

# Erforschung mitochondrialer Phänotypen in einem humanen *ex vivo* Modell mit A30P alpha-Synuklein Mutation

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors in Naturwissenschaften

der mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
und  
der medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Vorgelegt von

Andreas Hummel  
aus Stuttgart, Deutschland

10/2015

Tag der mündlichen Prüfung      17.05.2016  
Dekan der Math. Nat. Fakultät:      Prof. Dr. W. Rosenstiel  
Dekan der medizinischen Fakultät: Prof. Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof.Dr. Rejko Krüger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Philipp Kahle

Prüfungskommission: Prof. Dr. Rejko Krüger  
Prof. Dr. Philipp Kahle  
Prof. Dr. Manuela Neumann  
Prof. Dr. Olaf Riess

Ich erkläre, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Erforschung mitochondrialer Phänotypen in einem humanen *ex vivo* Modell mit A30P alpha-Synuklein Mutation“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den \_\_\_\_\_

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Rejko Krüger, der mir es ermöglicht hat meine Dissertation am Hertie Institut für klinische Hirnforschung anzufertigen. Die Erfahrungen die ich in seinem Labor sammeln durfte werden mir auf meinem weiteren Lebensweg von unschätzbaren Wert sein. Ein großer Dank gilt auch meinen Kollegen Carolin Obermaier für ihre Unterstützung in allen genetischen Fragen, Diana Großmann, Dr. Guido Krehbiel und natürlich Brigitte Maurer, die unser Labor am Laufen hielt.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Horst Herbert und Dr. Tina Lampe von der Graduate School in Tübingen für ihr unvergleichbares Engagement. Ebenso möchte ich mich bei den Mitgliedern meines Advisory Boards bedanken. Die Anregungen und Ideen von Prof. Dr. Olaf Riess und Prof. Dr. Manuela Neumann waren immer eine große Hilfe.

Nicht zu vergessen sind die Kooperationspartner der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Gasser, wie Benjamin Schmid, David Schöndorf, Michela Deleidi und Susanna Hoffmann für deren Unterstützung bei meinem Projekt.

Ein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lerche. Deren Team unaufgefordert bei allen Problemen zur Seite stand. Ohne die Hilfe von Stephan Müller, Dr. Snezana Maljevic und vor allem Heidi Löffler, wäre von meinem Privatleben nichts übrig geblieben. Weiterer Dank gilt Dr. Julian Schubert und Dr. Yvonne Füll für die netten Gespräche und Diskussionen.

Ich möchte auch der Arbeitsgruppe von Dr. Jared Sternecker danken. Um die Technik der iPS-Zellen zu erlernen, war ich gezwungen deren Labor am MPI in Münster für sechs Monate zu belagern. Dr. Peter Reinhardt, Lydia Wagner, Michael Glatzer, Dr. Jan Bruder, Dr. Susanne Höing und Kerstin Hergarten ließen die Zeit wie im Flug vergehen. Deren Unterstützung bei meinem Projekt war unvergleichlich.

Nicht zu vergessen ist Prof. Dr. Philipp Kahle, dessen Gesellschaft immer eine Bereicherung darstellte.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Lagen immer wieder unterstützt und ermutigt hat. Ohne die Unterstützung von meiner Freundin Chrisoula Makri, ihrer Familie und unserer Tochter Zoy Maria wäre ich heute nicht da wo ich jetzt bin.

Vielen Dank

# Inhaltsverzeichnis

1.0 Abkürzungen.....	1
2.0 Überblick.....	8
3.0 Overview.....	10
4.0 Einleitung.....	11
4.1 Die Parkinson-Krankheit (PK).....	11
4.1.1 Epidemiologie und Klinik.....	11
4.1.2 Behandlungsmöglichkeiten.....	13
4.2 Pathogenese von PK.....	14
4.2.1 Multifaktorielle Genese der sporadischen PK.....	15
4.2.2 Monogenetische Form.....	16
4.3 Alpha-Synuklein (a-Syn).....	19
4.3.1 A-Syn und die PK.....	20
4.3.2 Die Struktur von a-Syn.....	22
4.3.3 Die Interaktion von a-Syn mit Membranen.....	23
4.3.4 Die Rolle von a-Syn bei der Ausschüttung von Neurotransmittern (NT) .....	24
4.3.5 Fehlfaltungen und Aggregation von a-Syn.....	25
4.3.6 Die Bedeutung der mitochondrialen Dynamik bei der familiären PK.....	27
4.4 Modellsysteme zur Nachbildung neurodegenerativen Erkrankungen.....	30
4.4.1 Einführung in die Generierung von iPS-Zellen.....	32
4.4.2 Neuronale Vorläuferzellen als Basis für die mittelhirnspezifische Differenzierung zu dopaminergen Neuronen.....	34
4.4.3 Genetische Modifikation somatischer Zellen.....	36
4.5 Ziele dieser Doktorarbeit.....	37
5.0 Material und Methoden.....	38
5.1 Material.....	38
5.1.1 Virale Vektoren.....	38
5.1.2 Primersequenzen.....	38
5.1.3 Zelllinien.....	39
5.1.4 Zellkulturmedien.....	40
5.1.5 Puffer und Lösungen.....	41
5.1.6 Kits.....	42
5.1.7 Antikörper und Fluoreszenzmarker.....	43
5.1.8 Chemikalien.....	44

5.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	46
5.1.10 Laborgeräte.....	47
5.1.11 Software.....	48
5.2 Methoden.....	49
5.2.1 Hautbiopsie und Zellkultur für Fibroblasten.....	49
5.2.2 Gewinnung von embryonalen Maus Fibroblasten zur Co-Kultur.....	50
5.2.3 Retrovirale Reprogrammierung der Fibroblasten.....	52
5.2.4 iPS-Zellkultur.....	54
5.2.5 Genkorrektur mit Transkription activator-like effector nuclease (TALEN).....	55
5.2.6 Generierung von neuronalen Vorläuferzellen (smNPC) und deren Zellkultur..	56
5.2.7 Mittelhirnspezifische neuronale Differenzierung.....	57
5.2.8 Mikroskopie.....	58
5.2.8.1 Immunhistochemie.....	58
5.2.8.2 Mikroskopie mit fixierten Zellen.....	59
5.2.8.3 Mikroskopie mit lebenden Zellen.....	60
5.2.8.3.1 Bestimmung des neuronalen Auswuchses.....	60
5.2.8.3.2 Bestimmung des neuronalen Auswuchses (nach Reinhardt und Schmid et al. 2013).....	61
5.2.8.3.3 Bestimmung der mitochondrialen Morphologie.....	61
5.2.8.3.4 Bestimmung des mitochondrialen Transports in Neuriten.....	62
5.2.9 Western Blot.....	63
5.2.10 Real time Polymerase Kettenreaktion (rtPCR).....	64
5.2.11 Karyogramm und DNA-Chip Untersuchung (DNA-ChIP).....	65
6.0 Ergebnisse.....	67
6.1 Charakterisierung der iPS-Zellen.....	67
6.1.1 Abschaltung der viralen Vektoren.....	67
6.1.2 Expression von Stammzellmarkern.....	70
6.1.3 Differenzierung in die drei Keimblätter.....	76
6.1.4 Validierung der Unversehrtheit des Genoms mittels Karyogramm und DNA-Chip Untersuchung.....	82
6.2 Charakterisierung der smNPCs.....	84
6.2.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der differenzierten smNPCs.....	91
6.3 Einfluss von a-Syn auf den Auswuchs von Neuriten.....	94
6.4 Neuronale mitochondriale Morphologie.....	96

6.5 Mitochondrialer Transport in Neuriten.....	98
7.0 Diskussion.....	102
7.1 Generierung der iPS-Zellen.....	102
7.2 Charakterisierung der iPS-Zellen.....	103
7.3 Differenzierung zu smNPCs und deren Charakterisierung.....	107
7.4 Einfluss der A30P a-Syn Mutante auf neuronalen Auswuchs.....	108
7.5 Der Einfluss von A30P a-Syn auf die mitochondriale Morphologie.....	113
7.6 Einfluss der A30P a-Syn Mutation auf den mitochondrialen Transport in Neuriten .....	117
7.7 Zusammenfassung.....	122
8.0 Referenzen.....	126

## 1.0 Abkürzungen

Name	Abkürzung
1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	MPTP
Abbildung	Abb
adenomatosis polyposis coli	APC
Adenosindiphosphat	ADP
Adenosine-Tri-Phosphatase 13A2	ATPase 13A2
Adenosintriphosphat	ATP
alpha-Synklein	a-Syn
alpha-Synuclein	a-Syn
Amyotrophe laterale Sclerose	ALS
Antikörper	AK
Artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit	aCSF
artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit	aCSF
Aspekt Ratio	AR
Auflösung eines optischen Gerätes	d
äußere mitochondriale Membran	ämM
autosomal dominant	AD
autosomal rezessive Formen der PK	AR-PK
beta-Catenin	b-cat
beta-Synuclein	b-Syn
Bone morphogenic protein	BMP
Brain Derived Neurotrophic Factor	BDNF



Caenorhabditis elegans	c. elegans, Fadenwurm
Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer	COMT-Hemmer
central nervous system	CNS
Chaperon vermittelte Autophagie	CMA, engl. Chaperone Mediated Autophagy
Clustered regularly interspaced short palindromic repeat	CRISPRs
crisprRNS	crRNS
CRISPS-assozierte Gene	cas
Cystein-Strang-Protein alpha	Csp-a, engl. Cystein-String-Protein alpha
Desmethyprodin	MPPP
DNA (Cytosin-5) Methyltransferase 3-beta	DNMT3B
DNA-Chromatin immunoprecipitation	DNA-ChIP
dopaminerge Neurone	dN
dopaminerge Neurone des Mittelhirns	msDN
Dopaminrezeptoren	dR
Dopamintransporter	DAT
Drosophila melanogaster	d. melanogaster, Fruchtfliege
Dynamin-verwandtes Protein-1	Drp-1, engl. Dynamin-related Protein-1
epidermaler Wachstumsfaktor	EGF, engl. Epidermal growth factor
Erdbeschleunigung	g
Eucayotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1
F-Box Only Protein	FBXO7
Fibroblasten Wachstumsfaktor 8	FGF8, engl. Fibroblast Growth Factor 8
Fission-1	Fis-1
Fluoreszenz assoziierte Zellsortierung	FACS, engl. fluorescence associated cell sorting

Form Faktor	FF
Fötale Kälber-Serum	FCS
freie Sauerstoffradikale	ROS engl. reaktive oxigen species
gamma-Synuklein	g-Syn
genome wide association studies	GWAS
Glia Derived Neurotrophic Factor	GDNF
Globus Pallidus pars internus	GPI
Glycogen-Synthase-Kinase 3	GSK3
Grad Celsius	°C
Gramm	g
Guanosin-Triphosphat	GTP
Human embryonal kidney-Medium	HEK-Medium
Human Stem Cell Medium	hES-Medium
humanen Telomerase reverse Transkriptase	hTERT
Immunhistochemie	IHC
induced pluripotent stem cells	iPSCs
induzierbare pluripotente Stamm-Zellen	iPS-Zellen
innere mitochondriale Membran	imM
Januskinase/Transducer and activator of transcription	JAK/STAT
Kaliumströme	Kv
Kilogramm	kg
Knock-out	KO
Krüppel-ähnlicher Faktor 4	Klf4, engl. Krüppel-like Factor4
Leucine-rich repeat kinase 2	LRRK2
Leukämie inhibierenden Faktor	LIF
Levo-Dopa	L-Dopa

Lipoproteinrezeptor-verwandtes Protein 5/6	LRP5/6
Liter	l
Makorin Ring Finger Protein 1	MKRN1
Meter	m
microtubule associated protein light chain 3	LC3
mid-brain specific dopaminergic neurons	msdNs
Mikroliter	$\mu$ l
Mikrometer	$\mu$ m
Milligramm	$\mu$ g
Milliliter	ml
Millimeter	mm
Millisekunde	ms
Millivolt	mV
Minute	min
MIRO-1	mitochondriale Rho GTPase-1
mitochondrialer DNA	mtDNA
mitochondriales Fissionsprotein	Mff, engl. Mitochondrial fission protein
Mitofusin-1	Mfn-1
Mitofusin-2	Mfn-2
Monoaminoxigenase-Hemmer	MAO-Hemmer
Mouse embryonal fibroblast-Medium	MEF-Medium
Nanoampere	nA
Nanogramm	ng
Nanometer	nm
natives Ziegen Serum	NGS
Natriumströme	Nav

neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4	Nedd4
neuronal Vorläuferzellen	NPC, engl. Neuronal precursor cells
Neurotransmitter	NT
Nicht A $\beta$ -Bestandteil	NAC, eng. Non-A $\beta$ component
Nonessential Amino Acids	NEAA
numerische Apertur	NA
Octamer binding transcription factor 4	Oct4
Optic Atrophy 1	OPA1
Paired Box Protein 6	Pax6
Parkinson Krankheit	PK
Parkinson's Disease	PD
Phosphat gepufferte Saline	PBS
phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1	PINK1
Platelet derived growth factor alpha	PDGF-a
Polo-like Kinase	PLK
Prion Promoter	mPrP
Rapid Eye Movement	REM
Real time Polymerase Kettenreaktion	rtPCR
rhomboid family protease presenilin-associated rhomboid-like protein	PARL
Sekunde	s
Seven in Absentia Homolog 2	SIAH-2
Sex-determinierende Region Y Box-Protein 2	Sox2
small interfering RNS	siRNA

Small Molecule NPCs	smNPCs
Sodium Dodecyl Sulfat	SDS
Soluble n-ethylamine-sensitive factor Attachment protein Receptor	SNARE
Sonic Hedgehog	Shh
Stadium-spezifisches embryonales Antigen	SSEA3, engl. Stage specific embryonal antigen
Standardisierte Arbeitsprozesse	SOP eng. standard operating procedures
strukturierte Beleuchtung	SIM, engl. structured illumination microscopy
Stunde	h
substantia nigra pars compacta	SNpc
subthalamischer Nukleus	STN
Superoxide Dismutase 1	SOD1
synaptosomal assoziiertes Protein 25	Snap-25
Teratocarcinoma-derived Growth Factor 1	TDGF1
terminaler Deoxynukleotidyl-Transferase vermittelter Färbung von Doppelstrangbrüchen	TUNEL
Thyrosinhydroxylase	TH
tiefe Hirnstimulation	DBS, engl. Deep Brain Stimulation
Transcription Activating Like Effector	TAL
Transcription Activator-Like Effector Nucleases	TALENs
Transforming Growth Factor	TGF-b
Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc	OSKM
Tumor-assoziiertes Antigen-1-81	Tra-1-81, engl. Tumor related antigen-1-81

Umdrehungen pro Minute	U/min
Vacuolar Protein Sorting-35	VPS-35
vesikulärer Monoamintransporter	VMAT
Wildtyp	WT
Wingless	Wnt
zentrales Nervensystem	ZNS
Zink-Metallopeptidase-Ste-24-homolog	ZMPSTE24
Zinkfinger-Protein 42	Rex1
Zinkfingernuklease	ZFN
zyklisches Adenosinmonophosphat	cAMP

## 2.0 Überblick

Die Parkinson Krankheit (PK) ist eine neurodegenerative Krankheit bei der die dopaminergen Neurone in der substantia nigra pars compacta (SNpc) angegriffen werden. Im Laufe der Krankheit sterben immer mehr dopaminerge Neurone ab und die ersten Symptome wie der Ruhetremor in den Extremitäten oder der Verlust der Geruchssinnes, treten auf. Eines der Kennzeichen der PK sind die im Gehirn auftretenden Proteinablagerungen, sogenannte Lewy-Körper und Lewy-Neuriten, deren Hauptbestandteil alpha-Synuklein ist. Das Gen SNCA das für a-Syn encodiert war auch das erste welches als genetische Ursache für die PK entdeckt wurde. Die pathologischen Mechanismen der PK und die Rolle von a-Syn in diesem Prozess sind immer noch nicht aufgeklärt.

Mit der Entdeckung, dass somatische Zellen zu einem stamm-zellartigen Zustand reprogrammiert und in jedes Gewebe des Körpers differenziert werden können, entstand ein vollkommen neues Werkzeug welches der Wissenschaft erlaubt die Krankheiten in dem Gewebe zu erforschen in dem sie auch vorkommt. Diese Zellen lassen sich mittels Wachstumsfaktoren und kleinen Molekülen, die intrazelluläre Signale imitieren, zu dopaminergen Neuronen des Mittelhirns (msDN) differenzieren. Des weiteren erlaubt die Technik die Spenderzellen aus betroffenen Patienten zu gewinnen um die Krankheit im genetischen Hintergrund des Patienten zu erforschen. Diese „induced pluripotent stem-cells“ (iPS-Zellen) sind für die Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) besonders interessant, da das Gewebe des ZNS nur schwer zugänglich ist und meist nur postmortem oder während einer Operation gewonnen werden kann.

In dieser Arbeit wird ein neues iPS-Zellmodell vorgestellt welches aus einem Träger der a-Syn A30P Mutation und mehrerer Individuen gewonnen wurde. Das Genom einer dieser Kontrolllinien wurde mittels der TALEN-Technik so verändert dass sie nun die a-Syn A30P Mutation trägt. Mit diesen Zellmodellen wurde versucht die Phänotypen anderer Mutationen, die die PK auslösen, zu reproduzieren um einen generellen Pathomechanismus der PK aufzudecken.

Hierfür mikroskopierten wir die Zellen im lebendigen Zustand, um den Einfluss der Mutation auf die Morphologie der Mitochondrien und deren Transport zu erforschen und

stellten keine signifikanten Unterschiede fest.

Außerdem wurde überprüft ob a-Syn den gleichen Einfluss wie die LRRK2 G2019S Mutation auf den neuronalen Auswuchs hat, aber auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Auch wenn diese Studie keine Zusammenhänge zwischen a-Syn und anderen PK-Mutationen aufzeigen konnte, so birgt das neue Zellmodell die Möglichkeit in sich neue Einblicke in die Pathomechanismen der PK und die Funktion von a-Syn zu erhalten.



### 3.0 Overview

Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disease affecting dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). In the course of the disease, more and more dopaminergic neurons die and the first symptoms, like the tremor in the limbs or loss of smell, appear. Alpha-Synuclein (a-Syn) was the first gene discovered to cause familial forms of Parkinson's Disease and represents the main component of Lewy bodies and Lewy neurites, the hallmark of PD. The mechanisms of PD and especially the role of a-Syn remain elusive.

With the discovery that somatic cells can be reprogrammed to a stem cell like state, which can be maintained and further differentiated to any desired cell type, disease modeling gained a new and powerful tool to simulate the disease in the region where the disease occurs. It is possible to differentiate the iPSCs with the help of growth factors and small molecules, which mimic cellular signaling, to midbrain specific dopaminergic neurons (msdNs). Furthermore, the needed somatic cells can be donated from any disease carrier to study the disease in the genetic background of the patient. These induced pluripotent stem cells (iPSCs) are even more interesting for neurodegenerative diseases in the central nervous system (CNS), as the tissue of the CNS only can be extracted postmortem or during surgery.

In this study we generated a new iPSC model using tissue from an a-Syn A30P mutation carrier and an age and gender matched individual. Additionally one of the generated control lines was artificially mutated to carry the A30P mutation with TALEN technology. With this model we screened for different already reported phenotypes characteristic for other PD associated mutations to find a more general pathway for the origin of PD.

Here fore we used life cell imaging to elucidate the impact on mitochondrial morphology and mitochondrial transport in msdNs with no significant differences.

A previously reported reduction on neurite outgrowth in an iPSC model with the LRRK2 G2019S mutation we also investigated if a-Syn has the same effect, but no changes could be observed.

Nevertheless, this study did not show any connection between a-Syn and other PD related Mutations, the new cell model has the potential to contribute to the discovery of new pathways responsible for PD and the toxicity of a-Syn.

## **4.0 Einleitung**

### ***4.1 Die Parkinson-Krankheit (PK)***

Die PK wurde zum ersten Mal 1817 von James Parkinson in seiner Monografie „An Essay about the Shaking Palsry“ in der westlichen Welt beschrieben (Parkinson, 1817). Schon er erkannte die langsame Progression der Krankheit und die Bedeutung nicht motorischer Störungen wie Obstipation oder Schluckstörungen.

Aber schon lange Zeit vorher war die Schüttellähmung in Indien bekannt und man besaß dort schon damals ein Mittel zur Linderung. *Mucuna pruriens* oder besser bekannt als die Juckbohne, sie enthält einen Wirkstoff der die Symptome der PK lindern kann und heute noch eingesetzt wird, L-Dopa.

#### ***4.1.1 Epidemiologie und Klinik***

Die Parkinson Krankheit (PK) ist die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit nach der Alzheimer Krankheit, und die häufigste, die mit einer Einschränkung des Bewegungsapparates einher geht (Lees, Hardy et al. 2009). Sie ist ebenfalls eine Ursache für Parkinsonismus.

Parkinsonismus ist das Auftreten von mindestens zwei der vier Kernsymptome: Bradykinese, Muskelsteifheit, instabile Haltung und der typische Ruhetremor (Elbaz and Moisan 2008; Fahn 2003). Der durchschnittliche Beginn der Krankheit liegt im Alter von 60 Jahren und die Lebenserwartung beträgt nach der Diagnose der Krankheit im Mittel 15 Jahre (Katzenschlager, Head et al. 2008). Ein Grund für die motorischen Störungen der PK ist das Absterben von dopaminergen Neuronen (dN), die im Bereich der Substantia nigra pars compacta (SNpc) lokalisiert sind. Die SNpc ist verantwortlich für die Feinabstimmung unserer Bewegungen und ab einem Verlust von ca. 50% der dN tritt der typische Ruhetremor auf, der von Rigor und Akinese begleitet wird. Dies ist eines der Kennzeichen der PK, sowie neuronale intrazytoplasmatische Einschlüsse, die größtenteils

aus dem Protein  $\alpha$ -Syn bestehen, den sogenannten Lewy-Körpern und Lewy-Neuriten (Dickson, Braak et al. 2009). Das lokale und temporale Auftreten dieser Proteinablagerungen in verschiedenen Hirnarealen wird mit den Braak-Stufen beschrieben. Bei der 1. Stufe findet man Ablagerungen in der Medulla oblongata. Dort treten sie zuerst im dorsalen Vaguskern und im anterioren olfaktorischen Nukleus auf. Auch das enterische Nervensystem ist in dieser Stufe betroffen, was die Obstipation erklären kann. In der 2. Stufe weiten sich die Ablagerungen auf das Tegmentum pontines, den caudalen Raphe Nuklei, den gigantozellulären retikulären Nukleus und den Coeruleus-Subcoeruleus-Komplex aus. Das Mittelhirn, speziell die SNpc sind bei der 3. Stufe betroffen. Die ersten drei Stufen werden als Präsymptomatische Phase, während Stufe 4-6 als Symptomatische Phase der PK bezeichnet werden. In der 4. Stufe treten Läsionen im Prosencephalon auf, der Befall des Cortex beschränkt sich auf die transentorhinale Region des Mesocortex und den Allocortex. Während der 5. Stufe werden Ablagerungen im Neocortex gefunden. Diese beschränken sich auf sensorische Areale des Neocortex und prefrontalen Neocortex. Wenn in großen Teilen der primären sensorischen und premotorischen Arealen des Neocortex Oligomere auftreten, spricht man von der 6. Stufe (Braak, Del Tredici et al. 2003).

Es gibt auch Fälle bei denen sich die Krankheit früher manifestiert. Man spricht dann von PK mit frühem Beginn, oder juvenilem Parkinsonsyndrom, wenn die Krankheit schon vor dem 40. Lebensjahr auftritt. Es gibt sporadische und familiäre Fälle der PK die ca. 1% der Bevölkerung über 60 Jahre und ca. 4% der Bevölkerung über 85 Jahre befallt (de Lau and Breteler 2006). Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Menschen, die rauchen ein halb so hohes Risiko haben an der PK zu erkranken (Hernan, Zhang et al. 2001). Ebenso scheint Koffein das Risiko zu reduzieren (Elbaz and Moisan 2008), dies könnte aber daran liegen dass Nikotin als auch Koffein über das Belohnungszentrum Dopamin ausschütten und die Konsumenten einen gewissen Dopamin-erzeugenden Lebensstil aufweisen (Evans, Lawrence et al. 2006). Einige Studien zeigen bei Rauchern auch den umgekehrten Effekt, nämlich das Risiko an der PK zu erkranken (Elbaz and Moisan 2008). Nikotin aktiviert zwar nikotinische Acetylcholinrezeptoren im Gehirn, aber dies lässt sich nur schwer mit der PK in Verbindung bringen. Weniger bekannt ist, dass Tabakrauch die Monoaminoxigenase-(MAO)-Hemmer Harman und Norharman enthält (Herraiz and Chaparro 2005) und so den langsamen und graduierten Effekt der langsamen Neurodegeneration durch Administration minimaler Dosen dieser MAO-Hemmer kompensiert (Fowler, Volkow et al. 1998). Äußere Einflüsse wie Fettleibigkeit,

Bewegungsmangel, Kopfverletzungen und der Kontakt mit Herbiziden oder Pestiziden, wie Paraquat und Rotenon, werden in Verbindung mit der PK gebracht (Elbaz and Tranchant 2007).

Zu Beginn der PK verliert der Patient an allgemeiner Agilität, die im weiteren Verlauf bis hin zur Steifheit in Gliedmaßen und Verlust der Mimik führen kann. Frühe Anzeichen werden von den Betroffenen meist nicht wahrgenommen, da diese sich oft über große Zeiträume erstrecken. Die Veränderung der Handschrift ist eine solche langsame Veränderung. Abnormalitäten in der REM-Schlaf Phase (REM = Rapid Eye Movement) werden mit der PK in Verbindung gebracht (Iranzo, Santamaria et al. 2005). Ein häufiges nicht-motorisches Symptom ist Obstipation. Typisch ist auch ein Verlust des Geruchssinnes, welcher von den Betroffenen oft gar nicht wahrgenommen wird. Der Gang wird immer steifer und gebückter, die Bewegungen frieren manchmal ein und auch das Sprechen wird immer langsamer. Die Progression der Krankheit ist auch mit heutigen Therapien nicht aufzuhalten.

#### ***4.1.2 Behandlungsmöglichkeiten***

Der Verlust der dN hat eine Unterversorgung des nigrostriatalen Systems mit Dopamin zur Folge. Um die Symptome zu kompensieren therapiert man die PK mit dem Dopamin-Vorläufer Levo-Dopa (L-Dopa) in Kombination mit einem Decarboxylasehemmer, der den Abbau von L-Dopa vor dem Passieren der Blut-Hirnschranke hemmt. Die Metabolisierung von L-Dopa zu Dopamin in dopaminergen Zellen durch die Thyrosinhydroxylase (TH) führt zu einem Anstieg der Dopaminkonzentration in den dopaminergen Nervenzellen. Daraus folgt eine erhöhte vesikuläre Ausschüttung von Dopamin in den synaptischen Spalt und dies führt zu einer verbesserten Signalweiterleitung im nigrostriatalen System. Daraus folgt eine Abnahme des Tremors, eines der Symptome der PK. Zusätzlich können Catechol-O-Methyltransferasehemmer (COMT-Hemmer) und MAO-B-Hemmer gegeben werden, die den Abbau von L-Dopa und Dopamin kompetitiv hemmen und so die Dopaminkonzentration hoch halten.

Es wird diskutiert, ob die Gabe von L-Dopa die weitere Degeneration der dN der SNpc beschleunigt, da sein Metabolit Dopamin durch oxidativen Stress die Neurone schädigen kann (Ziv, Zilkha-Falb et al. 1997). Diese Degeneration konnte in vivo nicht reproduziert

werden (Mytilineou, Walker et al. 2003).

Ein weiterer praktizierter Ansatz ist die Stimulation von Dopaminrezeptoren (dR) direkt durch einen Agonisten. Trotz guter Möglichkeiten zur symptomatischen Therapie, kann die Progression der Krankheit nicht aufgehalten werden, denn mit der Zeit entwickeln sich L-Dopa resistente Symptome. Einen weiteren Therapieansatz bietet die tiefe Hirnstimulation (engl. Deep Brain Stimulation, DBS). Operativ wird ein Schrittmacher unter die Haut implantiert, der mittels Strom Hirnareale über Glaselektroden stimuliert. Klassische Areale sind der subthalamische Nukleus (STN) und der Globus Pallidus pars internus (GPi) (Nakamura, Christine et al. 2007). Leider kann auch die DBS die Progression der PK nicht aufhalten (Krack, Batir et al. 2003). Die Patienten entwickeln, ähnlich wie bei der Therapie mit L-Dopa, L-Dopa und auch STN-DBS resistente Symptome, wie Haltungsinstabilität und Demenz.

Eine mögliche neue kausale Therapie könnte die Immunisierung mit Antikörpern (AK) sein, die spezifisch an a-Syn binden und die Bildung von Aggregaten unterdrücken (Wood 2014). Der Verlauf der PK lässt sich mit den heutigen Behandlungsmethoden nur symptomatisch unterdrücken, nicht aufhalten. Am Ende der Krankheit entwickelt sich der Betroffene zum Pflegefall, da er durch die Einschränkung der Beweglichkeit nicht mehr selber für sich sorgen kann.

## ***4.2 Pathogenese von PK***

Die Pathogenese der PK kann grob in sporadische und monogenetische Formen aufgeteilt werden. Bei sporadischen Fällen sind keine pathogenen Mutationen vorhanden, die einen familiären Hintergrund aufweisen. Falls Mutationen auftreten, sind dies natürliche Polymorphismen die ein gewisses Risiko mit sich bringen an der PK zu erkranken. Mutationen mit familiärem Auftreten nennt man monogenetisch (s.Tabelle:4.1). Dies bedeutet, dass diese Mutation autosomal-dominant oder rezessiv vererbt wird. Individuen die diese Mutationen tragen werden auch die PK entwickeln. Monogenetische Formen der PK werden mit dem Kürzel „Park“ versehen. Diese Nomenklatur ist mittlerweile etwas verwaschen, da das familiäre Auftreten und die Penetranz einiger Park-Gene durch weitere Untersuchungen teils widerlegt wurden. Heute kann man neun Park-Gene als eindeutig

monogenetisch einteilen. Die anderen 10 Mutationen sind als Risikofaktoren eingestuft (Nalls, Pankratz et al. 2014).

#### ***4.2.1 Multifaktorielle Genese der sporadischen PK***

Die PK tritt meist sporadisch auf. Nur in 5-10% der Fälle liegen familiäre, also monogenetische Ursachen vor. Für sporadische Fälle konnten noch keine Krankheitsauslöser identifiziert werden. Studien an den Genomen von Patienten und gesunden Individuen die als Vergleichswert fungieren, sogenannte GWAS (engl. genome wide association studies), fanden Polymorphismen, die mit der Erkrankung assoziiert sind und ein erhöhtes oder erniedrigendes Risiko an der PK zu erkranken bedingen (Nalls, Pankratz et al. 2014). Es gibt noch keine Anhaltspunkte wie die idiopathische PK entsteht, da die Betroffenen meist erst mit der PK diagnostiziert werden, wenn die Degeneration dopaminerger Neurone weit fortgeschritten ist. Es gibt einige Umweltgifte, die ähnliche Symptome wie bei der PK auslösen. Diese sind aber nur ähnlich und werden als Parkinsonismus betitelt. Eine dieser Substanzen ist 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), das bei illegal synthetisiertem und verunreinigtem Desmethylprodin (MPPP), einem Opioidanalogon, vorkommt. Diese Substanz erlangte zu Beginn der 80er Jahre Berühmtheit, da sich Heroinsüchtige diese Substanz injizierten und innerhalb kürzester Zeit an schwerem Parkinsonismus erkrankten (Langston, Langston et al. 1984). Zu diesem Zeitpunkt war man sich sicher, das Rätsel um Parkinson bald gelöst zu haben, da sich seither mittels MPTP sehr schnell und zuverlässig Parkinsonismus in Versuchstieren modellieren lässt (Langston and Ballard 1984). Weitere Umweltgifte die Parkinsonismus auslösen findet man bei den Herbiziden und Pestiziden. Bekannte Vertreter sind hier Paraquat und Rotenone (Tanner, Kamel et al. 2011), das wie MPP+ an den Komplex I der Elektronentransportkette bindet und diesen inhibiert (Langston, Ballard et al. 1983).

### **4.2.2 Monogenetische Form**

Seit der Entdeckung der ersten genetischen Ursache der PK hat sich unser Verständnis für diese Krankheit vervielfacht. Der Fund der autosomal dominanten (AD) a-Syn A53T Mutation (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997) löste einen Paradigmenwechsel aus. Seitdem sind 19 weitere Loci gefunden worden (s. Tabelle 4.1). Kopplungsanalysen und anschließende Sequenzierung identifizierten anschließend noch weitere Mutationen im Gen von a-Syn, auf die später im Punkt 4.3 genauer eingegangen wird. Als die Lewy-Körper genauer untersucht wurden, konnte man a-Syn als ihren Hauptbestandteil identifizieren (Spillantini, Schmidt et al. 1997). Dies stellte die Verbindung zwischen idiopathischer und monogenetischer PK da.

Diese Gene bieten eine Möglichkeit die molekularen Grundlagen der Neurodegeneration bei der PK zu studieren und einen möglichen neuen Therapieansatz gegen die PK zu finden (Gasser 2009). Die häufigste Ursache für autosomal dominante PK sind Mutationen in der Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), die sich bei 10% aller Fälle nachweisen lassen (Di Fonzo, Tassorelli et al. 2006). Die häufigste LRRK2 Mutation ist die G2019S Mutation, die 5% aller AD-PK Fälle und 2% aller sporadischen Fälle verursacht (Deng, Le et al. 2005). Eine weitere AD-PK Mutation befindet sich im Locus des VPS-35 (engl. Vacuolar Protein Sorting-35) Gens. Dieses Gen steht im Zusammenhang mit retrograden Vesikeltransport von Endosomen zurück zum trans-Golgi Netzwerk (Bonifacino and Rojas 2006). Die Pathogenität von potentiellen Mutationen im EIF4G1-Gen (engl. Eucayotic translation initiation factor 4 gamma 1), im Rahmen eines autosomal dominant vererbten Parkinson-Syndroms (Chartier-Harlin, Dachsel et al. 2011), konnte in späteren Studien nicht bestätigt werden. Denn die pathogenen Mutationen wurden auch in gesunden Individuen gefunden (Lesage, Condroyer et al. 2012).

Es treten auch autosomal rezessive Formen der PK (AR-PK) mit Krankheitsbeginn vor dem 45. Lebensjahr auf. Diese nennt man juvenile PK. Ihre häufigsten Verursacher sind Mutationen im Parkin-Gen, mit bis zu 70% der familiären Fälle mit einem Krankheitsbeginn unter 30 Jahren (Lucking, Durr et al. 2000). Ebenso lösen Mutationen im Parkin-Gen bei 10-20% der Patienten, die PK mit frühen Beginn aus (Klein and Lohmann-Hedrich 2007). Trotz des frühen Beginns zeigen Parkinmutationen eine langsamere Progression und es tritt in der Regel keine Lewy-Körper Pathologie auf (Nussbaum and Polymeropoulos 1997). Dies könnte auf pathologische Unterschiede

Lokus	Chromosom	Gene	Manifestation	Vererbung	Quelle
Park1	4q21	SNCA	früher Beginn	AD	(Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997)
Park2	6q25.3-q27	Parkin	früher Beginn	AR	(Kitada, Asakawa et al. 1998)
Park3	2p13	Unbekannt	klassische PK	AD	(Gasser, Muller-Myhsok et al. 1998)
Park4	4q21	SNCA	früher Beginn	AD	(Singleton, Farrer et al. 2003)
Park5	4p13	UCLH1	klassische PK	unbekannt	(Leroy, Boyer et al. 1998)
Park6	1p36	Pink1	früher Beginn	AR	(Valente, Abou-Sleiman et al. 2004)
Park7	1p36	DJ-1	früher Beginn	AR	(Bonifati, Rizzu et al. 2003)
Park8	12q12	LRRK2	klassische PK	AD	(Zimprich, Biskup et al. 2004)
Park9	1p26	ATP13A2	jugendlicher Parkinsonismus	AR	(Ramirez, Heimbach et al. 2006)
Park10	1p32	Unbekannt	später Beginn	Risiko Faktor	(Hicks, Petursson et al. 2002)
Park11	2q37	Unbekannt	später Beginn	Risiko Faktor	(Lautier, Goldwurm et al. 2008)
Park12	Xq21-25	Unbekannt	später Beginn	X-chromosomal abhängig	(Pankratz, Nichols et al. 2003)
Park13	2p12	HTRA2	später Beginn	AD oder Risiko Faktor	(Strauss, Martins et al. 2005)
Park14	22q12-q13	PLA2G6	früher Parkinsonismus	AR	(Paisan-Ruiz, Bhatia et al. 2009)
Park15	22q12-q13	FBXO7	jugendlicher Parkinsonismus	AR	(Di Fonzo, Dekker et al. 2009)
Park16	1q32	Unbekannt	später Beginn	Risiko Faktor	(Satake, Nakabayashi et al. 2009)
Park17	16q11.2	VPS35	klassische PK	AD	(Vilarino-Guell, Wider et al. 2011)
Park18	3q27.1	EIF4G1	klassische PK	AD	(Chartier-Harlin, Dachsel et al. 2011)
Park19	1p31.1	DNAJC6	jugendlicher Parkinsonismus	AR	(Edvardson, Cinnamon et al. 2012)
Park20	21q22.11	SYNJ1	früher Parkinsonismus	AR	(Krebs, Karkheiran et al. 2013)
Park21	3q22.1	DNYJC13	Klassische PK	AR	(Vilarino-Guell, Rajput et al. 2014)

**Tabelle 4.1:** Genetische Ursachen der PK. (AD-PK = autosomal dominante PK, AR-PK = autosomal rezessive PK)



zwischen AD und AR Parkinson-Krankheit zurückzuführen sein (Hattori, Shimura et al. 2000). Die meisten Mutationen im Parkin-Gen sind Deletionen, Duplikationen und Triplikationen.

Parkin ist eine E3 Ubiquitin Ligase, die Prozesse während der Ubiquitinierung steuert und somit diese Proteine für die Proteolyse über das Ubiquitin-Proteasomsystem markiert. Die meisten Mutationen führen zu einem Verlust der Ligase-Funktion, der zu einem Überschuss von nicht ubiquitinierten Proteinresten führen kann (Shin, Ko et al. 2011). Man nimmt an, dass Funktionsverlustmutationen von Parkin eine Akkumulation toxischer Stoffe oder disfunktionale Mitochondrien zur Folge hat, die dopaminerge Neurone absterben lassen. Der genaue Hergang ist aber noch nicht aufgeklärt.

Parkin und PINK1 (engl. phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1) teilen sich einen gleichen Signalweg, um beschädigte Mitochondrien zu markieren und abzubauen (Narendra, Jin et al. 2010). Dieser Prozess wird Mitophagie genannt (Lemasters 2005). Pink1 befindet sich hauptsächlich im Zytosol, wird aber ständig in den Intermembranraum der Mitochondrien importiert wo es dann von PARL (engl.: rhomboid family protease presenilin-associated rhomboid-like protein) geschnitten und abgebaut wird. Werden nun die Mitochondrien geschädigt, sinkt das mitochondriale Membranpotential das die Funktion von PARL hemmt. Dies bewirkt nun, dass PINK1 nicht mehr abgebaut wird und sich an der Äußeren Membran anlagert. Pink1 kann von dieser Position aus Parkin aus dem Zytoplasma rekrutieren. Parkin verbindet nun mitochondriale Substrate mit Lysin-69 verbundenen Polyubiquitinketten. Diese Polyubiquitinketten werden durch Sequestosome mit den Proteinen p62 und LC3 (engl.: *microtubule associated protein light chain 3*) verbunden und zusammen bei der Bildung der Membran des Autophagosoms helfen (Youle and Narendra 2011).

Auf PINK1 Mutationen sind bis zu 8% bei den familiären und bis zu 1% bei den sporadischen Fällen der PK zurückzuführen (Kumazawa, Tomiyama et al. 2008). Nur bei etwa 1% der familiären Fälle der PK trägt eine Mutation im DJ-1 Gen (Healy, Abou-Sleiman et al. 2004), das für eine Peptidase der C56 Familie exprimiert. DJ-1 soll eine redox-sensitive Chaperonfunktion besitzen (Shendelman, Jonason et al. 2004). Bei der Induktion von oxidativem Stress, relokalisiert DJ-1 vom Cytosol zu den Mitochondrien (Canet-Aviles, Wilson et al. 2004). Mutationen im Gen von DJ-1 bewirken Veränderungen der mitochondrialen Morphologie (Kreihl, Ruckerbauer et al. 2010) und Störungen bei der Reaktion auf oxidativen Stress (Yang, Gehrke et al. 2005).

Die AR Fälle mit Beginn unter dem 20. Lebensjahr, nennt man auch juvenile PK oder PK

mit atypischen klinischem Bild. Diese äußerst schwere Form der PK kann durch Mutationen in der ATPase 13A2 (engl. Adenosine-Tri-Phosphatase 13A2) verursacht werden. Die dadurch ausgelöste neurodegenerative Krankheit wird auch Kufor-Rakeb Syndrom genannt (Ramirez, Heimbach et al. 2006). Die Manifestationen der Krankheit sind vielseitig, von Spastiken zu cerebralen und cerebellaren Atrophien mit möglichen Eiseneinlagerungen in den Basalganglien (Bruggemann, Hagenah et al. 2010).

In einer Studie mit Modulatoren von a-Syn in Hefezellen wurden drei Mangantransporter identifiziert (Yeager-Lotem, Riva et al. 2009). Einer von ihnen war das Homolog von ATPase 13A2 der Hefe, welcher die Toxizität von a-Syn unterdrückte (Gitler, Chesi et al. 2009).

Eine andere Mutation im Gen von FBXO7 (engl. F-Box Only Protein) löst eine weitere Form der juvenilen PK mit Pyramidenbahn-Zeichen und schweren Parkinsonismus aus, der auf L-Dopa anspricht. FBXO7, soll wie PINK1 und Parkin, für die membranpotenzialabhängige Mitophagie eine Rolle spielen und sich auch den gleichen Signalweg wie Pink1 und Parkin teilen (Burchell, Nelson et al. 2013).

### **4.3 Alpha-Synuklein (a-Syn)**

A-Syn wurde als erstes in Neuronen des elektrischen Organs von *torpedo californica* nachgewiesen (Maroteaux, Campanelli et al. 1988). Durch eine Antikörperfärbung wurde die Expression in Synapsen und nahe dem Nukleus nachgewiesen, daher der Name Synuklein. a-Syn ist ein sehr kleines Protein mit nur ca. 14kDa. Durch die geringe Größe überschreitet es nicht den Schwellenwert von 40kDa der Poren des Nukleus und kann sie daher ungehindert passieren. Daher verwundert es nicht, dass mittlerweile a-Syn auch im Nukleus nachgewiesen wurde (Klucken, Outeiro et al. 2006). Weitere Untersuchungen haben die weiteren Mitglieder der Synuklein-Proteinfamilie, beta- und gamma-Synuklein (b-Syn, g-Syn), identifiziert (Maroteaux and Scheller 1991). a-Syn und b-Syn weisen 90% Homologie im N-Terminus und 33% im C-Terminus auf (Lucking and Brice 2000). g-Syn ist weniger homolog. Es stimmt nur mit 78% im N-Terminus und 6% im C-Terminus mit a-Syn überein (Lucking and Brice 2000). Alle Synukleine besitzen einen hoch konservierten Abschnitt im N-Terminus, der aus einer sechsmal wiederholten KTKEGV

Sequenz besteht und bei Anlagerung mit Membranen eine alpha-Helix bildet (Maroteaux, Campanelli et al. 1988).

Ein kleiner Abschnitt von a-Syn wurde als Bestandteil der Plaques bei Alzheimerpatienten nachgewiesen. Dieser Abschnitt von Aminosäure 61-95 wird nicht A $\beta$ -Bestandteil (NAC, eng. Non-A $\beta$  component) genannt, da dieser nur einen kleineren Teil der Plaques darstellt und der Hauptbestandteil das A $\beta$ -Peptid ist (Ueda, Fukushima et al. 1993). Später ergaben weitere Forschungen, dass das NAC-Protein das menschliche Homolog zu *torpedo californica* a-Syn ist.

Im NAC-Abschnitt findet sich auch einen weiterer Unterschied zwischen a-Syn und b-Syn. Ein zwölf Aminosäuren langen Abschnitt mit der Sequenz VTGVTAVAQKTV. Dieser ist bei b-Syn nicht vorhanden. Dieser Teil spielt eine Rolle bei der Aggregation von a-Syn und sein Fehlen mag auch der Grund sein, wieso kein b-Syn in Lewy-Körpern gefunden wird (Giasson, Murray et al. 2001).

Durch Arbeiten mit Zebrafinken und deren Lernverhalten von Balzgesängen, wurde von einem Zusammenhang von a-Syn mit synaptischer Langzeit-Plastizität berichtet (George, Jin et al. 1995). Welche Funktion a-Syn bei der synaptischen Langzeit Plastizität spielt wird bis heute nicht vollkommen verstanden.

Des Weiteren wurde a-Syn zusammen mit b-Syn als Inhibitor von Phospholipase D2 identifiziert, welche Stoffe via Exozytose durch die Zellmembran schleust (Zeniou-Meyer, Zabari et al. 2007). Später wurde gezeigt dass mehrere Domänen von a-Syn notwendig wären um PLD2 zu inhibieren, aber eine physische Interaktion wurde nicht beobachtet (Jenco, Rawlingson et al. 1998).

### ***4.3.1 A-Syn und die PK***

Der erste Hinweis für eine genetische Ursache der PK war die Entdeckung der A53T Mutation im Gen von a-Syn (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997). Die A53T Mutation ist in der Antike durch einen sogenannten Founder-Effekt aufgetreten und hat sich seitdem vom Mittelmeerraum über die ganze Welt verbreitet. Eine weitere Mutation, die A30P Mutante, wurde bei einer deutschen Familie, die mit AD-PK diagnostiziert wurde, kurz

darauf entdeckt (Kruger, Kuhn et al. 1998). Seither wurden noch die E46K (Zarranz, Alegre et al. 2004), G51D (Lesage, Anheim et al. 2013) und die H50Q Mutationen entdeckt (Appel-Cresswell, Vilarino-Guell et al. 2013). Alle verursachen die PK mit frühem Beginn. Die Mutationen von a-Syn werden als Park1 zusammengefasst. Es gibt aber auch Duplikationen (Chartier-Harlin, Kachergus et al. 2004) und Triplikationen (Singleton, Farrer et al. 2003) des a-Syn Locus, man spricht dann von Park 4. Duplikationen treten bei ca. 1% aller AD-Fällen auf, wobei die Mutationen von a-Syn noch seltener sind. Die A53T Mutation kommt nur in Einzelfällen in Familien griechischen Ursprungs vor und die E46K und A30P Mutation gibt es es nur in einer Familie mit entweder spanischem oder deutschem Ursprung (Ibanez, Lesage et al. 2009). Die H50Q Mutation wurde in zwei britischen Patienten nachgewiesen, wobei bei einem ein familiär Hintergrund festgestellt wurde (Proukakis, Dudzik et al. 2013).

Die meisten Patienten mit Mutationen im SNCA-Gen sprechen gut auf L-Dopa an. Weisen aber eine schnelle Progression der Krankheit bei der auch Demenz vorkommen kann auf. Die Penetranz der Mutationen liegt bei 100% (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997), wobei die Duplikationen ähnlich einer sporadischen PK sind (Beginn zwischen 50-60 Jahren und Penetranz bei 43,8%) (Nishioka, Hayashi et al. 2006) und Triplikationen die volle Penetranz aufweisen. Die Krankheit beginnt dabei ca. zehn Jahre früher und geht mit schweren Symptomen einher, wie Demenz, autonome Dysfunktion und psychiatrische Störungen (Singleton, Farrer et al. 2003). Alle Betroffenen mit einer a-Syn Mutation oder Multiplikation des Locus weisen mehr neuronale Synuklein-Oligomere in Gehirnllysaten auf (Miller, Hague et al. 2004). Diese treten auch bei sporadischen Fällen auf und es wurde bewiesen, dass diese Ablagerungen zum größten Teil aus aggregiertem a-Syn bestehen (Spillantini, Schmidt et al. 1997). Dies stellte die Verbindung der sporadischen Fällen mit den AD Fällen der PK dar. Durch einen noch nicht bekannten Mechanismus weisen die mutierten Formen ein anderes Aggregationverhalten auf als das Wildtyp (WT) von a-Syn. Die A53T-, A30P- und E46K Mutation stellen eine toxische Funktionsgewinnmutation dar, die die Fähigkeit Aggregate zu bilden erhöht, indem sie die Fehlfaltung in eine beta-Faltblatt Struktur erleichtern (Pieri, Madiona et al. 2012). Die G51D Mutation aggregiert indessen langsamer, aber die gebildeten Fibrillen sind toxischer als die des WT (Lesage, Anheim et al. 2013).

Die neueste Mutation stellt die in einer finnischen Familie entdeckte A53E Mutation dar (Pasanen, Myllykangas et al. 2014), deren Pathologie sich aber eher mit einer multiplen

Systematrophie mit Parkinson-ähnlichen Symptomen vergleichen lässt (Ghosh, Sahay et al. 2014).

Die Duplikationen und Triplikationen exprimieren 50 bzw. 100% mehr  $\alpha$ -Syn (Farrer, Kachergus et al. 2004). Das Vorkommen von  $\alpha$ -Syn beschränkt sich auf Vertebraten und seine Sequenz ist stark konserviert. Es ist zur Zeit unerklärlich, dass in Nagetieren die A53T Mutation, die bei Menschen Parkinson auslöst, die natürliche Sequenz darstellt, ohne der PK ähnliche Symptome zu entwickeln.

### ***4.3.2 Die Struktur von $\alpha$ -Syn***

Es deutet darauf hin, dass  $\alpha$ -Syn in Lösung ein nativ ungefaltetes Protein mit einer Größe von 140 Aminosäuren ist. Dies ist in den letzten Jahren enorm diskutiert worden.  $\alpha$ -Syn aus Blut- und anderen Säugerzellen, das nicht denaturiert wurde, zeigte bei analytischer Ultrazentrifugation, dass die native Form das Gewicht eines Tetramers aufweist (Selkoe, Dettmer et al. 2014). Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen eine tetramerische Form, die resistenter gegen Aggregation ist (Wang, Perovic et al. 2011). Der Umstand, dass bei früheren Untersuchungen die Proteine denaturiert wurden, könnte die polymere Struktur auflösen und verbergen (Bartels, Choi et al. 2011). Neuere Untersuchungen zeigen hingegen, dass  $\alpha$ -Syn im menschlichen Gehirn hauptsächlich als Monomer vorliegt (Burre, Vivona et al. 2013).

Die Sequenz von  $\alpha$ -Syn lässt sich in drei Teile unterteilen. Der erste Teil von Aminosäure 1-60 nennt sich amphipathische N-Terminale Region, die bei einer Bindung mit einer Membran eine Faltung zu einer  $\alpha$ -Helix vollzieht, die der Bindedomäne von Apolipoproteinen ähnelt (Clayton and George 1998). In diesem Abschnitt findet man alle bisher bekannten Punkt-Mutationen die bei der PK vorkommen. Der mittlere Abschnitt der von Aminosäure 61 bis 95 verläuft, ist eine hydrophobe Region, die verantwortlich für die Aggregation von  $\alpha$ -Syn ist. Hier befindet sich auch das NAC-Peptid, das auch bei der Alzheimer Krankheit eine Rolle spielt (Ueda, Fukushima et al. 1993). Der letzte Teil der sich von der Aminosäure 96 bis 140 erstreckt, ist Säure- und Prolinreich, weist aber keine auffällige strukturelle Besonderheit auf. Im Gegensatz zu dem N-Terminale Abschnitt ist der C-Terminale Teil polar geladen und besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, die von

der PLK-Familie (engl. Polo-like Kinase) phosphoryliert werden (Mbefo, Paleologou et al. 2010). Speziell die Stelle an Serine-87 deutet mehr auf eine Regulierungsmöglichkeit für das Binden an Membranen *in vitro* hin als andere Stellen (Mbefo, Paleologou et al. 2010). Die Phosphorylierung an Serine-129 und Serine-87 inhibiert die Bildung von Fibrillen (Paleologou, Schmid et al. 2008, Paleologou, Oueslati et al. 2010). Die post-translationalen Modifikationen von  $\alpha$ -Syn scheinen einen großen Einfluss auf die Modulation von Toxizität, Struktur und Funktion zu nehmen (Oueslati, Fournier et al. 2010). In der Synuklein-Familie ist der C-Terminale Teil der am wenigsten konservierte.

### **4.3.3 Die Interaktion von $\alpha$ -Syn mit Membranen**

$\alpha$ -Syn bindet sich an Membranen unter zu Hilfenahme von sauren Kopfgruppen der Aminosäuren des N-Terminale Abschnittes. Diese bieten aber nur eine ausreichende Angriffsfläche, wenn die Membran ausreichend gekrümmt ist (Middleton and Rhoades 2010). Der N-Terminale Abschnitt von  $\alpha$ -Syn bildet eine hydrophobe  $\alpha$ -Helix bei der Bindung an Membranen. Dies gelingt durch mehrere Threonine an Position 3 in der  $\alpha$ -Helix und das Zusammenspiel dieser Gruppe mit Serin-Wiederholungen an Position 2-5 und 7. Diese Struktur ermöglicht  $\alpha$ -Syn eine Bindungsspezifität für gekrümmte Membranen wie Vesikel, Endosomen und Mitochondrien. Es ermöglicht auch ein ablösen von Vesikeln, wenn diese sich mit der Zellmembran verbinden und somit ihre starke Krümmung verlieren (Fortin, Troyer et al. 2004).

Außerdem weist  $\alpha$ -Syn auch eine Bindung mit kleinen spezifische Domänen an Membranen auf. Diese Domänen, kleine Lipid-Inseln die aus Cholesterol- und Acylketten bestehen, scheinen für die Lokalisierung von  $\alpha$ -Syn in der Präsynapse verantwortlich zu sein, da ihr Fehlen mit einem Fehlen von  $\alpha$ -Syn in der Präsynapse einhergeht. Es wird davon ausgegangen, dass  $\alpha$ -Syn auch bei der Genese dieser Inseln eine Rolle spielt (Fortin, Troyer et al. 2004).

Während der Interaktion mit Membranen kann  $\alpha$ -Syn zwei Typen von Strukturen annehmen. Zum ersten eine Helix, die einem zerbrochenem Hufeisen ähnelt (engl.: broken horseshoe-like helix) und zweitens eine verlängerte Helix (engl.: extended helix) (Robotta, Braun et al. 2011).

Eine Bindung von Fettsäuren durch  $\alpha$ -Syn wurde auch beobachtet und mehrfach ungesättigte Fettsäuren sollen die Aggregation von  $\alpha$ -Syn begünstigen. Diese Funde konnten durch einen KO (engl. Knock-out) in der Maus bestätigt werden und zeigten auch eine ungewöhnliche Komposition von Acyl-Ketten und ebenso in der Konzentration von Cardiolipin (Golovko, Faergeman et al. 2005, Golovko, Rosenberger et al. 2007).

#### ***4.3.4 Die Rolle von $\alpha$ -Syn bei der Ausschüttung von Neurotransmittern (NT)***

Die schon für seine Namensgebung bekannte Lokalisierung in den Präsynapsen von Neuronen lässt die Hypothese zu, dass  $\alpha$ -Syn bei der Ausschüttung von Neurotransmittern eine Rolle spielt. Seine Fähigkeit sich mit Membranen und mit Lipiden zu koppeln vermag diese Hypothese noch zu verstärken. Dagegen spricht der Fakt, dass die chemische Synapse und deren Funktion in allen Lebewesen mit Nervensystem stark konserviert ist und nur Vertebraten die Synukleinfamilie exprimieren. In einem Versuch, bei dem Mäusen das  $\alpha$ -Syn Gen entfernt wird, fällt eine erhöhte Unordnung der synaptischen Vesikel in deren Vorratsspeicher und erhöhte vesikuläre Dopaminausschüttung auf (Abeliovich, Schmitz et al. 2000). Dies bedeutet, dass sich die synaptischen Vesikel nicht mehr geordnet im Vorratsspeicher sammeln. Des weiteren konnten elektrophysiologische Untersuchungen eine erhöhte Kurzzeit-Bahnung sowie eine Reduzierung in der Depression der Aktionspotentiale im Vergleich zum WT beobachtet werden (Yavich, Tanila et al. 2004; Yavich, Jakala et al. 2006). Der Einfluss auf glutamaterge Synapsen ist eher gering (Chandra, Fornai et al. 2004), was Zweifel an der Rolle von  $\alpha$ -Syn als generellen Modulator der neuronalen Vesikelausschüttung aufkommen lässt. Eine weitere interessante Beobachtung ist die Resistenz des KO gegenüber MPTP (Dauer, Kholodilov et al. 2002). MPP<sup>+</sup> wird über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) aus der Zelle entfernt (Liu, Peter et al. 1992) und kann somit Komplex I der Elektronentransportkette in Mitochondrien nicht inhibieren (Krueger, Singer et al. 1990).

Es wird von Interaktionen mit dem Dopamintransporter (DAT) (Lee, Liu et al. 2001) und dem SNARE-Komplex (engl. Soluble n-ethylamine-sensitive factor Attachment protein

Receptor) (Burre, Sharma et al. 2010) berichtet. Ein wichtiger Teil des SNARE-Komplexes ist das synaptosomal assoziierte Protein 25 (Snap-25), das vom Cystein-Strang-Protein alpha (Csp-a) reguliert wird. Snap-25 wird in monomerer Form vom CSP-a-HSP70-SGT-Chaperonkomplex (Heatshockprotein 70, HSP70; Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha, SGT) prozessiert, um seine Aggregation und somit den proteosomalen Abbau zu verhindern (Sharma, Burre et al. 2011). Ein KO von CSP-a löst einen dem Parkinson sehr ähnlichen Phänotyp aus, der durch a-Syn gerettet werden kann. Dies geschieht weil a-Syn beim Zusammenbau des SNARE-Komplexes hilft, kann aber den Mangel an Snap-25, der mit dem Verlust des Csp-a-HSP70-SGT-Chaperonkomplex einhergeht, nicht ausgleichen (Burre, Sharma et al. 2010). Über den genauen Vorgang ist bislang wenig bekannt außer, dass a-Syn an Synaptobrevin-2 bindet das ein Teil des SNARE-Komplexes darstellt (Burre, Sharma et al. 2010). Das heißt, dass a-Syn auch eine Chaperonfunktion wie CSP-a aufweisen könnte, aber eben nicht wie dieses an der Regulation von SNARE-Komplex Untereinheiten mit wirkt. Wie groß der Einfluss von a-Syn bei der Bildung des SNARE-Komplexes und somit auf die Ausschüttung von Neurotransmittern ist und wie dies zur PK beiträgt ist momentan noch nicht bekannt.

#### ***4.3.5 Fehlfaltungen und Aggregation von a-Syn***

Eines der Kennzeichen der PK ist die Aggregation von a-Syn zu Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten. A-Syn wird von den Neuronen ständig nachgebildet, und älteres Protein über die Lysosomen über Chaperon-vermittelte Autophagie oder Makro-Autopagie abgebaut (Vogiatzi, Xilouri et al. 2008). Wenn das Protein aggregiert, kann man von einer Überregulation der Transkriptionsmaschinerie, einer Multiplikation des Genlokus, einer Punktmutation oder eines fehlerhaften lysosomalen Abbaus ausgehen. Man nimmt an, dass mutiertes a-Syn durch einen noch nicht bekannten Prozess, ähnlich den Prionen, fehlgefaltet wird und sich anschließend zu Aggregaten verbindet. Das natürliche a-Syn hat das gleiche Rückgrat wie das fehlgefaltete. a-Syn nimmt dann das fehlgefaltete a-Syn als Vorlage um sich selbst fehl-zufalten. Die Aggregation soll dann im Membran-gebundenen Zustand erfolgen, die Strukturveränderung im gebundenen Zustand macht es möglich, ein Dimer zu bilden (Tsigelny, Sharikov et al. 2008). a-Syn aggregiert über eine 5-10 nm dicke, fibrilläre Struktur hin zu Oligomeren (Spillantini, Crowther et al. 1998). Diese Fibrillen



bilden dann ein unregelmäßiges Geflecht, das dann als Lewy-Körper in Erscheinung tritt (Spillantini, Crowther et al. 1998). Ob die Oligomere tatsächlich toxisch für Neurone sind, ist noch nicht eindeutig geklärt, da verschiedene Tiermodelle widersprüchliche Daten liefern (Chen and Feany 2005, Azeredo da Silveira, Schneider et al. 2009).

Ein wichtiger Bestandteil des Aggregationsprozesses scheint Dopamin selbst zu sein. Es ist auch ein Bestandteil von  $\alpha$ -Syn Oligomeren und stabilisiert Protofibrillen (Norris, Giasson et al. 2005). Da aber auch nicht dopaminerge Zellen Lewy-Körper-Pathologie aufweisen, kann dies durch die Zell zu Zell Verbreitungs-Theorie erklärt werden. Bei dieser Theorie geht man davon aus, dass  $\alpha$ -Syn von einer Zelle zur anderen Zelle durch Exocytose und Endocytose weitergegeben wird (Danzer, Krebs et al. 2009).

Strukturanalysen haben gezeigt dass  $\alpha$ -Syn in Aggregaten eine beta-Faltblatt Struktur annimmt und nicht wie bei der Bindung an Membranen eine alpha-Helix aufweist (El-Agnaf, Jakes et al. 1998). Der genaue Hergang der Aggregation ist unbekannt, es gibt aber Hinweise auf Dysfunktionen im Abbau des Proteins. Es wurde einst angenommen,  $\alpha$ -Syn würde über das Proteasomsystem ohne Ubiquitinierung abgebaut, doch Studien weisen auf Monoubiquitinierung durch die E3 Ubiquitin-Ligase SIAH-2 (engl. Seven in Absentia Homolog 2) hin (Liani, Eyal et al. 2004). Weitere Abbauewege werden diskutiert, wie die Chaperon vermittelte Autophagie (CMA, engl. Chaperone Mediated Autophagy) (Cuervo, Stefanis et al. 2004) und den über Nedd4 (engl. neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) vermittelten Lysosomalen Abbau. Nedd4 polyubiquitiniert  $\alpha$ -Syn an Serin 21 und 96 welches anschließend in Endosome verpackt und lysosomal abgebaut wird. (Tofaris, Kim et al. 2011).

Es konnte beobachtet werden, dass die Mutationen von  $\alpha$ -Syn ein anderes Aggregationverhalten aufweisen als der WT (Ghosh, Sahay et al. 2014). Andere Arbeiten berichten von Prionen-ähnlichen Fehl-faltungen des Proteins, die sich auch von Zelle zu Zelle ausbreiten (Luk, Kehm et al. 2012, Kordower 2014). Dies bietet einen möglichen Ansatz für die Antikörpertherapie. Für AK stellt die Blut-Hirnschranke ein schwer passierbares Hindernis dar, ein noch wesentlich größeres ist eine intakte Zellmembran. Falls die Passage durch die Blut-Hirnschranke für den AK gegen fehl-gefaltetes  $\alpha$ -Syn möglich wäre, könnte fehl-gefaltetes  $\alpha$ -Syn markiert werden, sobald es die Zelle verlässt und somit die Prionen-ähnliche Verbreitung von Zelle zu Zelle unterdrücken. Es ist bereits bei Mäusen gezeigt worden, dass eine Immunisierung gegen  $\alpha$ -Syn, welches sich außerhalb der Neuronen befindet, möglich ist (Bae, Lee et al. 2012).

Im Falle der sporadischen PK wäre die Prionen-ähnliche Verbreitung von  $\alpha$ -Syn eine

Erklärung für die Lewy-Körper Pathologie und deren Ausbreitung. Jedoch konnte nur die Aufnahme von Monomeren, Fibrillen und Oligomeren gezeigt werden (Desplats, Lee et al. 2009) die Initiierung eines Lewy-Körpers oder Lewy-Neuriten konnte noch nicht beobachtet werden. Ebenso ist die Ursache der initialen Fehlfaltung von  $\alpha$ -Syn bis dato unbekannt.

#### ***4.3.6 Die Bedeutung der mitochondrialen Dynamik bei der familiären PK***

Die ersten Anhaltspunkte für das Zusammenspiel von der PK und mitochondrialer Dysfunktion lieferten post mortem Studien über Komplex I Mangelzustände in der SNpc bei Patienten mit PK (Schapira, Cooper et al. 1990). Dieser Umstand wurde bereits in Blutplättchen beschrieben (Parker, Boyson et al. 1989). Es ist erstaunlich, dass dieser Unterschied überhaupt gemessen werden konnte, da bereits zum Zeitpunkt des Todes eines PK-Patienten die dN der SNpc zum größten Teil abgestorben sind. Im Gegenzug haben sich die Gliazellen durch die durch Neurodegeneration hervorgerufene Gliosis vermehrt (Renkawek, Stege et al. 1999). Es kann daher angenommen werden, dass die Unterschiede nicht durch die dN sondern von anderen Zellen herrühren, wie den Gliazellen und nicht-dN. Wie eine Reduktion in Komplex I zu einem Absterben der dN der SNpc führt, ist bis heute noch nicht ganz aufgeklärt. Die Arbeiten zur Wirkungsweise des Toxins MPTP deuten ebenfalls auf eine Komplex I vermittelte Neurotoxizität hin. Dort stellte sich heraus, dass MPTP, das in den Astrozyten von MAO-B zu MPP<sup>+</sup> umgewandelt wird, über Poren in der mitochondrialen Membran (engl. membrane transition pore) in die Mitochondrien eindringt und dann die Elektronentransportkette am Komplex I inhibiert (Murphy, Krueger et al. 1995). Die daraus folgende Unterversorgung mit Adenosintriphosphat (ATP) und der oxidative Stress durch ROS lässt die dN absterben (Fornai, Schluter et al. 2005). Interessanterweise interferiert mitochondrial lokalisiertes  $\alpha$ -Syn auch mit Komplex I der Elektronentransportkette (Devi, Raghavendran et al. 2008). Dies lässt Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen Umweltfaktoren und sporadischer PK zu.

Mutationen in den Genen von DJ-1, Pink1 und Parkin wirken sich negativ auf die

Mitochondrien aus, indem sie in den Fällen von Pink1 und Parkin die Mitophagie stören. Es gibt Mutationen, die ein erhöhtes Risiko tragen Parkinson auszulösen, wie HTRA2/Omi, DJ-1 oder Mortalin (Bonifati, Rizzu et al. 2003, Bogaerts, Nuytemans et al. 2008, Burbulla, Schelling et al. 2010). Auch diese zeigen morphologisch auffällige Mitochondrien, die durch fehlerhafte Fissions- oder Fusionseffekte ausgelöst werden (Burbulla, Schelling et al. 2010, Kieper, Holmstrom et al. 2010, Krebiehl, Ruckerbauer et al. 2010). Diese Fissions- und Fusionseffekte werden zusammen mit dem mitochondrialen Transport als mitochondriale Dynamik zusammengefasst. Es konnten drei Proteine identifiziert werden, die essenziell für die Fission von Mitochondrien in Säugerzellen sind. Dynamin-related Protein-1 (engl. Dynamin-verwandtes Protein-1, Drp-1) (Labrousse, Zappaterra et al. 1999), Mitochondrial fission protein (engl.: mitochondriales Fissionsprotein, Mff) und Fission-1 (Fis-1). Mff und Fis-1 bilden in Säugerzellen einen Komplex, der die Fission kontrolliert (Gandre-Babbe and van der Blik 2008). Ob dieser Komplex auch Drp-1 rekrutiert, wie in Hefezellen, bleibt noch ungeklärt (Lee, Jeong et al. 2004).

Drp-1 hat die Eigenschaft Membranen abzuschneiden, in dem es sich zu langen spiralförmigen Multimeren zusammenschließt (Ingerman, Perkins et al. 2005). Diese Multimere sind nicht wie bei anderen Dynamin-Multimeren 50nm dick, sondern weisen eine durchschnittliche Dicke von 120nm auf (Mears, Lackner et al. 2011). Dies reicht aus um zwei Membranstrukturen zu umschneiden und abzutrennen (Mears, Lackner et al. 2011). Die Einschnürung zieht sich soweit zusammen, dass sich die gegenüberliegenden Seiten der inneren mitochondrialen Membran (imM) der Mitochondrien berühren und verbinden. Dies geschieht auch mit der äußeren mitochondrialen Membran (ämM) und das Mitochondrium teilt sich (Mears et al., 2011).

Die mitochondriale Fission spielt auch eine Rolle bei der mitochondrialen Qualitätskontrolle (Twig, Hyde et al. 2008). Wird die Fission blockiert, steigt die Produktion von ROS und der Anteil an mtDNA verringert sich, dies korreliert mit einer Abnahme des zellulären ATPs und der Proliferationsrate der Zellen (Parone, Da Cruz et al. 2008). Die Fusion von Mitochondrien hat durch die Verschmelzung von imM und ämM zwei voneinander unabhängige Mechanismen, da die Fusion der ämM ohne eine Fusion der imM stattfinden kann (Olichon, Baricault et al. 2003). Mitofusin-1 und Mitofusin-2 (Mfn-1, Mfn-2) gehören auch der Dynamin-Familie an und werden für die Fusion der ämM benötigt (Eura, Ishihara et al. 2003). Die Mitofusine müssen an beiden äußeren Membranoberflächen der Mitochondrien lokalisiert sein, damit sich diese verbinden und

dann die Membranen in einem SNARE-ähnlichen Mechanismus aufreißen und anschließend verbinden (Koshiba, Detmer et al. 2004). Eine andere Hypothese ist, dass sich die Mitofusine wie andere Dynamine verhalten und spiralförmige Strukturen bilden, die die Membranen durchdringen, öffnen und dann wieder verbinden (DeVay, Dominguez-Ramirez et al. 2009). Für die Fusion der imM wird zuzüglich zu den Mitofusinen noch Optic Atrophy 1 (OPA1) benötigt (Meeusen, DeVay et al. 2006, Song, Ghochani et al. 2009), welches im Intermembranraum lokalisiert ist (Olichon, Emorine et al. 2002). Die Mitochondrien wechseln ständig zwischen den Stadien der Fusion, Fission und der Mitophagie und haben eine durchschnittliche Halbwertszeit von einem Monat im Gehirn (Menzies and Gold 1971).

Im Laufe ihres Lebens verlieren die Mitochondrien immer mehr an Membranpotential und werden dann lysosomal abgebaut (Hagen, Yowe et al. 1997, Klionsky and Emr 2000). Die mitochondriale Biogenese findet im Soma der Neurone statt und von dort werden sie in deren Neuriten transportiert (Davis and Clayton 1996, Hollenbeck 1996). Über die Hälfte der Mitochondrien in den Neuriten sind stationär, wohingegen der Transport mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,3-2,0  $\mu\text{m/s}$  stattfindet (Hollenbeck 1996, Ligon and Steward 2000). Beim anterograden mitochondrialen Transport bindet das Mitochondrium mit Hilfe von den Adapterproteinen Milton und Miro an das Motorprotein Kinesin (Rice and Gelfand 2006). Das Protein Miro ist dabei in der ämM verankert (Guo, Macleod et al. 2005, Glater, Megeath et al. 2006) und bindet an das Protein Milton, welches mit dem Motorprotein Kinesin verbunden wird (Glater, Megeath, 2006). Bei retrogradem Transport bindet Milton an das Motorprotein Dynein (Frederick and Shaw 2007). Ein fehlerhafter mitochondrialer Transport wurde bei Chorea Huntington, der Alzheimer Krankheit und bei der PK beobachtet und könnte zur Neurodegeneration beitragen (Gunawardena and Goldstein 2001, Gunawardena, Her et al. 2003, Liu, Sawada et al. 2012).

Es scheint einen tiefen systemischen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Dynamik, der PK-assoziierten Mutationen und toxischen Umwelteinflüssen zu geben (Sherer, Betarbet et al. 2002). Der toxische Einfluss von  $\alpha$ -Syn auf Mitochondrien konnte in vielen Modellorganismen nachgewiesen werden. Der Mechanismus ist aber noch nicht entschlüsselt worden. Die Theorien reichen von Poren bildenden Oligomeren (Lashuel, Petre et al. 2002) bis hin zur mitochondrialen Fusion (Kamp, Exner et al. 2010).  $\alpha$ -Syn Mutationen und Überexpression in der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y lösen eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes aus (Parihar, Parihar et al. 2009),

die durch eine Überexpression des mitochondrialen Chaperones Trap-1 verhindert werden kann (Butler, Voigt et al. 2012).

Andere Theorien sehen einen eher passiveren Einfluss auf die Mitochondrien, die Oligomere von  $\alpha$ -Syn stören die Autophagie und somit auch die Mitophagie (Sampaio-Marques, Felgueiras et al. 2012). Es wurde auch von Störungen im Vesikeltransport zwischen endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat berichtet, was eine Störung des Membranaufbaus der Mitochondrien zur Folge hätte (Cooper, Gitler et al. 2006). Aggregiertes oder natives  $\alpha$ -Syn könnte sich an den Mikrotubuli der Neurone anlagern und den mitochondrialen Transport oder die Versorgung wichtiger Organellen beeinflussen (Nakayama, Suzuki et al. 2012).

#### ***4.4 Modellsysteme zur Nachbildung neurodegenerativen Erkrankungen***

Die Wahl des Modellorganismus ist unter Umständen der wichtigste Punkt bei der Erforschung von neurodegenerativen Erkrankungen. Für die Erforschung der PK wurden Modelle wie *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) (Tenreiro and Outeiro 2010), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, Fadenwurm) (Harrington, Hamamichi et al. 2010) und *Drosophila melanogaster* (*Drosophila m.*, Fruchtfliege) (Botella, Bayersdorfer et al. 2009) als Model für die prinzipiellen zellulären Prozesse angewendet. Die Überexpression von  $\alpha$ -Syn in *C. elegans* zeigt zwar einen Verlust von dN, aber man findet keine  $\alpha$ -Syn-Aggregate. Außerdem ist der Verlust der dN nicht progressiv (Lakso, Vartiainen et al. 2003, Kuwahara, Koyama et al. 2006). Das Modell *Drosophila m.* zeigt hingegen bei Expression von mutierten A30P, mutierten A53T und WT  $\alpha$ -Syn einen altersabhängigen Verlust an dN und Lewy-Körper ähnliche, filamentöse Einschlüsse aus  $\alpha$ -Syn. Es gibt sogar lokomotorische Auffälligkeiten, die mit der Gabe von Dopamin korrelieren (Feany and Bender 2000). Es wird jedoch diskutiert, ob es tatsächlich einen Verlust an dN gibt oder nur einen durch die Präparationsmethode verursachter Effekt ist, da bei whole-mount Präparationen kein Verlust an dN zu messen ist (Pesah, Burgess et al. 2005). Diese Modelle besitzen auch kein endogenes  $\alpha$ -Syn, das sie zu imperfekten Modellen für die  $\alpha$ -Syn vermittelte PK macht. Zusätzlich zeigen sie nicht die vier typischen klinischen Symptome der Bradykinesie, Ruhetremor, Steifheit und Haltungsinstabilität. Einige der Faktoren die bei der PK eine Rolle spielen, wie Protein-Protein-Interaktionen können mit

diesen Versuchsorganismen nicht modelliert werden, da die Interaktionspartner evolutionär nicht konserviert sind (Maetzler, Liepelt et al. 2009). Zum Beispiel ist a-Syn in *Drosophila m.* nicht vorhanden, oder das eine veränderte Form wie A53T a-Syn Mutation bei Nagetieren den WT darstellt.

Bei Mauslinien die WT oder mutiertes a-Syn exprimieren, kommt es stark auf den Promoter an wie sich der Phänotyp manifestiert (Chesselet 2008, Chesselet, Fleming et al. 2008, Chesselet, Richter et al. 2012). Auf die Überexpression von humanen WT a-Syn in Mäusen folgt keine Neurodegeneration in dopaminergen Neuronen, dafür aber Anosmie (Fleming, Tetreault et al. 2008), Störungen des Bewegungsapparates bei A53T Überexpression (Giasson, Duda et al. 2002) und eine Abnahme in der Fähigkeit zu lernen bei Expression der A30P a-Syn Mutation (Freichel, Neumann et al. 2007), die auch in der prodromalen Phase der PK auftreten. Nur die Mauslinie mit Prion Promoter (mPrP) A53T a-Syn weist das ganze Spektrum der a-Syn Pathologie auf (Dawson, Mandir et al. 2002, Chesselet, Fleming et al. 2008, Giasson, Duda et al. 2002, Lee, Stirling et al. 2002).

Die PK beim Menschen tritt normalerweise erst im 3. Quartal des Lebens auf. Bis zur Diagnose hat sich die PK in diesen Zeitraum langsam entwickelt und alle pathologischen Charakteristika der Krankheit wurden aus Gewebeproben analysiert, die *post mortem* gewonnen wurden. Die Lebensspanne einer Maus liegt aber bei nur etwa zwei Jahren, inwiefern die Maus diese Pathologien widerzuspiegeln vermag ist fraglich (Chesselet 2008). Es kann diskutiert werden ob die Beobachtungen in diesen Tiermodellen womögliche Prodromal-Phasen der PK darstellen, aber wie diese Unterschiede zu einer spezifischen Degeneration der dN führt bleibt ungeklärt.

Bei der Erforschung der PK werden auch Zellkulturmodelle aus humanen Zellen eingesetzt. Diese bieten den Vorteil, dass sie relativ günstig zu halten und relativ schnell genetisch zu manipulieren sind. Diese Modelle haben viele Anhaltspunkte geliefert, die dazu beigetragen haben, die pathogenen Mechanismen der PK aufzuklären. Um die Krankheit in dem genetischen Hintergrund zu erforschen in dem sie vorkommt, gehen neuere Zellmodelle direkt auf den Patienten zurück (Park, Arora et al. 2008). Dermale primäre Fibroblasten von Patienten mit idiopathischer oder familiärer PK werden als *ex vivo* Modelle bezeichnet und bieten eine hervorragende Plattform um mitochondriale Dynamiken zu erforschen (Burbulla and Kruger 2012).

Als in 2006 die Nachricht aus Kyoto veröffentlicht wurde, dass es Shinya Yamanaka gelungen ist, somatische Zellen in einen pluripotenten, stammzellähnlichen Zustand zurückzuführen, hatte die Welt ein neues System für die Modellierung von Krankheiten

(Takahashi, Tanabe et al. 2007). Diese Zellen erfüllen alle drei Faktoren, die Zellen als pluripotente Stammzellen charakterisieren. Erstens, haben sie das Potential sich in alle drei Keimblätter zu differenzieren. Zweitens erneuern sie sich selbst und drittens sind sie nahezu unsterblich. Diese induzierbaren pluripotenten Stamm- (iPS) Zellen bieten nun die Möglichkeit Zellen aus Patienten zu entnehmen und zu reprogrammieren. Nun gewinnt man eine Zelllinie, die sich in alle erdenklichen Gewebe des Körpers differenzieren lässt. Somit können auch schwer erreichbare Gewebe, wie zum Beispiel das zentrale Nervensystem (ZNS) *in vitro* gezüchtet und untersucht werden (Payne, Sylvain et al. 2014, Srikanth and Young-Pearse 2014).

#### **4.4.1 Einführung in die Generierung von iPS-Zellen**

Als Grundlage für die Reprogrammierung von iPS-Zellen werden in den meisten Fällen dermale Fibroblasten verwendet, da diese sehr einfach zu entnehmen und zu kultivieren sind. Es gibt aber auch Veröffentlichungen, die über die Verwendung von Keratinocyten (Aasen, Raya et al. 2008) oder mesenchymaler Stammzellen (Cai, Li et al. 2010) mit teilweise höherer Effizienz berichten. Für alle Reprogrammierungen werden die für das Stammzellstadium wichtigen Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc (OSKM), die so genannten Yamanaka-Faktoren, in die somatischen Zellen eingebracht. Oktamerbindender Transkriptionsfaktor 4 (Oct4, engl. Octamer binding transcription factor 4) spielt eine wichtige Rolle bei der Selbsterneuerung von Stammzellen (Niwa, Miyazaki et al. 2000). Sex-determinierende Region Y Box-Protein 2 (Sox2) wird kanonisch über den Leukämie inhibierenden Faktor (LIF)-Signalweg unterhalb von JAK/STAT (Januskinase/Transducer and activator of transcription, engl. Vermittler und Aktivator der Transkription) gesteuert. Oct4, Sox 2 und Nanog, werden alle über LIF-Signale reguliert. Sox2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Stammzellstadiums und erhöht die Expression von Krüppel-ähnlicher Faktor 4 (Klf4, engl. Krüppel-like Factor4). Es wurde gezeigt, dass Klf4 zusammen mit beta-Catenin (b-cat) die Expression der funktionellen Untereinheit der Telomerase steuert. b-cat wird durch den kanonischen Wnt-Signalweg gesteuert. Wenn Wnt an Frizzled und an das Lipoproteinrezeptorverwandtes Protein 5/6 (LRP5/6) bindet, rekrutieren sie mit der Hilfe von Dash3 den

Zerstörungskomplex bestehend aus Axin, adenomatosis polyposis coli (APC) und Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) an die Zellmembran. Dadurch wird b-cat im Cytosol angereichert und wandert schließlich in den Zellkern. Dort bindet es an Transkriptionsaktivatoren der DNS um seine Ziel-Gene zu aktivieren. Der letzte Faktor der verwendet wird ist c-Myc, der nicht nur als Transkriptionsfaktor sondern auch durch Rekrutierung von Histonacetyltransferasen Einfluss auf die Struktur des Genoms hat.

Als Vektor dienen meist Retroviren, die jeweils einen der Transkriptionsfaktoren enthalten. Neuere Vektoren umfassen Lentiviren mit erhöhter Transkriptionfähigkeit. (Sommer, Stadtfeld et al. 2009). Diese Systeme haben aber den Nachteil, dass die Expression der viralen Vektoren beim Erreichen des Stammzellstadiums abgeschaltet sein muss, da sonst die Zellen nicht differenzierbar sind. Aus diesem Grund hat man Vektoren wie Adenoviren (Zhou and Freed 2009) und Sendaviren (Fusaki, Ban et al. 2009) gewählt, die nicht in das Erbgut der Zellen integrieren, ihre Effizienz ist aber nicht ganz so hoch wie der retrovirale Ansatz. Andere Ansätze umfassen die Nutzung von LoxP flankierten Faktoren, die mit Hilfe der Cre-Rekombinase nach der Reprogrammierung herausgeschnitten werden können. Diese Systeme können dann auf einen polycystonischen Vektor geklont werden, der dann alle Yamanaka-Faktoren trägt (Somers, Jean et al. 2010). Es gibt auch Untersuchungen zu Transfektion und Elektroporation, aber auch hier liegt die Effizienz unterhalb der anderen Ansätze (Si-Tayeb, Noto et al. 2010). Nach erfolgreicher Reprogrammierung müssen die Zellen charakterisiert werden um sicher zu stellen, dass durch die Intervention keine krankhaften genetischen Veränderungen entstanden sind. Dafür muss geprüft werden, ob die Zellen noch die viralen Vektoren exprimieren. Ist dies nicht der Fall, muss untersucht werden ob Stammzellmarker exprimiert werden. Ein anschließendes Karyogramm oder eine DNS-Chip Untersuchung gibt Aufschluss über mögliche Mutationen. Als funktioneller Beweis müssen die Zellen in alle drei Keimblätter differenziert werden. Dies kann durch Implantation in immundefiziente Nacktmäuse geschehen und so *in vivo* beobachtet werden, ob die Stammzellen in alle drei Keimblätter differenzieren. Eine andere Methode ist die *in vitro* Differenzierung in die drei Keimblätter durch gezielte Induktion mit Wachstumsfaktoren, dies mag nicht so eindeutig sein wie ein *in vivo* Experiment, aber es muss dafür kein Versuchstier verwendet werden.



#### ***4.4.2 Neuronale Vorläuferzellen als Basis für die mittelhirnspezifische Differenzierung zu dopaminergen Neuronen***

Die ersten Protokolle für neuronale Differenzierungen weisen eine hohe Heterogenität in der Zellpopulation auf. Sie enthalten nicht nur Neurone, sondern auch andere Zelltypen des Meso- und Endoderms. Es gibt starke Signale, sogenannten Nischeneffekte, die über Zell-Zellkontakte weitergegeben werden und die Differenzierung beeinflussen (Potten, Wilson et al. 1997). Die Zelldichte spielt dabei eine tragende Rolle. Alle somatischen Zellen besitzen ein primäres Zilium, welche zusammen eine Strömung verursachen die Signalmoleküle zu anderen Zellen transportiert oder von ihnen abschirmt (Wheatley, Wang et al. 1996). Auf diesen primären Zilien sitzen Rezeptoren und Ionenkanäle welche die Signalwege für Wachstumsfaktoren wie Sonic Hedgehog (Shh) (Wechsler-Reya and Scott 1999, Huangfu, Liu et al. 2003) , Wingless (Wnt) (Simons, Gloy et al. 2005, Wallingford and Habas 2005) und Platelet derived growth factor alpha (PDGF-a) (Schneider, Clement et al. 2005) modulieren. Die so stimulierten Zellen erzeugen eigene Wachstumsfaktoren, die sie in das Medium sekretieren um die umliegenden Zellen zu inhibieren. Des weiteren verhindert die Zelldichte, dass die Wachstumsfaktoren im Medium an alle Zellen gleichmäßig binden und so die inhibierenden Signale überwiegen (Huang, Shen et al. 2014). Diese Effekte sind noch nicht ganz aufgeklärt und es gibt noch keine einfachen Ansätze um diese zu umgehen. Die herkömmlichen Protokolle verlangen eine stetige qualitative Kontrolle der Zellkultur von dem Experimentator und können durch den persönlichen Eindruck verfälscht werden. Eine vielversprechende Vorgehensweise ist eine lentivirale Differenzierung durch ein Konstrukt dass Transkriptionsfaktoren exprimiert, die essentiell für die dopaminerge Differenzierung in mittelhirnspezifische Neurone sind (Addis, Hsu et al. 2011). Eine weitere virale Infektion birgt aber die gleichen Risiken wie die Infektion mit den Yamanaka-Faktoren und macht diese Protokolle für Automatisierung und Hochdurchsatzverfahren ungeeignet.

Die Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen (NPCs engl. Neuronal precursor cells) der Bodenplatte des Neuralrohrs und die Aufreinigung der Kulturen liefert ein Mittel um diese Nachteile zu minimieren. Die NPCs haben die gleichen Eigenschaften wie Stammzellen, mit dem Unterschied, dass sie sich ausschließlich in der ektodermalen

Keimbahn weiterentwickeln. Sie bergen nur noch die Möglichkeit sich in Neurone oder Gliazellen weiter zu entwickeln. Die Differenzierung zu voll funktionsfähigen Neuronen ist ab diesem Stadium deutlich kürzer und effizienter (Reinhardt, Glatza et al. 2013). Die Differenzierung der iPS-Zellen zu NPCs der Bodenplatte wird durch eine doppelte Inhibierung des SMAD-Proteins mittels Dorsomorphin für den BMP- (engl. Bone morphogenic protein) Signalweg und SB-413542 für den TGF- $\beta$ - (engl. Transforming Growth Factor) Signalweg erreicht (Fasano, Chambers et al. 2010). Unterstützend wird noch Purmorphamin als Agonist für den Shh-Signalweg verwendet. Shh wird in der Bodenplatte des Neuralrohrs exprimiert und sorgt dafür, dass die Zellen nicht zu Neuroblasten des neuralen Bandes (engl. Neural Crest) differenzieren (Fasano, Chambers et al. 2010). Ein guter Marker für die erfolgreiche Differenzierung in das Gewebe des Mittelhirns ist Pax6 (engl. Paired Box Protein 6) (Zuber, Gestri et al. 2003). Es stellt während der Hirnentwicklung die Grenze zwischen Mesen- und Rhombencephalon her, wobei die Grenze auf der Seite des Rhombencephalon durch Engrailed erkennbar ist (Zinyk, Mercer et al. 1998). Nachdem die Zellen nach ca. 7-8 Tagen Pax6 exprimieren, kann man mit Hilfe von Chir 99021 und Purmorphamin den NPC Status nahezu unbegrenzt aufrecht erhalten. Chir 99021 inhibiert GSK-3, das zum Zerstörungskomplex für b-catenin gehört und des weiteren auch SMAD-Proteine im TGF- $\beta$  und BMP-Signalweg phosphoryliert (Ye, Tan et al. 2012, Wu, Ai et al. 2013, Petkov, Hyttel et al. 2014). Zusammengenommen erfolgt eine starke Stimulierung des shh-Signalwegs mit Inhibierung der Signalwege von TGF- $\beta$ , Aktivin und BMP. Die Differenzierung dieser smNPCs (engl. Small Molecule NPCs) folgt dann nach dem gleichen Schema wie die Differenzierung der iPS-Zellen. Man beginnt mit der Stimulierung des Signalwegs für Fibroblasten Wachstumsfaktor 8 (FGF8, engl. Fibroblast Growth Factor 8). Dieser ist das Signal, welches NPCs zu Neuroblasten des Mesencephalons differenzieren lässt (Crossley, Martinez et al. 1996). Anschließend stimuliert man die Neuroblasten durch die Signalwege von BDNF (engl. Brain Derived Neurotrophic Factor), GDNF (engl. Glia Derived Neurotrophic Factor) und TGF- $\beta$ 3. Mittels Bucladesin wird der cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) abhängige Signalweg stimuliert da cAMP die Zellmembran nicht durchdringen kann und wir nicht wie bei BDNF, GDNF und TGF- $\beta$ 3 Rezeptoren auf der Zelloberfläche finden. Die Differenzierung von menschlichen Zellen kann mehrere Monate in Anspruch nehmen.

### **4.4.3 Genetische Modifikation somatischer Zellen**

Bis vor einigen Jahren war es nur schwer möglich eine eukaryotische Zelle gezielt genetisch zu verändern. Mit der Idee die Zinkfinger DNA-Domänen mit Endonukleasen zu verbinden konnte ein DNA-spezifische Nuklease geschaffen werden, mit der die DNA punktgenau editiert werden kann, die Zinkfingernuklease (ZFN) (Carroll 2011). Dies wird durch einen von der ZFN hervorgerufenen Doppelstrangbruch bewerkstelligt, der mit Hilfe eines homologen Konstrukts der gewünschten DNS repariert wird. Die ZFNs stellten sich aber als wenig spezifisch heraus, aber das Konzept wurde weiterentwickelt.

Die TAL- (engl. Transcription Activating Like Effector) Domänen aus *Xanthomonas* Bakterien funktionieren ähnlich wie Zinkfingerproteine und werden mit Endonukleasen zu TALENs fusioniert. Diese sind deutlich spezifischer und einfacher herzustellen (Boch 2011).

Die CRISPR (engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) stellen die neueste und spezifischste Methode für genetische Modifikation heraus (Pennisi 2013). In Prokaryoten stellen die CRISPR zusammen mit den CRISPR-assoziierten Genen (cas) das Immunsystem dar und schützen die Zelle vor Plasmiden und viraler DNS.

Diese Techniken werden verwendet um Mutationen in Stammzellen einzufügen oder zu reparieren. Dadurch entsteht eine neue Zelllinie mit dem gleichen genetischen Hintergrund wie der des Zellspenders. Diese Zellen dienen dann als optimale Kontrolle in Versuchen mit iPS-Zellen.

## ***4.5 Ziele dieser Doktorarbeit***

Die pathologischen Zusammenhänge zwischen  $\alpha$ -Syn und der PK sind bis heute noch nicht aufgeklärt und die gängigen Zell- und Tiermodelle liefern widersprüchliche Daten. Durch die Methode humane dN aus iPS-Zellen zu generieren bietet einen vielversprechenden Ansatz neurodegenerative Erkrankungen zu modellieren. Durch die Spende von Gewebematerial eines Patienten mit der A30P  $\alpha$ -Syn Mutation bietet sich die Möglichkeit die PK im genetischen Hintergrund des Patienten zu erforschen.

Bis heute ist der Einfluss der A30P Mutation von  $\alpha$ -Syn auf die mitochondrialen Dynamiken in humanen dN nicht erforscht. Um dies genauer auszuleuchten sollen iPS-Zelllinien aus dem Gewebe eines Patienten mit A30P Mutation und dessen gesunden Geschwisterteils hergestellt werden. Diese iPS-Zellen sollen dann mittels genetischer Manipulation mittels der TALEN Technologie mutiert bzw. repariert werden um weitere Kontrollen zu erhalten. Diese iPS-Zelllinien müssen auf ihre genetische Unversehrtheit überprüft werden. Dafür wird die Expression von viral transduzierter Plasmide und wichtige Stammzellmarker überprüft und das Genom mittels eines DNA-Chips auf Mutationen überprüft. Um die Stammzeleigenschaften der generierten iPS-Zellen zu bestätigen werden alle iPS-Zelllinien in alle drei Keimblätter differenziert und mittels Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt. Anschließend werden die iPS-Zelllinien in ein neuronales Stammzellstadium gebracht um sie dann zu msDaNs differenzieren zu können. Dies bietet den Vorteil dass eine Differenzierung in unerwünschte, nicht neuronale Keimbahnen durch unerwünschte Effekte nahezu auszuschließen ist.

An diesen Zelllinien soll dann die mitochondriale Dynamik mittels Live-Cell Mikroskopie untersucht werden. Hierfür werden die Parameter des mitochondrialen Transports, die mitochondriale Morphologie und der neuronale Auswuchs untersucht.

Neben der Generierung eines neuen neuronalen Zellmodells aus humanen Fibroblasten eines Trägers der A30P  $\alpha$ -Syn Mutation bietet dieses Modell die Möglichkeit tiefe Einblicke in die Pathologie der  $\alpha$ -Syn vermittelten PK zu ermöglichen. Durch die Untersuchung der mitochondrialen Dynamik sollte überprüft werden ob bereits berichtete mitochondriale und neuronale Phänotypen der PK reproduziert werden können und gegebenenfalls die pathologischen Mechanismen die dazu führen genauer zu untersuchen.

## 5.0 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Virale Vektoren

Name des Vektors	Backbone	Quelle
<i>Oct3\4</i>	<i>pMXs-Oct3\4</i>	<i>Addgene, #13366</i>
<i>Sox2</i>	<i>pXMXs-Sox2</i>	<i>Addgene, #13367</i>
<i>c-Myc</i>	<i>pMXs-c-Myc</i>	<i>Addgene, #13375</i>
<i>KLF4</i>	<i>pMXs-KLF4</i>	<i>Addgene, #13370</i>
<i>VSV-G</i>	<i>pCMV-VSV-G</i>	<i>Addgene, #8454</i>
<i>Gag-Pol</i>	<i>pUMVC-gag-pol</i>	<i>Addgene, #8449</i>

#### 5.1.2 Primersequenzen

Gen	Forward-Primer (5'-3')	Reverse-Primer (3'-5')
<i>GAPDH</i>	<i>CTGGTAAAGTGGATATTGTTGCCAT</i>	<i>TGGAATCATATTGGAACATGTAAACC</i>
<i>endo KLF4</i>	<i>ACAGTCTGTTATGCTCTGTGGTTTCA</i>	<i>CATTTGTTCTGCTTAAGGCATACTTGG</i>
<i>viral KLF4</i>	<i>CCTCGCCTTACACATGAAGAGACA</i>	<i>CACCAGACCAACTGGTAATGGTAGC</i>
<i>Endo c-MYC</i>	<i>CCAGCAGCGACTCTGAGGA</i>	<i>GAGCCTGCCTCTTTCCACAG</i>
<i>Viral c-MYC</i>	<i>GCTACGGAACCTTTGTGCGTGA</i>	<i>CACCAGACCAACTGGTAATGGTAGC</i>
<i>Endo OCT4</i>	<i>GGAAGGAATTGGGAACACAAAGG</i>	<i>AACTTCACCTTCCCTCCAACCA</i>
<i>Viral OCT4</i>	<i>GGCTCTCCCATGCATTCAAAC</i>	<i>CATGGCCTGCCCGGTTATTA</i>
<i>Endo SOX2</i>	<i>TGGCGAACCATCTCTGTGGT</i>	<i>CCAACGGTGTCAACCTGCAT</i>
<i>Viral SOX2</i>	<i>GCACACTGCCCTCTCACAC</i>	<i>CACCAGACCAACTGGTAATGGTAGC</i>
<i>NANOG</i>	<i>CCTGTATTTGTGGGCCTG</i>	<i>GACAGTCTCCGTGTGAGGCAT</i>
<i>REX1</i>	<i>GCACACTAGGCAAACCCACC</i>	<i>CATTTGTTTCAGCTCAGCGATG</i>

<i>TDGF1</i>	<i>GACGGAACTGTGAGCACGATGT</i>	<i>AATGCCTGAGGAAAGCAGCGGA</i>
<i>UPF1</i>	<i>AACGAGCACCAAGGCATTGGCT</i>	<i>GGCTGCTTTGATAGTGCCTTCG</i>
<i>DNMT3B</i>	<i>TAAACAACGGCAAAGACCGAGGG</i>	<i>TCCTGCCACAAGACAAACAGCC</i>

### **5.1.3 Zelllinien**

<b>Name</b>	<b>Zellart</b>	<b>Ursprung und Mutation</b>
<i>α-Syn A30P</i>	<i>Humane Fibroblasten</i>	<i>Patient, A30P Mutation, HIH Biobank</i>
<i>17608</i>	<i>Humane Fibroblasten</i>	<i>Anonymer Spender, WT, HIH Biobank</i>
<i>α-Syn Kontrolle</i>	<i>Humane Fibroblasten</i>	<i>Geschwister des A30P Indexpatient, WT, HIH Biobank</i>
<i>SNCA 1</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>α-Syn A30P Indexpatient</i>
<i>SNCA 2</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>α-Syn A30P Indexpatient</i>
<i>Kontrolle 1</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>17608</i>
<i>Kontrolle 2</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>17608</i>
<i>Kontrolle 1 + A30P</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>17608, A30P Mutation</i>
<i>SNCA Kontrolle 1</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>α-Syn Kontrolle Geschwister Indexpatient, WT</i>
<i>SNCA Kontrolle 2</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>α-Syn Kontrolle Geschwister Indexpatient, WT</i>
<i>SNCA Kontrolle 3</i>	<i>Humane iPS Zellen</i>	<i>α-Syn Kontrolle Geschwister Indexpatient, WT</i>
<i>MEF-Feeder</i>	<i>Embryonale Maus Fibroblasten</i>	<i>Maus, WT</i>
<i>HEK293T</i>	<i>Human embryonal kidney Zellen</i>	<i>Human, ATCC CRL-11268</i>

### 5.1.4 Zellkulturmedien

Name	Bestandteil	Hersteller
<i>Fibroblasten-Medium</i>	<i>DMEM high Glucose</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>FCS 10%</i>	<i>PAA</i>
	<i>Penicillin\Streptomycin</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>β-Mercaptoethanol 50μM</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>NEAA 1%</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Mouse embryonal fibroblast-Medium (MEF-Medium)</i>	<i>KO-DMEM</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>FCS 10%</i>	<i>PAA</i>
	<i>Penicillin\Streptomycin\Glutamin</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Human embryonal kidney-Medium (HEK-Medium)</i>	<i>DMEM high Glucose</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>FCS 10%</i>	<i>PAA</i>
	<i>Penicillin\Streptomycin</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Human Stem Cell Medium (hES-Medium)</i>	<i>KO-DMEM</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>KO-Serum Replacement 20%</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>0,2% β-Mercaptoethanol 50μM</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>NEAA 1%</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>Penicillin\Streptomycin\Glutamin</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>N2B27-Medium</i>	<i>DMEM\F12 50%</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>Neurobasal-Medium 50%</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>N2-Supplement</i>	<i>Life Technologies</i>
	<i>B27-Supplement ohne Vitamin A</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (aCSF) 1 Liter</i>	<i>Natriumchlorid 8,66g</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Kaliumchlorid 0,224g</i>	<i>Fluka</i>
	<i>Kalziumchlorid-dihydrat 0,206g</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Magnesiumchlorid-hexahydrat 0,163g</i>	<i>Applichem</i>

	<i>Di-natriumhydrogenphosphat-heptahydrat 0,214g</i>	<i>Fluka</i>
	<i>Natrium-di-hydrophosphat-monohydrat 0,027g</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>D-Glukose 10g\l</i>	<i>Life Technologies</i>

### **5.1.5 Puffer und Lösungen**

<b>Name</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Phosphat gepufferte Saline 5x pH = 7.2 (PBS)</i>	<i>Natriumchlorid 685mM</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Kaliumchlorid 13,5mM</i>	<i>Fluka</i>
	<i>Di-Natriumhydrogenphosphat-heptahydrat 50mM</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Kalium-di-Hydrogenphosphat 9mM</i>	<i>Roth</i>
<i>Lyse-Puffer 1x</i>	<i>PBS</i>	<i>s.PBS</i>
	<i>Triton-X 100 0,5%</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Complete Protease Inhibitor 1 Tablette\50ml</i>	<i>Roche</i>
<i>Para-Formaldehyd-Lösung 4%, pH = 7.2 (PFA)</i>	<i>PBS</i>	<i>s.PBS</i>
	<i>Para-Formaldehyd 4%</i>	<i>Applichem</i>
<i>Tris gepufferte Saline 10x pH = 7,5</i>	<i>Natriumchlorid 5M</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Tris-Base 35mM</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Tris-HCl 165mM</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Laemmli-Puffer 2x pH = 6.8</i>	<i>4% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)</i>	<i>Fluka</i>
	<i>β-Mercaptoethanol 10%</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Glycerol 20%</i>	<i>Roth</i>
	<i>Bromphenolblau 0.004%</i>	<i>Roth</i>
	<i>Tris-HCL 0.135M</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>



<i>Lauf-Puffer pH = 8,3</i>	<i>Tris-base 25mM</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>Glycine 190mM</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>SDS 0,1%</i>	<i>Fluka</i>
<i>Block-Puffer</i>	<i>TBS</i>	<i>s.TBS</i>
	<i>Milchpulver 5%</i>	<i>Applichen</i>
<i>Stripping-Puffer</i>	<i>Destilliertes Wasser</i>	<i>Millipore</i>
	<i>SDS 2%</i>	<i>Fluka</i>
	<i>Tris-HCl 0,25M</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
	<i>β-Mercaptoethanol 8%</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>

### **5.1.6 Kits**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Plasmid Midi Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>RNeasy Midi Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>QuantiTect Sybr Green RT-PCR Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit</i>	<i>Qiagen</i>
<i>Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit</i>	<i>R&amp;D Systems</i>
<i>Bradford Assay Kit</i>	<i>Applichem</i>
<i>Mycoplasma PCR-Detection Kit</i>	<i>Applichem</i>

### 5.1.7 Antikörper und Fluoreszenzmarker

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
<i>Ratte anti SSEA-3</i>	<i>Millipore</i>	<i>1\100</i>
<i>Maus anti Tra-1-81</i>	<i>Abcam</i>	<i>1\150</i>
<i>Kaninchen anti Nanog</i>	<i>Millipore</i>	<i>1\250</i>
<i>Kaninchen anti Pax6</i>	<i>Covance</i>	<i>1\300</i>
<i>Maus anti Nestin</i>	<i>R&amp;D</i>	<i>1\150</i>
<i>Maus anti <math>\alpha</math>-Synuclein</i>	<i>Millipore</i>	<i>1\2000</i>
<i>Ziege anti Sox2</i>	<i>Santa Cruz</i>	<i>1\200</i>
<i>Maus anti Forse-1</i>	<i>Millipore</i>	<i>1\50</i>
<i>Maus anti FoxA2</i>	<i>Santa Cruz</i>	<i>1\200</i>
<i>Kaninchen anti Thyrosinhydroxylase</i>	<i>Pel Freez</i>	<i>1\400</i>
<i>Kaninchen anti MAP2</i>	<i>Santa Cruz</i>	<i>1\1000</i>
<i>Maus anti Oct4</i>	<i>Millipore</i>	<i>1\100</i>
<i>Maus anti beta-3-Tubulin</i>	<i>Abcam</i>	<i>1\5000</i>
<i>Alexa 488 anti Maus</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>1\1000</i>
<i>Alexa 488 anti Kaninchen</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>1\1000</i>
<i>Alexa 546 anti Maus</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>1\1000</i>
<i>Alexa 546 anti Kaninchen</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>1\1000</i>
<i>Alexa 546 anti Ziege</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>1\1000</i>
<i>HRP-konjugierter anti Maus</i>	<i>Life Technologies</i>	<i>1\10000</i>
<i>Hoechst 33342</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>1\20000</i>
<i>To-Pro 3</i>	<i>Life Technologies</i>	<i>1\1000</i>
<i>MitoTracker Green</i>	<i>Molecular Probes</i>	<i>1\10000</i>

## 5.1.8 Chemikalien

Name	Hersteller
<i>Natriumchlorid</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Kaliumchlorid</i>	<i>Fluka</i>
<i>Kalziumchlorid-dihydrat</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Magnesiumchlorid-hexahydrat</i>	<i>Applichem</i>
<i>Di-natriumhydrogenphosphat-heptahydrat</i>	<i>Fluka</i>
<i>Natrium-di-hydrophosphat-monohydrat</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)</i>	<i>Fluka</i>
<i><math>\beta</math>-Mercaptoethanol</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Glycerol</i>	<i>Roth</i>
<i>Bromphenolblau</i>	<i>Roth</i>
<i>Tris-HCL</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Kalium-di-Hydrogenphosphat</i>	<i>Roth</i>
<i>Triton-X 100</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Para-Formaldehyd</i>	<i>Applichem</i>
<i>Glycine</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Milchpulver</i>	<i>Applichen</i>
<i>Destilliertes Wasser</i>	<i>Millipore</i>
<i>Natriumhydroxid-Plättchen</i>	<i>Fluka</i>
<i>Salzsäure 37%</i>	<i>Merck</i>
<i>Fibroblasten Wachstumsfaktor 2</i>	<i>Peprotech</i>
<i>Fibroblasten Wachstumsfaktor 8</i>	<i>Peprotech</i>
<i>Valproinsäure</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Rock-Inhibitor</i>	<i>Ascent Scientific</i>
<i>Protaminsulfat</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>SB-43152</i>	<i>Ascent Scientific</i>
<i>Dorsomorphin</i>	<i>Tocris</i>
<i>Chir-99021</i>	<i>Axon Medchem</i>
<i>Purmorphamin</i>	<i>Alexis</i>
<i>Ascorbinsäure</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Accutase</i>	<i>StemPro</i>

<i>Kollagenase IV</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>dbcAMP</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>TGF-<math>\beta</math>3</i>	<i>Peprotech</i>
<i>GDNF</i>	<i>Peprotech</i>
<i>BDNF</i>	<i>Peprotech</i>
<i>Tris-HCl</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Matrigel Growthfactor reduced</i>	<i>Corning</i>
<i>Poly-L-Ornithine-hydrobromid</i>	<i>Sigma</i>
<i>Laminin</i>	<i>Sigma</i>
<i>Methanol</i>	<i>Merck</i>
<i>Ethanol</i>	<i>VWR</i>
<i>2-Propanol</i>	<i>VWR</i>
<i>0.05% Trypsin</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Protein Leiter</i>	<i>Promega</i>
<i>DMEM High Glucose</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Knock-Out DMEM</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>DMEM\F12</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Neurobasal</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Fötales Kälber-Serum (FCS)</i>	<i>PAA</i>
<i>Knock-out Serum Replacement</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Nonessential Amino Acids (NEAA)</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Penicillin\Strptomycin</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>Penicillin\Strptomycin\Glutamin</i>	<i>Life Technologies</i>
<i><math>\beta</math>-Mercaptoethanol 1mM</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>D-Glykose</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>N2-Supplement</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>B27-Supplement ohne Vitamin A</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>FGF-Rezeptor Inhibitor PD-173074</i>	<i>Selleckchem</i>

## 5.1.9 Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Lumox-Dish 3,5cm</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Zellkulturschale 1,5cm</i>	<i>Greiner</i>
<i>Zellkulturschale 3,5cm</i>	<i>Greiner</i>
<i>Zellkulturschale 10cm</i>	<i>Greiner</i>
<i>Zellkulturschale 15cm</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Zellkulturplatte 6-Well</i>	<i>Nunc, Thermo Scientific</i>
<i>Zellkulturplatte 12-Well</i>	<i>Nunc, Thermo Scientific</i>
<i>Zellkulturplatte 96-Well</i>	<i>Greiner</i>
<i>Einfrierröhrchen 1ml</i>	<i>Nunc, Thermo Scientific</i>
<i>Lab Tek HII Chamberslide</i>	<i>Nunc, Thermo Scientific</i>
<i>Reaktionsgefäß mit Schnappdeckel 0,5ml</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Reaktionsgefäß mit Schnappdeckel 1,5ml</i>	<i>Eppendorf</i>
<i>Reaktionsgefäß mit Schnappdeckel 2,0ml</i>	<i>Eppendorf</i>
<i>Röhre mit Schraubdeckel 15ml</i>	<i>Falcon</i>
<i>Röhre mit Schraubdeckel 50ml</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Zellkulturspachtel</i>	<i>Corning</i>
<i>Einwegspritze 1ml</i>	<i>Braun</i>
<i>Einwegspritze 10ml</i>	<i>Braun</i>
<i>Einwegspritze 50ml</i>	<i>Braun</i>
<i>Microlance 3 Einwegkanüle</i>	<i>BD</i>
<i>Einwegfilter für Spritze 0.22µm PVDA</i>	<i>Millex</i>
<i>Einwegfilter für Spritze 0.22µm Nitrocellulose</i>	<i>Millex</i>
<i>Sterilfilterflasche für Zellkulturmedien 0,5L</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Pipettenspitzen mit Filter 20µl</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Pipettenspitzen mit Filter 200 µl</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Pipettenspitzen mit Filter 1000µl</i>	<i>Sarstedt</i>
<i>Einwegpipetten steril 5ml</i>	<i>Corning</i>
<i>Einwegpipetten steril 10ml</i>	<i>Corning</i>
<i>Einwegpipetten steril 25ml</i>	<i>Corning</i>
<i>Glaspipetten 150mm</i>	<i>WU-Mainz</i>
<i>Deckgläser 15mm</i>	<i>Menzel-Gläser</i>

<i>Objekträger Superfrost II</i>	<i>Menzel-Gläser</i>
<i>Parafilm</i>	<i>Bemis</i>
<i>Pinzette 7</i>	<i>Dumont&amp;Fils</i>
<i>Schere</i>	<i>Fine Science Tools</i>
<i>Skalpel</i>	<i>Braun</i>

### **5.1.10 Laborgeräte**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Vortex Genie 2</i>	<i>Scientific Industries</i>
<i>MR 3001 Magnetrührer</i>	<i>Heidolph</i>
<i>Zellkulturmikroskop TS1000</i>	<i>Nikkon</i>
<i>Axio Observer Z1 mit Inkubator und Gasmischer</i>	<i>Carl Zeiss</i>
<i>Axio Imager</i>	<i>Carl Zeiss</i>
<i>VWB 18 Wasserbad</i>	<i>VWR</i>
<i>5417 R Zentrifuge</i>	<i>Eppendorf</i>
<i>Rotana 460R Zentrifuge</i>	<i>Hettich</i>
<i>UW 70 Ultraschallanzenze</i>	<i>Bandelin</i>
<i>FPM – 800A Entwicklermaschine</i>	<i>Fuji</i>
<i>DX – 65 Autoklav</i>	<i>Systec</i>
<i>VX – 150 Autoklav</i>	<i>Systec</i>
<i>iBlot Trockenblotgerät</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>MCO 18 AC Feuchtinkubator</i>	<i>Sanyo</i>
<i>PC 2004 Vario Vakuumpumpe</i>	<i>Vacuumbrand</i>
<i>Si 235 Analysewaage</i>	<i>Deurer Instruments</i>
<i>Zählkammer Neubauer improved</i>	<i>Roth</i>
<i>ND1000 Nonodrop Spectrophotometer</i>	<i>PeqLab</i>
<i>Pipette 0,1-2µl</i>	<i>Gilson</i>
<i>Pipette 2-20µl</i>	<i>Eppendorf</i>
<i>Pipette 20-200µl</i>	<i>Eppendorf</i>
<i>Pipette 100-1000µl</i>	<i>Eppendorf</i>

<i>Automatikpipette</i>	<i>Hirschmann Laborgeräte</i>
<i>Herasafe Zellkulturbank</i>	<i>Thermo Scientific</i>
<i>Polymax 1090 Rütteltisch</i>	<i>Heidolph</i>
<i>7500 RT PCR System rtPCR Maschine</i>	<i>Applied Biosystems</i>
<i>Mr.Frosty™ Freezing Container</i>	<i>Thermo Scientific</i>

### **5.1.11 Software**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Windows XP</i>	<i>Microsoft</i>
<i>Windows 7</i>	<i>Microsoft</i>
<i>Windows 8.1</i>	<i>Microsoft</i>
<i>OpenOffice 4.1</i>	<i>Oracle</i>
<i>AxioVision</i>	<i>Carl Zeiss</i>
<i>Fiji is just ImageJ (FIJI)</i>	<i>Open source NIH Imaging Solution</i>
<i>Chromosome Analysis Suite</i>	<i>Affimetrix</i>

## **5.2 Methoden**

### ***5.2.1 Hautbiopsie und Zellkultur für Fibroblasten***

Für diese Studie wurden mehrere humane Linien von Fibroblasten genutzt. Zwei Linien stammen von Geschwistern, von denen eine Person die  $\alpha$ -Syn A30P Mutation trägt. Das andere Geschwistern-Teil trägt diese Mutation nicht und kann somit als Kontrolle für spätere Versuche dienen (Kruger, Kuhn et al. 2001).

Als Kontrolle dient in dieser Studie eine dem Mutationsträger nach Alter und Geschlecht angepasste Fibroblastenlinie 17608 (Biobank, Hertie Institut, Universität Tübingen). Alle Fibroblasten wurden entsprechend des bestehenden Ethik-Votums und nach Einverständnis der Probanden entnommen und nach Anonymisierung aus Gründen des Datenschutzes für die Versuche zur Reprogrammierung und funktionellen Analyse verwendet.

Die Hautbiopsie wurde von einem erfahrenen Arzt unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Unter normalen Umständen wird das Hautstück am Oberarm, Nacken oder im Rückenbereich entfernt und sollte zwischen 3 und 6mm Durchmesser betragen. Zur Vorbereitung der Kultivierung wird das tiefer in der Haut liegende Fettgewebe entfernt und das Hautstück in mehrere ungefähr 4mm<sup>2</sup> kleine Stücke geschnitten. Diese Stücke werden im Abstand von 5mm voneinander in einer Zellkulturschale mit 10cm Durchmesser (Greiner) ausgesät und mit Fibroblasten-Medium (DMEM 4,5g/L Glukose, 10%FCS, 50 $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1% Penicillin/Streptomycin) überdeckt und in einem Inkubator (Sanyo) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Nach ein bis zwei Wochen wachsen die ersten Fibroblasten aus den Hautstücken und beginnen einen Zellrasen zu bilden.

Wenn die Fibroblasten zu etwa 70% konfluent sind, werden die Hautstücke abgenommen und in eine neue Zellkulturschale (Greiner) mit Medium überführt. Die Fibroblasten werden mit 0,05% Trypsinlösung (Life Technologies) abgelöst, mit der zehnfachen Menge an Medium verdünnt und bei 200g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet aus Fibroblasten kann nun in Einfrier-Medium (50% DMEM, 40% FCS und



10%DMSO) übernommen und in einem 1ml Cryogefäß (Nunc, Thermo Scientific) und Einfrier-Rondel (Thermo Scientific) für spätere Verwendung eingefroren werden.

Für die weitere Kultur der Fibroblasten werden diese in Zellkulturschalen (Greiner) mit 10cm Durchmesser gegeben und mit Fibroblasten-Medium (DMEM 4,5g/L, 10%FCS, 50µM β-Mercaptoethanol 1% Penicillin/Streptomycin) versorgt. Bei 80% Konfluenz wurden die Zellen mit 1,5ml Trypsin für 10min abgelöst und mit 10ml Fibroblastenmedium verdünnt. Anschließend wird die Zellsuspension mit 200g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 30ml Fibroblastenmedium resuspendiert und auf drei neue Zellkulturschalen mit 10cm Durchmesser verteilt oder eingefroren.

### ***5.2.2 Gewinnung von embryonalen Maus Fibroblasten zur Co-Kultur***

Für die Herstellung von Feeder-Zellen benötigt man die Embryonen von Mäusen, aus denen man die embryonalen Fibroblasten isoliert. Die meist empfohlenen Mauslinien sind die CF-1 oder C3H Linien, in dieser Studie wird jedoch die in der Neurowissenschaft häufig verwendete Linie Black6 genutzt.

Die Mäuse werden verpaart und täglich auf einen positiven Samenpfropfen untersucht. Falls der Pfropfen nicht klar erkennbar ist, kann auch mittels Gewichtszunahme der ungefähre Paarungszeitraum ermittelt werden. An Tag 10,5 sollte ein signifikanter Gewichtszuwachs messbar sein.

Die Mutter wird an Tag 12,5 der Schwangerschaft euthanasiert und unter semi-sterilen Konditionen die Uteri entfernt. Hierfür wird erst das gesamte Abdomen der Maus mit 70%igem Ethanol gespült und dann mit einer Schere vom Brustbein bis zum Becken geöffnet. Die Öffnung wird mit Stecknadeln fixiert um eine Kontamination der Uteri zu minimieren. Beide Uteri werden entfernt und in ein 50ml Schraubgefäß mit 70%igem Ethanol gegeben und unter die Zellkulturbank gebracht. Die Zeitspanne sollte zwischen 10 und 30 Sekunden betragen, da der Ethanol die Embryonen angreift. Nun werden die Uteri in Zellkulturschalen mit 15cm Durchmesser (Sarstedt) überführt und mit dPBS (Life Technologies) gewaschen. Anschließend werden die Embryos aus den Uteri entfernt, wobei

umliegende Membranen und die Plazenta entfernt werden. Die so erhaltenen Embryonen werden in eine neue Zellkulturschale überführt und der Kopf und die inneren Organe mit einer feinen Pinzette entfernt. Der Körper der Embryonen wird wieder in eine neue Zellkulturschale überführt und mit einem flachen Skalpell zu einer pipetierbaren Masse homogenisiert. Diese Masse wird in ein 50mL Gefäß überführt, mit 1 bis 2mL Trypsin pro Embryo (Life Technologies) für 15min bei 37°C inkubiert. Nun wird das Trypsin mit einigen Millilitern fötalem Kälberserum (FCS) inaktiviert. Die DNA von lysierten und beschädigten Zellen wird oben als zähe Wolke in dem Gefäß schwimmen und kann mit einer 1000µL Pipette entfernt werden. Die Zellmasse wird mit 70µm Zellsieben abfiltriert und bei 200g für 5min abzentrifugiert. Das Palett wird mit MEF-Medium (DMEM 4,5g/mL Glukose, 10%FCS, 50nM β-Mercaptoethanol, Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und in T150 Zellkulturflaschen (Greiner) ausgesät. Am nächsten Tag muss das Medium gewechselt werden um Zelltrümmer und nicht angewachsenen Zellen zu entfernen. Wenn die Zellkulturflaschen zu 100% konfluent sind, werden die MEF-Zellen mit 1mL Trypsin abgelöst, in 10mL MEF Medium aufgenommen, bei 200g abzentrifugiert und in MEF-Einfriermedium (DMEM 4,5g\l Glukose, 40%FCS, 10%DMSO) eingefroren. Pro Flasche nimmt man zwei 1mL Cryogefäße und friert die MEF-Zellen in einem Einfrierrondell bei -80°C ein. Ein kleiner Teil der Zellen wird in eine T150 Flasche gegeben und mit 30 mL MEF Medium ohne Antibiotika gegeben und für 2 Wochen inkubiert. Anschließend wird der Überstand dieser Flasche mit einem Mycoplasmen-PCR Kit (Applichem) getestet.

Nach einem negativen Resultat des Mycoplasmen-Tests werden die MEF-Zellen aufgetaut und in einer Zellkulturschale mit 15cm Durchmesser ausgesät. Die Zellen werden dann 2 bis 3 mal in einem Verhältnis von 1:3 vermehrt. Um weitere Teilungen der Zellen zu verhindern werden sie mit 1µg\ml Mitomycin-C, einem Cytostatikum, für 3 Stunden inaktiviert und zu Aliquots mit 1 Million und 2 Millionen Zellen eingefroren.

### **5.2.3 Retrovirale Reprogrammierung der Fibroblasten**

Für die Reprogrammierung der humanen Fibroblasten dienen Retroviren als Vektor, durch die die vier Yamanaka-Faktoren Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc in die humanen Fibroblasten eingeschleust werden. Diese Retroviren erhält man durch Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) mit den vier Yamanaka-Faktoren, Gag-Pol (Gag exprimiert Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, Pol kodiert für die Reverse Transkriptase, Protease und Integrase) und VSV-G (exprimiert virale Glycoproteine für Virushülle). Dafür sät man HEK293T-Zellen in Zellkulturschalen (Greiner) mit 10cm Durchmesser aus und inkubiert diese bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Wenn diese zu ca. 80% konfluent sind, wird das HEK-Medium (KO-DMEM 4,5g/l Glukose, 10%FCS, 1% PSG) abgesaugt, die Zellen mit 10ml Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (dPBS, Gibco) gewaschen und mit 1,5ml Trypsinlösung (Life Technologies) für 5min inkubiert. Die Zellen werden mit 8,5ml HEK-Medium abgewaschen und bei 200g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet wird mit 50ml HEK-Medium gelöst und in 5 neue Zellkulturschalen mit 10cm Durchmesser gegeben. Nach 24h werden die HEK-Zellen in jeder Zellkulturschale transfiziert. Das Transfektionsmedium besteht aus 2,25µg Gag-Pol (Addgene), 0,25µg VSV-G (Addgene) und 9µg eines Yamanaka-Faktors (Addgene) mit 30µl Fugene-6 (Life Technologies) in 600µl HEK-Medium. Dies wird für 30min inkubiert und tröpfchenweise auf eine Zellkulturschale mit 10ml frischem HEK-Medium gegeben. Oct4 ist ein wichtiger Faktor bei der Reprogrammierung, deswegen werden zwei Zellkulturschalen transfiziert und das Virus in doppelter Menge eingesetzt. Nach 24h wird das HEK-Medium zu Fibroblasten-Medium (KO-DMEM, 10%KO-Serum Replacement, 50µM β-Mercaptoethanol, 1%PSG) gewechselt. 24h später wird das Medium abgenommen, mit PVDF-Zellkulturfiltern mit 20µm Durchmesser (Millex) gefiltert und auf Eis gestellt, die HEK-Zellen werden erneut mit 10ml Fibroblasten-Medium versorgt um Viren für eine weitere Infektion zu erhalten. Die fünf Zellkulturüberstände mit viralen Partikeln werden zu gleichen Teilen gemischt und mit 20% frischen Fibroblastenmedium versetzt, da die Virusproduktion dem Medium viele Nährstoffe entzogen hat. Zuzüglich wird 4µg/ml Protaminsulfat (Sigma-Aldrich) zum Virusüberstand gegeben. Protamin ist ein Bestandteil von Sperma, bindet an die DNA und kondensiert diese (Yang and Hsieh 2001, Balhorn 2007) und hilft daher bei der Transduktion der Fibroblasten. Die Fibroblasten die am Vortag in 6-Well Zellkulturplatten (Nunc, Thermo Scientific) mit

25000 Zellen pro *Well* ausgesät wurden, werden mit 5ml pro *Well* viralen Zellkulturüberstand versetzt. Der Infektionsvorgang wird nach 12h wiederholt. Falls die Ausbeute an iPS-Kolonien nicht ausreichend ist, kann die Transduktion mit weiteren Chargen an Virus nach 18h und 24h wiederholt werden. Nach 24h wird der Virusüberstand abgenommen und die Zellen vier mal mit PBS gewaschen um Virusrückstände zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit 1ml Trypsin pro *Well*, wie oben beschrieben passagiert und mit 25000 Zellen pro *Well* in eine neue 6-*Well* Zellkulturplatte gegeben. Dem Fibroblasten-Medium werden ab diesem Stadium 1mM Valproinsäure (VPA, Sigma-Aldrich) und 5ng/ml Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (bFGF) zugegeben. Nach weiteren 24h wird das Medium auf humanes Stammzell-Medium (hES-Medium) mit 1mM VPA (Sigma-Aldrich), 5ng/ml bFGF (Peprotech), SB-421543 (Sigma-Aldrich) und 1ng/ml FGFR-Antagonist PD-173074 (Selleckchem) zugegeben. Das hES-Medium mit den oben genannten Zusätzen wird täglich gewechselt und um 0,5ml hES-Medium erhöht, wenn der Phenolrot-Indikator eine gelbliche Farbe bekommt, also saurer wird. Etwa sieben Tage nach der Infektion kann man die ersten iPS-Kolonien erkennen. Wenn die Kolonien eine Größe von etwa 10mm<sup>2</sup> erreicht haben, können sie in 12-*Well* Zellkulturplatten mit MEF-Feederzellen passagiert werden. Es muss für jede Kolonie ein *Well* zur Verfügung stehen. Dafür wird ein 1,0ml Cryo-Röhrchen (Nunc, Thermo Scientific) mit einer Million MEF-Feederzellen aufgetaut, mit 4ml MEF-Medium verdünnt und bei 200g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Palett mit 12ml MEF-Medium gelöst und gleichmäßig auf die 12-*Well* Zellkulturplatte verteilt. Nachdem die MEF-Zellen angewachsen sind, wird das MEF-Medium mit 1ml hES-Medium ausgetauscht, das mit 5ng/ml bFGF und 10µM Rock-Inhibitor (Selleckchem) versetzt ist. Nun wird jede iPS-Kolonie in ein *Well* der 12-*Well* Zellkulturplatte überführt. Die iPS-Kolonien werden dafür mit 1ml hES-Medium mit 1mg/ml Collagenase IV für 10 bis 15min inkubiert um die Kolonien leicht abzulösen. Wenn die Ränder der Kolonien anfangen sich abzulösen wäscht man die Zellen einmal mit hES-Medium. Jedes *Well* wird wieder mit 2ml hES-Medium gefüllt, die Kolonien mit einem Mikroskop (Nikon) unter einer semisterilen Zellkulturbank (Thermo Scientific) mit laminarer Luftströmung mit Hilfe einer 200µl Pipette (Eppendorf) abgenommen und in ein neues *Well* überführt. Jede dieser Kolonien ist ein Klon des jeweiligen Probanden und muss nun die nächsten Wochen propagiert werden. Dafür werden die angewachsenen Kolonien täglich mit frischen hES-Medium mit 5ng/ml bFGF versorgt. Wenn der Klon eine Größe von etwa 25mm<sup>2</sup> erreicht hat, werden erneut MEF-Feederzellen in 12-*Well* Zellkulturplatten ausgesät. Die Klone werden wie

oben beschrieben gesplittet, nur versucht man vorsichtig, den Klon in zwei bis drei kleinere Kolonien zu teilen um ihn zu propagieren. Nachdem der Klon nun mehrere Kolonien gebildet hat, wiederholt man das Passagieren bis das *Well* zu etwa 60% mit Kolonien bedeckt ist. Nun können die Kolonien der Klone in 6-*Well* Zellkulturplatten überführt werden. Bei diesen Platten werden eine Million MEF-Feederzellen auf fünf *Wells* verteilt. Dieser Schritt wird solange wiederholt bis das *Well* zu etwa 75% mit Kolonien bedeckt ist. Dann werden die Kolonien in fünf *Wells* einer 6-*Well* Zellkulturplatte passagiert. Wenn diese Konfluent ist, werden drei *Wells* eingefroren. Bei den anderen zwei werden die MEF-Feederzellen mittels einer 200µl Pipette abgekratzt und mit PBS abgewaschen. Die Kolonien aus einem gesäuberten *Well* werden mit 200µl RLT-Puffer (Qiagen) gelöst und bis zur weiteren Expressionsanalyse mittels RT-PCR bei -80°C eingefroren. Die anderen Kolonien des zweiten, von MEF-Feederzellen befreiten *Wells* werden mit einer 200µl Pipette (Eppendorf) abgenommen und bei -80°C eingefroren, um später DNA daraus zu extrahieren.

#### **5.2.4 iPS-Zellkultur**

Alle Schritte des Passagierens werden unter einer sterilen Arbeitshaube mit laminaren Luftzug durchgeführt. Um die Kolonien von MEF-Feederzellen zu säubern und für die Überführung der Kolonien wird ein Mikroskop (Nikon) unter der Arbeitshaube angebracht, da für jeden Arbeitsschritt eine keim-reduzierte Arbeitsatmosphäre und ausreichende Vergrößerung der Kolonien benötigt wird. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator (Sanyo) verwahrt.

Klone deren virale Vektoren inaktiviert und ihre Stammzellmarker exprimieren, werden aufgetaut und in 6-*Well* Zellkulturplatten (Nunc, Thermo Scientific) mit MEF-Feederzellen ausgesät. Es wird täglich das Medium mit 5ng/ml bFGF gewechselt und bei gelblicher Indikatorfarbe das Volumen angepasst um einer Unterversorgung mit Nährstoffen entgegen zu wirken. Wenn das *Well* zu 70% mit Kolonien bedeckt ist, oder spätestens sieben Tage nach der Passagierung, werden die Kolonien in eine neue Zellkulturplatte mit MEF-Feederzellen umgesetzt. Nicht benötigte *Wells* mit Kolonien werden in Einfriermedium (50% KO-DMEM, 40% KO-Serum Replacement, 10% DMSO) in einem Einfrierrondell (Thermo Scientific) bei -80°C eingefroren. Zu passagierende Kolonien

werden von MEF-Feederzellen befreit, indem man mit einer 200µl Pipette (Eppendorf) den Zellrasen ausserhalb der Kolonien entfernt und absaugt. Anschließend werden die Kolonien mit 1mg/ml Kollagenase IV (Life Technologies) in hES-Medium für 10 bis 15min angelöst. Wenn die Ränder der Kolonien sich leicht anheben, wird das Kollagenase-haltige Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit hES-Medium gewaschen. Die Kolonien werden mit 1ml hES-Medium versorgt und mit einem Zellkulturspachtel (Corning) abgeschabt. Mit einer 1000µl Pipette (Eppendorf) tituriert man die Kolonien um diese zu verkleinern und verteilt diese auf eine neue 6-Well Zellkulturplatte mit Feeder-Zellen. Am Tag des Passagierens, kann 1µM Rock-Inhibitor zum Medium gegeben werden um das Absterben einzelner iPS-Zellen oder kleinerer Kolonien zu unterdrücken.

### ***5.2.5 Genkorrektur mit Transkription activator-like effector nuclease (TALEN)***

TALENs sind artifizielle Restriktionsenzyme. Sie werden durch Fusion einer TAL-Effektor DNS-Bindedomäne mit einer DNS-Schneidedomäne kreiert. Durch dies kann die DNS einer Zelle *in situ* geändert werden. Es wird ein homologes Konstrukt der gewünschten Stelle erstellt, in das eine Neomycin-Resistenz Kasette inkloniert wird. Das Plasmid mit dem homologen Konstrukt wird zusammen mit den beiden Plasmiden, die die TALENs tragen, durch Elektroporation in die Zelle eingebracht. Positiv rekombinierte Zellen können mit Neomycin selektiert werden.

Die artifizielle Genmutation A30P im SNCA-Gen wurde von David Schöndorf, aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gasser, in die Zelllinie Kontrolle1 eingefügt.

## **5.2.6 Generierung von neuronalen Vorläuferzellen (smNPC) und deren Zellkultur**

Die Generierung der smNPCs findet in mit Matrigel (1% in dPBS, Corning) beschichteten 12-Well Zellkulturplatten (Nunc, Thermo Scientific) statt. Die Lösung sollte mindestens eine halbe Stunde im Inkubator (Sanyo) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stehen um eine ausreichende Beschichtung der Zellkulturschalen zu gewährleisten. Die Schalen können so auch über mehrere Tage aufbewahrt werden. Fünf bis zehn iPS-Kolonien werden, wie in Kapitel 6.4 beschrieben, passagiert und in ein Well, das mit 500µl hES-Medium mit 10µM SB-43152 (Sigma-Aldrich), 500nM PMA (Cayman Chemicals), 1µM DMA (Selleck Chemicals) und 3µM Chir-99021 (Axon Medchem) versetzt wurde, überführt. Das Medium wird täglich gewechselt und die Menge gegebenenfalls angepasst. Am fünften Tag wird das Medium zu N2B27-Medium (50:50 Neurobasalmedium (Life Technologies) und DMEM\F-12 (Life Technologies) mit N2- und B27-Supplement ohne Vitamin A (Life Technologies, 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin (PSG, Life Technologies)) gewechselt. Anstelle der Additive SB-43152 und DMA wird 150µM Ascorbinsäure dem Medium dazugegeben. Das Medium wird täglich gewechselt. Am siebten Tag sollten sich embryoiden Körper gebildet haben. Man passagiert einen embryoiden Körper, der Auswüchse aus Neuroepithel aufweist. Dieser wird mit einer 1000µL Pipette (Eppendorf) aufgenommen und in einem neuen matrigelbeschichteten Well durch Titrieren verkleinert. Diese Propagation wird etwa vier mal wiederholt, bis eine homogene Zellkultur aus Neuroepithelzellen vorliegt. Ist die gewünschte Homogenität erreicht und das Well zu etwa 80% konfluent, wird das Medium abgenommen, mit 1mL PBS gewaschen und die Zellen für 15min mit 150µL Accutase (Stempro) bei 37°C dissoziiert. Die Reaktion der Accutase wird mit 850µL N2B27-Medium gestoppt und die Zellen mit einer 1000µL Pipette abgespült. Die Zellen werden in ein 1,5mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und bei 200g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen im Verhältnis 1/10 neu ausgesät. Das Passagieren mit Accutase und die Versorgung der Zellen mit N2B27-Medium mit Chir-99021, PMA und Ascorbinsäure kann beliebig oft wiederholt werden. Selbst nach mehr als 50 Passagen lassen sich die Zellen problemlos differenzieren und weisen keine anormale Morphologie auf.

### ***5.2.7 Mittelhirnspezifische neuronale Differenzierung***

Für die Differenzierung zu mittelhirnspezifischen dopaminergen Neuronen, muss die Beschichtung von jeder Oberfläche von Matrigel zu einer Mischung aus Poly-dL-Ornithin-Hydrobromid (PORN, Sigma-Aldrich) und Laminin (Sigma-Aldrich) gewechselt werden. Dazu wird 1.668g Borsäure (Sigma-Aldrich) in 180ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1M Natrium-Hydroxidlösung auf pH 8,3 eingestellt. Darin löst man 90mg Poly-dL-Ornithin-Hydrobromid und filtriert die Lösung mit einem Sterilfilter (0.22µm, Millex). Die Lösung kann zu 10ml Aliquots eingefroren werden.

Zum Beschichten bedeckt man die Oberfläche der Zellschale oder des Deckglases mit der Lösung und lässt diese für 24h bei 37°C inkubieren. Dann nimmt man die Lösung ab und wäscht die Oberfläche dreimal mit sterilem dPBS (Life Technologies). Die mit PORN beschichtete Zellkulturschale wird mit einer 10% Lamininlösung (10% Laminin (Sigma-Aldrich) in dPBS) für 2h überschichtet und erneut bei 37°C inkubiert. Die Lamininlösung kann nun abgenommen und die Oberflächen einmal mit sterilem dPBS gewaschen werden. Zwei Tage vor dem Passagieren werden die Additive des N2B27-Mediums durch 1µM PMA (Cayman Chemical) und 100ng/ml FGF-8 (Peprotech) ersetzt. Die smNPCs können nach dem Passagieren in der gewünschten Zelldichte auf die PORN-Laminin beschichteten Oberflächen ausgesät werden.

Nach sechs Tagen wird FGF-8 aus dem Medium entfernt und die PMA-Konzentration auf 500nM reduziert. Am achten Tag wird PMA entfernt und 10ng/ml BDNF (ProSpec), 10ng/ml GDNF (ProSpec), 1ng/ml TGF-β3 (ProSpec), 500nM dbcAMP (Cayman Chemical) und 200µM Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich) dazu gegeben. Dieses Medium wird bei gelblichem Indikatorumschlag gewechselt. Die smNPCs benötigen etwa 21 Tage um die Neurogenese abzuschließen. Dieses Differenzierungsprotokoll weicht von dem der Arbeitsgruppe von Dr. Jared Sternecker (Reinhardt, Glatz et al. 2013) in nur einem Punkt ab. Die smNPCs werden hier nicht passagiert und dann differenziert, sondern erst für zwei Tage differenziert und dann passagiert.



## **5.2.8 Mikroskopie**

### **5.2.8.1 Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie (IHC) wird verwendet um bestimmte Proteine in Zellgewebe oder einzelnen Zellen sichtbar zu machen. Hierfür benutzt man einen Antikörper die an ein bestimmtes Epitop binden und macht diesen mit einem zweiten Antikörper, der den primären Antikörper bindet, sichtbar. Dies geschieht mit Hilfe von Farbstoffen oder Enzymen. Ist der primäre oder der sekundäre Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, spricht man von Immunfluoreszenz.

Die zu färbenden Zellen wurden auf, wie in Kapitel 5.2.7 beschrieben, mit PORN-Laminin beschichteten Deckgläschen aus Borsilikat (Menzel) ausgesät. Nach Erreichen des gewünschten Alters oder Zelldichte, werden die Zellen einmal mit dPBS (Life Technologies) gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd (Appllichem) -Lösung (PFA, 4% Formaldehyd in PBS, pH 7,2) für 15min fixiert. Dies sollte unter einem Abzug durchgeführt werden, da die Dämpfe der PFA-Lösung die Schleimhäute reizen und unter Verdacht stehen kanzerogen zu sein. Anschließend wird dreimal für 10min mit PBS gewaschen. Falls die Zellen für spätere Versuche gelagert werden, empfiehlt es sich, das PBS mit Natrium-Azid (0.1% Natrium-Azid in PBS) zu versetzen um Kontaminationen vorzubeugen. Anschließend werden die Zellen mit einer Färbelösung (10% natives Ziegen Serum (NGS), 0.1% Triton-x 100 (Sigma-Aldrich) in PBS) für 1h inkubiert. Dies geschieht einerseits um die Zellmembranen für Antikörper passierbar zu machen und andererseits um unspezifische Epitope mit Proteinen aus der Spezies des Antikörpers zu blockieren. Die Färbelösung wird durch frische Färbelösung, die primären Antikörper (Mischungsverhältnisse siehe Tabelle 5.1.6) enthält, ersetzt. Diese werden über Nacht bei 4°C inkubiert. Jetzt kann die Färbelösung entfernt und erneut drei mal für 10min mit PBS gewaschen werden. Anschließend wird eine weitere Färbelösung, die die sekundären Antikörper (Mischungsverhältnisse siehe Tabelle 5.1.6) und gegebenenfalls einen Farbstoff wie Hoechst33342 oder ToPro3, der die Zellkerne durch Interkallierung anfärbt (Mischungsverhältnisse siehe Tabelle 5.1.6), beinhaltet. Die Zellen werden für 4h bei Raumtemperatur inkubiert und danach die Zellen dreimal mit PBS für 10min gewaschen.

Anschließend werden die Deckgläschen vorsichtig von überschüssigen PBS befreit und mit AquaPolyMount (Polysciences) auf dem Objektträger (Super Frost II, Menzel-Gläser) eingebettet. Um eine Austrocknung zu vermeiden können die Ränder des Deckglases mit handelsüblichen nicht fluoreszierenden Nagellack abgedichtet werden.

### **5.2.8.2 Mikroskopie mit fixierten Zellen**

Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Axio Imager 2 (Carl Zeiss) mit Apotome (Carl Zeiss) durchgeführt. Das Apotome nutzt eine strukturierte Beleuchtung (engl. structured illumination microscopy (SIM)) um die Auflösungsgrenze für optische Geräte zu verbessern. Durch die Wellennatur des Lichts ist die Auflösung durch Beugung begrenzt. Die Auflösung eines optischen Gerätes ( $d$ ) ist immer abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$  und der numerischen Apertur (NA) des Objektivs ( $d = \lambda / NA_{\text{Objektiv}}$ ). Dies bedeutet, dass zwei Lichtpunkte die sich näher aneinander befinden als  $d$ , nicht als zwei sondern nur als ein Lichtpunkt dargestellt werden können, da sich das von ihnen ausgehenden Photonen in ihrer Wellenlänge überlagern. Um diesen Effekt zu korrigieren, wird ein Gitter mit bekanntem Gitterabstand in den Lichtweg des Mikroskops eingebracht. Von jeder Bildebene werden nun mehrere Bilder aufgenommen, bei denen das Gitter an einer anderen Position ist. Nun entstehen mehrere Bilder mit weniger Information als ein Bild ohne Gitter. Aus diesen Einzelbildern lässt sich nun ein Einzelbild mit höherer Auflösung berechnet. Wenn nun zwei Lichtpunkte nicht auflösbar sind, können nun mehrere Bilder aufgenommen werden bei denen jeweils einer von beiden Lichtpunkten verdeckt ist, somit lässt sich der Ursprungspunkt der Lichtemission berechnen und feststellen aus wie vielen Einzelemissionen ein Lichtpunkt besteht. Für alle Aufnahmen wird ein 40-Fach Plan-Aprochromat Objektiv NA=1,4 (Carl Zeiss) und einen *High-Grid* für das Apotome verwendet. Als Lichtquelle dient eine HXP-Lampe (Carl Zeiss) und für die Bildaufnahme eine AxioCam MRc (Carl Zeiss). Das Mikroskop wird mit einer Dual Core Workstation 2.0 Ghz (Dell) und der Axiovision Software Version 4.8.2 (Carl Zeiss) angesteuert. Die Belichtungszeit aller verwendeten Kanäle wird separat eingestellt und jeder Bildausschnitt wird als Stoß mit dem Apotome von mindestens sieben Bildern mit dem Abstand von  $0.28 \mu\text{m}$  und 5% Überlappung aufgenommen. Anschließend werden die

Stöße mit der maximalen Intensität vereint um ein Gesamtbild mit höherer Auflösung zu erzeugen. Zur Bildbearbeitung wird die Fiji-Software Version 1.49a verwendet (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012).

### ***5.2.8.3 Mikroskopie mit lebenden Zellen***

Für diese Untersuchungen wird ein Cell Observer Z1 (Carl Zeiss) mit Apotome (Carl Zeiss) verwendet. Um lebende Zellen zu untersuchen ist das Mikroskop mit Inkubationskammer, Heizung und CO<sub>2</sub>-Mischer (Carl Zeiss) ausgestattet. Für alle Aufnahmen wird ein 10- und 40-Fach Plan-Aprochromat Objektiv NA=1,4 (Carl Zeiss) und ein *Low-Grid* für das Apotome verwendet. Als Lichtquelle dient eine HXP-Lampe (Carl Zeiss) und für die Bildaufnahme eine AxioCam MRc (Carl Zeiss). Das Mikroskop wird mit einer Dual Core Workstation 2.0 Ghz (Dell) und der Axiovision Software Version 4.8.2 (Carl Zeiss) angesteuert. Die Belichtungszeit aller verwendeten Kanäle wird separat eingestellt und jeder Bildausschnitt wird als Stoß von mindestens sieben Bildern mit dem Abstand von 0.23 µm und 5% Überlappung aufgenommen. Anschließend werden die Stöße mit der maximalen Intensität vereint um ein Gesamtbild mit höherer Auflösung zu erzeugen. Zur Bildbearbeitung wird die Fiji-Software Version 1.49a (Schindelin et al., Nature Methods 2012) verwendet.

Die smNPCs werden auf mit Porn-Laminin beschichteten Lumox-Dishes (Sarstedt) mit 3,5cm Durchmesser ausgesät und differenziert. Mindestens 24h vor dem Experiment wird das N2B27-Medium mit aCSF ausgetauscht.

#### ***5.2.8.3.1 Bestimmung des neuronalen Auswuchses***

Die smNPCs werden auf Matrigel-beschichteten 12-*Well* Zellkulturplatten differenziert.

Nach acht Tagen werden diese mit 150µL Accutase (StemPro), wie in Kapitel 5.2.8.2 beschrieben abgelöst und 150.000 Zellen in ein Lumox-Dish ausgesät. Mindestens 24h vor dem Experiment wird das N2B27-Medium vorsichtig abgenommen und mit auf 37°C vorgewärmten aCSF ersetzt. Die Ausleuchtung muss vor jedem Experiment nach Köhler angepasst werden.

Für 30min wird alle 5min ein Bild aufgenommen und die Daten anschließend mit der Fiji-Software und dem Fiji-Plugin Neurite Tracer, wie in der Arbeit von Longair et al. beschrieben ausgewertet (Longair, Baker et al. 2011).

### ***5.2.8.3.2 Bestimmung des neuronalen Auswuchses (nach Reinhardt und Schmid et al. 2013)***

Nach vollendeter Differenzierung werden drei bis vier neuronale Cluster mit einer Pipettenspitze mechanisch in einen Matrigel-beschichteten Objektträger mit Flüssigkeitskammern (Nunc Chamberslide, Thermo Scientific) übertragen. Nach 24h wird von den auswachsenden Neuriten 30min lang für alle 5min mit dem Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) aufgenommen. Die Bilderserien wurden mit der Fiji-Software und dem Fiji-Plugin Neurite Tracer wie in der Arbeit von Longair et al. beschrieben ausgewertet (Longair, Baker et al. 2011).

### ***5.2.8.3.3 Bestimmung der mitochondrialen Morphologie***

SmNPCs werden für mindestens 21 Tage auf PORN-Laminin-beschichteten 12-Well Zellkulturplatten zu mDaNs differenziert. Das N2b27-Medium wird 24h vor dem Experiment zu aCSF gewechselt. Die Mitochondrien müssen mit 500µM MitoTracker-Green (Life Technologies) für 45min bei 37°C inkubiert werden. Danach werden die Zellen dreimal für 15min mit 37°C warmen aCSF gewaschen. Für die Aufnahmen wird ein 420\508 low-pass\high-pass-Filter (AVM) und ein 40-Fach Plan-Apochromat Objektiv

(Carl Zeiss) verwendet. Die Belichtungszeit wird passend abgestimmt. Von mindestens 15 Neuronen pro Zelllinie wird mit dem Apotome ein Stapel von mindestens 10 Bildern mit 0,22µm Abstand mit 5% Überlappung aufgenommen. Anschließend werden die Stöße mit der maximalen Intensität vereint um ein Gesamtbild mit höherer Auflösung zu erzeugen. Es werden drei unabhängige Experimente mit der Fiji-Software bearbeitet. Der Schwellenwert wird nach Otsu angepasst, Rauschen durch „despeckle“ reduziert und das Bild binärisiert. Die Mitochondrien werden mit „analyze particles“ morphologisch ausgewertet. Die Statistik wird mit OpenOffice Calc Version 4.1 (Oracle) erstellt.

#### ***5.2.8.3.4 Bestimmung des mitochondrialen Transports in Neuriten***

SmNPCs werden für mindestens 21 Tage auf PORN-Laminin-beschichteten 3,5cm Lumox-Dishes (Sarstedt) zu mDaNs differenziert. Das N2b27-Medium wird 24h vor dem Experiment zu aCSF gewechselt. Die Mitochondrien müssen mit 500µM MitoTracker-Green (Life Technologies) für 45min bei 37°C inkubiert werden. Danach werden die Zellen dreimal für 15min mit 37°C warmen aCSF gewaschen. Für die Aufnahmen wird ein 420\508 low-pass\high-pass-Filter (AVM) und ein 25-Fach LCI Plan-Apochromat Objektiv (Carl Zeiss) verwendet. Die Belichtungszeit wird passend abgestimmt und die Kamera auf 2x2 Binning eingestellt um die mögliche phototoxische Belastung zu minimieren. Pro Zelllinie werden 10 visuelle Felder alle 5s für 5min aufgenommen. Es werden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Bewegung der Mitochondrien wird mit dem Fiji-Plugin TrackMate ausgewertet. Die Statistik erfolgte mit OpenOffice Calc Version 4.1 (Oracle).

### **5.2.9 Western Blot**

Die für mindestens 30 Tage differenzierten mDaNs wurden mit Lysepuffer für 15min auf Eis inkubiert, mit einem Zellkulturspachtel (Corning) abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wird für weitere 45min auf Eis inkubiert. Das Zellysate wird für 5s mit einer Ultraschallanode zerkleinert und bei 4°C für 40min bei 16.000g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinmenge wurde nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Zu den Zellysaten wird das gleiche Volumen 2x Laemmli-Puffer gegeben und die Proteine bei 96°C für 3min denaturiert.

Das Trenngel (3,2ml destilliertes Wasser, 2,5ml 4x Tris-SDS-Puffer, 4,2ml Acrylamid, 100µL 10% Ammonium-Persulfat-Lösung, 10µL TEMED) wird zwischen Glasplatten gegossen und nach dem Erstarren mit Sammelgel (5,75ml destilliertes Wasser, 2,5ml 4x Tris-SDS-Puffer, 1,65ml Acrylamid, 100µL 10% Ammonium-Persulfat-Lösung, 10µL TEMED) überdeckt. Die Taschen für das Proteinlysate bildet ein Kamm der zwischen die Glasplatten eingebracht wird. Die Taschen werden mit der gleichen Menge Protein und einer Proteinleiter (Promega) befüllt. Das Gel wird in eine Mini-Protean Elektroporesekammer (BioRad) gegeben, mit Laufpuffer befüllt und für 1,5h bei 100V aufgetrennt. Die Proteine werden mit Hilfe eines iBlot Trockenblotgeräts (Invitrogen) für 7min auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wird mit 5% Milchpulver (Applichem) in TBS-Puffer für 1h geblockt und anschließend über Nacht mit einem primären Antikörper in 5% Milchpulver in TBS bei 4°C inkubiert. Die Membran wird dreimal für 10min auf einem Rütteltisch (Heidolph) gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, in 5% Milchpulver in TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wird erneut drei mal mit TBS für 10min gewaschen und für 1min mit ECL-Färbelösung (GE-Healthcare) inkubiert. In einer Dunkelkammer wird die Membran in eine Röntgenfilm-Kassette gelegt und ein Röntgenfilm (GE-Healthcare) auf der Membran belichtet. Der belichtete Film wird in einer Entwicklermaschine (Fuji) entwickelt. Für eine weitere Antikörperfärbung muss die Membran für 45min in Stripping-Puffer inkubiert werden um den ersten Antikörper abzulösen. Die Membran wird dreimal für 10min mit TBS gewaschen und anschließend kann eine neue Antikörperfärbung durchgeführt werden.

### **5.2.10 Real time Polymerase Kettenreaktion (rtPCR)**

Für die rt-PCR werden die in RLT-Puffer (Qiagen) gelösten Zellen aus Punkt 6.3 mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben weiter verarbeitet. Die lysierten Zellen in RLT-Puffer werden für 3min bei 18.000U/min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand mit 300µl 70%igen Ethanol vermengt. Die Lösung wird in eine RNeasy Spin Column (Trennsäule auf Polymerbasis) gegeben und für 1min inkubiert. Die RNA fällt durch den Ethanol aus und kann nicht mehr durch das feinmaschige Polymer in der Säule dringen. Die Säule wird für 15s bei 8000g in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es werden 700µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut bei 8000g für 15s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wird mit 500µl RPE-Puffer zweimal wiederholt und der Überstand jeweils verworfen. Die gewaschene, kondensierte RNA wird nun mit 50µl RNase freiem Wasser für 1min von der Säule gelöst, bei 8000g für 1min zentrifugiert und aufgefangen. Die so gewonnene RNA wird mit einem Nanodrop Spektrophotometer (PiqLab) gemessen und auf 500ng\µl eingestellt. Ein Spektrophotometer misst die Absorption des Lichts, die durch Partikel in Flüssigkeiten hervorgerufen wird. Die Probe wird in Bezug auf eine Kontrollflüssigkeit ohne gelöste Stoffe gemessen und lässt so auf die Konzentration des gelösten Stoffes der Probe schließen.

Anschließend wird mit der so gewonnen RNA eine quantitative rt-PCR durchgeführt. Hierzu wird der QuantiTec SYBR Green rt-PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Dieses Verfahren ermöglicht es die Transkription von RNA zu cDNA und die anschließende Messung in einem Arbeitsschritt durchzuführen. Die anschließende Messung wird durch eine Färbung mit *Sybr Green* ermöglicht. Dieser Farbstoff absorbiert blaues Licht mit 494nm Wellenlänge und emittiert in einem grünen Spektrum um 521nm, erhöht aber seine Intensität, wenn es in DNA-Doppelsträngen interkaliert. Dadurch ist es möglich die Anzahl an DNA-Kopien quantitativ durch die Lichtemission zu messen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass *Sybr Green* auch in Primer-Dimeren interkaliert und somit falsche Werte liefern kann, wenn nicht die Reaktionslösung ohne RNA als Kontrolle bei der Messung verwendet wird. Für die anschließende qPCR-Analyse wird der Mastermix nach folgendem Protokoll und auf Eis vorbereitet.

### Mastermix:

Komponenten	Volumen in $\mu\text{l}$
<i>2x QuantiTect SYBR Green RT PCR MasterMix</i>	<i>10</i>
<i>Forward Primer (10pmol/<math>\mu\text{l}</math>)</i>	<i>0,5</i>
<i>Reverse Primer (10pmol/<math>\mu\text{l}</math>)</i>	<i>0,5</i>
<i>QuantiTect RT Mix</i>	<i>0,2</i>
<i>RNase freies Wasser</i>	<i>7,8</i>
<i>cDNA</i>	<i>1</i>
<i>Gesamtvolumen</i>	<i>20</i>

Die PCR wird in einem 7500 RT PCR System (Applied Biosystems) nach folgendem Programm durchgeführt.

### PCR-Programm:

Funktion	Temperatur	Zeit (s)	Zyklen
<i>Reverse Transkription</i>	<i>50°C</i>	<i>1800</i>	<i>0</i>
<i>Initialisierung der PCR</i>	<i>95°C</i>	<i>900</i>	<i>0</i>
<i>Denaturierung</i>	<i>94°C</i>	<i>15</i>	<i>40</i>
<i>Annealing</i>	<i>60°C</i>	<i>30</i>	
<i>Elongation</i>	<i>72°C</i>	<i>30</i>	

Die Analyse wird mit der ct-Methode mit OpenOffice Calc (Oracle) durchgeführt.

### **5.2.11 Karyogramm und DNA-Chip Untersuchung (DNA-ChIP)**

Das Karyogramm wurde von Frau Dr. med. Mau-Holzmann am Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik durchgeführt. Dafür werden iPS-Zellen von MEF-Feederzellen befreit und mit 1ml Accutase (Stempro) für 15min inkubiert. Die



Zellsuspension wird bei 200g für 5min zentrifugiert und das Zellpalett resuspendiert. Die Zellen werden mit einer Neubauer Zählkammer gezählt und 250.000 Zellen in Matrigel-beschichteten 15ml Zellkulturflaschen (Greiner) ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen wurden diese an das Labor von Fr. Dr.med. Mau-Holzmann übergeben, die das Karyogramm durchführte.

Die DNA-ChIP-Analysen wurden von Dr.rer.nat Michael Bonin am Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik durchgeführt. Zur Vorbereitung wird die DNS von MEF-Feederzellen gesäuberten iPS-Zellen mit einem DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) extrahiert. Die DNS-Konzentration wird mit einem Nanodrop Spectrophotometer (PeqLab) bestimmt und auf 50ng/ $\mu$ l eingestellt. Die Proben werden an das Labor von Dr.rer.nat Michael Bonin übergeben und mit einem Axiom Custom Array (Affimetrix) gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der Chromosome Analysis Suite (Affimetrix).

Das Ziel dieser Untersuchungen ist, die Unversehrtheit des Genoms der hier generierten iPS-Linien zu verifizieren. Dies geschieht auf mikroskopischer Ebene mittels Karyogramm und auf molekularer Ebene mittels DNA-ChIP.

## **6.0 Ergebnisse**

### ***6.1 Charakterisierung der iPS-Zellen***

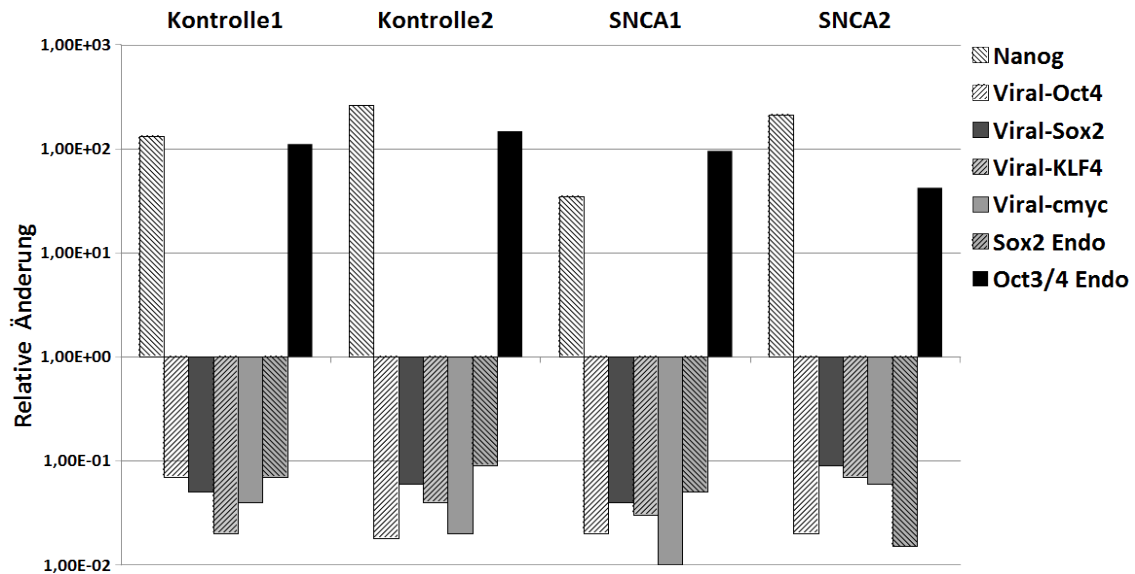
Für diese Arbeit werden aus Gründen der Übersicht die reprogrammierten Fibroblasten des Trägers der A30P Mutation im Gen von  $\alpha$ -Syn mit den Kürzeln SCNA1 und SNCA2 versehen. Die vier aus dem gesunden Geschwisteranteil reprogrammierten Fibroblasten werden als SNCA CNTL 1 bis SNCA CNTL 4 bezeichnet.

Des Weiterem benutzen wir als Kontrolle die bereits publizierten Zelllinien 17608/3 und 17608/6 und nennen diese Kontrolle1 und Kontrolle2 (Schondorf, Aureli et al. 2014).

#### ***6.1.1 Abschaltung der viralen Vektoren***

Nach vollendeter Reprogrammierung müssen die iPS-Zellen ihre eigenen Stammzellfaktoren exprimieren und die transduzierten Faktoren abschalten. Dies zeigt einerseits, dass die Zellen aus eigener Kraft das Stammzellstadium aufrecht erhalten und andererseits unterdrückt die Expression der transduzierten Stammzellfaktoren die spätere Differenzierung. Um sicher zu stellen, dass keine Expression von den viralen Vektoren ausgeht, wurde deren Expressionsrate mittels rtPCR überprüft. Als Kontrolle dient das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH, gegen das die relativen Expressionswerte abgeglichen und logarithmisch aufgetragen werden. Als Positivkontrolle dienen die endogen exprimierten Stammzellmarker von SOX2, OCT3/4 und NANOG. NANOG ist ein weit akzeptierter Marker für Pluripotenz, da es die Selbsterneuerung der Stammzellen unterstützt (Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). Die in Abb. 6.1 gezeigten Linien SNCA1 und SNCA2 weisen alle keine Expression der viral eingebrachten Yamanaka-Faktoren auf (gekennzeichnet mit Viral-Oct3/4, Viral-Sox2, Viral-KLF4 und Viral-cmyc). Die Expressionswerte der Linien SNCA1 und SNCA2 stimmen mit den publizierten iPS-Linien

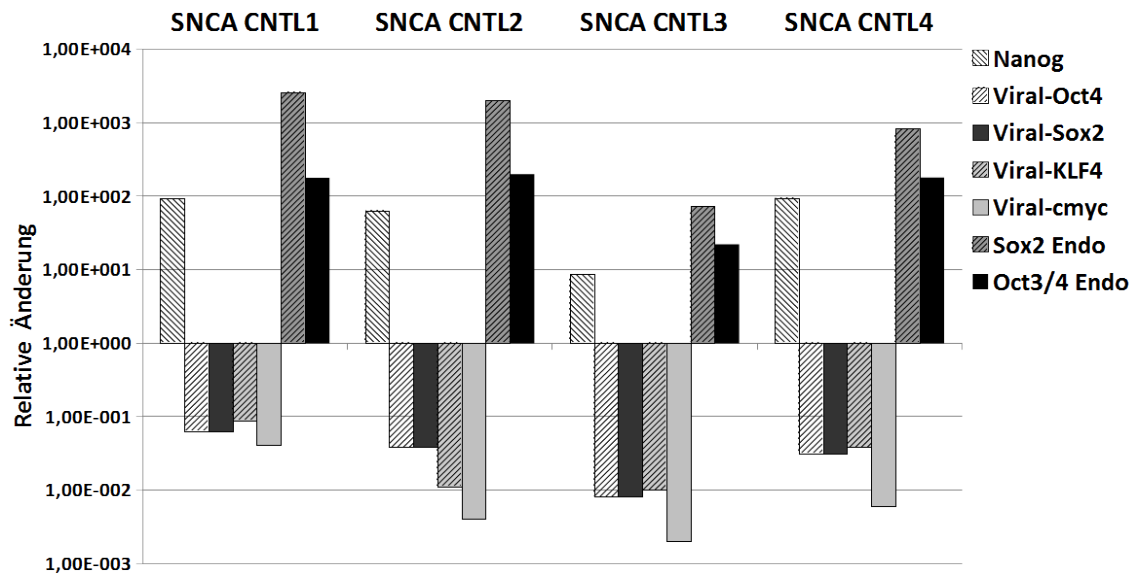
Kontrolle1 und Kontrolle2 (Schondorf, Aureli et al. 2014) überein. Die Expression der endogenen Stammzellmarker Nanog und Oct3/4 ist im Verhältnis zur Expression von GAPDH und den viral transduzierten Stammzellfaktoren hoch. Diese Expressionen lassen auf eine erfolgreiche Suppression der Expression der viralen Konstrukte und eine erfolgreiche Reprogrammierung schließen.



**Abb. 6.1:** Relative Änderung des Expressionswertes der gesuchten RNA im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH. Viral-Oct4, viral-Sox2, viral-KLF4 und viral-cmyc sind die Yamanaka-Faktoren die mit Hilfe der viralen Vektoren eingebracht wurden. Sox2 Endo und Oct3/4 Endo bezeichnen die endogen exprimierte RNS der Transkriptionsfaktoren. Das Balkendiagramm weist jedem Stammzellmarker eine Schraffur zu, dessen Expression im Verhältnis zu GAPDH aufgetragen sind. Die jeweils gruppierten Balken stehen für jeweils eine Zelllinie. Die y-Achse ist logarithmisch dargestellt.

Das Gleiche gilt für die in Abb. 6.2 gezeigten Linien SNCA CNTL 1, SNCA CNTL 2 und SNCA CNTL 4. Auch diese zeigen eine komplette Suppression der Expression der viralen Konstrukte und gute Expressionen der Stammzellmarker NANOG, SOX2 und OCT3/4. Die Linie SNCA CNTL3 exprimiert die ausgesuchten Stammzellmarker ungefähr 10-mal geringer als die anderen Linien. Des Weiteren lässt sich diese Linie nur schwierig im Stammzellstadium halten. Dies bedeutet, dass die Linie unkontrolliert differenziert und somit instabil ist. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Versuche mit ihr durchgeführt und die Linie verworfen.

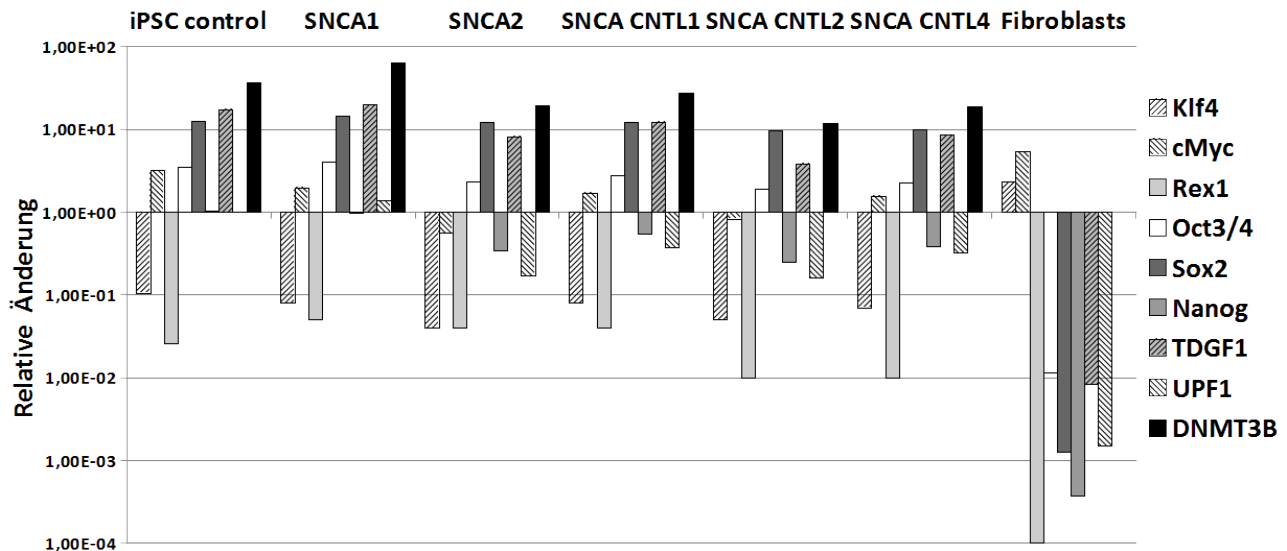
Um zu überprüfen ob, die exprimierten Stammzellfaktoren ausreichen, um das Stammzellstadium aufrecht zu erhalten, wurde eine rtPCR mit mehreren Stammzellmarkern durchgeführt.



**Abb. 6.2:** Relative Änderung des Expressionswertes der gesuchten RNA im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH. Viral-Oct4, viral-Sox2, viral-KLF4 und viral-cmyc sind die Yamanaka-Faktoren die mit Hilfe der viralen Vektoren eingebracht wurden. Sox2 Endo und Oct3/4 Endo bezeichnen die endogen exprimierte RNS der Transkriptionsfaktoren. Das Balkendiagramm weist jedem Stammzellmarker eine Schraffur zu, dessen Expression im Verhältnis zu GAPDH aufgetragen sind. Die jeweils gruppierten Balken stehen für jeweils eine Zelllinie. Die y-Achse ist logarithmisch dargestellt.

### 6.1.2 Expression von Stammzellmarkern

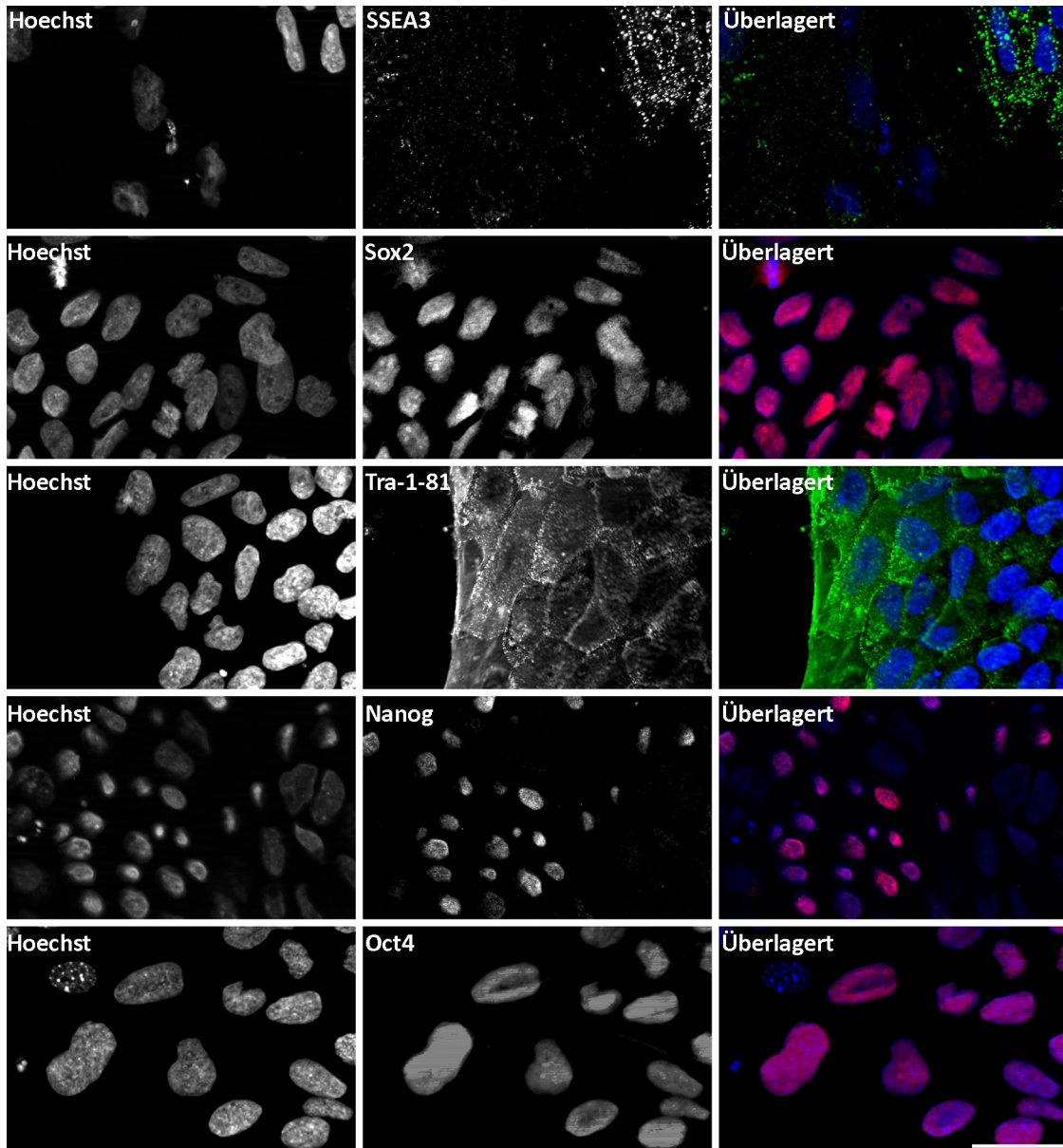
Für die weitere Charakterisierung der generierten iPS-Zellen wurde die Expression essentieller Stammzellmarker untersucht. Deren Expression wird zuerst mittels rtPCR quantifiziert und anschließend durch Immunfluoreszenz bestätigt.



**Abb. 6.3:** Relative Änderung des Expressionswertes der gesuchten RNA im Verhältnis zum Haushaltsgen GAPDH. iPSC control ist eine bereits publizierte iPS-Zelllinie und dient als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle dienen humane Fibroblasten. Das Balkendiagramm weist jedem Stammzellmarker eine Schraffur zu, dessen Expression im Verhältnis zu GAPDH aufgetragen sind. Die jeweils gruppierten Balken stehen für jeweils eine Zelllinie. Die y-Achse ist logarithmisch dargestellt.

Die Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren kommt nur in Stammzellen vor, diese regulieren Prozesse, die zum Erlangen der Stammzellcharakteristika führen. Neben der Expression der bekannten Yamanaka-Faktoren OSKM, wurde auch Rex1 (Zinkfinger-Protein 42) untersucht. Rex1 ist ein bekannter Marker für Pluripotenz, der von Sox2 und Nanog reguliert wird (Shi, Wang et al. 2006). Ein weiterer Stammzellmarker ist Cripto oder Teratocarcinoma-derived Growth Factor 1 (TDGF1), der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF, engl. Epidermal growth factor) gehört (Salomon, Bianco et al. 1999). DNA (Cytosin-5) Methyltransferase 3-beta (DNMT3B) spielt eine Rolle bei der Selbsterneuerung von Stammzellen (Tsumura, Hayakawa et al. 2006) und dient uns als weiterer Stammzellmarker. Da die iPS-Zelllinien später neuronal differenziert werden sollen, ist der Regulator für Transkripte, die keinen Sinn ergeben 1 (engl. *Regulator of nonsense-transcripts 1*) der von dem Gen UPF1 exprimiert wird, sehr interessant. Dieser reguliert über den Abbau von RNS-Transkripten die keinen Sinn ergeben (engl. *Nonsense*

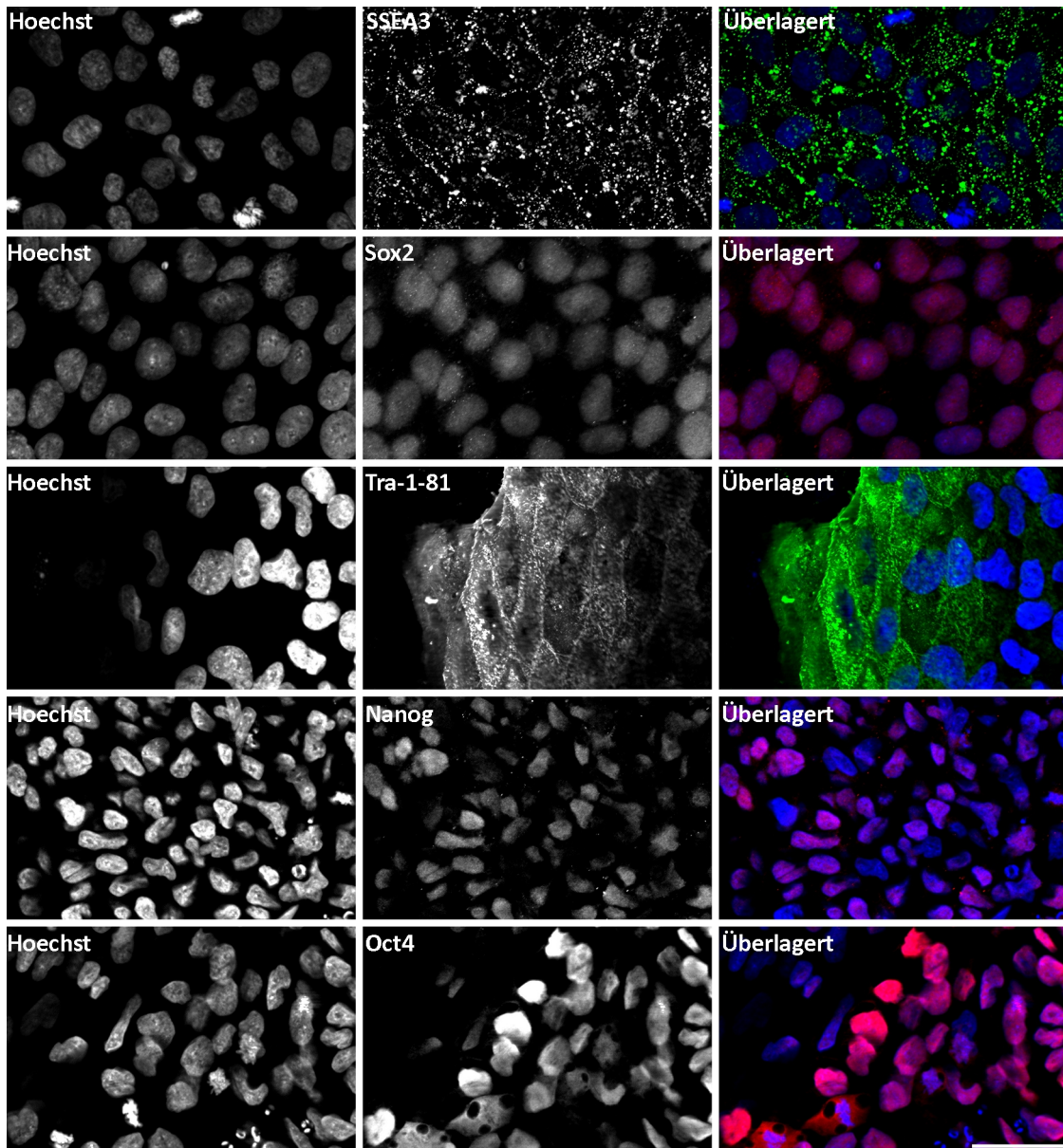
*Mediated RNA decay*, NMR), die Fähigkeit von Stammzellen sich in Neurone zu entwickeln (Lou, Shao et al. 2014). Dieses Transkript dient uns nicht nur als Stammzellmarker, sondern auch als eventueller Marker für die Fähigkeit unserer iPS-Zellen sich zu Neuronen zu differenzieren.



**Abb. 6.4:** Immunfluoreszenz-Aufnahme von iPS-Zellkolonien der Linie SNCA1. Beschriftungen oben rechts zeigen den Namen des gefärbten Antigens. SSEA3 und Tra-1-81 sind mit Alexa 488 markiert. Nanog, Oct4 und Sox2 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken entspricht 30µm.

Als Positivkontrolle für die Expression von Stammzellmarkern der generierten iPS-Zellen diente eine bereits publizierte iPS-Zelllinie (K7.1) anstelle von humanen embryonalen Stammzellen. Diese iPS-Zelllinie ist bereits gegen humane embryonale Stammzellen

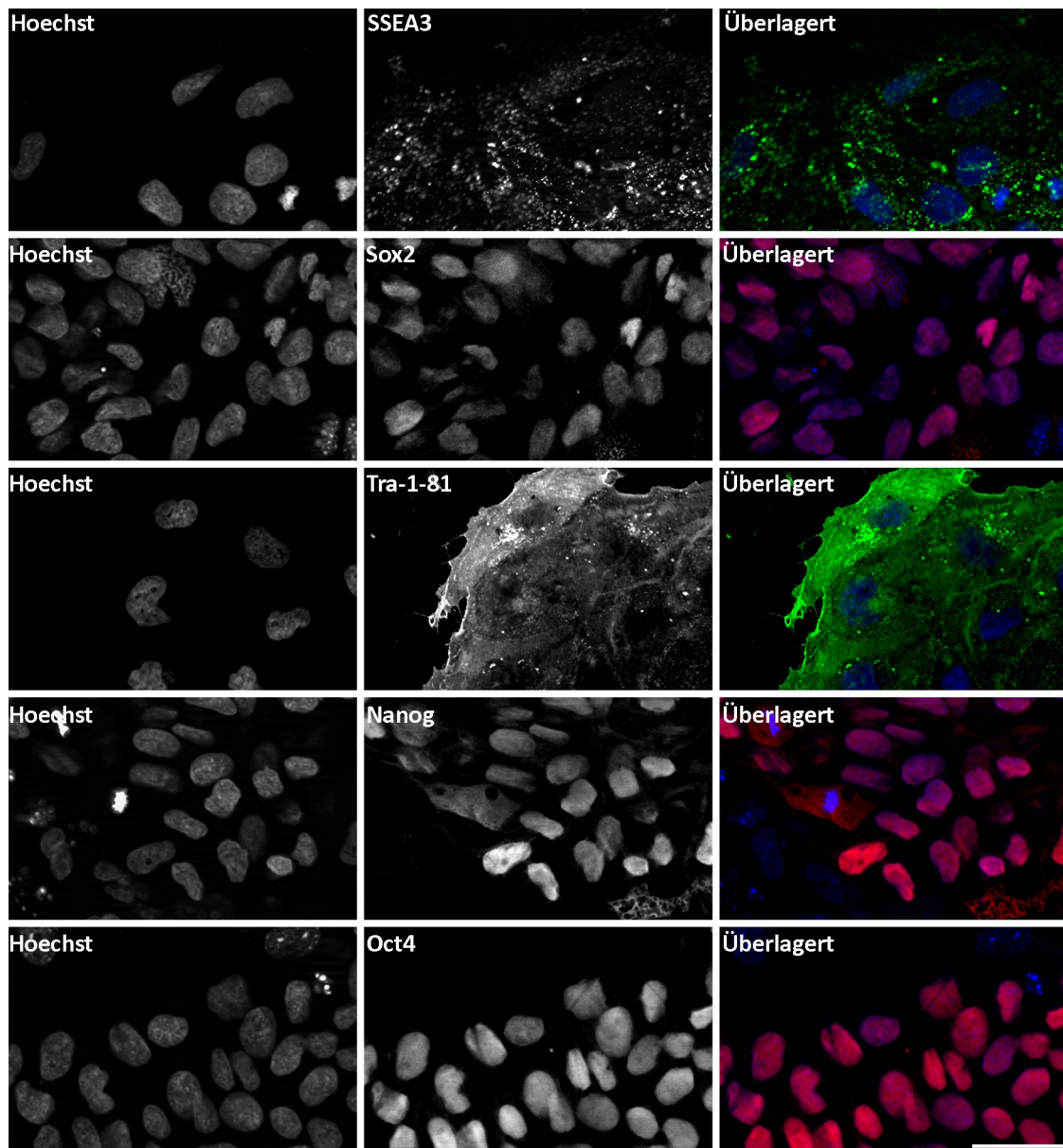
getestet worden und weist keine Auffälligkeiten auf (Reinhardt, Schmid et al. 2013). Als Negativkontrolle diente eine humane Fibroblastenzelllinie. Aus ethischen Gründen wurden in dieser Arbeit keine humanen embryonalen Stammzellen verwendet.



**Abb. 6.5:** Immunfluoreszenz-Aufnahme von iPS-Zellkolonien der Linie SNCA2. Beschriftungen oben rechts zeigen den Namen des gefärbten Antigens. SSEA3 und Tra-1-81 sind mit Alexa 488 markiert. Nanog, Oct4 und Sox2 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken entspricht 30µm.

Die Expressionswerte der Stammzellmarker wurden gegen den Expressionswert des Haushaltsgens GAPDH logarithmisch aufgetragen (s. Abb. 6.3). Alle Linien weisen ähnliche Expressionsmuster wie die Kontrollzelllinie auf. Die untersuchten Stammzellmarker deuten auf eine gelungene Reprogrammierung hin. Um die Daten der

rtPCR zu validieren, wurden die iPS-Zellen mit Sox2- (Santa Cruz) und Oct4-AK (Millipore) gefärbt und mit sekundären Immunfluoreszenz-AK (Life Technologies) markiert. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 5.2.8.2 beschrieben, aufbereitet und die mikroskopischen Aufnahmen wie in Kapitel 5.2.8.3 beschrieben, ausgeführt. Zusätzlich wurde Nanog (Millipore), Tumor-assoziiertes Antigen-1-81 (Tra-1-81, engl. Tumor related antigen-1-81) (Abcam) und Stadium-spezifisches embryonales Antigen (SSEA3, engl. Stage

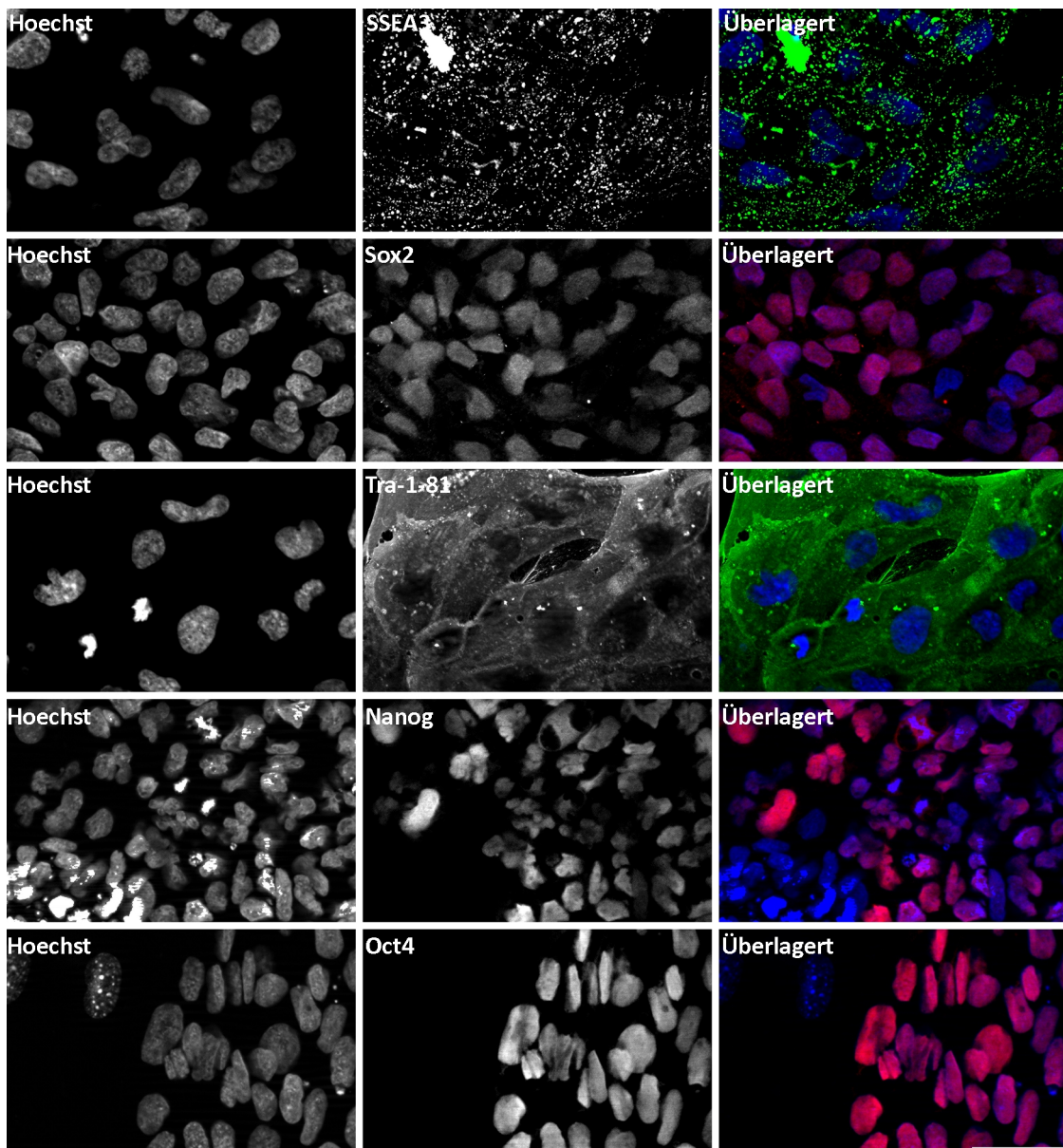


**Abb. 6.6:** Immunfluoreszenz-Aufnahme von iPS-Zellkolonien der Linie SNCA CNTL1. Beschriftungen oben rechts zeigen den Namen des gefärbten Antigens. SSEA3 und Tra-1-81 sind mit Alexa 488 markiert. Nanog, Oct4 und Sox2 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken entspricht 30µm



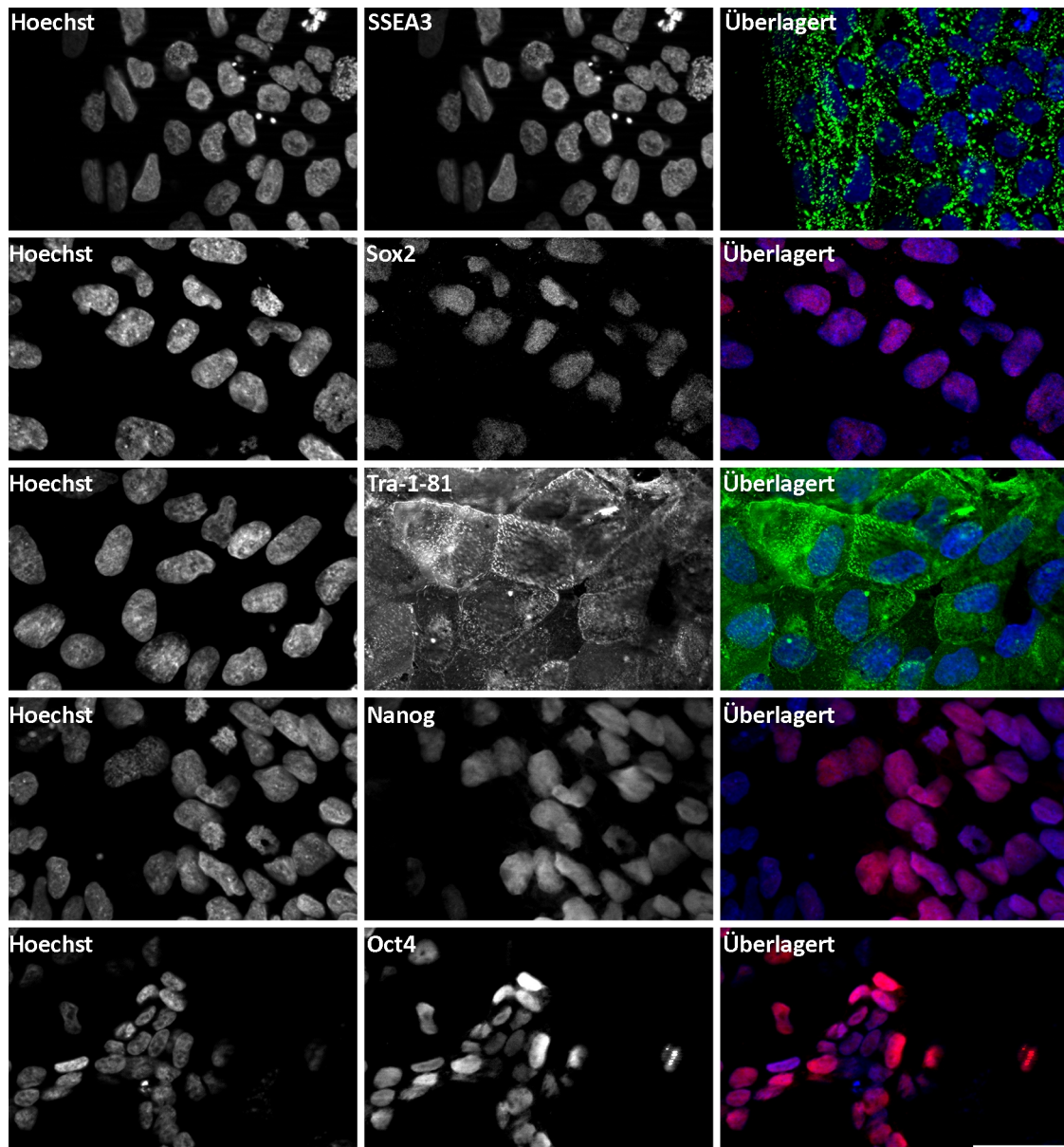
specific embryonal antigen) (Millipore) als Stammzellmarker gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (Invitrogen) sichtbar gemacht.

Die Linien SNCA1 und SNCA2 werden in Abb.6.4 und Abb.6.5 gezeigt. Die IF-Bilder validieren die Ergebnisse der rtPCR im Falle von Oct4, Sox2 und Nanog, da eine spezifische Immunfluoreszenz-Färbung dieser Proteine zu erkennen ist. Die Oberflächenproteine SSEA-3 und Tra-1-81 wurden mit einem Alexa 488 markierten sekundären AK gefärbt und ein spezifisches Färbemuster beobachtet.



**Abb. 6.7:** Immunfluoreszenz-Aufnahme von iPS-Zellkolonien der Linie SNCA CNTL2. Beschriftungen oben rechts zeigen den Namen des gefärbten Antigens. SSEA3 und Tra-1-81 sind mit Alexa 488 markiert. Nanog, Oct4 und Sox2 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken entspricht 30µm.

Die Linien SNCA CNTL<sub>1</sub>, SNCA CNTL<sub>2</sub> und SNCA CNTL<sub>4</sub> zeigen eine homogene Expression der Stammzellmarker (Abb. 6.6, 6.7 und 6.8). Die Zelllinien exprimieren selbstständig die nötigen RNA-Transkripte und translatieren diese in das entsprechende Protein.

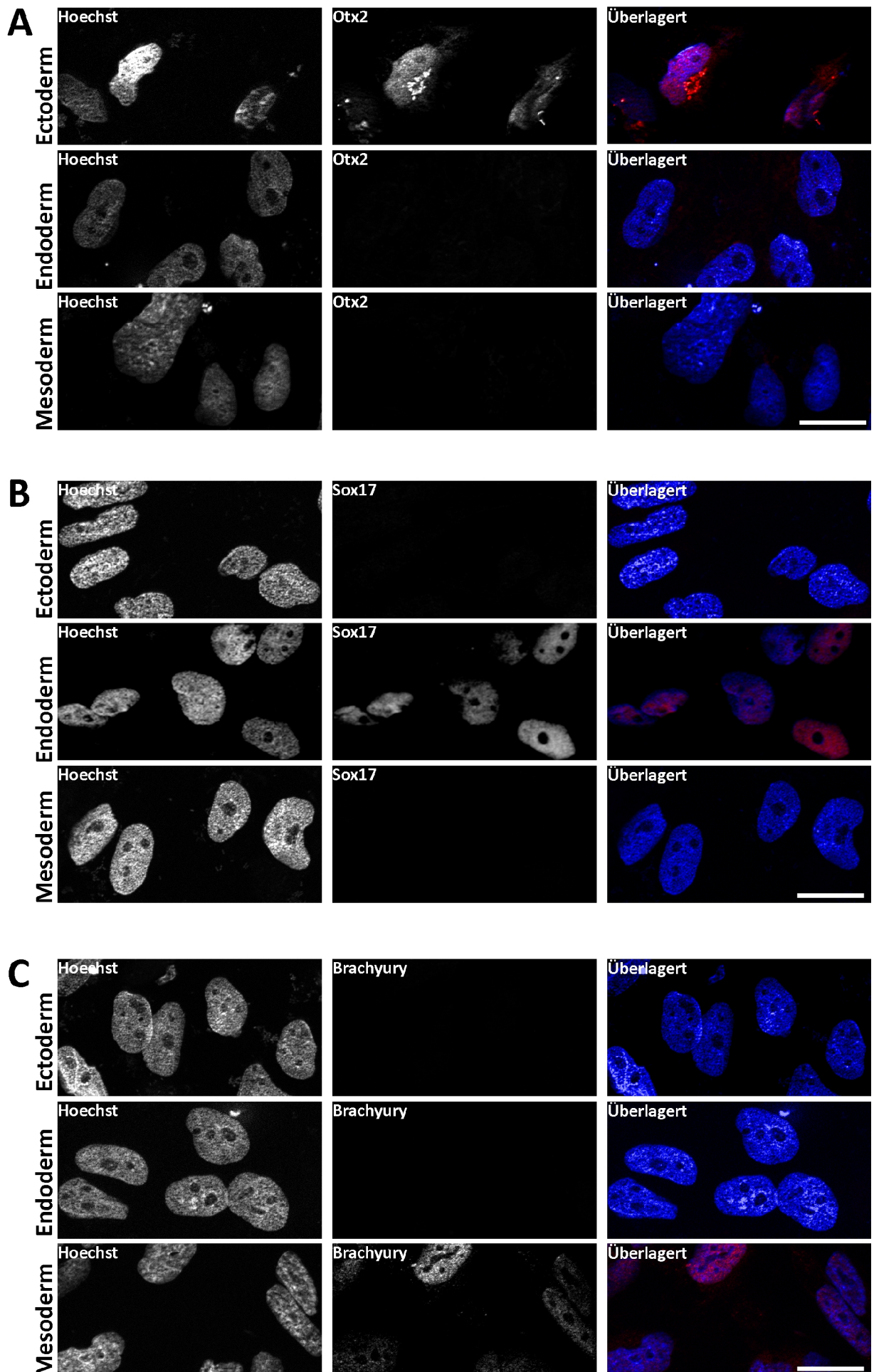


**Abb. 6.8:** Immunfluoreszenz-Aufnahme von iPS-Zellkolonien der Linie SNCA CNTL<sub>4</sub>. Beschriftungen oben rechts zeigen den Namen des gefärbten Antigens. SSEA3 und Tra-1-81 sind mit Alexa 488 markiert. Nanog, Oct4 und Sox2 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken entspricht 30µm.

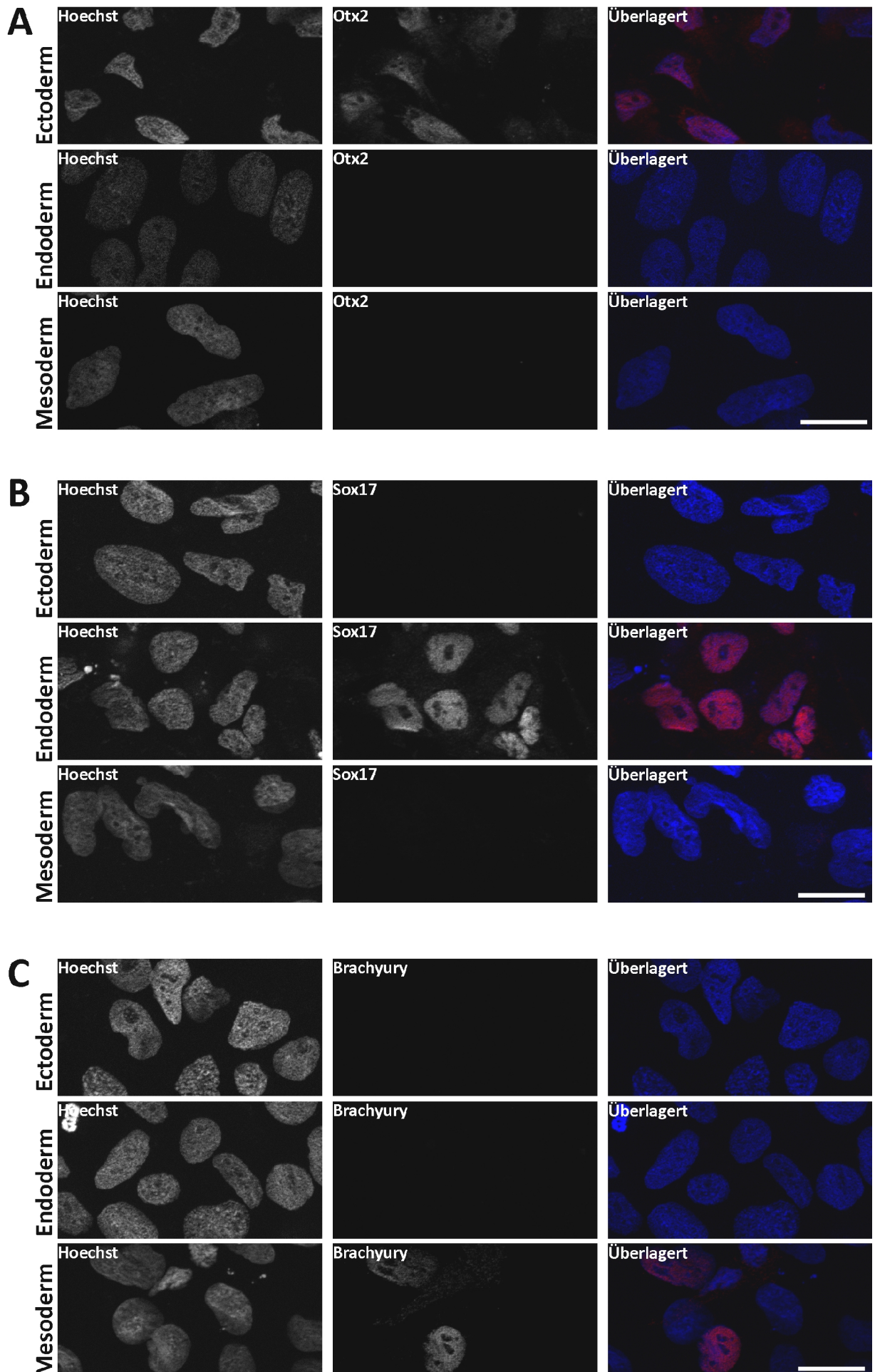
### ***6.1.3 Differenzierung in die drei Keimblätter***

Die Pluripotenz, die Fähigkeit sich in drei Keimblätter zu differenzieren, ist die wohl wichtigste Eigenschaft einer Stamm- oder iPS-Zelle. Um dies zu untersuchen werden die iPS-Zelllinien mit dem Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems) nach dem Protokoll des Herstellers differenziert und den beiliegenden AK gefärbt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem AxioImager mit 40x Apochromat/NA 1,4 Objektiv (Carl Zeiss).

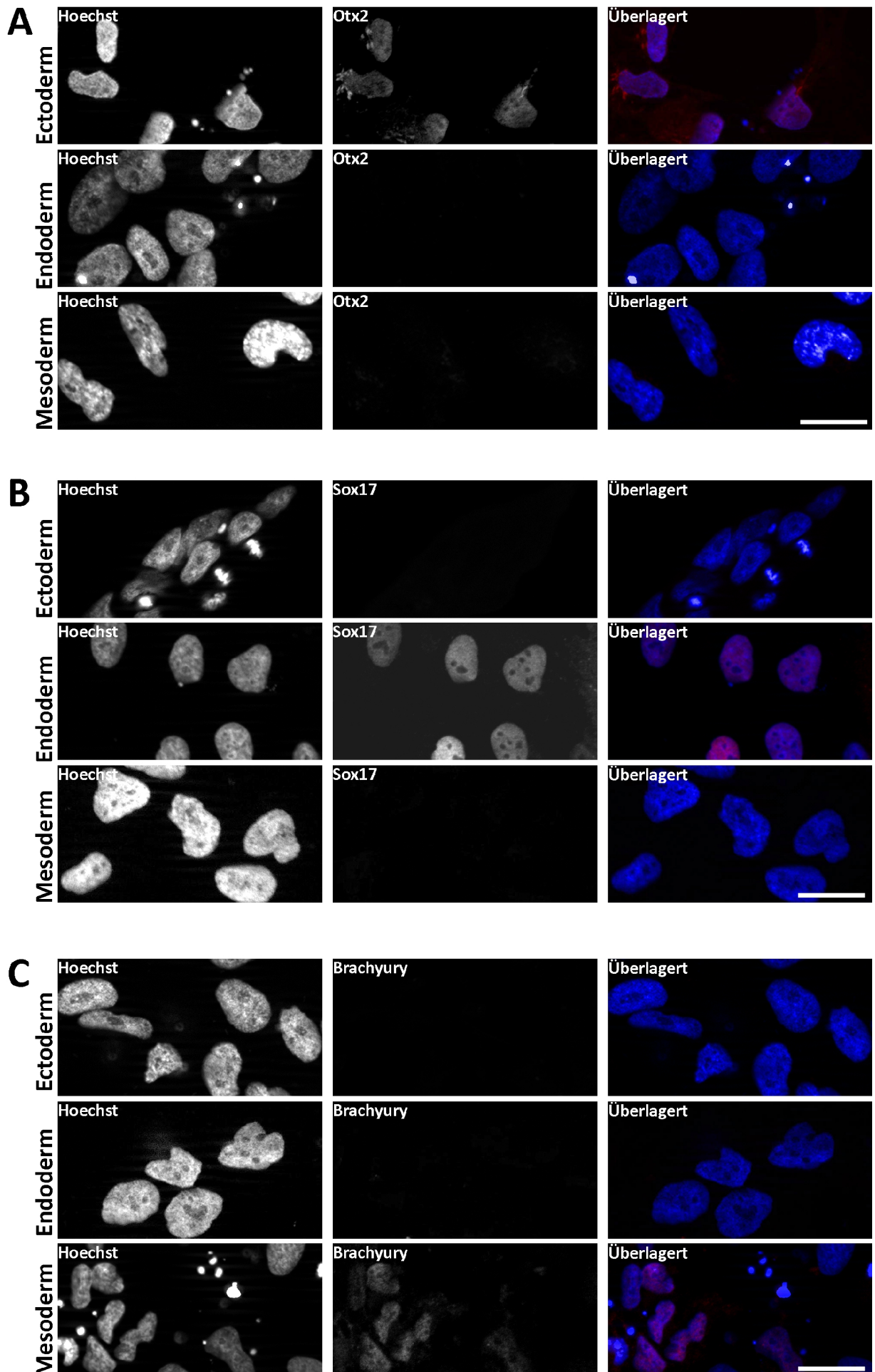
Durch eine Antikörperfärbung mit verschiedenen Keimbahn-spezifischen Antikörpern, kann jede Differenzierung einer Keimbahn zugeordnet werden. Hierzu wird jede Keimbahn-spezifische Differenzierung mit drei Antikörpern, wie in Kapitel 5.2.8.3 beschrieben, gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen werden wie in Kapitel 5.2.8.2 beschrieben, durchgeführt. Das Protein Brachyuri ist spezifisch für die mesodermale Keimbahn. Es wird bereits in der Blastozyste exprimiert und ist essentiell für die Entwicklung des Mesoderms (Marcellini, Technau et al. 2003). Die endodermale Keimbahn wird durch eine Färbung mit Sox 17 nachgewiesen. Während der Gastrulation kann Sox 17 dem Endoderm zugewiesen werden (Hassoun, Puschel et al. 2010). Um die Ektodermale Differenzierung nachzuweisen benutzt man einen Antikörper gegen Otx 2, ein Homöoboxgen, das bei der Entwicklung des Gehirns eine bedeutende Rolle spielt (Millet, Bloch-Gallego et al. 1996). Die drei Marker, die hier zur Identifizierung der Keimbahnen dienen sind alle Transkriptionsfaktoren und daher im Bereich des Nukleus lokalisiert. In Abb. 6.9 kann man deutlich die spezifischen Färbungen für die drei Keimblätter mit anti-Ziege Alexa Fluor 546 (Life Technologies) und die Gegenfärbung mit Hoechst 33342 der Zelllinie SNCA3 erkennen. In der Bilderserie A, von links nach rechts, ist die Differenzierung in die ectodermale Keimbahn mit Färbung für Brachyuri, Sox17 und Otx2. In Bilderserie B ist die endodermale und in C die mesodermale Keimbahndifferenzierung abgebildet. Die spezifische Pluripotenz der anderen Zelllinien kann man von Abb. 6.10 bis Abb. 6.13 erkennen. Alle iPS-Linien lassen sich in Zellen des Meso, Endo und Ectoderms differenzieren und bestätigen damit den pluripotenten Status.



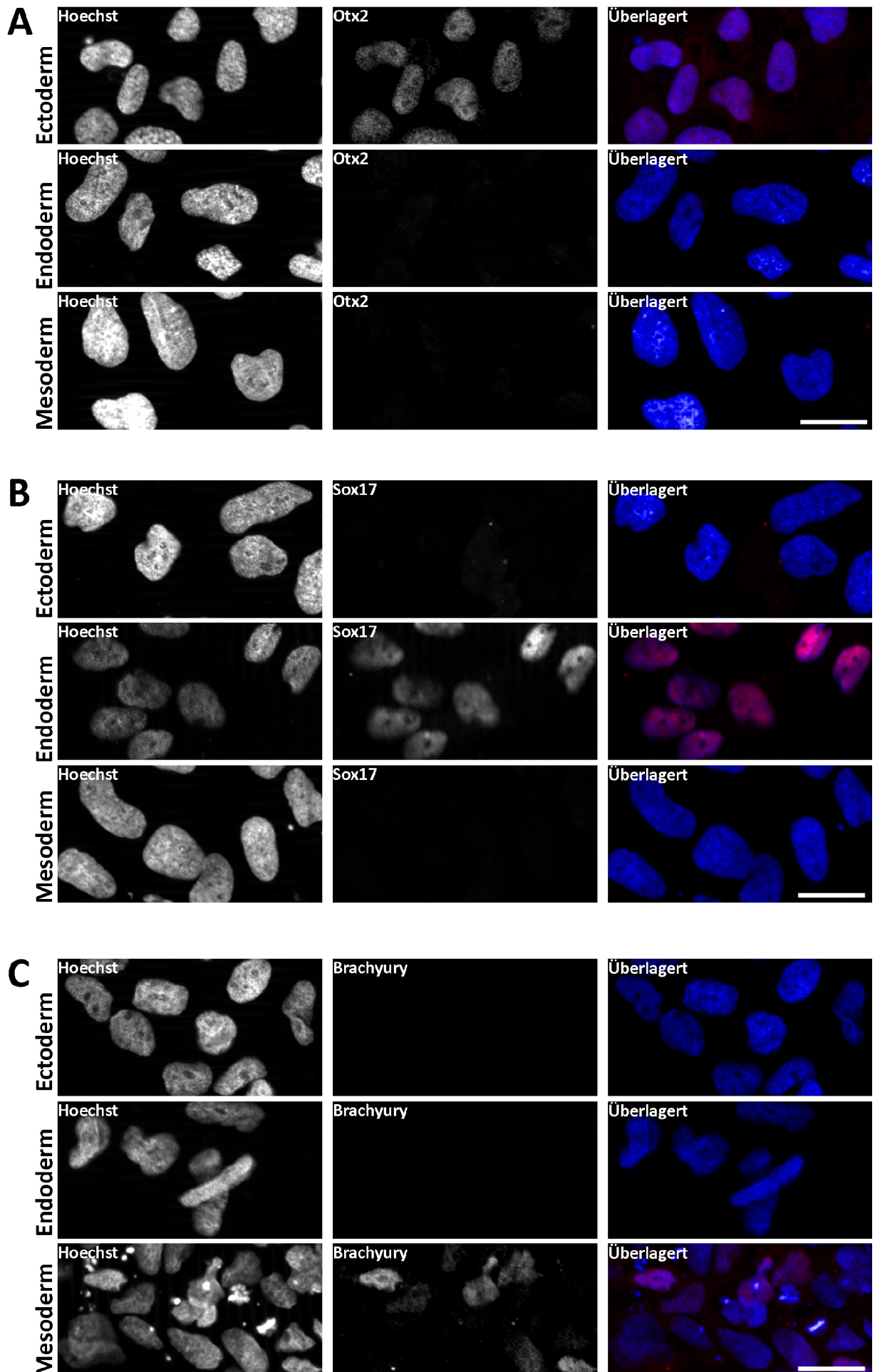
**Abb. 6.9:** Immunfluoreszenz-Aufnahme einzelner und differenzierter iPS-Zellen der Linie SNCA1 zu den drei Keimblättern. A zeigt die ectodermale, B die endodermale und C die mesodermale Differenzierung. Brachyuri färbt mesodermale Zellen. Otx2 färbt ectodermale Zellen und Sox 17 färbt endodermale Zellen. Alle primären Antikörper sind mit Alexa 546 konjugierten sekundären AK markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 10 $\mu$ m.



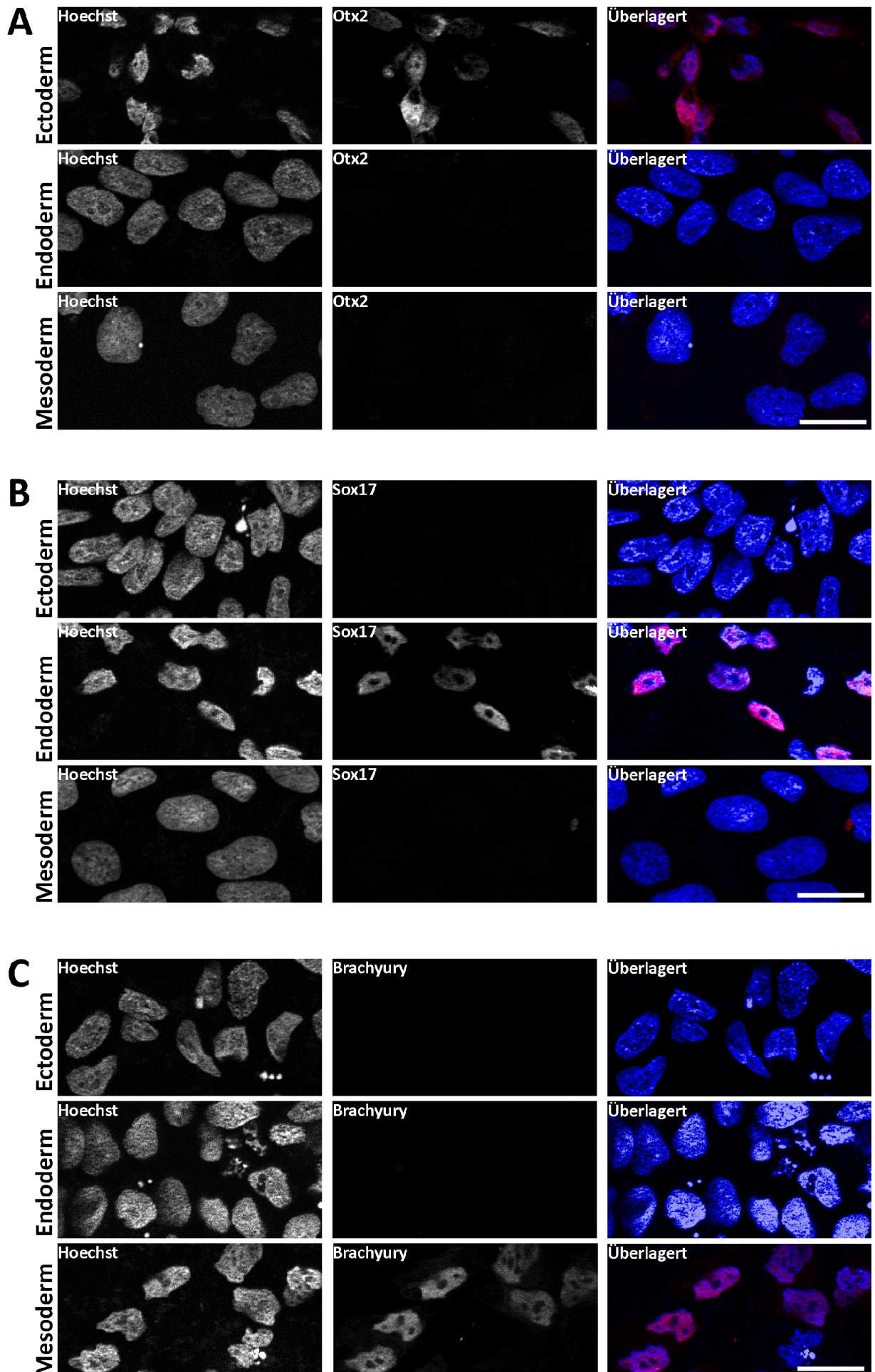
**Abb. 6.10:** Immunfluoreszenz-Aufnahme einzelner und differenzierter iPS-Zellen der Linie SNCA2 zu den drei Keimblättern. A zeigt die ektodermale, B die endodermale und C die mesodermale Differenzierung. Brachyuri färbt mesodermale Zellen. Otx2 färbt ektodermale Zellen und Sox 17 färbt endodermale Zellen. Alle primären Antikörper sind mit Alexa 546 konjugierten sekundären AK markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 10µm.



**Abb. 6.11:** Immunfluoreszenz-Aufnahme vereinzelter und differenzierter iPS-Zellen der Linie SNCA CNTL1 zu den drei Keimblättern. A zeigt die ektodermale, B die endodermale und C die mesodermale Differenzierung. Brachyuri färbt mesodermale Zellen. Otx2 färbt ektodermale Zellen und Sox 17 färbt endodermale Zellen. Alle primären Antikörper sind mit Alexa 546 konjugierten sekundären AK markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 10 $\mu$ m.



**Abb. 6.12:** Immunfluoreszenz-Aufnahme vereinzelter und differenzierter iPS-Zellen der Linie SNCA CNTL2 zu den drei Keimblättern. A zeigt die ektodermale, B die endodermale und C die mesodermale Differenzierung. Brachyuri färbt mesodermale Zellen. Otx2 färbt ektodermale Zellen und Sox 17 färbt endodermale Zellen. Alle primären Antikörper sind mit Alexa 546 konjugierten sekundären AK markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 10µm.



**Abb. 6.13:** Immunfluoreszenz-Aufnahme vereinzelter und differenzierter iPS-Zellen der Linie SNCA CNTL4 zu den drei Keimblättern. A zeigt die ektodermale, B die endodermale und C die mesodermale Differenzierung. Brachyuri färbt mesodermale Zellen. Otx2 färbt ektodermale Zellen und Sox 17 färbt endodermale Zellen. Alle primären Antikörper sind mit Alexa 546 konjugierten sekundären AK markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 10µm.



### **6.1.4 Validierung der Unversehrtheit des Genoms mittels Karyogramm und DNA-Chip Untersuchung**

Durch die Integration viraler DNA nach Transduktion der Fibroblasten kann es zu Doppelstrangbrüchen kommen, die chromosomale Aberrationen durch Fehler bei der DNA-Reperatur auslösen können. Die Insertion kann auch direkt in einem Gen erfolgen, was weitere Mutationen des Erbguts zur Folge hat. Große Deletionen oder Translokationen können mit Hilfe eines Karyogramms detektiert werden. Diese Untersuchungen wurden vom Labor von Frau Dr. med. Ulrike Mau in der Medizinischen Genetik der Universität Tübingen durchgeführt. Die Linien SNCA1 und SNCA2 sowie die Linien SNCA CNTL 1-3 wurden untersucht und kein auffälliger Befund festgestellt. Im Gegensatz zum DNA-ChiP wird beim Karyogramm mit intakten Chromosomen gearbeitet. Durch die mikroskopische Analyse der Chromosomen können daher auch Inversionen, Translokationen oder Ringschlüsse der Chromosomen untersucht werden. Durch die niedrige Auflösung des Karyogramms ist es nicht möglich kleinere Insertionen und Deletionen der DNA zu analysieren.

Um auch kleinere Mutationen des Genoms zu detektieren ist ein Karyogramm ungeeignet, deswegen wird mit Hilfe einer DNA-Chip Untersuchung das Erbgut überprüft. Diese Untersuchung wurde vom Labor von Dr. Michael Bonin in der Medizinischen Genetik der Universität Tübingen durchgeführt und mit der Chromosome Analysis Suite Software von Affymetrix ausgewertet. Bei dieser Technik werden kleine Oligonukleotide lithographisch auf einen Silikon-*Wafer* aufgebracht, an denen dann die zu untersuchende DNA hybridisiert. Die hybridisierte DNA kann dann durch Fluoreszenz-Emission detektiert werden. Die hohe Auflösung der DNA-ChiP ist mit einem Verlust der Makrostruktur der Chromosomen verbunden, da die DNA hier in kleinen Bruchstücken verwendet wird und nicht, wie beim Karyogramm, im kondensierten Zustand vorliegt.

Die Linien SNCA CNTL 1-3 sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Die meisten identifizierten Mutationen sind bekannte Variationen des Genoms. Dies bedeutet, dass die gefundenen Insertionen und Deletionen in Bereichen liegen, die häufig natürliche Polymorphismen aufweisen, die ohne pathologische Bedeutung sind. Die Linie SNCA CNTL1 weist eine nicht bekannte Insertion im kodierenden Bereich des Gens SDK2 auf. Auch die Linie SNCA Kontrolle 3 weist eine Insertion im kodierenden Bereich im Gen von

PCDH11Y auf. Ebenso trägt diese Linie eine Mosaikduplikation des X-Chromosomes. Dies bedeutet, dass ein gewisser Prozentteil der Zellen ein X-Chromosom zu viel hat.

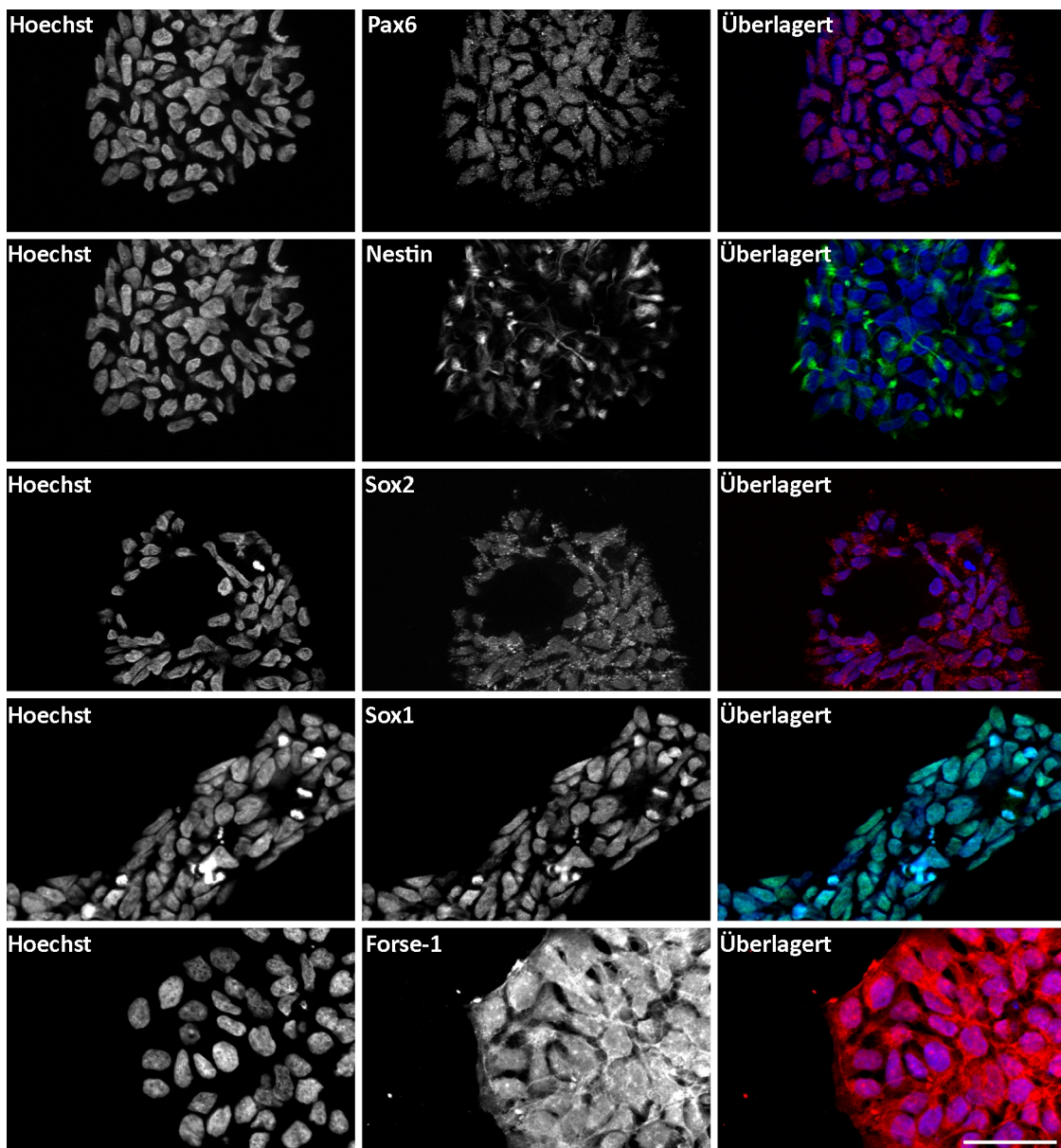
Chromosom	Linie	Mutation	Position	Befund	Referenz
1	1	Insertion	148,547,778-149,660,970	Variation_3313	Redon (2006)
1	2	Insertion	147,947,838-148,662,197	Variation_3313	Redon (2006)
2	1	Insertion	97,713,121-98,118,115	Variation_3378	Redon (2006)
2	1	Deletion	153,782,314-154,377,659	Variation_4312	Wong (2007)
8	1	Insertion	6,969,687-8,142,435	Variation_3719	Redon (2006)
8	2	Insertion	6,976,421-8,149,164	Variation_3719	Redon (2006)
14	1	Insertion	44,750,751-45,518,197	Variation_3937	Redon (2006)
14	1	Insertion	106,079,822-106,692,891	Variation_23307	Levy (2007)
14	2	Insertion	106,079,822-106,692,891	Variation_23307	Levy (2007)
14	4	Insertion	106,079,822-106,709,974	Variation_23307	Levy (2007)
16	1	Deletion	32,538,292-33,784,810	Variation_4002	Redon (2006)
16	4	Deletion	32,570,985-33,814,547	Variation_4002	Redon (2006)
17	1	Insertion	44,187,491-44,784,639	Variation_8850	Pinto (2007)
17	4	Insertion	44,187,491-44,785,669	Variation_8850	Pinto (2007)
17	4	Insertion	71,067,789-71,926,858	SDK2 Mutation	
X	1	Mosaik Duplikation	4,027,055-155,233,731	Chromosomale Duplikation	
Y	1	Insertion	4,122,808-4,550,383	Variation_31579	Perry (2008)
Y	1	Insertion	4,926,759-5,376,996	PCDH11Y Mutation	
Y	1	Insertion	5,511,936-6,114,495	Unbekannt	
Y	1	Insertion	22,000,378-22,645,331	Variation_31588	Perry (2008)

**Tabelle 6.1:** Zusammenfassende Chromosomale Analyse der Linien SNCA CNTL 1-3 mittels Affimetrix Array Scan. SNCA CNTL1 = 1, SNCA CNTL2 = 2, SNCA CNTL4 = 4

Die Linien SNCA1 und SNCA2 zeigen keine pathogenen Auffälligkeiten des Genoms in der Chip-Untersuchung.

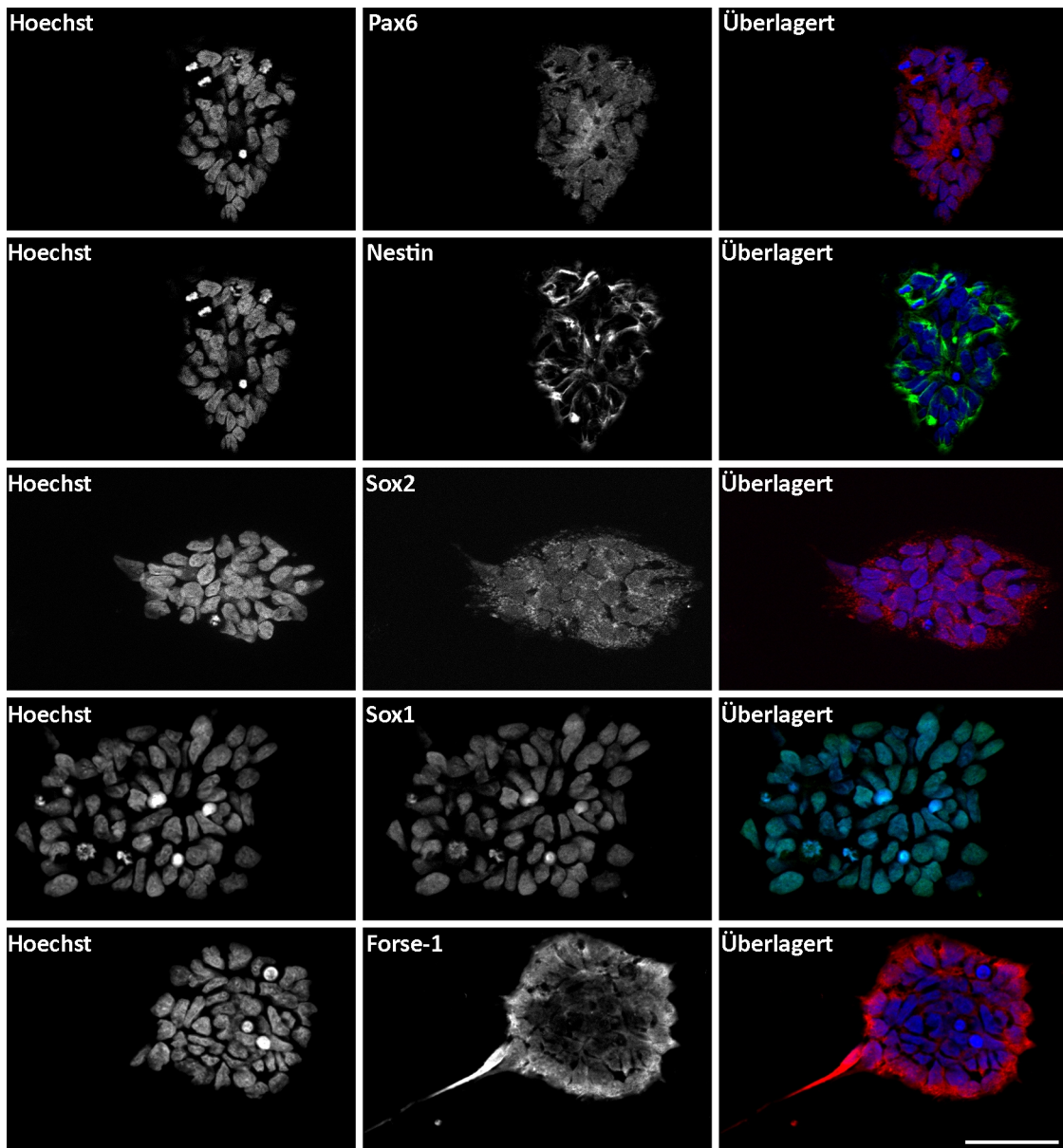
## 6.2 Charakterisierung der smNPCs

Parallel zu der Charakterisierung der SNCA Kontroll-Linien wurden die bereits charakterisierten Linien SNCA1, SNCA2, Kontrolle1, Kontrolle2 und die artifiziiell mutierte Linie Kontrolle1+A30P zu smNPCs differenziert. Um sicherzustellen, dass die generierten Zellen auch tatsächlich neuronale Vorläuferzellen sind, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung, wie in Kapitel 5.2.8.3 beschrieben, an ihnen durchgeführt. Als Marker dienen Nestin, Sox1, Pax6 und Forse-1. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden, wie in Kapitel 5.2.8.2 beschrieben, durchgeführt. Die Linien SNCA1 und SNCA2 sind positiv für alle



**Abb. 6.14:** Immunfluoreszenz-Aufnahme der smNPC-Linie SNCA1. Nestin und Sox1 mit Alexa 488 markiert. Pax6 Sox2 und Forse-1 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 30µm.

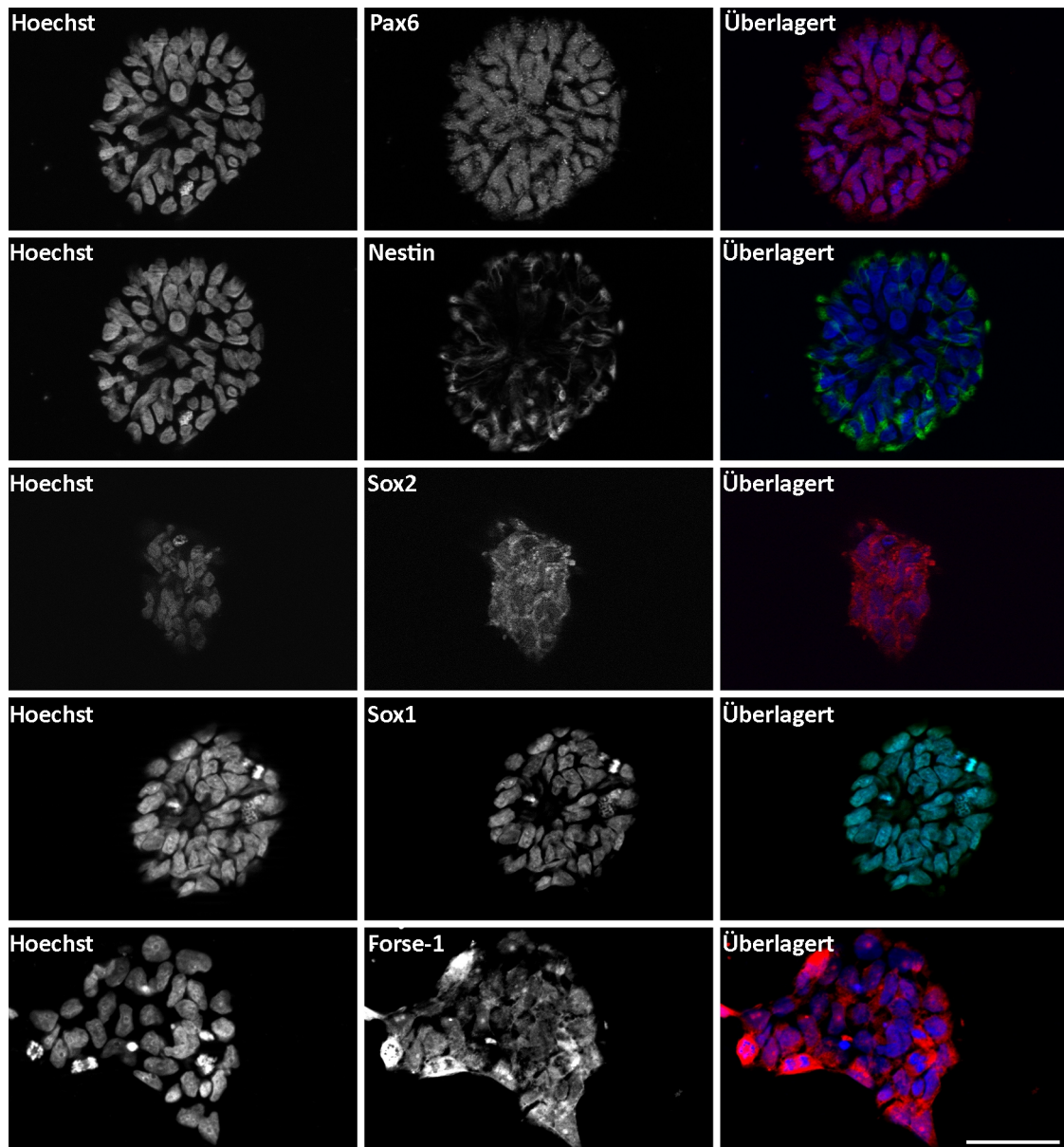
Marker (Abb. 6.14 bis Abb. 6.18).



**Abb. 6.15:** Immunfluoreszenz-Aufnahme der smNPC-Linie SNCA2. Nestin und Sox1 mit Alexa 488 markiert. Pax6 Sox2 und Forse-1 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 30µm.

Nestin ist, wie für ein intermediäres Filamentprotein typisch, faserförmig mit Alexa 488 gefärbt (Abb. 6.14 Bild 1). Pax6 und Sox2 sind Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern vorkommen und somit den Nukleus anfärben (Abb. 6.14 Bild 1 und 2). Forse-1 bindet an das Le(x) Kohlenhydrat, einem Proteoglycan- und zwei Glykolipidantigenen die bei der

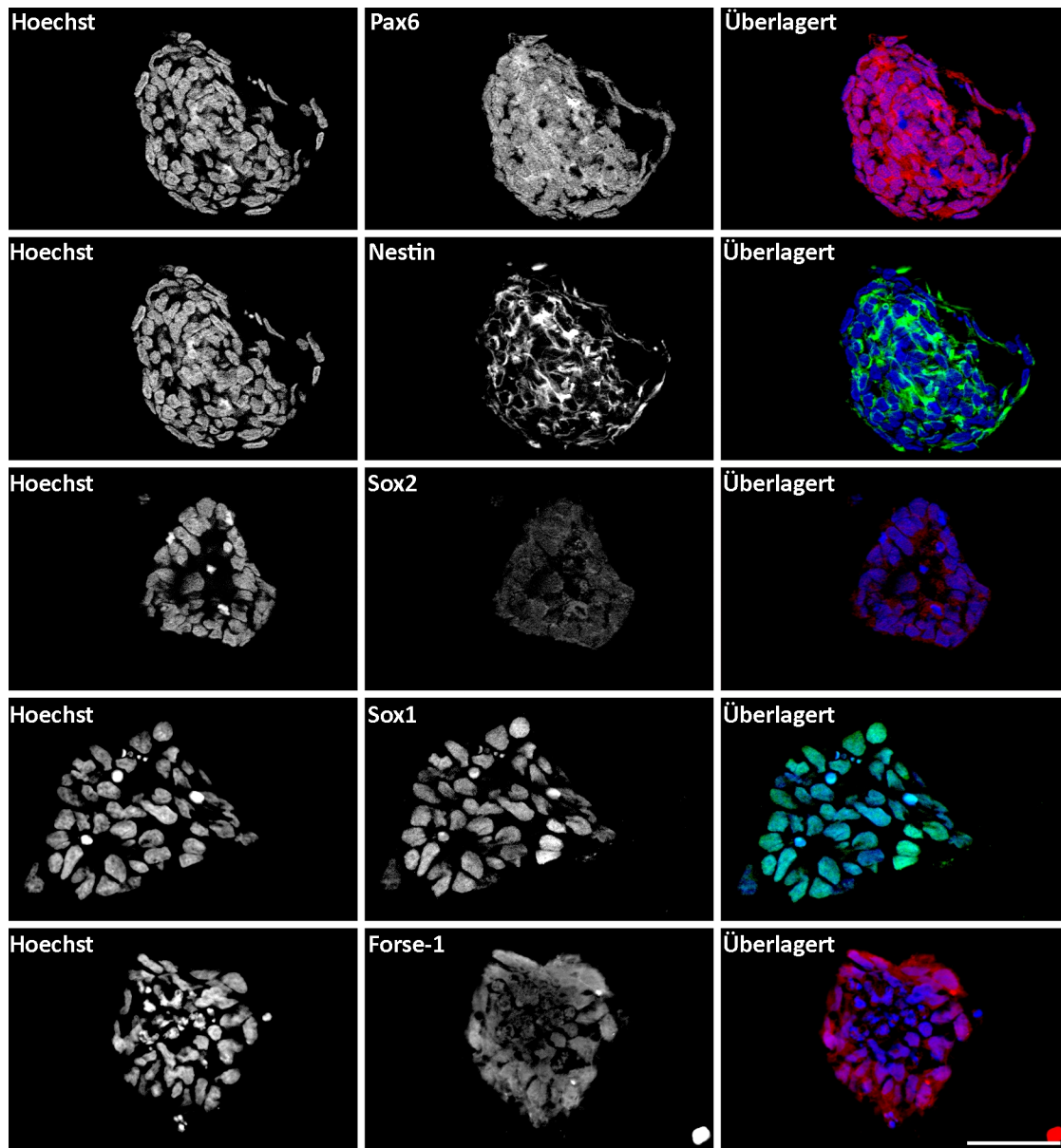
Zelladhäsion eine Rolle spielen (Allendoerfer, Magnani et al. 1995). Dies ist spezifisch für neuronale Vorläuferzellen des sich entwickelnden Gehirns (Tole and Patterson 1995) und dient hier als weiterer Charakterisierungsmarker (Abb. 6.14 Bild 3). In der Linie SNCA2 weist die Färbung das gleiche Muster auf (Abb. 6.15 Bild 1-3).



**Abb. 6.16:** Immunfluoreszenz-Aufnahme der smNPC-Linie Kontrolle 1. Nestin und Sox1 mit Alexa 488 markiert. Pax6 Sox2 und Forse-1 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 30µm.

Die Linien Kontrolle1 (Abb. 6.16) und Kontrolle2 (Abb. 6.17) weisen die gleichen Färbemuster wie die anderen beiden Linien auf. Die Linie Kontrolle1+A30P, die die

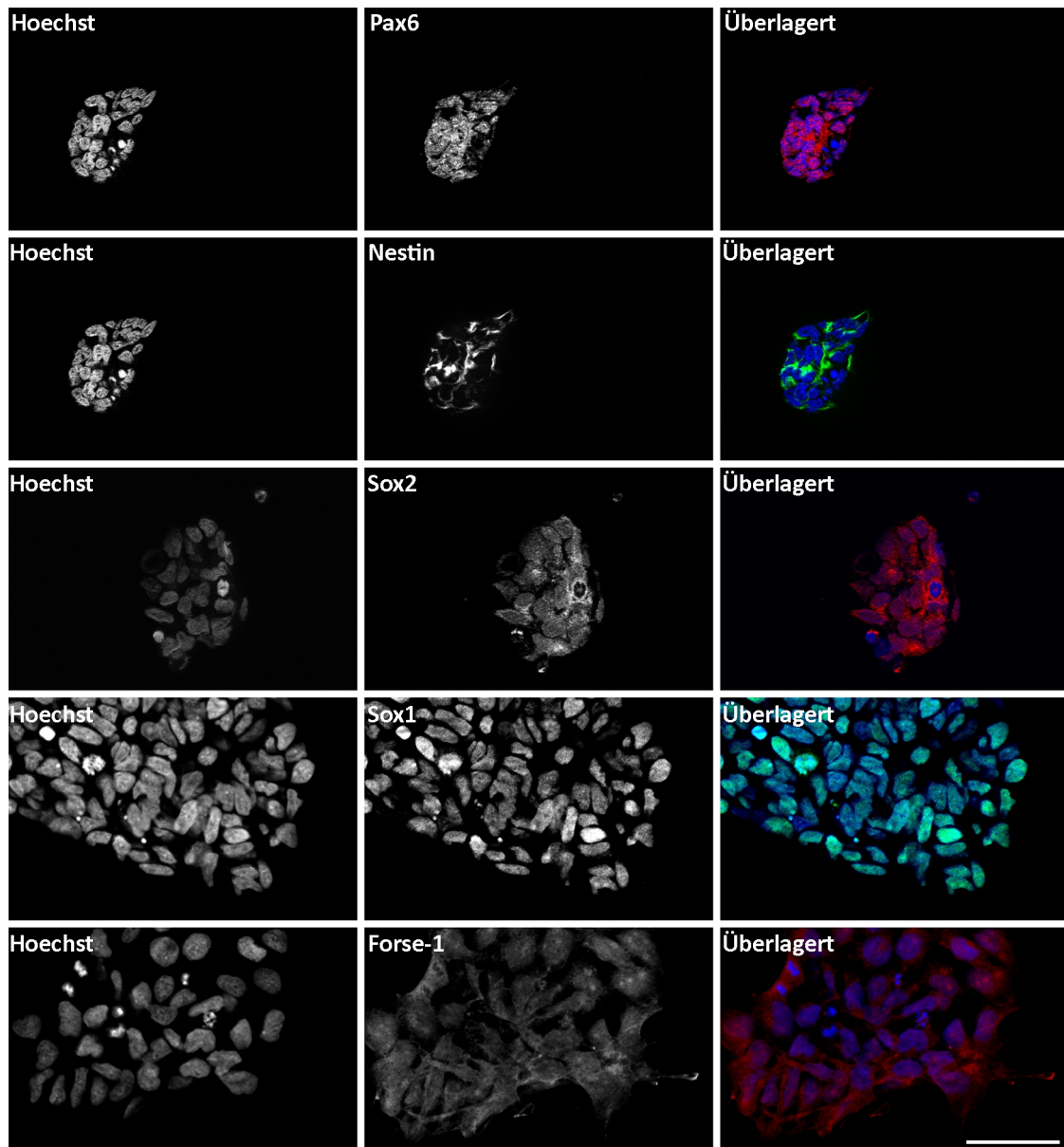
artifizielle Mutation A30P im Gen SNCA trägt, weist auch alle typischen Färbemuster auf und ist somit unauffällig (Abb. 6.18). Alle verwendeten iPS-Linien weisen nach Differenzierung zu smNPCs deutliche Expression neuronaler Marker der ventralen Bodenplatte auf.



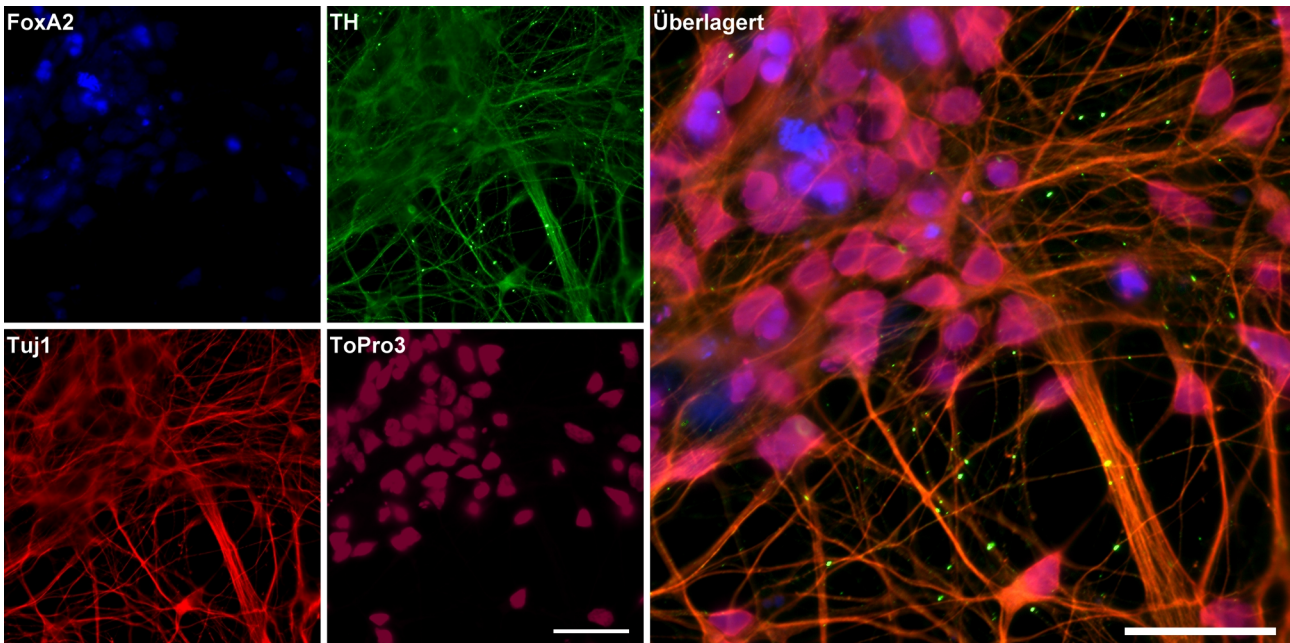
**Abb. 6.17:** Immunfluoreszenz-Aufnahme der smNPC-Linie Kontrolle 2. Nestin und Sox1 mit Alexa 488 markiert. Pax6 Sox2 und Forse-1 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 30µm.

Die Differenzierung zu msDaN, wie in Kapitel 5.2.7 beschrieben, zeigt eine deutliche Färbung für das neuronal spezifische beta-3 Tubulin, Thyrosin-Hydroxylase und FoxA2 das auf dopaminerge Neurone des Mittelhirns hinweist. Als Kernfärbung dient Topro3 (life technologies). Alle Färbungen wurden nach den Angaben im Kapitel 5.8.2.1 durchgeführt

und nach Kapitel 5.8.2.2 aufgenommen und mit Fiji ausgewertet (Schindelin, Arganda-Carreras et al. 2012). Die Häufigkeit von Neuronen liegt bei  $87 \pm 10\%$ . Davon sind  $78 \pm 6\%$  TH-positiv und somit dopaminerg. Von dieser Subpopulation sind  $57 \pm 3\%$  FoxA2-positiv, also mittelhirn-spezifisch (Abb. 6.19). Die Differenzierung ist spezifisch und effizient, aber am wichtigsten ist, dass sie reproduzierbar ist und damit hervorragend als Modell für die PK in msdaN geeignet ist. Um die Expression von a-Syn im Vergleich zu herkömmlichen Differenzierungsprotokollen zu untersuchen, wird ein Western-Blot

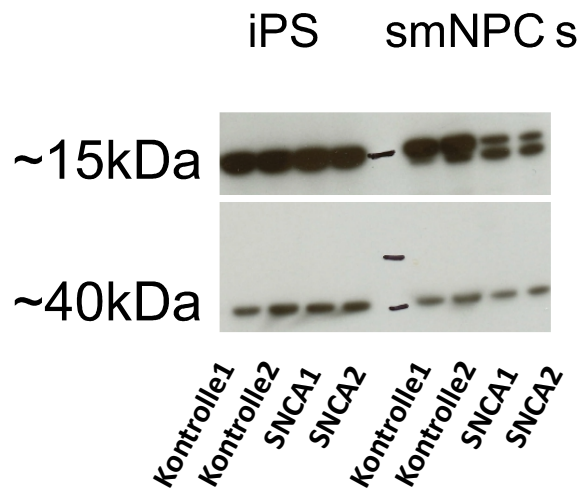


**Abb. 6.18:** Immunfluoreszenz-Aufnahme der smNPC-Linie Kontrolle 1 + A30P. Nestin und Sox1 mit Alexa 488 markiert. Pax6 Sox2 und Forse-1 sind mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung mit Hoechst33342. Maßstabsbalken 30µm.



**Abb. 6.19:** Immunfluoreszenz-Aufnahme von 30 Tage differenzierten smNPCs. FoxA2 mit Alexa 350, TH mit Alexa 488 und Tuj1 mit Alexa 546 markiert. Kernfärbung ToPro3. Maßstabsbalken 30 $\mu$ m.

durchgeführt. Als Grundlage für die Lysate dienen hier die Linien SNCA1, SNCA2, Kontrolle1 und Kontrolle2, die einerseits mit dem smNPC Protokoll differenziert werden und andererseits mit der klassischen Differenzierung über iPS-Zellen (Reinhardt, Schmid et al. 2013).



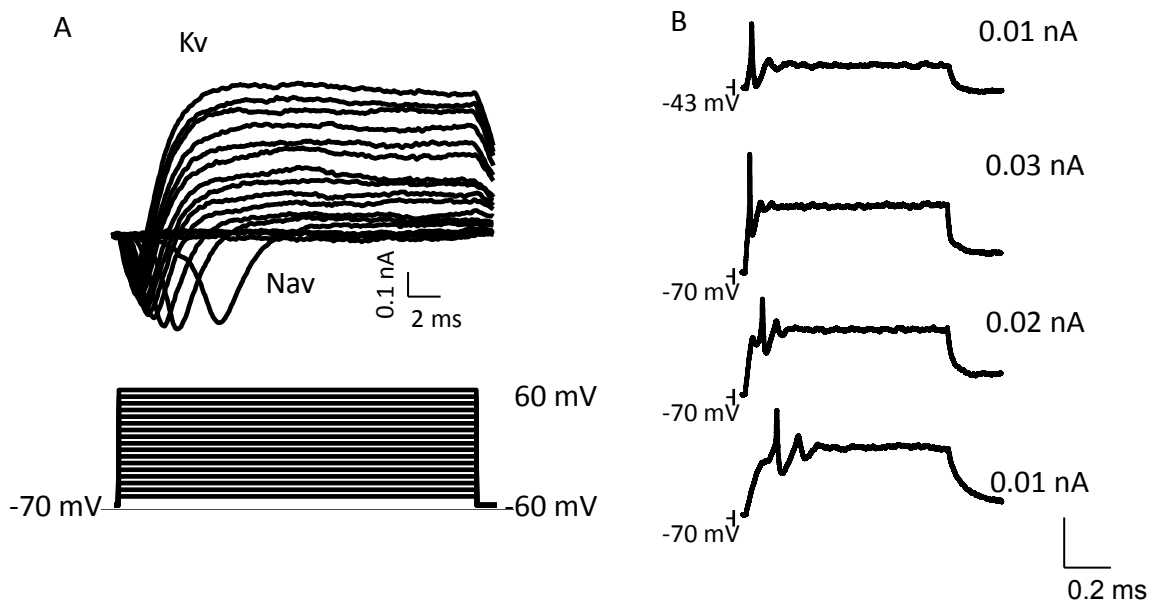
**Abb. 6.20:** Western Blot der a-Syn Expression in dopaminergen Neuronen aus iPS-Zellen und smNPCs. IPS-Zellen differenziert für 80 Tage, smNPCs für 30 Tage differenziert. Ladekontrolle GAPDH bei etwa 40 kDa. A-Syn bei etwa 15 kDa.



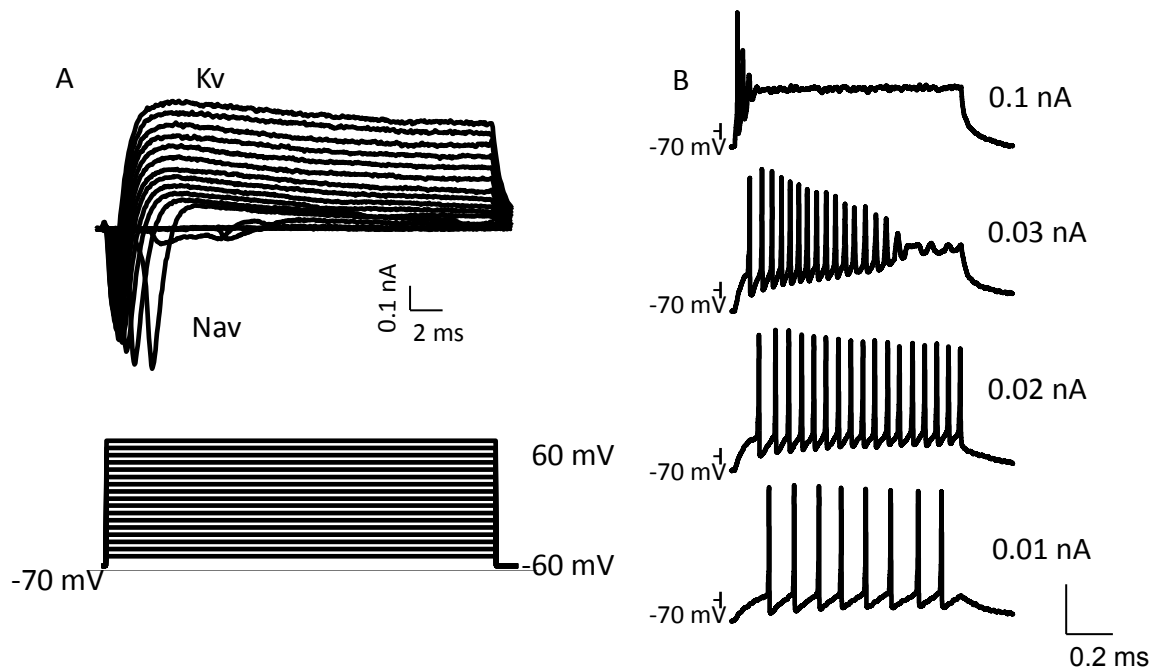
Die Expression von  $\alpha$ -Syn (Antikörper, BD Bioscience) ist in beiden Systemen gleich hoch (Abb. 6.20), wobei GAPDH (Antikörper, Millipore) als Ladekontrolle dient. Die Doppelbande in den smNPC Zelllinien kann mehrere Gründe haben. Modifizierungen von  $\alpha$ -Syn, wie Ubiquitinierung können ausgeschlossen werden da die Zellysate ausreichend denaturiert wurden. Ebenso sind Di- bzw. Multimere von  $\alpha$ -Syn in denaturierten Zellysaten nicht zu detektieren. Doppelbanden im Western Blot können einerseits durch zu große Mengen des aufgetragenen Proteins entstehen und andererseits kann die Konzentration des primären oder sekundären AK zu hoch sein. In beiden Fällen handelt es sich um Artefakte ohne wissenschaftliche Relevanz.

### 6.2.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der differenzierten *smNPCs*

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden von Frau Dr. Snezana Maljewitsch aus dem Labor von Prof. Dr. Holger Lerche der Universität Tübingen durchgeführt und ausgewertet.

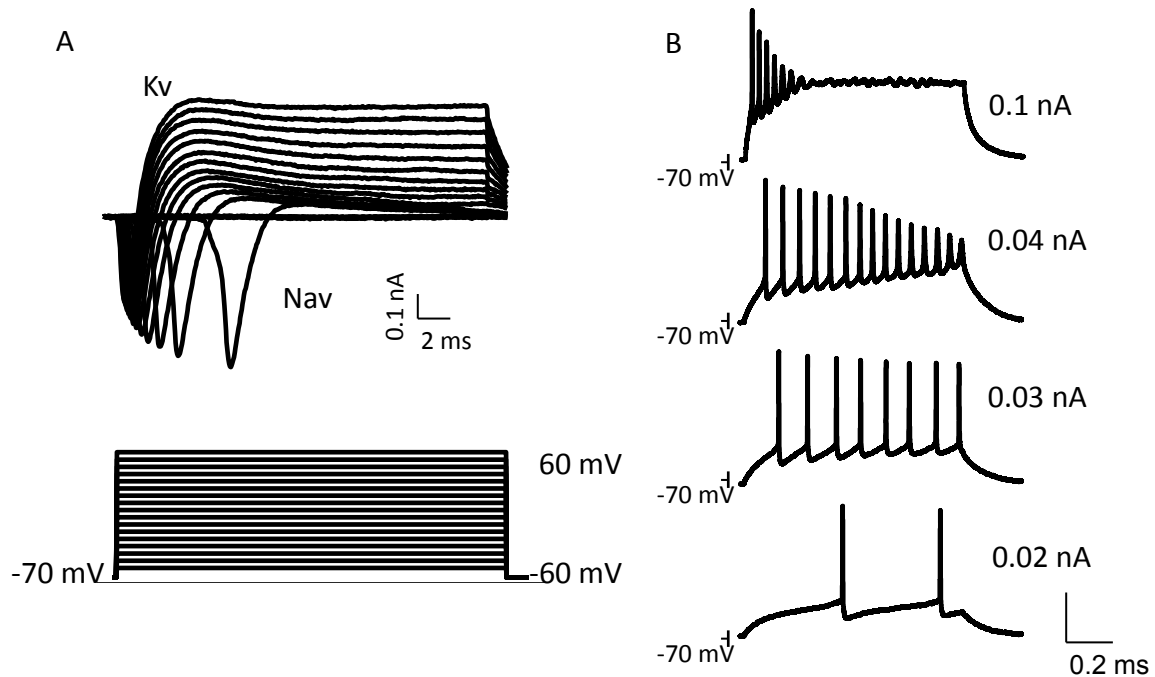


**Abb. 6.21:** Elektrophysiologische Charakterisierung der aus *smNPCs* differenzierten Neurone der Linie SNCA1. (A) Patch Clamp Spannungsmessung der spannungsabhängigen Natriumströme (Nav) und Kaliumströme (Kv). Das Spannungsschrittprotokoll ist unten zu sehen. (B) Depolarisierende Stromimpulse induzierten Aktionspotentiale wenn die Zelle auf -43mV konstant gehalten wird. Die gleiche Reaktion sehen wir auch wenn die Zelle auf -70mV gehalten wird. Zu sehen sind die Reaktionen auf Impulse von 0,01 ,0,02 und 0,03nA.



**Abb. 6.22:** Elektrophysiologische Charakterisierung der aus smNPCs differenzierten Neurone der Linie SNCA2. (A) Patch Clamp Spannungsmessung der spannungsabhängigen Natriumströme (Nav) und Kaliumströme (Kv). Das Spannungsschrittprotokoll ist unten zu sehen. (B) Depolarisierende Stromimpulse induzierten Aktionspotentiale wenn die Zelle auf -70mV konstant gehalten wird. Zu sehen sind die Reaktionen auf Impulse von 0,01 ,0,02 ,0,03 und 0,1nA. Ruhepotential dieser Zelle war -30mV.

Die aus smNPCs differenzierten Neurone, die wie in Kapitel 5.2.7 beschrieben, für die elektrophysiologische Untersuchung vorbereitet werden, zeigen ein Ruhemembranpotential zwischen -25 und -65 mV (Millivolt). Die Anregung der Neurone durch niedrige depolarisierende Ströme resultierte in Aktionspotentiale mit regelmäßigen Ausschlägen. Höhere Impulse induzierten schnellere Aktionspotentiale zu Beginn des gegebenen Impulses. Dies ist ein Charakteristikum von noch nicht maturierten Neuronen. Die Natriumströme reichten von 0,5 bis 3 nA (Nanoampere) und die Kaliumströme erreichten bis zu 4 nA. Die Neurone der Linien SNCA1, SNCA2 und Kontrolle1+A30P zeigen Elektrische Aktivität (Abb. 6.21 bis Abb. 6.23).

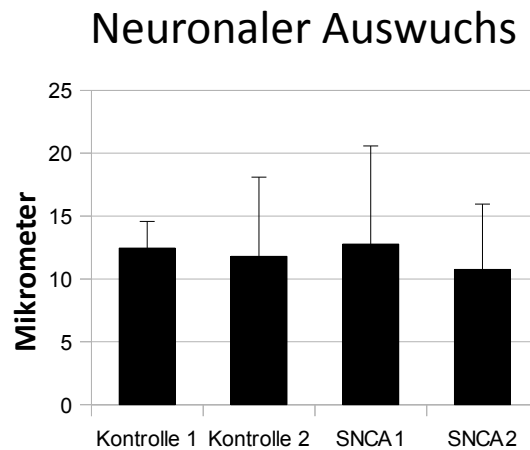


**Abb. 6.23:** Elektrophysiologische Charakterisierung der aus smNPCs differenzierten Neurone der Linie Kontrolle1 + A30P. (A) Patch Clamp Spannungsmessung der spannungsabhängigen Natriumströme (Nav) und Kaliumströme (Kv). Das Spannungsschrittprotokoll ist unten zu sehen. (B) Depolarisierende Stromimpulse induzierten Aktionspotentiale wenn die Zelle auf -70mV konstant gehalten wird. Zu sehen sind die Reaktionen auf Impulse von 0,01 ,0,02 ,0,03 und 0,1nA. Ruhepotential dieser Zelle war -30mV.

Die elektrische Aktivität der Linien Kontrolle1 und Kontrolle2 wurden bereits von Michela Deleidi aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Gasser von der Universität Tübingen beschrieben (Schondorf, Aureli et al. 2014)

### 6.3 Einfluss von *a-Syn* auf den Auswuchs von Neuriten

Der neuronale Auswuchs von Neuriten ist ein komplexer Prozess, der in drei Phasen eingeteilt werden kann. In der ersten Phase wird der Neurit geformt, diesen Prozess nennt man Sprossung (engl. Sprouting). In der nächsten Phase wächst der Neurit und wird chemotaktisch von seinen Zielzellen angezogen (positive Chemotaxis) oder von nicht Zielzellen fern gehalten (negative Chemotaxis). Die letzte Phase ist die Ausbildung von Synapsen an der Zielzelle, die Synaptogenese. Dieser Versuch untersucht nur die zweite Phase des neuronalen Auswuchses. Diese Phase wird erneut in drei Phasen unterteilt. Die Erste ist die Auswuchsphase, in der die Filopodien des Wachstumskegels sich nach außen hin verlängern. In der zweiten Phase breiten sich die Lamellipodien bis an die äußeren Enden der Filopodien aus und Mikrotubuli wachsen tiefer in den Wachstumskegel ein. Dadurch können auch Vesikel und Zellorganellen entlang der Mikrotubuli in den Wachstumskegel immigrieren, wie das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien. Man spricht hier von der Umhüllung (engl. Engorgement). Der letzte Schritt ist die Konsolidierungsphase, in der der Wachstumskegel zusammenfällt in dem das F-Actin depolymerisiert und sich ein neuer Schaft des Wachstumskegels bildet. Bei dieser Art des Wachstums wächst nur die Spitze des Wachstumskegels. Es wird nur dort



**Abb. 6.24:** Auswuchs von Neuriten aus für 80 Tage differenzierten Neuronen aus iPS-Zellen. Die Länge der Neuriten werden in  $\mu\text{m}$  angegeben. Dargestellt sind Werte aus drei unabhängigen Experimenten bei denen mindestens 10 visuelle Felder pro Zelllinie ausgewertet wurden. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

neues Material eingebettet, während das Cytoskelett des Axons intakt bleibt. Die Länge des Auswuchses wird von der Wachstumskinetik der Mikrotubuli und der Intermediärfilamente, zu denen auch die Neurofilamente gehören bestimmt. Dies geschieht durch einen Tretmühlenmechanismus (engl. Treadmilling), bei dem die Bausteine der Filamente am „minus“-Ende der Filamente abgebaut und am „plus“-Ende angehängt werden. Die Kinetik des Abbaus wird durch den Aufbau reguliert, was eine Demontage des Filaments verhindert. Im Gegensatz zu den Mikrofilamenten, deren Wachstum Guanosin-Triphosphat (GTP) abhängig ist, benötigen Mikrotubuli und Neurofilamente ATP zum Wachstum. Aus diesem Grund ist deren Wachstum von intakter ATP-Synthese in den Mitochondrien abhängig. Die Mitochondrien wandern vom Soma aus den Neuriten entlang und werden, sobald das Aktingerüst der Neurofilamente den Wachstumskegel durchzieht, dort positioniert um das Wachstum vor Ort zu unterstützen. Für diesen Versuch werden die Linien SNCA<sub>1</sub>, SNCA<sub>2</sub>, Kontrolle<sub>1</sub>, Kontrolle<sub>2</sub> und Kontrolle+A30P verwendet. Die Linien werden wie in Kapitel 5.2.8.3 kultiviert und wie in Kapitel 5.2.8.3.1 mikroskopisch aufgenommen und ausgewertet.

Wie in Abb. 6.24 gezeigt, sind keine Unterschiede zwischen den Linien zu berichten. Die Neuriten aller Linien wachsen im gleichen Zeitraum die annähernd gleiche Strecke. Obwohl die Messungen nach einem etablierten Protokoll durchgeführt wurden, ist die Standardabweichung sehr hoch.

## **6.4 Neuronale mitochondriale Morphologie**

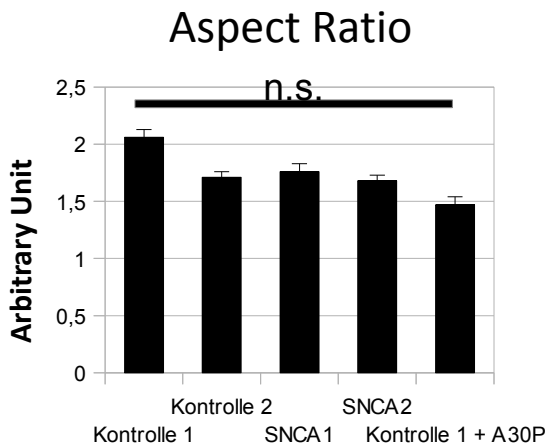
Die Mitochondrien sind hauptsächlich die Kraftwerke der Zellen, die den meisten Teil des ATPs erzeugen. Dies geschieht in der Atmungskette, die über den Krebszyklus gesteuert wird. Neben der Auffrischung des ATPs haben die Mitochondrien noch weitere Aufgaben wie das Speichern von Kalzium und Modulation der Kalzium-Signalwege. Die Mitochondrien sind auch beteiligt an der Apoptose, dem Freitod der Zelle. Ebenfalls regulieren sie freie Sauerstoffradikale (ROS engl. reaktive oxygen species) und deren Signalwege. Die Regulation der ROS ist sehr wichtig, da der oxidative Stress, also das Oxidieren von Zellbestandteilen wie die DNS, die Zellen schädigt und ihre Funktion schwer beeinflussen kann. Die durch ROS hervorgerufenen Schäden an mitochondrialer DNA (mtDNA) werden normalerweise repariert, sind die Schäden jedoch zu groß, wird die beschädigte mtDNA in einen Bereich des mitochondrialen Netzwerks isoliert und dieser Teil in einem Fissions-Prozess vom Netzwerk abgetrennt und mittels Mitophagie abgebaut. Das Netzwerk der Mitochondrien befindet sich meist im Soma der Zelle. Bei Neuronen befindet sich auch ein Teil des Netzwerkes im Soma, aber viele kleine Mitochondrien sind von diesem Netzwerk abgetrennt und über alle Neuriten verteilt, um auch ferne Bereiche des Neurons in das mitochondriale Netzwerk einzubinden. Sind diese Mitochondrien zu sehr geschädigt oder deren Kapazität erschöpft, werden diese zurück zum Soma transportiert und regeneriert bzw. abgebaut. Ist dieser Prozess der Regeneration gestört, ist das mitochondriale Netzwerk im Soma fragmentiert.

Diese Fragmentation und Morphologie der Mitochondrien lässt sich über zwei einfache Parameter überprüfen. Das Verhältnis von Länge der Mitochondrien zu ihrer Breite wird als Aspekt Ratio (AR) bezeichnet.

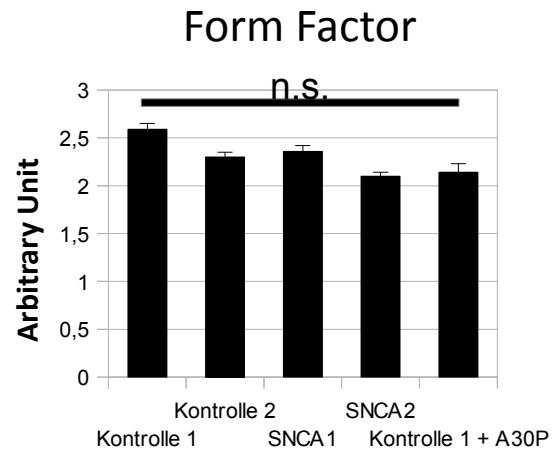
$$AR = \text{Breite}_{\text{Mitochondrium}} / \text{Länge}_{\text{Mitochondrium}}$$

Ist das Mitochondrium punktförmig, dann ist dieser Wert 1. Es kann keine Werte unter 1 geben und verlängerte Mitochondrien haben Werte größer 1. Die Verästelung der Mitochondrien wird mit dem Form Faktor (FF) beschrieben, der über folgende Formel bestimmt wird.

$$FF = \text{Perimeter}^2 / (4 * \Pi * \text{Fläche})$$



**Abb. 6.25:** Messungen zu den Parametern der mitochondrialen Morphologie: *Aspekt Ratio* Messung an 30 Tage differenzierten Neuronen aus smNPCs. Dargestellt sind Werte aus drei unabhängigen Experimenten bei denen insgesamt 50 Zellen ausgewertet wurden. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. ANOVA  $F(4/5938)=10$   $p>0,05$



**Abb. 6.26:** Messungen zu den Parametern der mitochondrialen Morphologie: Form Faktor Messung an 30 Tage differenzierten Neuronen aus smNPCs. Dargestellt sind Werte aus drei unabhängigen Experimenten bei denen insgesamt 50 Zellen ausgewertet wurden. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. ANOVA  $F(4/5938)=13,97$   $p>0,05$

Als Perimeter wird die Fläche einer Ellipse bezeichnet, die so über das Mitochondrium gelegt wird, dass es komplett in der Ellipse liegt. Wobei die Ellipse die kleinstmögliche Fläche aufweist. Diese quadrierte Fläche wird durch die Kreiszahl  $\pi$  und die wahre Fläche des Mitochondriums geteilt. Dieser Divisor muss wegen der Quadratur des Dividenten auch mit dem Faktor 4 multipliziert werden. Umso niedriger der FF, desto niedriger ist die Verästelung der Mitochondrien.

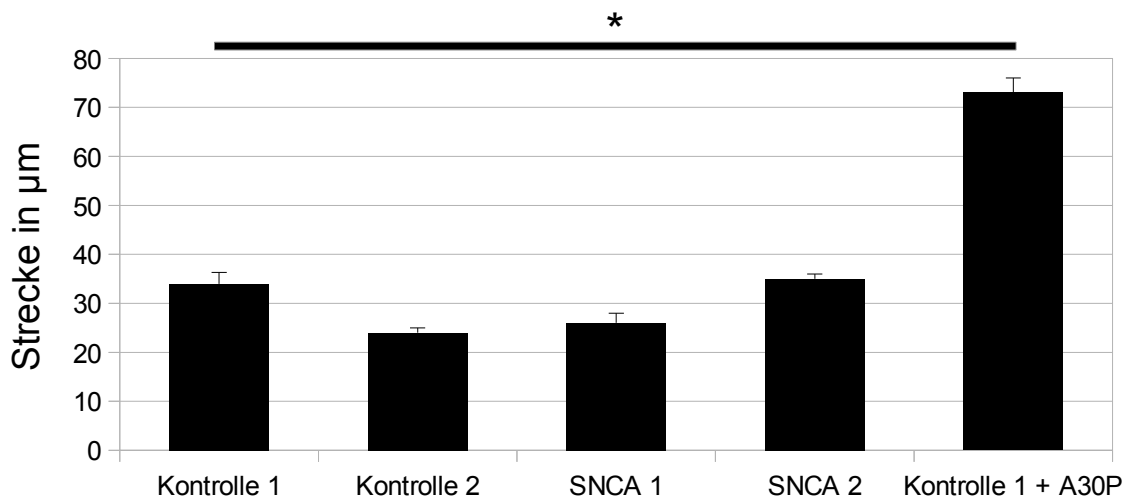
Der Form Faktor zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle, SCNA Mutation und artifizieller A30P Mutation (Abb. 6.25 ANOVA  $F(4/5938)=10$ ,  $p>0,05$ ). Die Mitochondrien weisen in allen Zelllinien eine relativ gleichmäßige sphärische Morphologie auf. Der Aspekt Ratio zeigt auch keine signifikanten Unterschiede in der mitochondrialen Verästelung (Abb. 6.26 ANOVA  $F(4/5938)=13,97$   $p>0,05$ ). Beide Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Mitochondrien des WT relativ sphärisch und wenig verästelt sind. Die Mitochondrien der Mutanten weisen die gleiche Größe wie Verästelung auf.



## ***6.5 Mitochondrialer Transport in Neuriten***

Die Funktion der Neurone ist vielleicht mehr von der Funktion von Mitochondrien abhängig als jede andere Zelle des Körpers. Die Ausmaße eines Neurons können unmöglich von einem zentralen mitochondrialen Netzwerk und der daraus resultierenden entropischen Verteilung mitochondrialer Stoffwechselprodukte versorgt werden. Aus diesem Grund müssen die Mitochondrien in der gesamten Zelle verteilt werden. Dies geschieht durch ein ausgeklügeltes Transportsystem, bei dem die Mitochondrien entlang der Mikrotubuli in den Axonen und Dendriten verteilt werden. Die Positionierung und der Transport der Mitochondrien unterliegt jedoch einer strikten Steuerung. Die Mitochondrien werden mit der Hilfe von drei Proteinen mit den Mikrotubuli verbunden. An den Mitochondrien wird das Protein MIRO-1 (mitochondriale Rho GTPase-1) an der äußeren Membran verankert und das Protein Milton dient als Kupplung zwischen MIRO-1 und den Motorproteinen Kinesin und Dynein. Diese Motorproteine bringen dann die Mitochondrien an die Stellen der Neurone, an denen das meiste ATP verbraucht wird, die Synapsen. Weitere Stationen der Mitochondrien sind die Ranvierschen Schnürringe an denen die Myosinscheide der Neuriten unterbrochen ist und die Saltatorische Erregungsleitung stattfindet. Fehler im Mitochondrialen Transport können durch Beschädigung der Motorproteine oder ihrer Ladung, Beschädigung der Mikrotubuli oder durch einen Mangel an ATP hervorgerufen werden.

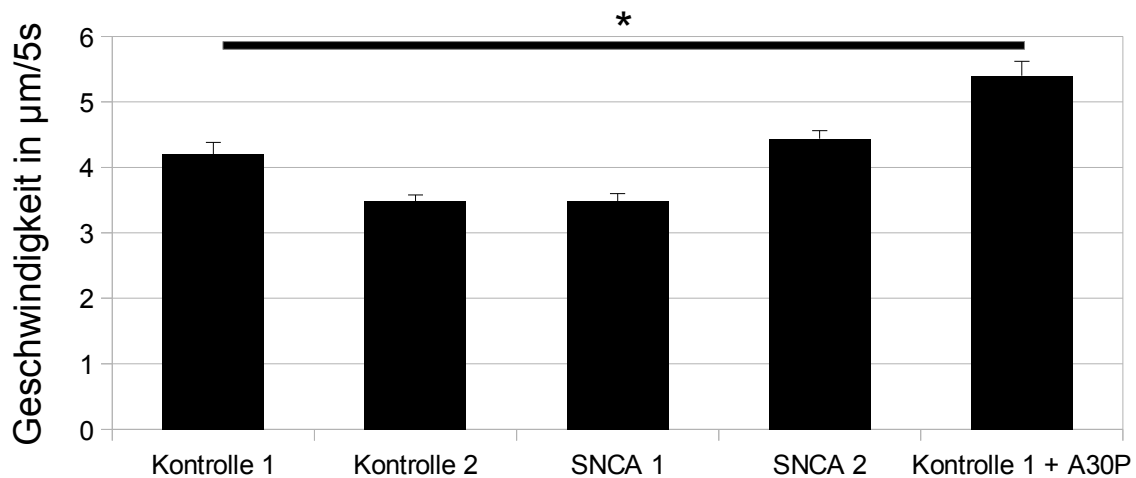
## Mitochondrialer Transport Zurückgelegte Strecke



**Abb.6.27:** Mitochondrialer Transport in Neuriten. Zurückgelegte Strecke in 5 Minuten in Millimetern. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt bei denen 10 visuelle Felder ausgewertet wurden. Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler. ANOVA  $F(4/10480)=9,36$ ,  $p>0,05$ ;  $p(c)>0,000005$  mit post hoc Test und Bonferroni-Korrektur

Die Untersuchungen des mitochondrialen Transports soll die Frage klären, ob a-Syn einen möglichen Einfluss auf den Transport der Mitochondrien hat. Es ist vorstellbar das Lewy-Körper und Lewy-Neuriten den Transport stören können. Es wird auch berichtet, dass die A30P a-Syn Mutation an Aktin bindet und dessen Struktur und Dynamik verändern kann (Sousa, Bellani et al. 2009). Die Hypothesen sollten sich durch eine verringerte Geschwindigkeit und oder eine reduzierte zurückgelegte Strecke manifestieren. Die Experimente werden, wie in Kapitel 5.2.8.3.2 beschrieben, durchgeführt und ausgewertet. Die zurückgelegte Strecke zeigt keine deutlichen Unterschiede zwischen den Kontrollen und den SNCA Linien. Die artifiziell mutierte Linie Kontrolle<sub>1</sub>+A30P zeigt einen signifikanten Anstieg in der zurückgelegten Strecke (Abb. 6.27 ANOVA  $F(4/10480)=14,7$ ,  $p<0,05$ ;  $p(c)<0,000005$  mit post hoc Test und Bonferroni-Korrektur). Die durchschnittliche Geschwindigkeit mit der sich die Mitochondrien fortbewegen, ist in einem ähnlicher Verhältnis verteilt. Jeweils eine Linie der Kontrolle, sowie eine Linie der Mutation zeigen eine reduzierte Geschwindigkeit verglichen mit den restlichen Linien. Aus diesem Grund lässt sich keine eindeutige Aussage treffen. Einzig die Linie Kontrolle<sub>1</sub>+A30P zeigt eine auffällige, signifikante Zunahme der Geschwindigkeit, die entweder die initiale Hypothese widerlegt

## Mitochondrialer Transport Geschwindigkeit



**Abb.6.28:** Mitochondrialer Transport in Neuriten. Durchschnittliche Geschwindigkeit in  $\mu\text{m}/5\text{s}$ . Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt bei denen 10 visuelle Felder ausgewertet wurden. Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler. ANOVA  $F(4/10480)=14,7$  ,  $p<0,05$ ;  $p(C)>0,000005$  mit post hoc Test und Bonferroni-Korrektur

oder auf einem uns unbekanntem Nebeneffekt schließen lässt (Abb. 6.28 ANOVA  $F(4/10480)=14,7$ ,  $p<0,05$ ;  $p(C)>0,000005$  mit post hoc Test und Bonferroni-Korrektur).

Die Linie Kontrolle1+A30P wurde einer genetischen Untersuchung mittels DNA-Microarray unterzogen (Tabelle 6.2). Die Linie weist zwei große Deletionen auf dem Chromosom 14 auf, die von Position 51,293,335-60,914,840 und Position 61,163,788-73,690,146 reichen. Eines der Gene das von diesen Deletionen betroffen ist exprimiert Aktin. Da Aktin ein wichtiger Bestandteil des Zytoskelettes ist, kann eine verminderte Expression einen Einfluss auf die Geschwindigkeit und die Entfernung haben. Wie genau dies aber möglich ist, kann nur schwer erklärt werden. Sie besitzt außerdem noch eine NIPA2 Mutation auf Chromosom 15 und eine SNAP29 Mutation auf Chromosom 22. Der Schaden durch die Deletionen ist so groß, dass diese Zelllinie nicht als Positivkontrolle dienen kann, da die beobachteten Effekte durch Faktoren unabhängig von der untersuchten A30P Mutation verursacht sein können.

Chromosom	Linie	Mutation	Position	Befund	Referenz
14	Kontrolle1+A30P	Deletion	51,293,335- 60,914,840	Großräumige Deletion	
14	Kontrolle1+A30P	Deletion	61,163,788- 73,690,146	Großräumige Deletion	
14	Kontrolle1+A30P	Insertion	106,079,822- 106,776,960	Variation_23307	Levy (2007)
15	Kontrolle1+A30P	Insertion	22,770,421- 23,281,364	NIPA2 Mutation	
15	Kontrolle1+A30P	Mosaik Insertion	22,770,421- 25,227,152	Variation_3592	Redon (2006)
22	Kontrolle1+A30P	Insertion	19,503,273- 22,209,139	Variation_31078	Pery (2008)
22	Kontrolle1+A30P	Mosaik Insertion	18,626,108- 23,720,584	SNAP29 Mutation	

**Tabelle 6.2:** Zusammenfassende Chromosomale Analyse der Linie Kontrolle+A30P mittels Affimetrix Array Scan.

## 7.0 Diskussion

### 7.1 Generierung der iPS-Zellen

Die Entwicklung somatische Zellen in ein pluripotentes Stadium zu reprogrammieren war mehr als ein Meilenstein für die Forschung. So ist es nur verständlich, dass die Forscher Shinja Yamanaka und John Gurdon für ihre Erkenntnisse im Jahre 2012 den Nobelpreis für Medizin verliehen bekamen. Es waren nur fünf Jahre zwischen der Entdeckung Yamanakas und der Verleihung des Preises vergangen, als schon hunderte Labore weltweit sein Verfahren nutzten um die Forschung an Stammzellen, deren Differenzierung und die Entstehung genetischer Krankheiten voranzutreiben.

Speziell auf dem Gebiet der neurodegenerativen Erkrankungen hat die iPS-Technologie sich als nützliches Modellsystem, das wichtige Krankheitscharakteristika repliziert, erwiesen. Neurone aus iPS-Zellen von Patienten mit familiärer AD replizieren die als Biomarker identifizierte, erhöhte Konzentration des A $\beta$ -Proteins, welche durch die Gabe von  $\beta$ -Sekretase-Inhibitoren reduziert werden konnte (Israel, Yuan et al. 2012). Bei der Amyotrophen lateralen Sclerose (ALS) wurden humane Fibroblasten eines *Superoxide Dismutase 1* (SOD1)-Trägers zu Motoneuronen differenziert, die Einschlüsse in den Neurofilamenten aufwiesen (Chen, Qian et al. 2014). In den ersten iPS-Zellen, die aus Patienten mit iPD gewonnen wurden, wurden noch keine pathologischen Phänotypen zwischen iPS-Linien aus Patienten mit iPD und gesunden Kontrollen untersucht (Soldner, Hockemeyer et al. 2009). Doch später konnte bei humanen iPS-Zellen mit LRRK2 Mutation eine höhere Suszeptibilität gegenüber oxidativem Stress beobachtet werden (Nguyen, Byers et al. 2011). Kurz darauf wurden auch Unterschiede bei der Morphologie der dopaminergen Neurone entdeckt, die Länge der Neuriten wie die Anzahl der Neuriten war bei der LRRK2 G2019S Mutation und Zellen aus Patienten mit iPD gegenüber gesunden Kontrollen reduziert (Sanchez-Danes, Richaud-Patin et al. 2012, Reinhardt, Schmid et al. 2013). Eine weitere Arbeit an dieser Mutation bestätigte die reduzierte Länge der Neuriten und untersuchte dies auch an Gen-korrigierten Linien bei denen die Mutation mittels einer Zinkfinger-Endonuklease entfernt, bzw. eingefügt wurde. Zusätzlich fiel eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -Syn in den mutierten, aber nicht in den Gen-

korrigierten Zelllinien auf (Reinhardt, Schmid et al. 2013). Bei Untersuchungen an dopaminergen Neuronen aus iPS-Zellen, die eine mutierte Form von PARK2 tragen, fiel eine veränderte Morphologie von Mitochondrien und eine Erhöhung des oxidativen Stresses auf im Vergleich zu iPS-Zellen und Fibroblasten ohne Mutation von PARK2 auf (Imaizumi, Okada et al. 2012). In dopaminergen Neuronen aus iPS-Zellen die eine Triplikation des SNCA-Lokus tragen wurde eine Verdopplung der Expression von a-Syn festgestellt die in den ursprünglichen Fibroblasten nicht zu erkennen war, da Fibroblasten normalerweise kein a-Syn exprimieren (Devine, Ryten et al. 2011).

Die in dieser Arbeit generierten iPS-Linien haben das Potential, Hinweise zur Funktion von a-Syn und seine Rolle bei der PK aufzudecken und somit zur Erforschung der Ursachen der PK beizutragen.

## ***7.2 Charakterisierung der iPS-Zellen***

Die virale Reprogrammierung alleine ist ein riskanter Eingriff in das Genom der Zelle bei der die chromosomale Integrität angegriffen werden kann (Baum, Dullmann et al. 2003). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Chromosomen auf aberrante genetische Veränderungen zu untersuchen. Mit Hilfe des Karyogramms wurden die reprogrammierten Zelllinien auf mikroskopischer Ebene, auf Aberrationen überprüft und das Genom mit Illumina DNA-Microarray und Affimetrix Array Scan DNA-Microarray-Untersuchungen auf eventuelle Schäden überprüft. Die Reprogrammierung durch virale Vektoren wird heute mit Retro-, Lenti-, Adeno- oder Sendai-Virus durchgeführt. Der retrovirale Ansatz ist der klassische Weg, den auch Shinya Yamanaka gegangen ist und auch noch heute breite Verwendung findet. Die Effizienz dieses Ansatzes ist aber eher gering und nur 0,001-0,01% aller Zellen werden reprogrammiert (Takahashi, Tanabe et al. 2007, Liao, Wu et al. 2008). Lentiviren können im Gegensatz zu Retroviren auch Zellen infizieren, die sich nicht in einem Teilungsstadium befinden. Dies verspricht eine höhere Effizienz und neue Strategien, wie polycystronische Konstrukte, haben sich etabliert (Sommer, Stadtfeld et al. 2009). Diese Konstrukte können auch mit dem Cre-LoxP-System kombiniert werden und somit nach gelungener Reprogrammierung aus dem Genom

entfernt werden (Soldner, Hockemeyer et al. 2009). Um eine Reprogrammierung ohne virale Integration zu bewerkstelligen kann man auch auf Adeno- oder Sendaviren zurückgreifen. Die Effizienz der Sendai-Viren bei der Reprogrammierung ist dem Ansatz mit Adenoviren deutlich überlegen (Fusaki, Ban et al. 2009). Im Gegensatz zu Adenoviren besitzen Sendai-Viren das Potential sich in der Wirtszelle über einige Passagen zu reproduzieren, bevor die Reprogrammierung von statten geht (Fusaki, Ban et al. 2009). Es gibt aber auch andere Verfahren zur Reprogrammierung. Man kann ein Plasmid (Okita, Nakagawa et al. 2008) oder mRNA (Yakubov, Rechavi et al. 2010) durch Elektroporation oder Transfektion in die Zelle einbringen. Die Effizienz dieser Verfahren ist jedoch im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren gering und der Aufwand relativ groß. Ein weiterer Weg ist die Reprogrammierung durch die Proteine der Yamanaka-Faktoren, die direkt in das Medium gegeben werden. Diese Proteine müssen aber mit basischen Aminosäureketten versehen werden um die Zellmembran zu durchqueren (Kim, Kim et al. 2009). Die Herstellung dieser Proteine ist aufwendig und die Effizienz gering. Im Gegenzug erhält man jedoch Zelllinien, die keine genetische Manipulation aufweisen. Der klassische Weg zu iPS-Zellen, wie er von Yamanaka et al. postuliert wurde, ist immer noch häufig angewandt, da er ohne große Mittel zu bewerkstelligen ist und die Integration in das Genom bei ausreichender Kontrolle für die Grundlagenforschung ein zu vernachlässigendes Problem darstellt. Wenn das Genom untersucht wurde und keine Auffälligkeiten zu erkennen sind, muss überprüft werden, ob die nun viral integrierten Plasmide noch aktiv sind oder ob die Zelle sie abgeschaltet hat. Dies kann durch eine qPCR festgestellt werden. Die Abschaltung der Plasmide ist wichtig, da die iPS-Zellen die wichtigen Stammzellfaktoren selbst generieren müssen um auch wirklich reprogrammiert zu sein. Des Weiteren können diese viralen Faktoren die spätere Differenzierung negativ beeinflussen. Die Validierung der Abschaltung der viral eingebrachten und die Aktivierung der zelleigenen Stammzellfaktoren ist unumgänglich um den Stammzellstatus zu bestätigen.

Die Stammzellmarker müssen nicht nur auf der RNA-Ebene sondern auch auf der Proteinebene nachgewiesen werden. Hierfür eignet sich Western-Blot, Fluoreszenz assoziierte Zellsortierung (FACS, engl. Für fluorescence associated cell sorting) sowie IHC gleichermaßen, wenn die iPS-Kolonien ohne einen Rasen aus Futterzellen gezüchtet werden. Ist dies nicht der Fall, muss dies durch IHC bewiesen werden, da die Detektion mittels Western-Blot und FACS nicht zwischen Zellen des Rasens und den iPS-Kolonien unterscheidet. Weil die Futterzellen meist aus der Maus stammen, können bei FACS-

Messungen Maus-spezifische Antikörper als negativ Kontrolle dienen. Die IHC zeigt hier klare Signalunterschiede zwischen den Rändern der iPS-Kolonie und den umliegenden Futterzellen.

Durch eine Differenzierung in die drei Keimbahnen kann nachgewiesen werden, dass die generierten iPS-Zellen auch pluripotent sind. Eine gängige Methode ist der sogenannte Teratoma-Test. Dabei werden die zu testenden Zellen in immundefiziente Nacktmäuse transplantiert. Durch die Immundefizienz werden die implantierten Zellen nicht vom Immunsystem der Maus angegriffen und können sich im Körper der Maus ungehindert differenzieren. Die Mäuse werden anschließend euthanasiert und die gewucherten Transplantate pathologisch untersucht (Zhang, de Almeida et al. 2008). Die menschliche Vorstellungskraft gibt uns die Möglichkeit, die Folgen eines solchen Eingriffs erahnen zu lassen und uns *in vitro* Alternativen nicht zu verschließen. Diese ist ein Differenzierungsprotokoll nach dem Baukastenprinzip, was uns ermöglicht die iPS-Zellen in alle drei Keimbahnen zu differenzieren und anschließend mit Antikörpern keimbahnspezifische Proteine zu detektieren. Diese Methode beweist die Pluripotenz *in vitro*. Die Generierung von iPS-Zellen ist mittlerweile eine Standardmethode und die Pluripotenz nur ein Merkmal der Charakterisierung, die heute auch ohne Tierversuche und zu geringeren Kosten zu bewerkstelligen ist. Die iPS-Linien SNCA<sub>1</sub>, SNCA<sub>2</sub> sowie SNCA Kontrolle 1-3 wurden diesem Test unterzogen. Jede Differenzierung in eine Keimbahn wurde mit drei keimbahnspezifischen AK gefärbt. Die Differenzierungen weisen immer nur ein Signal für den AK des zu detektierenden Keimblatts auf. Dies spricht nicht nur für Pluripotenz an sich, sondern auch für die Möglichkeit diese Linien gezielt in die gewünschte Keimbahn zu differenzieren.

Als letztes wurden die Versuche zur genomischen Integrität durchgeführt. Ein Karyogramm der Zelllinien SNCA<sub>1</sub>, SNCA<sub>2</sub> und SNCA Kontrolle 1-3 zeigte keine Auffälligkeiten. Diese Methode ist auf mikroskopischer Ebene eine gesicherte Methode um große und kleine Translokationen sowie Duplikationen und Deletionen zu detektieren. Leider kann diese Methode keinen genaueren Einblick in das Genom liefern und eine DNA-ChIP-Untersuchung ist unumgänglich. Diese zeigte für die Klone SNCA<sub>1</sub> und SNCA<sub>2</sub> keine Auffälligkeiten. Bei den Linien SNCA Kontrolle 1-3 wurden einige Fehler detektiert. Die Linie SNCA Kontrolle<sub>1</sub> weist eine Mosaikduplikation des X-Chromosomes auf. Dies bedeutet, dass ein bestimmter Anteil aller Zellen dieser Linie eine Duplikation des Chromosomes vorweist, die anderen aber nicht. Es wäre sicher möglich die Zellen klonal



auszusäen. Dies heißt, die Zellkultur so dünn auszusäen, dass die vereinzelt Zellen eine eigene Kolonie bilden. Nun können verschiedene Klone, die einzelne Kolonien gebildet haben, selektiert und erneut untersucht werden um einen mutationsfreien Klon zu erhalten. Jedoch weist diese Linie eine weitere Mutation auf dem Y-Chromosom auf, die bis jetzt keine bekannten Anomalien sind. Maßgeblich für die Exklusion dieser Linie ist jedoch eine Insertion in den kodierenden Bereichs des Gens *PCDH11Y*, das für Protocadherin kodiert und somit eine unvorhersehbare Veränderung des Proteins bewirkt. Dieses Protein kommt nur auf dem Y-Chromosom vor und ist damit nur bei männlichen Individuen des *homo sapiens* zu finden. Das weibliche Homolog (*PCDH11X*) unterscheidet sich vom männlichen nicht nur in der Sequenz der DNA, diese ist beim weiblichen gespalten und invers auf beide Chromosomen verteilt (Wilson, Ross et al. 2007), sondern auch in der Funktion des Proteins. Protocadherin wird von Vitamin A-Säure im weiblichen Organismus gehemmt und im männlichen aktiviert. Dies führt zu Unterschieden, wie die Größe der Amygdala (Cooke and Woolley 2005) und soll zu dem Volumenunterschied zwischen dem männlichen und weiblichen Gehirn beitragen (Priddle and Crow 2013). Protocadherine sind eine Untergruppe der Cadherine und sind in Neuronen an allen Phasen der Entwicklung und bei der Signalweiterleitung beteiligt. Eine Mutation im Gen von *PCDH11Y* kann zu unvorhersehbaren Artefakten führen, die mit der PK nichts zu tun haben. Aus diesem Grund ist die Linie SNCA Kontrolle1 nicht für die weiteren Experimente zur Identifikation Parkinson-spezifischer Folgen der A30P Mutation im SNCA Gen geeignet.

Die Linie SNCA Kontrolle 2 weist keine unbekannt Anomalien auf. Alle gefundenen Insertionen kommen nur in Regionen vor die eine erhöhte genetische Variabilität aufweisen (Redon, Ishikawa et al. 2006, Levy, Sutton et al. 2007, Wong, deLeeuw et al. 2007, Pinto, Marshall et al. 2007, Perry, Yang et al. 2008), diese werden als bekannte Variation in Tabelle 6.1 bezeichnet. Da keine pathologisch relevanten Auffälligkeiten bei der Linie SNCA Kontrolle 2 gefunden wurden, kann diese für weitere Versuche verwendet werden.

Die Linie SNCA Kontrolle 3 besitzt eine Insertion im kodierenden Bereich des Gens *SDK2*. Dieses Gen kodiert für Sidekick2, dessen Funktion noch nicht aufgeklärt ist, aber durch Immunglobulin-Domänen und Fibronectin III-Domänen könnte es eine Rolle bei der Zelladhäsion in der Retina spielen (Yamagata, Weiner et al. 2002). Bei der Maus ist die Expression im Mittelhirn kaum detektierbar und auch bei den humanen Probanden ist die

Expression niedrig. Laut dem Allen Brain Atlas, exprimiert das sich entwickelnde menschliche Gehirn SDK2 kaum. Die Auswirkungen bleiben dennoch unvorhersehbar und das Risiko Artefakte zu messen ist nicht zu unterschätzen. Mit dieser Information kann die Zelllinie SNCA Kontrolle<sup>3</sup> unter Vorbehalt und strenger Beobachtung für weitere Experimente herangezogen werden, da nicht bekannt ist ob SDK2 eine Funktion in Neuronen des ZNS spielt.

### ***7.3 Differenzierung zu smNPCs und deren Charakterisierung***

Die Idee eine neuronale Vorläufer-Zelllinie zu schaffen um einfacher und schneller Neurone zu generieren ist nicht neu. Schon das Labor von Prof. Oliver Brüstle aus Bonn sah die positiven Aspekte eines solchen Modells (Falk, Koch et al. 2012). Bisherige Ansätze der Differenzierung nutzen Wachstumsfaktoren, die rekombinant hergestellt werden (Falk, Koch et al. 2012). Diese Wachstumsfaktoren werden in großen Mengen eingesetzt und deren Kosten sind bei längeren Differenzierungen beachtlich. Man kam schnell zu der Erkenntnis, dass chemische Verbindungen die günstiger herzustellen sind, ebenfalls die Signalwege der Wachstumsfaktoren regulieren können (Mak, Huang et al. 2012). Mit diesen Verbindungen können dann mit geringen Kosten neuronale Vorläuferzellen hervorgebracht werden die in großer Menge dann auch Hochdurchsatz-Verfahren ermöglichen (Reinhardt, Glatza et al. 2013). Nachdem neuronale Vorläufer-Zelllinien nach diesen Protokoll differenziert wurden, müssen als nächstes ihre neuronalen Eigenschaften charakterisiert werden, um zu belegen dass es sich bei diesen Linien um die gewünschten neuronalen Vorläuferzellen handelt. Dies geschieht über Epitope wie Pax6, welches neuronale Vorläufer des zentralen Nervensystems markiert. Des weiteren werden Sox2, Nestin und Forse-1 detektiert. Alle Linien zeigen die gleichen Färbemuster wie bei Peter Reinhardt et al. in der ursprünglichen Publikation. Die generierten SCNA- und Kontroll-Zelllinien zeigen eine gute Differenzierbarkeit zu Neuronen des dopaminergen und Mittelhirn-spezifischen Typs, welcher durch die Färbung mit FoxA2, TH und b3-Tubulin nachgewiesen wurde. Die Linien zeigen alle nach 30 Tagen Differenzierung elektrische Aktivität, auch wenn die Rate und Amplitude der Aktionspotentiale eher auf nicht maturaerte Neurone schließen lässt. Das Ruhemembranpotential aller Linien liegt bei

-30mV und ist vergleichbar mit anderen Messungen bei denen dopaminerge Neurone der Ratte *in vivo* ein Ruhemembranpotential von -43mV (Grace and Bunney 1983, Grace and Bunney 1983) und *in vitro* von -36mV aufwiesen (Grace and Onn 1989, Grace 1990, Grace 1991). Das Ruhemembranpotential scheint von der jeweiligen Präparationsmethode abhängig zu sein. Bei diesen Neuronen aus der Ratte mussten die dopaminergen Neurone um -15mV bis -25mV depolarisiert werden um spontane Aktionspotentiale zu unterdrücken. Bei den hier gemessenen Linien aus humanen iPS-Zellen sind es -40mV bei den Linien SNCA2 und Kontrolle1 + A30P und -13mV bei Linie SNCA1. Alle Linien zeigen Aktionspotentiale bei Stromimpulsen von 0,01nA. Die neuronale Aktivität der gemessenen Neurone wird hier eindeutig belegt.

#### **7.4 Einfluss der A30P $\alpha$ -Syn Mutante auf neuronalen Auswuchs**

Der negative Einfluss von  $\alpha$ -Syn Überexpressionen auf den neuronalen Auswuchs wurde bereits beschrieben (Takenouchi, Hashimoto et al. 2001). Diese Versuche beschäftigten sich mit neuronalen B103 Zellen aus der Ratte, in die humanes  $\alpha$ -Syn transfiziert wurde (Takenouchi, Hashimoto et al. 2001). Diese den Neuronen sehr ähnlichen, differenzierten Neuroblastomzellen der Ratte zeigten ein vermindertes Wachstum der Neuriten und man schloss daraus dass, eine verminderte Zelladhäsion dafür verantwortlich sei (Takenouchi, Hashimoto et al. 2001). Neuere Versuche in der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, die mit Retinsäure differenziert wurden und das Spectrin SPTBN1 überexprimierten, zeigten einen unkontrollierten neuronalen Auswuchs. Die Autoren postulierten eine Interaktion von  $\alpha$ -Syn mit dem Spectrin SPTBN1, das als Gerüstprotein das Aktinzytoskelett mit der Zellmembran verbindet, da eine Coexpression von  $\alpha$ -Syn den Effekt revertierte (Lee, Lee et al. 2012). Weitere *in vitro* Versuche an primären korticalen Neuronen der Ratte zeigten einen dosisabhängigen beschleunigten neuronalen Auswuchs durch die Gabe von extrazellulären WT  $\alpha$ -Syn-Protein in das Zellkulturmedium, aber nicht bei den mutierten Formen A53T und A30P von  $\alpha$ -Syn (Liu, Wang et al. 2013). Weitere Versuche mit trunkierten  $\alpha$ -Syn zeigten, dass nur die NAC- und C-Terminale Region diesen Phänotypen auslösen, da diese Regionen Funktionen von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen beherbergen sollen (Liu, Wang et al. 2013).

Es gibt bis heute keine publizierten Daten zur Rolle von A30P mutiertem  $\alpha$ -Syn beim neuronalen Auswuchs in menschlichen Neuronen, die aus iPS-Zellen generiert wurden. Dies und die Erkenntnis, dass die LARRK2 G2019S Mutante einen geringeren neuronalen Auswuchs als der WT in humanen iPS-Zellen vorweist (Reinhardt, Schmid et al. 2013), ermutigten uns den Versuch für die A30P  $\alpha$ -Syn Mutante durchzuführen.

In unserem Modell konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien SNCA1 mit 12,5  $\mu\text{m}$ , SNCA2 mit 11,8  $\mu\text{m}$ , gegenüber Kontrolle 1 mit 12,8  $\mu\text{m}$  und Kontrolle 2 mit 10,8  $\mu\text{m}$  bezüglich des neuronalen Auswuchses feststellen (Abb.:6.25). Alle Neuriten der untersuchten Linien wachsen annähernd die gleiche Strecke.

Die hier verfolgte Hypothese, sieht eine Reduktion des neuronalen Auswuchses vor, der durch eine Fehlfunktion in den Mitochondrien hervorgerufen wird. Die Ursache dieser mitochondrialen Fehlfunktion könnte die A30P Mutation von  $\alpha$ -Syn auslösen. Wie schon im Kapitel 6.3 beschrieben, ist der neuronale Auswuchs von dem Nachschub an dafür benötigten Proteinen abhängig. Viele der Prozesse, die zu deren Fertigung und Zusammenbau benötigt werden sind Energie-abhängig. Diese Energie wird in Form von ATP und GTP im Cytosol durch Glykolyse und in den Mitochondrien im Krebs-Zyklus gewonnen. Beide Prozesswege sind miteinander verwoben und es wird seit Jahrzehnten an deren gegenseitigen Kompensationsfähigkeiten geforscht. ATP und GTP sind für den neuronalen Auswuchs essentiell. Einerseits um das Zytoskelett durch Aktin-Treadmilling auf- und abzubauen und andererseits um die Transportproteine Kinesin und Dynein für den Transport von Vesikeln und Mitochondrien mit Energie zu versorgen. Deswegen könnte ein negativer Einfluss von A30P mutierten  $\alpha$ -Syn auf die Mitochondrien indirekt über den neuronalen Auswuchs messbar sein. Es ist überraschend, dass die hier erhaltenen Ergebnisse der Tier- und Zellkulturversuche nicht repliziert werden konnten. Eventuell sind hier die Unterschiede zwischen artifizierlicher und natürlicher Expression von  $\alpha$ -Syn von Bedeutung. Die Expressionsraten von transfizierten Plasmiden ist von den jeweiligen Promotoren abhängig, doch bei Studien mit Überexpression deutlich höher als die physiologischen Werte. Hier könnte ein Dosis-Wirkungseffekt, ähnlich dem bei einer Duplikation oder Triplikation des  $\alpha$ -Syn Lokus, eine Rolle spielen, der auch in iPS-Zellen auftreten könnte wenn man  $\alpha$ -Syn künstlich überexprimiert. Die Überexpression von A30P mutierten  $\alpha$ -Syn kann in Neuronen mittels Transfektion oder Transduktion mit einem Plasmid, das das mutierte A30P  $\alpha$ -Syn und ein Fluoreszenz-Protein trägt durchgeführt werden. Der Fluoreszenzmarker ist hier nötig um Zellen auffindig zu machen, die positiv

transduziert oder transfiziert wurden. Die Transfektionsraten mit Kalziumphosphat-DNS-Komplexen sind mit 1-3% eher gering (Kohrmann, Haubensak et al. 1999), bei Lipofektion liegt die Effizienz bei ca. 25% (Washbourne and McAllister 2002). Höhere Transfektionsraten lassen sich mittels Elektroporation (Zeitelhofer, Vessey et al. 2007) und viraler Transduktion (~95%) erreichen (Washbourne and McAllister 2002). Bei artifiziellen Überexpressionen können aktivierende und inhibierende Effekte auftreten, die unterschiedliche Phänotypen auslösen können. Die inhibierenden Prozesse können eine Reduktion der „Gleichgewichtswerte“ eines anderen Proteins zur Folge haben, wie bei der Überexpression von Makorin Ring Finger Protein 1 (MKRN1), eine Ubiquitin E3 Ligase, welche die Expression der humanen Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) herabsetzt und so die Länge der Telomere reguliert (Kim, Park et al. 2005). Die inhibierenden Effekte sind aber nicht nur auf Protein-Protein Interaktionen beschränkt, auch RNS und cis-agierende DNS Sequenzen können Phänotypen hervorrufen, wie bei den Entdeckungen der ersten microRNS (Hipfner, Weigmann et al. 2002, Brennecke, Hipfner et al. 2003). Aktivierende Effekte spielen zum Beispiel bei der Differenzierungen eine Rolle. Hier folgt aus einer Überexpression eines regulatorischen myogenen Faktors, MyoD, eine Differenzierung von Fibroblasten zu Myoblasten (Davis, Weintraub et al. 1987) und auch die Überexpression von mehreren Genen, wie den Yamanaka-Faktoren, differenziert Fibroblasten zu iPS-Zellen (Takahashi, Tanabe et al. 2007). Bei der Aktivierung kann es aber auch zu neomorphen Proteinfunktionen kommen, so vermag das Gen *hairless* bei Überexpression in *drosophila m.* das Geschlecht zu beeinflussen (Parkhurst, Bopp et al. 1990, Erickson and Cline 1991). Dies widerspricht einem der Grundgedanken welchem der Arbeit mit iPS-Zellen zu Grunde liegt, ein Zellmodell zu generieren mit dem Krankheiten im genetischen Hintergrund und in den von der Krankheit betroffenen Zellen der Patienten mit familiärer PK untersucht werden können. Es ist durchaus möglich, dass der bei der Überexpression von a-Syn beobachtete Phänotyp eines veränderten neuronalen Auswuchses, nicht bei physiologischen Konzentrationen von A30P mutierten a-Syn reproduziert werden kann.

Ein weiterer Punkt, die fehlenden Unterschiede bei dem neuronalen Auswuchs zu erklären, könnte das benutzte Protokoll sein. Der klassische Weg den neuronalen Auswuchs zu bestimmen, konnte bei diesen Versuchen nicht angewendet werden. Bei dieser klassischen Messung werden embryonale Neurone (Doherty, Dickson et al. 1984) oder Neuriten-bildende Zellen wie PC12 (Geldof 1995) vereinzelt ausgesät und einige Zeit nach dem Anwachsen gemessen um den Auswuchs der Neuriten zu vergleichen. Um dies

zu erreichen muss der optimale Zeitpunkt gefunden werden, an dem die Neurone gerade jung genug sind um durch den Prozess der Dissoziation keine Schäden an ihren Neuriten vorzuweisen, aber alt genug um mit dem Auswuchs zu beginnen (Sciarretta and Minichiello 2010). Des Weiteren muss die richtige Zelldichte gefunden werden damit die Neurone überleben, aber nicht zu dicht wachsen um eine Messung an einzelnen Zellen zu gewährleisten (Kleinfeld, Kahler, & Hockberger, 1988). Die gängigen Protokolle hierzu sind auf Neurone von Nagetieren (Kleinfeld, Kahler et al. 1988, Kaech and Banker 2006) oder die Phäochromozytomzelllinie PC12 abgestimmt (Sano, Kato et al. 1988, Yeyeodu, Witherspoon et al. 2010) , die Entwicklungszeit und die erforderliche Zelldichte variiert von Spezies zu Spezies (Brus, Keller et al. 2013).

Die Übertragung von bereits bekannten Versuchsprotokollen auf andere Modellsysteme kann in manchen Fällen zu starken Veränderungen des Protokolls führen. Die erforderlichen Konformität der Modellsysteme an etablierte Protokolle kann daher nicht immer erreicht werden. Es ist nicht gelungen, das Protokoll für den neuronalen Auswuchs in dem Sinne zu optimieren das wiederholbare Resultate erzeugt werden konnte. Zuerst wurde versucht die smNPCs mit Accutase zu dissoziieren, auszusäen und dann mit der Differenzierung zu beginnen. Dabei wurden verschiedene Zelldichten von 500 bis 20000 Zellen pro Well getestet. Bei zu geringer Zelldichte sind die Kulturen abgestorben bevor Neuriten sichtbar waren. War die Zelldichte ausreichend um ein Absterben der smNPCs zu verhindern, waren die Zellabstände zu gering um Neuriten eindeutig bestimmten Neuronen zuschreiben zu können. Um diese Umstände zu umgehen, wurden auch smNPCs in ausreichender Zelldichte differenziert, nach 3, 5 und 10 Tagen mit Accutase dissoziiert und zu verschiedenen Zelldichten ausgesät. Diese Kulturen wurden 24 Stunden nach dem Anwachsen mit einem Zeiss Cell Observer Mikroskop für mehrere Tage alle 60 Minuten fotografiert um das Verhalten der Zellen zu analysieren. Die Anwachs-Raten der Zellen waren sehr gering und der Anteil an Zelltrümmern stieg im Verhältnis zur Differenzierungsdauer stark an, während die Zahl der angewachsenen Zellen abnahm. Des Weiteren zeigte sich kein neuronaler Auswuchs nach einem erneuten Aussäen der Zellen, was die Annahme verstärkt, dass die bereits differenzierten Neurone nicht anwachsen und die Zellen die anwachsen keine Neurone sind oder dem Stadium der smNPCs noch zu sehr ähnelten. Aus diesem Grund wurde das Protokoll zum neuronalen Auswuchs aus der Publikation von Reinhardt und Schmid verwendet (Reinhardt, Schmid et al. 2013). Dieses Protokoll benutzt fertig differenzierte Neurone aus iPS-Zellen, aus denen dann mehrere Cluster mit einer Pipettenspitze „abgekratzt“ und ausgesät werden. Die daraus

hinauswachsenden Neuriten werden dann alle 5 Minuten für 30 Minuten gemessen. Nun kann die Hypothese erstellt werden, dass Neurone mit einem Phänotyp der die A30P Mutation von  $\alpha$ -Syn zur Ursache hat, eventuell schon abgestorben sind und daher keine signifikanten Unterschiede messbar waren. Auch ein Trauma der Neurone, vermittelt durch das „Abkratzen“ der neuronalen Cluster, könnte eine heterogenere Zellpopulation zur Ursache haben. Bei dieser heterogenen Population ist die Anzahl der von der A30P mutierten Form von  $\alpha$ -Syn beschädigten Neurone zu gering und der Effekt von  $\alpha$ -Syn ist überdeckt. Dies könnte auch die Höhe der Standardabweichung erklären, die bei dieser Messung auftritt. Die Methode des „Abkratzens“ von Neuronen aus dem Gewebe in der Zellkulturschale stellt eine Verletzung der Neurone dar, indem die bereits mit anderen Neuronen vernetzten Axone und Dendriten abgerissen werden. Im Gegensatz zu Neuronen des peripheren Nervensystems, weisen die Neurone des zentralen Nervensystems nur ein sehr eingeschränktes Potential sich zu regenerieren auf. Bereits 1850 berichtete Augustus Volney Waller in seinem Assay „Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres“, dass die distalen axonalen Abschnitte von durchtrennten Neuronen bei Fröschen nicht regenerieren (Waller, 1850). Auf die Durchtrennung des Rückenmarks oder des optischen Nervs folgt keine Regeneration der axonalen Bahnen, sondern meist auch die Apoptose der betroffenen Neurone (Berkelaar, Clarke et al. 1994, Liu, Xu et al. 1997). Versuche in Ratten zeigten, dass bei der Durchtrennung des optischen Nervs 50% der retinalen Ganglionzellen in der Retina absterben (Berkelaar, Clarke et al. 1994). Bereits acht Stunden nach einer traumatischen Verletzung der Nervenbahnen lassen sich apoptotische Marker und Doppelstrangbrüche der DNA mittels terminaler Deoxynukleotidyl-Transferase vermittelter Färbung von Doppelstrangbrüchen (TUNEL) nachweisen (Berkelaar, Clarke et al. 1994). Ob diese Erkenntnisse einen Einfluss auf das hier verwendete Protokoll hat, ist nicht bekannt. Ein Nachweis, ob die Verletzung der Neuriten bei der hier verwendeten Methode stattfindet und ob dies die Resultate beeinflusst, wurde nicht geprüft, ist aber bei weiterer Verwendung dieses Protokolls unumgänglich um die Maskierung eventueller Phänotypen dieser Methode zu bestätigen.

## **7.5 Der Einfluss von A30P $\alpha$ -Syn auf die mitochondriale Morphologie**

Die Morphologie der Mitochondrien wird durch Fissions- und Fusions-Prozesse, die die Mitochondrien durch einen ständigen Zyklus aus Abbau, Regeneration und mitochondrialer Genese führen, bestimmt (Detmer and Chan 2007, Westermann 2008). Die Schädigung der Mitochondrien zeigt sich durch eine Fission des mitochondrialen Netzwerkes. Anstatt eines intakten Netzwerks, lässt die Schädigung, bzw. Fission, die Mitochondrien als einzelne Organellen erscheinen (Youle and Karbowski 2005). Eine fragmentierte mitochondriale Morphologie wurde bereits bei  $\alpha$ -Syn Mutationen beschrieben, dabei wurde die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y untersucht, die A53T und A30P mutiertes  $\alpha$ -Syn sowie den  $\alpha$ -Syn WT überexprimierten (Kamp, Exner et al. 2010).

Andere Proteine deren Mutationen die PK auslösen, zeigen ebenfalls auffällige mitochondriale Morphologie. Ein Knock-Out von DJ-1 zeigt fragmentierte Mitochondrien bei MEF-Zellen aus KO-Mäusen, der revertiert werden kann in dem WT *DJ-1* retransfiziert wird (Krebiehl, Ruckerbauer et al. 2010). Ebenso zeigt sich der fragmentierte Phänotyp bei humanen Fibroblasten, die einem homozygoten Träger der DJ-1 E64D Mutation entnommen wurden (Krebiehl, Ruckerbauer et al. 2010).

Auch das mitochondriale Chaperone *Mortalin* zeigt in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, die verschiedene Funktionsverlustmutationen von *Mortalin* überexprimieren, fragmentierte Mitochondrien (Burbulla, Schelling et al. 2010). Dieser Phänotyp bestätigt sich in humanen Fibroblasten eines Trägers der A476T Mutation (Burbulla, Schelling et al. 2010).

Auch bei einem transgenen Modell von *D. melanogaster*, das mutierte Formen von *Pink1* exprimiert, zeigen die Mitochondrien auffällige Schwellungen. Durch Einbringen der Rezeptor-Tyrosin Kinase Ret, die im GDNF-Signalweg liegt, konnte diese größtenteils gerettet werden (Klein, Muller-Rischart et al. 2014). Durch einen siRNA (engl.: small interfering RNS) vermittelten *knock-down* von *Pink1* in der HeLa-Zelllinie, lässt sich ebenfalls ein fragmentierter Phänotyp in den Mitochondrien erkennen, der sich durch *Parkin* umkehren lässt (Exner, Treske et al. 2007).

In gleicher Weise moduliert auch mutiertes *Parkin* die Morphologie der Mitochondrien in humanen Fibroblasten von Patienten mit PK (Grunewald, Voges et al. 2010). Die *Parkin*-



Mutanten weisen im nativen Zustand eine höhere mitochondriale Masse auf. Bei einer Behandlung mit dem Pflanzenschutzmittel Paraquat zeigen die Mutanten eine höhere Anzahl an fragmentierten Mitochondrien auf als die Kontroll-Fibroblasten (Grunewald, Voges et al. 2010). Es liegt daher nahe, die aus smNPC differenzierten Neurone auf auffällige Morphologien der Mitochondrien zu überprüfen, da ein fragmentierter Phänotyp auf Probleme bei der Mitophagie und der mitochondrialen Fusion hinweisen kann.

Die Mitochondrien der für mindestens 21 Tage differenzierten SNCA1-, und SNCA2-iPS-Zelllinie weisen keine signifikanten Unterschiede weder beim *Aspect Ratio* noch beim Form Factor zu den Kontrolllinien auf. Auch die später aus den Analysen entfernte Kontrolllinie mit isogener A30P Mutation zeigt keine Auffälligkeiten. Alle Zelllinien weisen einen eher sphärischen Umriss der Mitochondrien auf.

Der Aspect Ratio liegt bei den SNCA Linien 1 und 2 bei 1,76 bzw. 1,68 im Vergleich mit den Kontrolllinien Kontrolle 1 bei 2,06 bzw. Kontrolle 2 bei 1,76. Die isogen mutierte Linie weist mit einem Wert von 1,47 auch keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen auf. Die Ergebnisse deuten jedoch einen Trend an, der auf eine Verkürzung der Mitochondrien hinweist, welcher sich in den Linien mit A30P mutiertem a-Syn manifestiert. Durch Mutationen von a-Syn, bei denen die A53T Mutation die ausgeprägtesten pathologischen Veränderungen bewirkt, wird ein größerer Stress auf die Mitochondrien ausgeübt als beim WT. Dies hat die Fragmentation des mitochondrialen Netzwerks zur Folge (Parihar, Parihar et al. 2009). Die Werte aus iPS-Zellen generierten dN für den *Aspect Ratio*, sind im Vergleich mit anderen Zelltypen wie Fibroblasten, eher gering (Burbulla, Schelling et al. 2010, Krebiehl, Ruckerbauer et al. 2010). Hier finden sich deutlich höhere Werte, die somit auf längere Mitochondrien schließen lassen.

Ein ähnliches Bild kann man auch bei der Verästelung, dem Form Factor der Mitochondrien beobachten. Die Werte der SNCA Linien liegen bei 2,36 bzw. 2,1 und die Kontrollen bei 2,59 und 2,3. Die Kontrolllinie mit A30P Mutation liegt bei 2,14. Alle Zelllinien weisen den gleichen Grad an Interkonnektivität auf. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen, ob nun Kontrolle oder Mutante, schon von vornherein eine gering vernetzte mitochondriale Population haben. Es ist bekannt, dass bei der Synaptogenese und der Ausbildung von Axonen und Dendriten eine Fragmentation der Mitochondrien vorkommt (Li, Okamoto et al. 2004). Ob Synaptogenese oder die Ausbildung von Neuriten hier die Ursache ist, wurde nicht überprüft. Ob die Fragmentation in diesem Stadium der Neurone einen unbekanntem Stressor, wie die Dissoziierung oder der Entzug von

Wachstumsfaktoren zur Ursache hat ist nicht bekannt.

Eine mögliche Ursache für die Unterschiede in diesen Messungen und den bisher publizierten Ergebnissen könnte auch die Wahl des Modells sein. Die Wirkung von  $\alpha$ -Syn auf die Mitochondrien könnte sich erst an einem späteren Zeitpunkt der Krankheitsentwicklung der PK manifestieren. Es wurde gezeigt, dass die Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS-Zellen die Mitochondrien „verjüngt“, aber Schäden in der mitochondrialen DNS erhalten bleiben (Prigione, Hossini et al. 2011). Ob die sphärische mitochondriale Morphologie der hier verwendeten dN auf die konservierten Schäden der mtDNA oder auf das zu geringe Alter der dN in Kultur zurückzuführen ist, ist nicht bekannt. Eine weitere Ursache könnte auch der umgekehrte Fall darstellen. Während des Stammzellstadiums befinden sich die Zellen in einem metabolischen Zustand bei dem die Glykolyse die dominierende Form der ATP-Akquirierung darstellt (Folmes, Nelson et al. 2011), was an den Warburg-Effekt erinnert. Erst bei der Differenzierung schalten die Stammzellen auf oxidative Phosphorylierung um und der oxidative Stress steigt (Yanes, Clark et al. 2010). Um diesen oxidativen Stress entgegenzuwirken wurde das Medium mit Ascorbinsäure versetzt. Ein zusätzlicher Effekt von Ascorbinsäure ist eine höhere Ausbeute an dopaminergen Neuronen (Yan, Studer et al. 2001), jedoch bei einer Langzeit-Überdosierung Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien in Leberzellen von Mäusen nimmt (Feuring, Schultz et al. 2011). Ob dies einen Einfluss auf die Mitochondrien der *in vitro* Modelle hat, ist unbekannt. In den Zellkulturmedien befindet sich neben Ascorbinsäure noch weitere Antioxidantien, die mit den N2- und B27-Supplementen zum Zellkulturmedium hinzugegeben werden. Diese könnten ebenfalls die vermutliche Toxizität gegenüber Mitochondrien kompensieren, in dem sie radikale Sauerstoffspezies abfangen (Ma, Cao et al. 2010). Einige Arbeiten versuchen mitochondriale Phänotypen zu erzeugen indem die Zellkulturbedingungen so verändert werden dass keine Glykolyse mehr stattfindet. Hierbei wird die Glukose im Zellkulturmedium durch Galaktose ersetzt (Narendra, Tanaka et al. 2008, Grunewald, Gegg et al. 2009). Dies soll die Zellen dazu zwingen ihre Energie mittels oxidativer Phosphorylierung anstatt durch Glykolyse zu erzeugen (Marroquin, Hynes et al. 2007). Es wäre daher angebracht die Versuche mit älteren oder künstlich gealterten Kulturen zu wiederholen, bei denen keine Ascorbinsäure als Additiv im späten Stadium der Differenzierung eingesetzt wird. Ein alternativer Ansatz wurde hier vom Labor von Prof. Lorenz Studer geliefert, das mit der Einbringung einer Progerin-Mutation, die auch bei der Progeria vorkommt, die Neurone künstlich altern ließ (Miller, Ganat et al. 2013). Die Symptome der Progeria äußern sich in verfrühtem

Haarausfall, Arterienverkalkung, Kleinwuchs, kraniofaziale Disproportion, Verlust des Unterhaut-Fettgewebes und Osteoporose (DeBusk 1972). Eine Ursache der Progeria ist eine Punktmutation (N265S) im *ZMPSTE24*-Gen, welches das Enzym Zink-Metalloproteinase-Ste-24-homolog (*ZMPSTE24*) codiert (Shackleton, Smallwood et al. 2005). *ZMPSTE24* ist verantwortlich für die Prozessierung von Prälamina A zu Lamin A (Shackleton, Smallwood et al. 2005). Letzteres ist ein Strukturprotein der inneren Zellkernmembran (Lutz, Trujillo et al. 1992). Eine weitere Ursache, die häufiger vorkommt, ist eine Mutation im Locus von *Prälamina A* (Eriksson, Brown et al. 2003). Diese Mutation im Codon 608 verändert das Triplet von GGC in GGT (Eriksson, Brown et al. 2003). Dies hat keine Änderung der Aminosäure Glycin zur Folge, fügt aber eine neue Spleissstelle in die pre-mRNA von *Prälamina A* ein (Reddel and Weiss 2004). Dadurch entsteht eine um 150 Basenpaare verkürzte mRNA und ein um 50 Aminosäuren verkürztes Protein, das Progerin. Progerin besitzt keine Schnittstelle mit der *ZMPSTE24* eine Prozessierung vom Prälamina A zu Lamin A einleiten kann (De Sandre-Giovannoli, Bernard et al. 2003). Progerin wird mittels einer Farnesyl-Gruppe an der Kernmembran verankert und dort normalerweise von *ZMPSTE24* prozessiert und abgespalten (De Sandre-Giovannoli, Bernard et al. 2003). Bleibt Progerin an der Kernmembran verankert, können sich keine freien Lamin A-Ketten bilden und die Zellkerne deformieren sich (De Sandre-Giovannoli, Bernard et al. 2003). Das Mausmodell für Progeria besteht aus einem *ZMPSTE24*-KO, dies hat zur Folge, dass Prälamina A nie prozessiert wird und sich an der Kernmembran anlagert (Fong, Frost et al. 2006). Die frühzeitige Alterung setzt fünf bis zehn Mal schneller ein als bei Menschen ohne Mutation (DeBusk 1972), dies bedeutet, die Neurone müssen ebenfalls mehrere Jahre kultiviert werden bis eventuelle Krankheitsbilder in Erscheinung treten. Die Progeria ist nicht zu verwechseln mit einem schnelleren Metabolismus und zeigt auch im Endstadium der Krankheit kein erhöhtes Auftreten von neurodegenerativen Krankheiten (Brown, Kieras et al. 1985), was sie als Modell für schnelleres Altern ausschließt. Wie effektiv dieser Ansatz das Altern von Neuronen modellieren kann, muss noch gezeigt werden. Die Einbringung einer zweiten Mutation, deren Auswirkung auf die Neurone auch wenig erforscht ist, macht eine klare Abgrenzung zwischen Progeria und der PK eher schwierig. Vor allem wenn noch in Betracht gezogen wird, dass der größte Risikofaktor an der PK zu erkranken das hohe Alter selbst ist. Dies macht es also nahezu unmöglich zu determinieren, ob der Phänotyp von der Progeria, der Parkinson-Mutation oder nur durch das Alter der Zelle hervorgerufen wird. Eine weitere Gefahr besteht darin, dass durch die Manipulation am Genom der Zelle ein

Vorteil des Modells unbewusst verworfen wird. Nämlich die grundlegende Idee der iPS-Zellen, die Mutation in ihrem unveränderten genetischen Hintergrund zu erforschen und somit die Auswirkungen der Mutation zu ergründen. Werden nun neue Mutationen eingebracht können Effekte auftreten, die es schwierig machen, die Ursachen und Wirkungen beider Mutationen voneinander zu trennen.

## ***7.6 Einfluss der A30P a-Syn Mutation auf den mitochondrialen Transport in Neuriten***

Der mitochondriale Transport in den Neuriten ist für das Neuron ein lebenswichtiger Mechanismus. Die Mitochondrien werden von verschiedenen Adaptoren und Rezeptoren an Motorproteine gekoppelt und zu Regionen mit erhöhtem Bedarf an ATP transportiert. Diese Regionen, wie aktive Wachstumskegel (Morris and Hollenbeck 1993), axonale Gabelungen (Ruthel and Hollenbeck 2003), Ranvier'sche Schnürringe (Fabricius, Berthold et al. 1993, Zhang, Ho et al. 2010) sowie pre- und postsynaptische Terminals (Bogan and Cabot 1991, Li, Okamoto et al. 2004) weisen eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien auf.

Wird der mitochondriale Transport in die Neuriten gestört, können die Synapsen nicht mehr ausreichend mit ATP versorgt werden und wichtige Vorgänge, wie der Transport der synaptischen Vesikel (Orlando, Lignani et al. 2014) oder die Aufrechterhaltung des Membranpotentials mittels der Natrium-Kalium-Pumpe (Skou 1957), können nicht stattfinden. Ebenso wichtig ist die Fähigkeit der Mitochondrien  $Ca_{2+}$  in den Synapsen zu puffern (Kunz and Kaiser 1961).  $Ca_{2+}$  ist nicht nur wichtig als „*second Messenger*“, der eine Rolle bei Langzeit-Depression und Potentiation spielt (David and Barrett 2000, Zenisek and Matthews 2000, David and Barrett 2003, Talbot, David et al. 2003, Yang, He et al. 2003), sondern auch bei der Verschmelzung synaptischer Vesikel mit der neuronalen Membran eine wichtige Rolle einnimmt (DeLorenzo and Freedman 1977). Durch diese Mechanismen unterstützen die Mitochondrien die neuronale Transmission (Billups and Forsythe 2002, Medler and Gleason 2002, David and Barrett 2003, Talbot, David et al.

2003) oder bestimmte Formen der synaptischen Plastizität (Levy, Faas et al. 2003, Kang, Tian et al. 2008). Weisen die Synapsen verminderte oder keine Aktivität auf, können diese durch das „complement-System“ markiert und anschließend von Mikroglia abgebaut werden. Dieser Vorgang scheint auch bei Neurodegenerativen Krankheiten aufzutreten (Stevens, Allen et al. 2007). Verliert ein Neuron zu viele Synapsen, wird es von Mikroglia abgebaut (Luo, Ding et al. 2010).

Der mitochondriale Transport in Neuriten könnte durch Anlagerungen von A $\beta$ OP mutiertem a-Syn an das Zytoskelett behindert werden. Versuche zeigten, dass monomeres Aktin nicht von a-Syn gebunden wird, jedoch eine Anlagerung von A $\beta$ OP a-Syn an polymerisierten Aktin stattfindet und eine Tendenz zur Ausbildung von Aktin-Foki aufweist, die einen möglichen Ursprungsort für die Aggregation von a-Syn darstellt (Sousa, Bellani et al. 2009). Ebenso scheint es eine Verbindung von a-Syn und dem Netzwerk aus Mikrotubuli zu geben, welche a-Syn als funktionelles Mikrotubuli-assoziiertes Protein darstellen (Alim, Ma et al. 2004). Eine neuere Arbeit beschreibt den störenden Einfluss von a-Syn Oligomeren auf die Interaktion von Kinesin und Mikrotubuli und wie diese Interaktion die Stabilität, den Zusammenbau und die Transporteigenschaften der Mikrotubuli herabsetzt (Prots, Veber et al. 2013).

Im Gegensatz zu dieser mechanischen Behinderung des Transports kann man auch eine kinetische Behinderung des Transports in Betracht ziehen. Hier wird der Transport der Mitochondrien nicht durch mechanische Blockaden des „Schienensystems“ inhibiert, sondern durch eine mangelnde Versorgung der Motorproteine mit ATP verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass die mutierten Formen von a-Syn das mitochondriale Membranpotential herabsetzten, ebenso die Rate mit der ATP produziert wird (Banerjee, Sinha et al. 2010).

Die Hypothese, dass die a-Syn Ablagerungen am Zytoskelett den Transport der Mitochondrien behindern, kann durch die durchschnittlich zurückgelegte Strecke der Mitochondrien überprüft werden. Diese Hypothese geht davon aus, dass sich alle beweglichen Mitochondrien in einer Zelle annähernd gleich schnell bewegen und aus diesem Grund ein Unterschied durch die Blockade des Zytoskelettes über die zurückgelegte Strecke messbar wird.

Die von den Mitochondrien innerhalb von 5 Minuten zurückgelegte Strecke ist zwischen den Kontrolllinien und den SNCA-Linien annähernd gleich. Die Mitochondrien der Zelllinien Kontrolle 1 und Kontrolle 2 bewegen sich 34 bzw. 24 mm in 5 min was im

Durchschnitt  $29 \pm 5 \mu\text{m}$  ergibt. Die Mitochondrien der Zelllinien mit A30P Mutation bewegen sich 26 bzw. 35  $\mu\text{m}$  und im Durchschnitt  $31 \pm 5 \mu\text{m}$  in 5 min. Die mutierte A30P Kontrolle bewegt sich signifikant weiter als die anderen Linien und liegt bei  $73 \pm 1 \mu\text{m}$  in 5 min. Die zurückgelegte Strecke der Mitochondrien stimmt im Falle der Kontroll- und A30P mutierten-Zelllinien mit bereits publizierten Strecken überein (Morris and Hollenbeck 1993). Die isogen mutierte A30P Kontroll-Zelllinie legt Strecken zurück, die an mitochondrialen Transport in noch wachsenden Neuronen erinnert, da sich die Mitochondrien in noch nicht maturierten Neuronen schneller bewegen und somit größere Strecken zurück legen (Morris and Hollenbeck 1993). Da in den nicht artifiziell veränderten Zellen keine Unterschiede bei der zurückgelegten Strecke messbar sind, kann in diesem Stadium der Neurone nicht von einer Blockade ausgegangen werden. Eventuell sind die Neurone zu jung um Aggregate von  $\alpha$ -Syn mit A30P Mutation zu bilden, die den Transport nachweisbar zu beeinflussen, da die Aggregation von  $\alpha$ -Syn erst in älteren Neuronen auftritt. Es gibt hier zu noch keine Daten an humanen Neuronen, doch Arbeiten an  $\alpha$ -Syn Aggregation in lebenden Ratten konnte ein Auftreten von  $\alpha$ -Syn Aggregaten vier Wochen nach moderater viraler Überexpression zeigen (Dimant, Kalia et al. 2013). Die erhöhte zurückgelegte Strecke des mitochondrialen Transports in der Zelllinie mit isogener A30P Mutation ist mit der zur überprüfenden Hypothese nicht in Einklang zu bringen.

Die durchschnittliche Geschwindigkeit des mitochondrialen Transports in Neuriten zeigt keine Unterschiede zwischen SNCA- und Kontrolllinien auf. Jedoch bewegt sich die isogene A30P Linie deutlich schneller als die anderen Zelllinien. Dies korreliert mit der zurückgelegte Strecke. Man kann annehmen, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit eines Motorproteins mit zu transportierender Ladung in allen Zellen annähernd gleich ist, wenn sich das Protein bewegt und die vom transportierten Mitochondrium zur Verfügung gestellten Menge an ATP konstant ist. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Kontrolllinien liegt bei 4,2 bzw. 3,3  $\mu\text{m}/5\text{s}$  was ein Mittel von  $3,75 \pm 0,5 \mu\text{m}/5\text{s}$  ergibt. Die Linien SNCA 1 und SNCA 2 bewegen sich im Durchschnitt 3,5  $\mu\text{m}/5\text{s}$  bzw. 4,4  $\mu\text{m}/5\text{s}$ . Im Mittel bewegen sich die mutierten Zelllinien  $4,0 \pm 0,4 \mu\text{m}/5\text{s}$ . Dies ist ein nicht signifikanter Unterschied von 6,25 %. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der transportierten Mitochondrien stimmt mit bereits publizierten saltatorischen und bidirektionalen Geschwindigkeiten überein. Diese bewegen sich zwischen 0,32 und 0,91  $\mu\text{m}/\text{s}$  (Morris and Hollenbeck 1995, Macaskill, Rinholm et al. 2009). Die durchschnittliche Geschwindigkeit des mitochondrialen Transports bei der Zelllinie mit isogener A30P Mutation liegt bei  $5,4 \mu\text{m}/5\text{s}$  und ist damit schneller als die Mitochondrien in anderen

Arbeiten (Morris and Hollenbeck 1995, Macaskill, Rinholm et al. 2009).

Die Ergebnisse der Zelllinie mit isogener A30P Mutation weichen von den Ergebnissen der nicht veränderten Zelllinie mit A30P Mutation in den Parametern der zurückgelegten Strecke und durchschnittlicher Geschwindigkeit ab. Diese Unterschiede könnten auch ein unerwünschter Nebeneffekt der artifiziellen Veränderung des Genoms sein. Aus diesem Grund wurde eine DNA-Chip Untersuchung durchgeführt und eine Deletion auf Chromosom 14 entdeckt. Ein Gen welches vollständig von dieser Deletion auf Chromosom 14 betroffen ist, ist *ACTN1*. Dieses Gen exprimiert für das Zytoskelettprotein Aktin. Dies allein kann den Phänotyp der erhöhten Geschwindigkeit des mitochondrialen Transports erklären. Es wurde bereits berichtet, dass die Abwesenheit von Aktin den mitochondrialen Transport beschleunigen kann (Morris and Hollenbeck 1995). Aktin ist ein Interaktionspartner der mitochondrialen Transportmaschinerie und kann so am Zytoskelett in den Neuriten andocken (Chada and Hollenbeck 2004). Es gibt eine interessante Hypothese, diese postuliert, dass Myosin V und VI mit Dynein um das andocken verschiedener Organellen konkurriert, diese somit von den Mikrotubuli entfernt und auf Aktinfilamente platziert (Pathak, Sepp et al. 2010). Gegenwärtige Studien in *D. Melanogaster* zeigen eine erhöhte Geschwindigkeit des mitochondrialen Transports bei „knock-down“ von Myosin V und VI (Pathak, Sepp et al. 2010). Myosin ist ein Motorprotein welches am Aktinzytoskelett bindet und dessen „knock-down“ eine Verlagerung des mitochondrialen Transports auf die Mikrotubuli erzwingt (Pathak, Sepp et al. 2010). Der Transport auf den Mikrotubuli scheint eine höhere Geschwindigkeit zu besitzen als der Transport auf Aktinfilamenten. Die ungenügende Expression von Aktin in den isogen generierten A30P mutierten Neuronen zwingt die Mitochondrien das Netzwerk aus Mikrotubuli zu verwenden, kann die erhöhte durchschnittliche Geschwindigkeit der Mitochondrien und die erhöhte zurückgelegte Strecke erklären. Aufgrund der Deletion auf Chromosom 14 ist die Zelllinie zu verwerfen. Isogene Kontrollen sollten sich in keinem Gen außer der zu untersuchenden Mutation unterscheiden. Der hier gemessene Phänotyp lässt sich alleine auf die Deletion zurückführen die durch die Veränderung des Genoms entstanden ist.

Die Techniken die gegenwärtig zur Veränderung von humanen Genomen zur Verfügung stehen sind die Zink-Finger-Nukleasen (ZNFs) (Carroll 2011), TALENs (Joung and Sander 2013) und die CRISPRs (Jinek, Chylinski et al. 2012). ZNFs weisen eine geringe Spezifität auf (Ramirez, Foley et al. 2008) und verändern so auch Teile des Genoms die nicht

erwünscht sind (Gabriel, Lombardo et al. 2011). Dies macht eine ausführliche Kontrolle des gesamten Genoms unumgänglich, auch wenn es Bemühungen zur Verbesserung deren Spezifität gibt (Doyon, Vo et al. 2011). TALENs weisen im Gegensatz zu den ZFNs zwei entscheidende Vorteile auf. Zum einen kann jedes Labor mit einer minimalen molekularbiologischen Ausrüstung funktionsfähige TALENs selber herstellen und andererseits ermöglichen sie eine automatisierte Hochdurchsatz-Herstellung (Reyon, Tsai et al. 2012). Im Vergleich zu ZNFs, weisen TALENs eine vergleichbare Spezifität auf, wobei sie weniger toxisch wirken (Mussolino, Morbitzer et al. 2011). Auch TALENs stehen im Verdacht nicht zielgerichtete Veränderungen des Genoms herbeiführen. Um ein Bild von den nicht zielgerichteten Veränderungen des Genoms in nicht kodierenden Bereichen zu bekommen, ist eine Sequenzierung des gesamten Genoms nötig (Ding, Lee et al. 2013). Das aus Bakterien stammende CRISPRs sind ein Teil des bakteriellen Immunsystems, welches auf RNS-gelenkten Endonukleasen beruht die fremde DNS-Abschnitte erkennen können (Jinek, Chylinski et al. 2012). Die DNS-Fragmente von vorangehenden viralen Attacken werden als Platzhalter in die Loci der CRISPRs integriert (Jinek, Chylinski et al. 2012). Diese Loci werden dann in crRNA (crRNA) transkribiert und besitzen somit eine spezifische Bindestelle, die komplementär zur viralen DNS ist (Jinek, Chylinski et al. 2012). Die CRISPRs sind gegenüber den TALENs spezifischer (Ding, Regan et al. 2013). Es wird aber diskutiert, ob dies an einer höheren Expressionsrate und niedriger Toxizität liegt (Ding, Regan et al. 2013). Wie alle Werkzeuge zur Veränderung des Genoms weisen auch die CRISPRs nicht zielgerichtete Veränderungen der DNS auf (Fu, Foden et al. 2013). Die Ergebnisse des mitochondrialen Transports sind ein gutes Beispiel dafür, wie schnell eine Zelllinie einen genetischen Defekt durch eine gezielte genetische Veränderungen erhalten kann. Die Interpretation solcher Daten erweist sich dann als schwierig. Werden diese Linien nicht überprüft, können sich schwerwiegende Artefakte in die Messungen einschleichen und so die Ergebnisse und die Interpretation verfälschen.

Der Transport der Mitochondrien ist kalziumabhängig (Yi, Weaver et al. 2004) und bei erhöhten cytosolischen Kalzium-Werten stoppen die Mitochondrien ihre Bewegung. Es gibt zwei Hypothesen wie dies stattfinden könnte. Beim Motor-Miro-Bindungs-Modell binden zwei  $Ca_{2+}$ -Ionen an Miro, das zwei Kalzium-bindende EF-Hände besitzt. Hierdurch bindet das Motorprotein an Miro und löst sich von den Mikrotubuli. Dadurch wird die Bewegung gestoppt (Wang and Schwarz 2009). Die andere Hypothese ist das Motor-Freilassungs-Modell, bei dem durch die  $Ca_{2+}$ -Bindung an Miro das Motorprotein



abgekoppelt wird und das Mitochondrium stoppt (Macaskill, Rinholm et al. 2009). A-Syn weist ebenfalls Verbindungen zur Regulation des intrazellulären Kalziums auf. Einerseits zeigt a-Syn erhöhte Aggregation bei Kontakt mit  $Ca_{2+}$  (Lowe, Pountney et al. 2004) und andererseits scheint es die  $Ca_{2+}$ -homöostase zu regulieren (Belal, Ameli et al. 2012, Cali, Ottolini et al. 2012). Ein Teufelskreis, der in diesen dopaminergen Neuronen, die aus iPS-Zellen differenziert wurden, einen möglichen frühen Phänotypen der a-Syn vermittelten Toxizität hätte sichtbar machen können. Eine verminderte Strecke beim mitochondrialen Transport hätte auf erhöhte Kalziumwerte hinweisen und dies mit bildgebenden  $Ca_{2+}$ -Messungen verifiziert werden können. Mutationen von *Pink1* haben eine Störung im mitochondrialen Transport zur Folge, da *Pink1* die Rho-GTPase Miro reguliert (Liu, Sawada et al. 2012) und somit einen Einfluss auf die Kupplung zwischen den Mitochondrien, Milton und Kinesin aufweist. Eine Verminderung des Transports hätte auch die a-Syn Mutanten und Mutanten von *Pink1* einen Phänotyp teilen lassen und eventuell weitere Parallelen aufgezeigt. Eine womögliche genetische Epistase zwischen *Pink1* und a-Syn im Bereich des mitochondrialen Transports hätten durch gegenseitige „Rescue“-Experimente aufgezeigt werden können.

## **7.7 Zusammenfassung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen zellulären Phänotypen als pathomechanistisch relevantes Modell für die A30P a-Syn Mutation zu identifizieren. Dieser Phänotyp sollte dann mittels genetischer und pharmakologischer Manipulation moduliert werden. Die genetische Modulation dieses Phänotypen hätte mittels viral transduzierter siRNS stattgefunden. Über diesen Ansatz hätten gewisse Interaktionspartner wie TRAP1, SIRT2 oder PLK2 moduliert werden können um mögliche Veränderungen sichtbar zu machen. Die pharmakologische Manipulation des Phänotyps kann mittels Hochdurchsatz-Verfahren, bei denen man komplette Sammlungen verschiedener Kandidaten-Substanzen an den Zelllinien testet, durchgeführt werden. Diese Hochdurchsatz-Verfahren werden gegenwärtig mittels automatisierter Zellkultur bewerkstelligt. Durch diese zukunftsweisende Technik können Versuchsreihen, die sonst Jahre benötigt hätten in wenigen Monaten durchgeführt werden.

Hierfür wurden die Fibroblasten eines Trägers der A30P Mutation zu iPS-Zellen reprogrammiert. Das gleiche geschah mit den Fibroblasten eines altersgleichen und gleichgeschlechtlichen Geschwisterteils, der von der Mutation unbetroffen ist. Alle Zelllinien wurden charakterisiert und deren Stammzellstatus bestätigt.

Da zu Beginn der Versuche die nicht mutierten Fibroblasten des Familienmitgliedes noch nicht zugänglich waren, wurden die Versuche zunächst mit einer alters- und geschlechtsangepassten Kontrollzelllinie durchgeführt. Die Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen und deren weitere Differenzierung zu mittelhirnspezifischen dopaminergen Neuronen wurde belegt. Die hier durchgeführten, funktionellen Versuche konnten die in der gängigen Literatur beschriebenen Phänotypen nicht reproduzieren.

Es ist durchaus möglich, dass der Einfluss von a-Syn auf die Mitochondrien sekundärer Natur ist. Im Falle der mitochondrialen Morphologie gibt es eine Arbeit von Min Zhu et al., in der beschrieben wird, dass a-Syn Überexpression von WT und Mutanten keinen Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien in Hela, SH-SY5Y und PC12 Zellen hat (Zhu, Li et al. 2012). Erklären kann man diese Diskrepanzen nur schwierig. Minimale Änderungen der Protokolle oder der verwendeten Substanzen und Zelllinien können sich aufsummieren und zu signifikanten Unterschieden führen. Deshalb ist es nicht nur in der industriellen Fertigung, sondern auch in der Drittmittel-basierten Wissenschaft unumgänglich, sich auf „*standard operating procedures*“ (SOP eng.: Standardisierte Arbeitsprozesse) zu einigen, von denen keine Abweichungen erlaubt sind. Diese normalisierten Versuche sind dann auch unter verschiedenen Laboren vergleich- und reproduzierbar.

Die Funktion von mutierten a-Syn könnte in humanen Neuronen von der in Neuroblastomzelllinien oder nicht neuronalen Nagerzelllinien abweichen. Die Grundlagenforschung, die an der Entschlüsselung der Funktion von a-Syn arbeitet, zeigen eine grundlegende Tendenz zu einer Rolle in der synaptischen Plastizität, (Cheng, Vivacqua et al. 2011, Tozzi, Costa et al. 2012) oder dem Ausschütten von synaptischen Vesikeln hin (Lee, Kang et al. 2011, Gaugler, Genc et al. 2012). Diese neuronal spezifischen Prozesse sind in nicht neuronalen Zellsystemen nicht vorhanden. In wie weit diese neuronalen Mechanismen in unterschiedlichen, differenzierten Krebszelllinien vorliegen ist nicht bekannt. Ein weiteres nicht zu vernachlässigendes Detail ist, dass in allen Vertebraten unterhalb der Altweltaffen die a-Syn A53T Mutation den Wildtyp darstellt (Hamilton 2004). Es wird diskutiert ob a-Syn eine toxische Funktionsgewinnmutation

darstellt und wie diese sich bei der PK manifestieren. In wie weit die Funktion der a-Syn Mutationen mit der Funktion des nativen a-Syn korreliert bleibt ungeklärt.

Eine weitere Hypothese, wieso publizierte mitochondriale Phänotypen nicht reproduziert werden konnten, ist das Alter der generierten Neurone. Die PK beruhend auf der A30P Mutation, ist sehr variabel und liegt zwischen dem 54. und dem 76. Lebensjahres. Die Veränderung, die sich durch die Mutation ergibt ist in erst 30 Tage alten Neuronen eventuell zu subtil um mit den von uns verwendeten Methoden detektiert zu werden.

Die Reprogrammierung von somatischen Gewebe, welches aus Trägern von genetisch vererbten Krankheiten stammt, verlangt nach Kontrollen, die den gleichen oder ähnlichen genetischen Hintergrund aufweisen sowie aus einem ähnlichen Lebensumfeld kommen. Da bei der PK signifikante epistatische und epigenetische Effekte, die aus dem genetischen Hintergrund der Patienten resultieren, die Penetranz, das Alter bei Ausbruch der Krankheit und das Fortschreiten der Krankheit beeinflussen (Summers 1996, Lees, Hardy et al. 2009). Ebenso können Umwelteinflüsse eine Rolle spielen (Tanner, Chen et al. 1989, Liou, Tsai et al. 1997). Bei transgenen Tiermodellen wird dies durch gesunde Geschwister aus dem selben Wurf gewährleistet, die durch Inzucht wenig genetische Variabilität vorweisen (Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on genetic background in mice. (1997). *Neuron*, 19(4), 755-759). Bei humanen Material ist dies komplizierter, da selbst bei Zwillingen eine gewisse genetische Variabilität auftritt (Bruder, Piotrowski et al. 2008). Gleichgeschlechtliche Geschwister, die nicht die pathogene Mutation teilen und zufälligerweise annähernd das gleiche Alter wie der Patient aufweisen, stellen die Kontrolle mit der niedrigsten genetischen Variabilität bei humanen Material dar. Es ist daher unumgänglich, die gewonnen Zellen aus Patienten und gegebenenfalls den Geschwistern, genetisch so zu manipulieren, dass isogene Kontrollen oder Mutationen entstehen. Wenn eine Mutation durch genetische Manipulation entfernt oder in gesunde Zellen eingefügt wird spricht man von isogenen Kontrollen oder isogenen Mutanten. Dies bedeutet, dass der genetische Hintergrund einer Zelllinie nicht verändert wird, sondern nur der Locus, der bei einer Krankheit eine gewisse Mutation trägt. So kann man die Auswirkung dieser Mutation in einem neuen Zellmodell studieren.

Die Generierung von pluripotenten Stammzellen aus somatischen Zellen hat die Forschung revolutioniert. Besonders das Feld der neurodegenerativen Krankheiten verlässt sich mehr und mehr auf Modelle, die auf iPS-Zellen beruhen. Diese Zellmodelle

eröffnen außerdem neue Möglichkeiten in Hochdurchsatz-Verfahren. Es ist sehr problematisch die nötigen Zellzahlen für diese Verfahren zu gewinnen, besonders bei schwer zu erreichendem Gewebe wie dem ZNS. Besonders die automatisierte Suche nach Stoffen, die potentiell neuroprotektive Funktionen in sich tragen, benötigen ein Zellmodell, das dem betroffenen Gewebe möglichst ähnlich ist. Die Stammzelltechnik erlaubt es diese Tests *in vitro* durchzuführen, da die Stammzellen beliebig expandiert werden können. Die Theorie ist, dass man einen Versuch an einer Zelllinie etabliert, die einen klaren krankheitsspezifischen Phänotypen hervorbringt. Diesen Phänotypen versucht man anschließend durch die Gabe von Kandidaten-Substanzen umzukehren und damit zu revertieren. Ist dieser Versuch an einer Zelllinie mit krankheitsspezifischer Mutation etabliert, kann man auch andere genetische Mutationen dieser Krankheit in anderen Zelllinien testen und überprüfen, ob die von den Kandidaten-Substanzen aktivierten Signalwege miteinander korrelieren. Durch die Daten aus verschiedenen Mutationen und der Funktion der Kandidaten-Substanzen im Organismus kann man dann eine Karte der aktivierten Signalwege erstellen und Gemeinsamkeiten der verschiedenen Mutationen erkennen.

Die Machbarkeit solcher Studien wurde schon bewiesen (Hoing et al., 2012) und es wird große Hoffnung in diese Forschung gesetzt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass hier ein einzigartiges Parkinson-Zellmodell auf Basis von iPS-Zellen mit der A30P  $\alpha$ -Syn Mutation geschaffen wurde, welches den genetischen Hintergrund widerspiegelt in dem die PK mit A30P Mutation auftritt. Zusammen mit isogenen Kontrolllinien bietet dieses System die Möglichkeit nicht nur die pathologischen Auswirkungen der  $\alpha$ -Syn A30P Mutation aufzuklären, sondern könnte auch einen Einblick in die physiologische Funktion von  $\alpha$ -Syn liefern. Kombiniert mit der smNPC Technik, die von Peter Reinhardt et al. entwickelt wurde und neuen Hochdurchsatz-Verfahren haben diese Zelllinien das Potenzial an der Entwicklung von pharmakologisch wirksamen Substanzen gegen die PK beizutragen.

## 8.0 Referenzen

- Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. Banbury Conference on genetic background in mice. (1997). *Neuron*, 19(4), 755-759.
- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., . . . Izpisua Belmonte, J. C. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 26(11), 1276-1284. doi: 10.1038/nbt.1503
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., . . . Rosenthal, A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25(1), 239-252.
- Addis, R. C., Hsu, F. C., Wright, R. L., Dichter, M. A., Coulter, D. A., & Gearhart, J. D. (2011). Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector. *PLoS One*, 6(12), e28719. doi: 10.1371/journal.pone.0028719
- Alim, M. A., Ma, Q. L., Takeda, K., Aizawa, T., Matsubara, M., Nakamura, M., . . . Ueda, K. (2004). Demonstration of a role for alpha-synuclein as a functional microtubule-associated protein. *J Alzheimers Dis*, 6(4), 435-442; discussion 443-439.
- Allendoerfer, K. L., Magnani, J. L., & Patterson, P. H. (1995). FORSE-1, an antibody that labels regionally restricted subpopulations of progenitor cells in the embryonic central nervous system, recognizes the Le(x) carbohydrate on a proteoglycan and two glycolipid antigens. *Mol Cell Neurosci*, 6(4), 381-395. doi: 10.1006/mcne.1995.1029
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., . . . Farrer, M. J. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 28(6), 811-813. doi: 10.1002/mds.25421
- Azeredo da Silveira, S., Schneider, B. L., Cifuentes-Diaz, C., Sage, D., Abbas-Terki, T., Iwatsubo, T., . . . Aebischer, P. (2009). Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 18(5), 872-887. doi: 10.1093/hmg/ddn417
- Bae, E. J., Lee, H. J., Rockenstein, E., Ho, D. H., Park, E. B., Yang, N. Y., . . . Lee, S. J. (2012). Antibody-aided clearance of extracellular alpha-synuclein prevents cell-to-

- cell aggregate transmission. *J Neurosci*, 32(39), 13454-13469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1292-12.2012
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, 8(9), 227. doi: 10.1186/gb-2007-8-9-227
- Banerjee, K., Sinha, M., Pham Cle, L., Jana, S., Chanda, D., Cappai, R., & Chakrabarti, S. (2010). Alpha-synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: implications in Parkinson's disease. *FEBS Lett*, 584(8), 1571-1576. doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.012
- Bartels, T., Choi, J. G., & Selkoe, D. J. (2011). alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, 477(7362), 107-110. doi: 10.1038/nature10324
- Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A., & von Kalle, C. (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*, 101(6), 2099-2114. doi: 10.1182/blood-2002-07-2314
- Belal, C., Ameli, N. J., El Kommos, A., Bezalel, S., Al'Khafaji, A. M., Mughal, M. R., . . . Chan, S. L. (2012). The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum (ER) stress protein Herp counteracts mutant alpha-synuclein-induced ER stress via the homeostatic regulation of ER-resident calcium release channel proteins. *Hum Mol Genet*, 21(5), 963-977. doi: 10.1093/hmg/ddr502
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*, 14(7), 4368-4374.
- Billups, B., & Forsythe, I. D. (2002). Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J Neurosci*, 22(14), 5840-5847. doi: 20026597
- Bogaerts, V., Nuytemans, K., Reumers, J., Pals, P., Engelborghs, S., Pickut, B., . . . Van Broeckhoven, C. (2008). Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease. *Hum Mutat*, 29(6), 832-840. doi: 10.1002/humu.20713
- Bogan, N., & Cabot, J. B. (1991). Light and electron microscopic analyses of intraspinal axon collaterals of sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res*, 541(2), 241-251.
- Boch, J. (2011). TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol*, 29(2), 135-136. doi: 10.1038/nbt.1767

- Bonifacino, J. S., & Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 568-579. doi: 10.1038/nrm1985
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., . . . Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604), 256-259. doi: 10.1126/science.1077209
- Botella, J. A., Bayersdorfer, F., Gmeiner, F., & Schneuwly, S. (2009). Modelling Parkinson's disease in *Drosophila*. *Neuromolecular Med*, 11(4), 268-280. doi: 10.1007/s12017-009-8098-6
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24(2), 197-211.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), 25-36.
- Brown, W. T., Kieras, F. J., Houck, G. E., Jr., Dutkowski, R., & Jenkins, E. C. (1985). A comparison of adult and childhood progerias: Werner syndrome and Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Adv Exp Med Biol*, 190, 229-244.
- Bruder, C. E., Piotrowski, A., Gijbbers, A. A., Andersson, R., Erickson, S., Diaz de Stahl, T., . . . Dumanski, J. P. (2008). Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet*, 82(3), 763-771. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.12.011
- Bruggemann, N., Hagenah, J., Reetz, K., Schmidt, A., Kasten, M., Buchmann, I., . . . Klein, C. (2010). Recessively inherited parkinsonism: effect of ATP13A2 mutations on the clinical and neuroimaging phenotype. *Arch Neurol*, 67(11), 1357-1363. doi: 10.1001/archneurol.2010.281
- Brus, M., Keller, M., & Levy, F. (2013). Temporal features of adult neurogenesis: differences and similarities across mammalian species. *Front Neurosci*, 7, 135. doi: 10.3389/fnins.2013.00135
- Burbulla, L. F., & Kruger, R. (2012). The use of primary human fibroblasts for monitoring mitochondrial phenotypes in the field of Parkinson's disease. *J Vis Exp*(68). doi:

10.3791/4228

- Burbulla, L. F., Schelling, C., Kato, H., Rapaport, D., Voitalla, D., Schiesling, C., . . . Kruger, R. (2010). Dissecting the role of the mitochondrial chaperone mortalin in Parkinson's disease: functional impact of disease-related variants on mitochondrial homeostasis. *Hum Mol Genet*, *19*(22), 4437-4452. doi: 10.1093/hmg/ddq370
- Burchell, V. S., Nelson, D. E., Sanchez-Martinez, A., Delgado-Camprubi, M., Ivatt, R. M., Pogson, J. H., . . . Plun-Favreau, H. (2013). The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci*, *16*(9), 1257-1265. doi: 10.1038/nn.3489
- Burre, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., & Sudhof, T. C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, *329*(5999), 1663-1667. doi: 10.1126/science.1195227
- Burre, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A. T., & Sudhof, T. C. (2013). Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature*, *498*(7453), E4-6; discussion E6-7. doi: 10.1038/nature12125
- Butler, E. K., Voigt, A., Lutz, A. K., Toegel, J. P., Gerhardt, E., Karsten, P., . . . Schulz, J. B. (2012). The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates alpha-Synuclein toxicity. *PLoS Genet*, *8*(2), e1002488. doi: 10.1371/journal.pgen.1002488
- Cai, J., Li, W., Su, H., Qin, D., Yang, J., Zhu, F., . . . Pei, D. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem*, *285*(15), 11227-11234. doi: 10.1074/jbc.M109.086389
- Cali, T., Ottolini, D., Negro, A., & Brini, M. (2012). alpha-Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J Biol Chem*, *287*(22), 17914-17929. doi: 10.1074/jbc.M111.302794
- Canet-Aviles, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., . . . Cookson, M. R. (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*(24), 9103-9108. doi: 10.1073/pnas.0402959101
- Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, *188*(4), 773-782. doi: 10.1534/genetics.111.131433
- Chada, S. R., & Hollenbeck, P. J. (2004). Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol*, *14*(14), 1272-1276. doi: 10.1016/j.cub.2004.07.027



- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H. B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., . . . Sudhof, T. C. (2004). Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(41), 14966-14971. doi: 10.1073/pnas.0406283101
- Chartier-Harlin, M. C., Dachsel, J. C., Vilarino-Guell, C., Lincoln, S. J., LePrete, F., Hulihan, M. M., . . . Farrer, M. J. (2011). Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, *89*(3), 398-406. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.08.009
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., . . . Destee, A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, *364*(9440), 1167-1169. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17103-1
- Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., . . . Zhang, S. C. (2014). Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell*, *14*(6), 796-809. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.004
- Chen, L., & Feany, M. B. (2005). Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nat Neurosci*, *8*(5), 657-663. doi: 10.1038/nn1443
- Cheng, F., Vivacqua, G., & Yu, S. (2011). The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat*, *42*(4), 242-248. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.12.001
- Chesselet, M. F. (2008). In vivo alpha-synuclein overexpression in rodents: a useful model of Parkinson's disease? *Exp Neurol*, *209*(1), 22-27. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.08.006
- Chesselet, M. F., Fleming, S., Mortazavi, F., & Meurers, B. (2008). Strengths and limitations of genetic mouse models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, *14 Suppl 2*, S84-87. doi: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.004
- Chesselet, M. F., Richter, F., Zhu, C., Magen, I., Watson, M. B., & Subramaniam, S. R. (2012). A progressive mouse model of Parkinson's disease: the Thy1-aSyn ("Line 61") mice. *Neurotherapeutics*, *9*(2), 297-314. doi: 10.1007/s13311-012-0104-2
- Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci*, *21*(6), 249-254.
- Cooke, B. M., & Woolley, C. S. (2005). Sexually dimorphic synaptic organization of the

- medial amygdala. *J Neurosci*, 25(46), 10759-10767. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2919-05.2005
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., . . . Lindquist, S. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, 313(5785), 324-328. doi: 10.1126/science.1129462
- Crossley, P. H., Martinez, S., & Martin, G. R. (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature*, 380(6569), 66-68. doi: 10.1038/380066a0
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., & Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*, 305(5688), 1292-1295. doi: 10.1126/science.1101738
- Danzer, K. M., Krebs, S. K., Wolff, M., Birk, G., & Hengerer, B. (2009). Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J Neurochem*, 111(1), 192-203. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06324.x
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A. C., Goodchild, R., Larsen, K. E., . . . Hen, R. (2002). Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), 14524-14529. doi: 10.1073/pnas.172514599
- David, G., & Barrett, E. F. (2000). Stimulation-evoked increases in cytosolic [Ca(2+)] in mouse motor nerve terminals are limited by mitochondrial uptake and are temperature-dependent. *J Neurosci*, 20(19), 7290-7296.
- David, G., & Barrett, E. F. (2003). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol*, 548(Pt 2), 425-438. doi: 10.1113/jphysiol.2002.035196
- Davis, A. F., & Clayton, D. A. (1996). In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *J Cell Biol*, 135(4), 883-893.
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51(6), 987-1000.
- Dawson, T., Mandir, A., & Lee, M. (2002). Animal models of PD: pieces of the same puzzle? *Neuron*, 35(2), 219-222.
- de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5(6), 525-535. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., . . .

- Levy, N. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, 300(5628), 2055. doi: 10.1126/science.1084125
- DeBusk, F. L. (1972). The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr*, 80(4), 697-724.
- DeLorenzo, R. J., & Freedman, S. D. (1977). Calcium-dependent phosphorylation of synaptic vesicle proteins and its possible role in mediating neurotransmitter release and vesicle function. *Biochem Biophys Res Commun*, 77(3), 1036-1043.
- Deng, H., Le, W., Guo, Y., Hunter, C. B., Xie, W., & Jankovic, J. (2005). Genetic and clinical identification of Parkinson's disease patients with LRRK2 G2019S mutation. *Ann Neurol*, 57(6), 933-934. doi: 10.1002/ana.20510
- Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., . . . Lee, S. J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31), 13010-13015. doi: 10.1073/pnas.0903691106
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), 870-879. doi: 10.1038/nrm2275
- DeVay, R. M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L. L., Hoppins, S., Stahlberg, H., & Nunnari, J. (2009). Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol*, 186(6), 793-803. doi: 10.1083/jcb.200906098
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem*, 283(14), 9089-9100. doi: 10.1074/jbc.M710012200
- Devine, M. J., Ryten, M., Vodicka, P., Thomson, A. J., Burdon, T., Houlden, H., . . . Kunath, T. (2011). Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the alpha-synuclein locus. *Nat Commun*, 2, 440. doi: 10.1038/ncomms1453
- Di Fonzo, A., Dekker, M. C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Correia Guedes, L., . . . Bonifati, V. (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 72(3), 240-245. doi: 10.1212/01.wnl.0000338144.10967.2b
- Di Fonzo, A., Tassorelli, C., De Mari, M., Chien, H. F., Ferreira, J., Rohe, C. F., . . . Italian Parkinson's Genetics, Network. (2006). Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet*, 14(3), 322-331. doi:

10.1038/sj.ejhg.5201539

- Dickson, D. W., Braak, H., Duda, J. E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G. M., . . . Litvan, I. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*, *8*(12), 1150-1157. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70238-8
- Dimant, H., Kalia, S. K., Kalia, L. V., Zhu, L. N., Kibuuka, L., Ebrahimi-Fakhari, D., . . . McLean, P. J. (2013). Direct detection of alpha synuclein oligomers in vivo. *Acta Neuropathol Commun*, *1*(1), 6. doi: 10.1186/2051-5960-1-6
- Ding, Q., Lee, Y. K., Schaefer, E. A., Peters, D. T., Veres, A., Kim, K., . . . Cowan, C. A. (2013). A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, *12*(2), 238-251. doi: 10.1016/j.stem.2012.11.011
- Ding, Q., Regan, S. N., Xia, Y., Oostrom, L. A., Cowan, C. A., & Musunuru, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell*, *12*(4), 393-394. doi: 10.1016/j.stem.2013.03.006
- Doherty, P., Dickson, J. G., Flanigan, T. P., & Walsh, F. S. (1984). Quantitative evaluation of neurite outgrowth in cultures of human foetal brain and dorsal root ganglion cells using an enzyme-linked immunoadsorbent assay for human neurofilament protein. *J Neurochem*, *42*(4), 1116-1122.
- Doyon, Y., Vo, T. D., Mendel, M. C., Greenberg, S. G., Wang, J., Xia, D. F., . . . Holmes, M. C. (2011). Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nat Methods*, *8*(1), 74-79. doi: 10.1038/nmeth.1539
- Edvardson, S., Cinnamon, Y., Ta-Shma, A., Shaag, A., Yim, Y. I., Zenvirt, S., . . . Elpeleg, O. (2012). A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One*, *7*(5), e36458. doi: 10.1371/journal.pone.0036458
- El-Agnaf, O. M., Jakes, R., Curran, M. D., Middleton, D., Ingenito, R., Bianchi, E., . . . Wallace, A. (1998). Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett*, *440*(1-2), 71-75.
- Elbaz, A., & Moisan, F. (2008). Update in the epidemiology of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, *21*(4), 454-460. doi: 10.1097/WCO.0bo13e3283050461
- Elbaz, A., & Tranchant, C. (2007). Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, *262*(1-2), 37-44. doi: 10.1016/j.jns.2007.06.024

- Erickson, J. W., & Cline, T. W. (1991). Molecular nature of the *Drosophila* sex determination signal and its link to neurogenesis. *Science*, *251*(4997), 1071-1074.
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., . . . Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, *423*(6937), 293-298. doi: 10.1038/nature01629
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., & Mihara, K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem*, *134*(3), 333-344.
- Evans, A. H., Lawrence, A. D., Potts, J., MacGregor, L., Katzenschlager, R., Shaw, K., . . . Lees, A. J. (2006). Relationship between impulsive sensation seeking traits, smoking, alcohol and caffeine intake, and Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *77*(3), 317-321. doi: 10.1136/jnnp.2005.065417
- Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmstrom, K., Schiesling, C., Gispert, S., . . . Haass, C. (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci*, *27*(45), 12413-12418. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0719-07.2007
- Fabricius, C., Berthold, C. H., & Rydmark, M. (1993). Axoplasmic organelles at nodes of Ranvier. II. Occurrence and distribution in large myelinated spinal cord axons of the adult cat. *J Neurocytol*, *22*(11), 941-954.
- Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, *991*, 1-14.
- Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., . . . Brustle, O. (2012). Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLoS One*, *7*(1), e29597. doi: 10.1371/journal.pone.0029597
- Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D. S., Hulihan, M., . . . Langston, J. W. (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol*, *55*(2), 174-179. doi: 10.1002/ana.10846
- Fasano, C. A., Chambers, S. M., Lee, G., Tomishima, M. J., & Studer, L. (2010). Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *6*(4), 336-347. doi: 10.1016/j.stem.2010.03.001
- Feany, M. B., & Bender, W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, *404*(6776), 394-398. doi: 10.1038/35006074
- Feuring, M., Schultz, A., & Hersemeyer, K. (2011). Long-term, high intake of vitamin C

- decreases size and increases quantity of liver mitochondria in Guinea-pigs. *J Int Med Res*, 39(6), 2330-2334.
- Fleming, S. M., Tetreault, N. A., Mulligan, C. K., Hutson, C. B., Masliah, E., & Chesselet, M. F. (2008). Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Eur J Neurosci*, 28(2), 247-256. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06346.x
- Folmes, C. D., Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D. K., Lindor, J. Z., Dzeja, P. P., . . . Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab*, 14(2), 264-271. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.011
- Fong, L. G., Frost, D., Meta, M., Qiao, X., Yang, S. H., Coffinier, C., & Young, S. G. (2006). A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science*, 311(5767), 1621-1623. doi: 10.1126/science.1124875
- Fornai, F., Schluter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., . . . Sudhof, T. C. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(9), 3413-3418. doi: 10.1073/pnas.0409713102
- Fortin, D. L., Troyer, M. D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M. D., & Edwards, R. H. (2004). Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J Neurosci*, 24(30), 6715-6723. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1594-04.2004
- Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wang, G. J., Pappas, N., Logan, J., MacGregor, R., . . . Zezulkova, I. (1998). Neuropharmacological actions of cigarette smoke: brain monoamine oxidase B (MAO B) inhibition. *J Addict Dis*, 17(1), 23-34. doi: 10.1300/J069v17n01\_03
- Frederick, R. L., & Shaw, J. M. (2007). Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic*, 8(12), 1668-1675. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00644.x
- Freichel, C., Neumann, M., Ballard, T., Muller, V., Woolley, M., Ozmen, L., . . . Kahle, P. J. (2007). Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 28(9), 1421-1435. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.013
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 31(9), 822-826. doi: 10.1038/nbt.2623
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction

of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(8), 348-362.

- Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J. C., Genovese, P., Kaepfel, C., . . . von Kalle, C. (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 29(9), 816-823. doi: 10.1038/nbt.1948
- Gandre-Babbe, S., & van der Blik, A. M. (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 19(6), 2402-2412. doi: 10.1091/mbc.E07-12-1287
- Gasser, T. (2009). Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med*, 11, e22. doi: 10.1017/S1462399409001148
- Gasser, T., Muller-Myhsok, B., Wszolek, Z. K., Oehlmann, R., Calne, D. B., Bonifati, V., . . . Horstmann, R. D. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet*, 18(3), 262-265. doi: 10.1038/ng0398-262
- Gaugler, M. N., Genc, O., Bobela, W., Mohanna, S., Ardah, M. T., El-Agnaf, O. M., . . . Schneider, B. L. (2012). Nigrostriatal overabundance of alpha-synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. *Acta Neuropathol*, 123(5), 653-669. doi: 10.1007/s00401-012-0963-y
- Geldof, A. A. (1995). Nerve-growth-factor-dependent neurite outgrowth assay; a research model for chemotherapy-induced neuropathy. *J Cancer Res Clin Oncol*, 121(11), 657-660.
- George, J. M., Jin, H., Woods, W. S., & Clayton, D. F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron*, 15(2), 361-372.
- Ghosh, D., Sahay, S., Ranjan, P., Salot, S., Mohite, G. M., Singh, P. K., . . . Maji, S. K. (2014). The newly Discovered Parkinson's Disease Associated Finnish Mutation (A53E) Attenuates alpha-Synuclein Aggregation and Membrane Binding. *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi5010365
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Quinn, S. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, 34(4), 521-533.
- Giasson, B. I., Murray, I. V., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament

- assembly. *J Biol Chem*, 276(4), 2380-2386. doi: 10.1074/jbc.M008919200
- Gitler, A. D., Chesi, A., Geddie, M. L., Strathearn, K. E., Hamamichi, S., Hill, K. J., . . . Lindquist, S. (2009). Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet*, 41(3), 308-315. doi: 10.1038/ng.300
- Glater, E. E., Megeath, L. J., Stowers, R. S., & Schwarz, T. L. (2006). Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol*, 173(4), 545-557. doi: 10.1083/jcb.200601067
- Golovko, M. Y., Faergeman, N. J., Cole, N. B., Castagnet, P. I., Nussbaum, R. L., & Murphy, E. J. (2005). Alpha-synuclein gene deletion decreases brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding. *Biochemistry*, 44(23), 8251-8259. doi: 10.1021/bi0502137
- Golovko, M. Y., Rosenberger, T. A., Feddersen, S., Faergeman, N. J., & Murphy, E. J. (2007). Alpha-synuclein gene ablation increases docosahexaenoic acid incorporation and turnover in brain phospholipids. *J Neurochem*, 101(1), 201-211. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04357.x
- Grace, A. A. (1990). Evidence for the functional compartmentalization of spike generating regions of rat midbrain dopamine neurons recorded in vitro. *Brain Res*, 524(1), 31-41.
- Grace, A. A. (1991). Regulation of spontaneous activity and oscillatory spike firing in rat midbrain dopamine neurons recorded in vitro. *Synapse*, 7(3), 221-234. doi: 10.1002/syn.890070307
- Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification and characterization. *Neuroscience*, 10(2), 301-315.
- Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1983). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--3. Evidence for electrotonic coupling. *Neuroscience*, 10(2), 333-348.
- Grace, A. A., & Onn, S. P. (1989). Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci*, 9(10), 3463-3481.
- Grunewald, A., Gegg, M. E., Taanman, J. W., King, R. H., Kock, N., Klein, C., & Schapira, A. H. (2009). Differential effects of PINK1 nonsense and missense mutations on mitochondrial function and morphology. *Exp Neurol*, 219(1), 266-273. doi:



10.1016/j.expneurol.2009.05.027

- Grunewald, A., Voges, L., Rakovic, A., Kasten, M., Vandebona, H., Hemmelmann, C., . . . Klein, C. (2010). Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PLoS One*, *5*(9), e12962. doi: 10.1371/journal.pone.0012962
- Gunawardena, S., & Goldstein, L. S. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron*, *32*(3), 389-401.
- Gunawardena, S., Her, L. S., Bruschi, R. G., Laymon, R. A., Niesman, I. R., Gordesky-Gold, B., . . . Goldstein, L. S. (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron*, *40*(1), 25-40.
- Guo, X., Macleod, G. T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., . . . Zinsmaier, K. E. (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron*, *47*(3), 379-393. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.027
- Hagen, T. M., Yowe, D. L., Bartholomew, J. C., Wehr, C. M., Do, K. L., Park, J. Y., & Ames, B. N. (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(7), 3064-3069.
- Hamilton, B. A. (2004). alpha-Synuclein A53T substitution associated with Parkinson disease also marks the divergence of Old World and New World primates. *Genomics*, *83*(4), 739-742. doi: 10.1016/j.ygeno.2003.09.016
- Harrington, A. J., Hamamichi, S., Caldwell, G. A., & Caldwell, K. A. (2010). *C. elegans* as a model organism to investigate molecular pathways involved with Parkinson's disease. *Dev Dyn*, *239*(5), 1282-1295. doi: 10.1002/dvdy.22231
- Hassoun, R., Puschel, B., & Viebahn, C. (2010). Sox17 expression patterns during gastrulation and early neurulation in the rabbit suggest two sources of endoderm formation. *Cells Tissues Organs*, *191*(2), 68-83. doi: 10.1159/000236044
- Hattori, N., Shimura, H., Kubo, S., Kitada, T., Wang, M., Asakawa, S., . . . Mizuno, Y. (2000). Autosomal recessive juvenile parkinsonism: a key to understanding nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease. *Neuropathology*, *20 Suppl*, S85-90.
- Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M., Valente, E. M., Gilks, W. P., Bhatia, K., Quinn, N., . . . Wood, N. W. (2004). DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *75*(1), 144-145.
- Hernan, M. A., Zhang, S. M., Rueda-deCastro, A. M., Colditz, G. A., Speizer, F. E., &

- Ascherio, A. (2001). Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol*, *50*(6), 780-786.
- Herraiz, T., & Chaparro, C. (2005). Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, *326*(2), 378-386. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.033
- Hicks, A. A., Petursson, H., Jonsson, T., Stefansson, H., Johannsdottir, H. S., Sainz, J., . . . Sveinbjornsdottir, S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *52*(5), 549-555. doi: 10.1002/ana.10324
- Hipfner, D. R., Weigmann, K., & Cohen, S. M. (2002). The bantam gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics*, *161*(4), 1527-1537.
- Hoing, S., Rudhard, Y., Reinhardt, P., Glatza, M., Stehling, M., Wu, G., . . . Scholer, H. R. (2012). Discovery of inhibitors of microglial neurotoxicity acting through multiple mechanisms using a stem-cell-based phenotypic assay. *Cell Stem Cell*, *11*(5), 620-632. doi: 10.1016/j.stem.2012.07.005
- Hollenbeck, P. J. (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci*, *1*, d91-102.
- Huang, J. G., Shen, C. B., Wu, W. B., Ren, J. W., Xu, L., Liu, S., & Yang, Q. (2014). Primary cilia mediate sonic hedgehog signaling to regulate neuronal-like differentiation of bone mesenchymal stem cells for resveratrol induction in vitro. *J Neurosci Res*, *92*(5), 587-596. doi: 10.1002/jnr.23343
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L., & Anderson, K. V. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, *426*(6962), 83-87. doi: 10.1038/nature02061
- Ibanez, P., Lesage, S., Janin, S., Lohmann, E., Durif, F., Destee, A., . . . French Parkinson's Disease Genetics Study, Group. (2009). Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch Neurol*, *66*(1), 102-108. doi: 10.1001/archneurol.2008.555
- Imaizumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Koike, M., Kuzumaki, N., Hayakawa, H., . . . Okano, H. (2012). Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain*, *5*, 35. doi: 10.1186/1756-6606-5-35
- Ingerman, E., Perkins, E. M., Marino, M., Mears, J. A., McCaffery, J. M., Hinshaw, J. E., & Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol*, *170*(7), 1021-1027. doi: 10.1083/jcb.200506078

- Iranzo, A., Santamaria, J., Rye, D. B., Valldeoriola, F., Marti, M. J., Munoz, E., . . . Tolosa, E. (2005). Characteristics of idiopathic REM sleep behavior disorder and that associated with MSA and PD. *Neurology*, *65*(2), 247-252. doi: 10.1212/01.wnl.0000168864.97813.e0
- Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., . . . Goldstein, L. S. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, *482*(7384), 216-220. doi: 10.1038/nature10821
- Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B., & Morris, A. J. (1998). Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*, *37*(14), 4901-4909. doi: 10.1021/bi972776r
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821. doi: 10.1126/science.1225829
- Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(1), 49-55. doi: 10.1038/nrm3486
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, *1*(5), 2406-2415. doi: 10.1038/nprot.2006.356
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., . . . Haass, C. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J*, *29*(20), 3571-3589. doi: 10.1038/emboj.2010.223
- Kang, J. S., Tian, J. H., Pan, P. Y., Zald, P., Li, C., Deng, C., & Sheng, Z. H. (2008). Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell*, *132*(1), 137-148. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.024
- Katzenschlager, R., Head, J., Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Evans, A., Lees, A. J., & Parkinson's Disease Research Group of the United, Kingdom. (2008). Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology*, *71*(7), 474-480. doi: 10.1212/01.wnl.0000310812.43352.66
- Kieper, N., Holmstrom, K. M., Ciceri, D., Fiesel, F. C., Wolburg, H., Ziviani, E., . . . Kruger, R. (2010). Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp Cell Res*, *316*(7), 1213-1224. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.01.005
- Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., . . . Kim, K. S.

- (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4(6), 472-476. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.005
- Kim, J. H., Park, S. M., Kang, M. R., Oh, S. Y., Lee, T. H., Muller, M. T., & Chung, I. K. (2005). Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes Dev*, 19(7), 776-781. doi: 10.1101/gad.1289405
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., . . . Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608. doi: 10.1038/33416
- Klein, C., & Lohmann-Hedrich, K. (2007). Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 20(4), 453-464. doi: 10.1097/WCO.0b013e3281e6692b
- Klein, P., Muller-Rischart, A. K., Motori, E., Schonbauer, C., Schnorrer, F., Winklhofer, K. F., & Klein, R. (2014). Ret rescues mitochondrial morphology and muscle degeneration of Drosophila Pink1 mutants. *EMBO J*, 33(4), 341-355. doi: 10.1002/embj.201284290
- Kleinfeld, D., Kahler, K. H., & Hockberger, P. E. (1988). Controlled outgrowth of dissociated neurons on patterned substrates. *J Neurosci*, 8(11), 4098-4120.
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497), 1717-1721.
- Klucken, J., Outeiro, T. F., Nguyen, P., McLean, P. J., & Hyman, B. T. (2006). Detection of novel intracellular alpha-synuclein oligomeric species by fluorescence lifetime imaging. *FASEB J*, 20(12), 2050-2057. doi: 10.1096/fj.05-5422com
- Kohrmann, M., Haubensak, W., Hemraj, I., Kaether, C., Lessmann, V. J., & Kiebler, M. A. (1999). Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res*, 58(6), 831-835.
- Kordower, J. H. (2014). The prion hypothesis of Parkinson's disease: this hot topic just got hotter. *Mov Disord*, 29(8), 988. doi: 10.1002/mds.25918
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305(5685), 858-862. doi: 10.1126/science.1099793
- Krack, P., Batir, A., Van Blercom, N., Chabardes, S., Fraix, V., Ardouin, C., . . . Pollak, P. (2003). Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 349(20), 1925-1934. doi: 10.1056/NEJMoa035275

- Krebiehl, G., Ruckerbauer, S., Burbulla, L. F., Kieper, N., Maurer, B., Waak, J., . . . Kruger, R. (2010). Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One*, *5*(2), e9367. doi: 10.1371/journal.pone.0009367
- Krebs, C. E., Karkheiran, S., Powell, J. C., Cao, M., Makarov, V., Darvish, H., . . . Paisan-Ruiz, C. (2013). The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat*, *34*(9), 1200-1207. doi: 10.1002/humu.22372
- Krueger, M. J., Singer, T. P., Casida, J. E., & Ramsay, R. R. (1990). Evidence that the blockade of mitochondrial respiration by the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) involves binding at the same site as the respiratory inhibitor, rotenone. *Biochem Biophys Res Commun*, *169*(1), 123-128.
- Kruger, R., Kuhn, W., Leenders, K. L., Sprengelmeyer, R., Muller, T., Voitalla, D., . . . Przuntek, H. (2001). Familial parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology*, *56*(10), 1355-1362.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., . . . Riess, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, *18*(2), 106-108. doi: 10.1038/ng0298-106
- Kumazawa, R., Tomiyama, H., Li, Y., Imamichi, Y., Funayama, M., Yoshino, H., . . . Hattori, N. (2008). Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease. *Arch Neurol*, *65*(6), 802-808. doi: 10.1001/archneur.65.6.802
- Kunz, W., & Kaiser, G. (1961). [On the interaction of oleic acid, serum albumin and calcium ions with liver mitochondria]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, *326*, 17-24.
- Kuwahara, T., Koyama, A., Gengyo-Ando, K., Masuda, M., Kowa, H., Tsunoda, M., . . . Iwatsubo, T. (2006). Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, *281*(1), 334-340. doi: 10.1074/jbc.M504860200
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A., & van der Blik, A. M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*, *4*(5), 815-826.
- Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, A. M., Sirvio, J., Thomas, J. H., Nass, R., . . . Wong, G. (2003). Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem*, *86*(1), 165-172.
- Langston, J. W., & Ballard, P. (1984). Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

- tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, 11(1 Suppl), 160-165.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979-980.
- Langston, J. W., Langston, E. B., & Irwin, I. (1984). MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl*, 100, 49-54.
- Lashuel, H. A., Petre, B. M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R. J., Walz, T., & Lansbury, P. T., Jr. (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol*, 322(5), 1089-1102.
- Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., Tsiaras, W. G., Pezzoli, G., . . . Smith, R. J. (2008). Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 82(4), 822-833. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.01.015
- Lee, F. J., Liu, F., Pristupa, Z. B., & Niznik, H. B. (2001). Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J*, 15(6), 916-926.
- Lee, H. J., Lee, K., & Im, H. (2012). alpha-Synuclein modulates neurite outgrowth by interacting with SPTBN1. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(3), 497-502. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.143
- Lee, H. J., Kang, S. J., Lee, K., & Im, H. (2011). Human alpha-synuclein modulates vesicle trafficking through its interaction with prenylated Rab acceptor protein 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 412(4), 526-531. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.028
- Lee, M. K., Stirling, W., Xu, Y., Xu, X., Qui, D., Mandir, A. S., . . . Price, D. L. (2002). Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13), 8968-8973. doi: 10.1073/pnas.132197599
- Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L., & Youle, R. J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*, 15(11), 5001-5011. doi: 10.1091/mbc.E04-04-0294
- Lees, A. J., Hardy, J., & Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *Lancet*, 373(9680), 2055-2066. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60492-X

- Lemasters, J. J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*, *8*(1), 3-5. doi: 10.1089/rej.2005.8.3
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., . . . Polymeropoulos, M. H. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, *395*(6701), 451-452. doi: 10.1038/26652
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honore, A., Rozas, N., . . . French Parkinson's Disease Genetics Study, Group. (2013). G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol*, *73*(4), 459-471. doi: 10.1002/ana.23894
- Lesage, S., Condroyer, C., Klebe, S., Lohmann, E., Durif, F., Damier, P., . . . French Parkinson's Disease Genetics Study, Group. (2012). EIF4G1 in familial Parkinson's disease: pathogenic mutations or rare benign variants? *Neurobiol Aging*, *33*(9), 2233 e2231-2233 e2235. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.006
- Levy, M., Faas, G. C., Saggau, P., Craigen, W. J., & Sweatt, J. D. (2003). Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*, *278*(20), 17727-17734. doi: 10.1074/jbc.M212878200
- Levy, S., Sutton, G., Ng, P. C., Feuk, L., Halpern, A. L., Walenz, B. P., . . . Venter, J. C. (2007). The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol*, *5*(10), e254. doi: 10.1371/journal.pbio.0050254
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., & Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, *119*(6), 873-887. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.003
- Liani, E., Eyal, A., Avraham, E., Shemer, R., Szargel, R., Berg, D., . . . Engelender, S. (2004). Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, *101*(15), 5500-5505. doi: 10.1073/pnas.0401081101
- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., . . . Xiao, L. (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*, *18*(5), 600-603. doi: 10.1038/cr.2008.51
- Ligon, L. A., & Steward, O. (2000). Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol*, *427*(3), 340-350.
- Liou, H. H., Tsai, M. C., Chen, C. J., Jeng, J. S., Chang, Y. C., Chen, S. Y., & Chen, R. C.

- (1997). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology*, *48*(6), 1583-1588.
- Liu, G., Wang, P., Li, X., Li, Y., Xu, S., Ueda, K., . . . Yu, S. (2013). Alpha-synuclein promotes early neurite outgrowth in cultured primary neurons. *J Neural Transm*, *120*(9), 1331-1343. doi: 10.1007/s00702-013-0999-8
- Liu, S., Sawada, T., Lee, S., Yu, W., Silverio, G., Alapatt, P., . . . Lu, B. (2012). Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet*, *8*(3), e1002537. doi: 10.1371/journal.pgen.1002537
- Liu, X. Z., Xu, X. M., Hu, R., Du, C., Zhang, S. X., McDonald, J. W., . . . Choi, D. W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, *17*(14), 5395-5406.
- Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Prive, G. G., Eisenberg, D., . . . Edwards, R. H. (1992). A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell*, *70*(4), 539-551.
- Longair, M. H., Baker, D. A., & Armstrong, J. D. (2011). Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics*, *27*(17), 2453-2454. doi: 10.1093/bioinformatics/btr390
- Lou, C. H., Shao, A., Shum, E. Y., Espinoza, J. L., Huang, L., Karam, R., & Wilkinson, M. F. (2014). Posttranscriptional control of the stem cell and neurogenic programs by the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Rep*, *6*(4), 748-764. doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.028
- Lowe, R., Pountney, D. L., Jensen, P. H., Gai, W. P., & Voelcker, N. H. (2004). Calcium(II) selectively induces alpha-synuclein annular oligomers via interaction with the C-terminal domain. *Protein Sci*, *13*(12), 3245-3252. doi: 10.1110/ps.04879704
- Lucking, C. B., & Brice, A. (2000). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci*, *57*(13-14), 1894-1908.
- Lucking, C. B., Durr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., . . . European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's, Disease. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*, *342*(21), 1560-1567. doi: 10.1056/NEJM200005253422103
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2012). Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, *338*(6109), 949-953. doi: 10.1126/science.1227157



- Luo, X. G., Ding, J. Q., & Chen, S. D. (2010). Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, *5*, 12. doi: 10.1186/1750-1326-5-12
- Lutz, R. J., Trujillo, M. A., Denham, K. S., Wenger, L., & Sinensky, M. (1992). Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(7), 3000-3004.
- Ma, L., Cao, T. T., Kandpal, G., Warren, L., Fred Hess, J., Seabrook, G. R., & Ray, W. J. (2010). Genome-wide microarray analysis of the differential neuroprotective effects of antioxidants in neuroblastoma cells overexpressing the familial Parkinson's disease alpha-synuclein A53T mutation. *Neurochem Res*, *35*(1), 130-142. doi: 10.1007/s11064-009-0038-1
- Macaskill, A. F., Rinholm, J. E., Twelvetrees, A. E., Arancibia-Carcamo, I. L., Muir, J., Fransson, A., . . . Kittler, J. T. (2009). Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron*, *61*(4), 541-555. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.030
- Maetzler, W., Liepelt, I., & Berg, D. (2009). Progression of Parkinson's disease in the clinical phase: potential markers. *Lancet Neurol*, *8*(12), 1158-1171. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70291-1
- Mak, S. K., Huang, Y. A., Iranmanesh, S., Vangipuram, M., Sundararajan, R., Nguyen, L., . . . Schule, B. (2012). Small molecules greatly improve conversion of human-induced pluripotent stem cells to the neuronal lineage. *Stem Cells Int*, *2012*, 140427. doi: 10.1155/2012/140427
- Marcellini, S., Technau, U., Smith, J. C., & Lemaire, P. (2003). Evolution of Brachyury proteins: identification of a novel regulatory domain conserved within Bilateria. *Dev Biol*, *260*(2), 352-361.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci*, *8*(8), 2804-2815.
- Maroteaux, L., & Scheller, R. H. (1991). The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res*, *11*(3-4), 335-343.
- Marroquin, L. D., Hynes, J., Dykens, J. A., Jamieson, J. D., & Will, Y. (2007). Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol Sci*, *97*(2), 539-547.

doi: 10.1093/toxsci/kfm052

- Mbefo, M. K., Paleologou, K. E., Boucharaba, A., Oueslati, A., Schell, H., Fournier, M., . . . Lashuel, H. A. (2010). Phosphorylation of synucleins by members of the Polo-like kinase family. *J Biol Chem*, *285*(4), 2807-2822. doi: 10.1074/jbc.M109.081950
- Mears, J. A., Lackner, L. L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., & Hinshaw, J. E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*, *18*(1), 20-26. doi: 10.1038/nsmb.1949
- Medler, K., & Gleason, E. L. (2002). Mitochondrial Ca(2+) buffering regulates synaptic transmission between retinal amacrine cells. *J Neurophysiol*, *87*(3), 1426-1439.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J. M., & Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*, *127*(2), 383-395. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.021
- Menzies, R. A., & Gold, P. H. (1971). The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J Biol Chem*, *246*(8), 2425-2429.
- Middleton, E. R., & Rhoades, E. (2010). Effects of curvature and composition on alpha-synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys J*, *99*(7), 2279-2288. doi: 10.1016/j.bpj.2010.07.056
- Miller, D. W., Hague, S. M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M. R., & Singleton, A. B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*, *62*(10), 1835-1838.
- Millet, S., Bloch-Gallego, E., Simeone, A., & Alvarado-Mallart, R. M. (1996). The caudal limit of Otx2 gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts. *Development*, *122*(12), 3785-3797.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, *113*(5), 631-642.
- Morris, R. L., & Hollenbeck, P. J. (1993). The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci*, *104* ( Pt 3), 917-927.
- Morris, R. L., & Hollenbeck, P. J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol*, *131*(5), 1315-1326.
- Murphy, M. P., Krueger, M. J., Sablin, S. O., Ramsay, R. R., & Singer, T. P. (1995). Inhibition of complex I by hydrophobic analogues of N-methyl-4-phenylpyridinium

- (MPP+) and the use of an ion-selective electrode to measure their accumulation by mitochondria and electron-transport particles. *Biochem J*, 306 ( Pt 2), 359-365.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., & Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*, 39(21), 9283-9293. doi: 10.1093/nar/gkr597
- Mytilineou, C., Walker, R. H., JnoBaptiste, R., & Olanow, C. W. (2003). Levodopa is toxic to dopamine neurons in an in vitro but not an in vivo model of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(2), 792-800. doi: 10.1124/jpet.102.042267
- Nakamura, K., Christine, C. W., Starr, P. A., & Marks, W. J., Jr. (2007). Effects of unilateral subthalamic and pallidal deep brain stimulation on fine motor functions in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 22(5), 619-626. doi: 10.1002/mds.21300
- Nakayama, K., Suzuki, Y., & Yazawa, I. (2012). Binding of neuronal alpha-synuclein to beta-III tubulin and accumulation in a model of multiple system atrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 417(4), 1170-1175. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.092
- Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., . . . Singleton, A. B. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 46(9), 989-993. doi: 10.1038/ng.3043
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183(5), 795-803. doi: 10.1083/jcb.200809125
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., . . . Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*, 8(1), e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298
- Nguyen, H. N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., . . . Pera, R. R. (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*, 8(3), 267-280. doi: 10.1016/j.stem.2011.01.013
- Nishioka, K., Hayashi, S., Farrer, M. J., Singleton, A. B., Yoshino, H., Imai, H., . . . Hattori, N. (2006). Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 59(2), 298-309. doi: 10.1002/ana.20753
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24(4), 372-

376. doi: 10.1038/74199

- Norris, E. H., Giasson, B. I., Hodara, R., Xu, S., Trojanowski, J. Q., Ischiropoulos, H., & Lee, V. M. (2005). Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J Biol Chem*, *280*(22), 21212-21219. doi: 10.1074/jbc.M412621200
- Nussbaum, R. L., & Polymeropoulos, M. H. (1997). Genetics of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, *6*(10), 1687-1691.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, *322*(5903), 949-953. doi: 10.1126/science.1164270
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., & Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, *278*(10), 7743-7746. doi: 10.1074/jbc.C200677200
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., . . . Belenguer, P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*, *523*(1-3), 171-176.
- Orlando, M., Lignani, G., Maragliano, L., Fassio, A., Onofri, F., Baldelli, P., . . . Benfenati, F. (2014). Functional role of ATP binding to synapsin I in synaptic vesicle trafficking and release dynamics. *J Neurosci*, *34*(44), 14752-14768. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1093-14.2014
- Oueslati, A., Fournier, M., & Lashuel, H. A. (2010). Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Prog Brain Res*, *183*, 115-145. doi: 10.1016/S0079-6123(10)83007-9
- Paisan-Ruiz, C., Bhatia, K. P., Li, A., Hernandez, D., Davis, M., Wood, N. W., . . . Schneider, S. A. (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol*, *65*(1), 19-23. doi: 10.1002/ana.21415
- Paleologou, K. E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C. C., Kim, H. Y., Lamberto, G. R., . . . Lashuel, H. A. (2010). Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J Neurosci*, *30*(9), 3184-3198. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010

- Paleologou, K. E., Schmid, A. W., Rospigliosi, C. C., Kim, H. Y., Lamberto, G. R., Fredenburg, R. A., . . . Lashuel, H. A. (2008). Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *J Biol Chem*, *283*(24), 16895-16905. doi: 10.1074/jbc.M800747200
- Pankratz, N., Nichols, W. C., Uniacke, S. K., Halter, C., Murrell, J., Rudolph, A., . . . Parkinson Study, Group. (2003). Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet*, *12*(20), 2599-2608. doi: 10.1093/hmg/ddg270
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2009). Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(10), 2015-2024. doi: 10.1016/j.biocel.2009.05.008
- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., . . . Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, *134*(5), 877-886. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.041
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, *14*(2), 223-236; discussion 222.
- Parker, W. D., Jr., Boyson, S. J., & Parks, J. K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, *26*(6), 719-723. doi: 10.1002/ana.410260606
- Parkhurst, S. M., Bopp, D., & Ish-Horowicz, D. (1990). X:A ratio, the primary sex-determining signal in *Drosophila*, is transduced by helix-loop-helix proteins. *Cell*, *63*(6), 1179-1191.
- Parone, P. A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D. I., Maechler, P., . . . Martinou, J. C. (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One*, *3*(9), e3257. doi: 10.1371/journal.pone.0003257
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., . . . Paetau, A. (2014). A novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging*, *35*(9), 2180 e2181-2185. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024
- Pathak, D., Sepp, K. J., & Hollenbeck, P. J. (2010). Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria. *J Neurosci*, *30*(26), 8984-8992. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1621-10.2010

- Payne, N. L., Sylvain, A., O'Brien, C., Herszfeld, D., Sun, G., & Bernard, C. C. (2014). Application of human induced pluripotent stem cells for modeling and treating neurodegenerative diseases. *N Biotechnol.* doi: 10.1016/j.nbt.2014.05.001
- Pennisi, E. (2013). The CRISPR craze. *Science*, *341*(6148), 833-836. doi: 10.1126/science.341.6148.833
- Perry, G. H., Yang, F., Marques-Bonet, T., Murphy, C., Fitzgerald, T., Lee, A. S., . . . Redon, R. (2008). Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees. *Genome Res*, *18*(11), 1698-1710. doi: 10.1101/gr.082016.108
- Pesah, Y., Burgess, H., Middlebrooks, B., Ronningen, K., Prosser, J., Tirunagaru, V., . . . Mardon, G. (2005). Whole-mount analysis reveals normal numbers of dopaminergic neurons following misexpression of alpha-Synuclein in *Drosophila*. *Genesis*, *41*(4), 154-159. doi: 10.1002/gene.20106
- Petkov, S., Hyttel, P., & Niemann, H. (2014). The small molecule inhibitors PDO325091 and CHIR99021 reduce expression of pluripotency-related genes in putative porcine induced pluripotent stem cells. *Cell Rerogram*, *16*(4), 235-240. doi: 10.1089/cell.2014.0010
- Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L., & Melki, R. (2012). Fibrillar alpha-synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells. *Biophys J*, *102*(12), 2894-2905. doi: 10.1016/j.bpj.2012.04.050
- Pinto, D., Marshall, C., Feuk, L., & Scherer, S. W. (2007). Copy-number variation in control population cohorts. *Hum Mol Genet*, *16 Spec No. 2*, R168-173. doi: 10.1093/hmg/ddm241
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., . . . Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, *276*(5321), 2045-2047.
- Potten, C. S., Wilson, J. W., & Booth, C. (1997). Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells*, *15*(2), 82-93. doi: 10.1002/stem.150082
- Priddle, T. H., & Crow, T. J. (2013). Protocadherin 11X/Y a human-specific gene pair: an immunohistochemical survey of fetal and adult brains. *Cereb Cortex*, *23*(8), 1933-1941. doi: 10.1093/cercor/bhs181
- Prigione, A., Hossini, A. M., Lichtner, B., Serin, A., Fauler, B., Megges, M., . . . Adjaye, J. (2011). Mitochondrial-associated cell death mechanisms are reset to an embryonic-like state in aged donor-derived iPS cells harboring chromosomal aberrations. *PLoS*

*One*, 6(11), e27352. doi: 10.1371/journal.pone.0027352

- Prots, I., Veber, V., Brey, S., Campioni, S., Buder, K., Riek, R., . . . Winner, B. (2013). alpha-Synuclein oligomers impair neuronal microtubule-kinesin interplay. *J Biol Chem*, 288(30), 21742-21754. doi: 10.1074/jbc.M113.451815
- Proukakis, C., Dudzik, C. G., Brier, T., MacKay, D. S., Cooper, J. M., Millhauser, G. L., . . . Schapira, A. H. (2013). A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*, 80(11), 1062-1064. doi: 10.1212/WNL.ob013e31828727ba
- Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., . . . Kubisch, C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*, 38(10), 1184-1191. doi: 10.1038/ng1884
- Ramirez, C. L., Foley, J. E., Wright, D. A., Muller-Lerch, F., Rahman, S. H., Cornu, T. I., . . . Joung, J. K. (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods*, 5(5), 374-375. doi: 10.1038/nmeth0508-374
- Reddel, C. J., & Weiss, A. S. (2004). Lamin A expression levels are unperturbed at the normal and mutant alleles but display partial splice site selection in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet*, 41(9), 715-717. doi: 10.1136/jmg.2004.019323
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., . . . Hurles, M. E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), 444-454. doi: 10.1038/nature05329
- Reinhardt, P., Glatza, M., Hemmer, K., Tsytsyura, Y., Thiel, C. S., Hoing, S., . . . Sternecker, J. (2013). Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. *PLoS One*, 8(3), e59252. doi: 10.1371/journal.pone.0059252
- Reinhardt, P., Schmid, B., Burbulla, L. F., Schondorf, D. C., Wagner, L., Glatza, M., . . . Sternecker, J. (2013). Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell Stem Cell*, 12(3), 354-367. doi: 10.1016/j.stem.2013.01.008
- Renkawek, K., Stege, G. J., & Bosman, G. J. (1999). Dementia, gliosis and expression of the small heat shock proteins hsp27 and alpha B-crystallin in Parkinson's disease. *Neuroreport*, 10(11), 2273-2276.
- Reyon, D., Tsai, S. Q., Khayter, C., Foden, J. A., Sander, J. D., & Joung, J. K. (2012). FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*,

30(5), 460-465. doi: 10.1038/nbt.2170

- Rice, S. E., & Gelfand, V. I. (2006). Paradigm lost: milton connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria. *J Cell Biol*, 173(4), 459-461. doi: 10.1083/jcb.200604071
- Robotta, M., Braun, P., van Rooijen, B., Subramaniam, V., Huber, M., & Drescher, M. (2011). Direct evidence of coexisting horseshoe and extended helix conformations of membrane-bound alpha-synuclein. *Chemphyschem*, 12(2), 267-269. doi: 10.1002/cphc.201000815
- Ruthel, G., & Hollenbeck, P. J. (2003). Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. *J Neurosci*, 23(24), 8618-8624.
- Salomon, D. S., Bianco, C., & De Santis, M. (1999). Cripto: a novel epidermal growth factor (EGF)-related peptide in mammary gland development and neoplasia. *Bioessays*, 21(1), 61-70. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<61::AID-BIES8>3.0.CO;2-H
- Sampaio-Marques, B., Felgueiras, C., Silva, A., Rodrigues, M., Tenreiro, S., Franssens, V., . . . Ludovico, P. (2012). SNCA (alpha-synuclein)-induced toxicity in yeast cells is dependent on sirtuin 2 (Sir2)-mediated mitophagy. *Autophagy*, 8(10), 1494-1509. doi: 10.4161/auto.21275
- Sanchez-Danes, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jimenez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., . . . Raya, A. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med*, 4(5), 380-395. doi: 10.1002/emmm.201200215
- Sano, M., Kato, K., Totsuka, T., & Katoh-Semba, R. (1988). A convenient bioassay for NGF using a new subline of PC12 pheochromocytoma cells (PC12D). *Brain Res*, 459(2), 404-406.
- Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., . . . Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41(12), 1303-1307. doi: 10.1038/ng.485
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54(3), 823-827.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019



- Schneider, L., Clement, C. A., Teilmann, S. C., Pazour, G. J., Hoffmann, E. K., Satir, P., & Christensen, S. T. (2005). PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Curr Biol*, *15*(20), 1861-1866. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.012
- Schondorf, D. C., Aureli, M., McAllister, F. E., Hindley, C. J., Mayer, F., Schmid, B., . . . Deleidi, M. (2014). iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat Commun*, *5*, 4028. doi: 10.1038/ncomms5028
- Sciarretta, C., & Minichiello, L. (2010). The preparation of primary cortical neuron cultures and a practical application using immunofluorescent cytochemistry. *Methods Mol Biol*, *633*, 221-231. doi: 10.1007/978-1-59745-019-5\_16
- Selkoe, D., Dettmer, U., Luth, E., Kim, N., Newman, A., & Bartels, T. (2014). Defining the native state of alpha-synuclein. *Neurodegener Dis*, *13*(2-3), 114-117. doi: 10.1159/000355516
- Shackleton, S., Smallwood, D. T., Clayton, P., Wilson, L. C., Agarwal, A. K., Garg, A., & Trembath, R. C. (2005). Compound heterozygous ZMPSTE24 mutations reduce prelamin A processing and result in a severe progeroid phenotype. *J Med Genet*, *42*(6), e36. doi: 10.1136/jmg.2004.029751
- Sharma, M., Burre, J., & Sudhof, T. C. (2011). CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol*, *13*(1), 30-39. doi: 10.1038/ncb2131
- Shendelman, S., Jonason, A., Martinat, C., Leete, T., & Abeliovich, A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol*, *2*(11), e362. doi: 10.1371/journal.pbio.0020362
- Sherer, T. B., Betarbet, R., & Greenamyre, J. T. (2002). Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist*, *8*(3), 192-197.
- Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y., & Pei, D. (2006). Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, *281*(33), 23319-23325. doi: 10.1074/jbc.M601811200
- Shin, J. H., Ko, H. S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y. I., Pletinkova, O., . . . Dawson, T. M. (2011). PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*, *144*(5), 689-702. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.010
- Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z. J., Lough, J. W., & Duncan, S. A. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient

- transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol*, 10, 81. doi: 10.1186/1471-213X-10-81
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., . . . Walz, G. (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet*, 37(5), 537-543. doi: 10.1038/ng1552
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., . . . Gwinn-Hardy, K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*, 302(5646), 841. doi: 10.1126/science.1090278
- Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta*, 23(2), 394-401.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., . . . Jaenisch, R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 136(5), 964-977. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.013
- Somers, A., Jean, J. C., Sommer, C. A., Omari, A., Ford, C. C., Mills, J. A., . . . Kotton, D. N. (2010). Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, 28(10), 1728-1740. doi: 10.1002/stem.495
- Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, 27(3), 543-549. doi: 10.1634/stemcells.2008-1075
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G., & Chan, D. C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell*, 20(15), 3525-3532. doi: 10.1091/mbc.E09-03-0252
- Sousa, V. L., Bellani, S., Giannandrea, M., Yousuf, M., Valtorta, F., Meldolesi, J., & Chieregatti, E. (2009). {alpha}-synuclein and its A30P mutant affect actin cytoskeletal structure and dynamics. *Mol Biol Cell*, 20(16), 3725-3739. doi: 10.1091/mbc.E08-03-0302
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6469-6473.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840. doi:

10.1038/42166

- Srikanth, P., & Young-Pearse, T. L. (2014). Stem cells on the brain: modeling neurodevelopmental and neurodegenerative diseases using human induced pluripotent stem cells. *J Neurogenet*, 28(1-2), 5-29. doi: 10.3109/01677063.2014.881358
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., . . . Barres, B. A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131(6), 1164-1178. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036
- Strauss, K. M., Martins, L. M., Plun-Favreau, H., Marx, F. P., Kautzmann, S., Berg, D., . . . Kruger, R. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 14(15), 2099-2111. doi: 10.1093/hmg/ddi215
- Summers, K. M. (1996). Relationship between genotype and phenotype in monogenic diseases: relevance to polygenic diseases. *Hum Mutat*, 7(4), 283-293. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1996)7:4<283::AID-HUMU1>3.0.CO;2-A
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takenouchi, T., Hashimoto, M., Hsu, L. J., Mackowski, B., Rockenstein, E., Mallory, M., & Masliah, E. (2001). Reduced neuritic outgrowth and cell adhesion in neuronal cells transfected with human alpha-synuclein. *Mol Cell Neurosci*, 17(1), 141-150. doi: 10.1006/mcne.2000.0923
- Talbot, J. D., David, G., & Barrett, E. F. (2003). Inhibition of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake affects phasic release from motor terminals differently depending on external [Ca<sup>2+</sup>]. *J Neurophysiol*, 90(1), 491-502. doi: 10.1152/jn.00012.2003
- Tanner, C. M., Chen, B., Wang, W., Peng, M., Liu, Z., Liang, X., . . . Schoenberg, B. S. (1989). Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in China. *Neurology*, 39(5), 660-664.
- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., . . . Langston, J. W. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*, 119(6), 866-872. doi: 10.1289/ehp.1002839
- Tenreiro, S., & Outeiro, T. F. (2010). Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Res*, 10(8), 970-979. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x
- Tofaris, G. K., Kim, H. T., Hourez, R., Jung, J. W., Kim, K. P., & Goldberg, A. L. (2011). Ubiquitin ligase Nedd4 promotes alpha-synuclein degradation by the endosomal-

- lysosomal pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(41), 17004-17009. doi: 10.1073/pnas.1109356108
- Tole, S., & Patterson, P. H. (1995). Regionalization of the developing forebrain: a comparison of FORSE-1, Dlx-2, and BF-1. *J Neurosci*, 15(2), 970-980.
- Tozzi, A., Costa, C., Siliquini, S., Tantucci, M., Picconi, B., Kurz, A., . . . Calabresi, P. (2012). Mechanisms underlying altered striatal synaptic plasticity in old A53T-alpha synuclein overexpressing mice. *Neurobiol Aging*, 33(8), 1792-1799. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.002
- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Miller, M. A., & Masliah, E. (2008). Mechanism of alpha-synuclein oligomerization and membrane interaction: theoretical approach to unstructured proteins studies. *Nanomedicine*, 4(4), 350-357. doi: 10.1016/j.nano.2008.05.005
- Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., . . . Okano, M. (2006). Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells*, 11(7), 805-814. doi: 10.1111/j.1365-2443.2006.00984.x
- Twig, G., Hyde, B., & Shirihai, O. S. (2008). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta*, 1777(9), 1092-1097. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.05.001
- Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., . . . Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 11282-11286.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., . . . Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158-1160. doi: 10.1126/science.1096284
- Vilarino-Guell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., . . . Farrer, M. J. (2014). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 23(7), 1794-1801. doi: 10.1093/hmg/ddt570
- Vilarino-Guell, C., Wider, C., Ross, O. A., Dachselt, J. C., Kachergus, J. M., Lincoln, S. J., . . . Farrer, M. J. (2011). VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89(1), 162-167. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.001
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., & Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem*, 283(35), 23542-23556. doi: 10.1074/jbc.M801992200

- Wallingford, J. B., & Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*, *132*(20), 4421-4436. doi: 10.1242/dev.02068
- Wang, W., Perovic, I., Chittuluru, J., Kaganovich, A., Nguyen, L. T., Liao, J., . . . Hoang, Q. Q. (2011). A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(43), 17797-17802. doi: 10.1073/pnas.1113260108
- Wang, X., & Schwarz, T. L. (2009). The mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell*, *136*(1), 163-174. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.046
- Washbourne, P., & McAllister, A. K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol*, *12*(5), 566-573.
- Wechsler-Reya, R. J., & Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, *22*(1), 103-114.
- Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem*, *283*(20), 13501-13505. doi: 10.1074/jbc.R800011200
- Wheatley, D. N., Wang, A. M., & Strugnell, G. E. (1996). Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol Int*, *20*(1), 73-81. doi: 10.1006/cbir.1996.0011
- Wilson, N. D., Ross, L. J., Close, J., Mott, R., Crow, T. J., & Volpi, E. V. (2007). Replication profile of PCDH11X and PCDH11Y, a gene pair located in the non-pseudoautosomal homologous region Xq21.3/Yp11.2. *Chromosome Res*, *15*(4), 485-498. doi: 10.1007/s10577-007-1153-y
- Wong, K. K., deLeeuw, R. J., Dosanjh, N. S., Kimm, L. R., Cheng, Z., Horsman, D. E., . . . Lam, W. L. (2007). A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet*, *80*(1), 91-104. doi: 10.1086/510560
- Wood, H. (2014). Parkinson disease: A monoclonal antibody targeting misfolded alpha-synuclein has therapeutic potential in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. doi: 10.1038/nrneurol.2014.119
- Wu, Y., Ai, Z., Yao, K., Cao, L., Du, J., Shi, X., . . . Zhang, Y. (2013). CHIR99021 promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells by modulation of protein-encoding gene and long intergenic non-coding RNA expression. *Exp Cell Res*, *319*(17), 2684-2699. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.08.027
- Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., & Givol, D. (2010). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, *394*(1), 189-193. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.150

- Yamagata, M., Weiner, J. A., & Sanes, J. R. (2002). Sidekicks: synaptic adhesion molecules that promote lamina-specific connectivity in the retina. *Cell*, *110*(5), 649-660.
- Yan, J., Studer, L., & McKay, R. D. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem*, *76*(1), 307-311.
- Yanes, O., Clark, J., Wong, D. M., Patti, G. J., Sanchez-Ruiz, A., Benton, H. P., . . . Siuzdak, G. (2010). Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol*, *6*(6), 411-417. doi: 10.1038/nchembio.364
- Yang, F., He, X. P., Russell, J., & Lu, B. (2003). Ca<sup>2+</sup> influx-independent synaptic potentiation mediated by mitochondrial Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and protein kinase C. *J Cell Biol*, *163*(3), 511-523. doi: 10.1083/jcb.200307027
- Yang, Y., Gehrke, S., Haque, M. E., Imai, Y., Kosek, J., Yang, L., . . . Lu, B. (2005). Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(38), 13670-13675. doi: 10.1073/pnas.0504610102
- Yang, Y. W., & Hsieh, Y. C. (2001). Protamine sulfate enhances the transduction efficiency of recombinant adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Pharm Res*, *18*(7), 922-927.
- Yavich, L., Jakala, P., & Tanila, H. (2006). Abnormal compartmentalization of norepinephrine in mouse dentate gyrus in alpha-synuclein knockout and A30P transgenic mice. *J Neurochem*, *99*(3), 724-732. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04098.x
- Yavich, L., Tanila, H., Vepsalainen, S., & Jakala, P. (2004). Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J Neurosci*, *24*(49), 11165-11170. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2559-04.2004
- Ye, S., Tan, L., Yang, R., Fang, B., Qu, S., Schulze, E. N., . . . Li, P. (2012). Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains. *PLoS One*, *7*(4), e35892. doi: 10.1371/journal.pone.0035892
- Yeger-Lotem, E., Riva, L., Su, L. J., Gitler, A. D., Cashikar, A. G., King, O. D., . . . Fraenkel, E. (2009). Bridging high-throughput genetic and transcriptional data reveals cellular responses to alpha-synuclein toxicity. *Nat Genet*, *41*(3), 316-323. doi: 10.1038/ng.337
- Yeyeodu, S. T., Witherspoon, S. M., Gilyazova, N., & Ibeanu, G. C. (2010). A rapid,

- inexpensive high throughput screen method for neurite outgrowth. *Curr Chem Genomics*, 4, 74-83. doi: 10.2174/1875397301004010074
- Yi, M., Weaver, D., & Hajnoczky, G. (2004). Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol*, 167(4), 661-672. doi: 10.1083/jcb.200406038
- Youle, R. J., & Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8), 657-663. doi: 10.1038/nrm1697
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), 9-14. doi: 10.1038/nrm3028
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., . . . de Yebenes, J. G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*, 55(2), 164-173. doi: 10.1002/ana.10795
- Zeitelhofer, M., Vessey, J. P., Xie, Y., Tubing, F., Thomas, S., Kiebler, M., & Dahm, R. (2007). High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc*, 2(7), 1692-1704. doi: 10.1038/nprot.2007.226
- Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeberle, A. M., Demais, V., . . . Vitale, N. (2007). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem*, 282(30), 21746-21757. doi: 10.1074/jbc.M702968200
- Zenisek, D., & Matthews, G. (2000). The role of mitochondria in presynaptic calcium handling at a ribbon synapse. *Neuron*, 25(1), 229-237.
- Zhang, C. L., Ho, P. L., Kintner, D. B., Sun, D., & Chiu, S. Y. (2010). Activity-dependent regulation of mitochondrial motility by calcium and Na/K-ATPase at nodes of Ranvier of myelinated nerves. *J Neurosci*, 30(10), 3555-3566. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4551-09.2010
- Zhang, W. Y., de Almeida, P. E., & Wu, J. C. (2008). Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research *StemBook*. Cambridge (MA).
- Zhou, W., & Freed, C. R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27(11), 2667-2674. doi: 10.1002/stem.201
- Zhu, M., Li, W., & Lu, C. (2012). Role of alpha-synuclein protein levels in mitochondrial morphology and cell survival in cell lines. *PLoS One*, 7(4), e36377. doi: 10.1371/journal.pone.0036377

- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., . . . Gasser, T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, *44*(4), 601-607. doi: 10.1016/j.neuron.2004.11.005
- Zinyk, D. L., Mercer, E. H., Harris, E., Anderson, D. J., & Joyner, A. L. (1998). Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr Biol*, *8*(11), 665-668.
- Ziv, I., Zilkha-Falb, R., Offen, D., Shirvan, A., Barzilai, A., & Melamed, E. (1997). Levodopa induces apoptosis in cultured neuronal cells--a possible accelerator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease? *Mov Disord*, *12*(1), 17-23. doi: 10.1002/mds.870120105
- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G., & Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*, *130*(21), 5155-5167. doi: 10.1242/dev.00723