Institut für Neurogenetik

Leiterin: Prof. Dr. med. C. Klein

Funktionelle und molekulargenetische Untersuchungen neurodegenerativer Bewegungsstörungen

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Sascha Heinitz

aus Saarbrücken

Lübeck 2013

για την οικογένειά μου

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christine Klein

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Benthien

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.07.2014

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	**Einleitung**	**1**
1.1	Parkinson-Syndrom: Morbus Parkinson – klinische Beschreibung und genetische Ursachen	1
1.2	Morbus Parkinson und mitochondriale Dysfunktion	3
1.3	*X-linked dystonia-parkinsonism* (XDP)	5
1.4	Die mitochondriale Protease PARL	6
1.5	DJ-1: Funktion und Pathogenese von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn	7
1.6	Die E3-Ubiquitinligase Parkin	9
1.6.1	Struktur und Genetik	9
1.6.2	Parkins Funktion als E3-Ubiquitinligase	9
1.6.3	Parkins Funktion hinsichtlich Mitophagie	10
1.7	Mitofusin 1 und 2 und ihre Funktion bezüglich mitochondrialer Fusion und Mitophagie	11
1.8	Vorleistungen der Arbeitsgruppe: Parkin und Mitofusin	12
1.9	Schema	14
1.10	Annahmen	14
2.	**Patienten, Material und Methoden**	**15**
2.1	Patienten	15
2.1.1	Kollektiv der auf Mutationen im *PARL*-Gen untersuchten Personen	15
2.1.2	Kollektiv der auf Mutationen im *PARK7*-Gen untersuchten Personen	15
2.1.3	Kollektiv der auf DSC3 untersuchten Personen	15
2.1.4	Klinische Untersuchungen	17
2.2	Materialien	18
2.3	Methoden	22
2.3.1	Reverse Transkription	22
2.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	23
2.3.3	Gelelektrophorese	25
2.3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.3.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.3.4	Restriktion, Ligation, Klonierung und Transformation	26
2.3.4.1	Restriktion	26
2.3.4.2	Ligation, Klonierung und Transformation	28
2.3.5	Ubiquitinierungsreaktion	30

2.3.6	Sequenzierung	30
2.3.7	*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification* (MLPA)	32
2.3.8	Transfektion	34
2.3.9	Chemische Behandlung und Ernten von HEK293-Zellen, Fibroblasten und SH-SY5Y-Zellen; Messung der Proteinkonzentration	35
2.3.10	Immunpräzipitation und *Western Blotting* (*Immunoblot*)	36
2.3.10.1	Proteinextraktion für *in-vitro*-Versuche	36
2.3.10.2	*Western Blotting* (*Immunoblot*)	38
2.3.11	Mitochondriale Fraktionierung, Immunpräzipitation von Mitofusin 2 und Färbung mit *Colloidal Blue*	39
2.3.11.1	Fraktionierung eines SH-SY5Y-Lysats in mitochondrialen und cytosolischen Anteil	40
2.3.11.2	Immunpräzipitation von Mitofusin 2	41
2.3.11.3	Färbung mit *Colloidal Blue*	41
2.3.12	*In-vitro*-Mutagenese	42
2.3.13	*Real time* quantitative PCR	43
2.3.14	*Array comparative genomic hybridization*	43
2.3.15	Massenspektrometrie	44
3.	**Ergebnisse**	**45**
3.1	Die Mutation p.Ser77Asn des PARL-Proteins als seltene Ursache von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn und Mutationsanalyse des *PARK7*-Gens	45
3.2	Ätiopathologie einer an *X-linked dystonia-parkinsonism (XDP; DYT3)* erkrankten Patientenkohorte	47
3.2.1	Ergebnisse genetischer Untersuchungen	47
3.2.1.1	Patientenkohorte	47
3.2.1.2	Patientin L-5735 (II.2)	48
3.3	Funktionelle Studien	52
3.3.1	Ubiquitinierung von Mitofusin	52
3.3.1.1	Klonierung und Expression von Mitofusin 1 und Validierung des Produkts	52
3.3.1.2	Effekt unterschiedlicher Reaktionsansätze auf das Mitofusin 1-Signal in *in-vitro*-Studien	52
3.3.1.3	Effekt depolarisierender Agentien auf endogenes Mitofusin 1 und 2 in nicht-transfizierten Zellen	55
3.3.1.4	Ubiquitinierungsposition von endogenem Mitofusin 2	55

3.3.2	Effekt verschiedener depolarisierender Agentien auf Mitofusin 1 und Parkin in mit Parkin transfizierten Zellen	58
3.3.3	Parkin *in-vitro*-Studie und Massenspektrometrie	59
4.	**Diskussion**	**62**
4.1	Morbus Parkinson-bedingende Mutationen von PARL und DJ-1	62
4.1.1	Die Mutation p.Ser77Asn des PARL-Proteins als seltene Ursache von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn	62
4.1.2	Morbus Parkinson-bedingende Mutationen von DJ-1	66
4.2	Genetische Ursache der Erkrankung einer Patientenkohorte an XDP	69
4.3	Mitofusin und Parkin	73
4.3.1	Effekt unterschiedlicher Reaktionsansätze auf das Mitofusin 1-Signal in *in-vitro*-Studien	73
4.3.2	Ubiquitinierungsposition von endogenem Mitofusin 2	76
4.3.3	Zellstudien zu endogenem Mitofusin 1 und 2 und depolarisierende Agentien	78
4.4	Unspezifische multiple Automonoubiquitinierung von Parkin *in vitro*	79
4.5	Schlussfolgerungen – Beurteilung der Annahmen	80
5.	**Ausblick**	**82**
6.	**Zusammenfassung**	**84**
7.	**Literaturverzeichnis**	**86**
8.	**Anhang**	**95**
8.1	Tabellen	95
8.2	Abkürzungsverzeichnis	97
8.3	Eidesstattliche Erklärung	98
8.4	Angabe der Aktenzeichen sowie Daten der für das Forschungsvorhaben benötigten Genehmigungsschreiben der Ethikkommission	99
8.5	Danksagung	100
8.6	Lebenslauf	101
8.7	Poster und Veröffentlichungen	102

1. Einleitung

Diese Arbeit behandelt molekulare Mechanismen, die als Grundlage für die Entstehung von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn (*early onset Parkinson's Disease,* EOPD) dienen. Sie lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: Im ersten Teil wird das Ziel verfolgt, Mutationen sowohl des Gens *PARK7* als auch des Gens, das für *presenilin-associated rhomboid-like protein* (PARL) kodiert, als Ursache eines monogenetisch-bedingten Parkinson-Syndroms einzuordnen. Der hierauf folgende Teil befasst sich mit *X-linked dystonia-parkinsonism* (XDP; DYT3). Die genetischen Grundlagen dieser Erkrankung werden anhand eines Patientenkollektivs untersucht. Die ersten beiden Teilabschnitte stellen die DNA-Studien dieser Arbeit dar. Zuletzt richtet die vorliegende Arbeit ihr Augenmerk auf funktionelle Studien, die die Rolle der Enzyme Parkin und Mitofusin in der Entstehung von monogenetischem Morbus Parkinson beleuchten.

Die Einleitung beschreibt anfangs das Parkinson-Syndrom und XDP. Hiernach wird der Einfluss der Enzyme DJ-1 und PARL auf die Pathogenese des Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn veranschaulicht. Zum Schluss der Einleitung werden die Enzyme Parkin und Mitofusin vorgestellt.

1.1 Parkinson-Syndrom: Morbus Parkinson – klinische Beschreibung und genetische Ursachen

Das Parkinson-Syndrom umfasst das symptomatische Parkinson-Syndrom, Parkinson-Syndrome im Rahmen neurodegenerativer Systemerkrankungen und den idiopathischen Morbus Parkinson. Letzterer stellt die häufigste Bewegungsstörung dar, die auf neurodegenerative Prozesse zurückzuführen ist (Lang & Lozano, 1998a; Lang & Lozano, 1998b). Die Prävalenz von Morbus Parkinson wird mit circa 100 – 300/100000 im Alter von über 65 Jahren angegeben, wobei der Erkrankungsgipfel bei 50 bis 60 Jahren liegt (Wirdefeldt et al, 2011). Jedoch sind 10 % der Patienten[1] bei Erkrankungsbeginn jünger als 40 Jahre.

Das klinische Bild des Parkinson-Syndroms ist durch motorische Störungen geprägt. Zu diesen zählen Ruhetremor, Rigor, Bradykinesie und posturale Instabilität mit Reduktion von Stellreflexen und einer abnormen, vorgebeugten Körperhaltung. Neben diesen motorischen

[1] Geschlechtergerechtes Schreiben ist wichtig. In dieser Arbeit wird jedoch aufgrund der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet, wobei immer sowohl das weibliche als auch das männliche Geschlecht gemeint sind.

Symptomen leiden Patienten auch unter vegetativen und neuropsychologischen Auffälligkeiten.

Die Diagnose des Parkinson-Syndroms wird anhand klinischer Aspekte gestellt.

Pathophysiologisch liegt der Erkrankung ein Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* zugrunde. Im fortschreitenden Prozess breitet sich die Neurodegeneration im gesamten Gehirn aus. Histopathologisch lassen sich in betroffenen Arealen Lewykörper nachweisen. Diese Einschlusskörperchen stellen eine lokale Anreicherung von vorwiegend ubiquitiniertem α-Synuclein dar.

Die Therapie des Morbus Parkinson richtet sich nach dem Verlauf, der klinischen Symptomatik und dem Erkrankungsalter. Der generelle therapeutische Ansatzpunkt ist die Erhöhung des neuronalen Dopaminspiegels, zum Beispiel mittels L-DOPA.

Obwohl die genaue Ursache der Neurodegeneration in der *Substantia nigra* noch nicht vollständig geklärt ist, scheinen molekulare Veränderungen in dieser Region vielversprechende Informationen zur Pathogenese des Parkinson-Syndroms bereit zu halten. So spielt hier wohl die Funktion der nigrostriatalen Mitochondrien eine besondere Rolle. Es ließ sich beweisen, dass das Neurotoxin Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridin (MPTP) selektiv toxisch auf die *pars compacta* der *Substantia nigra* wirkt. Mäuse, denen MPTP verabreicht wurde, wiesen klinische Symptome auf, die auch bei Patienten mit Morbus Parkinson beobachtet werden (Heikkila et al, 1985). Hierbei ist zu erwähnen, dass ein Metabolit von MPTP den Komplex I der Mitochondrien in seiner Funktion hemmt (Vyas et al, 1986). Dieses Ergebnis veranlasste Forscher zu der Annahme, dass Patienten mit Parkinson-Syndrom durch toxische Substanzen einen Verlust ihrer Mitochondrienfunktion erfuhren.

Auch durch die Betrachtung familiärer Formen des Morbus Parkinson verspricht man sich ein besseres Verständnis von der Krankheitsgenese. Bisher konnten 18 sogenannte *PARK Loci* identifiziert werden. Innerhalb dieser *Loci* stehen Mutationen in mindestens sieben Genen im direkten Zusammenhang mit monogenetischen Formen des Morbus Parkinson (zusammengefasst in (Klein & Westenberger, 2012; Kumar et al, 2012)). Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über sämtliche bisher bekannte *Loci* und Gene.

Gen-*Locus*	**Gen-/*Locus*-symbol**	**PARK**	**Protein**	**Vererbungsmodus**
4q21-22	*SNCA*	*PARK1*	α-Synuclein*	Autosomal-dominant
6q25.2-q27	***PARK2***	***PARK2***	**Parkinson Protein 2, Parkin***	**Autosomal-rezessiv**
2p13	*PARK3*	*PARK3*	Unbekannt	Autosomal-dominant
4q12-q23	*SNCA*	*PARK4*	α-Synuclein*	
4q13	*UCHL1*	*PARK5*	*Ubiquitin carboxy-terminal-hydrolase-L1* (UCHL1)	Autosomal-rezessiv
1q35-p36	***PINK1***	***PARK6***	***PTEN-induced-putative kinase 1* (PINK1)***	**Autosomal-rezessiv**
1p36	***PARK7***	***PARK7***	**Parkinson Protein 7 (DJ-1)***	**Autosomal-rezessiv**
12q12	*LRRK*	*PARK8*	*Leucine-rich repeat kinase 2*	Autosomal-dominant
1p36	*ATP13A2*	*PARK9*	ATPase Typ 13A2	Autosomal-rezessiv
1p32	*PARK10*	*PARK10*	Unbekannt	Unbekannt
2q36-27	*PARK11*	*PARK11*	Unbekannt	Autosomal-dominant
Xq21-q25	*PARK12*	*PARK12*	Unbekannt	X-chromosomal
2p12	*HTRA2*	*PARK13*	HtrA2	Autosomal-dominant
22q13.1	*PLA2G6*	*PARK14*	Phospholipase A2, Gruppe VI	Autosomal-rezessiv
22q12-q13	*FBX07*	*PARK15*	F-Box Protein 7	Autosomal-rezessiv
1q32	*PARK16*	*PARK16*	Unbekannt	Unbekannt
16q11.2	*VPS35*	*PARK17*	*Vacuolar protein sorting 35 homolog*	Autosomal-dominant
3q27.1	*EIF4G1*	*PARK18*	*Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1*	Autosomal-dominant

Tabelle 1.1 *Bisher bekannte Loci und Gene, welche mit monogenetischem Morbus Parkinson zusammenhängen.* Der Vererbungsmodus ist angegeben. Sämtliche Gene, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind, wurden fett hervorgehoben. Ein (*) markiert Gene, die mit Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn assoziiert sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Proteinen (Mitofusin, Parkin) und Genen (*PARL*, *PARK7*), die die mitochondriale Integrität und Funktionalität beeinflussen. Sie sind desweiteren mit dem Parkinson-Syndrom assoziiert. Somit lässt sich an eben dieser Stelle eine Gemeinsamkeit zwischen dem Effekt von MPTP auf Mitochondrien und den bekannten familiären Parkinson-Syndromen erkennen. Hierauf wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

1.2 Morbus Parkinson und mitochondriale Dysfunktion

Der selektive Verlust dopaminerger Neurone bei Morbus Parkinson-Patienten wird mit abnehmender mitochondrialer Aktivität in Verbindung gebracht. Tatsächlich scheint die mitochondriale Dysfunktion solch schwerwiegende Folgen nach sich zu ziehen, dass man sie als Ursache der Degeneration dopaminerger Neurone betrachten kann. Beispielsweise sind 1) somatische Schäden der mitochondrialen DNA (mtDNA) häufiger bei Patienten mit

Parkinson-Syndrom zu finden (Bender et al, 2006), 2) Morbus Parkinson-ähnliche Symptome in Versuchsreihen mit Tieren und Menschen durch chemische Substanzen, die enzymatische Vorgänge in Mitochondrien stören (z. B. MPTP, Rotenon, Paraquat), zu induzieren (Litteljohn et al, 2011; Xiong et al, 2012; Yokoyama et al, 2011) und 3) Mutationen in nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen (z. B. PINK1 und DJ-1) als ursächlich für monogenetischen familiären Morbus Parkinson anzuführen. Zusätzlich konnten unphysiologische Verformungen des mitochondrialen Netzes, oxidative Schäden und eine verringerte mitochondriale Funktion in Tiermodellen und Fibroblasten von Patienten mit Parkinson-Syndrom nachgewiesen werden (Clark et al, 2006; Greene et al, 2003; Muftuoglu et al, 2004; Palacino et al, 2004).

Intakte Mitochondrien unterliegen dynamischen strukturellen Umbauprozessen zur Regulation ihrer Funktionalität: Mitochondriale Fusion bezeichnet das Verschmelzen zweier Mitochondrien und dient dem Schutz der Organelle. Hierbei werden Proteine ausgetauscht, mtDNA repariert und Metabolite gleichartig aufgeteilt. Der gegenteilige Prozess der Fusion ist die Fission von Mitochondrien. Sie verteilt die Organelle im Prozess der Zellteilung auf Tochterzellen. Ferner können durch Fission beschädigte Segmente durch Autophagie abgetrennt und mitochondriale Bestandteile durch Vereinnahmung in Autophagosomen abgebaut werden. Der Vorgang der Mitophagie beschreibt die Fusion dieser Autophagosomen mit degradierenden Lysosomen. Es weist vieles darauf hin, dass eine sehr genau gesteuerte Qualitätskontrolle zur Erkennung und Beseitigung beschädigter Mitochondrien besteht. Sie ist der zellulären Integrität zuträglich. Mutationen in Schlüsselenzymen dieser Prozesse scheinen in Kontrollmechanismen einzugreifen und die Zelle für destruktive Abbauvorgänge empfänglicher zu machen.

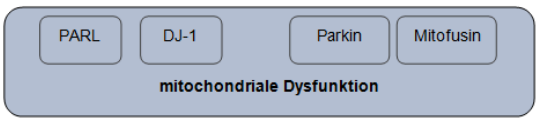


Abbildung 1.1 *Schema.* In dieser Arbeit behandelte Proteine (rechts, Parkin und Mitofusin) und die Genprodukte von *PARL* und *PARK7* (links, PARL beziehungsweise DJ-1), deren Fehlfunktion die mitochondriale Integrität beeinflussen kann.

Enzymmutationen, die aufgrund mitochondrialer Dysfunktion zu einem Parkinson-Syndrom führen, können ebenfalls Dystonie verursachen. Der folgende Abschnitt beschreibt eine Krankheit, die als Mischbild eines Parkinson-Syndroms und einer Dystonie zu sehen ist und dem genetischen Parkinson-Syndromen zugeordnet wird.

1.3 *X-linked dystonia-parkinsonism* (XDP)

X-linked dystonia-parkinsonism (XDP; DYT3) ist eine Krankheit, die bei betroffenen Patienten zur Ausbildung parkinsonoider und dystoner Bewegungsabläufe führt. Dystonie bezeichnet eine Bewegungsstörung, die mit unkontrollierbaren phasischen Muskelkontraktionen einhergeht. XDP wird X-chromosomal rezessiv vererbt und tritt aufgrund eines Gründereffektes ausschließlich bei Menschen auf, die von der philippinischen Insel Panay stammen. Hier beträgt die Prävalenz 5,24/100000 (Lee et al, 2002). Träger des Merkmales klagen erstmals im mittleren Alter von 39 Jahren (12 - 64 Jahre) bei Männern und 52 Jahren (26 - 75 Jahre) bei Frauen über Symptome (Evidente et al, 2004b).

Das klinische Bild von XDP ist mannigfaltig: Es werden sowohl fokale Dystonie (Lee et al, 2002) als auch in selteneren Fällen die Symptomatik eines Parkinson-Syndroms (Evidente et al, 2004a) als Erstmanifestationen beschrieben. Das Zusammenspiel von Morbus Parkinson und Dystonie führt zu einem vorzeitigen Tod meist in Folge einer Aspirationspneumonie oder von Verhungern aufgrund oropharyngealer Dysfunktion (Lee et al, 2011).

Die Diagnose von XDP kann durch die Kombination von Anamnese, Klinik und genetischer Testung gestellt werden.

XDP ist die einzige dystone Erkrankung, in der Neurone einem degenerativen Prozess unterworfen sind. Neuropathologisch lässt sich bei dieser Erkrankung eine Gliose des *Striatums* nachweisen. Sie wird mit synaptischer Dysfunktion (Evidente, 1993) und neuronalem Untergang (Waters et al, 1993) assoziiert. Trotz des klinischen Bildes eines Parkinson-Syndroms ist bei XDP-Patienten nicht die *Substantia nigra* betroffen.

Als Ursache der Entstehung von XDP wird die Insertion eines Retrotransposons in das Gen der größten Untereinheit des Transkriptionsfaktors IID (TFIID) *TAF1* (TATA-*box binding protein-associated factor* 1) am XDP-*Locus* angenommen (Makino et al, 2007). Diese Insertion tritt bei sämtlichen Patienten gemeinsam mit einer C>T Transition im *Exon* d4 des *TAF1*-Gens auf. Letztere trägt den Namen XDP-*disease-specific change 3* (DSC3) und ist Teil eines Transkriptionssystems (DYT3). Der Nachweis von DSC3 wird zu Diagnosezwecken bemüht. Die zellulär-funktionelle Folge der Mutation von *TAF1* ist bisher unbekannt (Makino et al, 2007).

Vergleichbar mit anderen X-chromosomal rezessiv vererbten Erkrankungen betrifft XDP vor allem Männer, die hemizygote Träger des mutierten Allels sind. Das homozygote Vorliegen von DSC3 oder die regelhafte Inaktivierung des X-Chromosoms könnten das Vorliegen von XDP bei Frauen erklären.

Der erste Abschnitt dieser Einleitung beschrieb den Stellenwert mitochondrialer Dysfunktion in der Pathogenese eines monogenetischen Parkinson-Syndroms und endet mit der Vorstellung von XDP. Die Gemeinsamkeiten des mitochondrial-bedingten Morbus

Parkinsons und XDP liegen darin, dass beide Erkrankungen dystone Symptome hervorrufen können und zum genetischen Morbus Parkinson gezählt werden.

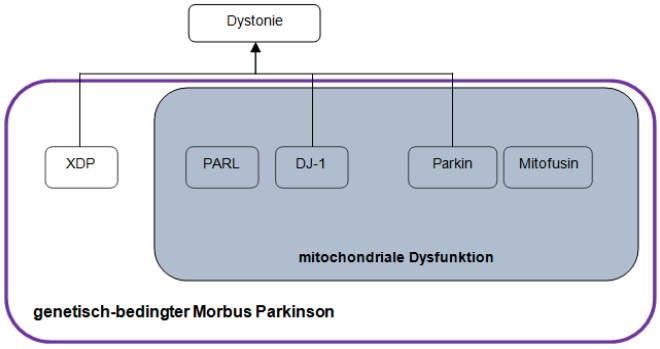


Abbildung 1.2 *Schema.* Ausbildung einer Dystonie durch Erkrankung an XDP und Fehlfunktion der Proteine DJ-1 und Parkin im Rahmen mitochondrialer Dysfunktion bei genetisch-bedingtem Morbus Parkinson.

Der zweite Teil der Einleitung beschreibt die Enzyme PARL und DJ-1. Mit ihnen wird der Aspekt der mitochondrialen Dysfunktion in der Pathogenese des Parkinson-Syndroms wieder aufgenommen.

1.4 Die mitochondriale Protease PARL

Zum besseren Verständnis der Funktion von PARL muss vorerst das Enzym PINK1 vorgestellt werden. Mutationen in *PINK1* kommen mit einer Frequenz von 1 – 9 % vor (Klein & Westenberger, 2012) und sind die zweithäufigste Ursache autosomal-rezessiven Morbus Parkinsons mit frühem Erkrankungsbeginn. Das *PINK1*-Gen kodiert ein 581 Aminosäuren langes Polypeptid – die Serin/Threonin-Kinase *PTEN-induced putative kinase 1*. PINK1 agiert im Rahmen einer Kaskade, die der mitochondrialen Qualitätskontrolle dient. Hierbei wirkt es funktionell vor (*upstream*) Parkin, welches ein zentrales Enzym zur Induktion von Mitophagie ist (siehe Abschnitt 1.6.3). PINK1 initiiert die Translokation von Parkin aus dem Cytosol zur äußeren mitochondrialen Membran, sobald Mitochondrien depolarisiert wurden. In Zellen, die kein PINK1 exprimieren, gelangt Parkin nicht zu den depolarisierten Mitochondrien. So lässt sich der Schluss ziehen, dass PINK1 für diese Translokation vonnöten ist (Rakovic et al, 2010; Vives-Bauza et al, 2010). Eine Voraussetzung für Parkins Translokation ist die mitochondriale Lokalisation von PINK1 und dessen Verbleib im Mitochondrion (Chu, 2010; Geisler et al, 2010; Jones, 2010; Kawajiri et al, 2010; Narendra et al, 2010; Vives-Bauza et al, 2010).

Das in intakten Mitochondrien vorkommende PINK1 wird proteolytisch prozessiert. Es wurde die posttranslationale Spaltung von PINK1 (~ 66 kDa) nach Eintritt des Enzyms in die äußere

mitochondriale Membran in eine circa 55 kDa große Form beschrieben ((Weihofen et al, 2008), siehe Abschnitt 1.6.3). Hierbei konnte die Position A103 als Ort der Spaltung von PINK1 durch das Enzym *presenilin-associated rhomboid-like protein* (PARL) ausgemacht werden (Deas et al, 2011; Jin et al, 2010).

PARL ist ein 379 Aminosäuren langes mitochondriales Polypeptid. Die katalytische Domäne von PARL besteht aus sechs transmembranären *Helices* und zwei Aminosäuren, p.Ser277 und p.His335, kodiert durch die *Exons* 2, 8 und 9 (Jeyaraju et al, 2011). Aufgrund seiner Interaktion mit PINK1 ist die einwandfreie Funktion von PARL für die korrekte Regulation der Mitophagie wichtig. Das unphysiologische Prozessieren von PINK1 durch PARL kann daher als Ursache für ein Parkinson-Syndrom mit frühem Erkrankungsbeginn herangezogen werden (Shi et al, 2011). In Mäusen ist PARL an der proteolytischen Verarbeitung von OPA1, einer Komponente des mitochondrialen Netzes, beteiligt. Ein *knockout* von PARL führt in diesem Fall zu kontrollierter Apoptose durch intramembranärer Proteolyse (Hill & Pellegrini, 2010). Desweiteren wird PARL N-terminal zweifach gespalten. Die selbstregulierte, sogenannte β-Proteolyse an der Position p.Ser77/Ser78 dient hierbei der Einleitung einer durch PARL induzierten mitochondrialen Fragmentierung (Sik et al, 2004).

Die Mutation p.Ser77Ala des *PARL*-Gens führt zur Fehlfunktion von PARL (Shi et al, 2011). Die mutierte Protease kann sich keiner β-Spaltung mehr unterziehen und weist eine reduzierte Fähigkeit zur Induktion mitochondrialer Fragmentation auf. Somit bedingt die Mutante p.Ser77Ala möglicherweise ein monogenetisches Parkinson-Syndrom (Shi et al, 2011). Um diese Vermutung zu bestätigen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Nicht nur die Betrachtung von dysfunktionellem PARL veranschaulicht, dass ein Parkinson-Syndrom durch Fehlregulation innerhalb des mitochondrialen Netzes hervorgerufen werden kann. Der folgende Abschnitt bemüht den gleichen theoretischen Ansatz im Rahmen des DJ-1-abhängigen Morbus Parkinsons.

1.5 DJ-1: Funktion und Pathogenese von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn

DJ-1 ist ein 189 Aminosäuren langes Polypeptid (Cookson & Bandmann, 2010). Es wird durch *PARK7* kodiert und folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang. DJ-1 nimmt als Quartärstruktur die Form eines Dimers an (Blackinton et al, 2009; Wilson, 2011). Seine funktionellen Domänen (siehe unten) werden durch die *Exons* 2 bis 7 kodiert.

Wurde bei Patienten eine Mutation in *PARK7* festgestellt, liegt diese meist homozygot oder *compound*-heterozygot vor. Generell ist das DJ-1-bedingte Parkinson-Syndrom jedoch als

selten einzustufen: Circa 1 - 2 % aller früh beginnenden Fälle lassen sich auf Mutationen des *PARK7*-Gens zurückführen (Klein & Westenberger, 2012).
Betrachtungen der zellulären Funktion von DJ-1 stützen die Theorie, dass es im Falle des genetisch-bedingten Parkinson-Syndroms zu neuronalem Untergang aufgrund oxidativen Stresses kommen kann. DJ-1 akkumuliert unter oxidativen Stimuli in Mitochondrien (Krebiehl et al, 2010) und reagiert dort mit Radikalen (*reactive oxygene species,* ROS*)*. Dabei bildet sich eine cysteinhaltige Sulfinsäure (Andres-Mateos et al, 2007), in der die Sulfhydrylgruppe des stark konservierten Cysteins 106 eine große Rolle spielt: Die DJ-1-Mutante p.Cys106Ala ist nicht mehr in der Lage, ROS abzupuffern (Canet-Aviles et al, 2004; Meulener et al, 2006; Taira et al, 2004). Der Verlust des funktionellen DJ-1-Dimers führt zur Reduktion des mitochondrialen Potentials und in Folge dessen zu mitochondrialer Fragmentierung (McCoy & Cookson, 2011; Thomas et al, 2011). Diese zieht wahrscheinlich Mitophagie nach sich (Gonzalez-Polo et al, 2009; Krebiehl et al, 2010).
Die zelluläre Funktion von DJ-1 ist in ihrem gesamten Spektrum noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass das Protein vielfältige Aufgaben wahrnimmt, die neben der Aktivität als Chaperon (Logan et al, 2010), der Interaktion mit PINK1 und Parkin (Tang et al, 2006) und der eben erwähnten Antwort auf oxidativen Stress noch viele weitere beinhaltet (siehe Anhang, 8.1).
Da ein DJ-1-abhängiger Morbus Parkinson selten vorkommt, wurden kaum systematische Mutationsanalysen mit Fokus auf *PARK7* durchgeführt. Solche Untersuchungen bestätigten jedoch, dass ein Parkinson-Syndrom nur in wenigen Fällen auf dysfunktionelles DJ-1 zurückzuführen war.

Die ersten beiden Teile der Einleitung gewährten Einblicke in die Grundlagen der in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Studien. Ihnen schließt sich nun im dritten Abschnitt die Vorstellung der Enzyme Parkin und Mitofusin an. Die funktionellen Studien der vorliegenden Arbeit beschäftigten sich mit diesen Proteinen. Parkin und Mitofusin zählen ebenfalls zu den Enzymen, deren Fehlfunktion die mitochondriale Integrität beeinträchtigt.

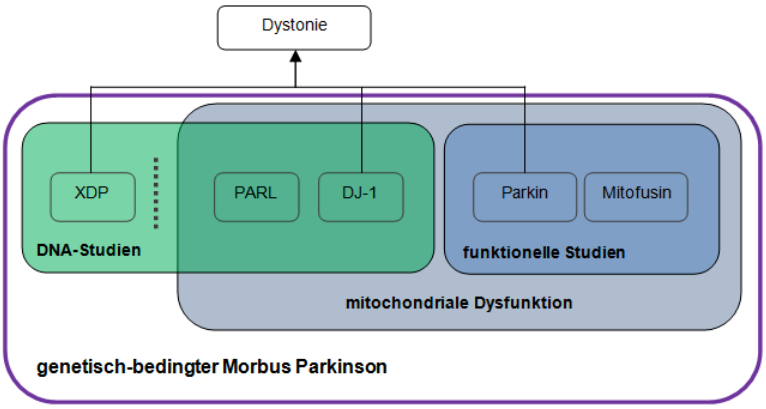


Abbildung 1.3 *Schema.* In dieser Arbeit behandelte Themenkomplexe, unterteilt in funktionelle und DNA-Studien.

1.6 Die E3-Ubiquitinligase Parkin

1.6.1 Struktur und Genetik

PARK2 kodiert die 465 Aminosäuren lange, aus 12 *Exons* bestehende E3-Ubiquitinligase Parkin. Das Gen folgt einem autosomal-rezessiven Vererbungsmodus. Strukturell können fünf funktionelle Domänen des Proteins benannt werden: die N-terminale UBL (*ubiquitin-like*)-Domäne zur Strukturstabilisierung und Expressionskontrolle, sowie die C-terminalen Domänen RING0, RING1, IBR (*in-between-ring*) und RING2, welche Parkins Funktion als ubiquitinierendes Enzym dienen (Hristova et al, 2009).

Mutationen des *PARK2*-Gens sind die häufigste Ursache für die Entstehung von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn (10 – 20 % aller Fälle). Sie bedingen 50 % aller familiären Formen, wobei 77 % der Mutationsträger jünger als 30 Jahre sind (Klein & Westenberger, 2012).

PARK2-Mutationen liegen homozygot, heterozygot als auch *compound*-heterozygot vor. Veränderungen des Gens beeinträchtigen vor allem die Interaktion von Parkin mit E2-Enzymen und dessen E3-Funktion (siehe Abschnitt 1.6.2, (Nuytemans et al, 2010; Ramsey & Giasson, 2010)).

1.6.2 Parkins Funktion als E3-Ubiquitinligase

Parkin spielt eine wichtige Rolle im Ubiquitinierungsprozess. Dieser stellt eine hochkonservierte und genau regulierte posttranslationale Modifikation dar, die vielfältigen zellulären Funktionen dient (van der Veen & Ploegh, 2012). Es werden hierbei mittels verschiedener Proteine ein oder mehrere Ubiquitinmoleküle (Ub) kovalent mit einem Substrat über dessen Lysin verbunden. Enzyme, die an dieser Reaktion teilnehmen sind Ub-aktivierende Enzyme (E1), Ub-konjugierende Enzyme (E2) und Ub-Ligasen (E3, Abbildung

1.4). Obwohl einige Substrate ausschließlich (mehrfach) monoubiquitiniert werden, können Proteinen auch Ub-Ketten angehängt werden. Ub ist ein kurzes, 76 Aminosäuren langes Protein. Jeder der sieben Lysinreste (Lys6, Lys11, Lys27, Lys33, Lys48, Lys63) von Ub kann zur Kettenbildung genutzt werden. Somit lassen sich eine Vielzahl diverser Strukturen unterschiedlicher Länge bilden (Deshaies & Joazeiro, 2009).

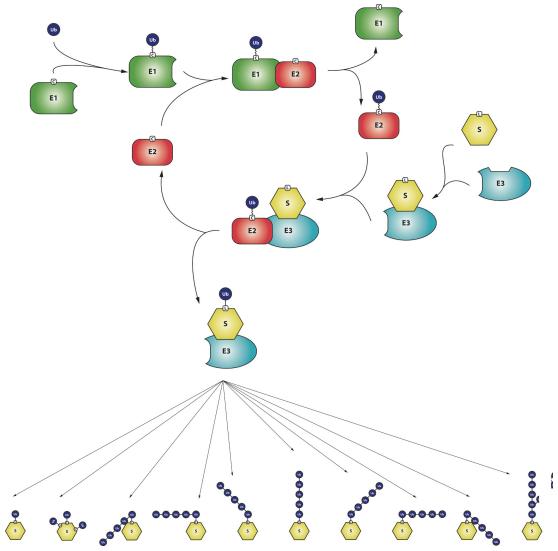


Abbildung 1.4 *Ubiquitinierung.* Im ersten Schritt wird der C-terminale Glycinrest des Ubiquitins (Ub, dunkelblau) mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums von E1 (grün) verbunden. Dadurch wird Ub aktiviert und kann schließlich auf das Cystein des aktiven Zentrums von E2 (rot) übertragen werden. Letztlich katalysiert ein E3-Enzym (hellblau) den Transfer des Ub von E2 auf eine Seitenkette eines Lysins des Zielproteins (Substrat, gelb). Durch die Polymerisierung der Aminogruppe des Lysinrestes eines Ub-Moleküls mit der Carboxylgruppe eines anderen Ubiquitins entstehen Ub-Ketten.

Homotypische Verbindungen von Ub über Lys48 markieren fehlgefaltete Proteine oder Proteine, die einem hohen Umsatz unterliegen, zum Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Modifikationen durch andere Kettenformen (z. B. die Verbindung über Lys63) können einen UPS-unabhängigen Zweck bedingen (lysosomaler Abbau, Antwort auf Stress, DNA-Reparatur usw.). Monoubiquitinierung dient der Modulation der Interaktion, Lokalisierung und Aktivität von Zielproteinen (Kim et al, 2007).

Im Jahre 2000 wurde Parkin erstmals als E3-Ligase identifiziert (Zhang et al, 2000). Seitdem konnten mehr als 50 verschiedene Proteine beschrieben werden, die mit Parkin interagieren. Außerdem scheint das Enzym im Rahmen einer E2-unabhängigen Automonoubiquitinierung sein eigenes Substrat zu sein (Chew et al, 2011).

Für manche Proteine, die mit Parkin reagieren, bestehen theoretische Ansätze, die die Pathogenese des Morbus Parkinson zu erklären versuchen - das Zusammenspiel der verschiedenen Enzyme wurde bisher jedoch unzureichend betrachtet.

1.6.3 Parkins Funktion hinsichtlich Mitophagie

Eine wichtige Erkenntnis konnte hinsichtlich der Interaktion von Parkin mit PTEN-*induced putative kinase 1* (PINK1) gewonnen werden: Es ließ sich beweisen, dass Parkin selektiv zu dysfunktionellen Mitochondrien, die ein geringes elektrisches Potential ($\Delta\psi$) aufweisen, rekrutiert wird und im Anschluss deren Autophagie fördert (Narendra et al, 2008). Aus dieser

Einsicht entstand folgendes Szenario: In intakten, bioenergetisch einwandfreien Mitochondrien wird PINK1 schnell proteolytisch prozessiert (siehe Abschnitt 1.4). In Mitochondrien, deren elektrisches Potential hingegen nicht mehr in der Lage ist, als Motor der ständigen ATP-Produktion zu fungieren, wird PINK1 stabilisiert und liegt ungespalten vor (Narendra et al, 2010). Derart rekrutiert es cytosolisches Parkin zu diesen wahrscheinlich nicht-funktionierenden Mitochondrien. Am Mitochondrion angekommen, wird Parkin enzymatisch aktiv und initiiert deren Autophagie über lysosomale Degradation (Mitophagie, (Rakovic et al, 2011; Rakovic et al, 2010; Vives-Bauza et al, 2010)). Daher können unter Stress stehende Zellen, genau wie Zellen, deren Parkin oder PINK1 nicht funktionell aktiv sind, ihre beschädigten Mitochondrien nur schlecht entsorgen. Dies führt zur intrazellulären Anreicherung oxidierter Proteine und zur Verringerung der Zellatmung. Der auf diese Veränderungen sehr wahrscheinlich folgende Zelltod könnte zur Neurodegeneration bei Morbus Parkinson beitragen.

Der genaue Ablauf der Mitophagieinitiierung nach Parkins Rekrutierung zum Mitochondrion ist noch nicht bekannt. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Parkin, welches sich in depolarisierten Mitochondrien befindet, mitochondriale Fusionsproteine (Mitofusin 1 und 2, siehe Abschnitt 1.7) ubiquitiniert (Rakovic et al, 2011). Die Bedeutung dieses Vorgangs im Hinblick auf Mitophagie und der Aktivitäts- und Mengenkontrolle der Fusionsproteine ist unklar.

1.7 Mitofusin 1 und 2 und ihre Funktion bezüglich mitochondrialer Fusion und Mitophagie

Die Fusionsproteine Mitofusin 1 und 2 (Mfn) gehören zu der Gruppe der konservierten transmembranären GTPasen. Der strukturelle Aufbau ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Mitofusin fördert die mitochondriale Fusion und beeinflusst dadurch die Form des mitochondrialen Netzes (Rakovic et al, 2011). Mutationen im Bereich der GTPase- oder der *coiled-coil*-Domänen von Hefe-Mitofusin verhindern die Fusion von Mitochondrien (Griffin & Chan, 2006). Menschliche Mitofusin 1-p.Lys88Thr GTPase-Mutanten weisen eine stark reduzierte Fähigkeit zur Bildung mitochondrialer Netze auf (Santel et al, 2003).

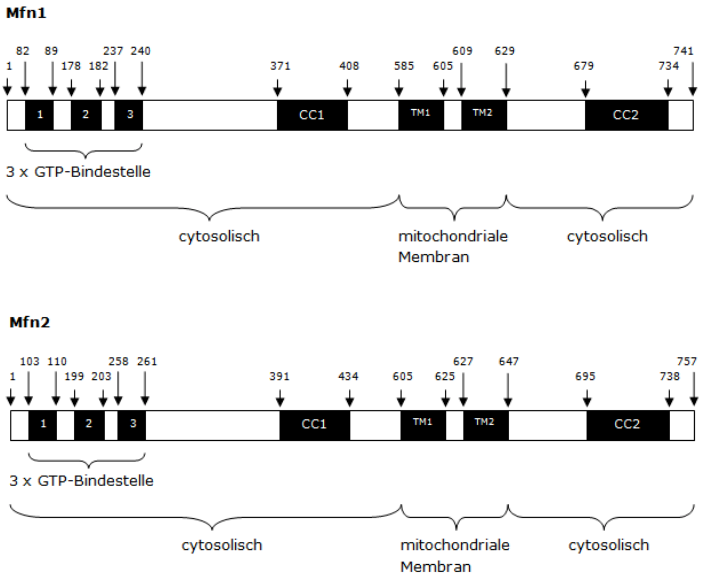


Abbildung 1.5 *Schemata der funktionellen Domänen von Mitofusin 1 und 2.* Das Aminoende von Mitofusin weist eine konservierte GTPase-Domäne auf. Am C-terminalen Ende befinden sich zwei *coiled-coil*-Strukturen.
1, 2, 3: Nukleotidbindung
CC1/2: *Coiled-coils*
TM1/2: Mitochondriale transmembranäre Domäne
Mfn – Mitofusin.

Mitochondriale Fusion dient dem gegenseitigen Austausch von Metaboliten und mtDNA-Kopien. Dies ist als Antwort auf eine sich ständig ändernde energetische Beanspruchung der Zelle zu deuten. Mitochondrien müssen jedoch entfernt werden, sind sie unwiderruflich beschädigt. In diesem Fall verhindert die verringerte mitochondriale Fusion den Schaden, den dysfunktionelle Mitochondrien den intakten zuführen. So können nicht-funktionierende Mitochondrien kleingehalten und leichter durch Lysosomen entfernt werden.
Es liegt die Vermutung nahe, dass Parkin, sobald es sich in geschädigten Mitochondrien anreichert, die Interaktion von mitochondrialen Fusionsproteinen durch Monoubiquitinierung von Mitofusin unterbindet, beziehungsweise Mitofusin inaktiviert (Gegg et al, 2010; Poole et al, 2010; Ziviani et al, 2010).
Zusammengefasst lässt wahrscheinlich das Ubiquitinierungsmuster von Mitofusin auf dessen Funktion in der Vermittlung von Mitophagie schließen. Um zu ergründen, ob Mitofusin posttranslational poly- oder monoubiquitiniert wird, bedarf es daher weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

1.8 Vorleistungen der Arbeitsgruppe: Parkin und Mitofusin

Die Forschungsgruppe des Instituts für Neurogenetik in Lübeck wies nach, dass in Fibroblasten gesunder Probanden Mitofusin höheren molekularen Gewichtes nach Behandlung mit Valinomycin (ein Mittel zur Depolarisierung der mitochondrialen Membran) entsteht (Rakovic et al, 2010). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich abhängig von Parkin, da im *Western Blot* keine zusätzlichen Mitofusinbanden bei Patienten, die kein Parkin exprimierten, auftraten (Abbildung 1.6, rechts).

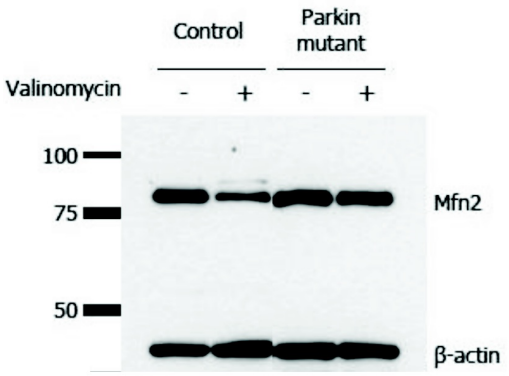


Abbildung 1.6 *Mitofusin 2-Menge in Fibroblasten gesunder Patienten und in Fibroblasten von Patienten mit nicht-funktionsfähigem Parkin.* Standardbedingungen sowie Zustand nach Behandlung mit Valinomycin gezeigt. Erkennbar ist, dass ausschließlich in gesunden Fibroblasten die Menge an Mitofusin 2 nach mitochondrialer Depolarisation mittels Valinomycin abnimmt und stattdessen eine Bande, die der hochmolekularen ubiquitinierten Form von Mitofusin 2 entspricht, auftritt. β-Aktin dient als Ladekontrolle. Mfn – Mitofusin. Abbildung aus (Rakovic et al, 2011).

Die immunologische Darstellung von Mitofusin 2 bestätigte, dass die zusätzliche Bande bei mitochondrialer Depolarisation ein hochmolekulares Mitofusin 2-Konjugat darstellte (Abbildung 1.7).

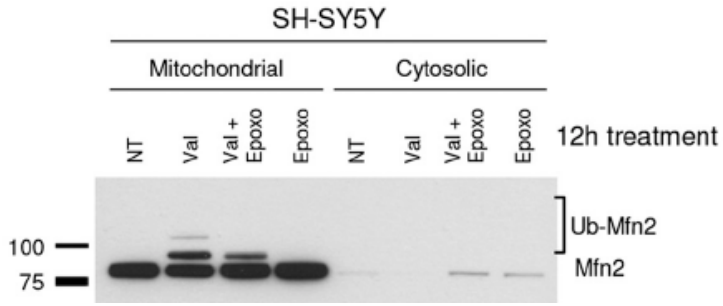


Abbildung 1.7 *Ubiquitinierung von Mitofusin 2 nach Depolarisation von Mitochondrien.* Mitofusin 2-Immunpräzipitate unbehandelter mitochondrialer und cytosolischer Kontrollen liegen im Vergleich zu durch Valinomycin, Valinomycin und Epoxomycin (zellulärer Stressor), Epoxomycin gestressten SH-SY5Y-Zellen vor. Hierzu wurden Antikörper gegen endogenes Mitofusin 2 benutzt. Ubiquitiniertes Mitofusin 2 findet sich nur in depolarisierten Kontrollen. Mfn 2 – Mitofusin 2; Ub-Mfn 2 – ubiquitiniertes Mitofusin 2. Abbildung aus (Rakovic et al, 2012).

1.9 Schema

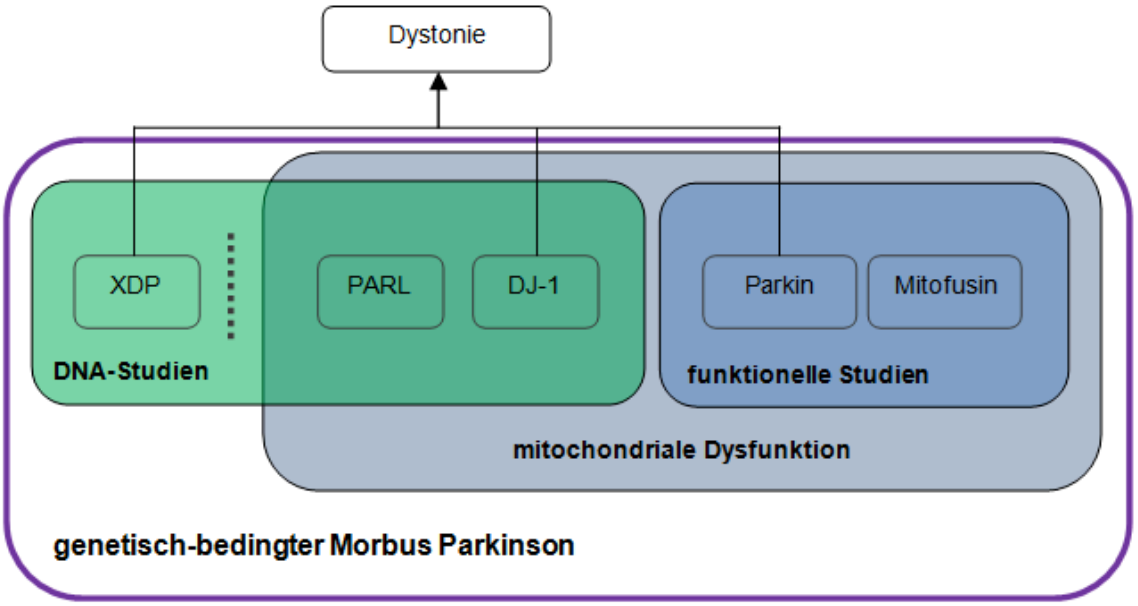


Abbildung 1.8 *Vereinfachte, schematische Darstellung der Themengebiete und deren Zusammengehörigkeit.* Im Verlauf dieser Arbeit wird zur Orientierung ein roter Pfeil den Themenkomplex markieren, mit dem sich der Abschnitt befasst.

1.10 Annahmen

Die Annahmen, denen in dieser Arbeit nachgegangen wird, lassen sich entsprechend der anfangs erwähnten Gliederung in drei Abschnitte unterteilen.

1)

Mutationen funktioneller Domänen des ***PARL***- und ***PARK7***-Gens sind eine häufige Ursache von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn.

2)

Das Vorliegen von DSC3 korreliert sehr gut mit der Diagnosestellung von **XDP** und ist bei Frauen dann ein Marker für die Ausbildung des Krankheitsbildes, wenn DSC3 entweder homozygot vorliegt oder das X-Chromosom regelhaft inaktiviert wurde.

3)

Die Ubiquitinierung von **Mitofusin** durch **Parkin** lässt sich *in vitro* durchführen und ist spezifisch. Ferner haben verschiedene depolarisierende Agentien einen unterschiedlichen Effekt auf die zelluläre Antwort durch Parkin und Mitofusin. Desweiteren ist die multiple, E2-unabhängige Autoubiquitinierung Parkins unspezifisch und ein Nebeneffekt dessen Aktivierung.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

DNA wurde zur weiteren Analyse in sämtlichen Studien aus venösem Blut gewonnen.

2.1.1 Kollektiv der auf Mutationen im *PARL*-Gen untersuchten Personen

92 mitteleuropäische Patienten mit früh beginnendem Morbus Parkinson konnten auf Mutationen im *PARL*-Gen untersucht werden. Das mittlere Erkrankungsalter des Kollektivs lag bei 36,4 ± 7,2 Jahren. 56 Patienten waren männlichen Geschlechts, 30 Patienten hatten eine positive Familienanamnese hinsichtlich Morbus Parkinson.

2.1.2 Kollektiv der auf Mutationen im *PARK7*-Gen untersuchten Personen

Das *PARK7*-Gen von 68 mitteleuropäischen Patienten mit Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn wurde auf Mutationen untersucht. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 37,31 ± 7,58 Jahre. 33 Frauen befanden sich in der Patientenkohorte. Insgesamt wiesen 17 Individuen eine positive Familienanamnese auf.

2.1.3 Kollektiv der auf DSC3 untersuchten Personen

Die Kohorte der auf DSC3 zu untersuchenden Individuen bestand aus 51 Personen philippinischer Herkunft. Sowohl die DNA klinisch an XDP erkrankter Patienten, als auch jene von gesunden Mitgliedern betroffener Familien wurden analysiert. Vorhandene Informationen zu den einzelnen Individuen sind in Tabelle 2.1, B zusammengefasst. Im Folgenden werden die sehr schwer erkrankte Patientin L-5735 (II.2. in Abbildung 2.1) und ihre ebenfalls symptomatischen Brüder (L-5737; II.6, L-5736; II.12 und L-5738, II.15; Stammbaum, siehe Abbildung 2.1) vorgestellt. Patientin L-5735 erkrankte im Alter von 50 Jahren an XDP - ein im Vergleich zu ihren Brüdern, die jeweils mit 47, 36 und 37 Jahren erste Symptome aufwiesen, später Zeitpunkt. Der Zustand der Patientin verschlechterte sich rapide. Im Alter von 59 Jahren verstarb sie an den Folgen einer Aspirationspneumonie. Das MRT der vier Patienten wies in beiden Hemisphären Auffälligkeiten im Bereich des *Putamens* auf. Auch ließ sich eine Volumenabnahme der *Caput caudatae* erkannen. Durch Ahnenforschung konnte der Schluss gezogen werden, dass der Großvater der Patienten mütterlicherseits hemizygot für DSC3 war und somit seinen Nachkommen die krankheitsbedingende Mutation vererbt haben musste. Die Mutter der vier Patienten litt in hohem Alter unter einer milden Dystonie: Erst in ihrem siebten Dezennium erkrankte sie an *Torticollis spasmodicus* und wurde nach geraumer Zeit bettlägerig. Weitere Patientendaten sind der Tabelle 2.1, A zu entnehmen.

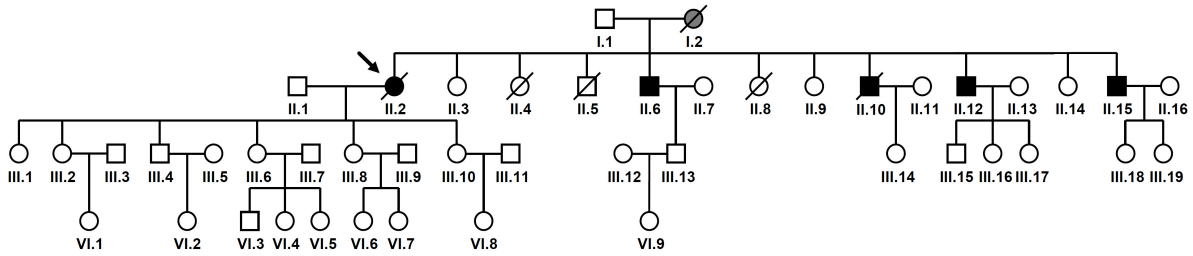


Abbildung 2.1 *Stammbaum der Familie von Patientin L-5735 (II.2).* Der Pfeil weist auf die erwähnte Patientin. Schwarze Symbole stehen für XDP Patienten, weiße Symbole markieren gesunde Individuen. Graue Symbole kennzeichnen Familienmitglieder, die eventuell erkrankt sind. Durchgestrichene Symbole stehen für verstorbene Individuen.

A	L-5735 (II.2)	L-5737 (II.6)	L-5736 (II.12)	L-5738 (II.15)
Geschlecht	Weiblich	Männlich	Männlich	Männlich
Erkrankungsalter (Jahre)	50	47	36	37
Alter bei letzter Untersuchung (Jahre)	59	52	46	41
Ursprüngliche Symptome und Krankheitsverlauf	2001: Dystonie des Beins; 2003: Dystonie des rechten Handgelenkes; 2008: unfreiwilliger Kieferschluss und Speicheln; 2009: kleine Schritte, verwaschene Sprache	2005: Zunge fiel vor, Hyperextension beider Füße und von Zehen; 2006: Dysphagie, beide Beine von Dystonie befallen; 2007: Fallneigung nach vorne	2000: schwache Stimme; 2007: dystone Spasmen, gefolgt von Tremor des linken Armes und Beins	2008: abdominale Kolik mit Atemschwierig-keiten, schwache Stimme; 2009: Dystonie der Stimmbänder, des Körperstammes/ Abdomens, beeinträchtigte Balance
Behandlung	Keine Medikation; MAB in 2010	Clonazepam (2mg) 1 Tablette bis in die; MAB in 2010	Keine Medikation; MAB in 2010	Clonazepam (2 mg) ½ Tablette ter in die; Levodopa + Carbidopa (25/250 mg) 1 Tablette ter in die, BTX-A Injektion, MAB
Erkrankungsdauer (Jahre)	9	5	10	4
Erkrankungsdauer ab Auftreten generalisierter Dystonie (Jahre)	2	1	7	1
Dauer dystoner Symptome (Jahre)	7	1	7	1

Dauer der gemischt dyston-parkinsonschen Phase (Jahre)	1	1	1	1
Erkrankungsdauer seit Einsetzen von Symptomen bis Parkinson-symptome überwiegen (Jahre)	8	2	7	1
B	L-Nummer	Geschlecht	Erkrankungsalter (Jahre)	Anfangs-symptomatik
	L-5710	Männlich	42	*Torticollis spasmodicus*
	L-5711	Männlich	35	Dorsalflexion der linken Großzehe
	L-5719	Männlich	35	Dystonie und Krämpfe des linken Beins
	L-5720	Männlich	33	Dorsalflexion des linken Fußes
	L-5722	Männlich	41	*Blepharospasmus*
	L-5727	Männlich	39	Tremor der Hand

Tabelle 2.1 *Klinische Daten der an XDP erkrankten Individuen.* MAB – Muskelafferenzblockierung, BTX-A – Botulinumtoxin A.

2.1.4 Klinische Untersuchungen

Die XDP-Patienten wurden klinisch von Ärzten der Forschungsgruppe um Prof. Dr. Raymond Rosales der Klinik für Neurologie und Psychiatrie, Universitätskrankenhaus Santo Tomas der Metropolregion Manila, Philippinen, untersucht.

2.2 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Lösungen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Material	Hersteller
Antibiotika	
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich
Geneticin	Gibco
Kanamycin (Kan)	Roth
Penicillin-Streptomycin (100 x)	PAA
Valinomycin + 10 mM Methanol	Sigma-Aldrich
Antikörper, Proteine und *Beads*	
α-β-Aktin	Sigma-Aldrich
α-Flag	Sigma-Aldrich
α-Mitofusin 1	Abcam
α-Mitofusin 2	Abnova
α-Neomycin	Millipore
α-Parkin	Cell Signalling
His *Beads*	QIAGEN
MBP *Beads*	New England Biolabs
Ubiquitin	Sigma-Aldrich
Chemikalien	
β-Mercaptoethanol, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Agarose	Biozym
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Riedel-de-Haën
Calciumchlorid-Anhydrid, 96 %	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich
EDTA (Titriplex)	Merck
Ethanol, 96 %	J.T. Baker
Ethidiumbromid	ICN Biomedicals
Glycerin-Anhydrid	Fluka
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 99 %	Sigma-Aldrich
Maltosemonohydrat	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Natriumacetat-Anhydrid	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
NP-40	USB
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich

Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (*tween*)	BIORAD
Saccharose	Fluka
Salzsäure, 32 %	Merck
TRIS Base, ≥99,9 %, p.a.	Roth
Trypton	Becton, Dickinson and Company
Enzyme	
Accutase	PAA
BamH I	New England Biolabs
CIP	New England Biolabs
Dpn I	Stratagene
EcoR I	New England Biolabs
Exo-SAP	Applied Biosystems
His Parkin	Boston Biochem
Pfu-Polymerase	Stratagene
Sal I	New England Biolabs
Taq-Polymerase	MP
UBE1	Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Westenberger
UBE2B	Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Scaglione
UBE2W	Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Scaglione
Filme und Membranen	
Fotofilm: Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare limited
Nitrozellulose Transfer Membran: Protran	Whatman
Polyacrylamidgel: NuPAGE, 4-12 %, BisTris	Invitrogen
Geräte	
Spektrometrie: SmartSpec 3000	BIORAD
Filmentwicklung: Curix 60	Agfa
Gelelektrophorese: biotech EPS301	Amersham pharmacia
Inkubation: Hera *cell* 150	Thermo scientific
Konzentrierung von Lösungen: Amicon Ultra Centrifugal Filters	Millipore
Light Cycler	Roche
Rotator: 3031	GFL
Sequenziergerät: 3130(xl) *Genetic Analyzer* *Gene* READIR 4200	 Applied Biosystems, Hitachi LI-COR
Thermocycler: MJ Mini *Personal Thermal Cycler*	 BIORAD
Ultraschallsonde: SONOPLUS	Bandelin
Transfektion: Nucleofector II	Amaxa
Western Blot: Novex Mini-Cell PowerPac Basic	 Invitrogen BIORAD
Zellzähler: Countess	Invitrogen
Zentrifuge: Biofuge pico Multifuge 1 S-R Contifuge stratos	 Heraeus Heraeus Heraeus
Kits	
BigDye Terminator v. 3.1 *Sequencing Kit*	Applied Biosystems
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gelextraktionskit	QIAGEN

QuikChange *Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit	Stratagene
SuperScript *First-Strand* Reverse Transkription Kit	Invitrogen
Lösungen	
Antioxidans, NuPAGE	Invitrogen
Chemilumineszenz-Lösung: Peroxid Luminol/*Enhancer*	Thermo scientific
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, 10 x)	PAA
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco
LB-Medium 1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCL LB-*plates* 1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl 1,5 % Bacto Agar + Amp/Kan (50 µg/ml)	
Triton-X-100	AppliChem
Zellmedium, DMEM	PAA
Desoxynukleosidtriphosphate	MP
DNA-Leiter (1kb und 100 bp)	Invitrogen
Primer	Eurofins
Proteinmessungsreagenzien A, B und S	BIORAD
Puffer	
Basic Nucleofactor Solution for Fibroblasts	Lonza
BigDye Terminator v. 3.1 5 x Sequenzpuffer	Applied Biosystems
Bovine Serum Albumin	New England Biolabs
2 x HEPES *Buffered Saline* (HBS) pH 7,05 280 mM NaCl 50 mM HEPES } 500 µl 1,5 mM Na2HPO4	
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Homogenisierungspuffer (pH 7,4; 50 ml) 12,5 mg Saccharose 500 µl 1 M Tris 100 µl 0,5 M EDTA	
Inkubationsmix (10 x) für Taq-Polymerase	MP
Ladepuffer-Glycerinfarbe 5 ml Glycerin 9,6 ml destilliertes Wasser 0,4 ml 0,5 M EDTA Bromphenolblau	
Ladepuffer für Western *Blot* für 10 µl Volumen 1,5 µl DTT 3,8 µl LDS-*Sample*-Puffer (4 x)	

Laemmli-*Sample*-Puffer	BIORAD
LDS-*Sample*-Puffer (4 x), NuPage	Invitrogen
Lyse-Puffer für Immunpräzipitation 25 mM Tris-HCl pH 7,6 150 mM NaCl 0,1 % NP-40 0,1 % SDS	
NEB-Puffer (500 ml) 10 ml 1 M TRIS pH 8,0 20 ml 5 M NaCl 1 ml 0,5 M EDTA 469 ml destilliertes Wasser	New England Biolabs
Radioimmunoprecipitation assay-Puffer (RIPA-Puffer) 10 ml Homogenisierungspuffer Phosphataseinhibitor (PhosStop) Proteaseinhibitor (cOmpleteMini)	 Roche Roche
Running-Puffer (20 x), NuPAGE Mes/MOPS	Invitrogen
Stripping-Puffer 40 g SDS (Natriumdodecylsulfat) 200 ml destilliertes Wasser	
T4-Ligase-Puffer (10 x)	New England Biolabs
Transfer-Puffer (20 x), NuPAGE	Invitrogen
TBE-Puffer (10 x) 270 g TRIS 137,5 g Borsäure Titriplex III (EDTA) 18,5 g ≥ 2,5 l destilliertes Wasser	
TBST-Puffer (1 x) 100 ml 10 x TBS 24,9 g TRIS 90 g NaCl auf 1 l, pH 8 900 ml destilliertes Wasser 1 ml *tween*	
Ubiquitinierungspuffer (10 x)	Boston Biochem
Waschpuffer für Immunpräzipitation Tris HCl 7,61 M NaCl 2 M NP-40 10 %	
Vektoren	
pcDNA3HA	Invitrogen, modifiziert
pCR2.1Topo	Invitrogen
pGEX6PI	GE Healthcare
Zellen	
BL21	Escherichia coli
DH5α	Escherichia coli
Fibroblasten	Human
HEK293	Human
SH-SY5Y	Human

Tabelle 2.2 *Materialien und Lösungen.*

2.3 Methoden

Die für den praktischen Teil dieser Arbeit angewandten Methoden werden im Folgenden näher beschrieben. Einige Methoden werden zum besseren Verständnis mittels Beispielen erläutert.

2.3.1 Reverse Transkription

Durch reverse Transkription lässt sich mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase aus menschlicher *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) synthetisieren. Hierfür nutzt die Reverse-Transkriptase die im Reaktionsansatz vorhandene mRNA als Vorlage zur Polymerisierung des cDNA-Stranges. Dazu benötigt sie Oligonukleotidprimer (oligo-*Primer*, 15 – 35 nt) und Desoxyribonukleosidtriphosphate. Die oligo-*Primer* lagern sich dem Ende der mRNA am Poly(A)-Schwanz an und dienen als Grundbaustein des neu zu bildenden Stranges. Von hier aus beginnt die Synthese der cDNA durch das Anknüpfen von zur mRNA-Sequenz komplementärer Desoxyribonukleosid-triphosphate in 5‘-3‘-Richtung durch das Enzym.
cDNA wurde zur Herstellung der Proteine Mitofusin 1 und 2 genutzt (siehe Abschnitt 2.3.4).
Das Protokoll sieht folgenden Vorgang vor:

1. Herstellung des Reaktionsmix 1 (Tabelle 2.3)

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
RNA	458,3 ng/µl	1,0 µl	458,3 ng
dNTP-Mix	10 mM	1,0 µl	1,0 mM
oligo(dT)*Primer*	0,5 µg/µl	1,0 µl	0,5 µg
destilliertes Wasser	-	7,0 µl	-
Gesamtansatz		10,0 µl	

Tabelle 2.3 *Herstellung des Reaktionsmix 1.*

2. Reaktionsmix 1 für 5 min bei 65° C inkubieren
3. Reaktionsmix 1 für mindestens 1 min auf Eis stellen
4. Herstellung des Reaktionsmix 2 (Tabelle 2.4)

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
RT-Puffer	10 x	2,0 µl	2,2 x
$MgCl_2$	25,0 mM	4,0 µl	11,1 mM
1,4-Dithiothreitol	0,10 M	2,0 µl	0,02 M
RNaseOUT	40,0 U/µl	1,0 µl	4,4 U/µl
Gesamtansatz		9,0 µl	

Tabelle 2.4 *Herstellung des Reaktionsmix 2.*

5. 9 µl von Reaktionsmix 2 zu Reaktionsmix 1 geben
6. Inkubation bei 42°C für 50 min
7. Beendigung der Reaktion bei 70°C für 15 min
8. Ansatz auf Eis (4° C) stellen
9. 1 µl RNase H hinzu pipettieren und bei 37°C für 20 min inkubieren lassen

2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren zur millionenfachen Vervielfältigung bekannter Abschnitte eines DNA-Stranges. Hierzu werden *Primer* aus Oligonukleotiden benutzt. Der Vorgang der Amplifikation des Sequenzabschnittes findet in einer PCR-Maschine (Thermocycler) statt. Er lässt sich in drei Abschnitte unterteilen:

1. Denaturierung: Zu Anfang wird die DNA durch Erwärmen des Reaktionsmix auf circa 95° C denaturiert, sodass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den zwei DNA-Strängen aufbrechen und diese letztlich einzeln vorliegen. Der erste Schritt der PCR macht somit die DNA-Sequenz den wesentlichen Agentien zur Amplifikation zugänglich.
2. Hybridisierung: Während der Hybridisierung wird die Temperatur im Thermocycler auf einen Bereich gesenkt, der der Anlagerungstemperatur der spezifischen *Primer* entspricht. Auf einen DNA-Strang bezogen hybridisieren so ein *forward*- und ein *reverse-Primer* mit diesem (*annealing*). Es schließen nun die 3‘-Enden der *Primer* den zu amplifizierenden Sequenzbereich ein. Dieser Schritt kann bei einer Temperatur zwischen 55° C und 65° C stattfinden und sollte in etwa zehn Grad Celsius geringer als die Schmelztemperatur des Primerpaars sein.
3. Elongation: Auf den Schritt der Hybridisierung folgt die Elongation. Eine spezifische thermostabile DNA-Polymerase fügt hierbei den 3‘-Enden der *Primer* Nukleotide zu. Die komplementäre DNA-Sequenz dient der Polymerase als Vorlage zur Elongation. Im Reaktionsgemisch müssen alle vier Nukleotide in ihrer Desoxyform vorliegen (dNTPs: dATP, dDTP, dCTP und dGTP). Die Temperatur zur Synthese des Stranges liegt bei etwa 72° C, ist jedoch im Wesentlichen von der Arbeitstemperatur der Polymerase abhängig. Die Dauer des Elongationsschrittes ist proportional zur Länge des zu amplifizierenden Abschnittes und kann mit einer Minute pro tausend Nukleotide bemessen werden.

Der Ablauf der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation wird in der Regel 35 Mal wiederholt. Dies führt dazu, dass eine große Menge des gewünschten DNA-Bereiches gewonnen wird.

Die PCR-Methode wurde für jedes Projekt dieser Arbeit benutzt: sowohl für die Mutationsanalyse durch Sequenzierung, der Ermittlung der Gendosis einer an XDP erkrankten Patientin (qRT-PCR, siehe Abschnitt 2.3.13) als auch zur Konstruktsynthese von Mitofusin 1.

Mitofusin 1 musste aufgrund dessen Sequenzlänge von 2226 Nukleotiden in zwei Abschnitten hergestellt werden: Der erste beträgt circa 1000 nt (im Weiteren: Teil 1), der zweite 1200 nt (im Weiteren: Teil 2). Diese Teilsequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Enzymatische Ligation der Amplifikate beider Teile führte anschließend zur Gesamtsequenz.

Als Enzym zur Elongation des Nukleotidstranges diente im Versuchsaufbau eine Pfu-Polymerase. Ihre *proofreading*-Funktion erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine fehlerfreie Produktsequenz.

Zur Amplifikation der Teilbereiche von Mitofusin 1 wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet (Tabelle 2.5):

1. Initialisierung: Denaturierung für 5 min bei 95° C
2. 35 Zyklen: 1. Denaturierung bei 95° C für 30 s
   2. Hybridisierung bei 65° C für 30 s
   3. Elongation bei 72° C für 2 min
3. Elongationsende: 72° C für 10 min
4. Endtemperatur: 4° C

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
destilliertes Wasser	-	8,4 µl	-
Pfu-Puffer	10 x	1,5 µl	1 x
dNTPs	1,0 mM	3,0 µl	0,2 mM
Primer I vorwärts*: Mfn1Fi/Mfn1EcoRI	10,0 pmol/µl	0,5 µl	$3{,}3 \times 10^{-4}$ mM
Primer II rückwärts*: Mfn1Ri/MfnBamHI	10,0 pmol/µl	0,5 µl	$3{,}3 \times 10^{-4}$ mM
Pfu-Polymerase	2,5 U/µl	0,6 µl	1,2 U
cDNA	2050,5 ng/µl	0,5 µl	1025,3 ng
Gesamtansatz		15,0 µl	

Tabelle 2.5 *PCR-Ansatz zur Amplifikation zweier Teilbereiche der Mitofusin 1-Sequenz.* (*) je Sequenzabschnitt umgibt das Primerpaar circa 1000 nt beziehungsweise 1200 nt. Mfn – Mitofusin.

2.3.3 Gelelektrophorese

Unter Gelelektrophorese versteht man die Wanderung von Molekülen in einem elektrischen Feld zur Auftrennung auf einem Trägergel. Die Geschwindigkeit (v) dieser Wanderung ist abhängig von gewissen Eigenschaften des aufzutrennenden Produkts: dessen Nettoladung (z), der elektrischen Feldstärke (E) und dem Reibungskoeffizient (f), der zwischen Medium und Molekül wirkt und von der Form des Moleküls abhängig ist. Der Zusammenhang dieser drei Komponenten stellt sich in Gleichung (1) dar:

$$(1)\ v = (E \times z) / f$$

Als Elektrophoresemedium werden Polyacrylamid- und Agarosegele bevorzugt. Für diese Träger unterscheiden sich der Aufbau und die Umstände der Auftrennung.

2.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese kann im Anschluss an eine PCR zur Überprüfung des Produkts hinsichtlich Größe und Reinheit durchgeführt werden. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Gele mit 1,5 % Agaroseanteil als Träger verwendet. Das Gel liegt in einer mit TBE-Puffer (1 x) gefüllten Plastikvorrichtung, die elektrischen Kontakt zu einem Netzteil hat. In Abhängigkeit von den spezifischen Eigenschaften des PCR-Produkts wandert dieses durch die Gelporen. Da das Gel Ethidiumbromid enthält, ein Phenanthridin-Farbstoff zur Interkalation in die DNA, lässt sich das Produkt unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (λ = 360 nm) sichtbar machen, im Vergleich mit einer DNA-Leiter in dessen Größe beschreiben und durch ein Bildbearbeitungssystem dokumentieren.

Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese beschreibt sich wie folgt:

1. 200 ml 1 x TBE mit 3 mg Agarose verrühren und aufkochen lassen
2. Während des Abkühlens 5 µl Ethidiumbromid hinzugeben
   (Stammlösung 10 mg/ml)
3. Gießen des 1,5 %-Agarosegels mit ein bis zwei Kämmen
4. Proben mit einem Volumen an Formamid-Ladepuffer, welches der Hälfte des Probenvolumens entspricht, anfärben und in Ladetaschen pipettieren
5. 4,5 µl 100 bp beziehungsweise 1 kb DNA-Leiter in eine Ladetasche pipettieren
6. Elektrophorese in 1 x TBE bei 120 V für 25 - 45 min
7. Betrachtung des Gels unter UV-Licht

2.3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In Abhängigkeit von ihrer Masse lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) auftrennen und analysieren. Diese Auftrennung wurde ausschließlich im Rahmen des *Western Blotting* (siehe Abschnitt 2.3.10) in einer hierfür vorgesehenen Vorrichtung und auf 4 - 12 % NuPAGE-Polyacrylamidgelen

(Invitrogen) durchgeführt. Zur Trennung von im Reaktionsgemisch enthaltenen Proteinen bedarf es einiger aufbereitender Schritte der aufzutragenden Proben: Da sich innerhalb eines Proteins unspezifische Disulfidbindungen zwischen Thiolresten verschiedener Cysteine bilden können, was Einfluss auf die Laufweite eines Proteins hätte, mengt man dem Reaktionsgemisch β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol bei. Diese biologischen Antioxidantien dienen der Reduktion von Disulfidbindungen und fördern die Entfaltung des Proteins, was durch thermische Denaturierung bei 95° C zusätzlich begünstigt wird. So lässt sich letztlich die Primärstruktur des nachzuweisenden Proteins durch PAGE entsprechend seines Molekulargewichtes auftrennen. Das Auftragen einer Massenleiter ermöglicht nach dem Lauf die Angabe der atomaren Masseneinheit sämtlicher separierter Proteine in Kilodalton (kDa).
Die weiteren Schritte zur Darstellung von durch PAGE getrennten Proteinen sind dem Abschnitt „Immunpräzipitation und *Western Blotting*“ (2.3.10) zu entnehmen.

2.3.4 Restriktion, Ligation, Klonierung und Transformation

Dank des Prinzips der Restriktion und Ligation war es möglich, die cDNA von Mitofusin 1 zu erhalten. Da die Synthese von Mitofusin 1-cDNA an einem Stück mittels Pfu-Polymerase fehlgeschlagen ist, wurden für die sequentielle Synthese zwei Primerpaare genutzt, die Teilsequenzen einschließen und gleichzeitig Restriktionsstellen für bestimmte Enzyme aufweisen. Somit konnten ein etwa 1000 nt und ein 1200 nt langer cDNA-Abschnitt hergestellt werden, die im Anschluss über ihre komplementären Restriktionsstellen miteinander verbunden wurden (Ligation). Die 3‘- und 5‘-Enden des gesamten Konstrukts ließen sich durch Restriktionsschnittstellen in eben diesen Bereichen der Ligation mit einem Vektor zugänglich machen (Klonierung). Dieser wurde anschließend in Bakterien transformiert.

2.3.4.1 Restriktion

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) binden an spezifische Basensequenzen der DNA und führen hier Doppelstrangbrüche ein. Der genaue Ort des Schnitts ist vom Enzym abhängig und weist in seiner Sequenz häufig ein Palindrom auf. Dieses wird durch zwei identische Polypeptiduntereinheiten der Restriktionsendonuklease erkannt.
Die Restriktionsreaktionen wurden bei 37° C für eine Stunde durchgeführt. Bei dem Restriktionsverdau von Vektoren ist zu beachten, dass nach Ablauf der Inkubationszeit dem Reaktionsgemisch eine alkalische Phosphatase (*Calf Intestine Phosphatase*, CIP) bei 37° C für eine Stunde beizumischen ist. CIP katalysiert die Hydrolyse des endständigen 5‘-Phosphats und verhindert somit, dass es eine Phosphodiesterbindung mit der

3‘-Hydoxylgruppe des anderen Endes eingeht. Protokolle der Restriktion sind in den Tabellen 2.6 - 2.8 aufgeführt.

Die Kombination verschiedener Restriktionsenzyme diente dazu, die Mitofusin 1-Abschnitte im Hinblick auf die folgende Ligation in die richtige Reihenfolge zu setzen (Teilabschnitt 2 folgt auf Teilabschnitt 1). Die vollständige cDNA-Sequenz von Mitofusin 1 konnte durch anschließendes Sequenzieren auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
Restriktionsenzym 1 (SalI)	20000 U/ml	5 µl	2298,9 U/ml
Restriktionsenzym 3 (EcoRI)	20000 U/ml	5 µl	2298,9 U/ml
Puffer NEB4	10 x	4,5 µl	~ 1 x
langes PCR-Produkt	-	28,5 µl	-
Gesamtansatz		43,5 µl	

Tabelle 2.6 *Restriktionsgemisch 1 zum Zurechtschneiden der Enden des kurzen Mitofusin 1-Abschnitts (circa 1000 nt).*

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
Restriktionsenzym 1 (SalI)	20000 U/ml	5 µl	2298,9 U/ml
Restriktionsenzym 2 (BamHI)	20000 U/ml	5 µl	2298,9 U/ml
Puffer NEB4	10 x	4,5 µl	~ 1 x
kurzes PCR-Produkt	-	28,5 µl	-
Gesamtansatz		43,5 µl	

Tabelle 2.7 *Restriktionsgemisch 2 zum Zurechtschneiden der Enden des langen Mitofusin 1-Abschnitts (circa 1200 nt).*

Substanz	Konzentration	Volumen	Menge im Ansatz
Restriktionsenzym 2 (BamHI)	20000 U/ml	5 µl	2298,9 U/ml
Restriktionsenzym 3 (EcoRI)	20000 U/ml	5 µl	2298,9 U/ml
Puffer NEB4	10 x	4,5 µl	~ 1 x
Vektoren pCR 2.1 TOPO/pcDNA3HA/ pGEX6PI*	109,6 ng/µl 79,4 ng/µl 30,7 ng/µl	28,5 µl	3123,6 ng 2262,9 ng 874,9 ng
Gesamtansatz		43,5 µl	

Tabelle 2.8 *Restriktionsgemisch 3 zum Zurechtschneiden des Vektors zur anschließenden Ligation und Klonierung.* (*) jeweiliges Plasmid in eigenem Reagenzansatz.

2.3.4.2 Ligation, Klonierung und Transformation

Ligasen sind Enzyme, die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig in einem dreigliedrigen Prozess die Bindung eines 3‘-Endes an ein 5‘-Ende zweier DNA-Stränge katalysieren:

1. Bindung von Adenosinmonophosphat (AMP) an die Ligase
2. Übertragung von AMP auf das 5‘-Phosphat der zu ligierenden Lücke mittels DNA-Ligase unter Bildung einer energiereichen Säureanhydridbindung
3. Bildung einer Phosphodiesterbindung durch Reaktion des 3‘-Hydroxylrestes mit dem Phosphat des Adenosindiphosphats unter Freisetzung von AMP

Die Ligation (protokollarisch in Tabelle 2.9 beschrieben) findet bei 16° C über Nacht statt.

Substanz	Konzentration			Volumen			Menge im Ansatz		
T4-Ligase	400000 U/ml			1 µl			40000 U/ml		
T4-Ligase-Puffer	10 x			1 µl			1 x		
Teil 1	27,1 ng/µl			3,4 µl	3,3 µl	3,2 µl	92,1 ng	89,4 ng	86,72 ng
Teil 2	20,8 ng/µl			4,3 µl	4,2 µl	4,1 µl	89,4 ng	87,4 ng	85,3 ng
Vektor*	109,8 ng/µl	79,4 ng/µl	30,7 ng/µl	0,3 µl	0,4 µl	0,7 µl	32,9 ng	31,7 ng	21,5 ng
Gesamtansatz				10 µl					

Tabelle 2.9 *Ligationsgemisch zur Verbindung der Sequenzabschnitte untereinander und mit den Vektoren pCR 2.1 TOPO, pcDNA3HA, pGEX6P1 (Klonierung).*

(*) für den Ansatz mit dem Zielvektor pCR 2.1 TOPO
für den Ansatz mit dem Zielvektor pcDNA3HA
für den Ansatz mit dem Zielvektor pGEX6P1

Die Produktsequenz (hier: Vektor und Mitofusin 1-Zielsequenz) kann nach der Ligationsreaktion mittels Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe überprüft werden. Hierdurch lässt sich einschätzen, ob die Reaktion erfolgreich ablief. Sequenzierung gibt die Gewissheit, dass das Produkt fehlerfrei in den Vektor integriert wurde (siehe Abschnitt 2.3.6)
Bakterien werden für die Produktion einer großen Menge spezifischer Plasmide benutzt. Man bedient sich dabei ihres starken Wachstums, der Klonierung und Transformation.
Unter Klonierung versteht man das Einfügen einer Zielsequenz (hier: Mitofusin 1) in einen Vektor (Plasmid). Das Produkt ist artifizielle, rekombinante DNA. Zur Herstellung dieser wurden bestimmte Restriktionsschnittstellen im Bereich des Vektors gewählt, die es zuließen, dass die „zurechtgeschnittene“ Zielsequenz nach Restriktion des Plasmids durch Ligation in das Plasmid integriert werden konnte. Eine der Sequenz auf dem Vektor vorgeschaltete *tag*-Basenfolge dient der Extraktion des Proteins nach dessen Expression durch Bakterien (siehe Abschnitt 2.3.10.1). Das Plasmid trägt ein Gen zur Vermittlung einer

gewollten Antibiotikumresistenz (Kanamycin, Ampicillin). Hierdurch besteht die Möglichkeit, Plasmid-tragende Bakterien auf einem antibiotikumhaltigen Nährboden zu selektieren und somit solche Organismen zu töten, die das Zielgen mangels Vektor nicht exprimieren.
Transformation stellt die Einschleusung von Fremd-DNA in die Zelle, eventuell sogar in das Genom eines prokaryotischen Organismus, dar. Nach einer erfolgreichen Transformation kann die in der Fremd-DNA beinhaltete Zielsequenz repliziert und, falls das Trägerplasmid den der Domäne der Wirtszelle entsprechenden Promotor besitzt, exprimiert werden. Damit die Einschleusung eines Plasmids in Bakterien gelingt, müssen sie für die Aufnahme der DNA sensibilisiert werden. Hierzu erhöht man die Calciumkonzentration des bakteriellen Milieus, was zur Bildung sogenannter chemisch-kompetenter Bakterien führt, und ändert mehrfach die Temperatur im Reaktionsansatz. Calciumkationen lagern sich durch ihre positive Ladung der negativ geladenen Zellmembran an. Dieser Vorgang führt zur Annäherung der ebenfalls negativ geladenen Vektoren an die Membran. Durch einen Hitzeschock bilden sich in der bakteriellen Zellmembran Poren, durch die die Plasmide in den Organismus eindringen.
Derart wurde das Konstrukt aus Mitofusin 1 und Vektor in den Escherichia (E.) coli-Stamm DH5α zur vielfachen Replikation integriert.
Der Klonierungsansatz wird in Tabelle 2.9 beschrieben. Zur Transformation von Bakterien des Typs DH5α wurde folgendes Protokoll benutzt:

1. Mischen von 5 µl des jeweiligen Klonierungsansatzes der drei verschiedenen Vektoren mit 100 µl DH5α-Bakterien
2. Inkubation auf Eis für 30 min
3. Inkubation bei 42° C für 45 s
4. 200 µl LB zu DH5α
5. Bakterien bei 37° C unter Bewegung für eine Stunde wachsen lassen
6. Bakterien auf einer mit Antibiotikum versetzten LB-Medium-Platte bei 37° C über Nacht in einem Inkubator wachsen lassen
7. Am Abend des Folgetages eine flüssige Kultur durch Überführung einer Kolonie in mit Antibiotikum versetzten LB-Medium
8. Am nächsten Morgen die Kultur bei 4000 upm für 10 min zentrifugieren, den Überstand verwerfen und das QIAprep Spin Miniprep Kit zur Plasmidextraktion verwenden

Aus den auf Nährmedium gewachsenen Bakterien konnte durch das QIAprep *Spin* Miniprep Kit (QIAGEN) das durch Zellteilung vervielfachte Plasmid extrahiert werden. Dieses stand fortan weiteren Anwendungen (Sequenzierung, Transfektion, Transformation für *in-vitro*-Reaktionen) zur Verfügung.

Zur Herstellung von Mitofusin 1 für *in-vitro*-Reaktionen wurde der die Mitofusin 1-Sequenz tragende Vektor entsprechend obigen Protokolls in den E. coli-Stamm BL21 transformiert. Bakterien dieses Stammes sind in der Lage, Isopropylthiogalactosid (IPTG)-abhängig die Transkription rekombinanter Sequenzen zu initiieren. Hierbei bindet IPTG als Induktor den Repressor des Operons, welches das eingeschleuste Plasmid innehat. Löst sich der Repressor von der Operatorstelle kann die RNA-Polymerase mit der DNA in Wechselwirkung treten und die Transkription der Zielsequenz beginnt. Damit die RNA-Polymerase an die DNA gelangen kann, muss beachtet werden, dass der zu transformierende Vektor einen prokaryotischen Promotor aufweist. Bakterien können IPTG nicht abbauen, was einen dauerhaften Affinitätsverlust des Repressors zur Folge hat. Somit kommt es zur ständigen Expression des auf dem Vektor kodierten Proteins.

2.3.5 Ubiquitinierungsreaktion

Es galt die Ubiquitinierung des Proteins Mitofusin 1 *in vitro* zu beweisen. Sämtliche für die Reaktion benötigten Aktionspartner wurden ebenfalls durch Klonierung, Transformation und Expression hergestellt. Zu diesen gehören: Ubiquitin, E1, E2 vom Typ W und B und Parkin (E3). Als Energiequelle dient der Reaktion Adenosintriphosphat (ATP). Die Agentien wurden bei 37°C für eine Stunde in Reaktion gebracht (Tabelle 2.10).

Agens	Volumen
10x Ubiquitinierungspuffer	10 µl
Ubiquitin	20 µl
ATP	4 µl
Parkin	10 µl
E1	5 µl
E2	10 µl
Mitofusin 1	30 µl
dH_2O	11 µl
Gesamtansatz	100 µl

Tabelle 2.10 *Ubiquitinierungsansatz.*

2.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten dient der Bestimmung der Basenabfolge eines DNA-Abschnitts. Für diese Forschungsarbeit wurde die automatisierte DNA-Sequenzierung basierend auf der Kettenabbruchmethode nach Frederick Sanger angewandt:
Zunächst hybridisiert das 3‘- respektive 5‘-Ende des zu sequenzierenden Stranges mit einem komplementären *Primer*. Eine DNA-Polymerase synthetisiert entsprechend der Vorlage (DNA) mittels aller vier Desoxyribonukleosidtriphosphate einen neuen Strang. Da im Ansatz zu gleichen Anteilen alle 2‘,3‘-Didesoxyribonukleosidtriphosphat-Analoga zusätzlich zu den üblichen Desoxyribonukleosidtriphosphaten vorkommen, brechen die sich in Synthese

befindenden Ketten statistisch gesehen bei jedem Nukleotid der Sequenz ab, da jedem der neu zugefügten Didesoxynukleotide potentiell die 3‘-Hydroxylgruppe fehlt. Die 2‘,3‘-Didesoxyribonukleosidtriphosphate sind entsprechend ihrem Desoxy-Pendant mit vier verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Nach automatischer elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente in mit Polymer (POP7) gefüllten Kapillaren wird die Sequenz durch Fluoreszenzspektroskopie entschlüsselt.
Um die in verschiedene Vektoren integrierte Zielsequenz Mitofusin 1 auf seine Richtigkeit zu überprüfen, wurde ein geeigneter Teilabschnitt des Plasmids sequenziert.
Hierfür wurde folgendes Protokoll beachtet:

1. 5 µl 50 ng/µl konzentriertes Plasmid mit 2 µl Exo-SAP versetzt
2. Inkubation: 1. 37° C für 15 min
   2. 80° C für 15 min
   3. 4° C Endtemperatur
3. Herstellung des allgemeines Sequenzansatzes (Tabelle 2.11)

Substanz	Konzentration	Volumen
Produkt	50,0 ng/µl	1,0 µl
Puffer	5x	1,5 µl
Primer	10 pmol/µl	0,5 µl
Terminator Mix v3.1	5x	1,0 µl
destilliertes Wasser	-	6,0 µl
Endvolumen		10,0 µl

Tabelle 2.11 *Allgemeiner Sequenzansatz.*

4. Inkubation: 1. 94°C für 1 min
   2. 94°C für 10 s
   3. 60°C für 5 s } x 25
   4. 60°C für 1 min
5. Natriumacetat-Fällung:
   1. Pro Sequenzansatz 10 µl Produkt, 50 µl 96 % Ethanol, 2 µl 3M Natriumacetat und 10 µl destilliertes Wasser mischen
   2. 15 min bei Raumtemperatur abgedunkelt stehen lassen
   3. Ansatz für 15 min bei 13000 upm zentrifugieren
   4. Überstand dekantieren
   5. 70 µl 70 % Ethanol hinzugeben
   6. Ansatz für 10 min bei 13000 upm zentrifugieren
   7. Überstand dekantieren und *Pellet* bei 56° C offen trocknen lassen
   8. *Pellet* über Nacht bei 4° C in 15 µl HiDi-Formamid auflösen
6. Sequenzierung in Applied Biosystems-Hitachi 3130(xl) Analyzer

Desweiteren wurde Patientenmaterial zur Mutationsanalyse des *PARK7*-, *PARL*- und *DYT3*-Gens mittels Sequenzierung untersucht.

2.3.7 *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification* (MLPA)

MLPA ist ein quantitatives PCR-Verfahren zum Nachweis genomischer Deletionen, Duplikationen und spezifischer Punktmutationen. Zur Amplifikation aller zu analysierenden *Exons* eines bestimmten Gens werden in den Reagenzansatz sämtliche den *Exons* korrespondierende *Primer* gegeben, die bei 60° C an die Sequenzen hybridisieren. Für jedes *Exon* gilt hierbei, dass der *forward*- und der *reverse*-*Primer* unmittelbar benachbart sind und ihr 3‘- beziehungsweise 5‘-Ende nebeneinander liegen. Eine Ligase ermöglicht die Verknüpfung der beiden *Primer*. Die zugeführten *Primer* besitzen an ihren Enden eine in ihrer Basenfolge stets gleiche „Universalsequenz“. Hieran kann sich jeweils ein weiterer *Primer* anlagern, somit die ligierte und hybridisierte Oligonukleotidsequenz umschließen und letztlich mittels PCR amplifizieren. Besteht nun zum Beispiel eine Deletion in einem *Exon* des zu analysierenden Gens, so bleibt die anfängliche Ligation der Oligonukleotide aus und es kann keine Amplifikation der Primersequenz stattfinden. Zur Analyse der Reaktionsprodukte vergleicht man die Fragmentlängen des PCR-Produkts mit denen der verschiedenen *Exons*. Hierfür werden die Produkte mittels Polyacrylamid-Gelektrophorese in einem Sequenziergerät (LI-COR) aufgetrennt. Dies ist möglich, da die an der Reaktion beteiligten *Primer* eine *stuffer sequence* aufweisen, die zu einer Mindestlänge von 130 – 480 bp des Amplifikationsprodukts führen. Es folgt die Bestimmung der Bandenintensität der aufgetrennten Sequenzen mittels des Computerprogramms TotalLab TL100 v2006. Als Normlänge, welche dem Programm eine Standardgröße für jedes *Exon* angibt und eine relative Quantifizierung ermöglicht, dienen die Produkte einer Kontrollprobe. Das Verhältnis der Intensitäten der Probe und Kontrolle wird für eine normale Gendosis mit 0,8 – 1,2, für eine heterozygote Exonduplikation mit 1,3 – 1,7 und für eine heterozygote Exondeletion mit 0,3 – 0,7 festgelegt und dem Programm als Referenzbereich angegeben.
Im Falle dieser Arbeit wurde zur Analyse von *PARK7* der Sondenpaar-Mix P051 der Firma MRC-Holland benutzt, der mit insgesamt circa 40 verschiedenen Sondenpaaren an die Sequenzen der in Tabelle 2.12 erwähnten Gene bindet.

Gen	P051
PARK7	1, 3, 5, 6, 7
SNCA	1, 2, 3, 4, 5, 6 und p.Ala30Pro*
PINK1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
LRRK2	p.Gly2019Ser*
Parkin	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

Tabelle 2.12 *Exons und Mutationen der von P051-Sonden bedachten Gene.* (*) Sonden spezifisch für diese Missensemutation.

MLPA-Protokoll:

1. Denaturierung von 40 - 60 ng DNA (Volumen 5 µl) für 5 min bei 98° C
2. Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 25° C
3. Nach frühestens 5 min Zugabe von 1,5 µl Mix 1:
   - SALSA probe-mix 0,75 µl
   - MLPA-Puffer 0,75 µl
4. Inkubation für 1 min bei 95° C, dann Inkubation für 16 Stunden bei 60° C
5. Nach Abkühlen auf 54° C Zugabe von 16 µl Mix 2:
   - Ligase-Puffer A 1,5 µl
   - Ligase-Puffer B 1,5 µl
   - dH_2O 12,5 µl
   - Ligase-65 0,5 µl
6. Ligation für 15 min bei 54° C, dann bei 98° C für 5 min
7. Nach Abkühlen auf 4° C Zugabe von 5 µl des Produkts in 15 µl des Mix 3:
   - 10x SALSA PCR-Puffer 2 µl
   - dH_2O 13 µl
8. Bei 60° C Zugabe von 5 µl Mix 4:
   - SALSA-*Primer*s 1 µl
   - SALSA-Enzympuffer 1 µl
   - SALSA-Polymerase 0,25 µl
   - dH_2O 2,75 µl
9. PCR-Reaktion:
   1. 5 min bei 95° C
   2. 33 Zyklen: a) 30 s bei 95° C
      b) 30 s bei 60° C
      c) 1 min bei 72° C
   3. 20 min bei 72° C
   4. 4° C Endtemperatur

Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Protokoll:

1. Gießen des Gels (25 cm x 22,5 cm x 0,25 mm)
2. Einsetzen des Gels in das LI-COR IR2 System
3. 15 minütiger Vorlauf des Gels
4. 5 min lang die Proben bei 95° C denaturieren und anschließend in ein Kühlaggregat stellen
5. 0,7 µl Produkt + 500 % Formamidfarbstoff in Gel laden
6. Elektrophorese bei 45° C und 25 W für 3 Stunden in 1x TBE-Laufpuffer

2.3.8 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Für die Versuchsreihen dieser Arbeit wurden als Zielorganismus humane Fibroblasten benutzt. Die Zelldichte einer 10 ml Petrischale muss weniger als 70 Prozent betragen, damit die Transfektion mit anschließendem Zellwachstum den größtmöglichen Erfolg hat. Um einen Vektor in Fibroblasten einzuschleusen, wird ihre Membran durch Elektroporation kurzzeitig durchlässig gemacht.

Trägt der eingeführte Vektor einen eukaryotischen Promotor vor der zu transkribierenden Sequenz, ist die Zelle in der Lage das gewollte Protein zu exprimieren.

Sobald das Plasmid in die Wirts-DNA aufgenommen wurde, spricht man von „stabiler Transfektion“.

Die Transfektion humaner Fibroblasten folgt folgendem Protokoll:

1. Nährmedium absaugen, Zellen mit PBS waschen und 10 min bei 37° C mit Accutase inkubieren
2. Die gelösten Zellen in 10 ml DMEM mit 10 % FBS- und 1 % Penicillin-Streptomycin-Zusatz suspendieren und die Zellzahl/ml bestimmen
3. 1 Millionen Zellen pro Transfektion in 15 ml Gefäß geben
4. Bei 1000 upm für 5 min zentrifugieren
5. Überstehendes Medium absaugen
6. 5 µg zu transfizierendes Plasmid mit 100 µl *Basic Nucleofactor Solution for Fibroblasts* mischen und Zellpellet mit dieser Mischung resuspendieren
7. Zellsuspension in Amaxa-Küvette pipettieren und Zellen elektroporieren (Programm U - 024)
8. Mit kleiner Pasteurpipette Küvetteninhalt gleichmäßig in zwei von sechs *wells* einer sechs-*well*-Schale tropfenweise verteilen
9. Nach 6 Stunden Medium durch frisches DMEM mit 10 % FBS- und 1 % Penicillin-Streptomycin-Zusatz austauschen

Humane Zellen benötigen circa vier Stunden um das Plasmid aufzunehmen. Nach 48 Stunden ist der Höhepunkt der Proteinexpression erreicht. Doch lassen sich die Zellen schon nach 24 Stunden für weitere Untersuchungen, die sich mit den von ihnen synthetisierten Proteinen befassen, chemisch behandeln.
Transfektionen wurden für sämtliche Proteinstudien durchgeführt, die sich mit der Erschließung der Ubiquitinierungsstelle von Mitofusin auseinandersetzen.

2.3.9 Chemische Behandlung und Ernten von HEK293-Zellen, Fibroblasten und SH-SY5Y-Zellen; Messung der Proteinkonzentration

Valinomycin ist ein Makrolidantibiotikum, welches als Kalium-Ionophor zur Entkopplung des mitochondrialen elektrochemischen Membranpotentials benutzt wird. Dieser Vorgang wird mit der Ubiquitinierung mitochondrialer Proteine assoziiert. Die Behandlung von HEK293-Zellen, humaner Fibroblasten und SH-SY5Y-Zellen mit Valinomycin dient daher der Untersuchung einer möglichen Ubiquitinierung bestimmter Proteine (Mitofusin, Parkin) unter dieser Stresssituation.
Die chemische Behandlung von HEK293-Zellen mit Valinomycin folgt folgendem Schema:

1. 1 ml DMEM mit Penicillin-Streptomycin-Zusatz mit 1,1 µl Valinomycin vermischen (1 µM)
2. Tropfenweise den Ansatz zu den in einer 10 ml Petrischale ausplattieren HEK293-Zellen geben
3. Zellen über Nacht bei 37° C inkubieren (circa 12 Stunden)

Die chemische Behandlung humaner Fibroblasten und SH-SY5Y-Zellen mit Valinomycin gelingt nach folgendem Schema:

1. Nährmedium absaugen
2. Zellen mit 2 ml 1 µM Valinomycin in DMEM mit 10 % FBS- und 1 % Penicillin-Streptomycin-Zusatz behandeln

Nach Ablauf der Inkubationszeit können die Zellen geerntet werden:

1. a) Für HEK293-Zellen: Medium der Petrischale durch DMEM mit Penicillin-Streptomycin-Zusatz ersetzen (z. B. 4,5 ml), Zellen abschaben und 1,5 ml Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
   b) Für humane Fibroblasten und SH-SY5Y-Zellen: 1 ml Medium eines 2 ml-*wells* verwerfen, Zellen abschaben und 1 ml Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
2. Für 5 min bei 8000 upm zentrifugieren
3. Überstand absaugen

4. Für 30 s bei 8000 upm zentrifugieren
5. Überstand absaugen
6. Zellpellet auf Trockeneis legen und bei - 80° C für mindestens 15 min lagern

Messung der Proteinkonzentration:

1. *Pellet* entsprechend Pelletgröße in RIPA-Puffer auflösen (Erfahrungswert, zwischen 25 – 300 µl)
7. 30 min warten, währenddessen zwei Mal die Zellwände durch häufiges (40 Mal) Pipettieren zerstören
8. Bei 13000 upm und 4°C für 20 min zentrifugieren
9. Überstand entnehmen und Messung der Proteinkonzentration:
    1. 3 µl der Probe mit einer Mischung aus 0,5 µl des Reagenz „S“ und 25 µl des Reagenz „A“ versetzen
    2. 200 µl des Reagenz „B“ hinzu pipettieren
    3. 30 min im Dunkeln stehen lassen
    4. Proteinmessung (Programm: Gen5 v. 1.05)

Nun können die Zellproteine durch *Western Blotting* analysiert werden. Dies wird im Folgenden näher erläutert.

2.3.10 Immunpräzipitation und *Western Blotting* (*Immunoblot*)

Durch Immunpräzipitation kann ein Protein mittels *Beads* (dt.: Perlen), welche einen gegen dieses Protein gerichteten Antikörper tragen, aus einem Zelllysat oder einer Suspension extrahiert und somit weiteren Untersuchungen zugeführt werden.
Western Blotting dient in dieser Arbeit dem Nachweis der Ubiquitinierung verschiedener Proteine (Mitofusin, Parkin), die an der Pathogenese eines hereditären Parkinson-Syndroms beteiligt sind. Der Methode liegt das Prinzip der Elektrophorese (siehe Abschnitt 2.3.3.2) zugrunde. Um die zu untersuchenden Proteine betrachten zu können, müssen sie zuvor aus den Zellen freigesetzt werden. Die Proteinsynthese für *in-vitro*-Versuche wurde durch den Escherichia coli-Stamm BL21 durchgeführt.

2.3.10.1 Proteinextraktion für *in-vitro*-Versuche

Die Extraktion von Parkin, welches einen Maltosebindungsprotein (MBP)-*tag* aufweist, aus transformierten Bakterien erfolgt gemäß folgendem Protokoll:

1. Eine Kolonie eines mit MBP-Parkin transformierten E.coli-Stamms (BL21) über Nacht in 10 ml LB, welches mit Ampicillin (50 µg/ml) versetzt wurde, wachsen lassen

2. In einer 2000 ml Flasche 500 ml der Flüssigkultur bei 37° C und 190 upm rotieren lassen, bis eine optische Dichte von 600 erreicht wird (circa 2 Stunden)
3. Proteinexpression durch IPTG (Endkonzentration 0,04 mM) induzieren und bei 25° C und 190 upm für 3 - 4 Stunden einwirken lassen
4. Flascheninhalt bei 4700 upm für 20 min bei 4° C zentrifugieren und Überstand verwerfen
5. *Pellet* in 15 ml NEB-Puffer + Proteaseinhibitoren (Aprotinin, Leupeptin, PMSF) resuspendieren
6. Für eine Minute Zellwände der Bakterien mittels Ultraschall zerstören
7. 150 – 200 µl Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) hinzufügen
8. Für 30 min bei 4° C und 200 upm inkubieren
9. Für 10 min bei 15000 g zentrifugieren, Überstand entnehmen
10. Dem Überstand Glycerol hinzugeben (Endkonzentration 10 %)
11. 300 – 500 µl der *Beads* zur Immunpräzipitation drei Mal mit 800 µl NEB-Puffer waschen
11. *Beads* zu Überstand geben und Suspension über Nacht bei 4° C rotieren lassen
12. *Beads* für 2 - 4 min bei 2000 upm zentrifugieren und das *Pellet* drei Mal mit NEB und Proteaseinhibitoren waschen
13. Überstand dekantieren
14. *Beads* in NEB-Puffer + 5 % Maltose (300 – 500 µl, Verhältnis 1:1) bei 4° C für zwei Stunden rotieren lassen
15. Lösung anzentrifugieren und Überstand entnehmen

Der Überstand enthält das zu extrahierende Protein und kann für Reaktionen als auch zur Analyse genutzt werden.
Die Extraktion von mit einem His-*tag* versehenen Mitofusin 1 aus transformierten Bakterien erfolgt gemäß nachstehendem Protokoll:

1.-4. Entsprechend der Extraktion eines Proteins, das mit einem MBP-*tag* markiert wurde
5. *Pellet* in 25 ml des Puffers A mit 25 µl der jeweiligen Proteaseinhibitoren (Apr, Leu, PMSF) und 5 µl DTT lösen
6. 30 s mittels Ultraschall die Zellwände der Bakterien auflösen
7. Für 15 min bei 12000 upm und 4° C zentrifugieren
8. 500 µl *Beads* drei Mal mit 1 ml des Puffers A waschen
9. Überstand des Zelllystats und *Beads* in 50 ml Flasche geben
10. Flasche 90 min lang bei 4° C rotieren lassen
11. Suspension 4 min lang bei 2000 upm und 4° C zentrifugieren und Überstand

dekantieren

12. *Beads* in einem Eppendorfgefäß jeweils drei Mal mit Puffer A + DTT, Puffer A + DTT und Puffer C + DTT waschen
13. Elution des Proteins in Puffer C + 15x Imidazol (Verhältnis *Beads* : Puffer = 1:1), drei Mal 5 min
14. Zweimaliges Anzentrifugieren der Lösung und Abtragen des Überstandes
15. 50 µl Glycerol zu 800 µl Proteinlösung geben

Der Überstand enthält das zu extrahierende Protein und kann für Reaktionen als auch zur Analyse genutzt werden.

2.3.10.2 *Western Blotting* (*Immunoblot*)

Die spezifische Auftrennung der im Zellinhalt beziehungsweise im Reaktionsgemisch enthaltenen Proteine erfolgt durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, siehe Abschnitt 2.3.3.2).

Nach der Elektrophorese werden sämtliche auf dem Gel vorhandene Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hier kann das nachzuweisende Enzym über einen primären Antikörper markiert werden. Die Membran wird nach diesem Vorgang mehrmals gewaschen. Nun wird der Nitrozellulosemembran ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der an den primären Antikörper bindet. Sekundäre Antikörper verfügen in der Regel über ein Enzym (Meerrettichperoxidase) zur chemischen Umsetzung eines fluoreszierenden Farbstoffes, welcher der Darstellung des Proteins auf einem lichtempfindlichen Film dient. Nach mehreren Waschvorgängen wird die Membran nach der Beschickung mit Antikörpern mit einem Reagenzgemisch (Chemilumineszenz-lösung, Thermo scientific) benetzt, welches den Farbstoff und Wasserstoffperoxid enthält. Die Peroxidase des sekundären Antikörpers setzt den Farbstoff um, wodurch dieser zu fluoreszieren beginnt (2).

(2) Substrat + H_2O_2 → fluoreszierender Farbstoff + H_2O

Die Lichtreaktion kann in einer Dunkelkammer auf einem Fotofilm aufgefangen und dieser daraufhin entwickelt werden.

Im Falle der Darstellung von Proteinen der *in-vitro*-Reaktionen gehen der Elektrophorese folgende Schritte voran:

1. 3,33 µl 4x β-Mercaptoethanol in 10 µl Reaktionsgemisch
2. Denaturierung für 4 min bei 95° C

Die Arbeit mit Zellpellets beziehungsweise mitochondrialen *Pellet*s (siehe Abschnitt 2.3.11) verlangt deren Aufarbeitung vor der Elektrophorese:

1. *Pellet* je nach Größe in RIPA-Puffer lösen (25 - 300 µl, eventuell Verdünnung der Lösung nach Messung der Proteinkonzentration notwendig)
2. 40 Mal durch Pipettieren mischen, 15 min warten und wieder 40 Mal mischen, ein letztes Mal die Lösung für 15 min auf Eis stehen lassen
3. Bei 4° C und mit 13000 upm für 20 min zentrifugieren
4. Messung der Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.3.9)
5. 10 µg Produkt mit 1,5 µl DTT und 3,8 µl Ladepuffer vermengen, bis 10 µl mit RIPA-Puffer auffüllen
6. Für 4 min bei 95° C denaturieren
7. Elektrophorese des gesamten Probenansatzes auf 4 - 12 % Polyacrylamid Gel (Invitrogen, NuPAGE) für 5 min bei 100 V, dann in Abhängigkeit von Protein bei 130 V
4. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (70 min bei 32 V)
5. Primäre Antikörperreaktion: z. B. 1 µl α-Mitofusin-Antikörper in 20 ml Milch (Verdünnung 1:10000) für eine Stunde
6. Waschen der Membran: drei Mal 10 min mit TBST-Puffer (1x)
7. Sekundäre Antikörperreaktion: 1 µl sekundären Antikörper in 20 ml Milch (z. B. Verdünnung 1:10000) für 45 min
8. Waschen der Membran: drei Mal 10 min mit TBST-Puffer (1x)
9. Sämtliche Lösung von der Membran entfernen und Chemilumineszenz-gemisch hinzugeben: 3 ml Peroxid + 3 ml Luminol
    a) 4 min unter Schwenken einwirken lassen
    b) Membran entnehmen und trocknen
10. Film in Dunkelkammer entwickeln: Expositionszeit 4 min, 2 min, 45 s und 10 s

2.3.11 Mitochondriale Fraktionierung, Immunpräzipitation von Mitofusin 2 und Färbung mit *Colloidal Blue*

Mitofusin 1 und 2 sind mitochondriale Proteine. Parkin ist ein Akteur im Rahmen der Ubiquitinierung, welcher ebenfalls einen Teil seiner Funktion in den Mitochondrien ausübt. Es ist daher je nach Fragestellung sinnvoll, ausschließlich die mitochondriale Fraktion einer Zelle zu untersuchen. Schließt man die cytosolische Fraktion von der Analyse aus, ergibt sich eine höhere Konzentration mitochondrialer Proteine, sodass zum Beispiel mögliche Ubiquitinierungsbanden von Mitofusin oder Parkin nach Immunpräzipitation dieser Enzyme besser auf einem *Western Blot* sichtbar gemacht werden können. Schließlich wird nur ein geringer Anteil der Proteine überhaupt ubiquitiniert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels Massenspektrometrie die Ubiquitinierungsposition von Mitofusin herausgefunden werden. Hierfür war es nötig, das Protein nach Elektrophorese auf einem Gel mittels *Colloidal Blue* sichtbar zu machen.

2.3.11.1 Fraktionierung eines SH-SY5Y-Lysats in mitochondrialen und cytosolischen Anteil

1. Zellen einer mehr als 70 % konfluenten 15 cm Zellschale in 10 ml DMEM ernten und in ein 15 ml Gefäß überführen
2. Bei 1000 upm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugieren
3. Überstand absaugen
4. *Pellet* mit 2 ml PBS reinigen und bei 1000 upm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugieren
5. Überstand absaugen
6. Gefäß mit *Pellet* für mindestens 15 min auf Trockeneis legen (ab diesem Schritt erfolgt jeder weitere bei 4° C)
7. *Pellet* in 3 ml Homogenisierungspuffer auflösen und Zellen maschinell durch Rotation und Druck zerstören (1000 upm, 50 Schläge)
8. Zelllösung in ein 15 ml Gefäß überführen
9. Für 10 min bei 1500 g und 4° C zentrifugieren
10. Überstand in ein neues 15 ml Gefäß überführen
11. Für 10 min bei 1500 g und 4° C zentrifugieren
12. Überstand in zwei 2 ml Gefäße überführen
13. Für 10 min bei 12000 upm und 4° C zentrifugieren
14. Überstand in neues Gefäß (entspricht cytosolischem Anteil) geben, bei – 80° C einfrieren
15. *Pellet* (mitochondrialer Anteil) in 500 µl Homogenisierungspuffer auflösen
16. Mitochondriale Fraktion für 10 min bei 12000 upm und 4° C zentrifugieren
17. Überstand dekantieren
18. Mitochondriales *Pellet* in 50 - 100 µl RIPA-Puffer (je nach Pelletgröße) durch mehrfaches Pipettieren auflösen
19. Für 20 min bei 13000 upm zentrifugieren und *Pellet* auf – 80° C kühlen

Von zehn 15 cm Schalen mit SH-SY5Y-Zellen wurden auf diese Weise die mitochondriale Fraktion extrahiert. Im Anschluss ließ sich eine Immunpräzipitation von Mitofusin 2 durchführen.

2.3.11.2 Immunpräzipitation von Mitofusin 2

Um Mitofusin 2 aus der mitochondrialen Fraktion zu extrahieren und somit eine noch höhere Konzentration des Proteins zu erlangen, bedient man sich der Immunpräzipitation.

1. Mitochondriales *Pellet* mittels 1 ml Lyse-Puffer, Phosphatase und Protease-inhibitoren (PhosStop und cOmpleteMini, je eine Tablette pro 10 ml Puffer) auflösen
2. Lösung für 30 min bei 4° C rotieren lassen
3. 150 µl Agarose-*Beads* (entspricht 300 µl *Beads*-Ethanol-Lösung) für eine Minute bei 4 ° C und 10000 upm zentrifugieren und Überstand verwerfen
4. *Beads* drei Mal mit 500 µl Waschpuffer vermengen und kurz anzentrifugieren, Überstand verwerfen und somit die *Beads* allmählich reinigen
5. Lösung der mitochondrialen Fraktion mit gewaschenen *Beads* vermengen, Suspension für zwei Stunden bei 4° C rotieren lassen und somit unspezifische Bindungspartner der *Beads* aus Lösung entnehmen
6. Suspension für eine Minute bei 10000 upm zentrifugieren und Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß geben
7. 5 µl α-Mitofusin 2-Antikörper zu Überstand geben und über Nacht rotieren lassen
8. 150 µl *Beads* waschen (siehe Schritt 4)
9. *Beads* mit Antikörper-Proteinlösung vermengen und 4 Stunden bei 4° C rotieren lassen
10. Für eine Minute bei 10000 upm zentrifugieren
11. Für 10 min bei 4° C in 1 ml Waschpuffer rotieren lassen } x 3
12. Für eine Minute bei 10000 upm zentrifugieren
13. Protease- und Phosphataseinhibitoren in 150 µl RIPA-Puffer zu *Beads* geben und für 5 min bei 95° C auf Rüttler (250 upm) kochen lassen
14. Kurz anzentrifugieren und Überstand auf 50 µl durch Zentrifugation bei 11000 upm mittels Amicon-Filtern konzentrieren
15. Elektrophorese (siehe Abschnitt 2.3.10.2)

2.3.11.3 Färbung mit *Colloidal Blue*

Um (ubiquitiniertes) Mitofusin 2 sichtbar zu machen, bedarf es der Einfärbung des Gels mittels *Colloidal Blue*.

1. Gel in Fixierungslösung für 10 min bei Raumtemperatur rotieren lassen
2. Fixierungslösung verwerfen und Färbungslösung (ohne Färber B) hinzugeben.
3. 10 min bei Raumtemperatur rotieren lassen
4. 5 ml Färber B hinzugeben, Gel bei Raumtemperatur für 3 - 12 Stunden rotieren lassen
5. Färbungslösung dekantieren und Gel in 15 ml destillierten Wasser bis zu

sieben Stunden rotieren lassen. Wasser regelmäßig wechseln

Nach Färbung der Banden lassen sie sich durch ein sauberes Skalpell herausschneiden und massenspektrometrisch untersuchen.

2.3.12 *In-vitro*-Mutagenese

Mutationen lassen sich artifiziell in Sequenzen einfügen. Dies ermöglicht die Erforschung ihrer Wirkung auf Proteinebene.

Ein Plasmid, das die zu mutierende DNA-Sequenz trägt, hybridisiert bei der *in-vitro*-Mutagenese mit konstruierten Primern, welche die gewünschte Mutation in Form einer Zielsequenz tragen. In einer Amplifikations- und Ligationsreaktion entsteht ein Produkt, dessen Sequenz dem Plasmid entspricht, sich doch ausschließlich im Bereich der mutagenen *Primer* von der ursprünglichen Basenfolge unterscheidet. Anschließend verdaut das Enzym DpnI die methylierte Plasmid-DNA, sodass nur die zirkuläre, einzelsträngige DNA, welche die Mutation trägt, im Reaktionsansatz verbleibt. Um größere Mengen der mutierten Sequenz zu erhalten und sie in einen Doppelstrang zu überführen, wird das Produkt in Bakterien transformiert.

Protokoll:

1. Herstellung des allgemeinen Reaktionsansatzes (Tabelle 2.13)

Substanz	Konzentration	Volumen
10x Reaktionspuffer	10x	5 µl
dsDNA	10-100 ng	X µl
Primer I vorwärts	125 ng	X µl
Primer II rückwärts	125 ng	X µl
dNTP-Mix	-	1 µl
QuikSolution Reagenz	-	1,5 µl
dH_2O	-	auf 50 µl Gesamtvolumen

Tabelle 2.13 *Allgemeiner Reaktionsansatz einer in-vitro-Mutagenese.*

2. 1 µl QuikChange *Lightning Enzyme* hinzugeben
3. Inkubation:
    1. 1 Zyklus für 1 min bei 95° C
    2. 19 Zyklen: a) 30 s bei 95° C
        b) 1 min bei 55° C
        c) 30 s/kb Plasmid
    3. 1 Zyklus für 18 min bei 68° C
4. Abkühlen auf 4° C
5. DpnI-Verdau des amplifizierten Produkts

1. 2 µl des Enzyms DpnI zur Amplifikationsreaktion hinzugeben
2. Inkubation bei 37° C für 60 min

6. Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der Amplifikation und des Produkts

Mutagenese wurde in dieser Arbeit angewandt, um durch Veränderung der vermuteten Ubiquitinierungsstelle von Mitofusin 2 die posttranslationale Modifikation zu beweisen.

2.3.13 *Real time* quantitative PCR

Ziel der *real time* quantitative PCR (qRT-PCR) ist die Erkennung von Gendosis-veränderungen (Deletionen und Duplikationen) eines oder mehrerer *Exons*. Die auf der PCR basierende Methode vereint das Prinzip der Amplifikation einer zu untersuchenden Zielsequenz und der Quantifizierung dieser. Im Verlauf der PCR wird durch die simultane Messung von Fluoreszenzsignalen ein Vergleich zwischen einem nicht-pathologischem Kontrollgen und einem Zielgen angestellt, indem während der log-Phase, also der Phase der linearen Amplifikation der DNA, die von den verschiedenen Sequenzen ausgehenden Signale ins Verhältnis gesetzt werden. Nimmt dieses einen Wert von 0,5 an, so lässt das auf eine heterozygote Deletion innerhalb der zu untersuchenden Sequenz schließen (Hälfte der Gendosis bei Messung vorhanden). Der Quotient von 1,5 entspricht einer heterozygoten Duplikation (doppelte Gendosis). Der Wert 1 stellt einen Normalbefund dar.
Für den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Light Cycler* werden besondere Sonden zur Aussendung von Fluroeszenzsignalen verwendet, die auf dem Prinzip der *FRET* (*Fluorescence resonance energy transfer*) basieren. Hierbei kann ein Donor-Fluorochrom durch Licht aktiviert werden, was die Anregung eines sich in der Nähe befindenden Akzeptor-Fluorochroms zur Folge hat. Die Besonderheit des *Light Cyclers* besteht nun darin, dass beide Fluorochrome in Form von Oligonukleotiden nebeneinander an die Zielsequenz binden. Somit sind die *FRET-Sonden* nah genug beieinander um ein ausreichend starkes Signal zur Detektion zu produzieren.
qRT-PCR für die Analyse einer Patientin mit XDP wurde durch Karen Freimann, M.Sc., Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck, durchgeführt.

2.3.14 *Array comparative genomic hybridization*

Um numerische Abweichungen (Amplifikationen und Deletionen) zu detektieren vergleicht die *array comparative genomic hybridization* (aCGH) die Intensität der Fluoreszenzsignale zweier DNA-Proben. Das Prinzip besteht bei dieser Methode darin, dass die Hybridisierung von fluoreszierenden Sonden mit der Anzahl der gebundenen Sondenfragmenten übereinstimmt. Für die *array* Variante der CGH ist charakteristisch, dass die zu bindenden DNA-Fragmente in einem Koordinatensystem auf einer Oberfläche (z. B. Glas) vorliegen.

Wird die zu untersuchende DNA vor der vergleichenden Messung des Fluoreszenzsignals mit einem bestimmten Farbstoff markiert, die Referenz-DNA jedoch mit einem andersfarbigen versehen, so lassen sich durch Computerprogramme, die das Lichtmuster analysieren, Aussagen über die jeweilige Gendosis treffen. aCGH wird vor allem im Bereich der Diagnostik von Syndromen angewandt.
Die Untersuchung der syndromalen Erkrankung einer XDP-Patientin durch aCGH konnte in Kollaboration mit Prof. Dr. Reiner Siebert und Dr. Inga Nagel des Instituts für Humangenetik der Christian Albrecht Universität zu Kiel durchgeführt werden.

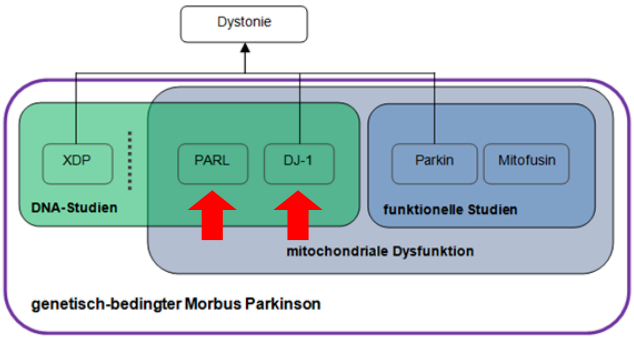
2.3.15 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie zählt zu den analytischen Verfahren, die der Messung der Masse von Atomen und Molekülen dient. Hierbei wird die zu untersuchende Substanz zuerst in Gasphase gebracht, worauf die Überführung in einen ionisierten Zustand folgt. Ein auf die Substanz einwirkendes elektrisches Feld lenkt diese entsprechend ihrer Masse und der physikalischen Reaktion auf das Feld ab, was zu einer für das Molekül oder Atom charakteristischen Aufteilung auf einem Analysator führt. Somit können unbekannte Substanzen identifiziert werden.
Massenspektrometrische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit von der *Taplin Biological Mass Spectrometry Facility* der Harvard University, Boston zur Analyse von Ubiquitinierungsreaktionen durchgeführt.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte. Der erste befasst sich mit der Wahrscheinlichkeit einer Morbus Parkinson-bedingenden Mutation im *presenilin-associated rhomboid-like* (*PARL*)-Gen und der Auswertung einer Mutationsanalyse von *PARK7* (3.1). Abschnitt 3.2 beschäftigt sich mit der genetischen Ursache der Erkrankung eines Patientenkollektivs an *X-linked dystonia-parkinsonism* (XDP, DYT3). Hierauf folgen die Ergebnisse der funktionellen Studien zu Mitofusin und Parkin (3.3).

3.1 Die Mutation p.Ser77Asn des PARL-Proteins als seltene Ursache von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn und Mutationsanalyse des *PARK7*-Gens



Um der Fragestellung nachzugehen, ob die Mutation p.Ser77Asn des PARL-Proteins häufig mit einem monogenetischen Parkinson-Syndrom assoziiert ist, wurden die funktionellen *Exons* 2, 8 und 9 des *PARL*-Gens von 92 Individuen, die früh am Morbus Parkinson erkrankten, sequenziert. Ferner sollten die DNA-Abschnitte durch die Sequenzierung auf bisher unbekannte Mutationen untersucht werden.
Nach Auswertung der Sequenzen ließen sich keinerlei Mutationen in den erwähnten DNA-Bereichen finden. Somit konnten keine möglicherweise krankheitsfördernden Veränderungen in den betrachteten *PARL*-Abschnitten nachgewiesen werden.

Veränderungen des *PARK7*-Gens führen potentiell zur Erkrankung an früh beginnendem Morbus Parkinson. Daher wurden von 68 Patienten die *Exons* 2 bis 7 von *PARK7* sequenziert. Sie kodieren für DJ-1. Zudem wurden die *Exons* 1, 3, 5 und 7 mittels MLPA auf Veränderungen der Gendosis untersucht.
In der Probe L-4471 ließ sich mittels konventioneller Sequenzierung die heterozygote Mutation c.235G>A (p.Ala79Thr) im *Exon* 4 ermitteln (Abbildung 3.1). Weitere Mutationen konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

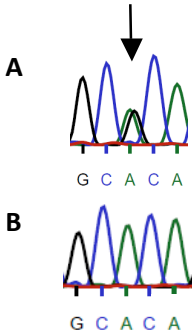


Abbildung 3.1 *Mutation c.235G>A (p.Ala79Thr) im Exon 4 des DJ-1-Gens von L-4471 (A) im Vergleich zur Wildtypsequenz (B).* Der Pfeil weist auf die Mutation hin. Grün: Adenin (A); Blau: Cytosin (C); Schwarz: Guanin (G).

Mittels MLPA konnten keine Deletionen oder Duplikationen in den *Exons* 1, 3, 5 und 7 beschrieben werden (Abbildung 3.2).

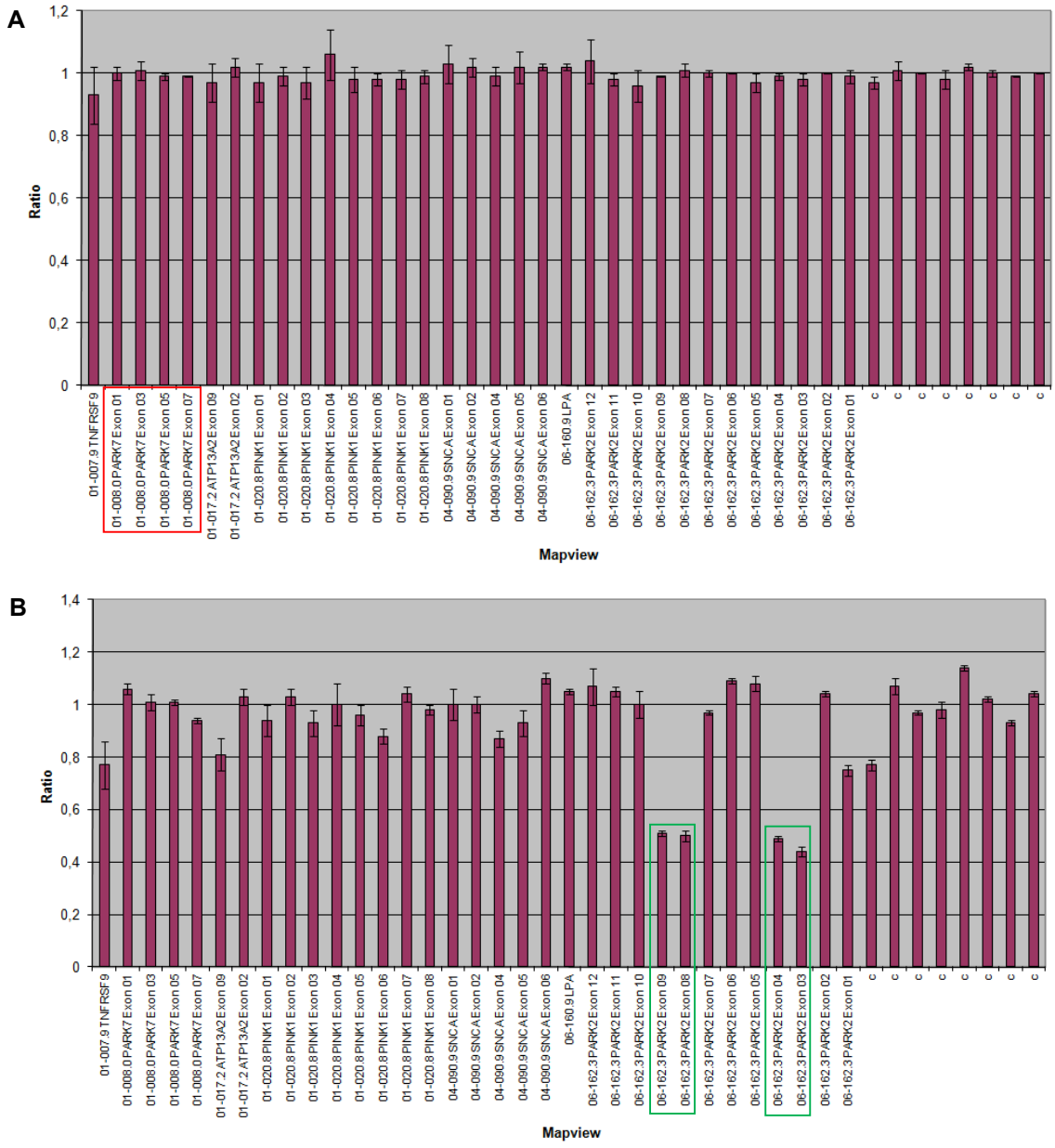
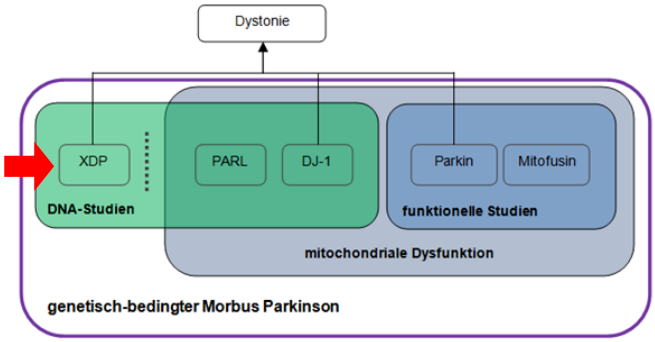


Abbildung 3.2 *MLPA-Ergebnisse der Probe L-4279 (A) und der Probe L-2538 (B).* (**A**) Rot markiert sind die auf Deletionen untersuchten *Exons* der Probe (1, 3, 5 und 7). Desweiteren sind in dem

MLPA-Lauf ebenfalls untersuchte, für diese Arbeit nicht relevante Gene sowie Kontrollen aufgelistet. Bei Betrachtung des Balkendiagrammes fällt auf, dass, im Vergleich zu den Kontrollen, bei keinen Proben Deletionen zu vermuten sind. Das Diagramm ist beispielhaft für sämtliche MLPA-Untersuchungen des *PARK7*-Gens. (**B**) Illustrierend stellt das Diagramm der Probe L-2538 eine Deletion in den *Exon*s 4, 5, 8 und 9 des *PARK2*-Gens dar. Sie gehen mit einer Abnahme des Balkenausschlages einher (grün markiert).

3.2 Ätiopathologie einer an *X-linked dystonia-parkinsonism (XDP; DYT3)* erkrankten Patientenkohorte

Dieser Abschnitt der vorliegenden Arbeit befasst sich mit den genetischen Hintergründen der Erkrankung einer Patientenkohorte an XDP.



3.2.1 Ergebnisse genetischer Untersuchungen

3.2.1.1 Patientenkohorte

Durch bidirektionale Sequenzierung im Bereich des *TAF1-Exons* d4 konnte die *disease-specific single-nucleotide change 3* (DSC3) Transition C>T in 43 von 44 Proben klinisch unter Krankheitsverdacht stehender Individuen nachgewiesen werden. Bei einem Mann ließ sich DSC3 nicht finden. Vier Frauen trugen die Transition, wobei alle heterozygote Trägerinnen waren (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Unter den klinisch gesunden, nicht DSC3-tragenden Individuen waren fünf Männer und zwei Frauen. Die Familienverhältnisse erkrankter Patienten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

L-Nummer	Geschlecht	C>T Transition	Familienverhältnis
L-5728	m	+, hemizygot	Vater von L-5732
L-5732	w	+, heterozygot	Tochter von L-5728
L-5731	m	+, hemizygot	Bruder von L-5733
L-5733	w	+, heterozygot	Schwester von L-5731
L-5734	m	-, Wildtyp	Neffe von L-5731, Sohn von L-5733

L-5744 L-5743	w m	+, heterozygot -, Wildtyp	Mutter von L-5743 Sohn von L-5744
L-5746 L-5756	m m	+, hemizygot -, Wildtyp	Bruder von L-5756 Bruder von L-5746
L-5747 L-5752 L-5753 L-5754	m m w m	+, hemizygot +, hemizygot -, Wildtyp +, hemizygot	Bruder von L-5752, L-5753 und L-5754 Bruder von L-5747, L-5753 und L-5754 Schwester von L-5747, L-5752 und L-5754 Bruder von L-5747, L-5752 und L-5753
L-5735 L-5745 L-7136	w m m	-/+, 0/+, hetero- und homozygot, (Ullrich-Turner-Syndrom, Mosaik) -, Wildtyp -, Wildtyp	Ehefrau von L-5745, Schwester von L-5736, L-5737, L-5737 und L-5738, Mutter von L-7136 Ehemann von L-5735, Vater von L-7136 Sohn von L-5735 und L-5745
L-5736 L-5737 L-5738	m m m	+, hemizygot +, hemizygot +, hemizygot	Bruder von L-5737 und L-5738 Bruder von L-5736 und L-5738 Bruder von L-5737 und L-5738

Tabelle 3.1 *Familienverhältnisse genetisch getesteter Individuen.* (+) C>T Transition vorhanden, (-) C>T Transition nicht vorhanden. M – männlich, w – weiblich.

3.2.1.2 Patientin L–5735 (II.2)

Eine Patientin (II.2, L–5735) war Trägerin der Transition DSC3. Als Schwester von drei Brüdern war sie eines von vier Geschwisterkindern, die an XDP litten. Abbildung 3.3 zeigt das Elektropherogramm ihrer Mutationssequenz. Es weist an einer bestimmten Stelle zwei unterschiedlich große Ausschläge (*Peaks*) auf: Der *Peak* für das Thyminsignal stellte sich im Vergleich zum Cytosinausschlag doppelt so groß dar (Abbildung 3.3, C). Bei heterozygoten weiblichen Trägerinnen des DSC3-Merkmales lässt sich normalerweise lediglich ein gleichhoher *Peak* für Thymin und Cytosin nachweisen (Abbildung 3.3, B), was der gleichmäßigen Verteilung des Merkmales auf 50 % aller Zellen entspricht. Da dies bei der Patientin jedoch nicht der Fall war, bestand die Vermutung, dass sie, entsprechend dem relativ starken Mutationssignal, auch eine größere Menge des mutierten Allels tragen müsste.

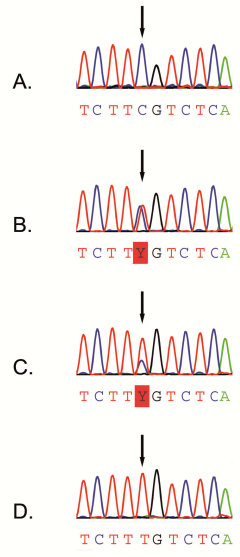


Abbildung 3.3 *Schematische Darstellung des disease-specific single-nucleotide change 3 (DSC3)-Merkmales.* (**A**) Sequenz eines weiblichen Individuums, welches homozygot für das Wildtypallel ist. Der Pfeil verweist auf die mögliche Lokalisation des DSC3-Merkmales (C>T). (**B**) Sequenz eines weiblichen Individuums, das ein heterozygoter Träger des DSC3-Merkmales ist. (**C**) Sequenz der Patientin L-5735. Das Wildtypallel sowie das mutierte Allel finden sich in einem Anteil der Zellen. In den restlichen Zellen kommt hingegen ausschließlich das mutierte Allel vor. Genotyp: C, T und T, 0. (**D**) Sequenz eines männlichen Individuums, welches hemizygot für das DSC3-Merkmal ist. Genotyp: T, 0. Grün: Adenin (A); Blau: Cytosin (C); Schwarz: Guanin (G); Rot: Thymin (T).

Tabelle 3.2 beschreibt die quantitative Analyse des *TAF1-Exons* d4. Ergebnisse der quantitativen *real time* PCR (qRT-PCR) ließen auf eine *Exon* d4-Deletion in einem Anteil der Patientenzellen schließen (Tabelle 3.2 A): Lag das durchschnittliche relative Verhältnis (Konzentration des *TAF1-Exons* d4 im Verhältnis zu der Konzentration von Beta Globin als Referenzwert) weiblicher Kontrollen bei 1,03 und männlicher Kontrollen bei 0,52, errechnete sich für die betroffene Patientin ein relatives Verhältnis von 0,75. Für alle anderen Gene des X-Chromosoms, welche durch MLPA auf Deletionen getestet wurden, konnten ähnliche Werte berechnet werden (0,65 - 0,77; Tabelle 3.2, B).

A

Gen	**Verhältnisse (*TAF1-Exon* d4/Beta Globin)**				
	Kontrolle 1, weiblich	**Kontrolle 2, weiblich**	**Kontrolle 1, männlich**	**Kontrolle 2, männlich**	**Patientin L-5735**
TAF1-Exon d4	0,95	1,10	0,57	0,46	0,75

B

Gen	**MLPA Kit**	**Verhältnisse (Probe/Kontrolle)**		
		weiblich	**männlich**	**Patientin L-5735**
AR	P071	0,92	0,54	0,74
PLP1 (gemittelte Ergebnisse für 7 *Exons*)		0,99	0,54	0,65
PAK3		0,95	0,54	0,75
FRMD7		0,93	0,53	0,75
*LMNB1**		1,07	1,01	0,96
MECP2 (gemittelte Ergebnisse für 4 *Exons*)	P015	/	/	0,77

AR (gemittelte Ergebnisse für 5 *Exons*)	P189	/	/	0,74
CDKL5 (gemittelte Ergebnisse für 21 *Exons*)		/	/	0,71
*NTNG1** (gemittelte Ergebnisse für 6 *Exons*)		/	/	0,93

Tabelle 3.2 *Quantitative Analyse des TAF1-Exons d4 (A) und sechs weiterer Gene des X-Chromosoms (B).* (*) Das *NTNG1*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 1. Das *LMNB1*-Gen liegt auf Chromosom 5. Die Verhältnisse für diese Gene wurden angegeben, um X-chromosomale Kopien mit autosomalen zu vergleichen. Das SALSA P071 Kit verfügt über die Möglichkeit, ausschließlich ein *Exon* von *PAK3* und *FRMD7* zu untersuchen.

Array comparative genomic hybridization (aCGH) der Patientenprobe wurde in Kollaboration mit dem Institut für Humangenetik der Christian Albrecht Universität zu Kiel durchgeführt. Sie ergab für das X-Chromosom einen Deletionswert von - 0,43 (im Vergleich zu - 1,00 bei einer heterozygoten Deletion, Abbildung 3.4).

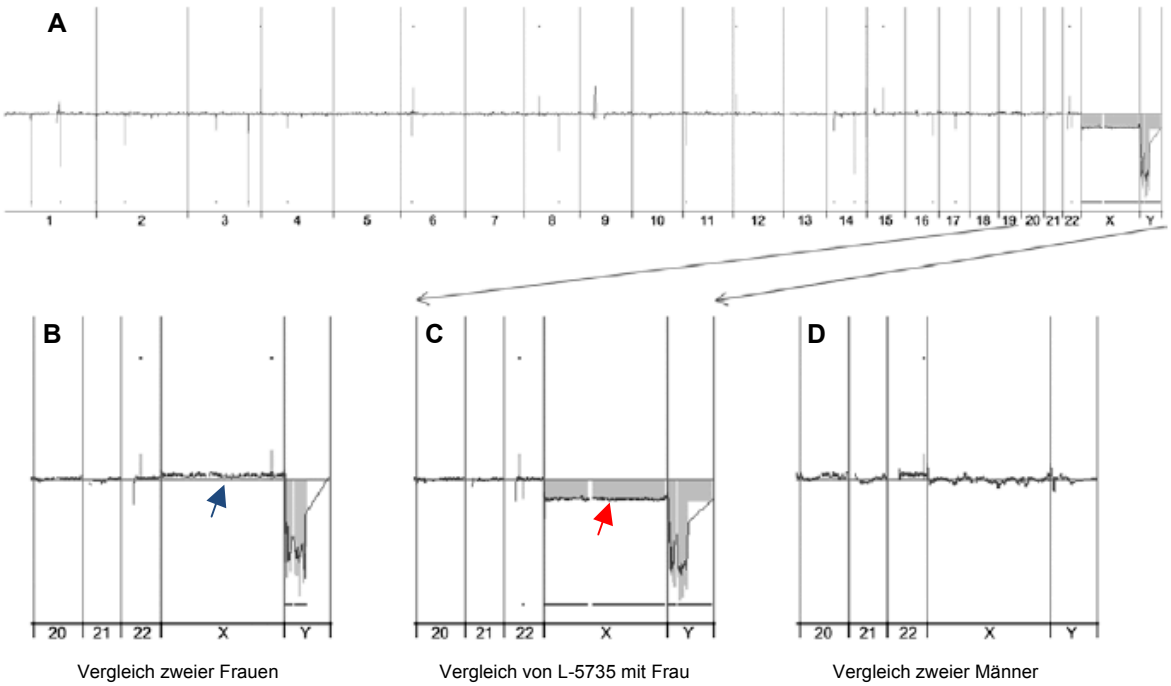


Abbildung 3.4 *Array comparative genomic hybridization (aCGH) der Patientenprobe.* aCGH wurde mit dem SurePrint G3 *Human* CGH *Microarray* Kit, 4x180K (Agilent, Santa Clara, CA) durchgeführt. Nimmt das Ergebnis einen Wert von Null an, würde dies für einen balancierten Chromosomalstatus sprechen (**B**, blauer Pfeil). Ein Wert von - 1,0 steht für eine heterozygote Deletion. Die Betrachtung des Genoms von L-5735 verdeutlicht, dass keine Signale auf dem Y-Chromosom und ein mittlerer Wert von - 0,43 für das X-Chromosom bestehen (**A**, **C** roter Pfeil). Dies spricht für das gleichzeitige

Vorliegen einer Monosomie X sowie eines Mosaiks bei L-5735. Die kleineren Abschnitte veranschaulichen die Chromosomen 20 – 22, X und Y einer gesunden Frau (**B**), der Patientin L-5735 (**C**) und eines gesunden Mannes (**D**).

Die genetische Analyse der Patientin L-5735 deutete auf das Vorliegen einer Monosomie X (siehe Diskussion, Abschnitt 4.2) in einem Anteil ihrer Zellen hin, weswegen ihr Phänotyp auf Charakteristika des Ullrich-Turner-Syndroms untersucht wurde (siehe Diskussion, Tabelle 4.1). Abbildung 3.6 veranschaulicht offensichtliche anatomische Merkmale der Patientin. Zu ihnen gehören ihre tief ansitzenden Ohren und ihre Kleinwüchsigkeit (139 cm). Die durchschnittliche Größe ihrer drei Brüder lag bei 161 cm, ihrer Schwestern bei 151 cm. Abbildung 3.5 stellt schematisch die genetischen Testergebnisse von Familienmitgliedern der Patientin dar.

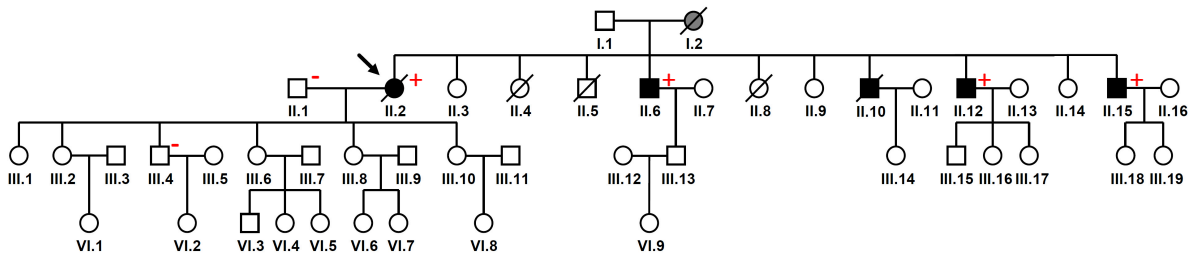


Abbildung 3.5 *Schematische Darstellung der genetischen Testergebnisse von Familienmitgliedern der Patientin L-5735 (II.2).* Der Pfeil verweist auf die Patientin. Schwarze Symbole stehen für XDP-Patienten, weiße Symbole markieren gesunde Individuen. Graue Symbole kennzeichnen Personen, die eventuell erkrankt sind. Verstorbene Familienmitglieder wurden durchgestrichen. Mit einem roten Pluszeichen sind Individuen markiert, denen die C>T Transition nachgewiesen werden konnte. Ein rotes Minuszeichen signalisiert den ausgebliebenen Nachweis.

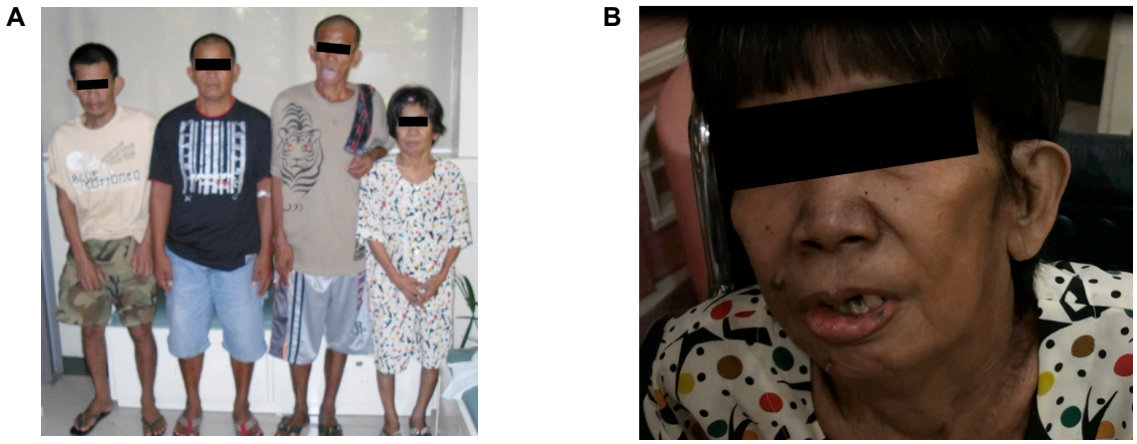
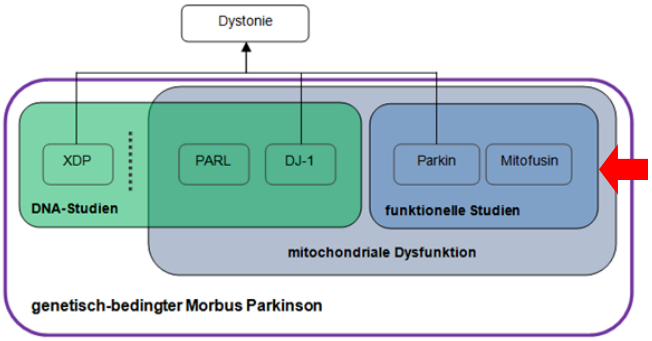


Abbildung 3.6 *XDP-Patienten.* (**A**) zeigt die Patientin (L-5735; II.2) mit ihren ebenfalls erkrankten Brüdern (von links: L-5738, II.15; L-5736, II.12; L-5737, II.6). (**B**) veranschaulicht die tief ansitzenden Ohren der Patientin L-5735.

3.3 Funktionelle Studien

Der folgende Abschnitt des Ergebnisteils beschäftigt sich mit den funktionellen Studien zu Mitofusin und Parkin.



3.3.1 Ubiquitinierung von Mitofusin

Es sollte nachgewiesen werden, dass Mitofusin 1 *in vitro* ubiquitiniert wird. Um den Ort der Ubiquitinierung von Mitofusin 2 durch Zellstudien in Erfahrung zu bringen, wurde dessen Ubiquitinierungsmuster in SH-SY5Y-Zellen untersucht.

3.3.1.1 Klonierung und Expression von Mitofusin 1 und Validierung des Produkts

Um Mitofusin 1 für *in-vitro*-Reaktionen zu erhalten, musste die Mitofusin 1-mRNA eines gesunden Individuums mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Diese konnte sodann in einen bakteriell exprimierenden Vektor kloniert werden. Sequenzierung bestätigte die richtige Basenfolge der gesamten kodierenden Mitofusin 1-Sequenz (2223 bp). PCR-bedingte Veränderungen wurden ausgeschlossen. Die Expression des Proteins wurde im Anschluss in Bakterien vollzogen. Das gereinigte Endprodukt ließ sich mittels Mitofusin 1-Antikörpern durch einen *Western Blot* analysieren: Eine spezifische Bande Mitofusin 1-entsprechenden molekularen Gewichtes spricht für die Synthese des gewollten Proteins.

3.3.1.2 Effekt unterschiedlicher Reaktionsansätze auf das Mitofusin 1-Signal in *in-vitro*-Studien

Die Applikation verschiedener Konzentrationen von UBE2W beziehungsweise UBE2B (E2-Enzyme) in Reaktionsansätzen ergab den in Abbildung 3.7 dargestellten *Western Blot*. In Abhängigkeit von den beigemengten E2-Konzentrationen zeigte sich ein abnehmendes Mitofusin 1-Signal (Abbildung 3.7, A). Oberhalb des Parkinsignals stellte sich mit gesteigerter E2-Konzentration eine Zunahme des Bandenmusters im *Western Blot* dar (Abbildung 3.7, B).

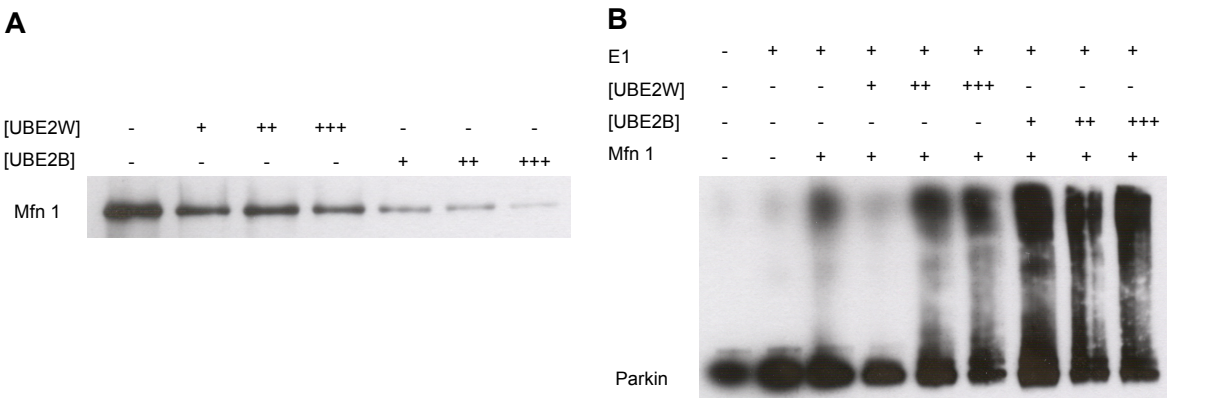


Abbildung 3.7 *Effekt unterschiedlicher E2-Konzentrationen auf das Mitofusin 1-Signal in vitro.* (**A**) Reaktionsansätze einer Ubiquitinierungsreaktion mit UBE2W und UBE2B unterschiedlicher Konzentrationen ([ ]). *Blot* A wurde mit einem Mitofusin 1-Antikörper behandelt. Mitofusinbanden unterschiedlicher Intensität treten bei zunehmender Konzentration an UBE2W beziehungsweise UBE2B auf. Für UBE2B ist dies besonders deutlich. Unterschiede bestehen ebenfalls hinsichtlich der Intensität der Banden bei gleicher Konzentration, jedoch anderem E2-Enzym.
(**B**) Reaktionsansätze einer Ubiquitinierungsreaktion mit UBE2W und UBE2B unterschiedlicher Konzentrationen, sowie einer Reaktion ohne E1-Enzym und zwei Reaktionen ohne Mitofusin 1. Es wurde ein Antikörper zur Darstellung von Parkin benutzt. Der *Blot* weist im Falle fehlenden Mitofusins und/oder fehlendem E1-Enzyms eine Bande oberhalb des Parkinsignals auf. Bei Zugabe ausschließlich eines E1-Enzyms und eines E1-Enzyms sowie Mitofusin 1 entsteht ein Signal bis in höhere molekulare Größen. Zunehmende Konzentrationen an UBE2W beziehungsweise UBE2B führen, besonders im Fall von UBE2B, zu einem intensiveren Signal oberhalb der Parkinbande. Mfn – Mitofusin.

Um zu überprüfen, ob Mitofusin 1 ubiquitiniert wird und dieser Vorgang *in vitro* wirklich von Parkin sowie der Konzentration des E2-Enzyms abhängig ist, wurde dem Reaktionsansatz neben den üblichen Reaktionspartnern anstatt funktionellem Parkins eine Parkinmutante mit verminderter Fähigkeit zur Substratubiquitinierung beigemengt. Der hieraus entstandene *Western Blot* wird in Abbildung 3.8 gezeigt.

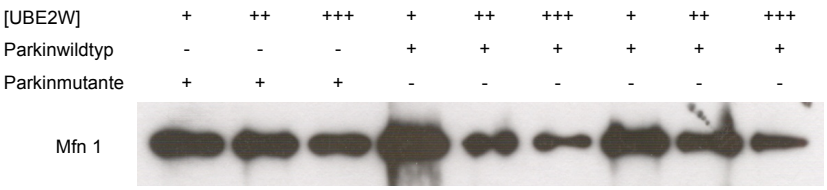


Abbildung 3.8 *Effekt unterschiedlicher E2-Konzentrationen und einer Parkinmutante auf das Mitofusin 1-Signal in vitro.* Unter gleichen Reaktionsumständen wurde dem einen Ansatz eine Parkinmutante mit verminderter Aktivität, zwei weiteren Ansätzen ein, im Hinblick auf seine Funktionalität, normales Parkin (Wildtyp) beigemengt. Der *Blot* wurde mit einem Mitofusin 1-Antikörper behandelt. Bei zunehmender Konzentration von UBE2W nimmt das Mitofusin 1-Signal ab, sofern der Reaktion funktionelles Parkin zugeführt wurde. Eine in ihrer Funktion zur Substratubiquitinierung

niedrigpotente Parkinmutante als Reaktionspartner führt zu einer schwächeren Abnahme des Mitofusin 1-Signals. Mfn – Mitofusin.

Um der Vermutung einer Ubiquitinierung von Mitofusin 1 durch Parkin *in vitro* nachzugehen, wurde ein Reaktionsansatz gewählt, der sämtliche funktionelle Proteine und Kofaktoren zur theoretischen Ubiquitinierung des Proteins enthält. Erneut wurde die Konzentration des E2-Enzyms in Ansätzen graduell erhöht. Der *Western Blot* zur Darstellung der Reaktionsergebnisse wurde zuerst mit einem Antikörper gegen den His-*tag* zur Anzeige von Parkin und Mitofusin 1 beschickt. Hierauf folgte die Darstellung sämtlicher ubiquitinierter Proteine mittels eines Ubiquitinantikörpers (Abbildung 3.9).

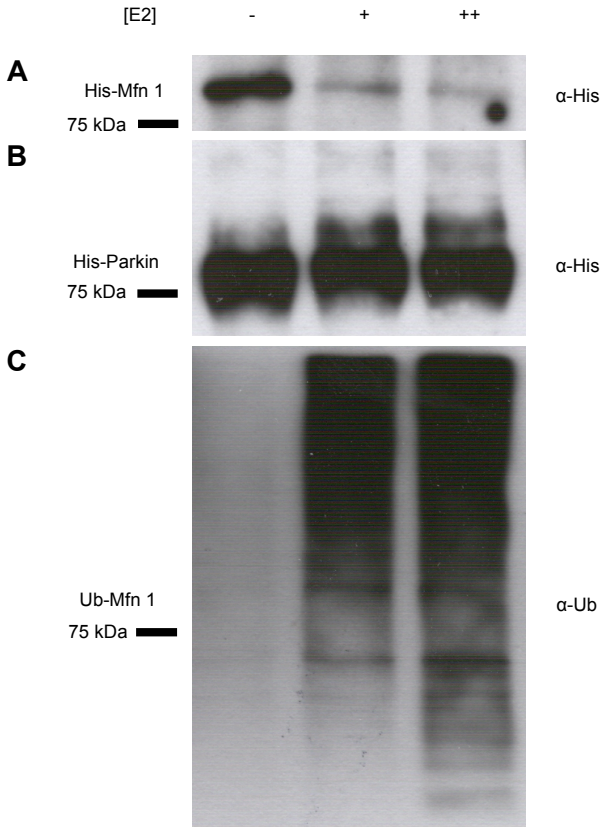


Abbildung 3.9 *Nachweis der Ubiquitinierung von Mitofusin 1 in einer in-vitro-Reaktion.* In Abhängigkeit von der E2-Konzentration ([E2]) zeigt sich die Abnahme des Mitofusin 1-Signals durch die Beschickung der Membran mit einem gegen den His-*tag* gerichteten Antikörper (**A**). Auch ist die Zunahme eines oberhalb der Parkinbande gelegenen Signals zu erkennen (**B**). Dieses setzt sich in höhere molekulare Ebenen fort. Die Darstellung sämtlicher ubiquitinierter Proteine durch einen Antikörper, der gegen Ubiquitin gerichtet ist, veranschaulicht, dass ab einem molekularen Gewicht von 75 kDa, welches der Molekülmasse von Mitofusin 1 entspricht, ein starkes Signal auftritt. Dieses intensiviert sich mit zunehmender E2-Konzentration (**C**). Ebenfalls lassen sich Banden unterhalb von 75 kDa nachweisen. Wird der Reaktion kein E2-Enzym beigemengt, so lassen sich keine Banden darstellen. Ub – Ubiquitin, Mfn - Mitofusin. Antikörper (z.B. α-His) rechts neben *Blot.*

3.3.1.3 Effekt depolarisierender Agentien auf endogenes Mitofusin 1 und 2 in nicht-transfizierten Zellen

Die Zellstudien zu Mitofusin sollten dem Effekt, den depolarisierende Agentien auf das Mitofusinsignal haben, nachgehen. Durch die chemische Behandlung nicht-transfizierter Zellen konnte deren Reaktion auf Stress im Vergleich zu transfizierten Zellen nachgegangen werden. Abbildung 3.10 stellt das Ergebnis einer Studie zum Verhalten von Mitofusin unter mitochondrialem Stress dar.

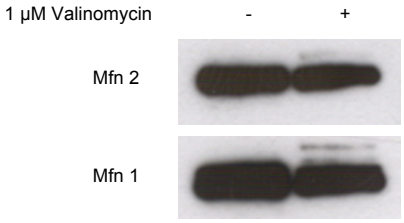


Abbildung 3.10 *Reaktion des Signals von endogenem Mitofusin 1 und 2 nach Stressung humaner HEK293-Zellen.* Endogenes Mitofusin 1 und 2 wird nach mitochondrialer Depolarisation mittels 1 µM Valinomycin ubiquitiniert. Hierbei tritt eine Bande oberhalb des Mitofusinsignals auf. Der *Blot* wurde mit Hilfe eines Mitofusin 1- beziehungsweise Mitofusin 2-Antikörpers erstellt. Mfn – Mitofusin.

3.3.1.4 Ubiquitinierungsposition von endogenem Mitofusin 2

Um herauszufinden, welches Lysin von Mitofusin 2 potentiell ubiquitiniert wird, wurden SH-SY5Y-Zellen mittels 1 µM Valinomycin gestresst. Nach Immunpräzipitation von Mitofusin 2 der mitochondrialen Fraktion des Zelllysats konnte das Produkt auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen werden. Durch die Behandlung des Gels mit *Colloidal Blue* ließ sich eine Bande einfärben, die auf Höhe von Mitofusin 2 lag. Zudem zeigte das Gel weitere Banden oberhalb dieses Signals. Abbildung 3.11 ist eine Fotografie des entsprechenden Gels.

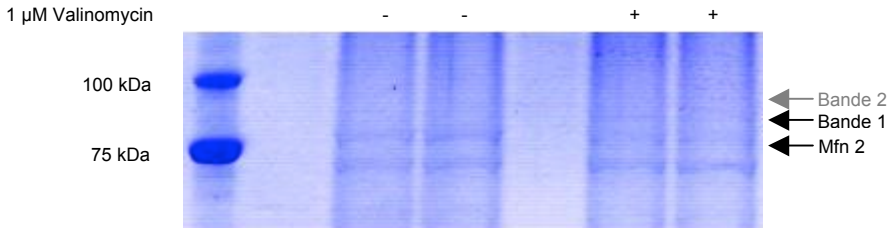


Abbildung 3.11 *Darstellung der Bandenbildung über Mitofusin 2 nach Stressung.* Die Färbung (*Colloidal Blue Staining* Kit) eines Gels nach Elektrophorese von durch Immunpräzipitation aus der mitochondrialen Fraktion erhaltenem Mitofusin 2 behandelter (1 µM Valinomycin, rechts) und unbehandelter (links) SH-SY5Y-Zellen. Es zeigt eine Bande für Mitofusin 2 (circa 75 kDa) in beiden Proben. Die gestressten Zellen weisen eine zusätzliche Bande oberhalb des Mitofusin 2-Signals auf (Bande 1). In grau gekennzeichnet, da auf der Fotografie nur schwer zu erkennen, liegt eine zweite Bande (Bande 2). Mfn – Mitofusin.

Das Bandenmuster oberhalb des Mitofusin 2-Signals wurde zur massenspektrometrischen Analyse an die *Taplin Biological Mass Spectrometry Facility* der Harvard University, Boston geschickt. Sie ergab, dass es sich hierbei um einfach (Tabelle 3.3, A) beziehungsweise zweifach (Tabelle 3.3, B) ubiquitiniertes Mitofusin 2 handelt. Die Kopplung von Ubiquitin an Mitofusin 2 wird nach Behandlung der Zellen mittels Valinomycin an der Stelle p.Lys416 vorgenommen (Tabelle 3.3, A-C).

A Aminosäuresequenz von Mitofusin 2 Bande 1: massenspektrometrisch überprüfte Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz der Probe mit der Sequenz von Mitofusin 2	**%-Übereinstimmungen**
MSLLFSRCNSIVTVKKNKRHMAEVNASPLKHFVTAKKKINGIFE QLGAYIQESATFLEDTYRNAELDPVTTEEQVLDVKGYLSKVRG ISEVLARRHMKVAFFGRTSNGKSTVINAMLWDKVLPSGIGHTT NCFLRVEGTDGHEAFLLTEGSEEKRSAKTVNQLAHALHQDKQ LHAGSLVSVMWPNSKCPLLKDDLVLMDSPGIDVTTELDSWIDK FCLDADVFVLVANSESTLMQTEKHFFHKVSERLSRPNIFILNNR WDASASEPEYMEEVRRQHMERCTSFLVDELGVVDRSQAGDR IFFVSAKEVLNARIQKAQGMPEGGGALAEGFQVRMFEFQNFER RFEECISQSAVKTKFEQHTVRAKQIAEAVRLIMDSLHMAAREQ QVYCEEMREERQDRLKFIDKQLELLAQDYKLRIKQITEEVERQ VSTAMAEEIRRLSVLVDDYQMDFHPSPVVLKVYKNELHRHIEEG LGRNMSDRCSTAITNSLQTMQQDMIDGLKPLLPVSVRSQIDMLV PRQCFSLNYDLNCDKLCADFQEDIEFHFSLGWTMLVNRFLGPK NSRRALMGYNDQVQRPIPLTPANPSMPPLPQGSLTQEEFMVS MVTGLASLTSRTSMGILVVGGVVWKAVGWRLIALSFGLYGLLY VYERLTWTTKAKERAFKRQFVEHASEKLQLVISYTGSNCSHQV QQELSGTFAHLCQQVDVTRENLEQEIAAMNKKIEVLDSLQSKAK LLRNKAGWLDSELNMFTHQYLQPSR	45,18
B Aminosäuresequenz von Mitofusin 2 Bande 2: massenspektrometrisch überprüfte Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz der Probe mit der Sequenz von Mitofusin 2	**%-Übereinstimmungen**
MSLLFSRCNSIVTVKKNKRHMAEVNASPLKHFVTAKKKINGIFE QLGAYIQESATFLEDTYRNAELDPVTTEEQVLDVKGYLSKVRGI SEVLARRHMKVAFFGRTSNGKSTVINAMLWDKVLPSGIGHTTN CFLRVEGTDGHEAFLLTEGSEEKRSAKTVNQLAHALHQDKQLH AGSLVSVMWPNSKCPLLKDDLVLMDSPGIDVTTELDSWIDKFC LDADVFVLVANSESTLMQTEKHFFHKVSERLSRPNIFILNNRWD ASASEPEYMEEVRRQHMERCTSFLVDELGVVDRSQAGDRIFFV SAKEVLNARIQKAQGMPEGGGALAEGFQVRMFEFQNFERRFE ECISQSAVKTKFEQHTVRAKQIAEAVRLIMDSLHMAAREQQVYC EEMREERQDRLKFIDKQLELLAQDYKLRIKQITEEVERQVSTAM AEEIRRLSVLVDDYQMDFHPSPVVLKVYKNELHRHIEEGLGRN MSDRCSTAITNSLQTMQQDMIDGLKPLLPVSVRSQIDMLVPRQ CFSLNYDLNCDKLCADFQEDIEFHFSLGWTMLVNRFLGPKNSR RALMGYNDQVQRPIPLTPANPSMPPLPQGSLTQEEFMVSMVT	38,04

GLASLTSRTSMGILVVGGVVWKAVGWRLIALSFGLYGLLYVYER LTWTTKAKERAFKRQFVEHASEKLQLVISYTGSNCSHQVQQEL SGTFAHLCQQVDVTRENLEQEIAAMNKKIEVLDSLQSKAKLLRN KAGWLDSELNMFTHQYLQPSR	
C Aminosäuresequenz von Ubiquitin Bande 1 und 2: massenspektrometrisch überprüfte Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz der Probe mit der Sequenz von Ubiquitin	**%-Übereinstimmungen**
MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFA GKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGGAKKRKKSYTTPKK NKHKRKKVKLAVLKYYKVDENGKISRLRRECPSDECGAGVFMA SHFDRHYCGKCCLTYCFNKPEDK	11,53

Tabelle 3.3 *Massenspektrometrisch überprüfte Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz der Banden 1 und 2 mit Mitofusin 2 und Ubiquitin, sowie Ort der Ubiquitinierung von Mitofusin 2.* (**A**) Die durch Massenspektrometrie ermittelten Aminosäuresequenzen der Bande 1 stimmen zu 45,18 % mit der Aminosäuresequenz von Mitofusin 2 überein (rot markiert). (**B**) 38,04 % der Aminosäuren der Bande 2 konnten in der Mitofusin 2-Sequenz nachgewiesen werden. (**A**, **B, C**) Das grün markierte Lysin (K) der Position p.Lys416 wurde als Ort der Ubiquitinierung von Mitofusin 2 identifiziert.

Um *in vivo* die Ubiquitinierung des Lysins zu bestätigen, sollte die Folge des Verlusts dieser Aminosäure in Zellen, die mutiertes Mitofusin überexprimieren, untersucht werden. So wurde die Mutante p.Lys416Arg hergestellt: Humanes Mitofusin 2 wurde in einen Vektor kloniert, der einen eukaryotischen Promotor aufwies. Im nächsten Schritt konnten *Primer* für die *in-vitro*-Mutagenese erstellt und sodann die Veränderung vollzogen werden. Der erfolgreiche Aminosäureaustausch ließ sich mittels Sequenzierung bestätigen. Als letztes wurden humane Fibroblasten mit Wildtyp- und p.Lys416Arg-Mitofusin 2 transfiziert. Abbildung 3.12 zeigt, dass Fibroblasten, die den Mitofusin 2-Wildtyp tragen, auf mitochondriale Depolarisation mit einer Abnahme des Signals für Mitofusin 2 antworten. Das Signal von Fibroblasten, welche die mutierte Form exprimieren, beschreibt hingegen sowohl mit als auch ohne Valinomycinbehandlung ein konstantes Bandenmuster.

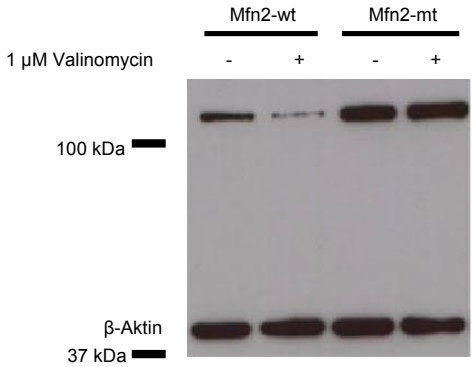
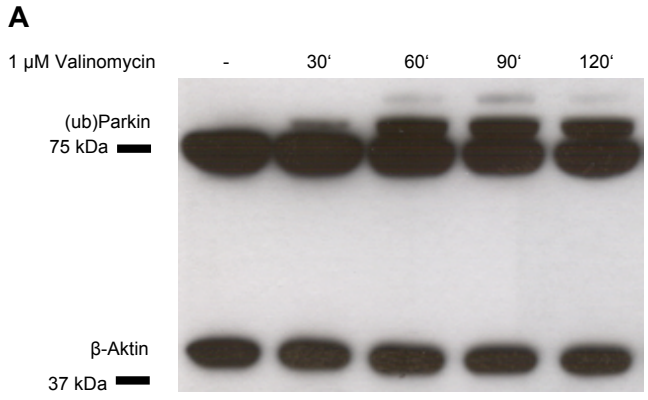


Abbildung 3.12 *Depolarisierung von Zellen, die den Mitofusin 2-Wildtyp und die Mitofusin 2-Mutante tragen.* Mittels mitochondrialer Depolarisation humaner Fibroblasten durch Valinomycin verändert sich das Signal der Mitofusin 2-Mutante nicht. Der Mitofusin 2-Wildtyp (wt) als auch die Mitofusin 2-Mutante wurden mit 1 µM Valinomycin gestresst. β-Aktin dient in dem Versuchsaufbau als Ladekontrolle. Mfn - Mitofusin.

3.3.2 Effekt verschiedener depolarisierender Agentien auf Mitofusin 1 und Parkin in mit Parkin transfizierten Zellen

Ziel war das mitochondrial depolarisierend wirkende Agens Valinomycin mit dem Protonophor CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon) hinsichtlich dessen Wirkung auf das Parkinsignal zu vergleichen. Der Effekt von Wasserstoffperoxid auf Mitofusin sollte ebenfalls untersucht werden. Abbildung 3.13 veranschaulicht, dass HEK293-Zellen, denen Parkin transfiziert wurde, im Vergleich zu CCCP früher mit einer stärkeren Bandenbildung reagieren sofern sie mit Valinomycin behandelt wurden.



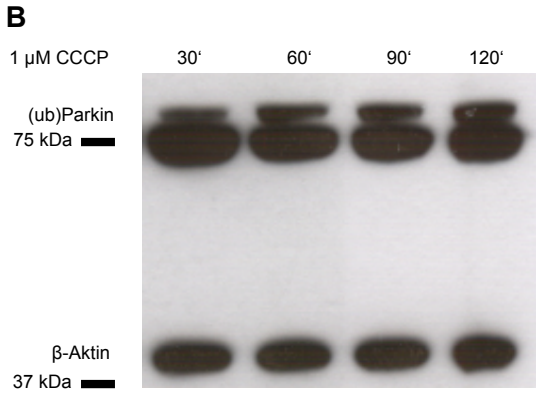


Abbildung 3.13 *Unterschiedliches Verhalten von Parkin nach mitochondrialer Depolarisation von HEK293-Zellen mittels Valinomycin und CCCP.* (**A**) Werden die Mitochondrien von HEK293-Zellen durch 1 µM Valinomycin (Val) depolarisiert, stellen sich auf einem *Western Blot*, der mit Parkinantikörpern behandelt wurde, nach 30 Minuten eine Bande über dem Parkinsignal, nach 60 Minuten zusätzlich eine zweite Bande dar. Im Vergleich zu der Depolarisation mittels 1 µM CCCP (**B**) ist hier die einzige Bandenbildung nach 30 Minuten nachzuweisen. Der *Blot* zeigt keine weiteren Veränderungen zu späteren Zeitpunkten. β-Aktin fungiert als Ladekontrolle.

Wasserstoffperoxid konnte in HEK293-Zellen keine Signalveränderung der Mitofusin 1-Bande herbeiführen (Abbildung 3.14).

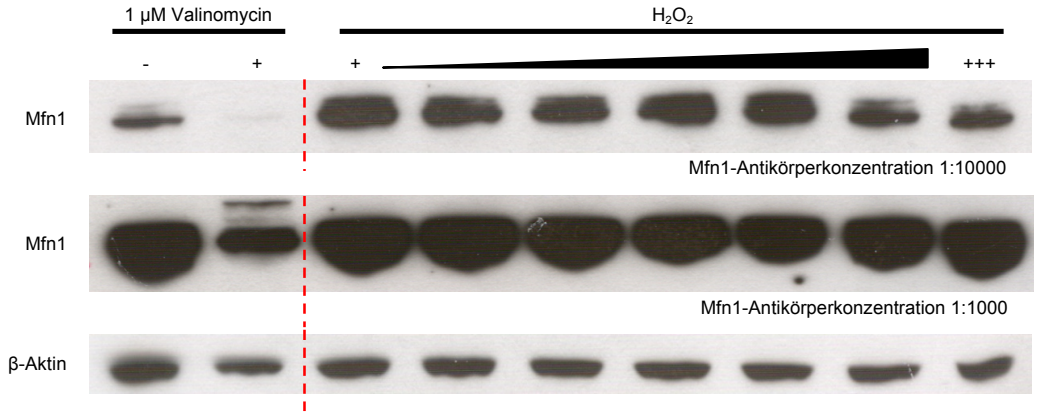


Abbildung 3.14 *Wirkung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf Mitofusin 1.* H_2O_2 führte zu keiner Bandenbildung über dem Mitofusin 1-Signal. Eine Abnahme des Signals zeigte sich ebenfalls nicht. Mfn – Mitofusin.

3.3.3 Parkin *in-vitro*-Studie und Massenspektrometrie

Im Rahmen der *in-vitro*-Studien mit Mitofusin 1 konnte beobachtet werden, dass Parkin in Abwesenheit eines E2-Enzyms monoubiquitiniert wird (siehe Abbildung 3.7, B, Ergebnisse). Deswegen beschäftigt sich ein Teil dieser Arbeit mit der Bestimmung des Ortes der Ubquitinierung von Parkin mittels Massenspektrometrie. Dem *in-vitro*-Ubiquitinierungsansatz wurde daher, bis auf ein E2-Enzym, sämtliche für die Ubiquitinierung eines Substrates

nötigen Agentien zugefügt. Der Parkinwildtyp (mit einem MBP-*tag* beziehungsweise His-*tag* markiertes Parkin) wurde in diesem Reaktionsansatz mehrfach ubiquitiniert. Das in Abbildung 3.15 dargestellte Gel sowie die Ergebnisse der Massenspektrometrie (Tabelle 3.4) illustrieren dies.

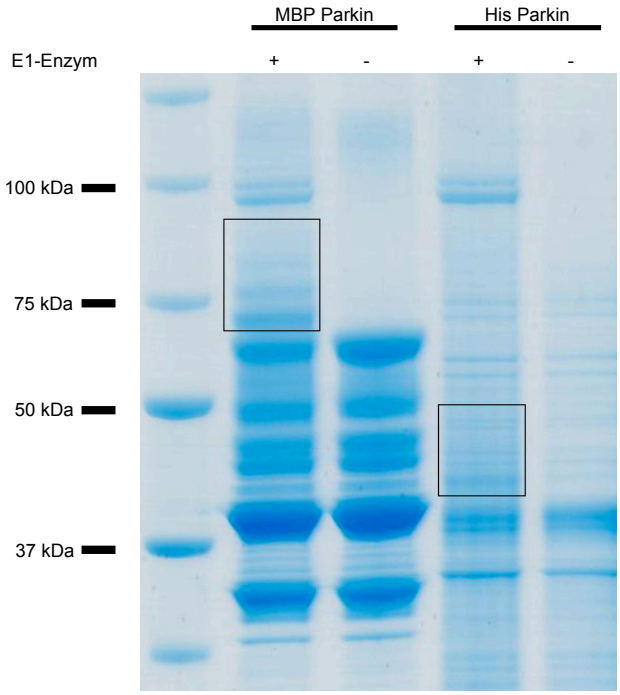


Abbildung 3.15 *Multiples Bandenmuster nach Reaktion von Parkin mit E1-Enzym in vitro.* Oberhalb der Banden für Parkin lassen sich nach Einfärbung des Zelllysates mittels *Colloidal Blue* mehrere Banden nachweisen (schwarze Kästen), sofern dem Reaktionsansatz ein E1-Enzym zugesetzt wurde (+). In Abwesenheit eines E1-Enzyms (-) stellen sich keine Banden oberhalb des Parkinsignals dar. In beiden Fällen wurde der Reaktion kein E2-Enzym beigemengt. MBP Parkin (circa 70 kDa) und His Parkin (circa 40 kDa) unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihres Verhaltens.

Parkinbanden höheren molekularen Gewichtes wiesen im Vergleich zu Banden niederen molekularen Gewichtes andere Ubiquitinierungsmuster auf. In mehreren Ubiquitinierungsansätzen wurden immer wieder andere Lysine Parkins ubiquitiniert. Auch Ubiquitin selbst und der MBP-*tag* werden E2-unabhängig durch Parkin mehrfach ubiquitiniert (Tabelle 3.4).

A Aminosäuresequenz von MBP Parkin massenspektrometrisch überprüfte Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz der Probe mit der Sequenz von MBP Parkin	**%-Übereinstimmungen**
MKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKF PQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWD AVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKS ALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGL TFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKV NYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDE GLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQM SAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSNNNNNNNNLGIEG RISEFMIVFVRFNSSHGFPVEVDSDTSIFQLKEVVAKRQGVPADQLRVI FAGKELRNDWTVQNCDLDQQSIVHIVQRPWRKGQEMNATGGDDPR NAAGGCEREPQSLTRVDLSSSVLPGDSVGLAVILHTDSRKDSPPAGS PAGRSIYNSFYVYCKGPCQRVQPGKLRVQCSTCRQATLTLTQGPSC WDDVLIPNRMSGECQSPHCPGTSAEFFFKCGAHPTSDKETSVALHLIA	79,64

TNSRNITCITCTDVRSPVLVFQCNSRHVICLDCFHLYCVTRLNDRQFVH DPQLGYSLPCVAGCPNSLIKELHHFRILGEEQYNRYQQYGAEECVLQ MGGVLCPRPGCGAGLLPEPDQRKVTCEGGNGLGCGFAFCRECKEAY HEGECSAVFEASGTTTQAYRVDERAAEQARWEAASKETIKKTTKPCP RCHVPVEKNGGCMHMKCPQPQCRLEWCWNCGCEWNRVCMGDHW FDVX	
B Aminosäuresequenz von Ubiquitin massenspektrometrisch überprüfte Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz der Probe mit der Sequenz von Ubiquitin	**%-Übereinstimmungen**
MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGK QLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGGAKKRKKSYTTPKKNKHKRKK VKLAVLKYYKVDENGKISRLRRECPSDECGAGVFMASHFDRHYCGKC CLTYCFNKPEDK	47,74

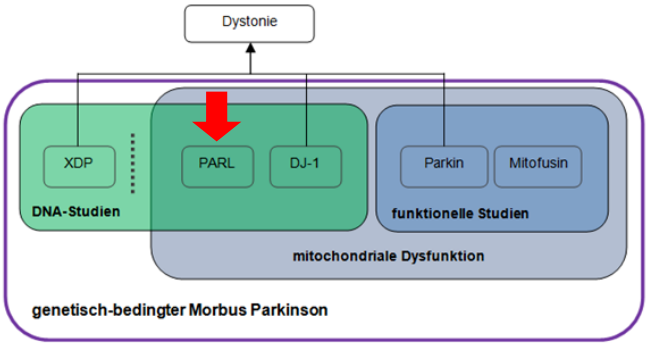
Tabelle 3.4 *Massenspektrometrisch überprüfte Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des Bandenmusters mit der von MBP Parkin und multiple Ubiquitinierungsstellen.* Die durch die *Taplin Biological Mass Spectrometry Facility* überprüften Banden weisen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz mit der Aminosäurenabfolge von MBP Parkin auf (**A**, 79,64 %). MBP Parkin wird ubiquitiniert (**B**, 47,74 % Übereinstimmung). Die grün markierten Lysine veranschaulichen die multiple Ubiquitinierung des MBP-*tags* (blau unterstrichen; vier Ubiquitinierungen), von Parkin (sechs Ubiquitinierungen) und Ubiquitin (sieben Ubiquitinierungen) nach Inkubation der *in-vitro*-Reaktion bei 37° C. Rot markiert wurden die mit dem verglichenen Protein übereinstimmenden Aminosäuresequenzen der eingeschickten Probe.

4. Diskussion

In diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit werden zuerst die Ergebnisse der Mutationsanalyse von *PARL* und *PARK7* diskutiert. Hierauf folgt die Beurteilung der Resultate der genetischen und klinischen Untersuchungen der XDP-Patientenkohorte. Zuletzt wird auf die Erkenntnisse der Proteinstudien eingegangen.

4.1 Morbus Parkinson-bedingende Mutationen von PARL und DJ-1

4.1.1 Die Mutation p.Ser77Asn des PARL-Proteins als seltene Ursache von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn



Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich zeigen, dass die Mutation p.Ser77Asn des Proteins PARL selten zu einem frühen Parkinson-Syndrom führt. Hierfür wurden die für die Funktion und Aktivität von PARL wichtigen *Exons* 2, 8 und 9 des *PARL*-Gens von 92 Patienten sequenziert. Bestärkt wird diese Annahme durch eine Arbeit, die in einer Kohorte von 2353 spät am Parkinson-Syndrom erkrankten Patienten unterschiedlicher Ethnizität lediglich einen Träger der Mutation p.Ser77Asn fand (Shi et al, 2011). Die vorliegende Arbeit konnte außerdem beweisen, dass eine beliebige Mutation in den *Exons* 2, 8 und 9 generell als sehr seltene Ursache für monogenetischen Morbus Parkinson anzuführen ist. Da die erwähnten Genabschnitte funktionelle Bereiche des Proteins kodieren, wären beeinträchtigende Mutationen am wahrscheinlichsten hier lokalisiert. In diesen *Exons* konnten jedoch in keiner der 92 DNA-Proben von Patienten, die gemittelt im Alter von 36,4 ± 7,2 Jahren erkrankten, Veränderungen erkannt werden.

Wenn man bedenkt, dass unter 230 Patienten mit spätem Erkrankungsbeginn (57,7 Jahren) nur einem Träger eine *PARL*-Mutation nachgewiesen werden konnte (Shi et al, 2011), liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen in *PARL* selten sind.

PARL ist ein Protein, das maßgeblich an der physiologischen Proteolyse von PINK1 beteiligt ist und somit als Mediator dessen zellulären Lokalisation und Funktion agiert (Shi et al, 2011). Das Verhältnis von membrangebundenem zu cytosolisch-prozessiertem PINK1 ist im Hinblick auf die mitochondriale und somit auch auf die zelluläre Integrität von besonderer Bedeutung (Matsuda et al, 2010; Narendra & Youle, 2011). Es kann die cytosolische Interaktion von Parkin und PINK1 und den darauf folgenden Transfer von Parkin zu den zu degradierenden Mitochondrien beeinflussen. Daher besteht die Annahme, dass die Fehlfunktion von PARL zu einem familiären Parkinson-Syndrom führen kann (McQuibban & Bulman, 2011).

Unabhängig von der PINK1-assozierten Pathogenese eines Parkinson-Syndroms stellt die Transfektion und konsekutive Überexpression von PARL, welches das säugetierspezifische Gegenstück zu Pcp1 in Hefen ist (McQuibban & Bulman, 2011), in Zellen, die mutiertes Pcp1 exprimieren, die physiologische mitochondriale Morphologie wieder her (Hill & Pellegrini, 2010). Dies lässt zum einen eine generelle Verbindung zwischen der Funktion der rhomboiden Proteasen und der Integrität von Mitochondrien erkennen. Zum anderen vermag es auch eine Antwort auf die Frage geben, warum Mutationen von PARL nicht als eine häufige Ursache der Entstehung von Morbus Parkinson herangezogen werden können: Die mitochondriale Funktion der rhomboiden Protease Pcp1 aus dem Reich der Pilze scheint bis in die Klasse der Säugetiere konserviert zu sein. Abbildung 4.1 veranschaulicht, dass ähnliches auch für PARL zutrifft. Das für Säugetiere spezifische N-terminale Pβ-Ende von PARL unterzieht sich zweier struktureller Spaltungen – der α- und β-Spaltung (Jeyaraju et al, 2011). Die α-Spaltung vermittelt den Transport des Proteins zu den Mitochondrien. Die β-Spaltung hat für das Protein einen Funktionszugewinn zur Folge, der die mitochondriale Morphologie beeinflusst. Die PARL-Sequenz muss einer strikten Stabilität unterliegen, damit die β-Spaltung ablaufen kann (Jeyaraju et al, 2006), was ein möglicher Grund für die evolutionäre Konservierung des Proteins ist. Werden die einzigen vier unterschiedlichen PARL-Sequenzen von Säugetieren verglichen, unterscheiden sich erstaunlicherweise lediglich 4 von 62 Aminosäurereste der Pβ-Domäne (Pellegrini & Scorrano, 2007). Dies weist auf den starken Selektionsvorgang im Bereich dieser Domäne hin. Es zeigt auch, dass aufgrund der resultierenden Pathogenität im Falle einer Mutation von *PARL* wahrscheinlich nur sehr wenige Varianten überhaupt die Evolution der Säugetiere überlebt hätten. Ein Träger einer Mutation im Abschnitt der Pβ-Domäne von PARL vermag einen Selektionsnachteil aufzuweisen, der womöglich gar nicht mit dem Leben zu vereinbaren ist. Diese Vermutung lässt sich durch Untersuchungen stützen, die zeigen, dass Mäuse, die kein PARL exprimieren, nach 8 - 12 Wochen aufgrund muskulärer Atrophie und Kachexie versterben. Auch sind Zellen, die kein PARL produzieren, anfälliger für apoptotische Signale (Pellegrini & Scorrano, 2007). Erwähnenswert ist, dass nicht nur die vor allem bei

Säugetieren vorhandene Pβ-Domäne genetisch konserviert ist. Die gesamte Familie der rhomboiden Proteasen unterliegt einer entsprechenden sequentiellen Konservierung (Urban, 2010). Ein Aspekt, der die enge Interaktion der Pβ-Domänenstruktur mit der Funktion des gesamten Proteins verdeutlicht, ist die Tatsache, dass die regulatorische Phosphorylierung von PARL im Bereich p.Ser65, p.Thr69 und p.Ser70 der Pβ-Domäne die β-Spaltung bei p.Ser77 – p.Ala78 in Säugetierzellen verhindert (Jeyaraju et al, 2006). Die Spaltung würde jedoch den Erhalt der mitochondrialen Struktur begünstigen. Entsprechend der eben erwähnten Phosphorylierung könnte eine Mutation von PARL ebenfalls in dessen Struktur eingreifen und die Proteinfunktion unterbinden. Die Mutation p.Ser77Asn beeinflusst die Spaltungsstelle der Pβ-Domäne (Shi et al, 2011). Eine Veränderung dieses Bereiches stellt sich also als besonders ungünstig dar. Das Auftreten einer PARL-Variante mit einer Mutation an eben dieser Position bei Patienten, die an Morbus Parkinson mit spätem Erkrankungsbeginn leiden, wird mit 2/3782 angegeben. Auf den gesundheitlichen Zustand der Mutationsträger wird jedoch nicht weiter eingegangen (Shi et al, 2011).

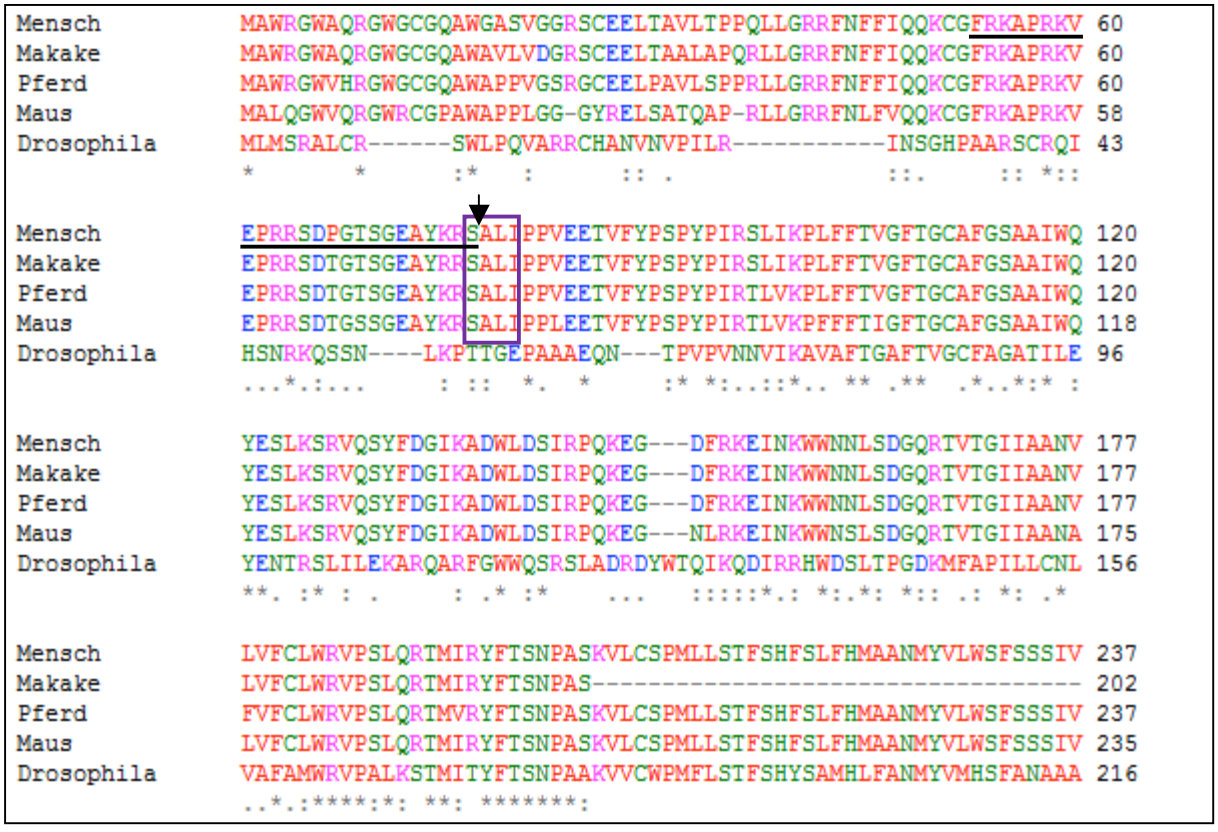


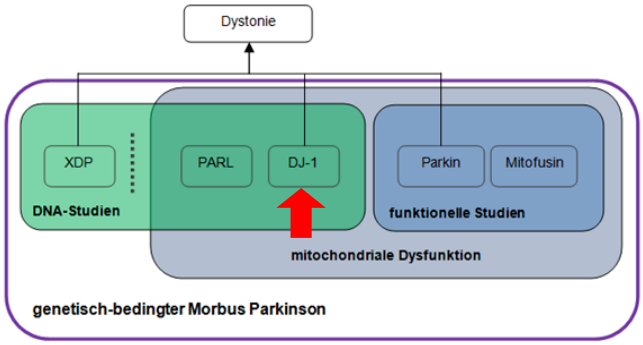
Abbildung 4.1 *Auszüge aus der Proteinsequenz von PARL der Spezies Mensch, Makake, Pferd, Maus und Fruchtfliege, geordnet durch ClustalW2 multiple sequence alignment program.*
Schwarz unterlegt ist die Pβ-Domäne. Die Sequenz p.Ser77 – p.Ala78 als Ort der β-Spaltung beim Menschen wurde mit einem Pfeil markiert. Die konservierten Aminosäuren in diesem Bereich wurden bei den hier vorgestellten Lebewesen mit einem Kasten hervorgehoben. Farben: Aminosäuren mit Hydroxy-, Amino- oder Sulfhydrylresten sowie Glycin sind grün dargestellt; rote Buchstaben stehen für

hydrophobe, aromatische und kleine Aminosäuren sowie Tyrosin; die Farbe blau verweist auf saure Aminosäuren; magenta sind basische Aminosäuren samt Histidin. Die Farben sollen hier die weitreichende Konservierung der PARL-Sequenz veranschaulichen. Zeichen: (*) bedeutet identische Aminosäure innerhalb verglichener Sequenzen. (:) markiert eine substituierte Aminosäure, die sich chemisch den anderen Aminosäuren entsprechend verhält. (.) weist auf substituierte Aminosäuren hin, die sich in der dreidimensionalen Proteinstruktur nicht von der ursprünglichen unterscheiden lassen.

Die eigenen Forschungsergebnisse bekräftigen die Annahmen, dass der Stelle p.Ser77 eine geringe Mutationsrate zuzuschreiben ist und dass die funktionellen *Exons* von *PARL* generell selten einer Sequenzänderung unterliegen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Überlegungen zur Konservierung der Gensequenz der Pβ-Domäne von *PARL* im Hinblick auf dessen Funktion und Relevanz bei Säugetieren. Im Rahmen der eigenen Arbeit wurde nicht berücksichtigt, dass die Anzahl der DNA-Kopien eines Gens durch Mutationen in kodierenden oder nicht-kodierenden Abschnitten vermindert werden kann (Wu & Liu, 2010). So könnte sich auch eine Mutation außerhalb der *Exons* 2, 8 und 9 pathogen auswirken.
Die transiente Transfektion von embryonischen Mausfibroblasten mit PINK1 und PARL beziehungsweise PINK1 und einer dysfunktionellen PARL-Mutante kann zur Betrachtung der Interaktion der beiden Enzyme genutzt werden (Shi et al, 2011). Untersuchungen solcher Zellreihen lassen eine PARL-abhängige Verarbeitung von PINK1 in dessen kürzere Form Δ1-PINK1 erkennen. Selbst in chemisch unbehandelten Zellen war aufgrund der Transfektion von PARL und PINK1 eine Induktion von Mitophagie zu erkennen. Zwar liefert das beschriebene Zellmodell einen Hinweis dafür, dass PINK1 durch PARL proteolytisch gespalten wird, verschweigt jedoch den Stellenwert dieser Interaktion. Die Spaltung von PINK1 durch PARL scheint bewiesen. Ob PARL jedoch im physiologischen Zustand einen erheblichen Einfluss auf die Verarbeitung von PINK1 hat, ist noch Gegenstand der Debatte. Es besteht die Möglichkeit, dass ein anderes Protein, das für die Spaltung von PINK1 viel wichtiger ist, eher zur Pathogenese eines monogenetischen Parkinson-Syndroms beiträgt. Auch diese Annahme vermag den nicht geglückten Nachweis von *PARL*-Mutanten in einer Kohorte von Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn zu erklären. Ferner konnte in weiteren Studien auch in Abwesenheit von PARL Δ1-PINK1 festgestellt werden, was das Vorkommen einer weiteren Protease, die an der Prozessierung von PINK1 beteiligt ist, suggeriert (Pellegrini & Scorrano, 2007).
Untersuchungen, die in Frage stellen, dass PARL an der Induktion von Mitophagie teilnimmt, wurden ebenfalls durchgeführt (Narendra & Youle, 2011). Sie diskutieren, dass das Protein wohl nicht maßgeblich an der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Struktur beteiligt ist, da sich die Mitochondrien von $PARL^{-/-}$-Zellen bei Behandlung mit depolarisierenden Substanzen nicht anders verhalten als Zellen mit funktionellem PARL (Cipolat et al, 2006). Diese Annahme widerspricht den oben erwähnten Forschungsergebnissen, unterstützt jedoch die

These, dass ein bisher unbekannter Partner anstelle von PARL mit PINK1 interagiert (McQuibban et al, 2003). Ferner konnte keine höhere Konzentration an Δ1-PINK1 in mit CCCP behandelten $PARL^{+/+}$-Zellen im Vergleich zu $PARL^{-/-}$-Zellen gemessen werden (Narendra et al, 2010). Methodisch ist anzumerken, dass der proteasomale Abbau von Δ1-PINK1 in den beschriebenen Versuchen nicht durch die Chemikalie MG132 inhibiert wurde. So lässt sich eine eventuelle Detektion von Δ1-PINK1 verhindern (Shi et al, 2011).

4.1.2 Morbus Parkinson-bedingende Mutationen von DJ-1



Es wurden bisher wenige Patienten beschrieben, die aufgrund dysfunktionellem DJ-1 an Morbus Parkinson erkrankt sind. Auch in der vorliegenden Studie konnten weder mittels MLPA noch durch konventionelle Sequenzierung neue Mutationen in *PARK7* gefunden werden.

Die im Ergebnisteil erwähnte Mutation c.235G>A im *Exon* 4 ist eine bekannte Variante von *PARK7* und wird in der Datenbank dbSNP geführt. Eine Mutation an dieser Stelle verändert die Aminosäuresequenz (p.Ala79Thr) des Proteins DJ-1. Die aliphatische Aminosäure Alanin ist unpolar und reaktionsträge. Threonin ist eine aufgrund ihrer Hydroxylgruppe polare neutrale Aminosäure. Sie ist reaktiv und kann über Wasserstoffbrückenbindungen mit freien Elektronenpaaren anderer Atome in Verbindung treten. Daher muss man vermuten, dass die Mutation p.Ala79Thr strukturellen und somit auch funktionellen Einfluss auf DJ-1 hat. In dbSNP wird sie als *Missense*-Mutation deklariert. Bisher sind keine Studien bekannt, die den zellulären Effekt einer für diese Mutation homozygoten Mutante untersuchen. In der Probe L-4471 konnten keine weiteren Mutationen in *PARK7* ermittelt werden. Das Individuum ist nicht homozygot für die Mutation c.235G>A. Es ist vorstellbar, dass die Variante einen additiven Effekt auf die Pathogenität einer anderen Mutation, die zu einem Parkinson-Syndrom mit frühem Erkrankungsbeginn führt, ausübt. Dieses Phänomen wird zum Beispiel im Rahmen folgender Studie beschrieben: Zwei *compound*-heterozygote Mutationen (c.3176T>G, p.Leu1059Arg und c.3253delC, p.Leu1085TrpfsX1088) des für die ATPase13A2 kodierenden Gens *PARK9* bedingen im Falle zweier Geschwister die

Ausbildung des Kufor-Rakeb-Syndroms (Park et al, 2011). Ferner ist bekannt, dass neben homozygoten Mutationen auch heterozygote Veränderungen von *PINK1*, *PARK2* und eben auch *PARK7* zu monogenetischem Morbus Parkinson führen können (Klein & Westenberger, 2012). Da L-4471 einer Person zuzuordnen ist, die in jungen Jahren am Parkinson-Syndrom erkrankte, besteht der dringende Verdacht auf das Vorliegen einer familiäre Form. Diese lässt sich bei L-4471 eventuell ätiopathologisch durch die Mutation c.235G>A in *PARK7* erklären.

Die Aminosäuresequenz von DJ-1 ist stark konserviert, was in Abbildung 4.2 dargestellt wird (Lucas & Marin, 2007).

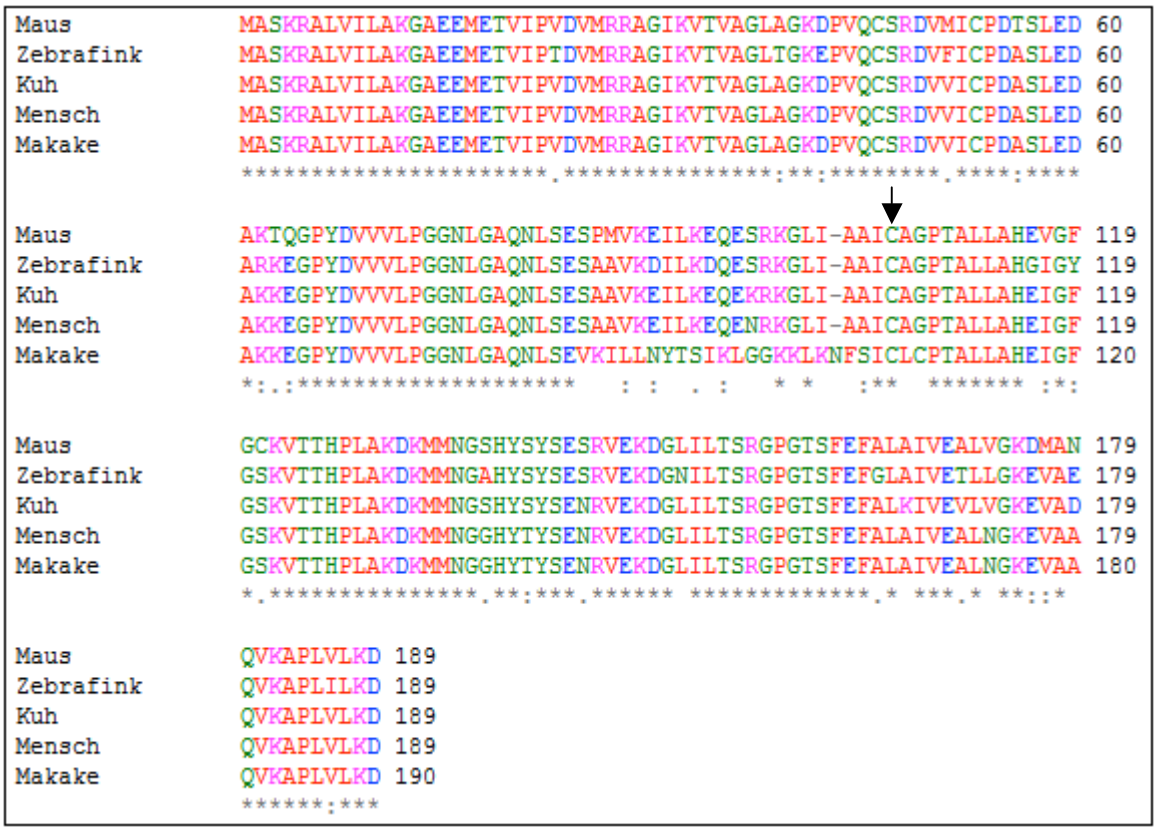


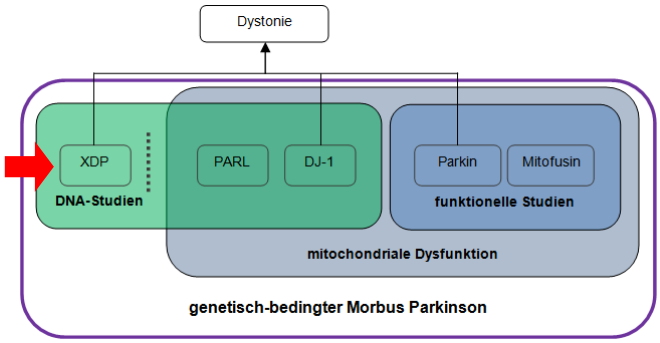
Abbildung 4.2 *Auszüge aus der Proteinsequenz von DJ-1 der Spezies Mensch, Makake, Kuh, Maus und Zebrafink geordnet durch ClustalW2 multiple sequence alignment program.* Es besteht eine starke genetische Konservierung der Aminosäuresequenz von DJ-1. Der schwarze Pfeil markiert das an der protektiven Redoxreaktion beteiligte Cystein 106. Farben: Aminosäuren mit Hydroxy-, Amino- oder Sulfhydrylresten sowie Glycin sind grün dargestellt; rote Buchstaben stehen für hydrophobe, aromatische und kleine Aminosäuren sowie Tyrosin; die Farbe blau verweist auf saure Aminosäuren; magenta sind basische Aminosäuren samt Histidin. Die Farben sollen hier die weitreichende Konservierung der PARL-Sequenz veranschaulichen. Zeichen: (*) bedeutet identische Aminosäure innerhalb verglichener Sequenzen. (:) markiert eine substituierte Aminosäure, die sich chemisch den anderen Aminosäuren entsprechend verhält. (.) weist auf substituierte Aminosäuren hin, die sich in der dreidimensionalen Proteinstruktur nicht von der ursprünglichen unterscheiden lassen.

Wird die Struktur eines Proteins in Lebewesen phylogenetisch ferner Herkunft nur geringfügig verändert, so kann dies für die große Tragweite einer Mutation in dessen Gen sprechen. DJ-1 kommt vielen verschiedenen Funktionen in unterschiedlichen Zellen nach ((Cookson, 2010), siehe Tabelle 8.2, Anhang). Es stellt sich daher, teleologisch betrachtet, die Frage, ob das Protein konserviert werden *muss*? Vorstellbar ist, dass es sich evolutionär als gravierender Nachteil herausstellt, dysfunktionelles DJ-1 zu exprimieren. Daher ist die Erkenntnis nicht überraschend, dass Mutationen in *PARK7* lediglich 1 - 2 % aller frühen Erkrankungen an Morbus Parkinson ausmachen (Klein & Westenberger, 2012). Somit gehört *PARK7* mit *PINK1* zu den Genen, die selten durch funktionelle Mutationen zu Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn führen (Cookson, 2010).

Eine weitere Studie befasste sich mit der Untersuchung der *Exons* 2, 5 und 7 von 144 schwedischen Patienten mit Parkinson-Syndrom (Anvret et al, 2011). 67 Patienten gaben an, dass bei Verwandten Morbus Parkinson diagnostiziert wurde. Die restlichen 77 Individuen der untersuchten Kohorte waren an einem monogenetischen Parkinson-Syndrom (Erkrankungsalter ≤ 50 Jahre) erkrankt. In der Patientenkohorte fanden sich insgesamt zwei heterozygote Sequenzänderungen (c.501A>G, p.Ala167Ala) von DJ-1. Dies veranlasste die Autoren ebenfalls zu der Annahme, dass *PARK7*-Mutationen selten als Ursache für genetisch-bedingten Morbus Parkinson anzusehen sind. Weitere Mutationen wurden in der Studie nicht beschrieben. Vielmehr ging sie davon aus, dass die stille Sequenzänderung p.Ala167Ala über die Beeinträchtigung der mRNA-Stabilität und der Sekundärstruktur des Proteins sowie sterischen Mechanismen bei Trägern Morbus Parkinson verursachen kann.

In Proben von 68 Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn eines Parkinson-Syndroms, also in etwa der Hälfte der schwedischen Kohorte, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine heterozygote Mutation nachgewiesen werden (1,4 %). So ist, verglichen mit der für Kaukasier angenommenen Mutationsfrequenz, die Anzahl gefundener Varianten in der Kohorte schwedischer Patienten und der eigenen recht hoch (0,91 %; Asiaten: 3,03 %; Araber: 0,74; aschkenasische Juden: 1,96 %, (Nuytemans et al, 2010)). Daher ist anzunehmen, dass Mutationen in *PARK7* häufiger als bisher vermutet Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn bedingen.

4.2 Genetische Ursache der Erkrankung einer Patientenkohorte an XDP



Bei 43 von 44 klinisch unter XDP-Verdacht stehenden Individuen konnte DSC3 ermittelt werden. Obwohl die Erkrankung bei einem Patienten klinisch diagnostiziert wurde, konnten in genetischen Untersuchungen keine zugrundeliegenden Veränderungen gefunden werden. Schon jetzt gilt die C>T Transition als verlässlicher Marker, der mit dem Auftreten von XDP korreliert. So konnte DSC3 in einer Studie in sämtlichen Proben von XDP-Patienten nachgewiesen werden (Nolte et al, 2003). Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass eine klinische Diagnose nicht immer mit dem Nachweis von DSC3 einhergeht. Dies ist bei jungen Menschen mit positiver Familienanamnese von besonderer Bedeutung: Der Junge L-5743 wurde negativ auf DSC3 getestet. Da er aber im Jahre 2000 geboren wurde, wäre es ungewöhnlich, würden sich Symptome seiner Krankheit vor seinem 20. Lebensjahr zeigen. Hätte der ausbleibende Nachweis von DSC3 nur eine geringe Aussagekraft, würde dies nun folgendes bedeuten: Es könnte keine definitive Aussage getroffen werden, ob junge, noch asymptomatische Menschen mit positiver Familienanamnese erkranken werden. Letztlich sollte bei Verdacht auf XDP eine genetische Testung vollzogen und eine Diagnose nicht ausschließlich auf Basis der klinischen Präsentation und der Familienanamnese erhoben werden. Der Korrelation von DSC3 mit der klinischen Präsentation von XDP könnte somit weiter nachgegangen werden.

Seit 1976 beobachtet die *XDP Study Group* der Philippinen den Krankheitsverlauf von 500 männlichen Patienten (Lee et al, 2011). Ihnen stehen 14 Fälle von Patientinnen gegenüber, die an XDP erkrankt sind und unterschiedliche Schweregrade der Krankheit aufwiesen. Bei allen Frauen präsentierte die Krankheit im Vergleich zu den männlichen Patienten einen milderen Verlauf (Evidente et al, 2004b; Lee et al, 2011; Waters et al, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Grund für die schwere Erkrankung einer 57-jährigen Frau (L-5735; II.2) an XDP herausgefunden werden. Ursächlich war eine Monosomie X in einem Teil ihrer Zellen. Beweisend hierfür sind das relative Verhältnis der Konzentration des *TAF1-Exons* d4 zur Konzentration von Beta Globin als Referenzwert und der durch aCGH erhobene Deletionswert von - 0,43 für das X-Chromosom. Somit trägt L-5735 den

Karyotypen 45,X/46,XX. Der Karyotyp 45,X, welcher sich durch gänzliches oder partielles Fehlen des X-Chromosoms auszeichnet, entspricht dem Befund eines Menschen mit Ullrich-Turner-Syndrom. Das Syndrom betrifft eines von 2500 - 4000 lebendgeborenen Mädchen (Collett-Solberg et al, 2011). In Tabelle 4.1 sind klinische Befunde der Monosomie X zusammengefasst. Sie wurden den Untersuchungsergebnissen der Patientin L-5735 vergleichend gegenübergestellt. In Abbildung 3.6 des Ergebnisteils lassen sich der kleine Körperbau der Patientin und ihre tief angelegten Ohren erkennen. Beides sind Merkmale des Ullrich-Turner-Syndroms.

Klinik des Ullrich-Turner-Syndroms	**Befunde der Patientin L-5735**
Körperliche Symptome:	
Kleinwüchsigkeit	Ja
Handödeme	Ja
Breiter Thorax	Nein
Tiefer Haaransatz	Nein
Tiefsitzende Ohren	Ja
Pterygiumfalte	Nein
Nägeldysplasie	Ja
Multiple Naevi	Ja
Gonadale Dysfunktion	Nein
Kongenitaler Herzfehler	Nein
Hypothyreose	Nein
Diabetes mellitus	Nein
Ametropie	Nein
Hörprobleme	Ja
Autoimmunerkrankung	Unbekannt
Kognitives Defizit	Nein

Tabelle 4.1 *Klinische Aspekte des Ullrich-Turner-Syndroms im Vergleich zu Befunden von L-5735.*

Im Gegensatz zur Patientin L-5735 wird eine Mosaik-Monosomie X bei vielen Individuen aufgrund ihrer milden bis fehlenden Symptomatik nicht diagnostiziert (Rivkees et al, 2011). Eine zusätzliche genetische Erkrankung vermag akzidentiell durch humangenetische Untersuchungen zur Diagnose führen. Ebendies war bei L-5735 der Fall: Erst nachdem aufgrund ihrer X-chromosomal rezessiven Erkrankung genetische Tests betrieben wurde, konnte bei der Patientin ein Ullrich-Turner-Syndrom diagnostiziert werden. Ähnliche Szenarien treten bei Müttern auf, deren Kinder am X-chromosomal vererbten Rett-Syndrom (encephalopathisch begründete Entwicklungsstörung) leiden. Bei ihnen konnte die Diagnose „Ullrich-Turner-Syndrom“ erst nach einer genetischen Untersuchung gestellt werden, die ursprünglich zur Klärung der Erkrankung ihrer Kinder durchgeführt wurde (Vorsanova et al, 2001). Da in manchen Zellen dieser Frauen die zum Rett-Syndrom führende *MECP2*-Mutation des X-Chromosoms nicht vorhanden war, kam es nicht zur Ausbildung der

Krankheit. Somit verhalf die Monosomie X diesen Müttern zur Ausbildung eines gesunden Phänotyps. L-5735 profitierte jedoch nicht von ihrer genetischen Ausstattung, da sie die Expression des *TAF1*-Wildtyps in einem Teil ihrer Zellen nicht zuließ.

Der Sohn von Patientin L-5735 (L-7136; III.4) wurde negativ auf DSC3 getestet. Sein Vater L-5745 wies die Transition C>T ebenfalls nicht auf (siehe Abbildung 3.5, Ergebnisse). Diese Ergebnisse bestätigen, dass L-5735 trotz ihres Leidens an einer X-chromosomal rezessiven Erbkrankheit ein Wildtyp-X-Chromosom tragen musste. Dieses vererbte sie L-7136.

Familienangehörige berichteten, dass die Mutter der Patientin eine milde XDP-Symptomatik kurz vor ihrem Tod im Alter von 80 Jahren entwickelte. Da die Mutter eine Trägerin der XDP-induzierenden Mutation gewesen sein muss, stellt sich die Frage, ob diese klinische Präsentation Ausdruck einer spät beginnenden XDP-Erkrankung war oder ein anderes neurologisches Leiden vorlag. Interessanterweise wiesen drei der 13 weiteren in der Literatur beschriebenen XDP-Patientinnen einen Beschwerdebeginn im Alter von über 70 Jahren auf (Tabelle 4.2). Auch hier bildete sich ein milder Phänotyp aus.

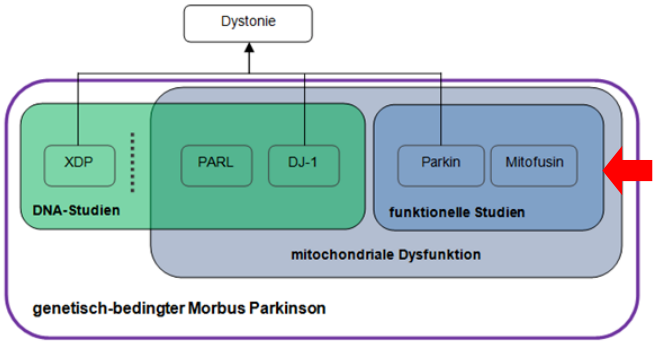
Patientin	Krankheits-beginn (Jahre)	Alter bei letzter Untersuchung (Jahre)	Klinik			Quelle
			Dystonie	Parkinson-Krankheit	Andere	
1	59	61	Milde Dystonie des linken Fußes	-	-	(Waters et al, 1993)
2	42	46	Cervicale Dystonie*	Dysdiadochokinese, trippelnder Gang	Tremor, facialer Tremor und Myoclonus	(Evidente et al, 2004b)
3	75	76	-	Trippelnder Gang*, Dys-diadochokinese	-	(Evidente et al, 2004b)
4	42	47	-	-	Perioraler Tremor*, milde Beeinflussung der Gehweise („*tandem gait*“)	(Evidente et al, 2004b)
5	75	76	-	Trippelnder Gang*, Dys-diadochokinese, Hypomimie, vorgebeugte Körperaltung, Microphagie, fehlendes Mitschwingen der Arme, posturaler und Intentions-tremor	-	(Evidente et al, 2004b)
6	51	66	-	Trippelnder Gang, Dys-diadochokinese, milde Retropulsion	Heben der Augenbraue, Chorea des linken Beins*, fortschreitend bis zur generalisierten Chorea	(Evidente et al, 2004b)
7	26	26	-	-	Milde, intermittierende Chorea des Oberkörpers und des Gesichts*	(Evidente et al, 2004b)
8	72	74	-	Vorgebeugte Körperhaltung, Dysdiadochokinese, trippelnder Gang, Retropulsion	Chorea des linken Arms*	(Evidente et al, 2004b)

9	35	36	-	Intentionstremor des Oberarms und posturaler Tremor*, milde Dys-diadochokinese, milde Retropulsion	-	(Evidente et al, 2004b)
10	47	63	Blepharospasmus*, oro-mandibulare Dystonie, Dystonie des Beins, generalisierte Dystonie (im vierten Jahr)	-	-	(Lee et al, 2011)
11	49	67	Torticollis*, Dystonie des Beins, Dysphagie, generalisierte Dystonie (im fünften Jahr)	Hypomimie, Bradykinesie	-	(Lee et al, 2011)
12	37	39	Flexion der Zehen, Torticollis, faciale Dystonie, Öffnen des Kiefers, generalisierte Dystonie (im zweiten Jahr)	-	Beinkrämpfe	(Lee et al, 2011)
13	48	58	Torticollis*, undeutliche Aussprache, Anterocollis	Trippelnder Gang	Schreibbeschwerden	(Lee et al, 2011)

Tabelle 4.2 *Klinik der bisher bekannten, an XDP erkrankten Frauen.* Zuerst aufgetretene Symptome sind mit (*) markiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass drei Szenarien bestehen, die die Entstehung einer schweren XDP-Symptomatik bei Frauen erklären: Die erste Möglichkeit ist, dass eine Patientin gemäß des X-chromosomal rezessiven Erbgangs der Erkrankung homozygot für die krankheitsbedingende Mutation ist. Ferner wird beschrieben, dass eine regelhafte (*skewed*) Inaktivierung des X-Chromosoms, das für den Wildtyp des *TAF1*-Gens kodiert, in mehr als 50 % der Zellen bei heterozygoten Trägerinnen die Ausbildung des klinischen Bildes nach sich zieht (Evidente et al, 2004b). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein drittes Szenario beschrieben, das bei L-5735 zu XDP führte: Es besteht die Möglichkeit, dass eine XDP-Patientin unter einem atypischen Ullrich-Turner-Syndrom leidet.

4.3 Mitofusin und Parkin



4.3.1 Effekt unterschiedlicher Reaktionsansätze auf das Mitofusin 1-Signal in *in-vitro*-Studien

Die Ubiquitinierung von Mitofusin 1 und 2 korreliert mit der Induktion von Mitophagie (Gegg et al, 2010). Die Kenntnis der Mechanismen dieser Proteinmodifikation kann als Voraussetzung zum Verständnis der Pathogenese eines Parkin- und PINK1-involvierenden monogenetischen Parkinson-Syndroms betrachtet werden. Sämtliche Mitofusin-betreffende Ubiquitinierungsreaktionen wurden bisher in Zellstudien durchgeführt. Es stellt sich neben der generellen Einordnung der Ubiquitinierung von Mitofusin daher die Frage, ob diese auch *in vitro* stattfinden kann. *In-vitro*-Reaktionen ermöglichen es, den Ablauf von Proteininteraktionen zu studieren, ohne dass eventuell unbekannte zelluläre Einflüsse auf diese einwirken können. Sie schließen somit bestimmte Proteine (z. B. PINK1) und unbekannte Einflussgrößen aus. *In-vitro*-Studien ermöglichen im Falle dieser Arbeit den ungetrübten Blick auf das Zusammenspiel von Mitofusin und Parkin sowie deren Interaktion bei Ubiquitinierungsreaktionen. Da *in-vitro*-Reaktionen sehr viel leichter als Zellstudien durchzuführen sind, vereinfachen sie die Beobachtung des funktionellen Zusammenspiels von Proteinen.

Den Ergebnissen der verschiedenen in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen ist Folgendes zu entnehmen: Wählt man in mehreren Ansätzen eine zunehmende Konzentration der an der Ubiquitinierungsreaktion maßgeblich beteiligten E2-Enzyme UBE2W beziehungsweise UBE2B, so schwächt die Intensität des Mitofusin 1-Signals auf einem *Western Blot* im Verlauf deutlich ab (Abbildung 3.7, A, Ergebnisse). Dies kann dadurch erklärt werden, dass Mitofusin 1 im ubiquitinierten Zustand ein größeres molekulares Gewicht annimmt. Das restliche, nicht-ubiquitinierte Mitofusin 1 ist auf Höhe seines ursprünglichen Molekulargewichtes bei circa 75 kDa signalgebend. Um Proteine der Membran eines *Western Blots* darzustellen, werden Antikörper verwendet, die diese binden. Der gegen Mitofusin 1 gerichtete Antikörper scheint lediglich mit unverändertem Mitofusin 1 zu reagieren. Das modifizierte ub-Mitofusin 1 vermag er jedoch nicht mehr als Substrat zu

erkennen. Obschon die Ubiquitinierung von endogenem Mitofusin 2 unter oxidativem Stress in Zellstudien bereits bewiesen und ubiquitiniertes Mitofusin 2 mittels *Western Blotting* dargestellt wurde (Rakovic et al, 2011), können folgende Gründe für die fehlende Bandenbildung im Falle der Mitofusin 1-*in-vitro*-Studien angeführt werden: Es ist möglich, dass die (multiple) Ubiquitinierung von Mitofusin 1 *in vitro* die Bindung des Antikörpers, im Gegensatz zum Antikörper für Mitofusin 2, verhindert. Für diese Annahme spricht, dass die Intensität der Mitofusin 1-Banden bei steigender Konzentration von UBE2W/B stetig abnimmt, da im Verlauf mehr Produkt entsteht. Hierbei geht unverändertes Mitofusin 1 verstärkt in einen höhermolekularen Zustand über. Da der Ansatz sämtlicher *in-vitro*-Reaktionen lediglich Enzyme und Kofaktoren enthielt, die in ihrem Zusammenspiel ubiquitinierend wirken, liegt es nahe, dass eine Ubiquitinierung von Mitofusin 1 eben jene Modifikation darstellt, die das Mitofusin 1-Signal abschwächen lässt (vergleiche auch Abschnitt 4.3.2). Der Grund für ein fehlendes ub-Mitofusin 1-Signal kann die sterische Hinderung einer Antikörperbindung durch Ubiquitin sein. Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes und 8,5 kDa schweres Molekül und in Kettenform als modifizierendes Agens relativ groß. Geht man von einer Polyubiquitinierung von Mitofusin 1 durch Parkin (E3) aus (Glauser et al, 2011), so ist es vorstellbar, dass hierdurch eine Blockade entsteht, die zur mangelhaften Bindung eines Antikörpers führt. Dieser Effekt wurde zum Beispiel auch bei der Bindung von Antikörpern an den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 (EGFR), der seine Relevanz in der Tumorzellforschung hat, beobachtet (Price-Schiavi et al, 2002). Aufgrund einer durch den heterodimeren Glykoproteinkomplex Muc4 potenzierten Phosphorylierung von ErbB2, verhindert Muc4 im Verlauf den Angriff eines Antikörpers auf ErbB2 sterisch. Auch ist es möglich, dass der 238 Aminosäuren lange *tag* GFP (*green fluorescent protein*) das Signal eines hiermit markierten Proteins auf einem *Western Blot* abschwächt, was ebenfalls auf sterische Ursachen zurückzuführen ist (Kobayashi et al, 2008). Zudem scheint es plausibel, dass Mitofusin als einziges Substrat Parkins in einem *in-vitro*-Ansatz mehr als üblich ubiquitiniert wird. Es ist daher denkbar, dass in Abhängigkeit des Antikörpers und der Art der Ubiquitinierung von Mitofusin 1 ein posttranslational modifiziertes Mitofusin nicht durch eine Bandenbildung auf einem *Western Blot* direkt nachzuweisen ist.

Zwei weitere Hinweise stützen die Annahme einer gelungenen *in-vitro*-Ubiquitinierung von Mitofusin 1: Wird der Reaktion eine funktionell beeinträchtigte Parkinmutante (E3) beigemengt, so reagiert das Mitofusin 1-Signal vergleichsweise schwach auf eine Konzentrationserhöhung von UBE2W (Abbildung 3.8, Ergebnisse). Ferner zeigt ein *Western Blot,* der funktionelles Parkin darstellt, entsprechend einer steigenden UBE2W/B-Konzentration ein immer stärkeres, multiples Bandenmuster (Abbildung 3.7, B, Ergebnisse). Die Signale sprechen typischerweise für eine Autoubiquitinierung von Parkin (Chaugule et al,

2011) und somit für den einwandfreien Ablauf der Reaktion in unterschiedlicher Intensität *in vitro*.

Der Beweis der Ubiquitinierung von Mitofusin 1 ist durch die folgende Methode gegeben: Ub-Mitofusin 1 konnte in einem *in-vitro*-Ansatz mittels anti-Ubiquitinantikörpern nachgewiesen werden (Abbildung 3.9, C, Ergebnisse). Dies steht im Einklang mit einigen Zellstudien (Gegg et al, 2010; Rakovic et al, 2011; Ziviani et al, 2010). Unter den selben Umständen zeigte sich im gleichen Reaktionsansatz erneut, dass auch Parkin (His Parkin) mehrfach ubiquitiniert wird (Abbildung 3.9, B, Ergebnisse).

Die für diesen Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche lassen eine E2-unabhängige Autoubiquitinierung von Parkin vermuten: In Abwesenheit von E2- und bei Zugabe von E1-Enzym ist eine verstärkte Bandenbildung oberhalb des Parkinsignals im Ubiquitinierungsansatz zu verzeichnen (Vergleiche Abschnitt 4.4). Die E2-unabhängige Autoubiquitinierung wurde daraufhin von einer anderen Forschungsgruppe postuliert (Chew et al, 2011).

Es scheint, als bilde Parkin eine höhere Aktivität zur Autoubiquitinierung *in vitro* aus, wird der Reaktion Mitofusin 1 beigemengt (Abbildung 3.7, B, Ergebnisse). Vermutlich wird die Autoubiquitinierung Parkins vermehrt dann durchgeführt, wenn ein zu ubiquitinierendes Protein im Reaktionsansatz vorkommt.

Parkin und Mitofusin 1 reagieren beide mit den Enzymen UBE2W und UBE2B in einem artifiziellen Milieu. Die durchgeführten Versuche lassen annehmen, dass UBE2B ein potenterer Reaktionspartner als UBE2W ist. Im Hinblick auf die Bildung eines ubiquitinierten Mitofusin 1 und Parkins werden nach Beimengung von UBE2B ein stärkeres Ubiquitinierungsmuster von Parkin und eine im Verlauf deutlichere Abnahme der Bandenintensität von Mitofusin 1 erreicht (Abbildung 3.7, Ergebnisse). Dies ist für weitere Versuche von Bedeutung, da die optimale Interaktion von Proteinen die Wahrscheinlichkeit eines Reaktionsnachweises immens erhöht.

Parkin benötigt bis auf die in den oben beschriebenen Reaktionsansätzen vorkommenden Proteine kein zusätzliches Enzym zur Ubiquitinierung von Mitofusin. Diese Erkenntnis wäre in zellulären Studien nicht möglich gewesen. Theoretisch wäre zum Beispiel die Ausbildung eines stabilisierenden Proteinkomplexes mit einem bisher nicht beschriebenen Enzym denkbar. Dieses Szenario konnte jedoch aufgrund des *in-vitro*-Ansatzes ausgeschlossen werden.

Als Artefakt ist die linear verlaufende Bandengruppe oberhalb des Parkinsignals der Abbildung 3.7, B, Ergebnisse, im Bereich der ersten vier Parkinbanden zu werten. Die Banden sind in sich nicht schlüssig zu erklären, da eine Ubiquitinierung ohne ein E1-Enzym nicht möglich ist. In ihrer Konfiguration ist sie typisch für das kurzzeitige Verrutschen des Fotofilms in der Dunkelkammer bei starkem Signal (Parkin).

4.3.2 Ubiquitinierungsposition von endogenem Mitofusin 2

Bisher konzentrierte sich die Diskussion der durchgeführten Proteinstudien vor allem auf die Ubiquitinierung von Mitofusin 1. Mit 741 Aminosäuren (Mitofusin 1) und 757 Aminosäuren (Mitofusin 2) sowie identischem funktionellen Aufbau und intrazellulärer Lokalisation unterscheiden sich Mitofusin 1 und 2 nach bisherigem Wissen nur in der eher gewebespezifischen Expression von Mitofusin 2 (Herz- und Skelettmuskel) (Santel et al, 2003). Die Reaktion der beiden Mitofusinvarianten auf mitochondriale Depolarisation ist jedoch die gleiche (Gegg et al, 2010).

Die auf dem Polyacrylamidgel angefärbten, potentiell (ubiquitiniertes) Mitofusin 2 darstellenden Banden der mitochondrialen Fraktion chemisch gestresster SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 3.11, Ergebnisse) sind nach massenspektrometrischer Analyse mit hoher Wahrscheinlichkeit Mitofusin 2 und (multi)ub-Mitofusin 2 (Sequenzübereinstimmungen: 45,18 % beziehungsweise 38,04 %; Tabelle 3.3, Ergebnisse). Mitofusin 2 wird mindestens zweimal ubiquitiniert, was mit bisherigen Publikationen übereinstimmt (Gegg et al, 2010). Das erste Ubiquitin wird der Stelle p.Lys416 angefügt. Ein zweites Molekül wird dem ersten Ubiquitin angehängt, da dem zweifach posttranslational modifizierten Mitofusin 2 (Bande 2 in Abbildung 3.11, Ergebnisse) massenspektrometrisch ebenfalls p.Lys416 als einziger Ort einer Ubiquitinierung nachgewiesen werden konnte. Es liegt daher keine zweifache Monoubiquitinierung von Mitofusin 2 vor, sondern mindestens die Ausbildung einer zweigliedrigen Ubiquitinkette. Spezifische Mutagenese des Lysins, dem das erste Ubiquitin angehängt wurde, bestätigt dieses Ergebnis: Bei der Mutante bildet sich keine in ihrer Signalgebung schwächere Mitofusin 2-Bande nach mitochondrialer Depolarisation aus (Abbildung 3.12, Ergebnisse). Es stellt sich im Weiteren die Frage, welche (regulatorische) Funktion die Ubiquitinierung an dieser Position und mit diesem Muster in Zellen einnimmt. Denn ein Ergebnis der Zellstudie ist, dass Mitofusin 2 *spezifisch* ubiquitiniert wird, also der Ubiquitinierung eine besondere Aufgabe zukommt. Wird die Ubiquitinierungsposition nach wiederholter Reaktion bestimmt, so lässt sich immer p.Lys416 als Stelle der posttranslationalen Modifikation nachweisen.

Allgemein ist bekannt, dass die Veränderung eines Substrats mittels einer viergliedrigen Ubiquitinkette, deren Ubiquitinmoleküle über Lys48 verbunden sind, zur Degradation durch das 26S Ubiquitin-Proteasom-System führt (Thrower et al, 2000). Mono- beziehungsweise Polyubiquitinierung durch über Lys63 verbundene Ubiquitinmoleküle hingegen dienen der intrazellulären Signalgebung, der DNA-Reparatur und dem intrazellulären Transport (Grabbe & Dikic, 2009). Es sprechen mehrere Hinweise dafür, dass durch die Ubiquitinierung von Mitofusin 2 über Lys48 der Weg einer UPS-abhängigen Mitophagie eingeschlagen wird. Sie müssen genau abgewogen werden:

Die Annahme, dass Mitofusin 2 über Ubiquitinierung zur Degradation gelangt, entspräche der anfangs erwähnten Theorie, die den durch oxidativen Stress hervorgerufenen Abbau von Mitofusin beschreibt. Unter Stress käme es zu einer geringeren Fusion von Mitochondrien, was den mitochondrialen und sukzessiv zellulären Untergang nach sich ziehen würde. Das theoretische Konstrukt einer Mitofusin-abhängigen Pathogenese des Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn wäre bestätigt (Gegg et al, 2010; Poole et al, 2010; Ziviani et al, 2010). Es konnte mittels Gelelektrophorese anstatt einer vierfachen jedoch nur eine zweifache Ubiquitinierung von Mitofusin 2 erkannt werden. Dies kann an der geringen Sensitivität der Färbung mit *Colloidal Blue* für den Nachweis höhermolekularer Mitofusinformen liegen. Auch blieb die Art der Ubiquitinierung - über Lys63 oder über Lys48 – noch unklar. So muss zur Ergründung des genauen Weges, den Mitofusin 2 einschlägt, auf Studien verwiesen werden, die eben diesem auf zellulärer Ebene nachgehen (siehe vorangegangene Publikationen).

Ferner befindet sich p.Lys416 im *coiled-coil* 1 (CC1)-Bereich des Enzyms Mitofusin 2. CC1 liegt im cytosolischen Abschnitt des transmembranär-mitochondrial lokalisierten Proteins. Dies lässt sich mit der Erkenntnis vereinbaren, dass Parkin unter oxidativem Stress aus dem Cytoplasma zu den Mitochondrien gelangt (Narendra et al, 2008). In örtlicher Nähe findet sodann die Ubiquitinierung von Mitofusin 2 im Cytoplasma statt. *Coiled-coil*-Domänen beteiligen sich an der Interaktion von Proteinen, was sich beispielhaft an der Rolle dieser helikalen Struktur im Rahmen der Infektion einer CD4-positiven Zelle durch das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) veranschaulichen lässt: Nach Bindung des viralen Glycoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor kommt es zur Exposition des viralen Glycoproteins 41 (gp41), das mit der CD4-positiven Zelle interagiert. Die Entfaltung von gp41 wird strukturell auf seine *coiled-coil*-Domänen zurückgeführt (Cai et al, 2011). Die hierauf folgende Fusion des Virus mit der Wirtszelle basiert somit auf einer Proteininteraktion zwischen gp41 und dem CD4-Rezeptor. Dies ist nur ein Beispiel, welches *coiled-coil*-Sequenzen mit dem Zusammenspiel von Proteinen in Verbindung bringt. Nimmt man an, dass CC1 ebenfalls am Zusammenwirken von Parkin mit Mitofusin beteiligt ist, würde die Ubiquitinierung von Mitofusin an der benannten Stelle durchaus Sinn ergeben. Sie könnte die Funktion von CC1 unterbinden. Eine Folge hiervon wäre, dass Mitofusin in seiner Funktion als mitochondrialer Fusionsfaktor gehemmt würde.

Nebst des Nachweises der Position und Spezifität der Ubiquitinierung von Mitofusin 2 konnte durch die Mutagenese von p.Lys416 bestätigt werden, dass sich das Signal von ubiquitiniertem Mitofusin unter mitochondrialer Depolarisation auf einem *Western Blot* nicht zwingend als zusätzlich bandenbildend abzeichnen muss. Auch ein Intensitätsverlust der Mitofusin 2-Bande spricht für eine Ubiquitinierung (vergleiche Abschnitt 4.3.1).

4.3.3 Zellstudien zu endogenem Mitofusin 1 und 2 und depolarisierenden Agentien

Die Ubiquitinierung von Mitofusin 1 und 2 durch Parkin verhindert die mitochondriale Fusion, fördert die Fragmentation der Mitochondrien und führt zu deren Autophagie (Gegg et al, 2010; Poole et al, 2010; Ziviani et al, 2010). Zur Anwendung in Zellstudien konnte die Ubiquitinierung beider Mitofusine mittels Valinomycin nachgewiesen werden (Abbildung 3.10, Ergebnisse). Ein Effekt des Kalium-transportierenden Ionophors Valinomycin aus der Gruppe der Makrolidantibiotika auf Mitochondrien wurde erstmals 1965 beschrieben (Azzi & Azzone, 1965). Die Chemikalie ist ein gut etabliertes depolarisierendes Agens, welches in mehreren Studien zur Beobachtung der Ubiquitinierung von Mitofusin verwendet wurde (Rakovic et al, 2011; Rakovic et al, 2010). Valinomycin lässt sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Vergleich zum ebenfalls konventionell zur mitochondrialen Depolarisation genutzten Agens Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) als das potentere Mittel zur Herbeiführung einer Ubiquitinierung von Parkin beschreiben. Hierfür setzt man voraus, dass ein im Vergleich stärkeres Bandenmuster über dem Parkinsignal zum selben Zeitpunkt bei gleichen Reaktionsumständen proportional zur depolarisierenden Potenz der Chemikalie ist (Abbildung 3.13, Ergebnisse: multiple Autoubiquitinierung von Parkin nach 60 Minuten durch Valinomycin). Wird auch davon ausgegangen, dass das Ausmaß der Ubiquitinierung von Mitofusin 1 von Parkins Aktivität abhängig ist, so spricht dessen starke Autoubiquitinierung für eine ebenfalls effektivere Ubiquitinierung Mitofusins unter Valinomycinbehandlung. Das Ergebnis steht im Konflikt mit einer Veröffentlichung, die CCCP und Valinomycin keine unterschiedliche Potenz hinsichtlich der Ubiquitinierung von endogenem Mitofusin 2 zuspricht (Rakovic et al, 2011). Dies ist dadurch zu erklären, dass im Fall der zitierten Studie keine Intervallbetrachtung des Ubiquitinierungszustandes von Mitofusin (respektive Parkin) durchgeführt wurde. Auch wurde die Ubiquitinierungsreaktion erst nach 12 Stunden untersucht. Man kann sagen, dass Ubiquitinierungsversuche, die kurzdauernde Reaktionen betrachten, am besten mit Valinomycin durchzuführen sind. In langfristigen Zellstudien ist jedoch kein Unterschied zwischen CCCP und Valinomycin nachzuweisen. Dies ist womöglich auf die jeweilige Substanzkinetik zurückzuführen.

Im Gegensatz zu publizierten Ergebnissen konnte Mitofusin 1 mittels Wasserstoffperoxid nicht in seinen ubiquitinierten Zustand überführt werden ((Rakovic et al, 2011), Abbildung 3.14, Ergebnisse). Die Ursache hierfür mag in der vergleichsweise geringeren Konzentration des applizierten Wasserstoffperoxids liegen. Auch die sehr kurze Halbwertszeit des Moleküls und die damit einhergehende äußerst schwere Inkubation von Zellen mit H_2O_2 können als Gründe angeführt werden. Wasserstoffperoxid ist im Vergleich zu Valinomycin und CCCP ein Zellgift, das einen natürlichen zellulären Stressor darstellt. Es ist jedoch aufgrund seiner Flüchtigkeit kaum zur praktischen Anwendung geeignet.

4.4 Unspezifische multiple Automonoubiquitinierung von Parkin *in vitro*

Eigene Ergebnisse der *in-vitro*-Studien legen nahe, dass Parkin in Abwesenheit von E2-Enzymen zur Autoubiquitinierung fähig ist (siehe Abbildung 3.7, B, Ergebnisse). Die für Proteinprodukte sehr sensitive Färbung mit *Colloidal Blue* veranschaulicht diese Annahme (Abbildung 3.15, Ergebnisse). Nach Formulierung der eigenen Vermutung, die Parkin eine auf sich selbst gerichtete Aktivität zuspricht, veröffentlichte eine andere Forschungsgruppe, dass sich Parkin in Abwesenheit eines E2-Enzyms *in vitro* vielfach einzelne Ubiquitinmoleküle anhängt. Eine Parkinmutante, die nur Parkins IBR-R2-Region aufweist, führt demnach sowohl E2-unabhängige Mono- als auch Polyubiquitinierung durch (Chew et al, 2011). Daraufhin sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erschlossen werden, welche Lysine Parkins eine Verbindung mit Ubiquitin eingehen. Massenspektrometrische Untersuchungen belegten eine E2-unabhängige multiple Automonoubiquitinierung Parkins (Tabelle 3.4, Ergebnisse). Da diese Modifikation für gleiche molekulare Gewichte des Enzyms an unterschiedlichen Stellen und selbst am artifiziellen MBP-*tag* nachgewiesen wurde, ist sie als unspezifisch und willkürlich einzuordnen. Somit muss man vermuten, dass sie keiner zellulären Funktion dient. Desweiteren konnte durch eigene Versuche erstmals bewiesen werden, dass sich Parkin *in vitro* mindestens eine zweigliedrige Ubiquitinkette anhängt (Tabelle 3.4, B, Ergebnisse). Die Fähigkeit zur Kettenbildung wurde bisher nur einer Parkinmutante zugesprochen (Chew et al, 2011).

Die Autoubiquitinierung von Parkin lässt sich, obschon sie nicht zielgerichtet abläuft, durch äußere Faktoren beeinflussen: SUMO-1 ist ein Protein, welches der Familie der *small ubiquitin-related modifier* (SUMO) E3-Ligasen zugeordnet wird. Die Interaktion von SUMO-1 und Parkin führt zu einer Aktivitätssteigerung und vermehrten Autoubiquitinierung Parkins (Um & Chung, 2006). Die Aktivität der Kinase LIMK1 hingegen führt zu verminderter Selbstubiquitinierung von Parkin (Lim et al, 2007). In beiden Fällen stellt sich die Frage, ob eine unterschiedlich starke Autoubiquitinierung ausschließlich Ausdruck der modulierten Aktivität von Parkin ist. Der Vorgang an sich vermag eventuell keiner weiteren Funktion zu dienen. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen diesen Schluss jedenfalls nahe.

Eine Kontaminierung des Reaktionsansatzes mit einem E2-Enzym ließ sich desweiteren ausschließen, da die verwendeten E1- und E2-Proteine bakteriell exprimiert wurden.

4.5 Schlussfolgerungen - Beurteilung der Annahmen

Die unter 1.10 gestellten Annahmen sollen nun beurteilt werden.

1)
Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Sequenzanalyse gezeigt werden, dass die Mutation p.Ser77Asn des *PARL*-Gens eine seltene Ursache von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn ist. In weiteren funktionell wichtigen *Exons* ließen sich keine Veränderungen nachweisen.
Mittels Sequenzierung konnte eine bekannte Mutation im *PARK7*-Gen ermittelt werden. Der Fund bekräftigt die Annahme, dass Mutationen von *PARK7* zu dysfunktionellem DJ-1 führen und ein monogenetisches Parkinson-Syndrom verursachen können. MLPA verwies auf keine weiteren Deletionen oder Duplikationen in den untersuchten Proben. Der Nachweis einer Mutation in einer Patientenkohorte von 68 Patienten lässt vermuten, dass funktionelle Veränderungen von *PARK7* wahrscheinlich häufiger auftreten als bisher angenommen.

2)
Die klinische Diagnosestellung von XDP korreliert stark mit dem Vorliegen von DSC3. So konnte durch die Sequenzanalyse von 44 klinisch unter Krankheitsverdacht stehenden Individuen in 43 Fällen die C>T Transition nachgewiesen werden.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals das Vorliegen des Genotyps 45,X/46,XX und somit ein atypisches Ullrich-Turner-Syndrom als Ursache für die Entwicklung eines XDP-Phänotyps bei einer Frau identifiziert.

3)
Proteinstudien konnten die Ubiquitinierung von Mitofusin durch Parkin unter Ausschluss von Störfaktoren *in vitro* bestätigen. Es wurden unterschiedliche Reaktionsansätze untersucht, wodurch die Teilnahme verschiedener E2-Enzyme an dieser Interaktion nachgewiesen werden konnte.
Mitofusin 2 wird spezifisch ubiquitiniert. Erstmals konnte der genaue Ort der zellulären Ubiquitinierung von Mitofusin 2 durch Parkin mittels Massenspektrometrie bestimmt werden. Es ließ sich beweisen, dass sich die posttranslationale Modifikation an einer Domäne abspielt, die womöglich der Proteininteraktion dient. Somit nährt das Ergebnis die Vermutung, dass die Ubiquitinierung von Mitofusin im Fall von mitochondrialem Stress Teil des durch Parkin initiierten, geordneten Abbaus von Mitochondrien ist.
Verschiedene depolarisierende Agentien haben einen unterschiedlichen Effekt auf Parkin und Mitofusin. Es konnte die stärkere Potenz von Valinomycin im Vergleich zu CCCP bei der

Herbeiführung einer Ubiquitinierungsreaktion in Zellstudien veranschaulicht werden. Eine Wirkung von Wasserstoffperoxid auf Mitofusin im Sinne einer Ubiquitinierung ließ sich nicht nachweisen.

Die Annahme, dass sich Parkin mehrfach unspezifisch monoubiquitiniert wurde durch *in-vitro*-Studien und massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt. Hierfür benötigt Parkin kein E2-Enzym. Parkin führt demnach eine multiple unspezifische Automonoubiquitinierung durch. Da sie nicht gerichtet abläuft, muss ihr wahrscheinlich keine Funktion zugeschrieben werden.

5. Ausblick

Da Mutationen von **PARL** potentiell zu einem genetisch-bedingten Parkinson-Syndrom führen, muss das Augenmerk auf andere Veränderungen als p.Ser77Ala gerichtet werden. Vor allem Mutationen in funktionellen Domänen des Proteins sollten durch Mutationsanalysen großer Studienpopulationen systematisch aufgedeckt werden. Bei vorliegenden Varianten sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass genomische Abweichungen in weiteren Genen vorliegen könnten. Im Falle von Veränderungen in Genen, die mit früh beginnendem Morbus Parkinson assoziiert sind, lässt sich ein additiver Effekt auf Mutationen in *PARL* nicht ausschließen. Auf zellulärer Ebene muss der Stellenwert der Interaktion von PARL mit PINK1 geklärt werden, da PARL nur eine der vielen Proteasen ist, die PINK1 zu spalten vermag.

Gleiches gilt für das Enzym **DJ-1**. Es bestehen Fallbeschreibungen von synergistischen Effekten einer Mutation in *PARK7* und einer weiteren heterozygoten Mutation in anderen Genen, die mit dem Parkinson-Syndrom assoziiert sind. Daher sollte bei Abklärung eines monogenetischen Parkinson-Syndroms im Falle einer DJ-1-Mutation auch an weitere Normvarianten gedacht werden. Die Erkenntnis, dass selbst heterozygote Mutationen von *PARK7* ein genetisch-bedingtes Parkinson-Syndrom nach sich ziehen können, muss in diagnostischen genetischen Untersuchungen Beachtung finden. Die Beurteilung funktioneller Zellstudien kann zum besseren Verständnis des hier zugrunde liegenden Pathomechanismus beitragen.

Die Untersuchung des **XDP**-Patientenkollektivs bestätigte durch das negative Testergebnis eines Patienten und der Enttarnung eines atypischen Ullrich-Turner-Syndroms den Stellenwert genetischer Tests. Diese sollten Familien, in denen Erbkrankheiten bekannt sind, regelhaft zukommen. In Zukunft muss auch, sofern klinische und anamnestische Anhalte hierfür vorliegen, die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Frauen aufgrund einer Monosomie X von XDP betroffen sein können. Vorstellbar ist die systematische genetische Untersuchung sämtlicher Frauen, deren Familien von XDP betroffen sind. Hierdurch könnten milde, subklinische Formen oder besondere genetische Varianten demaskiert werden. Optimal wäre die genetische Testung aller Individuen mit XDP in der Familienanamnese. So wird zurzeit das Genom einer XDP-Patientin, die nicht an einem Ullrich-Turner-Syndrom leidet, auf eine regelhafte (*skewed*) X-chromosomale Inaktivierung untersucht.

Die Proteinstudien der vorliegenden Arbeit bilden die Grundlage für weitere sehr aussichtsreiche Untersuchungen. Die Nachstellung der Ubiquitinierung von **Mitofusin** 1 *in vitro* ermöglicht den direkten Vergleich mit zellulären Reaktionen. Generell stellt sich die Frage nach der Qualität von *in-vitro*-Versuchen: Können sie die Realität abbilden und in Zukunft die sehr aufwändigen zellulären Reaktionen zur Klärung der Modifikation von

Mitofusin ablösen? Die prinzipielle Möglichkeit der Ubiquitinierung von Mitofusin *in vitro* ist eine Grundvoraussetzung zur Beantwortung dieser Fragen. Die Ubiquitinierung von Mitofusin 2 steht *in vitro* noch aus.

Die Spezifität von Ubiquitinierungsreaktionen hinsichtlich der teilnehmenden E2-Enzyme gilt es in groß angelegten Zell- oder *in-vitro*-Studien zu untersuchen. Besteht bei der Ubiquitinierung eventuell eine Gewebespezifität hinsichtlich Potenz oder generellem Ablauf der Reaktion?

Um das Schicksal von Mitofusin 1 und 2 nach ihrer Ubiquitinierung durch Parkin zu ergründen, muss dem genauen Muster dieser posttranslationalen Modifikation nachgegangen werden. Als eines der zentralen Enzyme, welches an der Gestaltung des mitochondrialen Netzes beteiligt ist, kommt der Fragestellung des Weges, den Mitofusin bei oxidativem Stress einschlägt, eine besondere Bedeutung zu.

Nachdem die Ubiquitinierungsposition von Mitofusin 2 *in vivo* erschlossen werden konnte, sollte sie auch für Mitofusin 1 bestimmt werden. Ist dieser Schritt getan, kann erforscht werden, ob Mitofusinmutanten, die kein zu ubiquitinierendes Lysin aufweisen, Zellen derart verändern, dass sie unter Stress nicht mehr zu Mitophagie fähig sind.

Obschon die vorliegende Arbeit die hohe Güte der *in-vitro*-Reaktionen bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf zelluläre Mechanismen verdeutlicht, sollte die multiple unspezifische Autoubiquitinierung von **Parkin** durch massenspektrometrische Untersuchungen auch in zellulären Studien nachgewiesen werden. Diese Versuche könnten dem Sinn der Modifikation noch genauer nachgehen.

6. Zusammenfassung

Die Proteine PARL und DJ-1 werden mit früh beginnendem Morbus Parkinson in Verbindung gebracht: Die Protease PARL ist an der Spaltung von PINK1 beteiligt. Gespaltenes PINK1 phosphoryliert Parkin, was zu dessen Translokation aus dem Cytosol in Richtung Mitochondrien führt. Hierdurch kann Parkin auf die mitochondriale Struktur einwirken. Da PARL indirekt auf Parkin Einfluss nimmt und als Marker dysfunktioneller Mitochondrien gilt, können Mutationen von *PARL* möglicherweise als Ursache für Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn gesehen werden. Diese Arbeit konnte über eine Mutationsanalyse eines Patientenkollektivs ausschließen, dass Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn häufig durch die Mutation p.Ser77Ala hervorgerufen wird. Ebenfalls ließ sich beweisen, dass *PARL*-Mutationen generell als seltene Ursachen für monogenetisch-bedingten Morbus Parkinson anzuführen sind.

DJ-1 (*PARK7*) fungiert unter anderem als enzymatisches Antioxidans zur Pufferung mitochondrialer reaktiver Sauerstoffradikale. So reagiert es auf dysfunktionelle Mitochondrien und ist daher mit früh beginnendem Morbus Parkinson in Verbindung zu bringen. In einer Mutationsanalyse eines Patientenkollektivs konnte eine heterozygote, potentiell pathogene Mutation in *PARK7* bestimmt werden. Zusätzliche, bisher unbekannte genomische Alterationen wurden nicht beobachtet.

Ein weiteres Thema dieser Arbeit ist die Erkrankung eines Patientenkollektivs an der X-chromosomal rezessiv vererbten Krankheit *X-linked dystonia-parkinsonism* (XDP). XDP ist eine nahezu ausschließlich auf den Philippinen vorkommende neurodegenerative Bewegungsstörung. Bei fast allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Individuen konnte eine pathognomonische Transition (DSC3) in einem *Exon* des *TAF1*-Gens nachgewiesen werden. Zudem ließ sich die Ursache der Erkrankung einer Patientin an XDP erklären: Ihr Genotyp entsprach dem eines Mosaiks für eine Monosomie X (45,X/46,XX). Dieser Fall ist die Erstbeschreibung einer Patientin mit XDP und atypischem Ullrich-Turner-Syndrom.

Ferner befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Ubiquitinierung von Mitofusin durch Parkin. Ein zentrales Ereignis der Pathogenese von Morbus Parkinson mit frühem Erkrankungsbeginn ist die fehlerhafte Funktion der protektiven Mitophagie, welche durch Parkin initiiert wird. Die Ubiquitinierung von Mitofusin durch Parkin führt zum Abbau von Mitofusin und dadurch letztlich zur Autophagie dysfunktioneller Mitochondrien. Teilaspekte der Interaktion der beiden Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit genau untersucht werden. Ein Ergebnis hiervon war, dass Parkin Mitofusin 2 spezifisch an einer cytosolischen Domäne ubiquitiniert. Parkin bestimmt somit maßgeblich den weiteren zellulären Weg von Mitofusin und letztlich das Schicksal von Zellen, die unter oxidativem Stress stehen. In der Funktion einer E3-Ligase ist hieran nur Parkin beteiligt.

Ebenfalls war es möglich, Reagenzien und Reaktionsumstände so zu bestimmen, dass die Ubiquitinierung von Mitofusin 1 *in vitro* mit verschiedenen E2-Enzymen nachgestellt werden konnte. Auch die multiple unspezifische Autoubiquitinierung von Parkin und dessen Interaktion mit mehreren E2-Enzymen ließ sich *in vitro* beweisen.

Die vorliegende Arbeit veranschaulicht somit die vielfältigen funktionellen und molekulargenetischen Aspekte des monogenetischen Parkinson-Syndroms.

7. Literaturverzeichnis

Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, Blanchard-Fillion B, Greco TM, Thomas B, Ko HS, Sasaki M, Ischiropoulos H, Przedborski S, Dawson TM, Dawson VL (2007) DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 14807-14812

Anvret A, Blackinton JG, Westerlund M, Ran C, Sydow O, Willows T, Hakansson A, Nissbrandt H, Belin AC (2011) DJ-1 Mutations are Rare in a Swedish Parkinson Cohort. *Open Neurol J* **5:** 8-11

Azzi A, Azzone GF (1965) Potassium-Transport-Linked Swelling Induced by Valinomycin in Liver Mitochondria. *Biochem J* **96:** 1C-2C

Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* **38:** 515-517

Blackinton J, Lakshminarasimhan M, Thomas KJ, Ahmad R, Greggio E, Raza AS, Cookson MR, Wilson MA (2009) Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1. *J Biol Chem* **284:** 6476-6485

Cai L, Gochin M, Liu K (2011) Biochemistry and biophysics of HIV-1 gp41 - membrane interactions and implications for HIV-1 envelope protein mediated viral-cell fusion and fusion inhibitor design. *Curr Top Med Chem* **11:** 2959-2984

Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 9103-9108

Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, Shaw GS, Walden H (2011) Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J* **30:** 2853-2867

Chew KC, Matsuda N, Saisho K, Lim GG, Chai C, Tan HM, Tanaka K, Lim KL (2011) Parkin mediates apparent E2-independent monoubiquitination in vitro and contains an intrinsic activity that catalyzes polyubiquitination. *PLoS One* **6:** e19720

Chu CT (2010) A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. *Hum Mol Genet* **19:** R28-37

Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126:** 163-175

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

Collett-Solberg PF, Gallicchio CT, Coelho SC, Siqueira RA, Alves ST, Guimaraes MM (2011) Endocrine diseases, perspectives and care in Turner syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **55:** 550-558

Cookson MR (2010) DJ-1, PINK1, and their effects on mitochondrial pathways. *Mov Disord* **25 Suppl 1:** S44-48

Cookson MR, Bandmann O (2010) Parkinson's disease: insights from pathways. *Hum Mol Genet* **19:** R21-27

Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S, Desmond H, Kjaer S, Loh SH, Renton AE, Harvey RJ, Whitworth AJ, Martins LM, Abramov AY, Wood NW (2011) PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet* **20:** 867-879

Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78:** 399-434

Evidente VG, Esteban RP, Hernandez JL, Natividad FF, Advincula J, Gwinn-Hardy K, Hardy J, Singleton A (2004a) Smell testing is abnormal in 'lubag' or X-linked dystonia-parkinsonism: a pilot study. *Parkinsonism Relat Disord* **10:** 407-410

Evidente VG, Nolte D, Niemann S, Advincula J, Mayo MC, Natividad FF, Muller U (2004b) Phenotypic and molecular analyses of X-linked dystonia-parkinsonism ("lubag") in women. *Arch Neurol* **61:** 1956-1959

Evidente VGH (1993) X-Linked Dystonia-Parkinsonism.

Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* **19:** 4861-4870

Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12:** 119-131

Glauser L, Sonnay S, Stafa K, Moore DJ (2011) Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J Neurochem* **118:** 636-645

Gonzalez-Polo R, Niso-Santano M, Moran JM, Ortiz-Ortiz MA, Bravo-San Pedro JM, Soler G, Fuentes JM (2009) Silencing DJ-1 reveals its contribution in paraquat-induced autophagy. *J Neurochem* **109:** 889-898

Grabbe C, Dikic I (2009) Functional roles of ubiquitin-like domain (ULD) and ubiquitin-binding domain (UBD) containing proteins. *Chem Rev* **109:** 1481-1494

Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ (2003) Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 4078-4083

Griffin EE, Chan DC (2006) Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* **281:** 16599-16606

Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC (1985) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci* **36:** 231-236

Hill RB, Pellegrini L (2010) The PARL family of mitochondrial rhomboid proteases. *Semin Cell Dev Biol* **21:** 582-592

Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS (2009) Identification of a novel Zn2+-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem* **284:** 14978-14986

Jeyaraju DV, McBride HM, Hill RB, Pellegrini L (2011) Structural and mechanistic basis of Parl activity and regulation. *Cell Death Differ* **18:** 1531-1539

Jeyaraju DV, Xu L, Letellier MC, Bandaru S, Zunino R, Berg EA, McBride HM, Pellegrini L (2006) Phosphorylation and cleavage of presenilin-associated rhomboid-like protein (PARL) promotes changes in mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 18562-18567

Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* **191:** 933-942

Jones N (2010) PINK1 targets dysfunctional mitochondria for autophagyin Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* **6:** 181

Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Sato F, Hatano T, Eguchi H, Hattori N (2010) PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett* **584:** 1073-1079

Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D, Gygi SP, Goldberg AL (2007) Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* **282:** 17375-17386

Klein C, Westenberger A (2012) Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2:** a008888

Kobayashi T, Morone N, Kashiyama T, Oyamada H, Kurebayashi N, Murayama T (2008) Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research. *PLoS One* **3:** e3822

Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, Wolburg H, Gizatullina Z, Gellerich FN, Woitalla D, Riess O, Kahle PJ, Proikas-Cezanne T, Kruger R (2010) Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One* **5:** e9367

Kumar KR, Lohmann K, Klein C (2012) Genetics of Parkinson disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol* **25:** 466-474

Lang AE, Lozano AM (1998a) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* **339:** 1044-1053

Lang AE, Lozano AM (1998b) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* **339:** 1130-1143

Lee LV, Maranon E, Demaisip C, Peralta O, Borres-Icasiano R, Arancillo J, Rivera C, Munoz E, Tan K, Reyes MT (2002) The natural history of sex-linked recessive dystonia parkinsonism of Panay, Philippines (XDP). *Parkinsonism Relat Disord* **9:** 29-38

Lee LV, Rivera C, Teleg RA, Dantes MB, Pasco PM, Jamora RD, Arancillo J, Villareal-Jordan RF, Rosales RL, Demaisip C, Maranon E, Peralta O, Borres R, Tolentino C, Monding MJ, Sarcia S (2011) The unique phenomenology of sex-linked dystonia parkinsonism (XDP, DYT3, "Lubag"). *Int J Neurosci* **121 Suppl 1:** 3-11

Lim MK, Kawamura T, Ohsawa Y, Ohtsubo M, Asakawa S, Takayanagi A, Shimizu N (2007) Parkin interacts with LIM Kinase 1 and reduces its cofilin-phosphorylation activity via ubiquitination. *Exp Cell Res* **313:** 2858-2874

Litteljohn D, Nelson E, Bethune C, Hayley S (2011) The effects of paraquat on regional brain neurotransmitter activity, hippocampal BDNF and behavioural function in female mice. *Neurosci Lett* **502:** 186-191

Logan T, Clark L, Ray SS (2010) Engineered disulfide bonds restore chaperone-like function of DJ-1 mutants linked to familial Parkinson's disease. *Biochemistry* **49:** 5624-5633

Lucas JI, Marin I (2007) A new evolutionary paradigm for the Parkinson disease gene DJ-1. *Mol Biol Evol* **24:** 551-561

Makino S, Kaji R, Ando S, Tomizawa M, Yasuno K, Goto S, Matsumoto S, Tabuena MD, Maranon E, Dantes M, Lee LV, Ogasawara K, Tooyama I, Akatsu H, Nishimura M, Tamiya G (2007) Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet* **80:** 393-406

Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* **189:** 211-221

McCoy MK, Cookson MR (2011) DJ-1 regulation of mitochondrial function and autophagy through oxidative stress. *Autophagy* **7:** 531-532

McQuibban GA, Bulman DE (2011) The PARLance of Parkinson disease. *Autophagy* **7:** 790-792

McQuibban GA, Saurya S, Freeman M (2003) Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* **423:** 537-541

Meulener MC, Xu K, Thomson L, Ischiropoulos H, Bonini NM (2006) Mutational analysis of DJ-1 in Drosophila implicates functional inactivation by oxidative damage and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 12517-12522

Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogus H, Dalkara T, Ozer N (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Mov Disord* **19:** 544-548

Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183:** 795-803

Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* **8:** e1000298

Narendra DP, Youle RJ (2011) Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxid Redox Signal* **14:** 1929-1938

Nolte D, Niemann S, Muller U (2003) Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:** 10347-10352

Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* **31:** 763-780

Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* **279:** 18614-18622

Park JS, Mehta P, Cooper AA, Veivers D, Heimbach A, Stiller B, Kubisch C, Fung VS, Krainc D, Mackay-Sim A, Sue CM (2011) Pathogenic effects of novel mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) causing Kufor-Rakeb syndrome, a form of early-onset parkinsonism. *Hum Mutat* **32:** 956-964

Pellegrini L, Scorrano L (2007) A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death Differ* **14:** 1275-1284

Poole AC, Thomas RE, Yu S, Vincow ES, Pallanck L (2010) The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PLoS One* **5:** e10054

Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, Arango M, Rudland PS, Yee L, Carraway KL (2002) Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *Int J Cancer* **99:** 783-791

Rakovic A, Grunewald A, Kottwitz J, Bruggemann N, Pramstaller PP, Lohmann K, Klein C (2011) Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS One* **6:** e16746

Rakovic A, Grunewald A, Seibler P, Ramirez A, Kock N, Orolicki S, Lohmann K, Klein C (2010) Effect of endogenous mutant and wild-type PINK1 on Parkin in fibroblasts from Parkinson disease patients. *Hum Mol Genet* **19:** 3124-3137

Rakovic A, Shurkewitsch K, Seibler P, Grunewald A, Zanon A, Hagenah J, Krainc D, Klein C (2012) PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)-dependent ubiquitination of endogenous Parkin attenuates mitophagy: study in human primary fibroblasts and induced pluripotent stem (iPS) cell-derived neurons. *J Biol Chem*

Ramsey CP, Giasson BI (2010) Identification and characterization of a novel endogenous murine parkin mutation. *J Neurochem* **113:** 402-417

Rivkees SA, Hager K, Hosono S, Wise A, Li P, Rinder HM, Gruen JR (2011) A highly sensitive, high-throughput assay for the detection of Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **96:** 699-705

Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* **116:** 2763-2774

Shi G, Lee JR, Grimes DA, Racacho L, Ye D, Yang H, Ross OA, Farrer M, McQuibban GA, Bulman DE (2011) Functional alteration of PARL contributes to mitochondrial dysregulation in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **20:** 1966-1974

Sik A, Passer BJ, Koonin EV, Pellegrini L (2004) Self-regulated cleavage of the mitochondrial intramembrane-cleaving protease PARL yields Pbeta, a nuclear-targeted peptide. *J Biol Chem* **279:** 15323-15329

Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* **5:** 213-218

Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia JH, Xia K, Zhang Z (2006) Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **15:** 1816-1825

Thomas KJ, McCoy MK, Blackinton J, Beilina A, van der Brug M, Sandebring A, Miller D, Maric D, Cedazo-Minguez A, Cookson MR (2011) DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum Mol Genet* **20:** 40-50

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19:** 94-102

Um JW, Chung KC (2006) Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. *J Neurosci Res* **84:** 1543-1554

Urban S (2010) Taking the plunge: integrating structural, enzymatic and computational insights into a unified model for membrane-immersed rhomboid proteolysis. *Biochem J* **425:** 501-512

van der Veen AG, Ploegh HL (2012) Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem* **81:** 323-357

Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrane J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K, Przedborski S (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107:** 378-383

Vorsanova SG, Yurov YB, Ulas VY, Demidova IA, Sharonin VO, Kolotii AD, Gorbatchevskaia NL, Beresheva AK, Soloviev IV (2001) Cytogenetic and molecular-cytogenetic studies of Rett syndrome (RTT): a retrospective analysis of a Russian cohort of RTT patients (the investigation of 57 girls and three boys). *Brain Dev* **23 Suppl 1:** S196-201

Vyas I, Heikkila RE, Nicklas WJ (1986) Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem* **46:** 1501-1507

Waters CH, Takahashi H, Wilhelmsen KC, Shubin R, Snow BJ, Nygaard TG, Moskowitz CB, Fahn S, Calne DB (1993) Phenotypic expression of X-linked dystonia-parkinsonism (lubag) in two women. *Neurology* **43:** 1555-1558

Weihofen A, Ostaszewski B, Minami Y, Selkoe DJ (2008) Pink1 Parkinson mutations, the Cdc37/Hsp90 chaperones and Parkin all influence the maturation or subcellular distribution of Pink1. *Hum Mol Genet* **17:** 602-616

Wilson MA (2011) The role of cysteine oxidation in DJ-1 function and dysfunction. *Antioxid Redox Signal* **15:** 111-122

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* **26 Suppl 1:** S1-58

Wu YC, Liu ST (2010) A sequence that affects the copy number and stability of pSW200 and ColE1. *J Bacteriol* **192:** 3654-3660

Xiong N, Long X, Xiong J, Jia M, Chen C, Huang J, Ghoorah D, Kong X, Lin Z, Wang T (2012) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol* **42:** 613-632

Yokoyama H, Kuroiwa H, Kasahara J, Araki T (2011) Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **71:** 269-280

Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:** 13354-13359

Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ (2010) Drosophila parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107:** 5018-5023

8. Anhang

8.1 Tabellen

Bekannte Mutationen und Varianten der Genkopien von *PARK7* werden in Tabelle 8.1 aufgeführt. Tabelle 8.2 fasst die bisher bekannten Funktionen von DJ-1 zusammen.

***PARK7*-Mutationen und Genkopievarianten**		
Missense- und *Nonsense*-Mutationen, Veränderungen des Leserasters		
Region	cDNA-Ort	Protein-Ort
Exon 2	c.29T>C	p.Leu10Pro
Exon 2	c.78G>A	p.Met26Ile
Exon 3	c.115G>T	p.Ala39Ser
Exon 3	c.192G>C	p.Glu64Asp
Exon 5	c.293G>A	p.Arg98Gln
Exon 5	c.310G>A	p.Ala104Thr
Exon 7	c.446A>C	p.Asp149Ala
Exon 7	c.471_473delGCC	p.Pro158del
Exon 7	c.487G>A	p.Glu163Lys
Exon 7	c.497T>C	p.Leu166Pro
Exon 7	c.511G>T	p.Ala171Ser
Exon 7	c.523A>G	p.Lys175Glu
Exon 7	c.535G>A	p.Ala179Thr
Splice-Varianten, stille Varianten und Varianten untranslatierter Bereiche		
Exon 4	c.234C>T	p.Gly78
IVS4	-	p.?
Exon 5	c.294G>A	p.Arg98
IVS5	-	p.?
Exon 7	c.480C>A	p.Thr160
Exon 7	c.501A>G	p.Ala167
Exon 7	c.558T>C	p.Val186
Exon 7	c.690_691insA	p.?
Exon 7	c.773G>A	p.?
Variation der Genkopien		
Exon 1 - 5	c.1_322del	p.?
Exon 1 - 5	c.(-129-?)_(322+?)dup	p.?
Exon 5	c.(253-?)_(107+?)del	p.Ser85ValfsX10
Exon 5 - 7	c.(253-?)_(795+?)del	p.?

Tabelle 8.1 *Pathologische Mutationen des PARK7*-Gens. Nach *(Nuytemans et al, 2010)*.

Funktionen von DJ-1
Antioxidans
Interaktion mit ras
Fertilitätskontrolle
Modulation des Androgenrezeptorsignals
Histondeacetylierung
Chaperon
Protease
Transkriptionsregulation
Modulation des Dopaminrezeptorsignals
Apoptosesuppression mittels Kinaseinteraktion
Suppression von PTEN
Beeinflussung des p53-Signals
Beeinflussung der Akt1-Funktion
Hochregulation der Glutathionsynthese oder der Synthese von Hitzeschockproteinen
Stabilisierung antioxidativ wirkender Transkriptions-faktoren
Interaktion mit Parkin und PINK1

Tabelle 8.2. *Bisher beschriebene Funktionen des Proteins DJ-1.* Nach (Cookson, 2010).

8.2 Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
α-	anti-
µ	mikro
bp	Basenpaare
dH_2O	zweifach destilliertes Wasser
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
g	Gramm; g-Kraft
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
m	milli
min	Minute(n)
n	nano
nt	Nukleotid(e)
p	pico
s	Sekunde(n)
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt

8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ferner wurden keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel verwendet.

Sascha Heinitz Lübeck, 01.11.2013

8.4 Angabe der Aktenzeichen sowie Daten der für das Forschungsvorhaben benötigten Genehmigungsschreiben der Ethikkommission

1)
Klinische und apparative Untersuchung der XDP-Patienten, molekulargenetische Untersuchung zu Ursachen von XDP:
Aktenzeichen IRB-MMC 10-073, 31.08.2010

2)
Molekulargenetische Untersuchung zu Ursachen des Parkinson-Syndroms als Grundlage für Phänotyp-Genotyp-Korrelationen:
Aktenzeichen 04-155, 02.03.2006

8.5 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Professor Dr. Klein für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und für die Möglichkeit, eine Dissertation an ihrem Institut anzufertigen.
Für die intensive Betreuung und Einarbeitung in die Methodik danke ich Frau Dr. Westenberger.
Auch bedanke ich mich bei Frau Prof. Klein und Frau Dr. Westenberger für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.
Ich bin sehr froh, dass man es mir ermöglicht hat, Kongressen und anderen Fortbildungsmöglichkeiten beizuwohnen.
Ferner gilt allen Mitgliedern der Forschungsgruppe des Instituts für Neurogenetik mein Dank. Besonders möchte ich hier Heike Pawlack, Susen Winkler, Anne Grünewald, Karen Freimann, Aloysius Domingo und Philip Seibler erwähnen. Hervorzuheben ist die Hilfe und Unterstützung von Dr. Rakovic bei der Lösung methodischer und theoretischer Probleme.
Meinen Freunden gebührt für die ständige Motivation ein besonderes Dankeschön.
Mein ganz besonderer und von Herzen kommender Dank gilt meiner lieben Familie, die mich stets in allen Lebenslagen unterstützt. Ohne sie wäre ich nicht der, der ich bin.

8.6 Lebenslauf

Dieser Abschnitt enthält persönliche Daten, die nicht Teil der online-Veröffentlichung sind.

8.7 Poster und Veröffentlichungen

Poster

- **Heinitz S**, Djarmati A, Hanses C, Rakovic A, Klein C (2011) Parkin-mediated ubiquitination of Mitofusin proteins in a human fibroblast model and in vitro. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Wiesbaden*

- **Heinitz S**, Rosales RL, Lee LV, Jamora RD, Ng AR, Freimann K, Lohmann K, Walter U, Nagel I, Rolfs A, Gölnitz U, Gillessen-Kaesbach G, Dressler D, Klein C, Westenberger A (2012) Genetic cause of X-linked dystonia-parkinsonism in a female patient. *Kongress der Movement Disorder Society, Dublin*

Veröffentlichungen

- **Heinitz S**, Klein C, Djarmati A (2011) The p.S77N presenilin-associated rhomboid-like protein mutation is not a frequent cause of early-onset Parkinson's disease. *Movement Disorders*

- Westenberger A, Rosales RL, **Heinitz S**, Freimann K, Lee LV, Jamora RD, Ng AR, Domingo A, Lohmann K, Walter U, Gölnitz U, Rolfs A, Nagel I, Gillessen-Kaesbach G, Siebert R, Dressler D, Klein C (2013) X-Linked dystonia-parkinsonism manifesting in a female patient due to atypical Turner Syndrome. *Movement Disorders*