

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München

Molekulare Charakterisierung der neuroprotektiven Wirkung transmembraner Proteine der
TM9-Superfamilie und der TMEFF-Proteine

Anne Katharina Gisela Wiegand

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel
2. Univ.-Prof. Dr. Th. Korn

Die Dissertation wurde am 15.07.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zielsetzung der Arbeit.....	4
1. Problemstellung	5
1.1 Morbus Parkinson: Inzidenz und Prävalenz	5
1.2 Diagnose, Klinik und Risikofaktoren	6
1.3 Therapie des Morbus Parkinson	8
1.4 Pathologie des Morbus Parkinson	14
2. Physiologie und Pathophysiologie der Substantia nigra	15
2.1 Physiologie der Substantia nigra	15
2.2 Pathophysiologie der Substantia nigra	17
2.3: Theorien zum Untergang der Neurone der Substantia nigra	19
3. TM9SF1	23
4. TMEFF1	25
4.1 gliale Tumore	25
4.2 TMEFF-Proteine	27
4.3 EGF-Rezeptor Familie	29
5. Die TGFβ- und die GDNF-Superfamilie	30
5.1 Die TGFβ- Superfamilie:	30
5.2 Die GDNF- Familie:	31
6. Material und Methoden	32
6.1 Material	32
6.2 Methoden	33
6.2.1 RNA- Isolierung	33
6.2.2 cDNA- Synthese	33
6.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion / PCR	33
6.2.4 real-time PCR /rt-PCR	37
6.2.5 real-time reverse Transkriptase-PCR/ rt-RT-PCR	38
7. Ergebnisse	39
7.1 Ergebnisse der relativen Expression von TM9SF1 und TMEFF1 nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Wachstumsinhibitoren von cDNA humaner SHSY5Y-Zellen	39
7.2 Ergebnisse der relativen Expressionsanalyse von TM9SF1 und TMEFF1 aus humanem Sektionsgewebe	41
7.3 Ergebnisse der TM9SF1-PCR	45
8. Diskussion	57
8.1 Diskussion der Ergebnisse der RT-PCR von TM9SFq und TMEFF1	57
8.2 Diskussion der Methode der rt-RT-PCR	59

8.3 Diskussion der Klonierungsversuche von TM9SF1	61
9. Ausblick.....	63
10. Zusammenfassung.....	64
11. Literaturverzeichnis.....	66
12. Materialliste	75

Zielsetzung der Arbeit

Diese Promotionsarbeit befasst sich im Rahmen von Grundlagenforschung mit der molekularen Charakterisierung von zwei transmembranen Proteinen. Transmembrane Proteine sind keine alleinigen Strukturelemente der Zellmembran, sondern besitzen eine funktionelle Bedeutung als Rezeptoren, Enzyme, Transportkatalysatoren oder Teile einer Signaltransduktionskette. Daher sind sie als Angriffspunkte einer medikamentösen Therapie von Krankheiten interessant.

Das transmembrane Protein TM9SF1 wird mit Neuroprotektion im Rahmen neurodegenerativer Prozesse in Zusammenhang gebracht; dem transmembranen Protein TMEFF1 werden neurotrophe Eigenschaften auf zerebrale Neurone sowie eine inhibitorische Funktion im Rahmen von Signaltransduktion und eine tumorsuppressive Funktion bei Gehirntumoren zugeschrieben.

Die Versuche dieser Promotion beschäftigen sich vor Allem mit M. Parkinson, der nach dem M. Alzheimer häufigsten neurodegenerativen Erkrankung der westlichen Welt. Die Erkrankung entsteht durch den selektiven Untergang dopaminergener Neurone der Basalganglien, insbesondere der Substantia nigra pars compacta. Die bisherigen medikamentösen und operativen Therapiemöglichkeiten zielen überwiegend auf die Linderung der durch den Dopaminmangel hervorgerufenen Symptome wie Rigor, Tremor und Dys-/Akinesie.

Ein präventiver Therapieansatz im Sinne einer Neuroprotektion konnte bislang nicht gefunden werden. Dem transmembranen Protein 9 der Superfamilie 1 (TM9SF1) wird nach bisherigen Erkenntnissen ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben.

Für TM9SF1 konnte im Rahmen experimenteller Versuche an einem Parkinson-Modell an Rattenzellen gezeigt werden, dass eine Hochregulation von TM9SF1 eine vermehrte Resistenz der Zellen gegenüber dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin hervorruft. Es konnte so ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden.

Mittels PCR wurde versucht, TM9SF1 aus humanen SHSY5Y-Zellen zu sequenzieren, um es anschließend zu klonieren und die bereits an Rattenzellen durchgeführten Experimente mit 6-Hydroxydopamin analog an humanen Zellen zu wiederholen.

Um eine genaue Analyse des Expressionsverhaltens zu erhalten, wurde außerdem die Expression von TM9SF1 in verschiedenen humanen Gewebeproben im Vergleich zu house-keeping-Genen untersucht. Die Expressionsanalyse könnte darüber Aufschluß geben, wie stark TM9SF1 in den von M. Parkinson betroffenen Hirnarealen exprimiert wird, und in welchen anderen Geweben das Gen vorkommt.

Sollten dabei gleiche Erkenntnisse gefunden werden, würde sich ein transmembranes Protein sehr gut zur Entwicklung neuroprotektiver, medikamentöser Therapien neurodegenerativer Erkrankungen wie M. Parkinson eignen.

Die Expressionsanalyse in humanen Geweben wurde ebenfalls an TMEFF1 durchgeführt, einem Gen, dem verschiedene Funktionen im ZNS zugeschrieben werden. Besonders die mögliche Funktion als

Tumorsuppressorgen macht eine weiterführende Charakterisierung von TMEFF1 interessant, da sich so eventuell ein therapeutischer Ansatz im Bereich der Hirntumortherapie ergeben könnte.

Hirntumore sind häufig aufgrund ihrer Lokalisation schwer operativ oder strahlentherapeutisch zu therapieren, und eine medikamentöse Therapie wird durch die Blut-Hirn-Schranke erschwert.

TMEFF1 wird in normalem Hirngewebe relativ hoch exprimiert, aber in Hirntumoren nur sehr gering. Aufgrund seiner molekularen Struktur konnte eine Rolle im Rahmen der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Außerdem wird in diesem Zusammenhang eine Funktion als Tumorsuppressorgen bei Hirntumoren postuliert.

In den durchgeführten Versuchen sollte neben der Expressionsanalyse von TMEFF1 in verschiedenen humanen Geweben unter anderem der Einfluß von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie GDNF, TGFβ oder 6-Hydroxydopamin auf die Expression von TMEFF1 geprüft werden.

Problemstellung

1. Neurodegenerative Erkrankungen: Morbus Parkinson

1.1 Morbus Parkinson: Inzidenz und Prävalenz

Der M. Parkinson wurde zuerst von James Parkinson im Jahr 1817 beschrieben (**Wood-Kaczmar et al 2006**).

Die Prävalenz innerhalb einer Population steigt von 1% bei 65-jährigen auf 5% bei 85-jährigen, eine familiäre Häufung der Krankheit ist zu beobachten, die besonders mit einer early-onset Form einhergeht (**Wood-Kaczmar et al 2006**).

In Nordamerika sind ca. eine Million Menschen von der Erkrankung betroffen. Das allgemeine Risiko der Erkrankung liegt bei 2% für Männer und 1,3% für Frauen (**Elbaz et al 2000, Brown et al 2005**).

Da das Alter der Patienten den einzigen unumstrittenen Risikofaktor für M. Parkinson darstellt, wird die Prävalenz der Erkrankung mit der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung ansteigen. Die Mortalität unter betroffenen Personen ist 2-5 mal höher als unter der gleichaltrigen Normalbevölkerung (**Morens et al 1996**).

Mit zunehmendem Alter der Patienten und Dauer der Erkrankung steigt auch das Risiko für eine Demenz-Entwicklung. Dadurch wird die Lebenserwartung der Patienten nochmals verringert (**Louis et al 1997**).

Manche Prognosen gehen davon aus, dass neurodegenerative Erkrankungen Krebs als zweithäufigste Todesursache unter älteren Personen im Jahr 2040 überholen werden (**Lang and Lozano 1998, Lilienfeld et al 1993**).

Die Ätiologie des M. Parkinson ist bis heute unbekannt.

Die Erkrankung beruht vor allem auf dem Untergang dopaminerger Neurone der Basalganglien, insbesondere der Substantia nigra pars compacta, der in einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin resultiert.

Die klinischen Beschwerden äußern sich in den drei Kardinalsymptomen Rigor, Akinese und Tremor. Bis heute ist M. Parkinson eine klinische Diagnose. Es gibt keinen speziellen, z.B. im Blut messbaren Faktor zur Diagnose der Erkrankung. Die endgültige Diagnose kann erst post mortem im Rahmen einer neuropathologischen Untersuchung gestellt werden (**Lang and Lozano 1998**).

Bei dem M. Parkinson gehen selektiv die dopaminergeren Neurone der Substantia nigra pars compacta zugrunde. Wenn ca. 50% der dopaminergeren Neurone und somit ca. 75-80% des striatalen Dopamins fehlen, entwickeln sich die klassischen Symptome des M. Parkinson (**Steece-Collier et al 2002, Braak et al 2004**).

1.2 Diagnose, Klinik und Risikofaktoren des M. Parkinson:

1.2.1 Diagnose und Klinik:

M. Parkinson ist zu Lebzeiten des Patienten eine überwiegend klinische Diagnose. Die drei Kardinalsymptome sind Rigor, (Ruhe-) Tremor und Akinese.

Die frühen Symptome der Erkrankung sind unspezifisch: Muskelschmerzen, Konzentrationsschwäche, vegetative Störungen, Veränderung des Schriftbildes etc.

Diese Symptomatik verschlimmert sich im Verlauf, es kommt zu Gangstörungen und schließlich zur Entwicklung der oben genannten Kardinalsymptome. In Spätstadien kommen häufig noch psychische Veränderungen wie Depression, Ängstlichkeit oder Schlafstörungen und Demenz hinzu, wobei ein Teil dieser Symptome auch durch die Therapie bedingt sein kann (**Juncos 1999**).

Die Patienten sind schließlich völlig auf fremde Hilfe angewiesen.

Aufgrund der unspezifischen Frühsymptome wird M. Parkinson in einem Viertel der Fälle nicht diagnostiziert, andererseits gibt es auch viele andere Erkrankungen, die sich als Parkinsonismus/ Parkinson-Syndrom manifestieren. Hierzu können der M. Wilson, Drogenabusus oder andere neurodegenerative Erkrankungen gehören (**Lang and Lozano 1998**).

Die Basis der Parkinson-Diagnostik bilden die neurologische körperliche Untersuchung und die sorgfältige Erhebung einer Anamnese.

Eine Reihe von Differentialdiagnosen kann bereits durch die klinische Untersuchung ausgeschlossen werden, ein bildgebendes Verfahren zur Diagnosesicherung ist streng genommen nicht erforderlich. Allerdings wird nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie eine einmalige bildgebende Diagnostik bei einem Patienten mit M. Parkinson empfohlen.

Mittels CT kann z.B. ein Normaldruckhydrozephalus oder eine (frontale) Raumforderung, mittels MRT eine Kleinhirnatrophie ausgeschlossen werden. Bei besonderen Risikofaktoren oder komplizierten Fällen können auch andere Verfahren, z.B. ein EEG hinzugezogen werden. Das Ansprechen des Patienten auf eine Therapie mit L-Dopa (L-Dopa-Test) zählt ebenfalls zu den Möglichkeiten der Diagnosestellung eines idiopathischen M. Parkinson. Parkinsonismus anderer Genese spricht meist schlecht oder gar nicht auf einen Therapieversuch mit L-Dopa an (**Lang and Lozano 1998**).

Im Frühstadium der Erkrankung oder z.B. bei der Abgrenzung eines isolierten Ruhetremors kann eine SPECT- oder PET-Untersuchung hilfreich sein.

Eine klinisch-neurologische Verlaufskontrolle sollte halbjährlich stattfinden, bei Auftreten neuer oder Verschlechterung bereits bestehender Symptome in kürzeren Abständen.

1.2.2 Risikofaktoren:

Letztlich bleibt die Ätiologie des M. Parkinson unbekannt.

Es gibt aber einige Studien, die darauf hinweisen, dass Umweltfaktoren eine wesentliche Rolle in der Krankheitsentstehung spielen (**Brown et al 2005, Tanner et al 1999**).

Außerdem wurden in den letzten Jahren einige genetische Veränderungen gefunden, die mit der Erkrankung assoziiert werden.

1.2.2.1 Umweltfaktoren:

Der einzige unumstrittene Risikofaktor für M. Parkinson ist das Alter des Patienten (**Wood- Kazmar et al 2006, Brown et al 2005, Elbaz et al 2000, Lang and Lozano 1998, Lilienfeld et al 1993**).

Weitere umweltbedingte Risikofaktoren für M. Parkinson werden oft kontrovers diskutiert. Einige dieser Risikofaktoren sind Exposition gegenüber Pestiziden (**Abbott et al 2003**) oder Exposition gegenüber verschiedenen Metallen in jungem Alter, besonders in der Kombination von verschiedenen Metallen. So wird die alleinige Exposition von Mangan oder Eisen kontrovers diskutiert, aber für die Kombination mehrerer Metalle wie z.B. Mangan und Eisen ergibt sich in einigen Studien ein höheres Risiko für die Entwicklung eines M. Parkinson (**Brown et al 2005**).

Im Gegensatz zu vielen anderen Krankheiten kann hier Rauchen als Risikofaktor nicht nachgewiesen werden; im Gegenteil, Raucher haben eine geringere Inzidenz der Erkrankung (**Lang and Lozano 1998**).

1.2.2.2 genetische Faktoren:

In den letzten Jahren wurden einige genetische Polymorphismen und Mutationen gefunden, die mit Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht werden. Im Wesentlichen sind die folgenden Gene bzw. folgenden Proteine betroffen: SYNCA/ α -Synuclein, Parkin/ PARK2, Ubiquitin-Carboxylterminale Hydrolase L1 /UCH L1/ DJ1-Protein/ DJ1, PINK1/ PARK6, Nurr1, LRRK2 u.a..

Die genetischen Faktoren werden im Abschnitt Pathophysiologie des M. Parkinson ausführlicher erläutert.

1.3 Therapie des Morbus Parkinson:

Die Therapie der Erkrankung sollte möglichst frühzeitig und altersentsprechend beginnen. Das Therapieziel besteht nicht nur in der Behandlung der Symptomatik, sondern u.a. auch im Erhalt der Lebensqualität und Berufs- oder Alltagsfähigkeit des Patienten und der Vermeidung von Komorbiditäten und Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie. Eine Übersicht über die verschiedenen Therapieoptionen gibt es bei **Lang and Lozano 1999** oder der **Deutschen Gesellschaft für Neurologie/ DGN** (Kompetenznetz Parkinson, Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von M. Parkinson, Evidenzniveau 2).

1.3.1 L- Dopa (Levodopa):

L-Dopa ist ein natürliches Intermediärprodukt des Stoffwechsels der enzymatischen Synthese des Dopamins aus L-Tyrosin.

Da die Symptome des M. Parkinson auf dem Mangel von Dopamin beruhen und exogen zugeführtes Dopamin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, wird L-Dopa zur Therapie benutzt.

Damit es nicht peripher im Körper durch die ubiquitär vorkommende L-aromatische Aminosäuredecarboxylase abgebaut wird (wodurch dopaminerge kardiovaskuläre und intestinale Nebenwirkungen entstehen), wird L-Dopa immer in Kombination mit einem Decarboxylase-Hemmer, z.B. Benserazid, gegeben. Dadurch kann auch die Dosis des Medikaments um bis zu 20% reduziert werden.

Trotzdem passiert nur ca. 1% der Dosis die Blut-Hirn-Schranke, wo L-Dopa danach decarboxyliert wird und den Basalganglien als Dopamin zur Verfügung steht.

In ausgesuchten Zentren kann auch eine intrajejunale Infusionstherapie mittels einer perkutan gelegten Sonde erfolgen. Diese Applikation wird besonders bei starken Wirkfluktuationen gewählt, da durch die kontinuierliche intrajejunale Abgabe von L-Dopa ein kontinuierlicher Blutspiegel erreicht wird. Dadurch entfällt die pulsatile Rezeptorstimulation durch die orale Gabe und die Abhängigkeit von einer regelmäßigen Magenentleerung.

Bis heute ist L-Dopa das beste Medikament zur Behandlung von M. Parkinson. Patienten profitieren von der Behandlung mit L-Dopa während ihres gesamten Krankheitsverlaufes. Es ist allen anderen Medikamenten in seiner symptomatischen Wirkung überlegen und verlängert durch die Vermeidung krankheitsbedingter Komplikationen wahrscheinlich auch die Lebenserwartung der Patienten.

Allerdings verzögert es den Krankheitsverlauf nicht. Die meisten Patienten entwickeln im Verlauf Nebenwirkungen wie Fluktuationen der Wirkung (hypokinetische Wirkungsfluktuationen wie Wearing-off/ End-of-dose-Akinesie etc.) und hyperkinetische Dyskinesien (choreatetotische Bewegungsmuster, Peak-dose-Phänomen etc.).

Leitliniengerecht wird die L-Dopa-Monotherapie bei Patienten über 70 Jahren oder Patienten mit Komorbiditäten als First-Line-Therapie eingesetzt, bis Wirkfluktuationen oder Therapiekomplikationen auftreten.

1.3.2 Dopamin-Agonisten:

In Deutschland stehen mehrere Dopaminagonisten zur Verfügung, z.B. Bromocriptin oder Lisurid. Es handelt sich um direkte Agonisten am postsynaptischen Dopamin-D2-Rezeptor. Häufig werden sie in Kombination mit L-Dopa eingesetzt, wobei sie einen Dosis-sparenden Effekt auf L-Dopa haben und auch die L-Dopa-typischen Nebenwirkungen vermindern. Die neueren Präparate sind auch als Monotherapie wirksam. Sie werden leitliniengerecht zur Therapie von Parkinson-Patienten unter 70 Jahren ohne Komorbiditäten eingesetzt, um den Einsatz von L-Dopa zu verzögern, oder zur Therapie von Rigor und Hypokinesie.

Die häufigsten Nebenwirkungen sind Übelkeit und orthostatische Dysregulation, die oft mit Domperidon behandelt werden (ein Dopaminantagonist mit nur geringer zentraler Wirkung) sowie Ödeme. Diese können durchaus so stark sein, dass ein anderes Medikament dieser Substanzklasse eingesetzt werden muß.

Dopaminagonisten führen außerdem zu verstärkter Tagesmüdigkeit. Das Phänomen kann durch die Erkrankung selbst bedingt sein und dann durch die Therapie verstärkt werden. Evtl. müssen die Patienten z.B. auf Autofahren verzichten.

Die schwersten Nebenwirkungen sind die retroperitoneale und/ oder pulmonale oder Herzklappen-Fibrose. Insbesondere die Herzklappenfibrosen werden den Substanzen Cabergolin und Pergolin zugeordnet. Daher dürfen diese beiden Medikamente vorerst nur in der Second-Line-Therapie eingesetzt werden.

Vor Therapiebeginn sollte eine kardiovaskuläre Untersuchung durch einen Kardiologen inklusive einer transthorakalen Echokardiographie erfolgen, um vorbestehende Herzerkrankungen auszuschließen. Während der Therapie sollten die Patienten halbjährlich einer körperlichen Untersuchung mit Herz- und Lungenauskultation und jährlich einer transthorakalen Echokardiographie unterzogen werden.

Apomorphin, ein Non-Ergot-Dopaminagonist mit geringer oraler Bioverfügbarkeit und kurzer Halbwertszeit, steht zur subkutanen (ggf. auch kontinuierlichen subkutanen) Applikation bei Patienten mit motorischen Komplikationen wie rasch einsetzenden Off-Phasen zur Verfügung.

1.3.3 COMT-Hemmer:

COMT-Hemmer wie Entacapon oder Tolcapone hemmen spezifisch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT), die unspezifisch Neurotransmitter methyliert und sie so inhibiert. Durch den Einsatz von COMT-Hemmern kann die L-Dopa-Dosis um bis zu 25% reduziert werden. Die Behandlung mit COMT-Hemmern ist besonders bei starken Wirkungsfluktuationen (on-off-Phänomen) in der L-Dopa-Therapie indiziert. Besonders Tolcapone verlängert die On-Phase der Therapie mit L-Dopa im fortgeschrittenen Krankheitsstadium um bis zu 30% (mit entsprechender Verringerung der Off-Phasen).

Allerdings weisen COMT-Hemmer eine starke Hepatotoxizität auf, so dass Leberwerte besonders engmaschig überwacht werden müssen. Außerdem können sie die Nebenwirkungen von L-Dopa potenzieren und Diarrhoen auslösen.

1.3.4 MAO-B-Hemmer:

Die MAO-B (Monoaminoxidase-B) desaminiert spezifisch Dopamin und inhibiert es so. MAO-B-Hemmer wie Selegilin und das neu zugelassene Rasagilin werden in den frühen Stadien des M. Parkinson zur symptomatischen Therapie eingesetzt. Es gibt auch Hinweise dafür, dass sie in einer Kombinationstherapie mit Dopamin wirksam sind.

MAO-B-Hemmer werden in Tablettenform verabreicht und prägastral resorbiert, so dass die Schwankungen in der Bioverfügbarkeit und die Metabolisierung zu Amphetamin-Derivaten relativ gering sind.

1.3.5 NMDA-Antagonisten:

Amantadin ist der bekannteste NMDA-Rezeptor-Antagonist. Es unterdrückt stimulierende Einflüsse u.A. aus dem Ncl. subthalamicus. Unter der Therapie bessern sich alle drei Kardinalsymptome des M. Parkinson. Er ist sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombinationstherapie wirksam. Auch L-Dopa-induzierte Dyskinesien können behandelt werden.

Allerdings tritt häufig ein rascher Wirkungsverlust ein.

Da Amantadin zu 90% renal eliminiert wird, muss die Nierenfunktion entsprechend überwacht werden.

Budipin, ein weiterer NMDA-Antagonist, wird überwiegend zur Therapie des Tremors eingesetzt.

1.3.6 Anticholinergika:

Anticholinergika zählen zu den ältesten Medikamenten bei M. Parkinson, daher gibt es auch nur wenige klinische Studien zu ihrer Wirksamkeit. Im klinischen Alltag werden sie trotzdem weiterhin eingesetzt.

Bei M. Parkinson überwiegt schließlich der cholinerge Input der Basalganglien, und dieser kann durch Blockade der muskarinergen Rezeptoren im Striatum gemindert werden.

Anticholinergika wirken insgesamt nur mäßig gut auf Ruhetremor und Rigor, daher werden sie meistens mit L-Dopa kombiniert. Im klinischen Alltag werden sie insbesondere zur Therapie des Ruhetremors benutzt. Allerdings sind die zahlreichen peripheren (Mundtrockenheit, Miktionsstörungen, Tachykardien, Akkommodationsstörungen) und zentralen (Halluzinationen, Erinnerungslücken) Nebenwirkungen besonders bei älteren Patienten dosis- und therapielimitierend.

1.3.7 operative Verfahren:

Das Gebiet der neurochirurgischen Therapieoptionen hat sich in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt. Insgesamt wird aber bemängelt, dass es wenig fundierte Studien mit entsprechend großen Fallzahlen und langen Nachbeobachtungszeiträumen gibt, sondern sich die Literatur überwiegend auf Einzelfallbeschreibungen oder kleine Studien beschränkt (**Stowe et al 2003**). Es gibt Hinweise dafür, dass Nebenwirkungen überwiegend psychiatrischer Art in 5-60% der Fälle auftreten, von denen bis zu 40% irreversibel sind. Allerdings scheinen neurochirurgische Verfahren bei schwerer Erkrankung der medikamentösen Therapie, zumindest kurzfristig, überlegen zu sein (**Stowe et al 2003**).

In den letzten Jahren hat sich das Verfahren der tiefen Hirnstimulation/ deep brain stimulation/ DBS als neurochirurgisches Verfahren durchgesetzt.

Hierbei werden stereotaktisch Elektroden im Gehirn (bevorzugt im Ncl. subthalamicus) eingesetzt, die mit einem Stimulator, oft unter dem Schlüsselbein liegend, verbunden sind. So können durch elektrische Impulse einzelne Gehirnareale gezielt außer Kraft gesetzt werden, indem sie überstimuliert werden. Das Ziel der Therapie ist, unkontrollierte Impulse von den Basalganglien zum Kortex oder dem Hirnstamm zu unterdrücken; der eigentliche Krankheitsprozess bleibt unangetastet (**Stowe et al 2003, Byrd et al 2000, Burchiel et al 1999**). Es resultiert also eine funktionelle Läsion im Gehirn und letztlich eine rein symptomatische Therapie (**Taha, Janszen et al 1999**), die daher auch nur einer beschränkten Patientenzahl zugänglich ist.

Es sprechen nur Symptome auf die Therapie an, die sonst auch auf eine L-Dopa-Therapie ansprechen würden. Besonders Off-Phänomene lassen sich hiermit gut behandeln, und im Gegensatz zur medikamentösen Therapie hält die Wirkung hier 24 Stunden an.

Indikationen für diese Therapie sind medikamentös therapierefraktäre Patienten, ungenügend einstellbarer Ruhetremor oder Patienten, die aufgrund einer Psychosegefahr medikamentös nicht ausreichend behandelt werden können. Vorher muß sichergestellt sein, dass die Symptome Dopa-sensitiv und schwer beeinträchtigend sind, schwere Allgemeinerkrankungen auch psychischer Art (Depressionen etc.) und neurochirurgische Risikofaktoren wie Aneurysmen müssen ausgeschlossen sein.

Die perioperative Letalität liegt bei bis zu 3%, postoperative Symptome wie psychische Alterationen sind häufig, aber in der Regel reversibel (**DGN**). Gegebenenfalls können die Elektroden auch neu platziert werden.

Im Rahmen einer Studie von 2006 (**Deuschl G, Schade-Brittinger C et al 2006**) wurde erstmalig nachgewiesen, dass bei medikamentös ausbehandelter Parkinson-Krankheit mit motorischen Fluktuationen und Dyskinesien die Nucleus-subthalamicus-Stimulation der oralen medikamentösen Therapie in Hinblick auf Verbesserung der Krankheitssymptome, der Alltagsaktivitäten und der Lebensqualität signifikant überlegen ist.

Weitere operative Verfahren sind die Pallidotomie und die Thalamotomie. Da diese Verfahren jedoch operative, irreversible Läsionen im Gehirn setzen, werden sie mittlerweile nur noch unter strenger Indikationsstellung angewandt; wenn der Patient jedoch von der Operation nicht profitiert, hat er möglicherweise den Rest seines Lebens mit den potentiellen Nebenwirkungen der Therapie zu kämpfen.

Überwiegend wird mit diesen Verfahren der Tremor behandelt.

Bei der Pallidotomie werden stereotaktische Läsionen im Bereich des inneren Segments des Globus Pallidus gesetzt, wodurch sich Tremor, medikamenten-induzierte Dyskinesien und in geringerem Ausmaß auch Rigor und Akinese verbessern (**Taha, Janszen et al 1999**). Off-Phasen werden in bis zu 30% der Fälle reduziert (**Stowe et al 2003**).

Bei der Thalamotomie stehen der Ncl. subthalamicus und der Ncl. ventralis im Vordergrund. Durch eine dortige Läsion wird der Kopf- und Ruhetremor auf der Gegenseite um meist 80% reduziert. Allerdings wird die Alltagsfähigkeit des Patienten in der Regel nicht verbessert (**Taha, Janszen et al 1999**).

1.3.8 GDNF-Therapie:

GDNF (glial cell line derived factor) ist ein neurotropher und neurorestaurativer Wachstumsfaktor, wie sowohl im Tiermodell als auch an menschlichen Zellen in vitro gezeigt wurde (**Gash, Zang et al 1996, Clarkson, Zawada et al 1997**). Bislang wurde der therapeutische Einsatz von GDNF bei verschiedenen Erkrankungen des ZNS im Labor erforscht, u.a. bei traumatischen Verletzungen des Gehirns oder Rückenmarks (**Li et al 1995, Kim et al 2001**), Apoplex oder ALS. Auch die therapeutischen Möglichkeiten von M. Parkinson werden intensiv erforscht. Es konnte nachgewiesen

werden, dass Rattenzellen, die mit GDNF behandelt worden waren, gegen die durch 6-OHDA verursachte Neurodegeneration weitgehend immun waren (**Yasuahra et al 2007**).

Therapieerfolge von Zelltransplantation bei neurodegenerativen Erkrankungen werden auf die Sekretion von GDNF durch die transplantierten Zellen zurückgeführt

So konnte gezeigt werden, dass eingekapselte Zellen, die in ein durch 6-OHDA geschädigtes Striatum implantiert worden waren und GDNF sezernierten, protektive Effekte auf die dopaminergen Neurone zeigten (**Date et al 2001, Shingo et al 2002, Yasuhara et al 2005**). Ratten, die zwei Wochen nach einer Schädigung durch 6-OHDA derartige Zelltransplantate erhielten, zeigten mehr neurorestaurative Effekte als ihre Vergleichsgruppe, die die Zelltransplantation erst nach vier Wochen erhielten (**Shingo et al 2002**).

Die Methode, verkapselte Zellen in ein Organ zu transplantieren, wird bereits bei Erkrankungen der Schilddrüse oder des Pankreas eingesetzt (**Tibell et al 2001, Groth et al 1994**).

Im ZNS werden zur Zeit chromaffine Zellen sowie Zellen benutzt, die die ciliaren neurotrophen Faktoren (CMTF) produzieren. Dies geschieht besonders bei ALS und Patienten mit schweren chronischen Schmerzen (**Aebischer et al 1996, Buchser et al 1996**).

Auf diese Weise können Neurotransmitter/ neurotrophe Faktoren kontinuierlich von den eingekapselten Zellen produziert werden, die durch die semipermeable Membran ausreichend mit O₂ und Nährstoffen versorgt werden und durch sie hindurch die Faktoren sezernieren können.

Außerdem kommt es nur zu einer geringen Immunreaktion auf die Transplantate, da die Donor- Zellen und das Immunsystem des Empfängers durch die Membran voneinander getrennt sind und nur geringfügig miteinander in Kontakt kommen können. Auch eine potentielle Tumorbildung durch die Transplantate hat sich nicht bestätigt (**Yasuahra et al 2006**).

Außerdem kann das eingekapselte Transplantat verhältnismäßig leicht wieder entfernt werden, falls es Probleme gibt (**Yasuahra et 2006**).

Im Tierversuch der Therapie des M. Parkinson mit GDNF hat sich gezeigt, dass eine verzögerte kurzfristige Applikation von GDNF nahe der S.N. vor neuronaler Degeneration schützt, aber keinen langfristigen Schutz vor neuronaler Degeneration bietet, da die Erkrankung langsam kontinuierlich fortschreitet; es wäre also eine langfristige Applikation von GDNF wünschenswert. Daher wurden eingekapselte Zellen, die über zwei Monate kontinuierlich GDNF sezernierten, intraventrikulär und intraparenchymal appliziert; hierbei scheint die intraparenchymale Applikation wohl effektiver zu sein als die Intraventrikuläre (**Winkler et al 1996, Aoi et al 2000**).

Die therapeutische Behandlung von Patienten mit GDNF ist im Augenblick nur im Rahmen von klinischen Studien möglich. Langzeitergebnisse liegen noch nicht vor.

Die intraventrikuläre Injektion von GDNF verbessert die Kardinalsymptome, besonders den Rigor, nicht. Außerdem verursacht sie starke Nebenwirkungen: Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust, Hyponatriämie, Parästhesien und psychische Alterationen (**Nutt et al 2003**).

Hingegen ergibt die intraputaminale Injektion von eingekapselten Zellen bessere Resultate ohne große Nebenwirkungen. Es wurde sogar eine Verminderung der aktuellen Medikation möglich, auch Medikamenten-induzierte Dyskinesien verbesserten sich (**Gill et al 2003**).

Die Problematik der GDNF-Therapie zeigte sich allerdings in einer klinischen Studie: sie wurde aufgrund von Antikörper-Bildung bei drei von 34 Patienten abgebrochen. Bislang sind die Patienten asymptomatisch und die Antikörper noch nicht weiter erforscht worden (**Lang et al 2006**).

Trotzdem gilt die autologe Transplantation von Zellen als relativ sicher und Nebenwirkungs-arm (**Arjona et al 2003**).

Im Tierversuch wurde außerdem festgestellt, dass Affen, die mit hohen GDNF-Dosen behandelt wurden, zerebellare Läsionen zeigen. In einer klinischen Studie mit neun Patienten konnten derartige Läsionen mittels MRT bislang nicht gefunden werden (**Chebrolu et al 2006**).

Eine intermittierende Behandlung mit GDNF wurde bislang noch nicht in einer klinischen Studie versucht.

1.3.9 supportive Therapien:

L-Dopa konkurriert mit neutralen Aminosäuren um die Aufnahme ins Blut und ins ZNS. Eine proteinreiche Mahlzeit kann so zu verminderten Plasmaspiegeln und einer verminderten Wirksamkeit von L-Dopa führen. Daher sollte die Einnahme der L-Dopa- Medikation im zeitlichen Abstand von etwa 1 Stunde zu den Mahlzeiten erfolgen.

Die Physiotherapie ist ein essentieller Bestandteil des Behandlungskonzeptes bei M. Parkinson. Sie fördert die Beweglichkeit des Patienten, vermindert Kontrakturen und verlängert die Mobilität und Alltagsfähigkeit der Patienten. Man geht davon aus, dass ein früher Beginn mit Physiotherapie die Dosierungen der Medikamente reduzieren bzw. eine Dosiserhöhung verzögern kann.

Des Weiteren entwickeln Parkinson-Patienten im Verlauf typische Sprachstörungen wie mangelnde Artikulation, gestörte Sprechgeschwindigkeit und reduzierte Modulation der Lautstärke. In speziellen Trainingsprogrammen können diese Defizite gezielt geübt werden.

1.4 Pathologie:

Da die endgültige Diagnosesicherung ohne die Gewinnung einer Histologie nur auf der klinischen Diagnose beruht, bleibt die histopathologische Untersuchung (häufig erst post mortem) weiterhin die Methode der Wahl zur Diagnosesicherung. Hierbei können verschiedene charakteristische Befunde erhoben werden.

In jedem Fall bilden sich Einschlusskörperchen in den Somata der Neurone der Substantia nigra. Sie können als spindelförmige Lewy-Neuriten/ Filamente oder als Lewy-Körperchen (Lewy-bodies) auftreten (**Lowe 1994, Braak et al 1998, Jellinger and Mizuno 2003**). Diese Einschlusskörperchen

sind im normalen Alterungsprozess des Gehirns nicht vorgesehen, sondern schon ein früher Marker für eine präsymptomatische Parkinson-Erkrankung (**Braak et al 1995**). Sie bestehen hauptsächlich aus Aggregaten eines falsch gefalteten Proteins, des α -Synucleins (**Spillantini et al 1997, Galvin et al 2001, Braak et al 2004**). Auf dieses Protein wird im Verlauf weiterführend eingegangen.

Braak et al beschrieben 2004 den genauen histopathologischen Ablauf der Parkinson- Erkrankung und teilten ihn in 6 Stadien ein:

Im ersten Stadium der Erkrankung bilden sich im motorischen Kern des N. vagus Lewy-Neuriten. Vereinzelt können diese auch in den präganglionären Fasern des N. vagus oder auch in Zellen des enterischen Nervensystems auftreten.

Diese Entwicklung wird in den folgenden Stadien der Erkrankung progredient.

Im zweiten Stadium bilden sich Lewy-Neuriten auch in den Neuronen des Locus coeruleus. So sind in den ersten Stadien Gehirnabschnitte betroffen, die in die motorischen Systeme des Gehirns (Medulla, spinale prämotorische Zentren und motorische Neurone) eingreifen.

Erst im dritten Stadium wandert der Prozess über das pontine Tegmentum hinaus und die ersten Lewy-Neuriten und etwas später auch Lewy-bodies können in der Substantia nigra pars compacta auftreten. Weiterhin findet man zu diesem Zeitpunkt noch keine mikro- oder makroskopischen Veränderungen in der Substantia nigra, insbesondere auch keinen Verlust von Neuronen.

Einschlusskörperchen treten nun auch in anderen Regionen des Gehirns auf, z.B. in Teilen der Amygdala.

In der nächsten Phase der Erkrankung findet man Einschlusskörperchen auch im zerebralen Kortex (am Übergang zwischen Allokokortex und Neokortex), im Mesokortex, entorhinalen Cortex und im Ammonshorn. Da diese Strukturen u.a. sensorische Informationen aus dem Neokortex verarbeiten, können so zum Teil auch psychische Veränderungen wie Stimmungsschwankungen der Patienten erklärt werden.

In den beiden letzten Stadien zeigt sich der Zelluntergang der dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta, und nach Verlust von ca. 70% der Neurone entwickeln die Patienten die volle Symptomatik des M. Parkinson.

2. Physiologie und Pathophysiologie der Substantia nigra

2.1. Physiologie der Substantia nigra:

Die Substantia nigra (S.n.) besteht aus zwei Teilen, einer ventral liegenden pars reticulata und einer dorsal liegenden pars compacta mit melaninhaltigen dopaminergen Neuronen.

Die S.n. ist ein funktioneller Teil des extrapyramidalen Systems und wird mit dem Globus pallidus (G.p.) und dem Corpus striatum (C.s.), das aus dem Ncl. caudatus und dem Putamen besteht, unter dem Begriff der Basalganglien zusammengefasst.

Die Basalganglien erhalten Informationen vom gesamten Kortex und projizieren ihre Impulse über den Thalamus zum prämotorischen Kortex und greifen in unsere Bewegungsabläufe modulierend ein.

Bei **Lang and Lozano 1998** gibt es eine gute Übersicht über diese Abläufe:

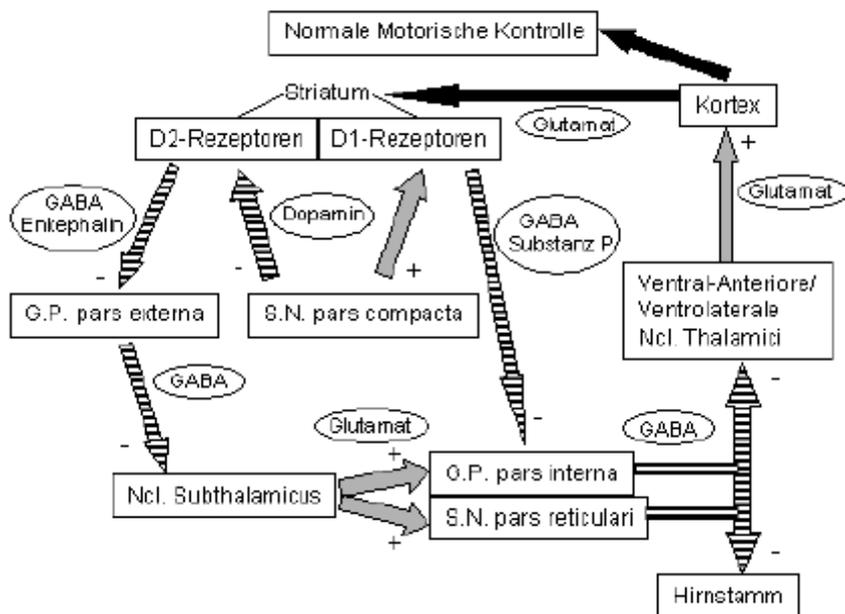


Abbildung 1: Normaler Erregungsablauf in den Basalganglien; aus Lang and Lozano: Parkinson's disease (first of two parts), N Engl J Med.1998 Oct 8; 339 (15): 1044-53.

Der motorische Kortex sendet seine stimulierenden Impulse mittels Glutamat an die hemmenden, GABA-ergen (γ - Aminobuttersäure/ Neurotransmitter) Neurone des Striatums. Diese Neurone besitzen Dopamin-D1 und -D2-Rezeptoren. Über die Dopamin-Rezeptoren stimuliert die S.n. pars compacta das Striatum. Die striatalen Neurone, die D1-Rezeptoren tragen, werden durch Dopamin stimuliert und hemmen direkt über GABA die S.n. pars reticularis und die Pars interna des G.p. .Die striatalen Neurone mit D2-Rezeptoren werden durch Dopamin inhibiert und inhibieren selbst mittels GABA Neurone des G.p. pars externa. Die Pars externa des G.p. wiederum hemmt über GABA den Ncl. subthalamicus, der seinerseits über Glutamat die S.n. pars reticularis und die Pars interna des G.p. stimuliert. Die Pars reticularis der S.n. und die Pars interna des G.p. sind in ihrer Funktion vergleichbar.

Beide hemmen über GABA sowohl den Hirnstamm als auch den ventro- anterioren und den ventro- lateralen Ncl. thalamicus, die zusammen als motorischer Thalamus bezeichnet werden. Der motorische Thalamus inhibiert anschließend den Kortex.

Zusammenfassend greift die S.n. pars compacta über zwei Wege in die Funktionsabläufe des Bewegungsablaufs und der Bewegungsinitiation durch die G.p. pars interna und S.n. pars reticularis ein: einmal direkt hemmend über D1-Rezeptoren des Striatums, und einmal indirekt stimulierend über die D2-Rezeptoren des Striatums.

Wird also der stimulierende Einfluß auf S.n. pars reticularis und G.p. pars interna durch den Ncl. subthalamicus geringer, vermindert sich auch der hemmende Einfluß im motorischen Thalamus und dadurch auch der hemmende Einfluß auf den Kortex.

Außerdem projiziert die S.n. auch ins limbische System und beeinflusst so auch psychische Vorgänge und Lernprozesse (**Lang and Lozano 1998, Sulzer 2000**).

Histologisch finden sich in der Substantia nigra Neurone mit langen, gering myelinisierten Axonen. In den Axonen findet über Mikrotubuli der Transport von beschädigten Mitochondrien, Vesikeln oder autophagischen Vakuolen statt. Die in diese Transportvorgänge involvierten Proteine wie z.B.: Dynein, Kinesin, Myosin oder Aktin benötigen Energie in Form von mitochondrial produziertem ATP (**Braak et al 2006, Sulzer 2000**).

So ist die intraneuronale Konzentration von Calcium in den Neuronen der Substantia nigra vergleichsweise hoch, wodurch oxidativer Streß und möglicherweise Exzitotoxizität entstehen können; Mitochondrien puffern diese Calciumkonzentrationen. Eine Dysfunktion von Mitochondrien kann so zu erhöhter Vulnerabilität der Neurone führen (**Puopolo et al 2007, Sulzer 2000**).

Der Kalium-Influx bringt Neurone wieder in das hyperpolarisierte Stadium und beeinflusst die Zeitabstände der neuronalen Übertragung; außerdem wirkt Kalium neuroprotektiv und blockiert Exzitotoxizität. Die Funktion der ATP-abhängigen Na⁺-K⁺-ATPase ist also essentiell für die Aufrechterhaltung des Kaliumgradienten der Zelle und der größte Verbraucher des neuronalen ATP (**Liss and Roeper 2001, Sulzer 2000**).

Die dopaminergen Neurone der Substantia nigra besitzen eine sehr große Anzahl axonaler Projektionen und Dendriten; der Zellkörper macht nur ca. 1% der Zellmasse aus; die Bedeutung dieser Transportfunktion kann so auch erklären, dass Mutationen von Proteinen, die in diese Transportvorgänge verwickelt sind, Menschen für eine neurodegenerative Erkrankung wie M. Parkinson anfällig werden lassen (**Sulzer 2000**).

Dopamin selbst wird überwiegend in präsynaptischen Vesikeln gespeichert und befindet sich nur in geringer Konzentration im Zytoplasma. Es oxidiert schnell bei Reaktionen mit Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, wobei neurotoxische Derivate entstehen können, wie z.B. 6-Hydroxydopamin.

Außerdem reagiert es auch mit intrazellulären Eisenprodukten oder Produkten der Monoaminoxidase, wodurch toxische Radikale entstehen (**Sulzer and Zecca 2007**). Dopaminerge Neurone haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich vor diesen intrazellulären Stressfaktoren zu schützen wie z.B. Feedback-gesteuerte Inhibition der Tyrosinhydroxylase (**Sulzer 2000**).

Diese Abwehrmechanismen können aber überspielt werden, wenn z.B. eine Umverteilung von vesikulärem Dopamin in zytoplasmatisches Dopamin stattfindet. Eine H⁺-ATPase in den präsynaptischen Vesikeln sorgt für einen Transport von Dopamin in die Vesikel entgegengesetzt des Dopamingradienten (**Staal et al 2004**). Wenn dieser Gradient nicht aufrecht erhalten werden kann, folgt das vesikuläre Dopamin dem Gradienten in Richtung Zytoplasma, wodurch massiver oxidativer

Streß entsteht. So wird auch hier wieder die Bedeutung der Mitochondrien als ATP- Lieferant deutlich (Sulzer 2000).

2.2 Pathophysiologie der Substantia nigra:

Beim idiopathischen M. Parkinson kommt es zum Untergang der dopaminergen Neurone der S.n. pars compacta; die Gründe hierfür sind noch unbekannt.

Dadurch fällt zunehmend der stimulierende Einfluß des Dopamins auf das Striatum aus, wodurch wiederum die hemmenden Einflüsse auf den G.p. pars externa und die S.n. pars reticularis ausbleiben. Auch die Hemmung der D1-Rezeptoren des Striatums vermindert sich zunehmend, wodurch ebenfalls die GABA-erge Hemmung des G.p. pars externa und S.n. pars reticularis ausfallen.

Insgesamt vermindert sich der hemmende Einfluß auf den motorischen Thalamus und die Modulation der Bewegungsabläufe nimmt zunehmend ab.

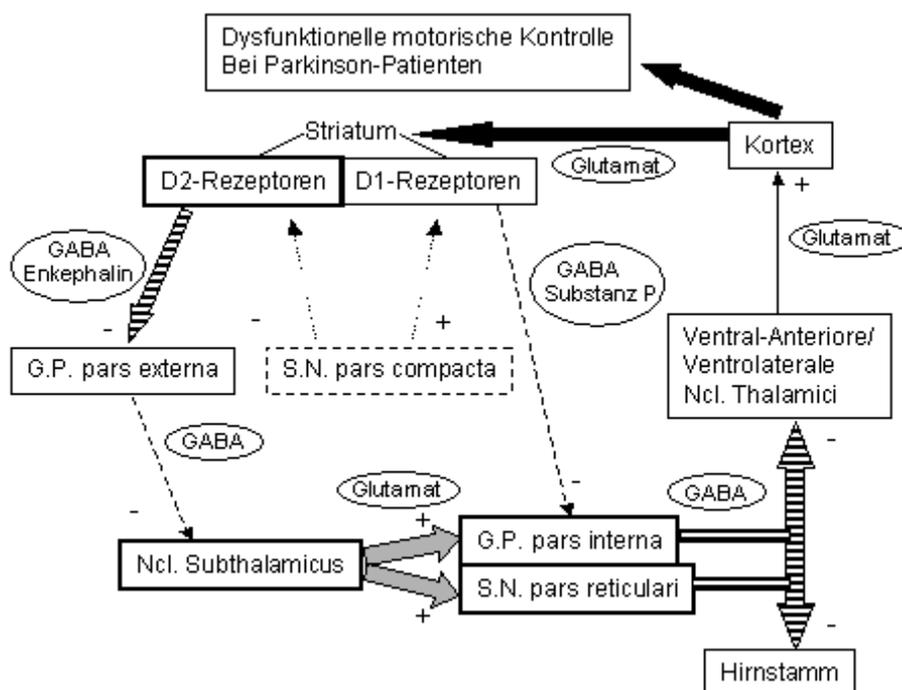


Abbildung 2: Erregungsablauf in den Basalganglien beim M. Parkinson; aus Lang and Lozano: Parkinson's disease (first of two parts), N Engl J Med.1998 Oct 8; 339 (15): 1044-53. Die Blockpfeile und die starken Umrandungen zeigen das Überwiegen einzelner Bestandteile der Basalganglien in der motorischen Kontrolle nach Degeneration dopaminergener Neurone der S.n. an

2.3 Theorien zum Untergang der Neurone der Substantia nigra:

Neben den schon erwähnten Umweltfaktoren gibt es eine Reihe genetischer Faktoren und Mutationen, die in den letzten Jahren mit der Entstehung des M. Parkinson in der familiären und early-onset-Form in Verbindung gebracht wurden. Hier werden die häufigsten Faktoren aufgezeigt.

Monogenetic causes of PD

Gene/protein	Pattern	Prevalence	Pathology	Common features	Notes
α -Synuclein	AD	Very rare	Lewy bodies	Early-onset dementia; presentation variable with mutation type	Aggregation of protein in Lewy bodies from genetic and sporadic forms of PD
Parkin	AR (mostly)	18% EOPD (50% with family history)	Rare Lewy bodies, if any	Early onset, slow progression	Protein is involved in ubiquitination
DJ-1	AR	<1% EOPD	Unknown	Early onset, slow progression	Protein is involved in the cellular stress response
PINK-1	AR (carriers may be at increased risk)	2-3% EOPD	Unknown	Early onset, slow progression	Protein is a mitochondrial kinase
LRRK2	AD	Highly variable	Lewy bodies	Typical PD (mostly)	Protein is a kinase with multiple putative domains

AR, autosomal recessive; AD, autosomal dominant; EOPD, early-onset PD (usually before 50 years of age).

Abbildung 3: Monogenetische Ursachen des M. Parkinson; aus Savitt et al: Diagnosis and treatment of Parkinson's disease: molecules to medicine; J Clin Invest. 2006 Jul; 116 (17): 1744-54

2.3.1 α -Synuclein:

Das SNCA-Gen kodiert α -Synuclein, ein kleines Protein von 140 Aminosäuren, zu dessen Proteinfamilie auch β -Synuclein und γ -Synuclein gehören. Es enthält eine N-terminale, α -helikale, eine hydrophobe zentrale und eine hydrophile C-terminale Region und ist normalerweise in seiner Struktur nicht gefaltet. Es wird im adulten Gehirn ubiquitär in Gliazellen und Neuronen in den präsynaptischen Enden exprimiert; die höchsten Konzentrationen liegen im cerebralen Neokortex, im Hippocampus und in der Substantia nigra (**Wood-Kazmar et al 2006, Fredenburg et al 2007, Follmer et al 2006**).

Über die physiologische Funktion des Proteins ist bislang nur wenig bekannt; es wird vermutet, dass es eine Rolle bei der Regulation des Reservepools synaptischer Vesikel im Gehirn, bei Lernprozessen und bei neuronaler Plastizität spielt (**Follmer et al 2006, Cabin et al 2002, Sidhu et al 2004, Wood Kazmar et al 2006**).

In vitro konnte gezeigt werden, dass α -Synuclein außerdem an der Lipid-Aufnahme im Gehirn beteiligt ist und die Aktivität der Enzyme Phospholipase C und D, die in Lipid-vermittelte Signaltransduktion involviert sind, verändert (**Wood-Kazmar et al 2006**). Außerdem scheint das Protein Nervenenden vor Verletzungen zu schützen (**Wood-Kazmar et al 2006, Chandra et al 2005**). Mutationen in α -Synuclein werden sowohl bei idiopathischem und bei familiärem M. Parkinson beobachtet. Drei Mutationen, A30P, E46K und A53T werden mit seltenen, early-onset Formen des M.

Parkinson in Verbindung gebracht, Duplikationen des SNCA-Gens werden bei familiärem M. Parkinson beschrieben (**Savitt et al 2006, Follmer et al 2006**).

α -Synuclein nimmt im Rahmen des M. Parkinson eine stabile, nicht lösliche, fibrilläre Struktur an, in die es sich über β -Faltblatt-Strukturen und metastabile oligomere Protofibrillen entwickelt. Diese Fibrillen sind der Hauptbestandteil der Lewy-bodies. In verschiedenen Versuchen zeigte sich, dass hohe Level von α -Synuclein anormale Proteinaggregation und Neurotoxizität in dopaminergen Neuronen auslösen: u.a. löste die Überexpression des Proteins in einer humanen fötalen dopaminergen neuronalen Zelllinie Apoptose der dopaminergen Neurone aus, die unter oxidativem Streß noch verstärkt wird (**Xu et al 2002, Wood-Kazmar et al 2006**). In nicht dopaminergen Neuronen bleiben die Fibrillen inert (**Follmer et al 2006**). Die Präsenz von Dopamin scheint außerdem die Stabilität noch metastabiler Protofibrillen zu fördern (**Conway et al 2001**).

2.3.2 Parkin:

Das Parkin-Gen liegt auf Chromosom 6, das Protein besteht aus 465 Aminosäuren und kodiert für eine E3-Ubiquitin-Ligase. Es wurde zuerst im Zusammenhang mit japanischen Patienten mit autosomal-rezessivem early-onset M. Parkinson untersucht (**Sulzer 2007, Hardy et al 2006, Wood-Kazmar et al 2006**).

Das Protein ist normalerweise in Bindungsreaktionen wie Ubiquitinierung oder die Markierung von Proteinen zur proteasomalen oder autophagischen Degradation als Antwort auf Streß involviert und wird in Neuronen in der postsynaptischen Region gefunden (**Sulzer 2007, Wood-Kazmar et al 2006**). Es finden sich in Zusammenhang mit M. Parkinson überwiegend loss-of-function-Mutationen, so dass das Protein seine Markierungs- und Ubiquitinierungsfunktion nicht mehr ausführen kann. Daher akkumulieren in der Zelle die eigentlich zum Abbau bestimmten Substrate. Dies führt zu einem selektiven Zelltod dopaminergener Neurone (**von Coelln et al 2004**).

Weiter spielt Parkin eine protektive Rolle für Mitochondrien im Tiermodell und in vitro: Parkin-knockout-Mäuse haben ein geringeres Maß mitochondrialer Proteine bei der oxidativen Phosphorylierung (**Palacino et al 2004**). Die Überexpression von Parkin verhindert in vitro das Anschwellen und die Streß- induzierte Apoptose von Mitochondrien (**Cookson 2005, Darios et al 2003**).

2.3.3 DJ-1:

In seltenen Formen des early-onset M. Parkinson werden auch Mutationen in DJ-1 gefunden. DJ-1 ist ein Protein, das sich im Gehirn hauptsächlich zytoplasmatisch und zu einem kleineren Teil in Mitochondrien findet (**Wood-Kazmar et al 2006**). DJ-1 kann an spezifischen Cystin-Enden oxidiert werden, und wird daher mit der Stressabwehr von Zellen in Verbindung gebracht, da es als Redox-

abhängiges Chaperon dienen könnte. Trotzdem wird DJ-1 bei einer zu starken Oxidation inaktiviert (**Zhou et al 2006, Canet-Aviles et al 2004**).

Im Tiermodell zeigte sich, dass die Inaktivierung von DJ-1 zu erhöhter Sensibilität bezüglich oxidativem Streß führt (**Yang et al 2005, Wood-Kazmar et al 2006**). Insofern könnte die Inaktivierung von DJ-1 zu einer erhöhten Anfälligkeit der Substantia nigra gegenüber M. Parkinson führen.

2.3.4 PINK-1/ PTEN- induced Kinase-1:

Homozygote und heterozygote Mutationen in PINK-1 werden bei verschiedenen Formen des familiären M. Parkinson gefunden, sowohl bei early-onset- als auch bei langsam progredienten oder late-onset-Formen (**Hardy et al 2006, Wood-Kazmar et al 2006**). Das Protein besteht aus 581 Aminosäuren und ist überwiegend in den mitochondrialen Membranen im ganzen Gehirn lokalisiert. Es zeigt Ähnlichkeiten zur Calmodulin-abhängigen Proteinkinase 1, enthält eine katalytische Serin-Threonin-Kinase-Domäne und zeigt in vitro autophosphorylierende Eigenschaften (**Wood-Kazmar et al 2006, Gandhi et al 2006**). PINK-1 ist schlecht löslich und aggregiert leicht; es wird daher auch in bis zu 10% der Lewy-bodies gefunden (**Silvestri et al 2005, Gandhi et al 2006**).

Die Überexpression von PINK-1 schützt Mitochondrien vor Depolarisierung und Apoptose, die durch den proteasomalen Inhibitor MG132 induziert wird (**Wood-Kazmar et al, Hardy et al 2006**).

Parkin und PINK-1 scheinen miteinander zu interagieren, denn es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Parkin die mitochondriale Dysfunktion der Integrität der Mitochondrien aufgrund von PINK-1 Verlust ausgleichen konnte. Allerdings konnte kein Einfluß des Parkins auf die vermehrte Apoptoserate der Mitochondrien durch PINK-1-Mutation festgestellt werden; daher scheint PINK-1 upstream von Parkin zu liegen (**Wood-Kazmar et al, Hardy et al 2006**).

2.3.5 LRRK2/ Leucine-rich repeat kinase 2:

2004 wurde erstmals über Mutationen im LRRK2-Gen im Zusammenhang mit autosomal- dominant vererbtem late-onset M. Parkinson berichtet (**Hardy et al 2006, Zimprich et al 2004**). Bislang wurden neun Mutationen im LRRK2-Gen, dessen Proteinprodukt Dardarin genannt wurde, ermittelt; Die häufigste Mutation, G2019S, wird in 2-5% des familiären M. Parkinson und in 1,5% der sporadisch auftretenden Parkinson-Fälle gefunden (**Gilks et al 2005**).

Die genaue Lokalisation in der Zelle und in den verschiedenen Gewebearten ist noch unklar.

Ursprünglich war LRRK2 mRNA in humanen Dopamin-innervierten Gehirnregionen nigrostriatal und mesolimbisch und nicht in der Substantia nigra gefunden worden. Im Mausgehirn wurde es aber in der Substantia nigra stark exprimiert (**Wood-Kazmar et al 2006**).

Mutationen in LRRK2 wurden in Lewy-bodies und in Lewy-Neuriten nachgewiesen (**Hardy et al 2006, Wood-Kazmar et al 2006**).

Dardarin, das Proteinprodukt des LRRK2, ist ein kompliziert aufgebautes Protein, das GTPase- und Kinase-Enzymdomänen sowie mindestens zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen enthält.

Die G2019S-Mutation befindet sich in der N-terminalen Region der Aktivierungsschleife der Kinaseenzymdomäne. Hier müssen Magnesium-Ionen binden, um die Kinase zu aktivieren. Die G2019S-Mutation führt zu einer erhöhten Kinaseaktivität des Proteins. Es wird postuliert, dass diese erhöhte Kinaseaktivität u.a. für die toxischen Effekte des mutierten Dardarins verantwortlich ist (**Hardy et al 2006, Wood-Kazmar et al 2006**).

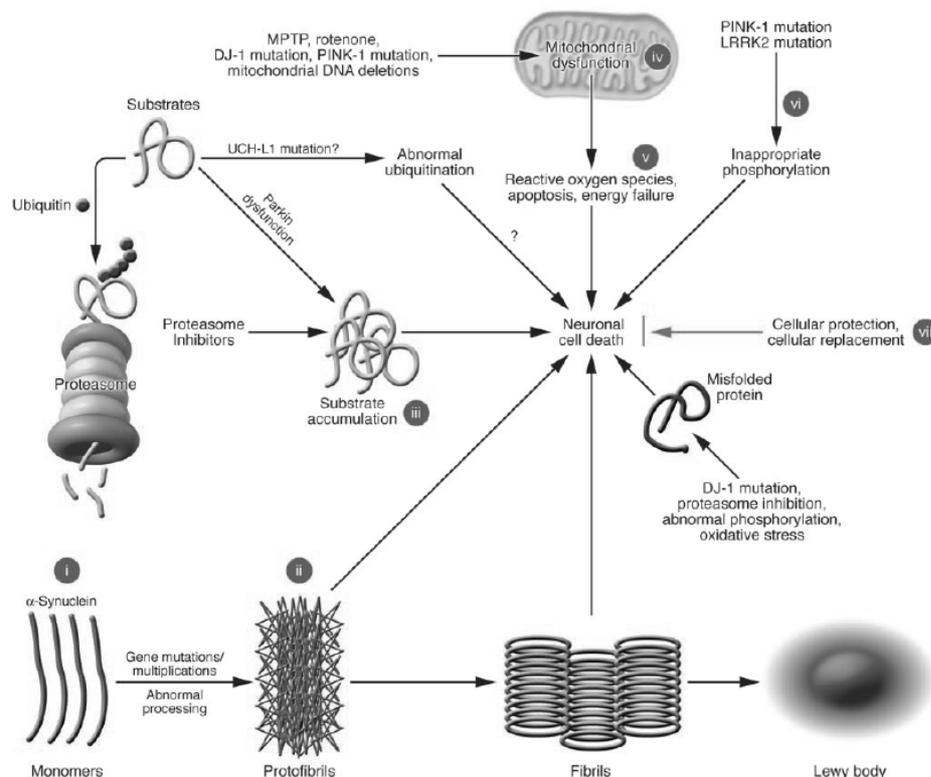


Abbildung 4: Modell des dopaminergen Zelltods und mögliche Ansätze für therapeutische Intervention. Durch Studien von familiärem M. Parkinson wurden Gene identifiziert, deren Mutation zu dopaminergem Zelltod führt. Diese Gene sind in verschiedene zelluläre Prozesse wie Protein- Ubiquitinierung und – Degradation, Antwort auf oxidativen Streß, Proteinphosphorylierung, mitochondriale Funktion und Proteinfaltung involviert. Mögliche therapeutische Ansatzpunkte werden aufgezeigt: Gentherapie zur Reduktion der α - Synuclein- Level (i); Inhibition von α - Synucleinaggregation (ii); Intervention zur Downregulation toxischer Substrate oder Hochregulation von Parkin oder proteasomalen Funktionen (iii); Verbesserung der mitochondrialen Funktion mit Kofaktoren wie CoQ 10, DJ-1 oder PINK-1 (iv); Fänger von freien Radikalen oder Antioxidantien (v); Einsatz von Kinaseinhibitoren, um die LRRK2- Aktivität zu blockieren oder Verstärkung der PINK-1- Funktionen (vi); andere Therapien wie der Einsatz trophischer Faktoren wie GDNF oder Stammzelltherapie (vii);

aus Savitt et al: Diagnosis and treatment of Parkinson's disease: molecules to medicine, J Clin Invest. 2006 Jul; 116 (7): 1744-54

3. TM9SF1

1996 hat die Forschergruppe um **Johanna Chluba-de Tapia** aus Basel eine bis dahin unbekannte Proteinfamilie im humanen Genom auf Chromosom 14 q entdeckt: Es handelt sich um transmembran verlaufende Proteine mit 2 Subtypen aus je 9 oder 11 transmembranen Domänen. Ursprünglich wurde diese neue DNA-Sequenz hMP70 genannt.

Diese neue Proteinfamilie zeigt keinerlei Ähnlichkeit zu anderen transmembranen Proteinfamilien wie z.B.: G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Ionenkanälen oder ATPasen.

TM9SF1 (transmembrane protein 9 superfamily 1) ist gehört zu dem Subtypus mit 9 transmembranen Domänen. Dieser Subtyp besteht aus Proteinen von ca. 68,8 kDa Molekularmasse mit einem großen, N-terminalen hydrophilem Teil (die ersten 230- 300 Aminosäuren) und C-terminal 9 hydrophoben, transmembran verlaufenden Domänen, die von kleinen hydrophilen Schleifen unterbrochen werden. Diese Eigenschaft ist für transmembrane Proteine charakteristisch. Außerdem zeigen sich 4 N-gekoppelte Glykosilierungsstellen, eine in der hydrophilen N-terminalen Region, drei in der hydrophoben C-terminalen Region. Im menschlichen Genom ist es ca. 2424 Basenpaare lang (www.pubmed.com).

Zu dieser Proteinfamilie finden sich in verschiedenen anderen Spezies große Homologien in Pflanzen, Nematoden, Hefen und Menschen:

Insgesamt lassen sich ähnliche Proteinstrukturen bei 10 verschiedenen Pflanzen, 1 Nematode und 19 humanen Genen nachweisen.

Die Hefepoteine p24a (ein precursor Protein, das in Proteintransporte involviert ist), 4ER113c, und YD9727.03c besitzen ebenfalls neun transmembrane Regionen. P24a und YD9727.03c haben außerdem noch zwei weitere mögliche transmembrane Regionen im N-terminalen Part. Die humanen Proteine sind in bis zu 31% identisch zu den Hefepoteinen. Die N-terminale Region zeigt zwischen humanen und Hefepoteinen bezüglich der Größe und Sequenz eine größere Variabilität als der C-terminale Bereich (**Schimmöller et al 1995**).

Die humane hMP70 mRNA, ein Transkript von ca. 2,4 kb, wird universell in allen menschlichen Geweben exprimiert: am meisten in Lunge, Leber, Pankreas und Niere, am wenigsten im Gehirn. Daher stellten **Chluba- de Tapia et al** die Hypothese auf, dass diese transmembrane Proteinfamilie spezieübergreifend aus einem sehr alten Ursprunggen hervorgegangen sein könnte. Die hohe Konservierung dieses Gens innerhalb der verschiedenen Spezies mit universellem Vorkommen in verschiedenen Gewebearten deutet ihrer Ansicht nach auf eine wichtige Funktion dieses Genprodukts hin.

J. Schlegel et al. fanden 2003 in ihren Experimenten bezüglich der molekularen Pathogenese des neuronalen Zelltodes heraus, dass die Expression und Regulation von TM9SF1 bei Ratten die Anfälligkeit von Zellen für das Neurotoxin 6-OHDA beeinflusst.

Hierbei wurde die aus Ratten-Phäochromozytomen gewonnene PC12-Zelllinie benutzt, die sich unter der entsprechenden Stimulation in neuronale Zellen differenziert und daher als neurobiologisches in vitro-Modell anerkannt ist (Vaudry et al 2002).

Des Weiteren gilt die Behandlung von Zellen mit dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, einem Isomer des Noradrenalins, als etabliertes Modell zur Erforschung neurodegenerativer Prozesse (Mandel et al 1997).

Die PC12-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1721) wurden zuerst mit Ethylnitrourea (ENU) behandelt. ENU ist ein alkylierendes Mutagen, das hauptsächlich Basensubstitutionen in der DNA bewirkt und so die Wiederherstellung von loss- oder auch gain-of-function Allelen ermöglicht (Stumm et al 2002). Die Mutationsrate wurde in diesem Fall anhand loss-of-function-Mutationen des hprt-Lokus festgelegt.

Die mit ENU-behandelten Zellen wurden dann mit verschiedenen Dosen von 6-OHDA zwischen 0-100 µM inkubiert. Eine Kontrollkohorte von nicht mit ENU-vorbehandelten PC12-Zellen wurde ebenfalls analog mit 6-OHDA inkubiert. Anschließend wurde eine dose-response-Kurve im Vergleich zu nicht ENU-behandelten PC12-Zellen erstellt, die einen 6-OHDA-Dosis-abhängigen Zelltod zeigte; die mittlere Überlebensrate der nicht ENU-behandelten Zellen nach 50µM 6-OHDA betrug 65%, die mittlere Überlebensrate der ENU-behandelten Zellen betrug 65,5%.

Einzelnen aufgeschlüsselt zeigten bei den ENU-behandelten PC12-Zellen 56% der Zellen eine Überlebensrate (ÜR) von 55-75 %, 8% eine ÜR von >75% , 10% eine ÜR von >85% und 25% eine ÜR <55%; in der Kontrollkohorte zeigten 84% der Zellen eine ÜR von 55-75%, lediglich ein Zellklon zeigte eine ÜR von 75-85% und 3 Klone eine ÜR <45%; diese Differenz ist statistisch signifikant.

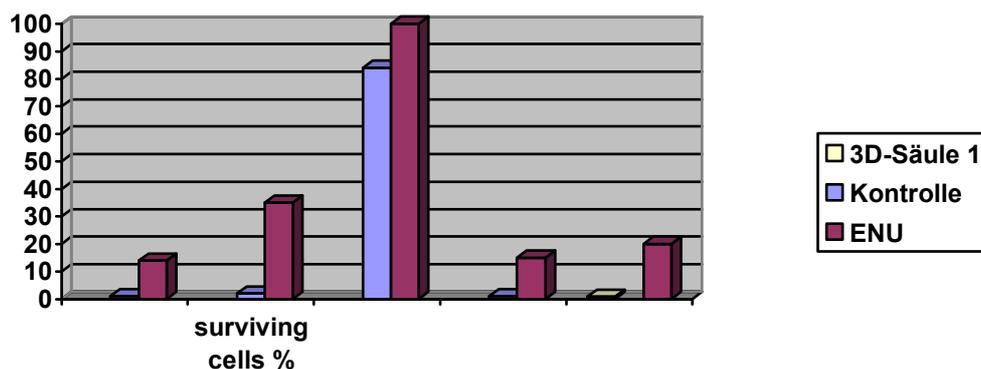


Abbildung 5: aus Schlegel et al 2003: Serial induction of mutations by ethylnitrourea in PC12 cells: a new model for a phenotypical characterization of the neurotoxic response to 6-OHDA; J Neurosci Methods. 2004 Aug 30; 137 (2): 215-20

Es wurden daraufhin Untersuchungen mittels RNA-Isolierung und PCR Technik durchgeführt, um festzustellen, ob sich die auf 6-OHDA-Exposition resistenten Zellklone im Gegensatz zu den auf 6-OHDA-Exposition sensiblen Klonen hinsichtlich ihrer Gene unterschieden.

Ein Genfragment von ca. 200 bp zeigte unterschiedliche Expression. Eine Sequenzanalyse ergab eine 99% Übereinstimmung mit dem Maus-TM9SF1-Gen. Bei den 6-OHDA-resistenten Klonen zeigte sich eine deutlich höhere basale Expression von TM9SF1 im Vergleich zu den sensiblen Klonen.

So wurden letztlich folgende Ergebnisse zur Diskussion gestellt:

1. Die Behandlung von PC12-Zellen mit ENU induziert Mutationen, die zu Veränderungen in der Zellantwort auf 6-OHDA-Belastung führen.
2. Durch 6-OHDA wird die Expression von TM9SF1 in PC12-Zellen verändert, wobei die resistenten Klone eine höhere basale Expression (ohne 6-OHDA-Belastung) haben im Vergleich zu den sensiblen Klonen; die sensiblen Klone erreichen auch durch 6-OHDA-Belastung nicht die Expression, die die anderen Klone ohne die 6-OHDA-induzierte Expression haben.

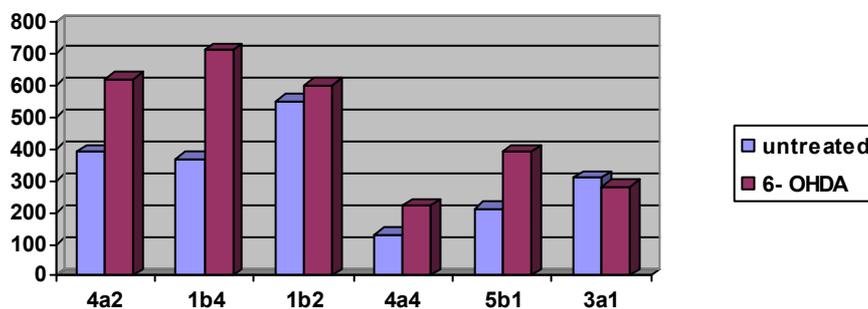


Abbildung 6: Demonstration semiquantitativer PCR-Produkte der TM9SF1-Expression von drei resistenten und drei sensiblen Klonen mit und ohne 6-OHDA-Behandlung. Die Intensität der resistenten Klone ist 1,5-fach stärker als die Intensität der sensiblen Klone; daher wird auf antiapoptotische Effekte von TM9SF1 geschlossen; aus Schlegel et al 2003: Serial induction of mutations by ethylnitrourea in PC12 cells: a new model for a phenotypical characterization of the neurotoxic response to 6-OHDA; J Neurosci Methods. 2004 Aug 30; 137 (2): 215-20

Folglich könnte die Veränderung der TM9SF1-Regulation in das Zellantwortverhalten der PC12-Zellen auf 6-OHDA-Belastung involviert sein und möglicherweise protektiv wirken.

In dieser Promotionsarbeit wurde einerseits die Expression von TM9SF1 in verschiedenen humanen Gewebeproben im Vergleich zu house-keeping-Genen untersucht; in weiteren Untersuchungen könnten die gleichen Versuche analog mit menschlichen Zellen durchgeführt werden. Sollte man zu gleichen Erkenntnissen gelangen, würde sich ein transmembranes Protein sehr gut zur Entwicklung medikamentöser Therapien neurodegenerativer Erkrankungen eignen.

4. TMEFF1

4.1 gliale Tumore:

Gliale Tumore entstehen allgemein aus Makroglia, Astrozyten und Oligodendroglia sowie deren Vorläuferzellen.

Sie werden mittels einer WHO-Klassifikation eingeteilt.

Das Glioblastom ist der häufigste und aggressivste gliale Tumor und entspricht der WHO-Klassifikation des Grad IV Astrozytoms. Histologisch findet sich ein anaplastischer, wenig differenzierter, zellreicher Tumor mit Nekrosezonen.

In den USA erkranken jährlich ca. 18000 Menschen an primär malignen Gehirntumoren, über die Hälfte der Patienten haben Glioblastome (**Nicholas et al 2006, Grossman SA and Batara JF et al 2004, Uddin et al 2005, Wrench et al 2002**).

Primäre Glioblastome entstehen aus ursprünglich glialen Zellen. Sekundäre Glioblastome entstehen aus präexistenten low- grade Astrozytomen und betreffen eher jüngere Patienten.

Die Symptomatik der Patienten hängt von der primären Lokalisation des Tumors und dem Ausmaß der Verdrängung umgebender Gehirnstrukturen ab. Häufige Symptome sind epileptische Anfälle oder Hirndruck- Symptomatik bedingt durch die peritumorale raumfordernde Hirnschwellung.

Die Zeit von den ersten Symptomen bis zur Diagnosestellung beträgt meist weniger als 6 Monate. (**Reardon et al 2006**). Die Prognose der Glioblastome ist schlecht. Die mediane 1- Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 30%.

Neben einer symptomatischen Therapie z.B. mit Antikonvulsiva oder Kortisonpräparaten aufgrund der Hirndrucksymptomatik sollte nach Möglichkeit eine histologische Sicherung des Tumors z.B. mittels Stereotaxie oder auch offener Biopsie/ Resektion des Tumors in sano erfolgen.

Glioblastome werden primär reseziert, sofern dies vom Allgemeinzustand des Patienten und vom Tumorsitz her möglich ist. Anschließend folgt eine Radiatio mit 54-60 Gy. Durch eine kombinierte Radiochemotherapie mit Temozolomid kann die 1-Jahres-Überlebensrate von 31 auf 37% heraufgesetzt werden (**Glioma Meta-Analysis Group 2002**).

Die Entstehung von Glioblastomen ist ein schrittweises Geschehen, an der u.a. Mutationen von Wachstumsfaktor- Rezeptoren wie EGF- (epidermal growth factor), PDGF- (platelet- derived- growth factor) oder VEGF- (vascular endothelial growth factor) Rezeptor beteiligt sind.

40 % der primären Glioblastome zeigen eine vermehrte Genamplifikation des EGF-Gens und 60% eine Überexpression des Proteins.

Außerdem kommt es häufig zu einem Verlust des Chromosom 10, einer Amplifikation und Überexpression des murine double minute 2 und einer Deletion/ Mutation des PTEN- Gens, einem Tumorsuppressor-Gen, auf Chromosom 10 (Phosphatase und Tensin homologes Gen) (**Reardon et al 2006, Nicholas et al 2006**).

Die Hochregulation des EGFR ist mit einer erhöhten Malignität und Aggressivität des Glioblastoms verbunden. Außerdem wird sie mit einer erhöhten Strahlenresistenz in Zusammenhang gebracht.

Daher werden nun u.a. in Studien zunehmend auch EGFR- Inhibitoren wie Gefitinib oder Erlotinib zur Therapie des Glioblastoms angewandt. (**Reardon et a 2006l, Kesari et al 2005, Jendrossek et al 2003**).

Eine zielgerichtete Therapie, die zur selektiven Wachstumsinhibition von Hirntumorzellen führt, gibt es bislang nicht. Da für TMEFF1 eine tumorsuppressive Funktion postuliert wird, könnte dieses Protein für einen derartigen Therapieansatz interessant sein.

4.2 TMEFF-Proteine:

TMEFF-Proteine (TMEFF1 und TMEFF2) gehören zur Familie der EGF-like-Proteine.

TMEFF1 ist ein transmembranes Protein, das aus verschiedenen Spezies isoliert wurde, u.a. bei *Xenopus*, Mäusen und auch bei Menschen (**Eib et al 1996**). Es enthält ein Signalpeptid, zwei Follistatin-Einheiten und eine EGF-ähnliche Struktur in der extrazellulären Domäne und eine kurze zytoplasmatische Region. TMEFF1 wird im menschlichen und im Mäuse-Gehirn in verschiedenen Regionen exprimiert, so z.B. im Bulbus olfactorius, piriformen Cortex, Gyrus cingulus, Motocortex, somatosensorischen Cortex, posterioren Assoziationsgebiet im Parietallappen, Hippocampus, der S. nigra pars compacta, dem motorischen Kern des N. trigeminus, dem Locus coeruleus und im Ncl. dentatus cerebelli.

Neben TMEFF1 gibt es auch TMEFF2, ein ähnliches Protein, hauptsächlich exprimiert in humanem Gehirn und Mäuse- Hirn. TMEFF2 findet man hier u.a. in Regionen, die zur Nahrungsaufnahme wichtig sind. In TMEFF2-Knockout-Versuchen bei Mäusen zeigten die homozygoten Knockout-Mäuse ein retardiertes Wachstum, schlechtes Nahrungsaufnahme-Verhalten und Unterernährung; **Horie et al 2000** erklären dies durch die Überexpression von TMEFF2 im Vergleich zu TMEFF1 in den Gehirnregionen, die in den Nahrungsaufnahme-Prozeß involviert sind (motorischer Kern des N. trigeminus, N. facialis, Ncl. ambiguus, dorsaler motorischer Kern des N. vagus und N. hypoglossus) Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Aminosäure-Sequenz zwischen TMEFF2 und TMEFF1 wird postuliert, daß auch TMEFF1 eine trophische Aktivität entfaltet.

Da TMEFF1 besonders im Locus coeruleus, einem der Haupt-Zentren für noradrenerge Neurone, und in großen Teilen des cerebralen Cortex (moto- und somatosensorischer Cortex, posteriores Assoziationsareal des Parietallappens) und den Pyramidenzellen (5th layer) exprimiert wird, nimmt man an, dass TMEFF1 einen neurotrophen Einfluß auf cerebrale Neurone hat. Aufgrund der Expression im paraventriculären Kern des Hypothalamus und im anterioren Lobus der Hypophyse besitzt TMEFF1 eventuell auch eine Funktion im neuroendokrinen System (**Kanemoto et al 2001**). Die Follistatin-like-Domänen des TMEFF1 besitzen Ähnlichkeit mit denen des Agrins, das eine Schlüsselrolle bei der Aggregation von ACH-Rezeptoren bei der Synaptogenese neuromuskulärer Junctions spielt. Daher werden den TMEFF-Proteinen neurotrophe Eigenschaften zugeschrieben (**Eib et al 1996, Kanemoto et al 2001**).

Wegen des strukturellen Aufbaus von TMEFF1 mit zwei Follistatin-like Domänen und einer Epidermal-growth-factor-like (EGF-like) Region wird ihm außerdem eine Rolle im Rahmen der Regulation von Wachstumsfaktor-Signalwegen zugeschrieben (**Gery et al 2003**). Follistatin-like-

Domänen konnten bereits in anderen Proteinen nachgewiesen werden, wo sie verschiedene Wachstumsfaktoren binden und in ihrer Wirkung neutralisieren (**Kupprion et al 1998, Patel 1996**). TMEFF1 könnte hierbei eine Rolle als Liganden-Precursor, Membran-gebundener Rezeptor oder als Bindungsprotein für Wachstumsfaktoren spielen (**Gery et al 2003**).

TMEFF1 bindet z.B. über die Follistatin-Domänen an den Korezeptor Cripto, wodurch es bei Xenopus-Embryonen inhibitorisch auf TGF β -enthaltende Liganden in der Signaltransduktion wirkt (**Ge et al 2003, Harms et al 2003**). **Lin et al 2003** konnten an humanen Gliomzellen (A172) zeigen, dass die zytoplasmatische Domäne von TMEFF1 durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α via Metalloproteinasen abgespalten werden kann. Die zytoplasmatische Domäne funktioniert als EGF-Rezeptor-ähnlicher Ligand; die meisten Mitglieder der EGF-Rezeptor-Familie werden über Metalloproteinasen gespalten. Proinflammatorische Proteine wie IL-1 β und TNF α regulieren die Expression von Wachstumsfaktoren, zellulären Proteinen und anderen Zytokinen; außerdem induzieren sie wahrscheinlich die Expression von Metalloproteinasen im ZNS. **Lin et al 2003** postulieren daher einen synergistischen Effekt von proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Rahmen der physiologischen Geweberegeneration nach Entzündungsprozessen. TMEFF1 könnte durch das Abspalten der zytoplasmatischen (EGF-Rezeptor-ähnlichen) Region in diesen Prozess involviert sein.

Für TMEFF1 wird außerdem eine mögliche Funktion als Tumorsuppressorgen postuliert. **Ge et al 2006** konnten zeigen, dass TMEFF1 häufig an der Zellmembran neben ST14, einer transmembranen Serin-Protease, in humaner Plazenta, humanem Lungen- und Nierengewebe lokalisiert ist. ST14 ist am Protein-Processing beteiligt und gilt als Tumorsuppressorgen. TMEFF1 bindet an die CUB-Domäne von ST14 und könnte so auch als Tumorsuppressorgen wirken.

In Northern Blot-Analysen konnten **Gery et al 2003** zeigen, dass TMEFF1 in normalen Hirngeweben hoch exprimiert wird, in Hirntumoren dagegen nur gering. In einer Lungenkarzinom- und einer Pankreaskarzinom-Zelllinie wurde hingegen eine leicht erhöhte Expression von TMEFF1 nachgewiesen. In weiteren Experimenten dieser Arbeitsgruppe zeigte sich, dass eine Hochregulation von TMEFF1 in einer Glioblastom-Zelllinie in einer Wachstumsrestriktion dieser Zellen resultierte. So scheint TMEFF1 als ein negativer Wachstumsregulator zu fungieren. Auch eine Deletion der EGF-like-Domäne führte zu einer Wachstumsinhibition der Glioblastomzellen, so dass wohl allein schon die zwei Follistatin-like-Domänen für diese Funktion ausreichen.

Daher postuliert auch die Arbeitsgruppe **Gery et al** eine mögliche Funktion von TMEFF1 als Tumorsuppressorgen bei Hirntumoren. Möglicherweise könnte aber eine Hochregulation von TMEFF1 bei Lungen- oder Pankreaskarzinomen das Wachstum der Karzinomzellen beeinflussen.

4.3 EGF-Rezeptor Familie:

Der epidermal growth factor/ EGF wurde in den 1960er Jahren durch Stanley Cohen entdeckt, der EGF-Rezeptor /EGFR ca. ein Jahrzehnt später (**Nicholas et al 2006**). Der EGFR gehört zu der Familie der humanen EGFR (HER), die eine Unterklasse der Tyrosinkinaserzeptoren sind.

In Neuronen und Gliazellen wird neben der EGF-Familie auch die Neuregulin-Familie, ebenfalls Teil der HER-Familie, exprimiert. Liganden des EGFR sind z.B. neben EGF auch TGF α oder heparin-binding EGF; Liganden der Neuregulin-Familie sind die Splicingprodukte der Gene NRG 1, NRG 2, NRG 3 und NRG 4. Durch die Liganden werden autokrine und parakrine Signalwege aktiviert (**Nicholas et al 2006, Esper et al 2006**).

Die EGFR-Familie spielt in der Entwicklung des ZNS eine große Rolle; sie wird gleichermaßen vom Embryonalstadium bis ins Erwachsenenalter exprimiert und ist in das Differenzierungs-, Proliferations- und Migrationsverhalten sowie das Überleben aller Zelltypen des ZNS involviert (**Nicholas et al 2006, Wong et al 2004**). Im Tierversuch wurde gezeigt, dass EGFR-knockout-Mäuse z.T. schon im Mutterleib oder bei der Geburt versterben; einige Tiere überleben ein paar Monate und versterben dann an neurodegenerativen Prozessen (**Threadgill et al 1995**).

Durch EGFR-Überexpression konnte in vivo und in vitro gezeigt werden, dass postnatal immobile neuronale Progenitorzellen zur Migration angeregt werden können. Dieser Einfluß auf die Zellmotilität wird u. a. mit der Entstehung von Hamartomen oder der Neurofibromatosis Typ I in Verbindung gebracht (**Bookvar et al 2003, Mangoura et al 2006**).

In primären Glioblastomen lässt sich bei 40% eine erhöhte Genamplifikation des EGFR- Gens und bei 60% eine Überexpression von EGFR nachweisen (in sekundären Glioblastomen nur in 8% bzw. 10%, dafür ist hier die Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens p 53 häufiger) (**Nicholas et al 2006**).

Die EGFR-vermittelte Signaltransduktion bei der Tumorgenese ist ein multifaktorielles Geschehen:

- 1.: Es kann zur erhöhten Expression von Liganden des EGF-Rezeptors kommen, wie z.B. TGF α oder heparin-binding EGF, was zu einer vermehrten autokrinen Signaltransduktion führt (**Nicholas et al 2006**).
- 2.: Bei fast 40% der Glioblastome findet man eine vermehrte Amplifikation des EGFR-Gens und eine erhöhte Mutationsrate mit oft mehreren verschiedenen Punktmutationen des EGFR-Gens im gleichen Tumor. Die vermehrte Genamplifikation korreliert mit einer Überexpression des EGFR; die Mutationen führen häufig zu einer erhöhten Aktivität des Proteins (**Nicholas et al 2006, Frederick et al 2000**).
- 3.: In Glioblastomen werden mutierte EGFR exprimiert. Die am häufigsten vorkommenden EGFR- Mutanten sind EGFRvII und EGFRvIII. Hier hat eine in-frame Deletion extrazellulärer Domänen stattgefunden. Durch die Deletion entsteht z.B. eine neue Tertiärstruktur des EGFR, so dass er zwar seine Liganden (wie TGF α etc.) nicht mehr binden kann, aber trotzdem ständig aktiviert ist und so kontinuierlich Signaltransduktion (z.B. durch Phosphorylierung der

Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/PI3K oder Ras-GTP) stattfindet (**Nicholas et al 2006, Moscatello et al 1998, Lal et al 2002, Mellinghoff et al 2005**). Außerdem werden bei der EGFRvIII-Mutation in vitro auch Metalloproteinasen und extrazelluläre Matrixproteine exprimiert; Faktoren, die bei der Invasivität von Tumorzellen eine Rolle spielen könnten (**Lal et al 2002**).

4.: Natürlich können auch EGFR-unabhängige Mechanismen downstream des EGFR-Signalweges mutieren und so aktiviert werden (Ras-Mutation, PTEN-Deletion etc.).

Da der EGFR eine wichtige Rolle in der Entstehung von Glioblastomen und vielen anderen Tumoren spielt, wird nach zielgerichteten Therapiemöglichkeiten des Glioblastoms gesucht.

Eine Möglichkeit ist eine Interferenz der Ligandenbindung herzustellen, wie es z.B. bei der Therapie des Mammakarzinoms mit der Herceptinentwicklung, einem Antikörper gegen Her2, gelungen ist. Allerdings ist Herceptin nicht ZNS-wirksam, da es die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. In vitro wurden bereits Antikörper gegen TGF α entwickelt, die allerdings bei der häufigsten EGFR-Mutation, der EGFRvIII-Mutation nicht wirksam sind und daher als alleinige Therapie wohl eher moderate Wirkung entfalten würden (**Nicholas et al 2006**).

Momentan werden vor allem Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Erlotinib und Gefitinib untersucht. Beide Medikamente sind schon bei der Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms/ NSCLC bei Chemotherapieresistenz zugelassen. Es handelt sich hierbei um kleine Moleküle, die mit der ATP-Bindung an die Tyrosinkinase-Domäne des EGFR konkurrieren, die Tyrosinkinase-Aktivierung verhindern und so zu einer Blockade des EGFR-Signalwegs führen (**Baselga et al 2005**).

Es konnte gezeigt werden, dass die Wirksamkeit dieser beiden Substanzen eng mit der Expression von EGFRvIII und PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted in chromosome 10), einem Tumorsuppressor-Gen, das den PI3K-Signalweg hemmt und in Glioblastomen meist nicht exprimiert wird, assoziiert ist. Eine Expression des EGFRvIII mit Überaktivierung des PI3K-Signalwegs scheint die Wirkung des Gefitinibs zu verbessern, der Verlust von PTEN ist mit einer Resistenz auf Tyrosinkinase-Inhibitoren assoziiert (**Mellinghoff et al 2005, Sordella et al 2004**).

Insgesamt konnten aber auch hier nur moderate Therapieerfolge erzielt werden (**Nicholas et al 2006**).

5. Die TGF β - und die GDNF-Superfamilie

5.1 Die TGF β - Superfamilie:

Die transforming growth factor β -Superfamilie besteht aus mehreren miteinander strukturell verwandten Proteinen wie TGF β , Inhibin, Activin und bone morphogenetic proteins (BMPs). Diese Proteine aktivieren komplexe Signalkaskaden und beeinflussen die zelluläre Differenzierung, Proliferation, Motilität, Adhäsion und Apoptose (**Glasgow et al 2008**). Alle Mitglieder der TGF β -Superfamilie werden als Vorläufer-Proteine hergestellt und schließlich in ihre aktiven Formen

umgewandelt. Sie besitzen außerdem am C-terminalen Ende sieben hoch konservierte Cystein-Residuen (**Sullivan et al 2005**).

Mitglieder der TGF β -Superfamilie aktivieren Signalkaskaden, indem sie an Typ I und II- Rezeptor Serin/Threonin-Kinasen an der Zelloberfläche binden. Durch die Bindung phosphoryliert Rezeptor II die Kinasedomäne von Rezeptor I. Dies führt zu einer Phosphorylierung von Smad-Proteinen, deren Komplexe im Nukleus kumulieren und die Transkription des target Gens regulieren (**Padgett et al 2007**).

Bei normalen Zellen induziert TGF β Zelldifferenzierung und verhindert so unkontrollierte Zellproliferation, indem es den Zellzyklus in der G1- Phase anhält. Bei Zellen, deren TGF β -Signalweg mutiert ist, kann diese Wirkung nicht mehr erfolgen. Manche Zellen erhöhen dann ihre Produktion an TGF β , da es in diesem Fall angiogenetisch und immunsuppressiv wirkt und so die Ausbreitung der Krebszellen fördert (**Blobe et al 2000**). So wird die Entstehung von u.a. gastrointestinalen Tumoren mit dem Verlust der TGF β -vermittelten Wachstumskontrolle/ -inhibition in Verbindung gebracht (**Glasgow et al 2008**).

5.2 Die GDNF- Familie:

GDNF steht für glial cell line derived neurotrophic factor. Der GDNF- Familie gehören neben GDNF auch Neurtutin, Artemin und Persephin an. Sie gehören aufgrund struktureller Ähnlichkeiten der TGF β (transforming growth factor β) Superfamilie an (**Sarma 2000**).

GDNF wurde erstmals 1993 als Wachstumsfaktor beschrieben, der das Überleben embryonaler dopaminergener Neurone des Mittelhirns unterstützt hat (**Lin et al 1993**). Außerdem ist es ein Wachstumsfaktor für spinale Motoneurone und zentrale noradrenerge Neurone (**Sarma 2000**).

Des Weiteren spielt GDNF bei der Entwicklung des enterischen Nervensystems und der Nieren sowie bei der Spermatogenese eine Rolle (**Zeng et al 2008, Sarma 2000**).

Der Wirkmechanismus von GDNF läuft über die Aktivierung der Rezeptor- Tyrosinkinase Ret und einen speziellen Korezeptor für GDNF, GFR α 1-4. Die intrazelluläre Signalkaskade läuft dann z.B. über den Phosphatidylinositid-3-Kinase- oder über den Mitogen-aktivierten Proteinkinase- Weg (**Yasuhara et al 2007**). Außer bei Motoneuronen wird TGF β in vitro und in vivo als Kofaktor für die Aktivierung von Ret benötigt (**Krieglstein et al 1998, Sarma 2000**).

Die Aktivierung von Ret kann zu Zellüberleben, Zellwachstum, Differenzierung oder Migration führen. (**Jurvansuu et al 2008**). Ursprünglich wurde Ret als Proto-Onkogen beschrieben, das in die Entstehung verschiedener Tumore, wie z.B. Pankreaskarzinom, MEN 2 A und B oder papilläres Schilddrüsenkarzinom verwickelt ist (**Zeng et al 2008**). Eine Loss-of-function-Mutation von Ret wird mit M. Hirschsprung in Verbindung gebracht, bei dem im Gastrointestinaltrakt die Ganglienzellen fehlen (**Jurvansuu et al 2008**).

6. Material und Methoden

6.1 Material

Die Arbeit in der Zellkultur erfolgte nach Standardkultivierungsmethoden.

Es wurde mit SHSY5Y-Zellen (ATCC-Nummer CRL-2266) und mit PC12-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1721) gearbeitet. Die nötigen Wachstumsmedien wurden von Invitrogen Corp. bezogen.

Außerdem wurde PBS-Puffer verwendet (138mM NaCl, 4,3mM Na₂PO₄, 1,4mM KH₂PO₄, pH7,4).

Die zur RNA-Isolierung aus Zellen benötigten Materialien wurden von Quiagen (Hilden/Germany), der Sigma Chemical Corp. (St.Louis, MO/USA) und der Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany) bezogen.

Die humanen Gewebeproben, aus denen RNA isoliert wurde, stammen aus Sektionen des Instituts für Pathologie der TU München am Klinikum Rechts der Isar, München/Germany. Die Materialien zur RNA-Isolierung aus den humanen Gewebeproben wurden von Invitrogen Corp.(Carlsbad, CA/USA), Sigma Chemical Corp. und der Carl Roth GmbH bezogen.

Die zur cDNA-Synthese benötigten Materialien stammen von den Firmen Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany) und Invitrogen Corp.. Dort findet sich auch das unten aufgeführte Protokoll zur cDNA-Synthese.

Die PCR-Materialien wurden bei Amersham Biosciences (Freiburg/Germany), Roche Diagnostics GmbH und Invitrogen Corp. bestellt.

Die benötigten Primer wurden beim Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH (Neuherberg/Germany) bestellt. Das Primerdesign wurde eigenständig durchgeführt; die entsprechenden Primersequenzen sind im Folgenden aufgeführt.

Die zur Agarosegel-Elektrophorese eingesetzten Materialien wurden von Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf/Germany), der Carl Roth GmbH und eurobio (www.eurobio.fr) bezogen. Die Molecular Weight Marker stammen von Roche Diagnostics GmbH und New England BioLabs (Frankfurt am Main/Germany). Bei RNA-Proben wurde im Rahmen der Gel-Elektrophorese zusätzlich MOPS-Puffer angesetzt (41,8 g MOPS, 800 ml DEPC- H₂O, mit NaOH auf einen pH von 7,0 einstellen, 16,6 ml 3M DEPC HCl (pH 5,2), 20 ml 0,5M DEPC- EDTA (pH 8,0), mit DEPC- H₂O auf ein Volumen von 1l auffüllen).

Die zur real-time reverse Transkriptase-PCR benötigten Materialien wurden bei Applied Biosystems (Foster City, CA/USA) und Invitrogen Corp. bestellt. Die erforderlichen Primer wurden ebenfalls vom Helmholtz Zentrum München hergestellt. Auch hier werden die Primersequenzen im Folgenden aufgeführt.

6.2 Methoden

6.2.1 RNA- Isolierung

6.2.1.1 RNA-Isolierung aus Zellen nach Quiagen RNAeasy- Protect- Kit

Die RNA-Isolierung aus Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll des Quiagen RNAeasy-Protect-Kits. Das Eluat wurde bei -20 gelagert.

6.2.1.2 RNA-Isolierung aus Gewebeproben

Die Gewebeproben der Sektionen wurden bei -200°C im Stickstofftank aufbewahrt. Zur RNA-Extraktion wurde aus den Proben ein ca. 0,5x0,5x0,3 mm großes Stück entnommen und in ein Eppendorf-Cup überführt.

Die RNA-Extraktion erfolgte nach einem Standardprotokoll (s. z.B. „Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics).

Die RNA wurde in DEPC- H₂O bei -80° C eingefroren.

Bei Bedarf wurde eine 1:100 Verdünnung der RNA- Probe mit 10 mM Tris- HCl (pH 7,5) im Photometer gemessen.

6.2.2 cDNA- Synthese

Die Synthese der cDNA wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Je 1 µl Random-Hexanucleotide-Primer, dNTP-Mix und je 1 µg RNA wurden in ein Microtube pipettiert, dann mit 8,5 µl destilliertem Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt, für 5 Minuten auf 65°C inkubiert und danach kurz auf Eis abgekühlt.

Nun wurden 4 µl 5x First Strand Buffer und 2 µl 0,1M DTT hinzugefügt und das Reagens zuerst für 10 Minuten bei 25°C oder bei Raumtemperatur inkubiert, dann nochmals für 2 Minuten bei 37°C.

Dann wurde 1 µl reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C und anschließend für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren.

Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

6.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion / PCR

Die PCR/ polymerase chain reaction dient der Herstellung identischer DNA- Stränge.

Bei **Kubista et al 2006** findet man eine gute Beschreibung der Methode:

Die PCR wird an einem DNA-template aus Einzel- oder Doppelstrang-DNA durchgeführt.

Man benötigt zur Reaktion zwei Oligonucleotid-Primer, die die DNA-Sequenz flankieren und als Startsequenz zur Amplifikation der DNA dienen, dNTP's, die die vier verschiedenen Basen enthalten, eine hitzestabile Polymerase und Magnesium-Ionen als Reaktionspuffer.

Es gibt verschiedene Polymerasen; am häufigsten werden die Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus* hergestellt) und die Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) benutzt. Beide sind hitzestabil und stellen neue DNA-Sequenzen her, indem sie einen DNA-Strang als komplementäre „Kopiervorlage“ nutzen (**Valasek et Repa 2005**).

Das normale PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt.

Es wird bei über 90°C denaturiert, so dass sich die zwei Stränge der template-DNA trennen.

Anschließend wird die Temperatur gesenkt, damit es zur Hybridisierung der Oligonucleotidprimer mit der Einzelstrang-DNA kommt. Danach wird die Temperatur auf das Temperatur-Optimum der Taq-Polymerase bei 72°C erhöht, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt, die mit der template-DNA identisch ist. Pro Zyklus der PCR wird also die DNA-Menge verdoppelt, bis sich irgendwann eine Plateauphase bildet, da sich irgendwann ein self-annealing-Effekt der doppelsträngigen DNA ausbildet (**Valasek et Repa 2005**).

Die Denaturierung muss bei so hoher Temperatur erfolgen, damit sich die DNA-Stränge auch komplett von einander trennen, denn nicht komplett getrennte DNA-Stränge werden sich wieder zusammenfügen und nicht amplifiziert. Die benötigte Temperatur hängt von der Zusammensetzung der DNA ab, denn eine Guanin-reiche DNA-Sequenz erfordert höhere Temperaturen.

Die Annealing-Temperatur wird durch das Primer-Design bestimmt. Die Schmelztemperatur der beiden Primer sollte möglichst gleich sein; die beste Annealing-Temperatur liegt dann einige Grad unter ihr. Dadurch können sich stabile Komplexe mit der target-DNA und verhältnismäßig wenig unspezifische Komplexe, wie z.B. Primer-Dimere, bilden.

Die optimale Temperatur der Taq-Polymerase liegt bei 72°C, so dass die meisten PCR-Ansätze in der Elongationsphase eine Temperatur von 72°C aufweisen.

Problematisch ist eine rasche Abfolge von Guaninen in der DNA-Sequenz, da diese in der Elongationsphase im Template tetraplexe Strukturen ausbilden können, die sehr stabil sind und die Elongation verhindern. Ähnliche Probleme können auftreten, wenn die template-DNA innerhalb der Sequenz komplementäre Basensequenzen aufweist, die sich zu Haarnadel-ähnlichen Strukturen falten können.

Einander komplementäre Primer können sich ebenfalls aneinanderlagern und als unspezifische Primer-Dimere vervielfältigt werden. Die Bildung von Primer-Dimeren sollte schon beim Primer-Design möglichst verhindert werden, da die PCR der template-DNA mit der PCR der Primer-Dimere konkurriert.

Im Rahmen der Versuche, TM9SF1 per PCR aus humanen SHSY5Y- Zellen zu gewinnen und anschließend damit funktionelle Klonierungsversuche durchzuführen, wurden verschiedene Konzepte zur Gewinnung von TM9SF1 per PCR angewandt.

Zuerst erfolgte eine Aufteilung des Gens in vier Abschnitte aufgeteilt, die einander überlappend per PCR hergestellt werden und hinterher in einen Vektor kloniert werden sollten (Zeichnung s. Kapitel 8.3).

Die ursprünglichen Primer lauteten nach einer Genkarte von TM9SF1 von 2004:

Fragment 1: S1-Primer (forward): 5`-AAC CAA AGC TTC CCG CGC GG-3`

Annealingtemperatur: 55°C

A1-Primer (reverse): 5`-CCA CAA AGC CCC GGA TTG GC-3`

Annealingtemperatur: 55°C

Fragment 2: S2-Primer (forward): 5`-ATG ACT TGC CAA TCC GGG GC-3`

Annealingtemperatur: 55°C

A2-Primer (reverse): 5`-CAG AAC CTG CAG AGG TGG TC-3`

Annealingtemperatur: 55°C

Fragment 3: S3-Primer (forward): 5`-ACC ACC TCT GCA GGT TCT GG-3`

Annealingtemperatur 55°C

A3-Primer (reverse): 5`-TCA CTC TAG GCT TGT ACC AG-3`

Annealingtemperatur: 55°C

Fragment 4: S4-Primer (forward): 5`-GGG CGA TGT TCT TGG TGC-3`

Annealingtemperatur: 55°C

A4-Primer (reverse): 5`-ATA GAT CGG CCG GAT GAA C-3`

Annealingtemperatur: 55°C

Das PCR-Programm war bei allen vier Fragmenten gleich: 40 Zyklen, initial fünf Minuten Denaturierung bei 94°C, danach Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C, 55°C Annealingtemperatur, 72°C Elongationstemperatur für 45 Sekunden, abschließend nochmals 72°C für 7 Minuten und schließlich Anhalten der Reaktion bei 4°C.

Weitere Primer für Fragment 1 waren:

S1b-Primer (forward): 5`-CGG TTC CAC AAG CTT AAG-3`

Annealingtemperatur: 55°C

S1c-Primer (forward): 5`-CGG TTC CAC AAG CTT AAG GAT GAC-3`

Annealingtemperatur: 55°C

S1d-Primer (forward): 5`-CTT CCC GCA AGC TTC CAC TG-3`

Annealingtemperatur: 55°C

Zur anschließenden Trennung und Identifikation von DNA-Produkten wurde nach Standardmethoden die Agarosegel-Elektrophorese (bei RNA-Produkten die Agarosegel-Formaldehyd-Elektrophorese) eingesetzt.

6.2.4 real-time PCR /rt-PCR

Die real-time PCR wurde 1993 von **Higuchi et al** erstmals beschrieben. Im Sinne einer qualitativen Analyse kann man mit dieser Methode Genomsequenzen und DNA- Mutationen messen. Bei der häufiger angewandten quantitativen Analyse kann man die Expression von Genen, DNA-Duplikationen oder -Deletionen oder auch Virustiter bestimmen (**Ding and Cantor 2003**).

Ziel der rt-PCR ist das Unterscheiden und Messen spezifischer Nucleinsäure-Produkte aus einer relativ geringen Ausgangsmenge. Ein bestimmtes Target wird amplifiziert, und dieser Vorgang wird durch den Einsatz von Fluoreszenz-Markern sichtbar gemacht. Dabei korreliert die Fluoreszenz-Intensität, wenn sie ein bestimmtes Level überschreitet, mit der Zunahme der entsprechenden Nucleinsäure-Menge im Versuchsansatz. Durch diesen Vorgang wird eine Quantifizierung ermöglicht und die DNA- Menge sowohl bei Versuchsbeginn als auch bei jedem rt-PCR-Zyklus quantitativ messbar. Die real-time PCR ist die bislang sensitivste Methode zur Messung und Entdeckung von Nucleinsäuren, sofern man adäquate Primer zu PCR besitzt. Die Messung nimmt hierbei einen exponentiellen Verlauf:

$$N_n = N_0 \times (1+E)^n$$

N_n : DNA-Molekülzahl nach n Zyklen rt-PCR

N_0 : DNA-Molekülzahl zu Beginn der rt-PCR

$0 < E < 1$: optimalerweise ist E nahe 1 vor der Plateauphase der PCR

Die Effizienz der PCR hängt also von E ab. E wiederum wird durch die Länge und Sequenz der zu analysierenden Nucleinsäure, die Zusammensetzung des Reaktionspuffers, Zyklenzahl und Primerdesign bestimmt und kann auch innerhalb einer rt-PCR wegen nachlassender Enzymaktivität, Verbrauch von Reagentien oder Akkumulation von Pyrophosphat- Molekülen variieren. Sobald die Plateauphase der PCR erreicht ist, geht E gegen 0 (**Ding and Cantor 2003**).

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde als fluoreszierendes Agens SYBR green eingesetzt.

Die Zunahme der Fluoreszenz- Emission wird während der Reaktion, also in „real time“, durch einen Sequenz Detector, hier der ABI Sequenz Detector 7700, gemessen. Sie ist also eine direkte Konsequenz der Amplifikationsrate des Targets.

6.2.5 real-time reverse Transkriptase-PCR/ rt-RT-PCR

Die rt-RT-PCR ist zwar die sensitivste Methode, um PCR-Produkte quantitativ zu messen, es gibt aber auch einige Schwierigkeiten und Methoden, die kontrovers bewertet werden. Auf diese wird in der Diskussion eingegangen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche wurde mit der two tubes-two enzymes-Reaktion gearbeitet. Dabei wird zuerst cDNA hergestellt und dann eine rt-PCR, die quantitativ analysiert wird, durchgeführt.

Außerdem wurde hier SYBR Green benutzt.

Zur Quantifizierung der Resultate wurde eine Standardkurve erstellt.

Dafür wurde aus humanen SHSY5Y-Zellen cDNA synthetisiert, eine Konzentrationsreihe hergestellt, aliquotiert, um Kontaminationen bei wiederholtem Auftauen zu vermeiden, und die Expression der hier gefragten Gene β -actin, GAPDH, TM9SF1 und TMEFF1 in der rtPCR gemessen. Daraus wurde eine Standardkurve berechnet, und bei jeder rtPCR wurde eine der aliquotierten cDNA-Proben mitpipettiert, so dass man einen Bezug zur Standardkurve herstellen konnte.

Um die Amplifikation der beiden betrachteten Gene TM9SF1 und TMEFF1 zu quantifizieren, wurden sie ins Verhältnis zu den house-keeping-Genen (HKG) β -actin und GAPDH gesetzt.

Im Folgenden wird die Durchführung der rt-RT-PCR- Experimente beschrieben:

Die Primer für die real-time-RT-PCR lauteten:

β -actin: β -actin-forward-Primer: 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3'

Annealingtemperatur 61°C

β -actin-reverse-Primer: 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'

Annealingtemperatur 61°C

GAPDH: GAPDH-forward-Primer: 5'-CGT GGA AGG ACT CAT GAC CA-3'

Annealingtemperatur 62°C

GAPDH-reverse-Primer: 5'-GCC ATC ACG CCA CAG TTT C-3'

Annealingtemperatur: 62°C

TM9SF1: TM9SF1-forward-Primer: 5'-AGC CCT GGT ACA AGT CTA CT-3'

Annealingtemperatur: 47°C

TM9SF1-reverse-Primer: 5'-GAG GAT GCC GTA CAA AGT GT-3'

Annealingtemperatur: 47°C

TMEFF1: TMEFF1-forward-Primer: 5'-TTG TTG GGA AAG AAA GAT GAT GGA-3'

Annealingtemperatur: 54°C

TMEFF1-reverse-Primer: 5'-GAT GCA GTA ACC ATT GAG GTT TT-3'

Annealingtemperatur 54°C

Die Programmierung der rtRT-PCR bestand aus 28 Zyklen, Annealingtemperatur s.o., Elongation bei 72°C.

Es wurde zuerst für das jeweilige Gen ein Mastermix pipettiert, hier bestehend aus 25 µl der entsprechenden Primern (β-actin forward und reverse, GAPDH forward und reverse, TMEFF1 forward und reverse und TM9SF1 forward und reverse), 175 µl aqua ad iniectabilia, 375 µl 2x Puffer und 25 µl SYBR Green, wobei vorher SYBR green verdünnt wurde (599 µl aqua a.i., 1 µl SYBR green).

Abschließend kamen je 5 µl template, hier cDNA von SHSY5Y-Zellen, hinzu.

Dieser MasterMix wurde dann auf eine 96-well-Platte mit einem Volumen von 20 µl pipettiert und dann die cDNA zugegeben. Die rtPCR erfolgte dann mit 28 Zyklen.

Zur zusätzlichen Überprüfung der Reaktion wurde der Ansatz hinterher auf ein Agarosegel geladen.

7. Ergebnisse

7.1 Ergebnisse der relativen Expressionsanalyse von TM9SF1 und TMEFF1 nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Wachstumsinhibitoren von cDNA humaner SHSY5Y- Zellen

Im Rahmen dieser Versuche wurde mittels cDNA aus humanen SHSY5Y Zellen die relative Expression der Gene TM9SF1 und TMEFF1 in Bezug auf die beiden house-keeping-genes β-actin und GAPDH sowie die Beeinflussung der Expression durch die Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren wie GDNF und TGFβ und mit Wachstumsinhibitoren wie dem zytotoxischen 6-OHDA untersucht.

Im Rahmen von Versuchen, die dieser Arbeit vorhergehen, wurden humane SHSY5Y-Zellen zuerst mit den Wachstumsfaktoren GDNF und TGFβ, sowie auch mit beiden Wachstumsfaktoren gleichzeitig für 48 Stunden inkubiert und danach mit dem Wachstumsinhibitor 6-OHDA für weitere 24 Stunden inkubiert. Eine Zellkultur wurde lediglich mit 6-OHDA inkubiert. Aus diesen Zellen wurde RNA extrahiert und konserviert.

Um die relative Expression von TM9SF1 und TMEFF1 im Vergleich zu den house-keeping-genes β-actin und GAPDH zu messen, wurde aus dieser RNA cDNA hergestellt und mehrere real-time PCR's mit den Primern für β-actin, GAPDH, TM9SF1 und TMEFF1 durchgeführt.

Die folgenden Abbildungen zeigen ein Excel- Säulendiagramm mit den Mittelwerten der relativen Expression von TM9SF1 und TMEFF1 in Bezug auf β-actin bzw. GAPDH.

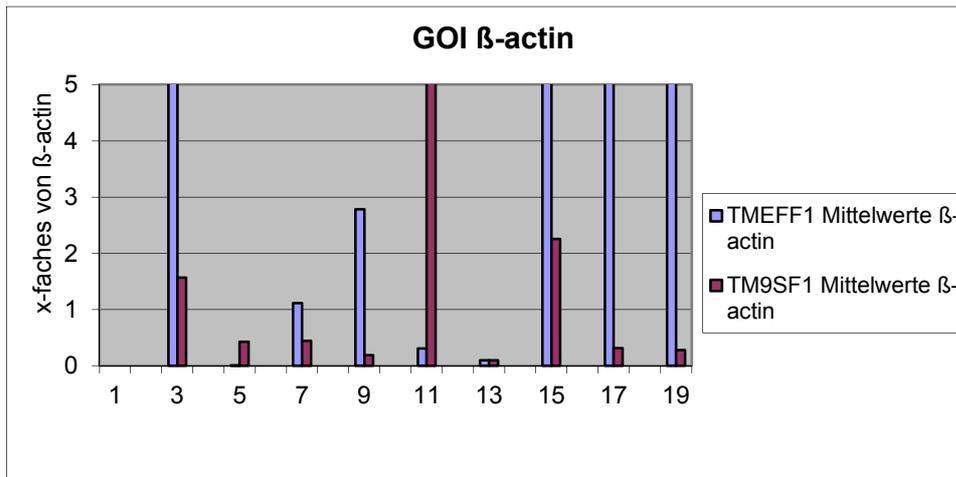


Abbildung 7: Darstellung der relativen Expression von TM9SF1 und TMEFF1 in Bezug auf β -actin
 x-Achse: 1=NTC (non template control),3=Kalibrator, 5=Kontrolle (cDNA nicht vorbehandelter SHSY5Y- Zellen),
 7=GDNF, 9=TGF β , 11=GDNF+TGF β , 13=GDNF+6-OHDA 50 μ m, 15= TGF β + 6-OHDA 50 μ m, 17= GDNF+ TGF β + 6-OHDA 50 μ m, 19= 6-OHDA 50 μ m
 y- Achse: beliebige Einheit als Vielfaches des HKG β -actin

Hier zeigt sich generell eine eher hohe Expression beider Gene im Verhältnis zu β -actin. Auch die Kalibratoren sind im Vergleich zu den Werten des GAPDH- Vergleichs insbesondere für TMEFF1 sehr hoch.

Es zeigt sich eine relative Überexpression von TM9SF1 nach der Vorbehandlung mit GDNF sowie mit TGF β + 6-OHDA. Im Vergleich dazu fällt die Reaktion auf eine Inkubation mit 6-OHDA eher schwach aus.

TMEFF1 zeigt eine deutliche Expressionssteigerung nach der Vorbehandlung mit TGF β , sowie eine starke relative Überexpression für die Inkubation mit TGF β + 6-OHDA, GDNF+ TGF β + 6-OHDA und 6-OHDA.

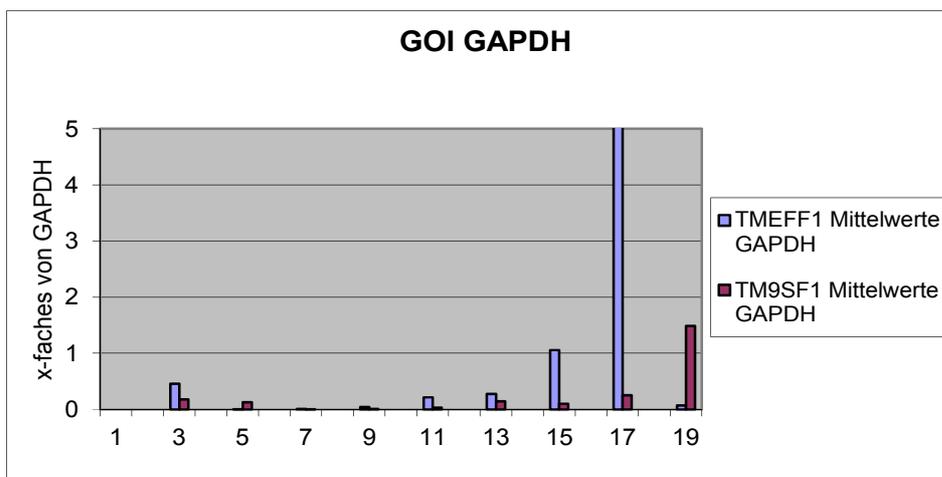


Abbildung 8: Darstellung der relativen Expression von TM9SF1 und TMEFF1 in Bezug auf GAPDH

x- Achse: 1=NTC (non template control),3=Kalibrator, 5=Kontrolle (cDNA nicht vorbehandelter SHSY5Y- Zellen), 7=GDNF, 9=TGF β , 11=GDNF+TGF β , 13=GDNF+6-OHDA 50 μ m, 15= TGF β + 6-OHDA 50 μ m, 17= GDNF+ TGF β + 6-OHDA 50 μ m, 19= 6-OHDA 50 μ m
y- Achse: beliebige Einheit als Vielfaches des HKG GAPDH

Eine Vorbehandlung mit den Wachstumsfaktoren GDNF und TGF β oder auch in der Kombination von beiden scheint die Expression von TM9SF1 in Bezug auf GAPDH kaum zu beeinflussen.

Sobald aber eine Vorbehandlung mit Wachstumsfaktoren und 6-OHDA stattgefunden hat, zeigt sich eine vermehrte Expression von TM9SF1 in Bezug auf GAPDH.

Eine deutliche Expressionsinduktion von TM9SF1 zeigt sich durch die Vorbehandlung mit 6-OHDA im Vergleich zur Kontrolle.

Für TMEFF1 lässt sich feststellen, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit den Wachstumsfaktoren TGF β und GDNF in Bezug auf GAPDH jeweils allein kaum Effekte zeigt; eine Kombination der Vorbehandlung mit TGF β und GDNF zeigt eine ähnliche Expressionsinduktion wie die Kombination der Vorbehandlung aus GDNF und 6-OHDA. Eine deutliche Steigerung der relativen Expression zeigt sich nach der Vorbehandlung mit TGF β , GDNF und 6-OHDA.

Durch eine Vorbehandlung mit 6-OHDA lässt sich so gut wie kein Effekt erzielen.

7.2 Ergebnisse der relativen Expressionsanalyse von TM9SF1 und TMEFF1 aus humanem Sektionsgewebe

Im Rahmen der Arbeit wurde ebenfalls die relative Expression der Gene TM9SF1 und TMEFF1 in verschiedenen humanen Geweben untersucht. Die Gewebeproben stellte das Institut für Pathologie der Technischen Universität München/ Klinikum Rechts der Isar aus fünf Autopsien zur Verfügung. Insgesamt wurden 20 verschiedene Gewebarten untersucht, davon neun aus unterschiedlichen Gehirnregionen (Parietallappen, Occipitallappen, Marklager, Ncl. caudatus, Thalamus, Hippocampus, Medulla oblongata, Appendix vermiformis) und 11 aus anderen Organen (Leber, Lunge, Niere, Milz, Herz, Schilddrüse, Darm, Prostata, Harnblase, Muskel- und Fettgewebe). Aus dem humanen Gewebe wurde zuerst RNA entsprechend dem Trizol-Protokoll extrahiert und gepoolt, um interindividuelle Abweichungen zu vermeiden. Danach wurde cDNA hergestellt und probeweise je eine PCR mit Primern der house-keeping-genes β -actin und GAPDH sowie mit TM9SF1-Primern durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich eine Analyse mittels quantitativer real- time PCR lohnt. Bei der Darstellung der PCR auf einem Agarosegel ließ sich zeigen, dass sowohl die house-keeping-genes als auch TM9SF1 per PCR darstellbar waren.

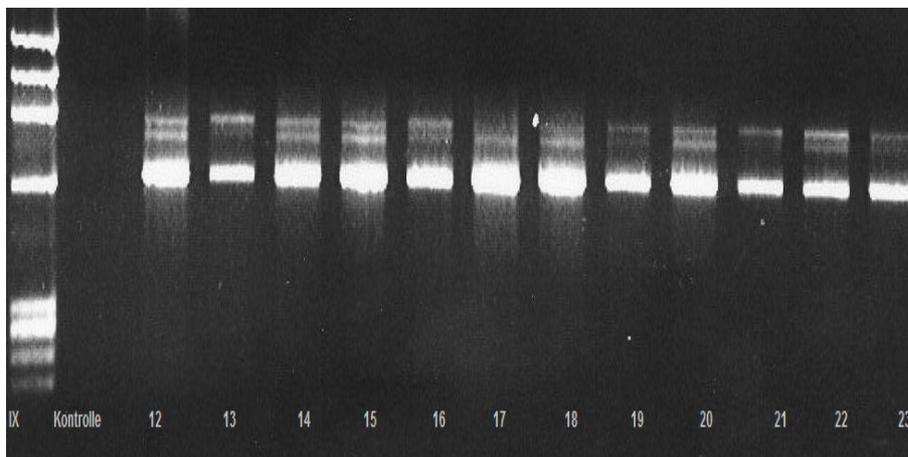
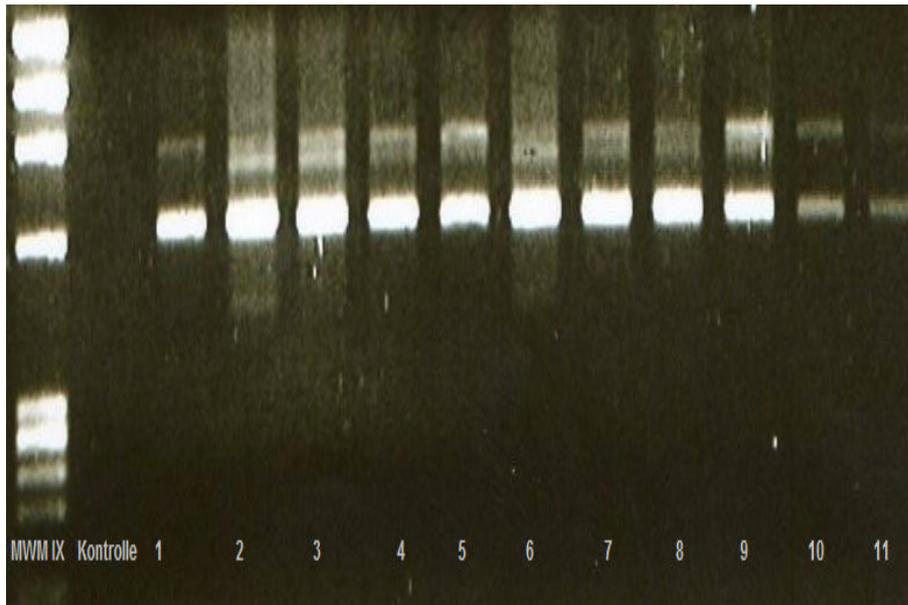


Abbildung 9: Nachweis des HKG β -actin aus den Autospie-Geweben

PCR mit β -actin- Primern (IX= MWM IX/Roche, Ko=Kontrolle, 1=Leber, 2=Lunge, 3=Niere, 4=Milz, 5=Herz, 6=Schilddrüse, 7=Darm, 8=Prostata, 9=Blase, 10=Muskel, 11=Fettgewebe, 12=Frontallappen, 13=Parietallappen, 14=Occipitallappen, 15=Marklager, 16= Ncl. caudatus, 17=Thalamus, 18=S. nigra, 19=Hippocampus, 20=Hypothalamus, 21=Medulla oblongata, 22= Kleinhirn, 23= KH- Wurm)

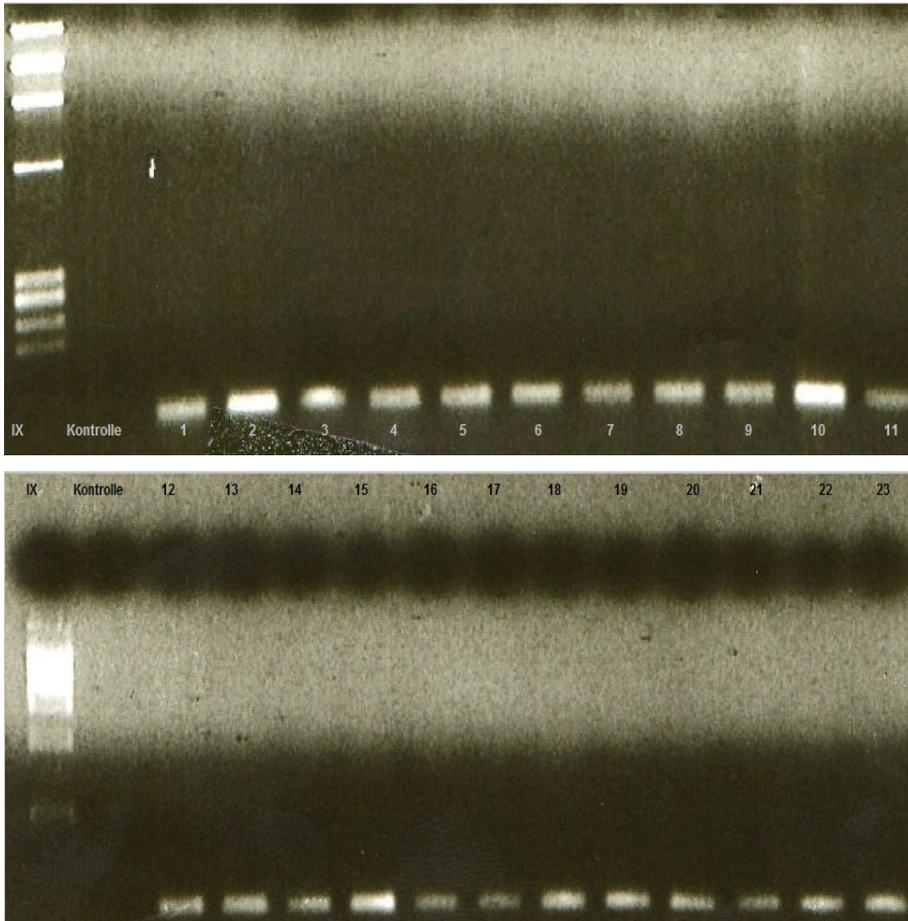
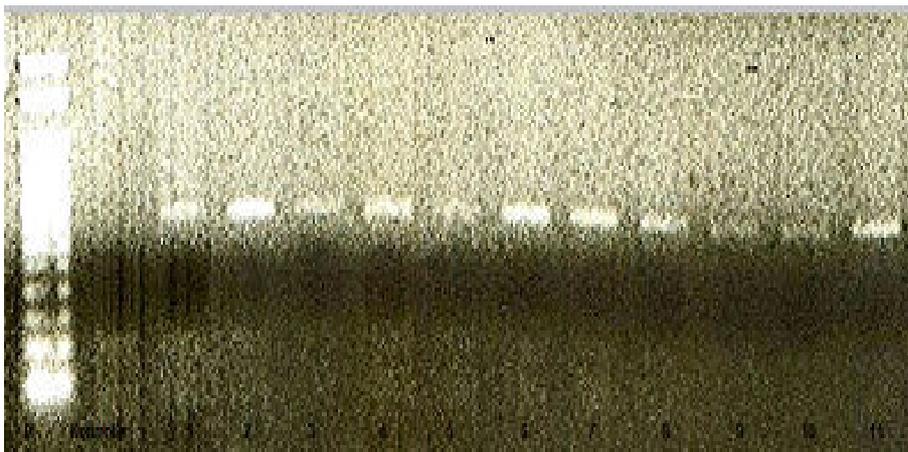


Abbildung 10: Nachweis von GAPDH aus den Autopsie- Geweben

PCR mit GAPDH- Primern (IX= MWM IX/Roche, Ko=Kontrolle, 1=Leber, 2=Lunge, 3=Niere, 4=Milz, 5=Herz, 6=Schilddrüse, 7=Darm, 8=Prostata, 9=Blase, 10=Muskel, 11=Fettgewebe, 12=Frontallappen, 13=Parietallappen, 14=Occipitallappen, 15=Marklager, 16= Ncl. caudatus, 17=Thalamus, 18=S. nigra, 19=Hippocampus, 20=Hypothalamus, 21=Medulla oblongata, 22= Kleinhirn, 23= KH- Wurm)



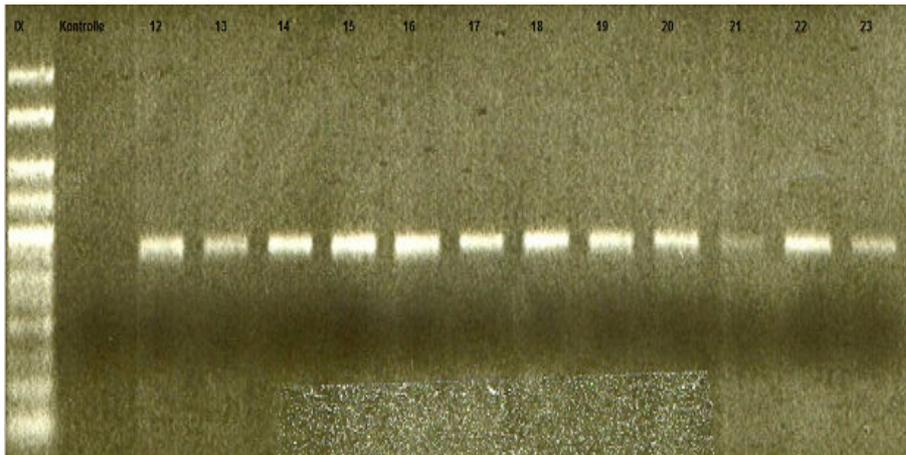


Abbildung 11: Nachweis von TM9SF1 aus den Autopsie- Geweben

PCR mit TM9SF1-TaqMan-PCR- Primern (IX= MWM IX/Roche, Ko=Kontrolle, 1=Leber, 2=Lunge, 3=Niere, 4=Milz, 5=Herz, 6=Schilddrüse, 7=Darm, 8=Prostata, 9=Blase, 10=Muskel, 11=Fettgewebe, 12=Frontallappen, 13=Parietallappen, 14=Occipitallappen, 15=Marklager, 16= Ncl. caudatus, 17=Thalamus, 18=S. nigra, 19=Hippocampus, 20=Hypothalamus, 21=Medulla oblongata, 22= Kleinhirn, 23= KH- Wurm)

Anschließend wurde eine quantitative real-time PCR mit SYBR green durchgeführt, in der die Genexpression im Verhältnis zu den beiden house-keeping-genes β -actin und GAPDH ermittelt wurde.

Hierbei lässt sich folgendes Säulendiagramm erstellen:

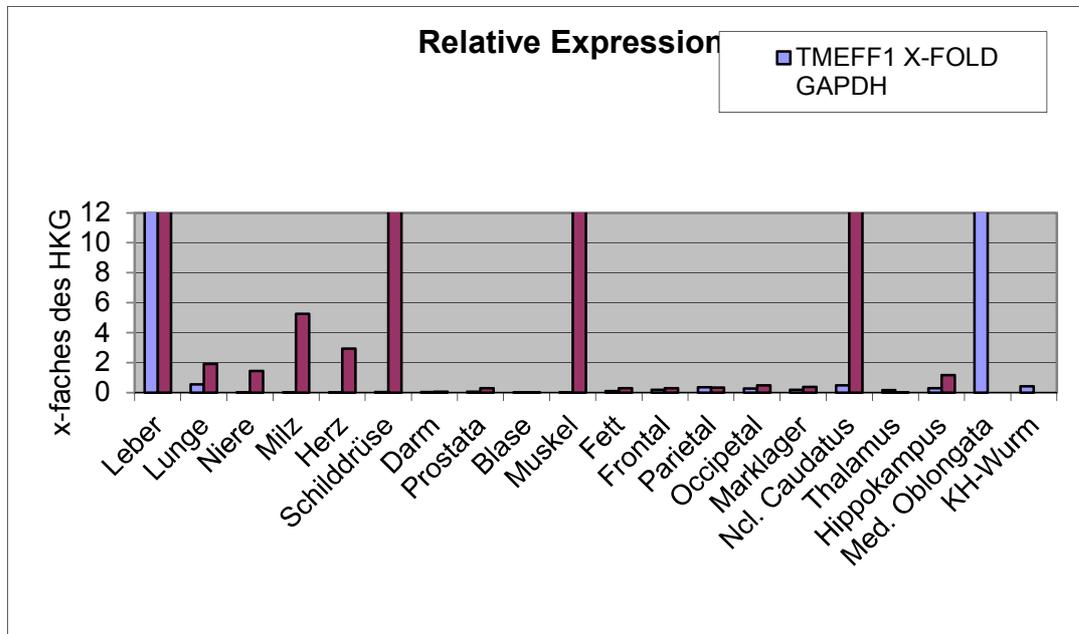


Abbildung 12: relative Expression von TM9SF1 und TMEFF1 in verschiedenen humanen Geweben

x- Achse: die 20 verschiedenen Gewebearten

y- Achse: vielfaches des jeweiligen house-keeping Gens (β -actin bzw. GAPDH)

Zusammenfassend zeigt sich hier, dass die Expression von TM9SF1 im humanen Gehirn mit Ausnahme der Basalganglien im Vergleich zur Expression z.B. in Muskel-, Leber- oder Schilddrüsengewebe relativ gering ist (vgl. hierzu **Chluba de Tapia et al 1997**).

Im Gegensatz dazu ist TMEFF1 vorwiegend in den hier untersuchten Gehirngeweben exprimiert, besonders im Hirnstamm. Außerhalb des Gehirns zeigt sich eine relativ hohe Expression in Leber und Lunge (vgl. Gery et al 2003).

7.3 Ergebnisse der TM9SF1- PCR:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem versucht, TM9SF1 aus menschlichen SHSY5Y- Zellen mittels PCR herzustellen, um das Gen nachfolgend zu klonieren und dann an menschlichen Zellen die Expressionsversuche der Gruppe Schlegel et al aus dem Jahre 2003 zu wiederholen.

Da eine Reproduktion in toto aufgrund der Größe des Gens schwierig war, wurde das Gen entsprechend einer DNA- Sequenz vom April 2004 in ursprünglich vier einander überlappende Sequenzen mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeteilt. Es sollten jeweils 4 Fragmente mittels PCR hergestellt werden, die dann im Rahmen der Klonierung des Gens in den pBluescript- Vektor wieder aneinander gefügt werden sollten.

Das Stopkodon befindet sich bei 1838 bp.

Fragment 1 ging vom Startkodon bis zu 440 bp, Fragment 2 von 440 bp bis 860 bp, Fragment 3 von 860 bp bis 1400 bp und Fragment 4 von 1400 bp bis 1900 bp. Am Beginn des Fragmentes 1 wurde eine Hind III-Schnittstelle eingefügt, am Ende von Fragment 2 und Anfang von Fragment 3 eine Pst I-Schnittstelle, am Ende von Fragment 3 eine XmaI und XbaI- Schnittstelle, die sich auch am Beginn von Fragment 4 befand, und am Ende von Fragment 4 wurde eine EagI-Schnittstelle eingefügt. Das Design der entsprechenden Primer wurde entsprechend der vorliegenden Genkarte 2004 durchgeführt.

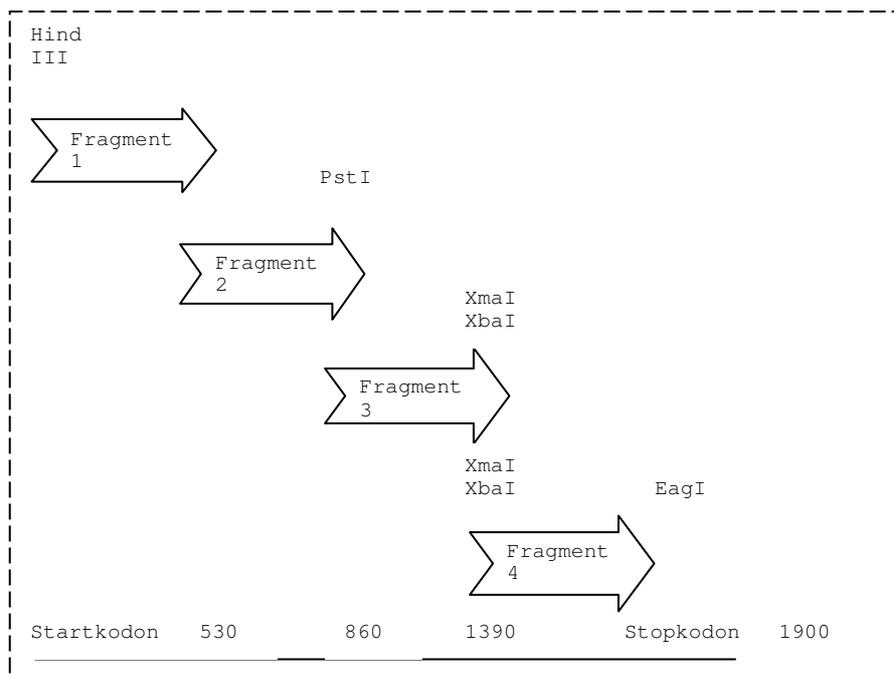


Abbildung 13: Darstellung der ursprünglichen Aufteilung von TM9SF1 in vier Fragmente. Fragment 1 ging vom Startkodon bis zu 440 bp, Fragment 2 von 440 bp bis 860 bp, Fragment 3 von 860 bp bis 1400 bp und Fragment 4 von 1400 bis 1900 bp.

Am Beginn des Fragmentes 1 wurde eine Hind III- Schnittstelle eingefügt, am Ende von Fragment 2 und Anfang von Fragment 3 eine Pst I- Schnittstelle, am Ende von Fragment 3 eine XmaI und XbaI- Schnittstelle, dies sich auch am Beginn von Fragment 4 befand, und am Ende von Fragment 4 wurde eine EagI- Schnittstelle eingefügt. Das Stopkodon liegt bei 1838 bp.

Mit diesen Primern ließen sich folgende Fragmente reproduzieren:

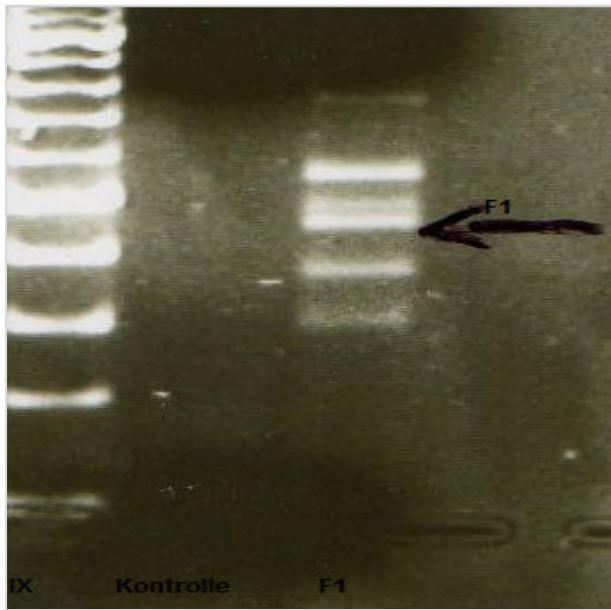


Abbildung 14: Fragment 1 mit den Primern S1-A1;

Reihenfolge MWM IX, Kontrolle, PCR-Produkt

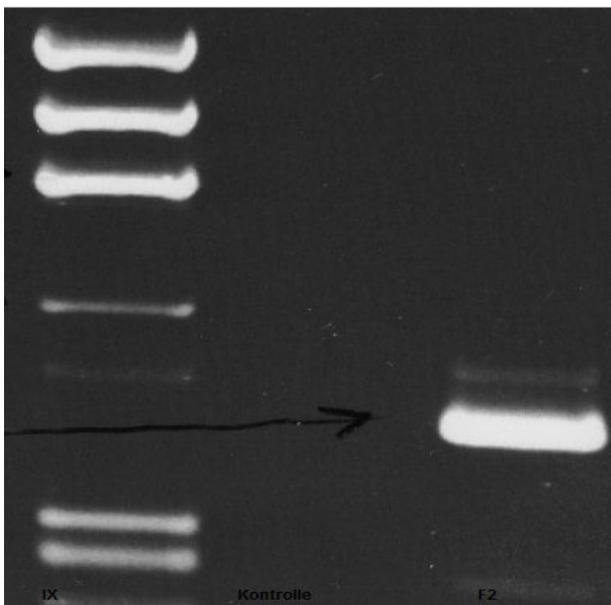


Abbildung 15: Fragment 2 mit den Primern S2-A2;

Reihenfolge MWM IX, Kontrolle,

PCR-Produkt

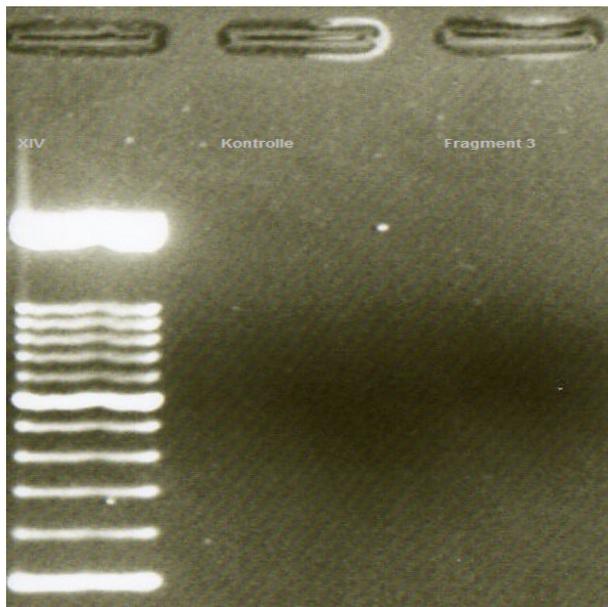


Abbildung 16: Fragment 3 mit den Primern S3-A3; Reihenfolge MWM XIV, Kontrolle, PCR-Produkt

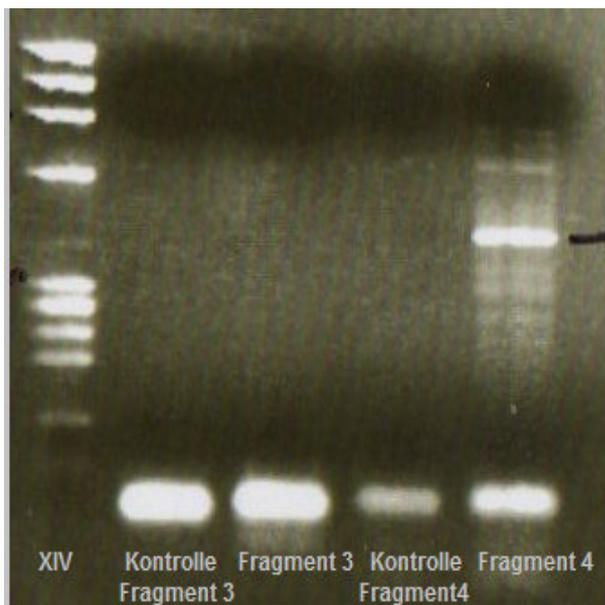


Abbildung 17: Fragment 3 mit den Primern S3-A3 und Fragment 4 mit den Primern S4-A4 Reihenfolge MWM XIV, Kontrolle Fragment 3, PCR-Produkt Fragment 3, Kontrolle Fragment 4, PCR-Produkt Fragment 4

Mit diesen Primern ließ sich lediglich für Fragment 2 ein spezifisches PCR-Produkt reproduzierbar herstellen; die Fragmente 4 und insbesondere 1 ließen sich nur mit weiteren unspezifischen Banden herstellen. Fragment 3 ließ sich selbst nach mehreren Modifikationen im PCR-Programm, z.B. einer Veränderung der Annealingtemperatur zwischen 50-56°C und Verlängerung der Annealing- und Elongationszeiten bis auf maximal 1 Minute nicht herstellen.

Es wurden daraufhin weitere Primer für Fragment 1 mit den Namen S1b, S1c, S1d bestellt. In den Versuchen mit diesen Primern konnte ebenfalls kein spezifisches PCR- Produkt gewonnen werden:

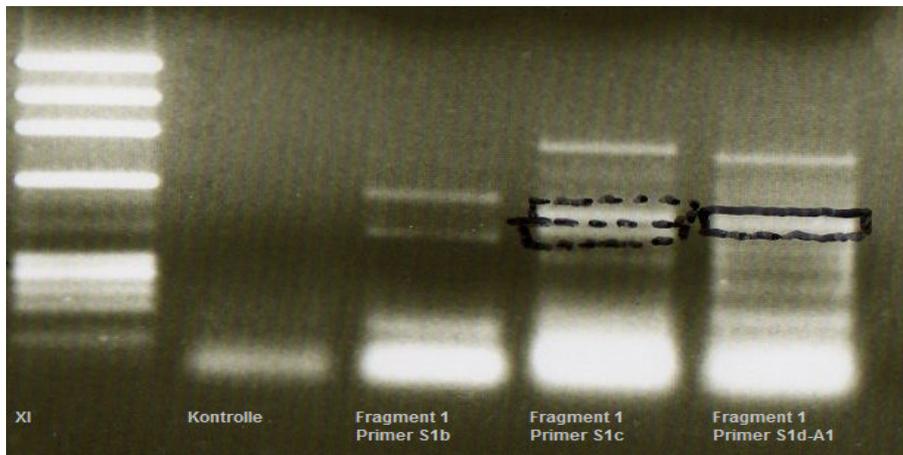


Abbildung 18: Fragment 1 mit den Primern S1b, S1c, S1d- A1 in der Reihenfolge MWM XI, Kontrolle, PCR-Produkt S1b, PCR- Produkt S1c, PCR-Produkt S1d

Nachdem die Herstellung von TM9SF1 mit diesen Primern nicht erfolgreich war, wurden bei der Aufteilung des Gens in verschiedene Fragmente Veränderungen vorgenommen:

Das ehemals lange Fragment 1 wurde in zwei kleinere Fragmente 1a und 1b unterteilt, um auf diese Weise spezifische Fragmente zu gewinnen. Insgesamt war aber Fragment 1 nun länger als bei den ersten Versuchen (1a vom Startkodon bis ca.440 bp, 1b von 435 bp bis 840 bp). Fragment 2 wurde ebenfalls in zwei kleinere Fragmente geteilt, die bis in das ehemalige Fragment 3 reichten: 2a von 702 bp bis 1090 bp, 2b von 1080 bp bis 1415 bp. Fragment 3 sollte von 1395 bp bis zum Stopkodon bei 1903 bp reichen.

An den forward-Primer von Fragment 1a wurde eine HindIII-Schnittstelle und alternativ mit einem anderen Primer eine AIII-Schnittstelle eingefügt, an den reverse-Primer von Fragment 1b eine PstI-Schnittstelle, an den reverse-Primer von Fragment 2 eine Xba-Schnittstelle und an den reverse-Primer von Fragment 3 eine SacI-Schnittstelle.

Die dazugehörigen Primer wurden auf der Basis einer neuen Genkarte von November 2006 hergestellt. Mittels der Restriktionsenzyme sollte das Gen dann in den pIRES-Vektor kloniert werden. Der pIRES-Vektor enthält eine Region, die für ein grün fluoreszierendes Protein kodiert. Bei einer erfolgreichen Genklonierung wird nicht nur das gene/ protein of interest, sondern auch das fluoreszierende Protein exprimiert und daher die Effizienz der Selektion erleichtert.

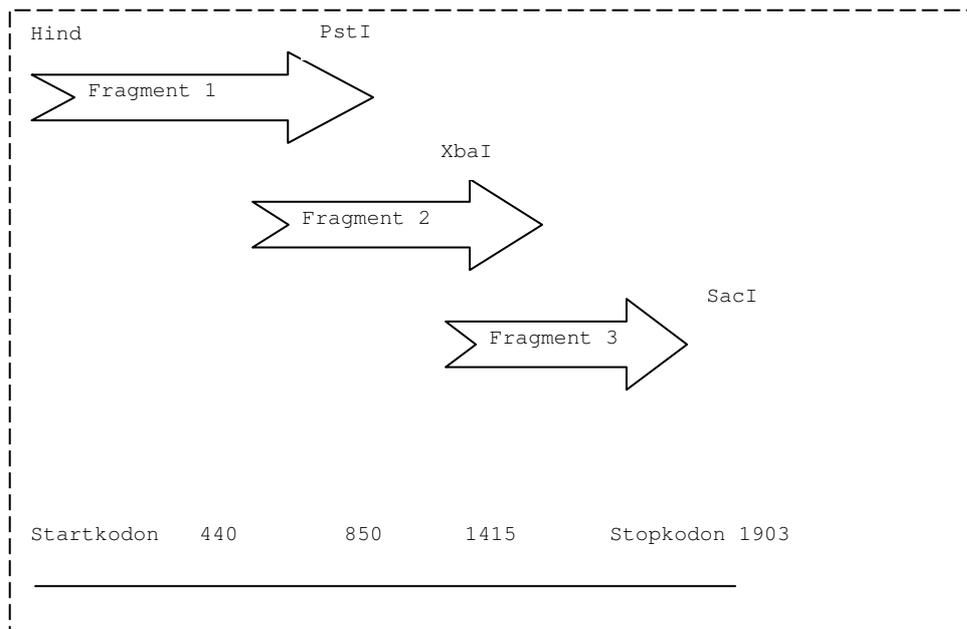


Abbildung 19: Erneute Aufteilung von TM9SF1. Das ehemals lange Fragment 1 wurde in zwei kleinere Fragmente 1a und 1b unterteilt, um auf diese Weise spezifische Fragmente zu gewinnen. Insgesamt war aber Fragment 1 nun länger als bei den ersten Versuchen (1a vom Startkodon bis ca.440 bp, 1b von 435 bp bis 840 bp). Fragment 2 wurde ebenfalls in zwei kleinere Fragmente geteilt, die bis in das ehemalige Fragment 3 reichten: 2a von 702 bp bis 1090 bp, 2b von 1080 bp bis 1415 bp. Fragment 3 sollte von 1395 bp bis zum Stopkodon bei 1903 bp reichen.

An den forward- Primer von Fragment 1a wurde eine HindIII-Schnittstelle und alternativ mit einem zweiten Primer eine AtIII-Schnittstelle eingefügt, an den reverse-Primer von Fragment 1b eine PstI-Schnittstelle, an den reverse-Primer von Fragment 2 eine Xba-Schnittstelle und an den reverse-Primer von Fragment 3 eine SacI-Schnittstelle.

Nach dieser neuen Aufteilung ließen sich folgende Fragmente gewinnen:



Abbildung 20: Fragment 1a mit den Primern F1a1-R1a, F1a2-R1a und Fragment 1b mit den Primern F1b-R1b hier in der Reihenfolge MWM IX, Kontrolle, Fragment F1a mit Primer F1a1-R1a, Fragment 1a mit den Primern F1a2-R1a und Fragment 1b; Annealingtemperatur 56°C für 30 Sekunden

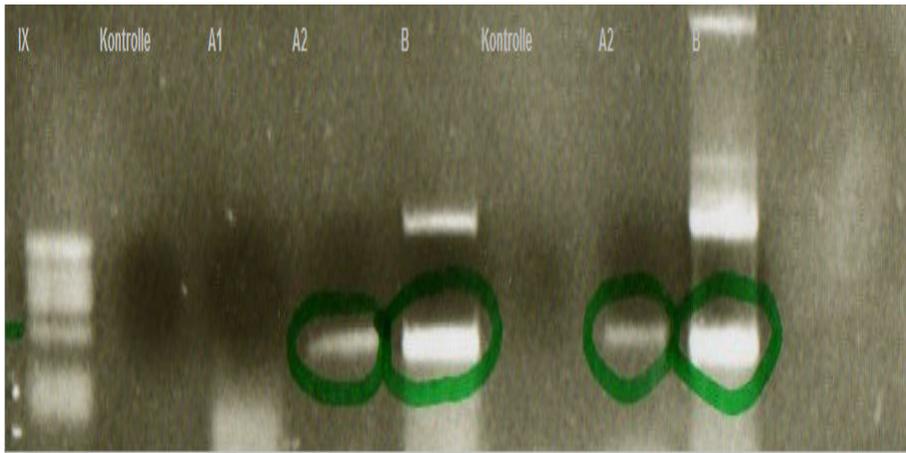


Abbildung 21: Fragment 1a mit den Primern F1a1-R1a, F1a2-R1a und Fragment 1b mit den Primern F1b-R1b von zwei verschiedenen PCR- Ansätzen hier in der Reihenfolge MWM IX, Kontrolle, Fragment F1a mit Primer F1a1-R1a, Fragment 1a mit den Primern F1a2-R1a und Fragment 1b, Kontrolle, Fragment 1a mit den Primern F1a2-R1a und Fragment 1b; Annealingtemperatur 58°C für 30 Sekunden

Mit dem Primerpaar F1a1-R1a, d.h. mit dem Primer der HindIII-Schnittstelle, ließ sich keine DNA-Bande herstellen. Es gelang jedoch, mit den beiden anderen Primerpaaren die Fragmente 1a und 1b gewinnen. Da aber eine HindIII-Schnittstelle für eine mögliche Klonierung in den pBluescript- oder pIRES-Vektor von Vorteil schien, wurde ein erneuter Versuch gemacht, Fragment I mit dem Primerpaar F1a1-R1a herzustellen. Gleichzeitig sollte mit dieser PCR das gesamte Fragment 1 aus den kleinen Fragmenten 1a und 1b gewonnen werden. Im PCR-Ansatz wurden dazu fünf verschiedene Ansätze pipettiert, wobei beim letzten Ansatz („E“ genannt), das Primerpaar F1a1-R1b verwandt wurde, also eine HindIII-Schnittstelle in das Fragment eingebaut werden sollte. In diesem Ansatz ließ sich das gesamte Fragment 1 mit dieser Primer-Kombination herstellen.

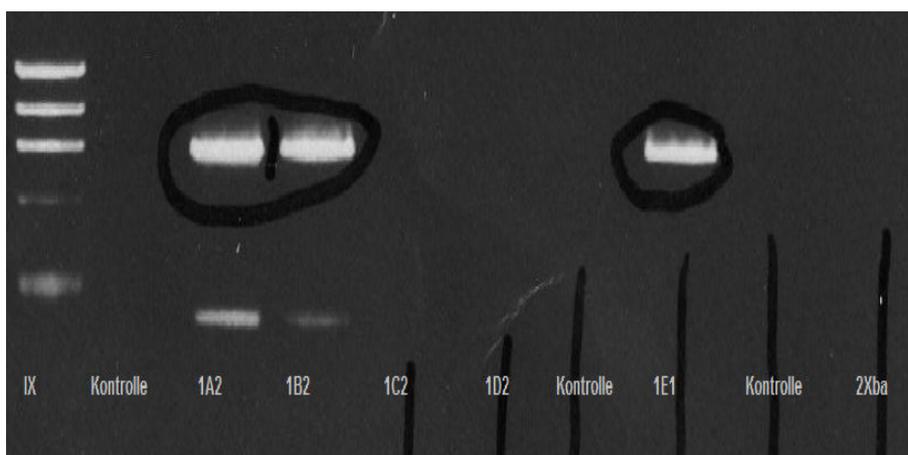


Abbildung 22: Herstellung des gesamten Fragments 1 per PCR, in Ansatz E1 mit der Primer Kombination F1a1-R1b, d.h. mit einer HindIII- Schnittstelle

Fragment 2 war ebenfalls in zwei Unterfragmente unterteilt worden (Fragment 2a und 2b mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Xba). Diese jeweils ca. 400 bp langen Fragmente konnten

zwar mittels PCR hergestellt werden, allerdings ließ sich hier, im Gegensatz zu der ersten Aufteilung des Gens, bei der Fragment 2 spezifisch gewonnen werden konnte, kein spezifisches PCR Produkt nachweisen.

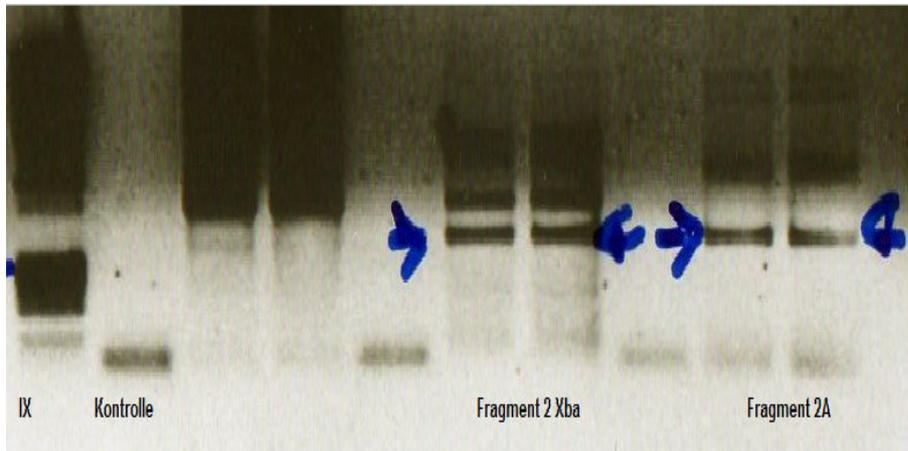


Abbildung 23: PCR der Fragmente 2bXba und 2a

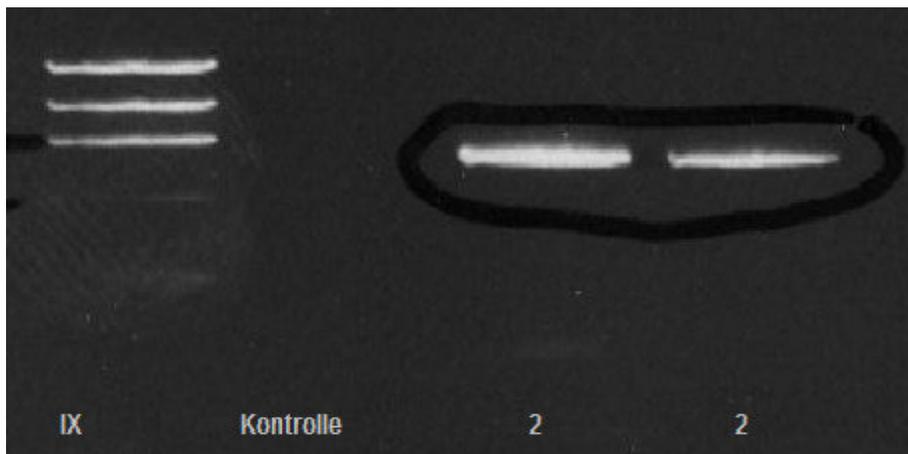


Abbildung 24: Fragment 2

Trotzdem wurden beide Banden der Fragmente 2A und 2BXba ausgeschnitten und aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine PCR, um das gesamte Fragment 2 herzustellen. Da die DNA-Konzentration des Fragments 2A geringer war, wurden zwei verschiedene PCR- Ansätze in einem DNA-Verhältnis von 2A:2bXba= 10:1 bzw. 5:1 angefertigt.

Hierbei ergab sich schließlich ein spezifisches PCR- Produkt.

Bei der Erstellung von Fragment 3 zeigte sich zwar eine von der Länge des Fragments her passende Bande bei der anschließenden Gel- Elektrophorese, dennoch war auch nach mehreren Versuchen hier keine spezifische Bande zu erzeugen.

Obwohl trotz mehrerer Veränderungen bezüglich der Anzahl der PCR-Zyklen und Annealingtemperatur keine Verbesserung der Spezifität der Banden erreicht werden konnte, wurde aufgrund der Annahme, dass die oben gezeigte Bande dem Gen TM9SF1 entsprechen könnte und daher eine HindIII- und eine SacI-Schnittstelle enthalten müsste, ein Klonierungsversuch in den pBluescript-Vektor unternommen.

Zur Erfolgskontrolle wurde danach der Vektor wiederum mit SacI verdaut. Wenn das Einfügen von TM9SF1 in den Vektor funktioniert hätte, wäre der Vektor nun nicht mehr ca. 3000 bp sondern ca. 4900 bp lang.

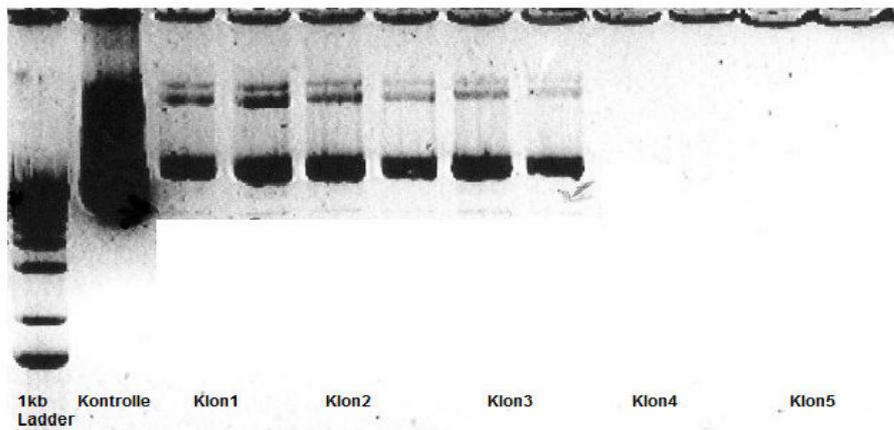


Abbildung 27: Gel-Elektrophorese des Probeverdaus von pBluescript-TM9SF1 mit SacI; als Kontrolle wurde ein nicht verdauter pBluescript pipettiert; auf dem Bild zeigen sich zarte Banden auf der Höhe kurz unterhalb der 5090-Bande des 1kb-Ladder

Zur Erfolgskontrolle, dass das Einfügen von TM9SF1 in den pBluescript- Vektor gelungen war, wurde eine DNA- Sequenzierung durchgeführt.

Im Rahmen dieser Sequenzierung konnte keine sinnvolle Abfolge der Basen gefunden werden, so dass in den Vektor zwar ein DNA- Fragment einer ähnlichen Größe wie TM9SF1 eingefügt worden war, aber nicht das gewünschte Gen TM9SF1.

Parallel zu diesem Versuch wurde eine Klonierung der einzelnen Fragmente in den pBluescript- Vektor unternommen, indem Fragment 1 über HindIII und PstI in den Vektor eingefügt wurde.

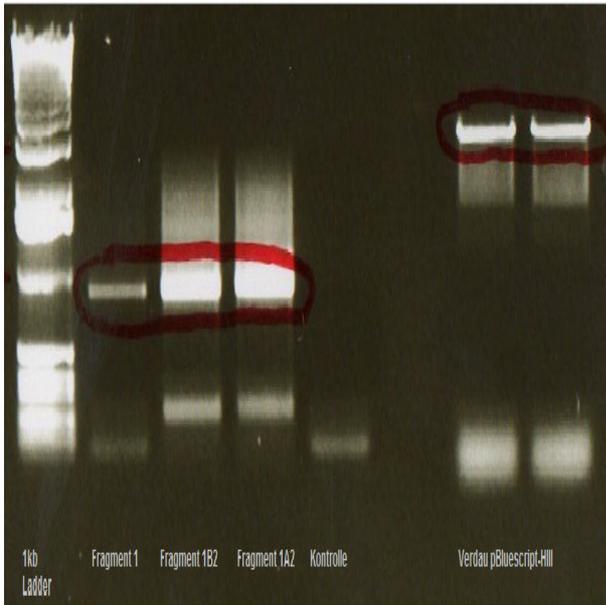


Abbildung 28: Erneute Herstellung des gesamten Fragments 1 und Verdau des pBluescript-Vektors mit HIII

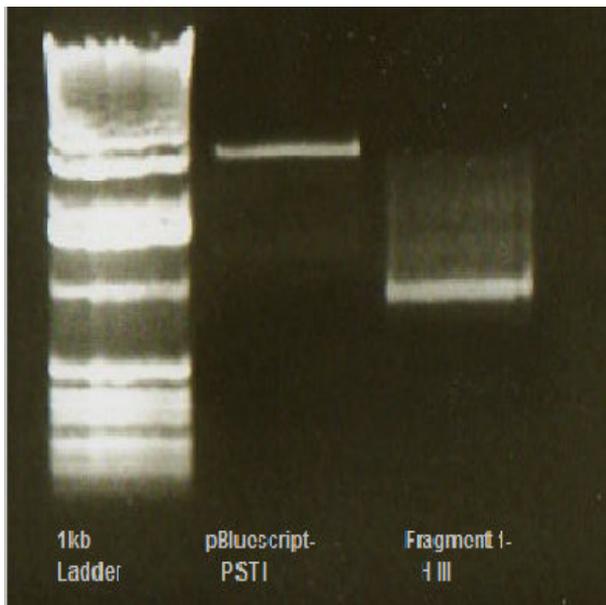


Abbildung 29: Verdau des pBluescript-Vektors mit PstI (vorher schon mit HIII verdaut) und Verdau von Fragment 1 mit HIII

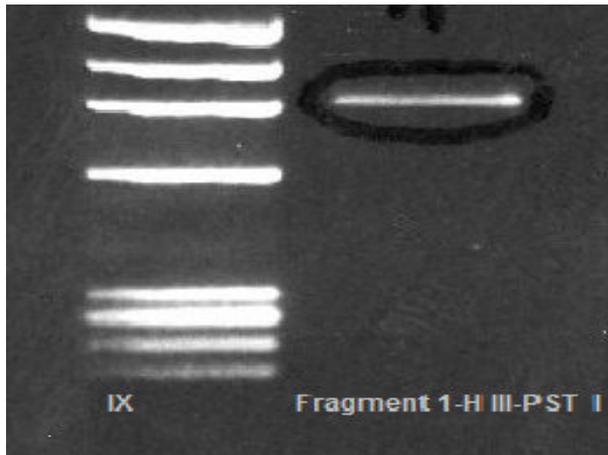


Abbildung 30: Verdau von Fragment 1 mit HIII und PstI

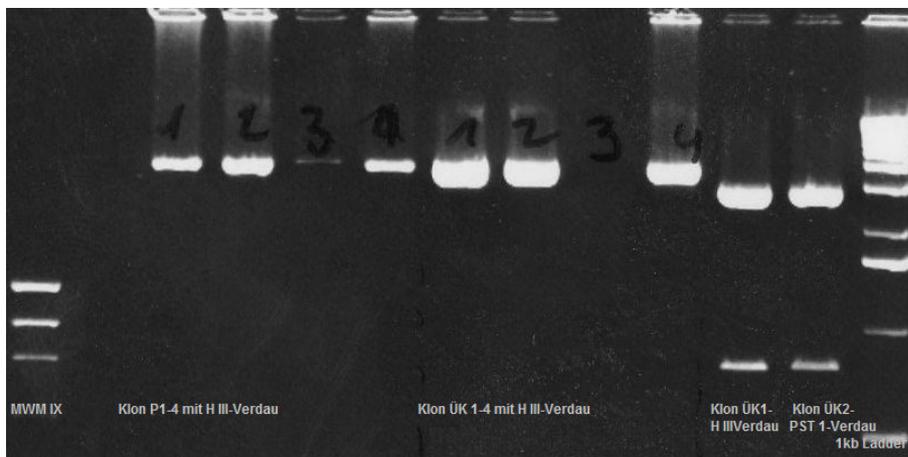


Abbildung 31: pBluescript-Vektor nach Transfektion mit Fragment 1; hier in 8 Spalten lediglich mit HIII verdaut, in 2 Spalten mit den Restriktionsenzymen HIII und PstI verdaut. Reihenfolge: MWM IX, Kontrolle, Klone P1-4 mit HIII-Verdau, Klone ÜK1-4 mit HIII- Verdau, Klone ÜK 1 und 2 mit Verdau der Restriktionsenzyme HIII und PstI, 1Kb-Ladder

Fragment 3 wurde ebenso in den pBluescript-Vektor eingefügt.

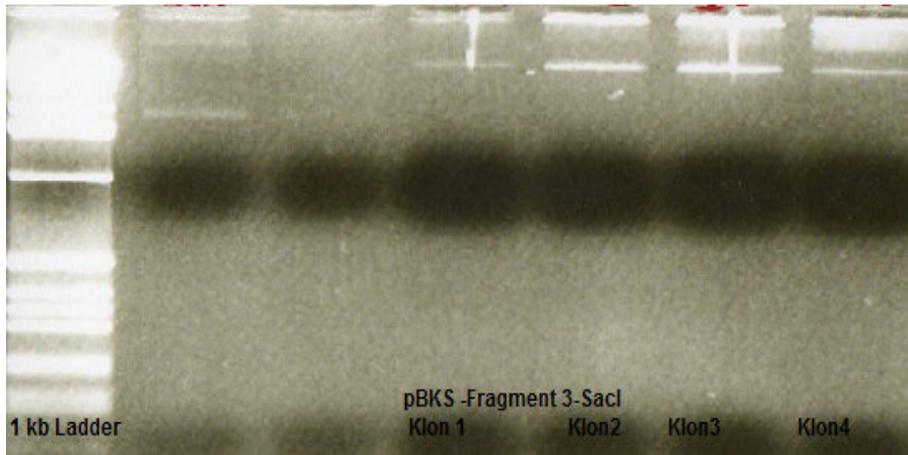


Abbildung 32: Verdau des pBluescripts mit Fragment 3 mit SacI

Lediglich das Einfügen von Fragment 2 über die Restriktionsenzyme PstI und Xba war nicht möglich. Zuerst wurden kompetente Dam⁺-Bakterien benutzt, wodurch die Xba-Schnittstelle phosphoryliert und so die Enzymaktivität gestört wurde, allerdings ließ sich Fragment 2 auch bei der Verwendung von Dam⁻-Bakterien nicht in den pBluescript-Vektor transformieren. Schließlich wurde auf eine Fortsetzung der Klonierungsversuche von TM9SF1 verzichtet.

8. Diskussion

8.1 Diskussion der Ergebnisse der RT-PCR von TM9SF1 und TMEFF1

In dieser Arbeit scheint der Bezug der durch real-time PCR gewonnenen Ergebnisse auf β -actin keine Ergebnisse zu zeigen; hier finden sich insgesamt stark erhöhte Werte, die sich auch in den Spalten drei und fünf, also den Kalibratoren (bezüglich beider Gene) und der unbehandelten Kontrolle (bezüglich TM9SF1) deutlich äußern. Insbesondere das Expressionsverhalten von TM9SF1 bei der zusätzlichen Inkubation mit 6-OHDA und besonders mit 6-OHDA allein widerspricht den Werten, die sich in Bezug auf GAPDH finden und die auch von **Schlegel et al** postuliert wurden. Vielleicht kam es hier doch zu einer vermehrten Amplifikation von Pseudogenen, die zu diesen erhöhten Werten führen.

Dahingegen scheint der Bezug auf GAPDH durchaus gute Ergebnisse zu bringen. Die relativ hohe Expression von TM9SF1 in den Basalganglien, Muskel-, Leber- und Schilddrüsengewebe wurde auch von **Chluba-de Tapia et al** bestätigt.

Auch die Untersuchungen im Rahmen der funktionellen Versuche der mit TGF β , GDNF und 6-OHDA vorbehandelten SHSY5Y-Zellen zeigen in Bezug auf GAPDH gute Ergebnisse.

Entsprechend der Versuche an PC12-Zellen von **Schlegel et al** zeigt sich für TM9SF1 auch in humanen Zellen eine starke Expressionsinduktion durch die Vorbehandlung mit 6-OHDA.

Eine alleinige Vorbehandlung mit Wachstumsfaktoren TGF β und GDNF einzeln oder auch kombiniert scheint die Expression von TM9SF1 kaum zu beeinflussen. Erst die zusätzliche Behandlung mit dem Apoptose-induzierenden 6-OHDA führt zu einem Anstieg der Expression, der bei der alleinigen Vorbehandlung mit 6-OHDA am stärksten ist.

Wahrscheinlich ist TM9SF1 innerhalb des normalen Gehirnmobilismus von eher geringer Bedeutung und wird deswegen abgesehen von der Expression in den Basalganglien im Gehirn relativ gering exprimiert; daher könnte auch die Inkubation mit GDNF allein nur geringe Effekte haben, da die Zellen keinen inhibitorischen/ apoptotischen Belastungen ausgesetzt waren. Sie wurden sozusagen aus dem Normalzustand heraus, in dem die Expression von TM9SF1 eher gering ist, mit Wachstumsfaktoren behandelt, so dass die Behandlung nur relativ geringe Wirkung zeigt. Auch eine Behandlung mit dem wachstumskontrollierenden/ inhibitorischen TGF β hat auf die Expression von TM9SF1 wahrscheinlich aus denselben Gründen keine Auswirkung.

Die Expression von TM9SF1 nimmt jedoch bei humanem Gewebe bei der Aktivierung antiapoptotischer Schutzmechanismen, wie sie z.B. durch die 24-stündige Inkubation der SHSY5Y-Zellen mit 6-OHDA induziert werden könnte, zu.

Die Versuche der Gruppe **Schlegel et al** aus dem Jahr 2003 konnten dies bereits analog an tierischen PC12-Zellen zeigen. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in einem zytotoxischen Modell des M. Parkinson von PC12-Zellen nach ENU-Mutagenese die Expression von TM9SF1 hochreguliert wird (s. Einleitung).

Außerdem wurde im Rahmen neuester Forschung 2009 postuliert, dass TM9SF1 bei Säugetieren Autophagie induzieren kann und auch in dieser Funktion mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden kann (**He et al 2009**).

Im Gegensatz zu TM9SF1 wird TMEFF1 überwiegend in Gehirngeweben sowie in Leber und Lunge exprimiert. Auch dieses Expressionsmuster wurde von anderen Arbeitsgruppen wie **Gery et al 2003** bestätigt. Insgesamt zeigt sich eine geringe Expression in glialen Zelllinien, glialen und meningealen Tumorproben.

Im Gegensatz zu TM9SF1 lässt sich durch die Inkubation mit je GDNF, TGF β oder 6-OHDA keine vermehrte Expression hervorrufen.

Die stärkste relative Expression zeigt sich bei einer Vorbehandlung mit der Kombination aus TGF β , GDNF und 6-OHDA, gefolgt von der Expression nach Vorbehandlung mit TGF β und 6-OHDA.

Man könnte hieraus folgern, dass durch eine Inkubation der SHSY5Y-Zellen mit dem wachstumskontrollierenden/- inhibitorischen TGF β und dem Apoptose-induzierenden 6-OHDA eine

Hochregulation von TMEFF1 aufgrund seiner neurotrophen Eigenschaften stattgefunden hat, die **Kanemoto et al 2001** postuliert haben.

TMEFF1 könnte so ebenfalls antiapoptotische Eigenschaften besitzen, die allerdings nicht mit einer Inkubation von 6-OHDA allein in Zusammenhang gebracht werden können.

Eine alleinige Vorbehandlung der SHSY5Y-Zellen mit dem Wachstumsfaktor GDNF könnte eine Inhibition des Zellwachstums hervorgerufen haben. Bei **Gery et al 2003** wurde beschrieben, dass Follistatin-like Domänen bei anderen Proteinen Wachstumsfaktoren binden und neutralisieren können. Außerdem konnten **Gery et al 2003** nachweisen, dass eine Überexpression von TMEFF1 in einer Inhibition des Zellwachstums resultierte.

So könnte sich die fehlende bis geringe Expression von TMEFF1 im Vergleich zu GAPDH nach einer Stimulation der Zellen mit GDNF erklären. Selbst im Vergleich zur β -actin-Expression fällt auf, dass die mit GDNF und GDNF+ 6-OHDA vorbehandelten Proben eher eine geringe Expression zeigen. Insofern lassen diese Ergebnisse auf eine wachstums-regulierende, inhibitorische Funktion von TMEFF1 schließen, sofern es z.B. durch ein Überangebot von Wachstumsfaktoren überexprimiert wird. Zusammen mit den Ergebnissen von **Gery et al 2003**, die zeigen konnten, dass TMEFF1 in Gehirntumoren eher gering, dafür aber in normalen Gehirngewebe eher hoch exprimiert wird, was die Ergebnisse dieser Doktorarbeit für das normale Hirngewebe bestätigen, könnte die Theorie, dass TMEFF1 ein Tumorsuppressorgen ist, erhärtet werden.

8.2 Diskussion der Methode der rt-RT-PCR

Die Methode der rt-RT-PCR hat einige Vorteile gegenüber anderen Methoden, um RNA quantitativ zu messen:

Die rt-RT-PCR ist die sensitivste und flexibelste Methode, um z.B. mRNA-Level in verschiedenen Proben zu vergleichen, sehr ähnliche mRNA-Sequenzen von einander zu unterscheiden oder um RNA-Strukturen zu analysieren. Die Methode erfordert das Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase vor der rt-PCR.

Die rt-RT-PCR kann man in zwei verschiedenen Ansätzen durchführen:

Entweder als sog. one tube-two enzymes-Reaktion, wobei reverse Transkriptase für die cDNA und Polymerase für die PCR im gleichen Ansatz benutzt werden, oder als die two tubes-two enzymes-Reaktion, wobei zuerst cDNA hergestellt und dann eine rt-PCR, die quantitativ analysiert wird, durchgeführt wird. Hier wurde mit der two tube-two enzymes-Methode gearbeitet.

Als fluoreszierendes Agens wurde hier SYBR Green benutzt. SYBR green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA bindet und mit vielen verschiedenen Primern und Targets

eingesetzt werden kann. Die Fluoreszenz von SYBR green ist ca. 1000-mal größer, wenn es an doppelsträngige DNA gebunden hat; in ungebundener Form ist es nicht messbar. Je größer die DNA-Konzentration, umso stärker die SYBR green-Bindung und umso größer die Fluoreszenz-Emission (**Giulietti et al 2001, Valasek et Repa 2005**).

Ein Software-Programm berechnet das Emissionsverhältnis zwischen der jeweiligen Reaktion und einer Baseline in Bezug auf die Anzahl der PCR-Zyklen. Es wird ein Schwellenwert festgesetzt, meistens die 10-fache Abweichung von der Baseline während der Zyklen 3-15; auf diese Weise wird der Punkt festgelegt, ab dem die Fluoreszenz-Emission den Schwellenwert überschreitet.

Zur Quantifizierung der Resultate kann man zwei verschiedene Methoden anwenden: das Erstellen einer Standardkurve oder den Vergleich der Probe mit einem Kalibrator.

Hier wurde mit einer Standardkurve gearbeitet (s. Methoden).

Um die Amplifikation der beiden betrachteten Gene TM9SF1 und TMEFF1 zu quantifizieren, wurden sie ins Verhältnis zu den house-keeping-Genen (HKG) β -actin und GAPDH gesetzt.

Die Reaktion ist sehr schnell (ca. 2h im ABI Sequenze Detecor 7700), sensitiv und genau auch bei geringen RNA-Mengen. Sie verbindet die einfache Amplifikation eines Genes in der PCR mit der gleichzeitigen quantitativen Analyse der Proben. Außerdem erlaubt sie die Analyse vieler verschiedener Proben gleichzeitig bei Benutzung einer 96-well-Platte.

Dennoch werden einige Aspekte der rt-RT-PCR, die auch in dieser Arbeit angewandt wurden, kontrovers diskutiert.

Die hier benutzte two tubes-two enzymes-Methode birgt eine größere Kontaminationsgefahr, da die cDNA-Synthese und die rtPCR in zwei getrennten Schritten vorgenommen wurden. Diese Methode verlangt einerseits sorgfältiges, sauberes Arbeiten während der cDNA-Synthese; andererseits kann man in einem Arbeitsschritt gleich mehrere cDNA-Aliquots herstellen, falls man die cDNA auch anderweitig benutzen möchte.

Bustin stellte 2002 die Theorie auf, dass die one tube-two enzymes-Methode weniger sensitiv und daher für geringe RNA-Mengen weniger geeignet ist als die hier angewandte Methode (**Bustin 2002**). Außerdem besteht bei dieser Technik die Gefahr der Kontamination der RT-PCR durch Amplifikation genomischer DNA, wenn HKG wie β -actin oder GAPDH benutzt werden, da hier eine Assoziation mit multiplen Pseudogenen besteht. In diesem Fall sollte ein DNase-Verdau mit durchgeführt werden oder man sollte zur besseren internen Kontrolle ein Tube mit DNase behandeltem Wasser mitlaufen lassen. Des Weiteren gibt es für die RT keine „hot start“ Enzyme, so dass die benutzten Enzyme bereits beim Reaktions-Setup eine gewisse Aktivität besitzen und so schon Primer annealen und Primer-Dimer oder unspezifische DNA Produkte bilden können; das TaqMan-Enzym ist bis auf eine Temperaturerhöhung auf 95 Grad Celsius inaktiv (**Peters et al 2004**).

Auch die Herstellung der cDNA mit MMLV-RT, wie hier durchgeführt, wird in einigen Publikationen nicht befürwortet (**Peters et al 2004**). In dem Labor des Instituts für Neuropathologie der TU München wird MMLV-RT aber schon lange ohne Probleme benutzt.

Die Amplifikation der DNA kann mit verschiedenen Methoden gemessen werden: Fluoreszenz-Markern, Hybridisierungsproben, Hydrolyse-Proben etc. (**Bustin 2000**).

Im Rahmen der hier durchgeführten Methode wurde das kostengünstige SYBR green zur quantitativen Analyse der Genamplifikation verwendet. SYBR green als Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert gebunden stärker als frei in Lösung.

Allerdings ist die Spezifität von SYBR green herabgesetzt, weil die Substanz auch an unspezifische PCR-Produkte (wie Primer-Dimere oder jegliche sonst amplifizierte DNA) bindet und dann fluoresziert. Man kann in diesem Fall die Spezifität erhöhen, indem man die Standardkurve entsprechend anpasst (**Ding et Cantor 2004**).

Außerdem können mehrere SYBR green Moleküle an ein DNA-Fragment binden; so könnten theoretisch lange DNA-Fragmente mehr fluoreszieren als kurze (**Bustin 2000**).

Ein größeres Problem stellt die Anwendung der house-keeping-genes (HKG) dar.

Unter House-keeping-genes (HKG) versteht man Gene, die in verschiedenen Gewebetypen gleich stark exprimiert werden und so als Vergleich für die Expressionstärke anderer Gene dienen können. Sie sollten durch das Experiment nicht beeinflusst werden (**Giulietti et al 2001**).

Die drei häufigsten HKG werden bei **Bustin 2000** beschrieben:

β -actin kodiert ein ubiquitär vorkommendes Zytoskelett-Protein, das in moderatem Level in fast allen Zelltypen präsent ist.

GAPDH ist ein glykolytisches Protein, das ebenfalls in fast allen Zelltypen exprimiert und wegen seiner konstanten Expression häufig als endogene Kontrolle bei RT-PCR benutzt wird.

rRNA (ribosomale RNA) macht 8-90% der totalen zellulären RNA aus und eignet sich gut zur internen Kontrolle, da die verschiedenen rRNA-Transkripte durch eine beständige Polymerase gebildet werden und daher die Expressionslevel auch unter Konditionen, die die mRNA-Expression beeinflussen, kaum variieren. Als HKG lässt sich rRNA gut aus Rattenleber, humanen Hautfibroblasten und einigen malignen Zelllinien gewinnen.

Generell ist es nicht möglich, vorherzusehen, welches HKG für den gerade geplanten Versuch das Beste ist (**Bustin 2002**). Daher wird in den meisten Publikationen beschrieben, dass man zuerst zu den HKG korreliert, die die Arbeitsgruppe vielleicht schon von vorherigen Versuchen kennt und die sich dort als zuverlässig erwiesen haben.

Für GAPDH gibt es Hinweise, dass es nicht zur Erstellung von Standardkurven benutzt werden sollte (**Oliveira et al. 1999, Bustin 2000, Giulietti et al. 2001, Bustin 2002, Bustin 2005**). Die GAPDH-Konzentration variiert erheblich, unter anderem zwischen einzelnen Individuen (**Bustin et al, 1999**) während einer Schwangerschaft (**Cale et al. 1997**) oder in verschiedenen Entwicklungsstadien (**Calvo et al. 1997, Kubista et al. 2006**); Insulin stimuliert z.B. die GAPDH-Transkription (**Rolland et al. 1995, Barroso et al. 1999**), ebenso wie Apoptose (**Ishitani et al. 1997**), neurodegenerative (**Tatton et al. 2000**) oder Krebserkrankungen (**Chang et al. 1998, Ripple & Wilding 1995**). Insulin stimuliert

die GAPDH-Transkription über verschiedene Insulin- abhängige Elemente im Promotor. Ein ähnlicher Mechanismus wird durch Wachstumshormone oder den Einfluß von Vitamin D vermutet (**Bustin 2000**). Dennoch geben einige Autoren an, dass eine Korrelation von Daten zum HKG GAPDH aussagekräftig sein kann (**Bustin 2002**).

Auch bei β -actin war schon früh bekannt, dass es in experimentellen Situationen in der Transkription variieren kann (**Spanakis 1993**); die Expression in Blastomeren und verschiedenen Schweinezellen und Kaninchen- Myokard ist unterschiedlich (**Bustin 2000**). Zusätzlich existieren bei β -actin Pseudogene, die bei der PCR ebenfalls amplifiziert werden, und so die Interpretation der β -actin-Transkription erschweren können (**Mutimer et al. 1998**).

Auch rRNA als HKG kann mit anderen biologischen Faktoren beeinflusst werden, und bislang wurde noch nicht quantifiziert, ob und, wenn ja, wie die Transkription von rRNA interindividuell variiert (**Bustin 2000**).

Außerdem wird auch die Benutzung von HKG in Analysen von RNA, die aus Gewebeproben gewonnen wurde, in Zweifel gezogen (**Bustin 2002**).

8.3 Diskussion der Klonierungsversuche von TM9SF1

Das ursprüngliche Ziel dieser Versuche war, das Gen TM9SF1 mittels PCR herzustellen, in den pBluescript- oder pIRES-Vektor zu klonieren und dann funktionelle Versuche analog der Versuche von Schlegel et al aus dem Jahr 2003 durchzuführen. Dabei sollte postuliert werden, dass TM9SF1 aus humanen Zellen nach Belastung mit 6- OHDA ebenso stärker exprimiert wird wie an PC12-Zellen gezeigt wurde.

Bei der ersten Aufteilung des Gens in vier Fragmente konnte letztlich die Region zwischen 860-1400 bp nicht hergestellt werden. Auch die Gewinnung von Fragment 1 mit Primern mit einer HindIII-Schnittstelle stellte sich kompliziert dar, konnte aber schließlich doch erfolgen.

Nachdem die Einteilung des Gens in drei Fragmente mit den jeweiligen Unterfragmenten 1a, 1b, 2a und 2b erfolgt war, zeigten sich hier wieder Schwierigkeiten bei der Herstellung des ersten Fragments. Da das Fragment über eine HindIII-Schnittstelle in den pBluescript-Vektor kloniert werden sollte, wurden als forward- Primer zwei verschiedene Primer, einer genau entsprechend der Gensequenz und einer mit einer eingebauten HindIII-Schnittstelle designt. Das Fragment ließ sich nur mit dem Primer ohne HindIII-Schnittstelle herstellen. Die HindIII-Schnittstelle konnte nur eingebaut werden, indem bei einer weiteren PCR das Fragment als template diente und der Primer mit der HindIII-Schnittstelle verwendet wurde.

Auch die Herstellung des Fragments 2b, also von ca. 900-1400 bp war zwar letztlich möglich, doch zeigten sich bei den anschließenden Gel-Elektrophoresen eher schwache Banden mit geringer DNA-Konzentration. Dieses Problem ergab sich auch bei der Herstellung von Fragment 3.

Bei fast allen PCR's zeigten sich unspezifische Banden, die das Ausschneiden der gewünschten Banden erschwerten.

Um dieses Problem zu lösen, wurde zum einen streng auf sauberes Arbeiten geachtet; die PCR wurde auf Eis pipettiert, um vorzeitige Reaktionen wie die Bildung von Primer-Dimeren oder einen vorzeitigen Reaktionsstart nach Hinzufügen der Taq-Polymerase zu verhindern.

Um die Effizienz der PCR's zu erhöhen, wurden zum anderen die üblichen einfachen Veränderungen an den Rahmenbedingungen unternommen: Änderung der Annealingtemperatur zur Verbesserung der spezifischen Bindung der Primer, neuer Ansatz und Veränderung der dNTP-Menge oder Veränderung der $MgCl_2$ -Konzentration zur Verbesserung der Arbeit der Taq-Polymerase. Diese Maßnahmen zeigten letztlich nicht das gewünschte Ergebnis.

Auf das Primerdesign wurde besonders geachtet, um hier eine möglichst große Sensitivität und Spezifität zu erreichen; dies wird von verschiedenen Autoren ebenfalls empfohlen (**Elnifro et al 2000**, **Li et al 2008**).

Das Primerdesign erfolgte anhand der in der Pubmed veröffentlichten Gensequenz von TM9SF1. Hierbei fiel auf, dass sich die Sequenz innerhalb von wenigen Monaten immer wieder leicht insbesondere um die Start- und Stopsequenz herum veränderte. Leider konnten die Primer nicht jedes Mal daran angepasst werden, aber dies könnte erklären, warum sich das Herstellen des ersten Fragments schwierig gestaltete.

Die Primer wurden so gewählt, dass sich ihre Annealingtemperatur um maximal 4°C unterschied, um gute Voraussetzungen für das Anlagern der Primer und die anschließende Verlängerung der Sequenz durch die Taq-Polymerase zu gewährleisten.

Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII (Fragment 1a) und Xba (Fragment 2b) mussten artefiziell hergestellt werden, es wurde aber darauf geachtet, dass maximal zwei Basen zur Originalsequenz verändert werden mussten, um die Reaktion möglichst wenig zu beeinflussen. Trotzdem könnten diese Veränderungen mit ein Grund dafür sein, warum sich diese Primer schlecht anlagerten und eine Produktion der entsprechenden Fragmente erschwert war.

Die Erstellung der Sequenz von ca.860-1400 bp war unabhängig von der Aufteilung des Gens in Fragmente schwierig. Im Rahmen der PCR wird die doppelsträngige DNA durch Denaturierung in Einzelstrang-DNA umgewandelt. Es könnte durchaus sein, dass sich in diesem Bereich die DNA zu Schleifen oder Filamenten im Sinne eines DNA-Coilings verdreht, so dass die Polymerase nicht in der Lage ist, diese Schleifen in lineare Stränge aufzubrechen.

Ein weiteres Problem könnte sich bei der Aufreinigung der PCR- Produkte aus Agarosegelen nach der Gel-Elektrophorese ergeben haben; da meist keine spezifischen Banden gewonnen werden konnten, liefen die Gele meist bei 100 Volt für 1-2 Stunden, damit sich die Banden besser von einander trennten. Dies könnte dazu geführt haben, dass die Banden relativ schwach waren und eine geringe DNA- Konzentration aufwiesen. Im Rahmen der anschließenden Aufreinigung der DNA könnte die

Konzentration der DNA weiter verringert worden sein und die anschließenden Klonierungsversuche erschwert haben.

Ursprünglich waren die Klonierungsversuche auch mit Dam⁺-Bakterien durchgeführt worden; Dam⁺-Bakterien phosphorylieren allerdings die Xba-Schnittstelle des pBluescript-Vektors, so dass das Restriktionsenzym nicht mehr schneiden kann. Eine Klonierung des 2. Fragments in Dam⁻-Bakterien war ebenfalls versucht worden, aber nicht erfolgreich gewesen.

Letztlich wurde uns das Gen TM9SF1 von einer anderen Arbeitsgruppe aus den USA in einem Vektor zur Verfügung gestellt; allerdings ließ sich nicht eruieren, in welchen Vektor das Gen kloniert worden war, so dass weitere Versuche mit diesem Gen/Vektor eingestellt wurden.

9. Ausblick

Im Rahmen dieser Versuche wurden die beiden transmembranen Proteine TM9SF1 und TMEFF1 in ihrer funktionellen Bedeutung und ihrem Expressionsverhalten untersucht.

Zwar konnte das ursprüngliche Ziel der Arbeit, TM9SF1 aus humanen Zellen zu klonieren und funktionelle Versuche damit durchzuführen, nicht erreicht werden.

Trotzdem lassen die Ergebnisse der Expressionsanalyse darauf schließen, dass TM9SF1 bei humanen Zellen eine antiapoptotische, vielleicht auch neuroprotektive Funktion übernimmt, sofern die entsprechenden Zellen vorher einem apoptotischen Streß ausgesetzt waren. Diese antiapoptotische Funktion könnte TM9SF1 für einen Therapieansatz neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. M. Parkinson interessant machen. Als transmembranes Protein könnte TM9SF1 so zu einem Ansatzpunkt einer weiteren medikamentösen Therapie einer bestehenden neurodegenerativen Erkrankung werden. Im Rahmen neuester Forschung wurde 2009 postuliert, dass TM9SF1 bei Säugetieren Autophagie induzieren kann und auch in dieser Funktion mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden kann (**He et al 2009**).

Auch die weitere Forschung der neurotrophen und wachstums- regulierenden Eigenschaften von TMEFF1 wäre vielversprechend.

Die Hochregulation von TMEFF1 nach der Inkubation der Zellen mit TGF β und 6-OHDA bestätigt die bereits von **Kanemoto et al 2001** postulierte neurotrophe Funktion des Proteins. Auch hier könnte sich ein klinischer Bezug z.B. im Rahmen der Therapie eines Schädel-Hirn-Traumas ergeben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TMEFF1 nach einer Vorbehandlung der Zellen mit dem Wachstumsfaktor GDNF eine Downregulation von TMEFF1 und dem Zellwachstum stattgefunden hat. Aufgrund dieser wachstums- regulierenden / inhibitorischen Eigenschaften von TMEFF1 könnte sich ein Therapieansatz im Rahmen der Hirntumorthherapie ergeben.

Gery et al 2003 haben die Expression von TMEFF1 zwar an Hirntumoren gemessen; allerdings wurden diese Tumore nicht aus neuronalen Zellen gezüchtet. Insofern wäre es z.B. interessant, die Expression von TMEFF1 in humanen Hirntumoren zu untersuchen. Die entsprechenden

Gewebeproben ließen sich im Rahmen der operativen Therapie von Hirntumoren oder bei Autopsien gewinnen. Zeitgleich wäre eine funktionelle Analyse der Expression von TMEFF1 in humanen Lungen- oder Pankreaskarzinomen sinnvoll, da **Gery et al 2003** eine vermehrte Expression von TMEFF1 in diesen Karzinomen nachweisen konnte. Man könnte so der Frage nachgehen, ob eine Hochregulation von TMEFF1 zwar das Wachstum oder vielleicht auch die Entstehung von Hirntumoren vermindert, aber zeitgleich das Wachstum oder die Entstehung von Lungen- oder Pankreaskarzinomen erhöht.

10. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die neuroprotektive Wirkung der transmembranen Proteine TM9SF1 und TMEFF1 untersucht werden. Für beide Proteine gab es nach Literaturlage schon Hinweise auf eine mögliche neuroprotektive (in Bezug auf TM9SF1, s. **Schlegel et al 2003**), neurotrophe (TMEFF1, s. **Eib et al 1996, Kanemoto et al 2001**) oder tumorsuppressive Wirkung (TMEFF1, s. **Ge et al 2006**).

Es wurde zunächst eine relative Expressionsanalyse der beiden Proteine im Vergleich zu den house-keeping-Genen GAPDH und β -actin in cDNA humaner SHSY5Y-Zellen durchgeführt, die mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und -inhibitoren vorbehandelt worden war. Außerdem wurde eine Analyse der relativen Expression beider Proteine ebenfalls im Verhältnis zu den house-keeping-Genen GAPDH und β -actin in verschiedenen humanen Geweben erstellt.

Schließlich wurde noch versucht, TM9SF1 aus SHSY5Y-Zellen mittels PCR zu gewinnen, um letztendlich funktionelle Versuche, die analog zu den an Rattenzellen von Schlegel et al 2003 erfolgten Versuchen geplant waren, durchzuführen. Diese Versuche waren trotz verschiedener Modulierungen im Vorgehen nicht erfolgreich und wurden schließlich abgebrochen.

Aus den Versuchen zur relativen Expression von TM9SF1 und TMEFF1 in humanen SHSY5Y-Zellen im Vergleich zu GAPDH und β -actin erhärtet sich der Eindruck der neuroprotektiven oder antiapoptotischen Wirkung von TM9SF1, da sich nach einer Vorbehandlung der Zellen mit dem Wachstumsinhibitor 6-OHDA eine deutliche Hochregulation von TM9SF1 zeigt.

Für TMEFF1 zeigen sich im Rahmen dieser Versuche ebenfalls Hinweise für die bereits von Kanemoto et al 2001 postulierten neurotrophischen Eigenschaften; außerdem ergeben sich Anzeichen für eine wachstumsregulierende, ggf. tumorsuppressive Wirkung von TMEFF1.

Die Expressionsanalyse der beiden Proteine in menschlichen Geweben im Vergleich zu β -actin und GAPDH zeigen für TM9SF1 eine vorwiegend in Muskulatur, Leber- oder Schilddrüsengewebe auftretende Expression, im menschlichen Gehirn ist es lediglich in den Basalganglien höher exprimiert. Hingegen wird TMEFF1 überwiegend in den hier untersuchten Gehirngeweben exprimiert (besonders im Hirnstamm); außerhalb des Gehirns zeigt sich mit Ausnahme von Leber und Lunge eine nur geringe Expression.

Insgesamt wäre eine weitere Erforschung der neuroprotektiven, neurotrophen und wachstumsregulierenden/ tumorsuppressiven Wirkung der beiden Proteine TM9SF1 und TMEFF1 vielversprechend.

11. Literaturverzeichnis

Autor	Titel	Journal
Abbott RD, Ross GW, White LR, Sanderson WT, Burchfiel CM, Kashon M, Sharp DS, Masaki KH, Curb JD, Petrovitch H	Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study	J Neurol 2003 Oct;250 Suppl 3:III30-9
Aebischer P, Schlupe M, Déglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE	Intrathecal delivery of CTNF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients	Nat Med 1996 Jun;2(6):696-9
Aoi M, Date I, Tomita S, Ohmoto T	GDNF induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration	Acta Neurochir (Wien) 2000;142(7):805-10
Arjona V, Mínguez-Castellanos A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, Pardal R, Méndez-Ferrer S, Martín JM, Pérez M, Katati MJ, Valencia E, García T, López-Barneo J et al 2003	Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson disease	Neurosurgery 2003 Aug;53(2):321-8; discussion 328-30
Barroso I, Benito B, Garcí-Jiménez C, Hernández A, Obregón MJ, Santisteban P.	Norepinephrine, tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during Brown adipocyte differentiation	Eur J Endocrinol. 1999 Aug;141(2):169-79
Baselga J, Arteaga CL	Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer	J Clin Oncol. 2005 Apr 10;23(11):2445-59
Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF.	Role of transforming growth factor beta in human disease	N Engl J Med. 2000 May 4;342 (18): 1350-8
Bookvar JA, Kapitonov D, Kapoor G, Schouten J, Counelis GJ, Bogler O, Snyder EY, McIntosh TK, O'Rourke DMv	Constitutive EGFR signaling confers a mobile phenotype to neural stem cells	Mol Cell Neurosci 2003 Dec;24(4):1116-30
Braak H, Bohl JR, Müller CM, Rüb U, De Vos RA, Del Tredici K	Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure of Parkinson's disease for the inclusionbody pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered	Mov. Disord. 2006 Dec;21(12):2042-51
Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR	Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors	Environ Health Perspect. 2005 Sep;113(9):1250-6
Buchser E, Goddard M, Heyd B, Joseph JM, Favre J, de Tribolet N, Lysaght M, Aebischer P	Immunoisolated xenogeneic chromaffin cell therapy for chronic pain. Initial clinical experience.	Anesthesiology 1996 Nov;85(5):1005-12; discussion 29A-30A
Burchiel KJ, Anderson VC, Favre J, Hammerstad JP	Comparison of pallidal and subthalamic nucleus deep brain stimulation for advanced Parkinson's disease: results of a randomized, blinded pilot study	Neurosurgery 1999 Dec;45(6):1375-82; discussion 1382-4
Bustin SA, McKay IA	The product of the primary	DNA Cell Biol 1999

	response gene BRF1 inhibits the interaction between 14-3-3 proteins and cRaf-1 in the yeast trihybrid system	Aug;18(8):653-61
Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S	Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients	Br J Cancer 1999 Apr;79(11-12):1813-20
Bustin SA	Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays	J Mol Endocrinol. 2000 Oct;25(2):169-93
Bustin SA	Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems	J Mol Endocrinol. 2002 Aug;29(1):23-39
Bustin SA	Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences	Expert Rev Mol Diagn. 2005 Jul;5(4):493-8
Byrd DL, Mark WJ Jr, Starr PA	Deep brain stimulation for advanced Parkinson's disease	AORN J 2000 Sep;72(3):387-90, 393-408; quiz 409-14, 416-8
Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL	Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking α -synuclein	J Neurosci 2002 Oct 15;22(20):8797-807
Cale JM, Millican DS, Itoh H, Magness RR, Bird IM	Pregnancy induces an increase in the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in uterine artery endothelial cells	J Soc Gynecol Investig. 1997 Nov-Dec;4(6):284-92
Calvo EL, Boucher C, Coulombe Z, Morisset J	Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein	Biochem and Biophys Res Commun. 1997 Jun 27;235(3):636-40
Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR	The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization	Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 15;101(24):9103-8
Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC	α -synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration	Cell. 2005 Nov 4;123(3):383-96
Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ	Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma	Oncol Rep. 1998 Mar-Apr;5(2):469-71
Chebrolyu H, Slevin JT, Gash DA, Gerhardt GA, Young B, Given CA, Smith CD	MRI volumetric and intensity analysis of the cerebellum in Parkinson's disease patients infused with GDNF	Exp Neurol. 2006 Apr;198(2):450-6
Chluba-de Tapia J, de Tapia M, Jäggin V, Eberle AN	Cloning of a human multispansing membrane protein cDNA: evidence for a new protein family	Gene. 1997 Sep 15;197(1-2):195-204
Clarkson ED, Zawada WM, Freed CR	GDNF improves survival and reduces apoptosis in human embryonic dopaminergic neurons in vitro	Cell Tissue Res 1997 Aug;289(2):207-10
Collins VP	Brain tumors: classification and	J Neurol Neurosurg

	genes	Psychiatry. 2004 Jun;75 Suppl 2:ii2-11
Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr	Kinetic stabilization of the α -synuclein protofibril by a dopamine- α - synuclein adduct	Science. 2001 Nov 9;294(5545):1346-9
Cookson MR	The biochemistry of Parkinson's disease	Annu Rev Biochem. 2005;74:29-52
Darios F, Corti O, Lücking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, Gu WJ, Hirsch EC, Rooney T, Ruberg M, Brice A	Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death	Hum Mol Genet. 2003 Mar 1;12(5):517-26
Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Takeuchi A, Ohmoto T.	Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats	Cell Transplant. 2001;10 (4-5): 397-401
Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deuschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenzl S, Mehdorn HM, Moringlane JR, Oertel W, Pinski MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J; German Parkinson Study Group, Neurostimulation Section	A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease	N Engl J Med 2006; 355: 896-908
Ding C, Cantor CR	Quantitative analysis of nucleic acids- the last few years of progress	J Biochem Mol Biol. 2004 Jan 31;37(1):1-10
Eib DW, Martens GJ	A novel transmembrane protein with epidermal growth factor and folistatin like domains expressed in the hypothalamo-hypophysis axis of <i>Xenopus laevis</i>	J Neurochem. 1996 Sep;67(3):1047-55
Elbaz A, Manubens-Bertran JM, Baldereschi M, Breteler MM, Grigoletto F, Lopez-Pousa S, Dartigues JF, Alperovitch A, Rocca WA, Tzourio C.	Parkinson's disease, smoking, and family history. EUROPARKINSON Study Group	J Neurol 2000 Oct;247(10):793-8
Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE	Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology	Clin Microbiol Rev October 2000, p. 559-570
Esper RM, Parkonin MS, Loeb JA	Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease	Brain Res Rev. 2006 Aug;51(2):161-75
Fredenburg RA, Rospigliosi C, Meray RK, Kessler JC, Lashuel HA, Eliezer D, Lansbury PT Jr	The impact of the E46K mutation on the properties of α -synuclein in its monomeric and oligomeric states	Biochemistry 2007 Jun 19;46(24):7107-18
Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD	Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas	Cancer Res. 2000 Mar 1;60 (5): 1383-7
Follmer C, Romão L, Einsiedler CM, Porto TC, Lara FA, Moncores M, Weissmüller G, Lashuel HA, Lansbury P, Neto VM, Silva JL, Foguel D.	Dopamine affects the stability, hydration and packing of protofibrils and fibrils of the wild type and variants of α -	Biochemistry. 2007 Jan 16;46(2):472-82

	synuclein	
Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, Latchman DS, Holton JL, Wood NW, Revesz T	PINK1 protein in normal human brain and in Parkinson's disease	Brain. 2006 Jul;129 (pt 7): 1720-1731
Gash DM, Zhang Z, Ai Y, Grondin R, Coffey R, Gerhardt GA	Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF	Nature 1996 Mar 21;380(6571):252-5
Ge W, Hu H, Ding K, Sun L, Zheng S.	Protein interaction analysis of ST14 domains and their point and deletion mutants	J Biol Chem 2006 Mar 17;281(11):7406-12. Epub 2006 Jan 9
Gery S, Yin D, Xie D, Black KL, Koeffler HPet	TMEFF1 and brain tumors	Oncogene 2003 May 8;22(18):2723-7
Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P	Direct brain infusion of GDNF in Parkinson disease	Nat Med. 2003 May;9(5):589-95
Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C	An overview of real-time quantitative pcr: applications to quantify cytokine gene expression	Methods. 2001 Dec;25(4):386-401
Glasgow E, Mishra L	Transforming growth factor β -signaling and ubiquinators in cancer	Endocr Relat Cancer. 2008 Mar;15(1):59-72
Glinka Y, Gassen M, Youdim MB	Mechanism of 6- OHDA neurotoxicity	J Neural Transm Suppl. 1997;50:55-66
Grossman SA and Batarra JF	Current management of glioblastoma multiforme	Semin Oncol. 2004 Oct;31(5):635-44
Groth CG	Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients	Lancet. 1995 Mar 18;345(8951):735
Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A	Genetics of Parkinson's disease and Parkinsonism	Ann Neurol.2006 Oct;60(4):389-98
Harms PW, Chang C	Tomoregulin-1 (TMEFF1) inhibits nodal signaling through direct binding to the nodal coreceptor Cripto	Genes & Development 2003 17: 2624-2629
He P, Peng Z, Luo Y, Wang L, Yu P, Deng W, An Y, Shi T, Ma D	High-throughput functional screening for autophagy-related genes and identification of TM9SF1 as an autophagosome-inducing gene	Autophagy. 2009 Jan 1;5(1):52-60
Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R	Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions	Biotechnology (N Y) 1993 Sep;11(9):1026-30
Horie M, Mitsumoto Y, Kyushiki H, Kanemoto N, Watanabe A, Taniguchi Y, Nishino N, Okamoto T, Kondo M, Mori T, Noguchi K, Nakamura Y, Takahashi E, Tanigami A	Identification and characterization of TMEFF2, a novel survival factor for hippocampal and mesencephalic neurons	Genomics. 2000 Jul 15;67(2):146-52
Ishitani R, Chuang DM	Overexpression of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase is involved in low K ⁺ - induced apoptosis but not necrosis of cultured cerebellar granule cells	Mol Pharmacol. 1997 Apr;51(4):542-50
Jellinger KA	Prevalence of vascular lesions in dementia with Lewy bodies. A postmortem study	J Neural Transm. 2003 Jul;110(7):771-8
Jendrossek V, Belka C, Bamberg M	Novel chemotherapeutic agents for the treatment of	Expert Opin Investig Drugs. 2003

	glioblastoma multiforme	Dec;12(12):1899-924
Juncos JL	Management of psychotic aspects of Parkinson's disease	J Clin Psychiatry 1999;60 Suppl 8:42-53
Jurvansuu JM, Goldman A	Recent Inventions on Receptor Tyrosine Kinase RET Modulation	Recent Pat Biotechnol. 2008; 2(1): 47-54
Kanemoto N, Horie M, Omori K, Nishino K, Kondo M, Noguchi K, Tanigami A	Expression of TMEFF1 mRNA in the mouse central nervous system: precise examination and comparative studies of TMEFF1 and TMEFF2	Brain Res Mol Brain Res. 2001 Jan 31;86(1-2):48-55
Kesari S, Ramakrishna N, Sauvageot C, Stiles CD, Wen PY	Targeted molecular therapy of malignant gliomas	Curr Oncol Rep. 2006 Jan;8(1):58-70
Kim BT, Rao VL, Sailor KA, Bowen KK, Dempsey RJ.	Protective effects of GDNF on hippocampal neurons after traumatic brain injuries in rats	J Neurosurg. 2001 Oct;95(4):674-9
Kriegstein K, Henheik P, Farkas L, Jaszai J, Galter D, Krohn K, Unsicker K	Glial cell line derived neurotrophic factor requires transforming growth factor β for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons	J Neurosci. 1998 Dec 1;18(23):9822-34
Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N	The real-time polymerase chain reaction	Mol Aspects Med. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125
Kupprion C, Motamed K	SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells	J Biol Chem. 1998 Nov 6;273(45):29635-40
Lal A, Glazer CA, Martinson HM, Friedman HS, Archer GE, Sampson JH, Riggins G	Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion	Cancer Res. 2002 Jun 15;62(12):3335-9
Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M	Randomized controlled trial of intraputamenal GDNF infusion in Parkinson disease	Ann Neurol. 2006 Mar;59(3):459-66
Lang AE and Lozano AM	Parkinson's disease (first of two parts)	N Engl J Med. 1998 Oct 8;339(15):1044-53
Lang AE and Lozano AM	Parkinson's disease (second of two parts)	N Engl J Med. 1998 Oct 15;339(16):1130-43
Li L, Wu W, Lin LF, Lei M, Oppenheim RW, Houenou LJ	Rescue of adult mouse notoneurons from injury-induced cell death by GDNF	Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Oct 10;92(21):9771-5
Li K, Brownley A, Stockwell TB, Beeson K, McIntosh TC, Busam D, Ferriera S, Murphy S, Levy S	Novel computational methods for increasing PCR primer design effectiveness in directed sequencing	BMC Bioinformatics. 2008 Apr 11;9:191
Lilienfeld DE and Perl DP	Projected neurodegenerative disease mortality in the United States, 1990-2040	Neuroepidemiology 1993;12(4):219-28
Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F	GDNF: a glial-cell line derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons	Science. 1993 May 21;260(5111):1130-2

Liss B, Roeper J	ATP- sensitive potassium channels in dopaminergic neurons: transducers of mitochondrial dysfunction	News Physiol Sci. 2001 Oct;16:214-7
Louis ED, Marder K, Cote L, Tang M, Mayeux R	Mortality from Parkinson disease	Arch Neurol 1997 Mar;54(3):260-4
Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, Leff SE	Midbrain injection of recombinant adeno- associated virus encoding rat glial cell line- derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6- hydroxydopamine- induced degeneration model of Parkinson's disease in rats	Proc Natl Acad Sci USA. 1997 Dec 9;94(25):14083-8
Mangoura D, Sun Y, Li C, Singh D, Gutmann DH, Flores A, Ahmed M, Vallianatos G	Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells	Oncogene. 2006 Feb 2;25(5):735-45
Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhim R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS	Molecular determinants of the response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors	N Engl J Med. 2005 Nov 10;353(19):2012-24
Michel PP, Hefti F	Toxicity of 6-OHDA and dopamine for dopaminergic neurons in culture	J. Neurosci Res. 1990 Aug;26(4):428-35
Morens DM, White LR, Davis JW	Re: "The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993"	Am J Epidemiol. 1996 Jul 15;144(2):198-9
Moscattello DK, Holgado-Madruga M, Emler DR, Montgomery RB, Wong AJ	Constitutive activation of phosphatidyl- inositol- 3 - kinase by naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor	J Biol Chem. 1998 Jan 2;273(1):200-6
Mutimer H, Deacon N, Crow S, Sonza S	Pitfalls of processed pseudogenes in RT- PCR	Biotechniques. 1998 Apr;24(4):585-8
Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R	Epidermal growth factor receptor- mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas	Clin Cancer Res. 2006 Dec 15;12(24):7261-70
Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER Jr, Lozano AM, Penn RD, Simpson RK Jr, Stacy M, Wooten GF; ICV GDNF Study Group	Randomized, double-blind trial of GDNF in PD	Neurology. 2003 Jan 14;60(1):69-73
Oliveira JG, Prados RZ, Guedes AC, Ferreira PC, Kroon EG	The housekeeping gene glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis	Arch Dermatol Res. 1999 Dec;291(12):659-61
Palacino JJ, Saqi D, Goldberg MS, Krauss S,	Mitochondrial dysfunction and	J Biol Chem. 2004

Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J	oxidative damage in parkin-deficient mice	Apr 30;279(18):18614-22
Patel K, Amthor H, Connolly D, Brand-Saberi B, Wilkinson DG, Cooke J, Christ B	The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis	Dev Biol 1996 Sep 15;178(2):343-62.
Peters IR, Helps CR, Hall EJ, Day MJ	Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design	J Immunol Methods. 2004 Mar;286(1-2):203-17
Puopolo M, Raviola E, Bean BP	Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons	J Neurosci. 2007 Jan 17;27(3):645-56
Reardon DA, Wen PY	Therapeutic advances in the : rational and potential role of targeted agents	Oncologist. 2006 Feb;11(2):152-64
Ripple MO, Wilding G	Alteration of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase activity and messenger RNA content by androgen in human prostate cacinoma cells	Cancer Res. 1997 Jun 15;57(12):2428-33
Rolland V, Dugail I, Le Liepvre X, Lavau M	Evidence of increased glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthetase promoter activities in transiently transfected adipocytes from genetically obese rats	J Biol Chem. 1995 Jan 20;270(3):1102-6
Saarma M	GDNF- a stranger in the TGF β -superfamily?	Eur J Biochem. 2000 Dec;267(24):6968-71
Samuels MA	Update in Neurology	Ann Intern Med. 2007 Jan 16;146(2):128-32
Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM	Diagnosis and treatment of Parkinson`s disease: molecules to medicine	J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1744-54
Schimmöller F, Singer-Krüger B, Schröder S, Krüger U, Barlowe C, Riezman H	The absence of EMP24p, a component of ER- deriveds COPII- coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi	EMBO J. 1995 Apr 3;14(7):1329-39
Schlegel J, Neff F, Piontek G	Serial induction of mutations by ethylnitrosourea in PC12 cells: a new model for a phenotypical characterization of the neurotoxic response to 6-hydroxydopamine	J Neurosci Methods. 2004 Aug 30;137(2):215-20
Shingo T, Date I, Yoshida H, Ohmoto T	Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson`s disease	J Neurosci Res. 2002 Sep 15;69(6):946-54
Sidhu A, Wersinger C, Moussa CE, Vernier P	The role of α -synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration	Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec;1035:250-70
Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G	Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK-1 mutants associated to recessive parkinsonism	Hum Mol Genet. 2005 Nov 15;14(22):3477-92
Sordella R, Bell DW, Haber DA,	Gefitinib- sensitizing EGFR	Science. 2004 Aug

Settman J	mutations in lung cancer activate ant- apoptotic pathways	20;305(5687):1163-7
Spanakis E	Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts and controls	Nucleic Acids Res. 1993 Aug 11;21(16):3809-19
Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M	Alpha-synuclein in Lewy bodies	Nature 1997 Aug 28;388(6645):839-40
Staal RG, Mosharov EV, Sulzer D	Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore	Nat Neurosci. 2004 Apr;7(4):341-6
Steece- Collier K, Maries E, Kordower JH	Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited	Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Oct 29;99(22):13972-4
Stowe RL, Wheatley K, Clarke CE, Ives NJ, Hills RK, Williams AC, Daniels JP, Gray R	Surgery for Parkinson's disease: lack of reliable clinical trial evidence	J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003 Apr;74(4):519-21
Stumm G, Russ A, Nehls M	Deductive genomics: a functional approach to identify innovative drug targets in the post- genome era	Am J Pharmacogenomics. 2002;2(4):263-71
Sullivan AM, O'Keeffe GW	The role of growth/ differentiation factor 5 (GDF5) in the induction and survival of midbrain dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease treatment	J Anat. 2005 Sep;207(3):219-26
Sulzer D	Multiple hit hypotheses for dopamin neuron loss in Parkinson's disease	Trends Neurosci. 2007 May;30(5):244-50
Sulzer D, Zecca L	Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review	Neurotox Res. 2000 Feb;1(3):181-95
Taha JM, Janszen MA, Favre J	Thalamic deep brain stimulation for the treatment of head, voice, and bilateral limb tremor	J Neurosurg. 1999 Jul;91(1):68-72
Tanner CM, Ben-Shlomo Y	Epidemiology of Parkinson's disease	Adv Neurol 1999;80:153-9
Tatton WG, Chalmers-Redman RM, Elstner M, Leesch W, Jagodzinski FB, Stupak DP, Sugrue MM, Tatton NA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling	J Neural Transm Suppl; 2000;(60):77-100
Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantiaC, Mourton T, Herrup K, Harris RC	Targeted disruption of mouse EGF- receptor: effects of genetic background on mutant phenotype	Science. 1995 Jul 14;269(5221):230-4
Tibell A, Raffael E, Wennberg L, Nordenström J, Bergström M, Geller RL, Loudovaris T, Johnson RC, Brauker JH, Neuenfeldt S, Wernerson A	Survival of macroencapsulated allogeneic parathyroid tissue one year after transplantation in nonimmunosuppressed humans	Cell Transplant. 2001;10(7):591-9
Uddin J	Glioblastoma multiforme	www.emedicine. com 2005
Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, Eiden LE	Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections	Science. 2002 May 31;296(5573):1648-9
von Coelln R, Dawson VL, Dawson TM	Parkin- associated Parkinson's disease	Cell Tissue Res. 2004 Oct;318(1):175-84
Valasek MA, Repa JJ	The power of real- time PCR	Adv Physiol Educ.

		2005 Sep;29(3):151-9
Winkler C, Sauer H, Lee CS, Björklund A	Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned neurons in a rat model of Parkinson's disease	J Neurosci. 1996 Nov 15;16(22):7206-15
Wood- Kaczmar A, Gandhi S, Wood NW	Understanding the molecular causes of Parkinson's disease	Trends Mol Med. 2006 Nov;12(11):521-8
Wong RW, Guillaud L	The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS	Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Apr-Jun;15(2-3):147-56
Wrench M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS	Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature	Neuro Oncol. 2002 Oct;4(4):278-99
Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA	Dopamine- dependent neurotoxicity of α - synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson's disease	Nat Med. 2002 Jun;8(6):600-6
Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R, Lu B	Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3- kinase/ Akt signalling	Proc Natl Acad Sci. USA. 2005 Sep 20;102(38):13670-5
Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Wenji Y, Kameda M, Matsui T, Miyoshi Y, Date I	Early transplantation of an encapsulated GDNF- producing cell dempnstrating strong neuroprotective effects in a rat model of Parkinson's disease	J Neurosurg. 2005 Jan;102(1):80-9
Yasuhara T, Borlongan CV, Date I	Ex vivo gene therapy: transplantation of neurotrophic factor- secreting cells for cerebral ischemia	Front Biosci. 2006 Jan 1;11:760-75
Yasuhara T, Shingo T, Date I	Glial cell line- derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease	Acta Med Okayama. 2007 Apr;61(2):51-6
Zeng Q, Cheng Y, Zhu K, Yu Z, Wu X, Huang K, Zhou M, Han S, Zhang Q	The relationship between overexpression of glial cell- derived neurotrophic factor and its RET receptor with progression and prognosis of human pancreatic cancer	J Intern Med Res. 2008 Jul- Aug;36(4):656-64
Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, Fink AL	The oxidation state of DJ-1 regulates ist chaperone activity toward α -synuclein	J Mol Biol. 2006 Mar 3;356(4):1036-48
Zigmond MJ, Striker EM	Animal models of Parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications	Int Rev Neurobiol. 1989;31:1-79
Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T	Mutations in LRRK2 cause autosomal- dominant parkinsonism with pleomorphic pathology	Neuron. 2004 Nov 18;44(4):601-7

12. Materialliste

Material zur cDNA- Synthese	Firma	Katalognummer
Random-Hexanucleotide-Mix	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	11 277081
dATP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	11 934511 001
dCTP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	11 934520 001
dTTP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	11 934546 001
dGTP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	11 934538 001
5x First Strand Buffer	Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA/USA)	y 00146
0,1M DTT	Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA/USA)	y 00147
M-uMLV- Reverse Transkriptase 500 U	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	11 062603 001
dNTP- Mix: Konzentration 25mM		
25 µl dATP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	
25 µl dCTP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	
25 µl dTTP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	
25 µl dGTP 100mM	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	
360 µl destilliertes Wasser		
Material zur RNA- Isolierung	Firma	Katalognummer
Trizol Reagens 100ml	GIBCO BRL Life Technologies	15596-026
Chloroform	Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO/USA)	122K3759
Isopropanol		
Ethanol 100%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	
DEPC/Diethylpyrocarbonat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	
0,1% DEPC- H ² O		
PCR- Material	Firma	Katalognummer
10xPCR Rxn Buffer	Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA/USA)	y02028
MgCl ₂ 50mM	Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA/USA)	y02016
dNTP Mix s.o.	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	
Taq DNA Polymerase 5000u/ml	Amersham Biosciences (Freiburg/Germany)	27-0799-06
aqua ad iniectionabilia 100ml	Delta Select	
Primer	Gesellschaft für Strahlenschutz und Forschung (GSF) München	
Agarosegel- Elektrophorese	Firma	Katalognummer
SeaKem Agarose for gel electrophoresis	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf/Germany)	50004 E
Ultra Pure 10xTBE Buffer	Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA/USA)	15581-028
eurobio Ethidium Bromide 0,7mg/ml	Eurobio (www.eurobio.fr)	

10x Sample Buffer/ Blue juice		
H ² O		
Molecular Weight Marker IX 50µg	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	11 44 94 60 01
1Kb- Ladder 500µg/ml	New England BioLabs (Frankfurt am Main/Germany)	N3232G
Molecular Weight Marker II 50µg	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	
Molecular Weight Marker XIV 50µg	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Germany)	
Agarose-Formaldehyd- Gele	Firma	Katalognummer
SeaKem Agarose for gel electrophoresis	Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf/Germany)	50004 E
DEPC- H ² O		
10x MOPS Puffer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	
Formaldehyd 37%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	P7331
Formamid	Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO/USA)	44H1160
6x RNA Ladepuffer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	
eurobio Ethidium Bromide 0,7mg/ml	Eurobio (www.eurobio.fr)	
3%HCL	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	
10x MOPS Puffer:		
41,8 g MOPS		
800 ml DEPC- H ² O		
mit NaOH auf einen pH von 7,0 einstellen		
16,6 ml 3M DEPC HCl, pH 5,2		
20 ml 0,5M DEPC- EDTA, pH 8,0		
mit DEPC-H ² O auf ein Volumen von 1l		
auffüllen		
6x RNA Ladepuffer:		
1mM EDTA, pH 8,0		
0,25% Bromphenol Blau		
50% Glycerol		
TaqMan- RT- PCR	Firma	Katalognummer
Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems (Foster City, CA/USA)	43 04 437
aqua ad iniectabilia 100ml	Delta Select	
		Primersequenz
Primer (gelöst in DEPC-H ² O):	Gesellschaft für Strahlenschutz und Forschung (GSF) München	
beta-actin forward		5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3'
beta-actin reverse		5'-GCC GAT CCA GGA GTA CT-3'
GAPDH forward		5'-CGT GGA AGG ACT CAT GAC CA-3'
GAPDH reverse		5'-GCC ATC ACG CCA CAG TTT C-3'

TMEFF1 forward		5'-TTG TTG GGA AAG AAA GAT GGA-3'
TMEFF1 reverse		5'-GAT GCA GTA ACC ATT GAG GTT TT-3'
TM9SF1 forward		5'-AGC CCT GGT ACA AGT CTA CT-3'
TM9SF1 reverse		5'-GAG GAT GCC GTA CAA AGT GT-3'
SYBR- Green	Molecular Probes	
Zellkultur	Firma	Katalognummer
SHSY5Y Zellen, humane Neuroblastom- Zelllinie		ATCC-Nr. CRL-2266
Growth Medium DMEM+GlucMax	Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA/USA)	
1x PBS		
Trypsin		
EDTA		
RNA- Isolierung aus Zellen	Firma	Katalognummer
RN easy- Protect Mini- Kit:	Quiagen (Hilden/Germany)	
Lyse Puffer		
RPE Puffer		
RW1 Puffer		
β- Mercaptoethanol	Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO/USA)	
Ethanol 100%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe/Germany)	
DEPC- H ² O		
Geräte		
Gelwanne		
Gelkammer		
Ultra-Turrax T8 Homogenisator		
Messständer		
Microtube Safety Cup 1,5ml		
PCR Sprint- Maschine		
Pipetten:		
0,1µl-10µl		
2µl- 20µl		
10µl- 100µl		
20µl- 200µl		
100µl- 1000µl		
Pipettenspitzen		
Waage		
eppendorf Zentrifuge		
eppendorf Zentrifuge		
RT-PCR 7700 Sequence Detector		
eppendorf Thermomixer 1,5 ml		
Serological Pipette 10ml		
Serological Pipette 5ml		
Zellkultur Testplatten		
Falcon Tubes 15ml		
Falcon Tubes 50ml		