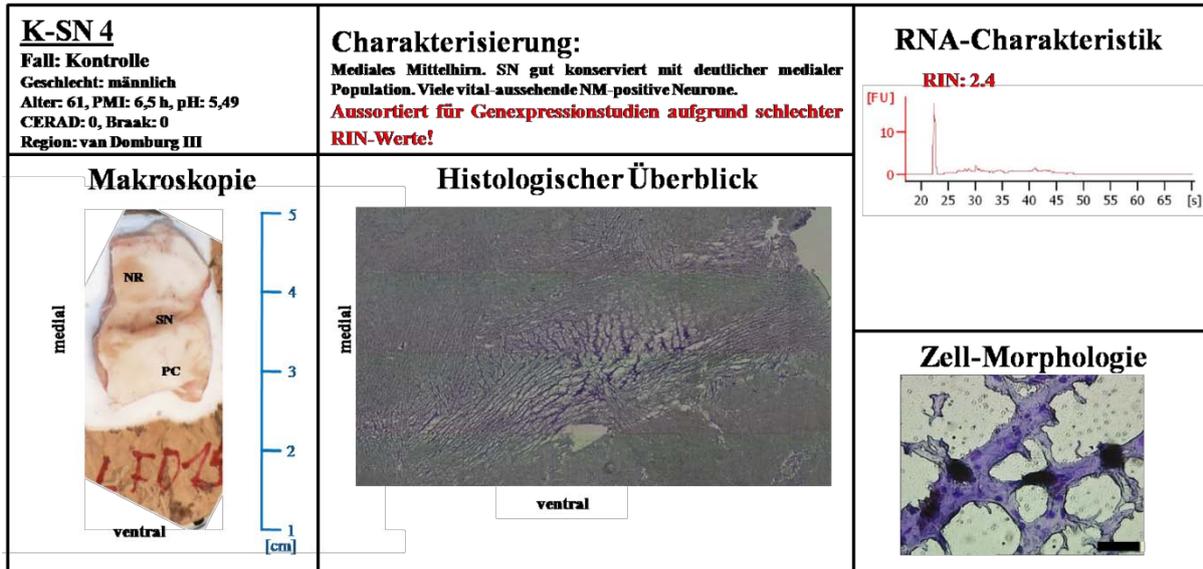


Abbildung A13 – Übersicht des humanen Substantia Nigra Gewebes der Kontrollprobe K-SN 4. Zusammenfassung der Eigenschaften, Charakteristik, Makroskopie, Histologie und Zell-Morphologie der Gewebeprobe K-SN 4.

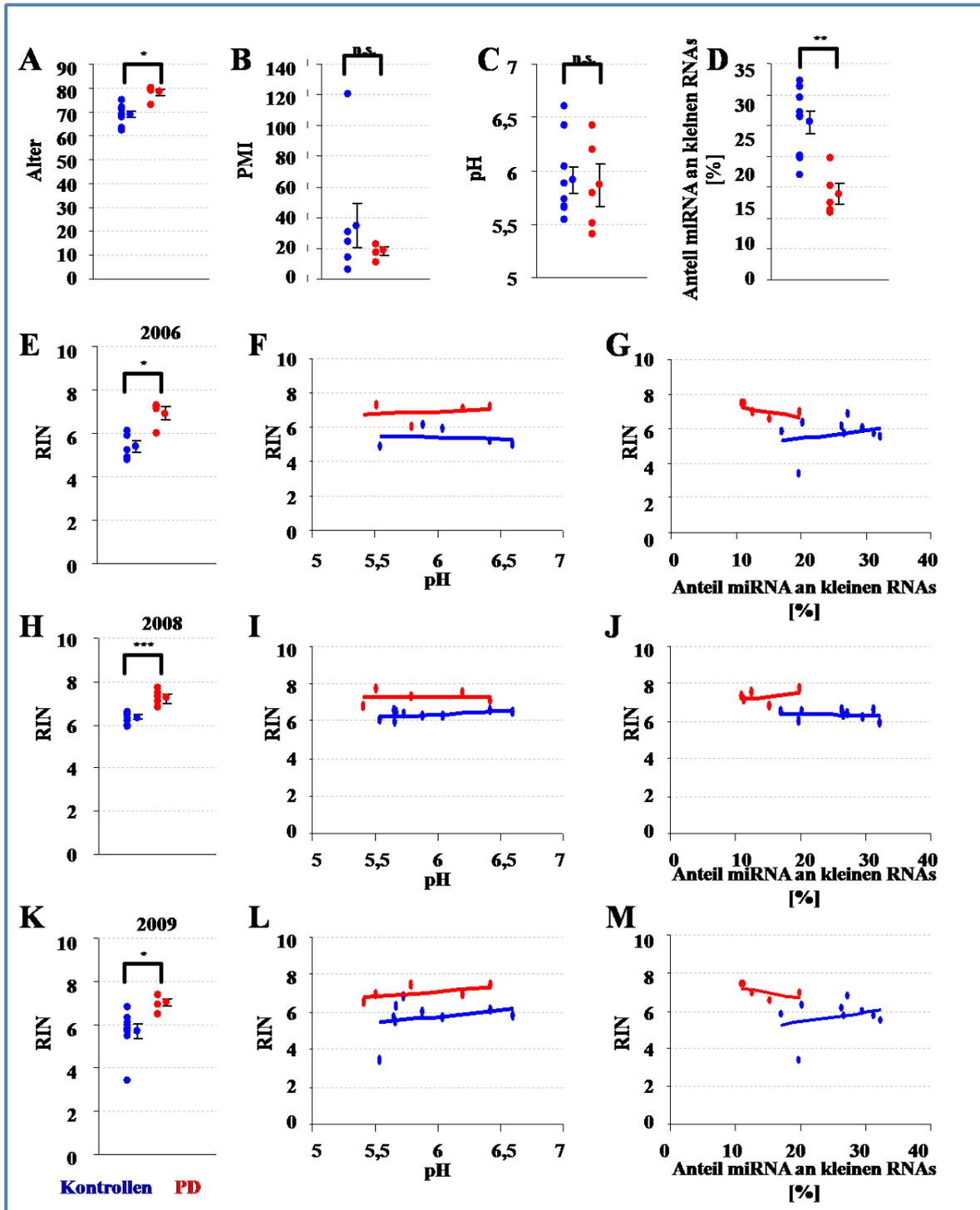


Abbildung A15 – Eigenschaften des humanen Hirnmaterials.

Scatterplots der humanen Hirne: Scatterplot des Alters der Gewebespenders (A), Scatterplot des PMI (*post-mortem* Index, B), der pH-Werte (C), des miRNA-Anteils an kleinen RNAs insgesamt (Fragmentgrößen < 200 nt, D) und der RIN-Werte von 2008 (E). Die RIN-Werte (2006) von Kontrollen ($R^2=0,0265$) und PD ($R^2=0,0461$) zeigen keine Korrelation mit dem pH-Wert (F) und keine Korrelation mit dem prozentualen Anteil von miRNAs an kleinen RNAs (Kontrollen: $R^2=0,0777$, PD: ($R^2=0,3508$) (G). Die RIN-Werte (2008) von Kontrollen ($R^2=0,2256$) und PD ($R^2=0,0047$) zeigen keine Korrelation mit dem pH-Wert (I) und keine Korrelation mit dem prozentualen Anteil von miRNAs an kleinen RNAs (Kontrollen: $R^2=0,0329$, PD: ($R^2=0,1443$) (J). Die RIN-Werte (2009) von Kontrollen ($R^2=0,0851$) und PD ($R^2=0,2256$) zeigen keine Korrelation mit dem pH-Wert (L) und keine Korrelation mit dem prozentualen Anteil von miRNAs an kleinen RNAs (Kontrollen: $R^2=0,0777$, PD: ($R^2=0,3508$) (M). Kontrollen jeweils in blau, PD in rot, weitere Details im Text.

| Vergleich Gen | Kontrolle mit Kontrolle | PD mit PD | Kontrolle mit PD | | |
|-----------------------|-------------------------|---------------|------------------|---------------|-------------|
| | p-Wert m vs w | p-Wert m vs w | p-Wert m vs m | p-Wert w vs w | p-Wert alle |
| TH-1 ¹ | 0,4510 | 0,4136 | 2,63E-09 | 1,76E-06 | 2,32E-14 |
| TH-2 | 0,1711 | 1,000 | 7,16E-10 | 6,95E-07 | 1,1E-13 |
| TH-3 | 0,1643 | 0,5761 | 9,26E-15 | 6,61E-07 | 6,66E-16 |
| TH-4 | 0,5207 | 0,7706 | 6,70E-07 | 4,44E-05 | 1,63E-10 |
| TH-5 ² | 1,0000 | 0,6415 | 7,50E-11 | 3,87E-08 | 2,20e-16 |
| DAT ¹ | 0,1739 | 0,8556 | 0,0041 | 0,0145 | 2,92E-10 |
| VMAT ¹ | 0,6085 | 0,3275 | 0,0001 | 0,0014 | 0,0010 |
| D2all ¹ | 0,9350 | 0,8564 | 1,49E-05 | 0,0021 | 9,00e-8 |
| GIRK2 ¹ | 0,4954 | 0,3223 | 4,01E-06 | 0,0003 | 5,60e-10 |
| ENO2 | 0,8132 | 0,4991 | 5,44E-06 | 1,76E-05 | 3,69e-9 |
| CB | 0,1574 | 0,8657 | 8,46E-05 | 0,0025 | 9,44e-7 |
| JMJD1C | 0,9723 | 0,8201 | 0,8620 | 0,4940 | 0,6638 |
| NURR1 | 0,7348 | 1,0000 | 0,9279 | 0,8508 | 0,9847 |
| PITX3 ² | 0,6466 | 0,7143 | 0,6623 | 0,1667 | 0,1615 |
| miR-133b ² | 0,0942 | 0,3681 | 0,3175 | 0,9118 | 0,7992 |
| Kv4.3 | 0,8636 | 0,2864 | 3,44E-09 | 3,94E-06 | 3,87e-14 |
| FREQ ¹ | 0,1035 | 0,0932 | 1,19E-07 | 0,0499 | 2,00e-7 |
| TRIP8B | 0,9044 | 0,2744 | 0,7445 | 0,5409 | 0,9082 |
| CaV1.3 | 0,1107 | 0,6532 | 0,3078 | 0,3022 | 0,4661 |
| KIR6.2 | 0,2000 | 0,2565 | 0,9843 | 0,7713 | 1,0000 |
| SUR1 | 0,2523 | 0,4789 | 0,0317 | 0,0478 | 0,0134 |
| NMDAR ² | 0,4894 | 0,0651 | 0,0411 | 0,0519 | 0,0387 |
| LRRK2 | 0,3189 | 0,5628 | 0,2100 | 0,7788 | 0,1386 |
| α -SYN | 0,2100 | 0,3120 | 2,51E-10 | 1,52E-08 | 1,24e-13 |
| IGSF-4 ¹ | 0,6993 | 0,3851 | 4,54E-06 | 0,0002 | 2,14e-11 |
| HOMER1 ¹ | 0,0652 | 0,6126 | 0,1450 | 0,3956 | 0,5306 |
| LDH-B ¹ | 0,9793 | 0,3415 | 1,62E-08 | 0,0059 | 4,36e-9 |
| GSK3B | 0,1461 | 0,4040 | 3,63E-08 | 8,30E-06 | 1,85e-12 |

Tabelle A1 – Geschlechtervergleich der Einzelzellgenexpressionsanalysen in PD.

Zusammenstellung der p-Werte verschiedener Vergleiche der Geschlechter. Es sind keine Unterschiede zur geschlechterdurchmischten Auswertung erkennbar.

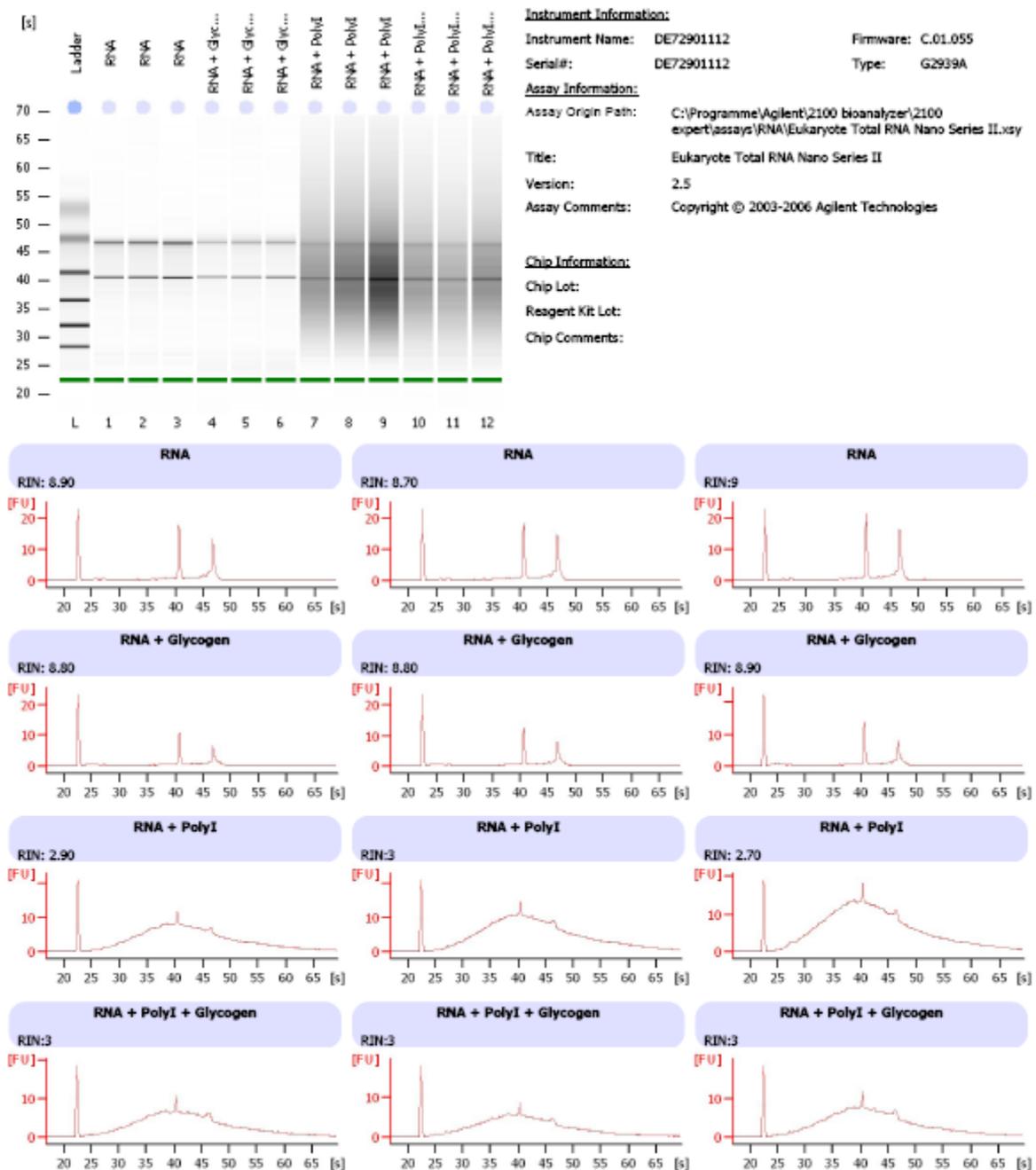


Abbildung A16 – Einfluß von polyI und Glycogen auf die RIN-Bestimmung.
 Anhand der Elektrophoreogramme ist deutlich zu erkennen, dass polyI die RIN-Werte beeinflusst.

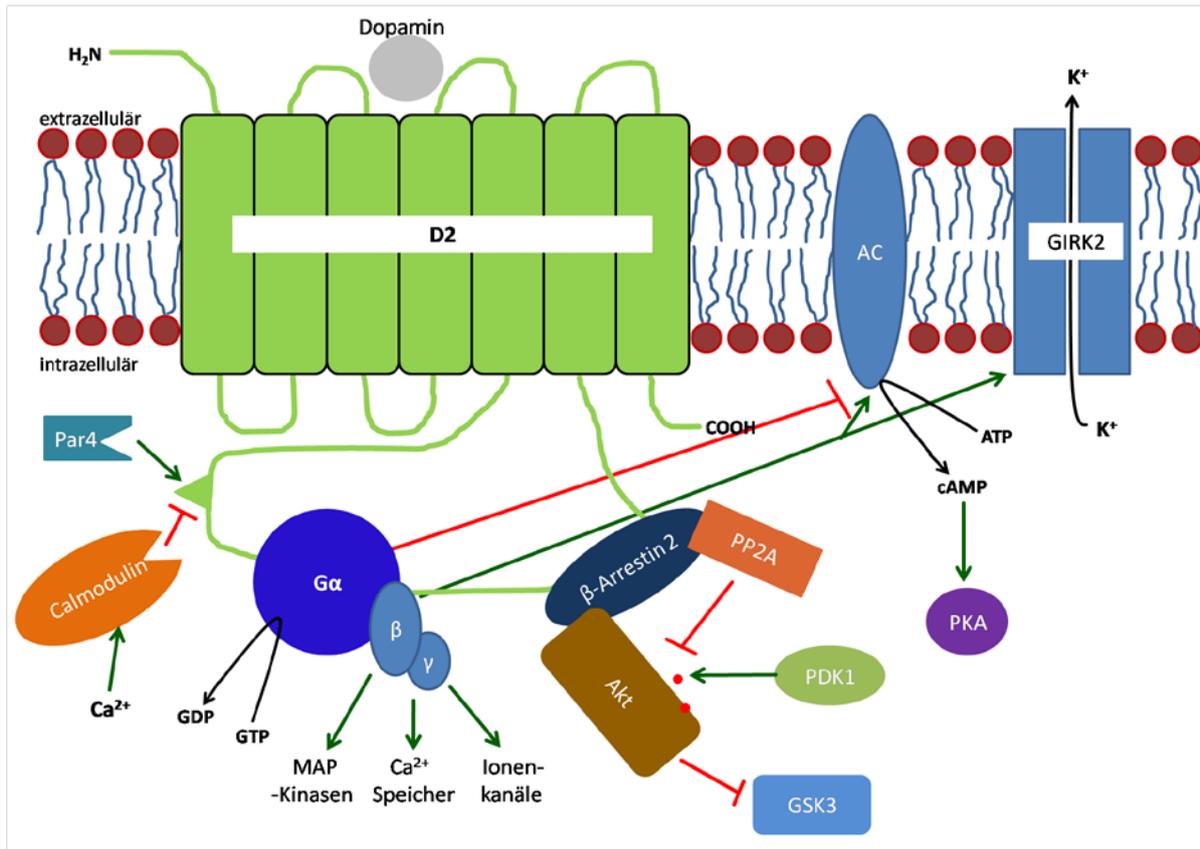


Abbildung A17 – D2 assoziierte Pathways.

Die Abbildung fasst einige der bekannten Interaktionen des D2(long)-Rezeptors zusammen. Alle Interaktionsdomänen befinden sich auf dem dritten intrazellulären Loop, welcher bei der kurzen Variante D2s um 29 AS verkürzt ist. Ganz links die Interaktionsdomäne für Par 4 (*Prostata apoptose response 4*), welche die gleiche Bindungsdomäne wie Calmodulin aufweist. Mittig das gekoppelte G-Protein mit α -, β - und γ -Untereinheit (G α , β , γ), wobei bei Aktivierung und Austausch von gebundenem GDP zu GTP die α -Untereinheit die Adenylatcyclase (AC) inhibiert und den Kaliumkanal GIRK2 aktiviert, was zu einer Hyperpolarisation führt. β - und γ -Untereinheiten regulieren MAP(Mitogen-activated protein)-Kinasen, Calcium(Ca²⁺)-Speicher und Ionenkanäle. β -Arrestin 2, Protein-Phosphatase 2A, Akt und Pyruvat-Dehydrogenase Kinase Isoenzym 1 regulieren in Abhängigkeit von D2-Aktivierung die Glykogen Synthase Kinase 3. (H₂N – N-terminales Proteinende, COOH – Carboxy-terminales Proteinende, K⁺ – Kalium, cAMP – cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat, ATP – Adenosin-Tris-Phosphat, rote Punkte - Phosphate modifiziert nach (Beaulieu et al., 2005; Kottke and Stark, 2006; Park et al., 2005))

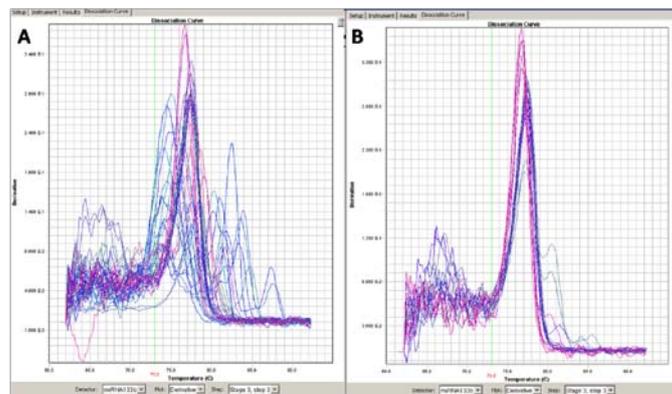


Abbildung A18 – Unterschiedliche Schmelzkurven von miRNA-SYBRgreen-Assays. Screenshots von Schmelzkurvenanalysen nach 1 h cDNA-Synthese (A) wie laut miScript-Protokoll (Qiagen) empfohlen mit vielen unspezifischen Schmelzkurvenverläufen und mit homogenen Schmelzkurvenverläufen nach Übernacht-Synthese (B).

Danksagung

Als erstes möchte ich den Gewebespendern danken, ohne deren Spenden diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren möchte ich der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Birgit Liss danken. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Liss für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, und für die Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung, sowie die Möglichkeit in einem hochmodernen Labor arbeiten zu dürfen. Ein herzlicher Dank natürlich auch für alle offenen Gespräche, e-mails und dass Sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und ich eine Menge von Ihnen lernen durfte. Vielen Dank auch, dass Sie sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit zu perfektionieren.

Ferner gebührt Prof. Dr. Dietmar Thal besonderer Dank für die Bereitstellung weiterer Gewebeproben, für die Begutachtung meiner Doktorarbeit und dafür, dass Sie sich als Zweitgutachter dieser Arbeit bereit erklärt haben.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch der ehemaligen Arbeitsgruppe in Marburg, sowie unseren früheren Nachbararbeitsgruppe von Prof. Dr. Jochen Roeper. Prof. Roeper möchte ich hier insbesondere danken, da Sie, genau wie Prof. Liss, trotz wenig Zeit immer offen für Gespräche und Anregungen waren, die diese Arbeit stets gefördert haben. Neben Prof. Roeper gilt dies natürlich auch für Dr. Wiebke Milani. Von den ehemaligen Mitstreitern aus der Marburger Arbeitsgruppe möchte ich mich bei Euch allen (Dr. Wiebke Milani (geb. Baum), Dr. Andrea Hetzel, Frauke Kepura, Olga Ebers (geb. Häckel), Anna-Lena Grebe (geb. Damm) und Jan Gründemann) aufrichtig bedanken. Ihr habt Freud und Leid des wissenschaftlichen Arbeitens mit mir geteilt und mir sehr viel beigebracht, und zudem dafür gesorgt, dass ich mich von Anfang an in Marburg wohlfühlt habe. Jan und Wiebke möchte ich weiterhin für die immernoch sehr fruchtbare Zusammen-arbeit danken.

Sehr dankbar bin ich auch natürlich auch meinen jetzigen (Dr. Elena Potic (geb. Dragicevic), Johanna Duda, Christina Pötscke, Andrea Seemüller, Desireé Spaich und Stefanie Schulz) und ehemaligen Arbeitskollegen (Andreas Weins, Robin Kemmler, Hashuka Huzurudin, u.a.) in Ulm, sowie Dr. Yvonne Begus-Nahrman. Jo möchte ich hier insbesondere für die Motivations-Parcours danken und Yvonne für den vielen Kaffee und die vielen Gespräche, für die ich natürlich auch allen anderen herzlich danke.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Schatzele und bei meinen Eltern bedanken. Hier gilt insbesondere ein riesiger Dank an Jessica für die liebevolle und unermüdliche Hilfe und Unterstützung, die mir die letzten Jahre leichter gemacht haben und an meine Eltern für

die Hilfe und Unterstützung seit ich denken kann (und bestimmt auch schon davor). Ich danke Euch, dass Ihr vor allem auch in schwierigen Zeiten an mich geglaubt habt.

Letztlich geht noch ein ganz spezieller Dank an alle meine Freunden, Rugbykameraden und meiner gesamten Familie für schöne Zeiten außerhalb meines Büros und Labors, für jeden Kaffee, jedes Bier, jedes offene Gespräch und natürlich für das viele Lachen!

Lebenslauf

(Stand: 02.05.2010)

Name: Falk Schlaudraff
Akademischer Titel: Master of Science
Geburtstag: 08.05.1978
Geburtsort: Lüneburg
Familienstand: verlobt
e-mail: falk.schlaudraff@gmx.de
Anschrift: Ringstr. 164 b
 89081 Ulm-Lehr
Telefon: 0731/50036216
Mobiltelefon: 0178/1318508
Homepage: <http://www.moltkeplatz.de/~schlaudraff>



Derzeitige Tätigkeit: Seit 2007 Promotion in der AG Liss, Molekulare Neurophysiologie
 Thema:
 Quantitative Genexpressionsanalysen humaner dopaminerger Neurone nach Lasermikrodissektion aus *post-mortem* Mittelhirngewebe von Morbus Parkinson Patienten und Kontrollen.

Studium an der Universität zu Lübeck

2004 - 2006 Masterstudium Molecular Life Science
Abschluss: **Master of Science; Endnote 1,8**
Abschlussarbeit: Monogene Parkinsonsyndrome: Mutations-Screening und Charakterisierung humaner Hautfibroblasten; Note 1,3

2001 - 2004 Bachelorstudium Molekulare Biotechnologie
Abschluss: Bachelor of Science; Endnote 2,1
Abschlussarbeit: Analyse von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren; Note 1,0

1999 - 2001 Grundstudium Informatik mit Nebenfach Bio-Informatik/
 -Mathematik
Zwischenabschluss: Vordiplom; Note 3,0

Hilfswissenschaftler: 2001 - 2006 diverse Tätigkeiten im „LoLa“ (Lübecker offenes Labor) und an folgenden Instituten: Institut für Biologie, Institut für Mathematik, Institut für Biochemie und Institut für Neuro- und Bioinformatik.

Zertifikate: 2002 Bescheinigung für biologische Sicherheit nach §15 der Gentechnikrichtlinie
 2004 Fachkunde im Strahlenschutz im nichtmedizinischen Bereich

Sonstige Tätigkeiten

Praktika: 2006 Institut für Physiologie, Philipps-Universität Marburg
 Vorbereitungspraktikum für die Promotion in der AG Liss, Molekulare Neurophysiologie
 2004 Universitätsklinikum Freiburg, Sektion experimentelle Anästhesiologie
 Herstellung rekombinanter Klone zur weiteren Erforschung von polycythemia rubra vera
Sprachkenntnisse Deutsch, Muttersprache; Englisch, verhandlungssicher; Französisch, Grundkenntnisse
Sprachkurse: 2004 Englisch-Sprachkurs, Calgary, Kanada

Publikationsliste

Cell type specific subunit composition of G-protein-gated potassium channels in the cerebellum.

2007, Journal of Neurochemistry

Aguado C, Colon J, Ciruela F, **Schlaudraff F**, Cabanero MJ, Watanabe M, Liss B, Wickman K, Lujan R

Elevated alpha-synuclein mRNA levels in individual UV-laser-microdissected dopaminergic substantia nigra neurons in idiopathic Parkinson disease.

2008, Nucleic Acids Research

Gründemann J, **Schlaudraff F**, Haeckel O and Liss B

p53 deletion impairs clearance of chromosomal-instable stem cells in aging telomere-dysfunctional mice.

2009, Nature Genetics

Begus-Nahrman Y, Lechel A, Obenauf AC, Nalapareddy K, Peit E, Hoffmann E, **Schlaudraff F**, Liss B, Schirmacher P, Kestler H, Danenberg E, Barker N, Clevers H, Speicher MR, Rudolph KL.

UV-laser microdissection and gene expression analysis of individual neurons from post-mortem Parkinson's disease brains.

2010, bookchapter in Methods in Molecular Biology, in press

Gründemann, J, **Schlaudraff F**, and Liss B

A53T-alpha-Synuclein Overexpression Impairs Dopamine Signaling and Striatal Plasticity in Old Mice.

2010, PLoS ONE

Kurz A, Double KL, Lastres-Becker I, Tozzi A, Tantucci M, Bockhart V, Bonin M, García-Arencibia M, Nuber S, **Schlaudraff F**, Liss B, Fernández-Ruiz J, Gerlach M, Wüllner U, Lüddens H, Calabresi P, Auburger G and Gispert S

Orchestrated transcriptional dysregulation of marker- and PARK-genes in dopamine midbrain neurons from Parkinson disease patients is not associated with cell-specific down-regulation of miRNA miR-133b.

2010, in preparation

Schlaudraff F, Gründemann J, Potic E, Thal D, Hardy J, Roeper J, and Liss B

Poster

Elevated alpha-synuclein mRNA levels in individual UV-laser-microdissected dopaminergic substantia nigra neurons in idiopathic Parkinson's disease.

Gründemann J, **Schlaudraff F**, Haeckel O and Liss B

K_{ATP} channels in a medial subpopulation of dopaminergic substantia nigra neurons are essential for burst firing *in vivo*.

Schiemann J, Klose V, **Schlaudraff F**, Bingmer m, Magill PJ, Schneider G, Birgit Liss, and Roeper J (IBAGS 2010)

K-ATP channels are essential regulators of in vivo burst firing in a medial subpopulation of substantia nigra dopamine neurons.

Schiemann J, Klose V, **Schlaudraff F**, Bingmer M, Magill PJ, Schneider G, Liss B, and Roeper J (SFN 2010)

Electrophysiological properties of surviving striatonigral dopaminergic neurons after partial striatal 6-hydroxydopamine lesions.

Prinz A, **Schlaudraff F**, Liss B, and Roeper J (SFN 2010)

L-type calcium channels control age-dependent desensitization and cocaine-induced plasticity of D2-autoreceptor function in substantia nigra dopamine midbrain neurons.

Dragicvic/Potic E, Poetschke C, Schiemann J, Schmidt K, **Schlaudraff F**, Lujan R, Striessnig J, Roeper J, and Liss B (SFN 2010)

