

Untersuchung der Ablagerung von α -Synuklein-Aggregaten und der mitochondrialen Funktion im Gehirn von neugeborenen Mäusen mit peroxisomalen Biogenesestörungen (Pex11 β – und Pex13 Knockout-Maus-Modelle)

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Sascha Michel Halupczok**

aus Einbeck

Gießen 2019

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Abteilung Medizinische Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt/ PD Dr. Barbara
Ahlemeyer

Gutachter: PD Dr. Blaes

Tag der Disputation: 05.Oktober 2020

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. α -Synuklein	1
1.2. Peroxisomen	6
1.3. α -Synuklein, Peroxisomen und Parkinson Krankheit	10
1.4. Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material	12
2.1. Tiere	12
2.2. Laborgeräte	13
2.3. Allgemeine Verbrauchsmaterialien	14
2.4. Chemikalien	14
2.5. Verwendete Kits	16
2.6. Verwendete Primer	16
2.7. Verwendete Antikörper	17
2.8. Herstellen von Lösungen und Puffern	17
3. Methoden	19
3.1. Herstellung der Paraffinschnitte der Gehirne: Perfusionsfixierung der Mäuse, Paraffineinbettung, Schneiden	19
3.2. Färbungen	19
3.2.1. Klüver-Barrera Färbung	19
3.2.2. Allgemeines zur Immunfluoreszenzfärbung	20
3.2.3. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen	21
3.2.4. Immunfluoreszenzfärbung mit dem TSA-Kit und Behandlung mit Ameisensäure	23
3.2.5. Bildaufnahme und -bearbeitung	26
3.2.6. Humane Gehirpräparate.....	26
3.3. cDNA Amplifikation durch die semiquantitative polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	26
3.3.1. Allgemeines zur PCR	26
3.3.2. RNA-Isolierung	27
3.3.3. DNA-Degradierung	28
3.3.4. Umschreiben der mRNA in cDNA	29
3.3.5. Messen der RNA-Konzentration	29
3.3.6. PCR und Gelelektrophorese zur Testung der α -Syn und Parkin qRT-PCR-Primer	30
3.3.7. cDNA Amplifikation durch die quantitative polymerase Kettenreaktion qRT-PCR	31
4. Ergebnisse	32
4.1. Vorstellung der untersuchten Hirnareale in Koronarschnittebenen	32
4.1.1. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C5.....	33
4.1.2. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C10.....	34
4.1.3. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C15.....	35
4.1.4. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C20	36
4.2. Analyse der Genexpression von α -Syn und Parkin im Neocortex von <i>Pex13</i> -defizienten Mäusen	36

4.2.1. Resultate des Primertests	36
4.2.2. Resultate der qRT-PCR.....	38
4.3. Untersuchungen zur Menge an α -Syn in verschiedenen Hirnarealen von <i>Pex13</i> -defizienten Mäusen	39
4.3.1. Optimierung der Immunfluoreszenzfärbung für α -Syn	39
4.3.1.1. Verstärkung/Permeabilisierung	39
4.3.1.2. Optimierung der Verdünnungen der Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen von embryonalen Mausgehirnen	40
4.3.1.2.1. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen α -Syn	40
4.3.1.2.2. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen Vimentin	41
4.3.1.2.3. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen Komplex IV Untereinheit I der oxidativen Phosphorylierung (Oxph)	42
4.3.1.2.4. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen Parkin	43
4.3.2. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Primärantikörpern gegen α -Syn und Vimentin im Gehirn von <i>Pex13</i> -defizienten Mäusen (Gruppen 1 und 2)	46
4.3.2.1. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C5	46
4.3.2.2. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C10	49
4.3.2.3. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C15	51
4.3.2.4. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C20	54
4.3.2.5. Vorstellung der Ergebnisse der <i>Pex11β</i> Mäuse	55
4.3.3. Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Primärantikörpern gegen SOD2 und Vimentin in den Mausgehirnen der Gruppen 1 und 2	57
4.3.3.1. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C5	57
4.3.3.2. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C10	60
4.3.3.3. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C15	65
4.3.3.4. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C20	67
4.3.4. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Komplex IV der Atmungskette	68
5. Diskussion	71
5.1. α -Syn	71
5.2. Mitochondriale Funktion	76
5.3. Schlussfolgerung und Ausblick	77
6. Zusammenfassung	78
7. Summary	80
8. Abkürzungsverzeichnis	81
9. Abbildungsverzeichnis	82
10. Tabellenverzeichnis	86
11. Literaturverzeichnis	87
12. Publikationsverzeichnis	103
13. Ehrenwörtliche Erklärung	104
14. Danksagung	105

1. Einleitung

1.1. α -Synuklein

Alpha-Synuklein (α -Syn) ist ein Protein aus der Familie der wasserlöslichen Synukleine, mit dem Gen-Locus 4q21–q22 (Chen et al. 1995), welches erstmals 1988 im kalifornischen Zitterrochen *Torpedo californica* und im Rattengehirn isoliert werden konnte (Maroteaux et al. 1988). α -Syn kommt, neben Neurofilament, Ubiquitin, Parkin u.a., in großen Mengen in Lewy Körperchen (engl. „Lewy Bodies“) vor (Spillantini et al. 1997; Baba et al. 1998; Goedert 1999), welche das neuropathologische Hauptmerkmal des Morbus Parkinson darstellen (Spillantini u. Goedert 2000). Dabei handelt es sich um runde zytoplasmatische Einschlusskörperchen der Nervenzellen. Benannt wurden sie nach dem Neurologen Friedrich H. Lewy (1885 - 1950), der diese in Fosters „Handbuch der Neurologie“ 1912 das erste Mal mit Parkinson in Verbindung brachte (Foster u. Lewy 1912).

Mittlerweile sind neben α -Syn zwei weitere Mitglieder der Synukleinproteinfamilie beschrieben worden: β -Syn und γ -Syn. β -Syn wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert (ZNS), wohingegen γ -Syn sowohl im peripheren Nervensystem (PNS) (Nakajo et al. 1990; Jakes et al. 1994; Ji et al. 1997; Buchman et al. 1998; Surguchov et al. 1999), als auch in frühen Stadien von Brust- und Eierstockkrebs vorzufinden ist (Bruening et al. 2000).

Humanes α -Syn wird, ähnlich wie β -Synuklein, hauptsächlich im ZNS und nur in geringeren Mengen auch im Herz, Pankreas und Muskel exprimiert (Uéda et al. 1994), dessen Funktion dort aber kaum erforscht ist. α -Syn ist ein normaler Bestandteil von Neuronen und kommt vor allem im Bereich von Synapsen vor, wo es an der Ausschüttung von Neurotransmittern beteiligt sein soll (Iwai et al. 1995). Es sind drei Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicen entstehen. Die 140 Aminosäuren lange Isoform entsteht durch die Translation aller 6 Exons und ist die weitaus häufigste Form. Die Deletion von Exon 3 führt zur 126-Isoform, die 112-Isoform entsteht durch die Deletion von Exon 5 (Beyer 2006; Campion et al. 1995).

Die Genexpression (mRNA-Gehalt) von α -Syn ist in den verschiedenen Hirnregionen der Maus sehr unterschiedlich. So finden sich hohe Mengen an α -Syn im Neocortex, in der Amygdala, im Striatum, im Bulbus olfactorius und Hippocampus. In diesen Regionen macht α -Syn bis zu 1% der cytosolischen Proteinmenge aus (Iwai et al. 1995). Im Hirnstamm und Cerebellum hingegen konnten nur geringe Mengen nachgewiesen werden (Iwai et al. 1995). Interessanterweise nimmt die Menge von α -Syn in allen

Regionen mit steigendem Alter ab, mit Ausnahme vom Hippocampus (Maroteaux u. Scheller 1991; Malatynska et al. 2006). Ein Großteil des Proteins ist im Cytosol gelöst, ein kleiner Anteil befindet sich an der Zellmembran (Jao et al. 2004) und in Mitochondrien (allerdings nur in den Hirnregionen mit hoher Gesamtmenge an α -Syn, wie z.B. Bulbus olfactorius, Hippocampus, und Striatum). Eine Ausnahme ist hier der Neocortex, wo α -Syn trotz der hohen cytosolischen Menge nicht in Mitochondrien nachweisbar ist (Liu et al. 2009).

Die physiologische Funktion von α -Syn ist trotz intensiver Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten nur wenig verstanden. Zunächst wurde es als ein Teil der nicht-Beta-Amyloid Komponente in senilen Plaques bei Morbus Alzheimer-Patienten identifiziert (Uéda et al. 1993). Diese Entdeckung und die Tatsache, dass es nur im Gehirn in quantitativ großen Mengen exprimiert wird, lassen auf hirnspezifische Funktionen schließen. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass es keine einheitliche Sekundärstruktur hat, sondern diese sich erst durch die Interaktion mit anderen Proteinen ausbildet und sehr unterschiedlich ausfallen kann (Weinreb et al. 1996). Die N-terminale Sequenz ist für die Bindung des Proteins an Membranen verantwortlich (Bisaglia et al. 2006). Die stark repetitiven Sequenzen (Abb.1) lassen vermuten, dass es sich nicht wie ein Protein mit katalytischer Funktion falten kann (Maroteaux et al. 1988).

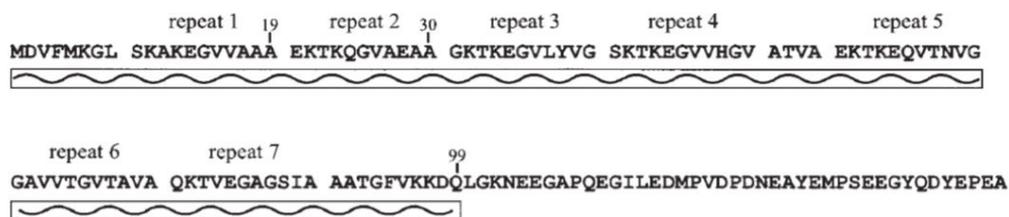


Abb. 1: Darstellung der repetitiven Aminosäuresequenz von α -Syn (übernommen aus (Bisaglia et al. 2006)).

Da es besonders häufig in Gehirnregionen mit hoher synaptischer Plastizität vorzufinden ist und dort in synaptischen Endigungen vorkommt (Jakes et al. 1994), lässt sich vermuten, dass es eine wichtige Rolle bei der normalen Funktion von Synapsen und darüber hinaus beim Lernprozess einnimmt. So konnten tatsächlich Versuche mit dem Zebrafinken zeigen, dass die Expression von Synelfin, dem homologen Gen von α -Syn besonders hoch in der Phase ist, in der der Fink sein Zwitschern lernt (George et al. 1995).

Bei Mäusen, in denen das Gen für α -Syn und/oder β -Syn ausgeschaltet wurde, zeigten sich allerdings weder ein offensichtlicher Phänotyp, noch sind grundsätzliche

Hirnfunktionen, oder die Ultrastruktur von Synapsen verändert. Auch die Freisetzung oder die Wiederaufnahme von Neurotransmittern war unverändert (Abeliovich et al. 2000; Chandra et al. 2004), jedoch nahm die Anzahl an Vesikeln ab (Murphy et al. 2000). Hinzukommend zeigten die Gehirne dieser Mäuse eine signifikant reduzierte Menge an [1-(14)C]Palmitinsäure (16:0) (Golovko et al. 2005). Des Weiteren konnte bei diesen Tieren bei konstanter, elektrischer Stimulierung eine erhöhte Freisetzung von Dopamin in der Substantia nigra und eine verminderte motorische Aktivität nach der Stimulierung mit Amphetaminen nachgewiesen werden (Abeliovich et al. 2000). Außerdem konnte α -Syn eine durch Mangan induzierte Autophagie teilweise aufheben (Yan et al. 2019). Die Tatsache, dass humanes α -Syn die veränderte SNARE-Komplex Aktivität von cysteine-string protein- α (CSP α) knockout-Mäusen teilweise aufheben kann, lässt darauf schließen, dass α -Syn eine neuroprotektive Funktion hat (Chandra et al. 2005; Bonini u. Giasson 2005). Diese Funktion erfüllt es allerdings nur, wenn es in der Lage ist in seiner α -helikalen Form an die Zellmembran zu binden. Die genetisch veränderte α -Syn Mutation A30P bildet diese α -helikalen Form nur stark eingeschränkt aus, bindet dadurch nicht mehr an die Phospholipidmembran (Perrin et al. 2000) und erfüllt damit nicht mehr diese neuroprotektive Funktion (Chandra et al. 2005). Außerdem ist α -Syn ein aktivitätsabhängiger, negativer Regulator bei der Neurotransmitterfreisetzung (Steidl et al. 2003; Watson et al. 2009).

Wesentlich gravierender sind die Folgen, wenn dieses Protein Fibrillen bildet, die sich zu großen cytoplasmatischen Einschlüssen zusammenlagern, die man Lewy bodies nennt und die zum Krankheitsbild der sog. Synukleinopathien führen (Spillantini et al. 1997; Spillantini et al. 1998; Giasson et al. 2001). Zu den Synukleinopathien wird Morbus Parkinson (Spillantini et al. 1997; Hardy u. Gwinn-Hardy 1998; Goedert 2001), Demenz mit Lewy bodies (Goedert 2001; Lim et al. 2013), die multiple-Systematrophie (Spillantini et al. 1998; Tu et al. 1998; Dickson et al. 1999; Goedert 2001), das Hallervorden-Spatz Syndrom (Kruer 2013) und Chorea Huntington (Charles et al. 2000; Furlong et al. 2000) gezählt. Fibrilläres α -Syn scheint ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Depressionen und bei Alkohol- und Kokainabhängigkeiten zu spielen (Brenz Verca et al. 2003; Liang et al. 2003; Mash et al. 2003; Pinhasov et al. 2005).

Wie α -Syn diese Krankheitssymptome hervorruft ist noch nicht geklärt. Eine Überexpression dieses Proteins reduzierte die Neurotransmitterfreisetzung (Larsen et al. 2006; Mosharov et al. 2006) und verursachte eine Neurodegeneration mit motorischer Symptomatik (Masliah et al. 2000; Feany u. Bender 2000; Auluck et al. 2002; Giasson et al. 2002; Lee et al. 2002; Kirik et al. 2002). Eine α -Syn-Überexpression löst auch

Morbus Parkinson aus (Polymeropoulos et al. 1997; Krüger et al. 1998). Analog sind mehrere Mutationen im α -Syn-Gen bekannt: A53T, A30P, und E46K (siehe Abb. 2), die beim Menschen die juvenile Form der Parkinson Krankheit auslösen (Polymeropoulos et al. 1997; Conway et al. 2000; Dev 2003; Eriksen et al. 2003; Singleton et al. 2003; Zarranz et al. 2004).

Die mRNA von der α -Syn Isoform mit 140 Aminosäuren war im frontalen Neocortex von Patienten mit einer Lewy body Demenz und von Patienten mit Morbus Alzheimer weniger stark exprimiert als in Kontrollpatienten. Hier wird aber diskutiert, dass die geringe Menge an α -Syn mRNA nur eine Folge des Verlustes von Neuronen darstellt (Beyer et al. 2004). Interessanterweise scheint die Toxizität von α -Syn an das Vorhandensein von Dopamin gekoppelt zu sein, was den gezielten Verlust von Neuronen in der Substantia Nigra (SN) beim Morbus Parkinson erklären könnte (Ganguly et al. 2019). In allen anderen Zellen erfüllt es womöglich neuroprotektive Funktionen (Xu et al. 2002), wahrscheinlich durch die Herunterregulierung der p53-Proteinmenge und dessen transkriptioneller Aktivität (Alves Da Costa et al. 2002). Auch in vitro Untersuchungen an Zellkulturen zeigten, dass α -Syn nur in Zellen, die auch Dopamin produzierten eine Apoptose auslöste. Hier bildet α -Syn einen Komplex mit dem 14-3-3 Protein, die beide in der Substantia nigra in erhöhter Menge vorkommen. Dieser Komplex geht mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht (Ostrerova et al. 1999; Hsu et al. 2000; Junn u. Mouradian 2002). Interessant ist, dass α -Syn die Synthese von Dopamin (Perez et al. 2002) und dessen Rückaufnahme aus dem synaptischen Spalt vermindert (Yavich et al. 2004). Vermittelt wird der Zelltod möglicherweise auch durch die inhibierende Wirkung von α -Syn auf den ersten Komplex der Atmungskette in Mitochondrien (Liu et al. 2009). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass das C-terminale Ende von α -Syn in vivo Proteinkomplexe binden kann, die für mitochondriale Elektronentransportproteine bestimmt sind (McFarland et al. 2008) und dass bei Morbus Parkinson die Aktivität von Komplex I reduziert ist (Schapira 1993).

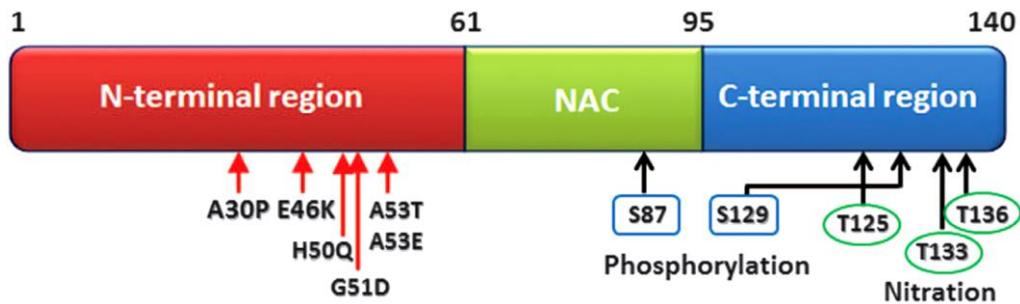


Abb. 2: Darstellung von humanem α -Syn mit bekannten Genmutationen, die mit einer familiären Form des Morbus Parkinson in Verbindung gebracht werden, sowie die Angabe der Aminosäuren die phosphoryliert bzw. nitriert werden können (übernommen aus (Basu et al. 2015)).

Die Toxizität von α -Syn ändert sich durch Mutationen und hängt zudem von seiner Phosphorylierung und Ubiquitylierung (und damit dem Abbau im Proteasom) ab. Das Protein der A53T Mutation (Abb. 2) des α -Syn-Gens wird vermindert im Proteasom abgebaut und führt so zu einem erhöhten, intrazellulären ROS Gehalt mit Zelltod und einer erhöhten Phosphorylierung von α -Syn (Smith et al. 2005). Phosphoryliertes α -Syn bildet 90% des gesamten α -Syn in Lewy bodies (Fujiwara et al. 2002; Anderson et al. 2006) und kommt dort teilweise in ubiquitylierter Form vor (Hasegawa et al. 2002). Auch führten die Mutationen A30P, E46K und A53T zu einer schnelleren Fibrillenbildung, wenn sie mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) ausgesetzt werden (Perrin et al. 2001; Greenbaum et al. 2005), die z.B. in Zellmembranen vorkommen. Es konnten einige weitere Faktoren ermittelt werden, die die Agglomeration von α -Syn beeinflussen (Hashimoto et al. 1998; Giasson et al. 1999; Narhi et al. 1999; Conway et al. 2000). So konnte gezeigt werden, dass eine pH-Erniedrigung, eine Erhöhung der Temperatur so wie der α -Syn Konzentration zu einer beschleunigten Oligomerisierung in vitro führt. Jedoch bleibt der genaue Mechanismus, der zur Agglomeration von α -Syn und schließlich zur Bildung von Lewy bodies führt sowie die möglichen Interaktionen mit anderen Komponenten (Tab.1), wie Parkin (Shimura et al. 2001), Neurofilament (Goldman et al. 1983), Ubiquitin (Kuzuhara et al. 1988) und Synphilin-1 (Wakabayashi et al. 2000) oder mit PINK-1 und DJ-1, die beide ebenfalls bei der Entstehung des Morbus Parkinson eine Rolle spielen (Bornhorst et al. 2014), ein bisher ungeklärtes Rätsel der modernen Wissenschaft.

Name	Gen	Chromosom	Vererbung	Vermutete Funktion
Park 1	α -Synuklein	4q21	dominant	Präsynaptisches Protein
Park 2	Parkin	6q25.2-27	rezessiv	Ubiquitin E3 ligase/UPS System
Park 3	unbekannt	2p13	dominant	unbekannt
Park 4	unbekannt	4p14	dominant	unbekannt
Park 5	UCH-L1	4p14	dominant	UPS-System
Park 6	Pink1	1p35-36	rezessiv	Mitochondriale Kinase
Park 7	DJ-1	1p36	rezessiv	Chapron-Funktion/Antioxidant
Park 8	LRRK2	12p11.2	dominant	Kinase
Park 9	ATP13A2	1p36	rezessiv	unbekannt
Park10	unbekannt	1p32	dominant	unbekannt
Park 11	unbekannt	2q36-37	dominant	unbekannt
Park 12	unbekannt	Xq21-q25	unbekannt	unbekannt
Park 13	HTRA2	2p12	unbekannt	

UPS=Ubiquitin-Proteasom System

Tab. 1: Auflistung aller bekannten Gene mit Genlokus und Funktion die nachweisbar an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit involviert sind (adaptiert von (Thomas u. Beal 2007)).

1.2. Peroxisomen

Das Peroxisom ist ein in allen kompletten eukaryotischen Zellen vorkommendes Zellorganell, welches 1954 durch Rhodin in der Niere entdeckt und als „Microbodies“ beschrieben wurde (Rhodin 1954). Den Namen „Peroxisom“ bekamen sie durch Christian de Duve im Jahre 1966 durch ihr Vermögen Wasserstoffperoxid zu verstoffwechseln (Duve u. Baudhuin 1966).

Diese Zellorganellen sind von einer Membran umgeben und unterscheiden sich je nach Zell- bzw. Gewebetyp (Duve u. Baudhuin 1966). In Peroxisomen findet eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen statt, wie z.B. die α - und β -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren, Teilschritte der Biosynthese von Gallensäuren, Cholesterin und die Synthese von Plasmalogenen, sowie dem Abbau von Entzündungsmediatoren. Bei den oxidativen Reaktionen werden ROS generiert, die aber in diesem Organell durch antioxidative Enzyme wieder abgebaut werden (Lazarow u. Fujiki 1985; Keller et al. 1986; van den Bosch et al. 1992; Schrader et al. 2012; Schrader et al. 2013).

Im Gegensatz zu Mitochondrien besitzen Peroxisomen keine DNA oder Ribosomen. Alle ihre Proteine werden von nukleären Genen kodiert und größtenteils an freien Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert und durch entsprechende Targeting-Signale gezielt in das Organell importiert (Subramani et al. 2000). Zurzeit sind 36 Proteine, sog. Peroxine, bekannt, die die Biogenese (Bildung, Proliferation und Matriximport) funktioneller Peroxisomen regulieren.

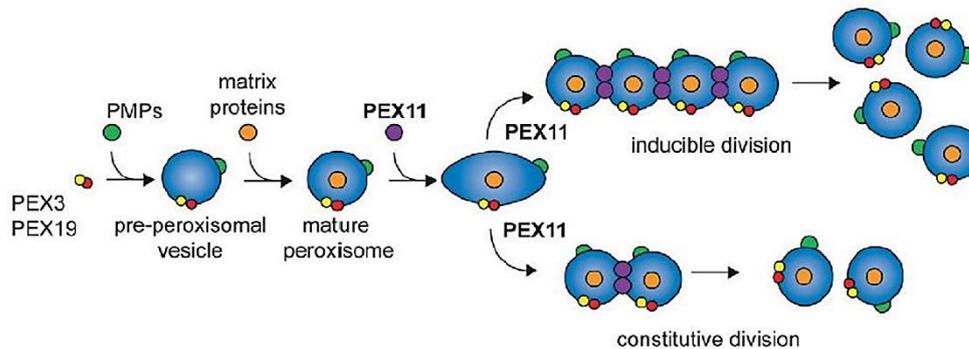


Abb. 3: Schematische Darstellung der Funktion von PEX11 bei der peroxisomalen Biogenese und Proliferation (übernommen aus (Colasante et al. 2015)).

Die Morphologie von Peroxisomen und deren Enzymzusammensetzung variiert zwischen den verschiedenen Geweben und Arten (Eckert u. Erdmann 2003). Peroxisomen können sehr flexibel auf metabolische Änderungen reagieren, z.B. proliferieren (Beier u. Fahimi 1991; Baumgart 1997) oder abgebaut werden (Pexophagie). Die Proliferation von Peroxisomen wird u.a. über Stimulation von Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) durch Lipidderivate induziert (Dreyer et al. 1992). Weiterhin spielt hier das Pex11 Protein (Abb. 3) eine wichtige Rolle. Pex11 β ^{-/-} Hefezellen besitzen eine reduzierte Anzahl an Peroxisomen, während der Metabolismus nur indirekt verändert ist (Li u. Gould 2002). Wenn sich Peroxisomen teilen, werden diese zunächst verlängert (tubuläre Form) mit anschließender Teilung und vermehrtem Import von peroxisomalen Enzymen und Membranproteinen (Reddy u. Mannaerts 1994).

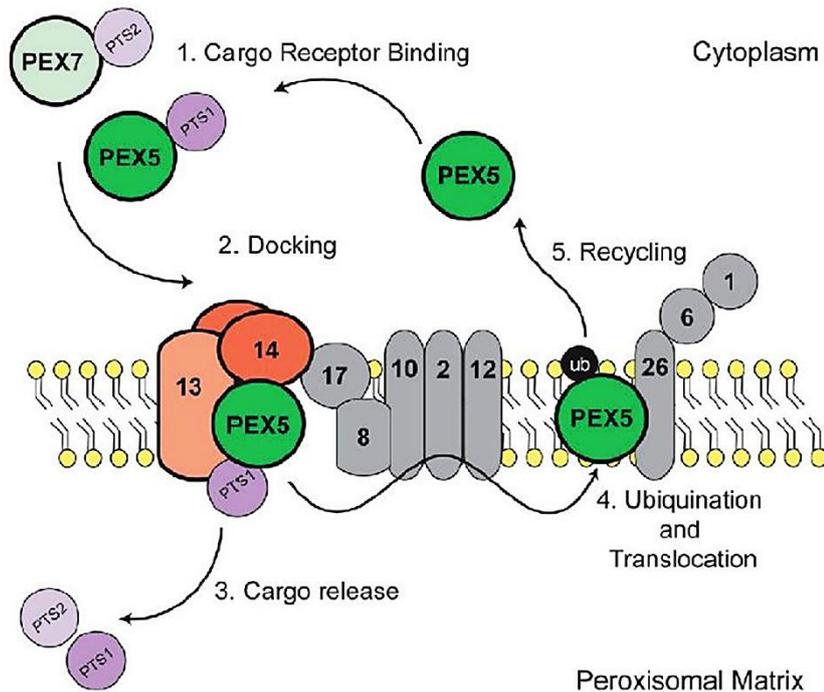


Abb. 4: Schematische Darstellung der Rolle von PEX13 beim peroxisomalen Proteinimport in die Matrix (übernommen aus (Colasante et al. 2015)).

Ein peroxisomales Membranprotein, das für den Matrixproteinimport zuständig ist, ist PEX13 (Abb. 4), das seine Rolle zusammen mit PEX14 durchführt. Darüber hinaus ist es ein Teil des sog. „Docking“-Komplexes in der peroxisomalen Membran. Die cytoplasmatische C-terminale Region besitzt eine SH3 Domäne, die PEX5 (=Rezeptor für das peroxisomale-targeting Signal 1 (PTS1)) bindet (Erdmann u. Blobel 1996; Elgersma et al. 1996; Gould et al. 2014). Der N-Terminus von PEX13 interagiert mit PEX7, dem Rezeptor für Proteine mit einem PTS2. Der Verlust von PEX13 führt somit zu einem Verlust von Proteinen mit PTS1 und PTS2 Proteinimport und damit zu einem kompletten Verlust der peroxisomalen metabolischen Funktion (Liu et al. 2010).

Peroxisomen sind in der Lage, den Abbau bestimmter Fettsäuren zu ermöglichen, zu dem Mitochondrien nicht in der Lage sind (Ferdinandusse et al. 2002). Zu den Fettsäuren die ausschließlich durch β -Oxidation in Peroxisomen abgebaut werden gehören die sehr langkettigen Fettsäuren (VLCFA) ($\geq C_{24}$), verzweigt langkettigen Fettsäuren, wie z.B. 2,6,10,14-Tetramethylpentadecansäure (Pristansäure) und Eicosanoide (Gervois et al. 2000; Karnati u. Baumgart-Vogt 2008).

Generell entsteht oxidativer Stress durch eine gesteigerte Produktion oder einem verminderten Abbau von ROS oder reaktiven Stickstoffspezies (RNS). Die Folge sind Zellschädigungen durch Oxidation der DNA, von Proteinen, Lipiden und

Monosacchariden (Moldovan u. Moldovan 2004). Zu den ROS zählen das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), während das Stickstoffmonoxidradikal ($\cdot NO$) und Peroxynitrit zu den RNS gerechnet werden (Schrader u. Fahimi 2004; Fruehauf u. Meyskens 2007). Dies ist relevant zu erwähnen, da Peroxisomen über einerseits verschiedene Oxidasen (z.B. Acyl-CoA Oxidase) und andererseits über antioxidative Enzyme, wie Katalase, Glutathionperoxidase und Peroxiredoxine verfügen und daher eine starke Rolle bei der Aufrechterhaltung des Equilibriums zwischen Entstehung und Abbau von ROS übernehmen (Siraki et al. 2002). Die Menge an Katalase in Peroxisomen wird mit steigendem Alter herunterreguliert, was eine mögliche Erklärung des beobachteten oxidativen Stresses in diesem Stadium darstellt (Beier et al. 1993; Terlecky et al. 2006; Titorenko u. Terlecky 2011). Es ist nachgewiesen, dass RNS und ROS zu der Pathogenese von Arteriosklerose, Bluthochdruck, Entzündungen, Krebs, Diabetes Typ 2 und neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, beitragen (Asayama et al. 1999). Welche genaue Rolle Peroxisomen bei der Pathogenese dieser Krankheiten haben ist jedoch bis heute noch nicht geklärt.

Die wichtige Bedeutung von Peroxisomen wird deutlich wenn diese Zellorganellen nicht korrekt funktionieren und sogenannte „Peroxisomale Störungen“ hervorrufen. Diese werden in zwei Gruppen aufgeteilt: 1. peroxisomale Biogenesestörungen und 2. Defekte einzelner peroxisomaler Enzyme (Wanders u. Waterham 2005). Ein gutes Beispiel für die zweite Gruppe ist die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD), die durch eine Mutation im ALD-Gen hervorgerufen wird. Dieses Gen kodiert den Fettsäuretransporter ABCD1 an der peroxisomalen Membran. Bei einem Defekt kommt es zu einer Akkumulation von sehr langkettigen Fettsäuren im Cytoplasma und nachfolgend im Blut (Mosser et al. 1993; Berger u. Gärtner 2006).

Bei den peroxisomalen Biogenesestörungen (PBDs) erfolgt die Einteilung nach dem Schweregrad der Erkrankung. Hier ist das Zellweger Syndrom (ZS) die Form mit der schwersten klinischen Symptomatik (Wanders u. Waterham 2005), gefolgt von der neonatalen Adrenoleukodystrophie (NALD) und dem infantilen Refsum Syndrom (IRD). Die Ursache der Erkrankung ist in allen Fällen ein Defekt der Gene für die Peroxine, der zu einem Verlust vieler Funktionen von Peroxisomen führen (Gould u. Valle 2000). Beim Menschen kommen vor allem Mutationen im *Pex1* (70%), *Pex6* (10%), *Pex12* und *Pex26* Gen (jeweils 5%) vor (Baumgart et al. 2003; Steinberg et al. 2006). Bei einem Patienten mit einer Mutation des *Pex13*-Gens, war die Symptomatik vergleichbar mit einer milden Form der NALD, mit Muskelhypotonie, Retinitis pigmentosa, Schwerhörigkeit, epileptischen Anfällen und Hepatosplenomegalie (Liu et al. 1999). Bei einem Patienten

mit einer homozygoten Non-sense Mutation des *Pex11 β* Gens kam es zu Symptomen wie fortschreitender Hörverlust, periodische Migräneattacken und milden intellektuellen Einschränkungen (Ebberink et al. 2012). In der Maus führt eine Mutation des *Pex13*- oder des *Pex5*-Gens zum Phänotyp des ZS oder NALD, mit intrauteriner Wachstumsretardierung, schwerer Hypotonie und der Unfähigkeit zu Fressen. Außerdem weisen diese Mäuse eine verzögerte Migration von Neuronen im Neocortex, Cerebellum und den Nuclei olivares inferiores, veränderte Purkinje-Zellen, Demyelinisierung und neuronaler Degeneration auf (Baes et al. 1997; Crane 2014). Eine ähnliche Symptomatik zeigen Knockout-Mäuse mit einer Deletion des Exons 2 im *Pex13* (Maxwell et al. 2003). Daher sind diese Mäuse ein gutes Werkzeug zur Untersuchung sowohl der physiologischen als auch der pathophysiologischen Funktion der Peroxisomen im ZNS.

1.3. α -Syn, Peroxisomen und Parkinson Krankheit

Sowohl bei der Neurodegeneration durch α -Syn-Agglomerate in Lewy bodies (z.B. bei Morbus Parkinson) als auch bei peroxisomalen Biogenesestörungen (PBS) spielt oxidativer Stress, und damit gekoppelt eine Störung der mitochondrialen Funktion, eine wichtige Rolle (Baumgart et al. 2001).

Heutzutage ist der Morbus Parkinson die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach der Alzheimer-Demenz mit einer Prävalenz von 1% bei der über 60-Jahre alten Bevölkerung (de Lau u. Breteler 2006). Allerdings ist diese Zahl mit Vorsicht zu betrachten, da es zum einen keine einheitlichen klinisch-diagnostische Kriterien für diese Krankheit gibt und daher eine striktere Auswahl der Kriterien zu geringeren Prävalenzen führt, und zum anderen eine definitive, aber eher selten durchgeführte Diagnose nur post-mortem gestellt werden kann (Litvan et al. 2003). Interessant war die Entdeckung, dass einige Menschen durch 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) parkinsonähnliche Symptome entwickelten (Betarbet et al. 2000). Die Relevanz dieses Erkenntnis wurde noch deutlicher nachdem gezeigt werden konnte, dass der Komplex I der Atmungskette bei Morbus Parkinson Defekte aufweist (Greenamyre u. Hastings 2004) und MPTP sowohl ein selektiver Komplex-I Inhibitor ist, als auch eine Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra induziert (Betarbet et al. 2000). Dieses Ergebnis konnte mit anderen Komplex-I Inhibitoren wie Rotenon und Paraquat repliziert werden (Betarbet et al. 2000).

Bei Morbus Parkinson Patienten konnte eine reduzierte Komplex-I Aktivität in Cytoplasma von Hybridzelllinien, die mitochondriale DNA von Parkinson-Patienten enthalten, gefunden werden (Swerdlow et al. 1996). Weiterhin besitzen Substantia nigra

pars compacta Neurone von post-mortem Parkinson-Patienten eine große Anzahl an mitochondrialen DNA-Deletionen (Bender et al. 2006; Kraytsberg et al. 2006). Zudem konnte ein früheinsetzender Morbus Parkinson in Mäusen ausgelöst werden, indem man gezielt den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A in dopaminergen Neuronen deletierte (Ekstrand et al. 2007). In Zellkulturen konnte außerdem gezeigt werden, dass Dopamin selbst eine mitochondriale Fehlfunktion auslösen kann, die von einer erhöhten intrazellulären Akkumulation von α -Syn begleitet wird. Erstaunlicherweise konnte die mitochondriale Fehlfunktion durch das Ausschalten der α -Syn Expression verhindert werden (Ganguly et al. 2019).

Viele weitere Experimente zeigen auch einen Zusammenhang von oxidativem Stress und einer mitochondrialen Dysfunktion bei der Entstehung des Morbus Parkinson (Beal 2005; Keeney et al. 2006; Lin u. Beal 2006). Berücksichtigt man weiterhin, dass die hereditäre Form des Morbus Parkinson durch Mutationen von einer Reihe von Proteinen (sogenannte Park-Proteine s. Tab. 1) ausgelöst werden kann, wird deutlich, dass dieser Prozess sehr komplex und multifaktoriell ist und es daher weiterer Forschung bedarf, um die Pathogenese dieser Krankheit in seiner Gesamtheit verstehen zu können.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Peroxisomen sind in allen eukaryotischen Zellen vorzufinden und erfüllen dort eine Vielzahl von Funktionen. Peroxisomale Stoffwechselforgänge verursachen sowohl die Entstehung als auch den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies. Mit steigendem Alter sinkt ihre Zahl, daher wird vermutet, dass sie eine Rolle bei dem Alterungsprozess spielen. Yakunin et al. (2013) zeigten in *Pex2*-, *Pex5*- und *Pex13* knockout Mäusen eine erhöhte Menge an α -Syn-Oligomeren und an phosphoryliertem α -Syn im Vergleich zum Wildtyp-Tier. Allerdings wurde hier nur das gesamte Gehirn auf Proteinebene untersucht. Daraus ergaben sich für unsere Gruppe folgende Fragen, die versucht wurden in dieser Arbeit zu beantworten:

1. In welchen Arealen des Gehirns der *Pex13* knockout Maus kommt die Erhöhung von α -Syn vor, bzw. ist am größten?
2. Gibt es auch Veränderungen bei heterozygoten *Pex13*-defizienten Mäusen?
3. Korreliert die Expression von α -Syn mit der Expression von SOD2?
4. Zeigt sich eine Fehllokalisierung von α -Syn in die Mitochondrien?
5. Können in den *Pex11 β* ^{-/-} Mäuse ebenfalls erhöhte Mengen von α -Syn gefunden werden?

2. Material

2.1. Tiere

C57BL/6J-Mäuse wurden in einer spezifisch pathogenfreien Umgebung im Zentralen Tierlabor (ZTL) der Justus-Liebig Universität Gießen gehalten. Die Temperatur betrug $22 (\pm 2) ^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit $55 (\pm 5) \%$ mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Zur Nahrung stand den Tieren sterilisiertes, pelletiertes Pressfutter (Standarddiät) und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Dabei wurden stets die Tierschutzgesetze der Bundesrepublik Deutschland gewahrt. Für diese Arbeit wurden zum einen bereits vorhandene Paraffinschnitte des Gehirns von *Pex13*⁻ und *Pex11β*-defizienten Mäusen unterschiedlichen Alters verwendet. Zum anderen wurden zweimal zwei *Pex13*^{+/-} Mäuse (C57BL/6J) miteinander verpaart. Die schwangeren Mäuse wurden am 19. (E19, Gruppe 1, Tab. 2), bzw. am 18. Embryonaltag (E18, Gruppe 2, Tab. 3) getötet (Tötungserlaubnis: 471M1016 Peroxisomen Gl20/23). Zusätzlich wurden eine 19 Wochen (W) und eine 65W alte Wildtyp-Maus getötet.

Im Folgenden wird eine Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten Würfe gezeigt, geordnet nach deren Genotyp und benannt nach ihrer Seriennummer, die im Labor vergeben wurde:

Tab. 2: Anzahl der Tiere pro Genotyp für den 1. Wurf (*Pex13*).

Gruppe 1	<i>Pex13</i> ^{+/+}	<i>Pex13</i> ^{+/-}	<i>Pex13</i> ^{-/-}
Seriennummer	P0640	P0641 P0642	P0637 P0638
Anzahl der Tiere	1	2	2

Tab. 3: Anzahl der Tiere pro Genotyp für den 2. Wurf (*Pex13*).

Gruppe 2	<i>Pex13</i> ^{+/+}	<i>Pex13</i> ^{+/-}	<i>Pex13</i> ^{-/-}
Seriennummer	P0661	P0663	P0662
Anzahl der Tiere	1	1	1

Das Material der *Pex11β*-defizienten Tiere (Tab. 4) wurde aus bereits vorhandenem Probenmaterial aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommen.

Tab. 4: Anzahl der Tiere pro Genotyp (*Pex11β*).

	<i>Pex11β</i> ^{+/+}	<i>Pex11β</i> ^{+/-}	<i>Pex11β</i> ^{-/-}
Anzahl der Tiere	1	1	1

2.2. Laborgeräte

Die nun folgende Tabelle (Tab. 5) gibt eine alphabetische Übersicht über die Laborgeräte und deren Bezugsquelle, die für die Anfertigung dieser Arbeit benutzt wurden.

Tab. 5: Liste der Laborgeräte mit Bezugsquelle.

Laborgeräte	Bezugsquelle
Analysenwaage PB3002 DeltaRanger	Mettler Toledo, Gießen
Biometra Trio Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Biometra Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Bio-Rad GelDoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Confocales-Laser Scanning Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop (DMRD)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gewebeeinbettautomat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Heizmagnetrührer	Janke & Kunkel, IKA®, Staufen
Labor-Spülautomat G 7883 CD	Miele Professional, Gütersloh
Lichtmikroskop DMLM	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Rotations-Mikrotom Leica RM 2135	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrowelle, intellowave	LG electronics GmbH, Willich
Nanodrop 2000	Peqlab, Erlangen
Paraffin-Ausgießstation „Paramat“	Paul Scherrer Institut, Villingen, Schweiz
pH-Meter inolab pH720	WTW GmbH&Co. KG, Weilheim
Projektionsmikroskop „Visopan“	Reichert, Optische Werke A.G. Wien, Österreich
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck KGaA, Darmstadt
Vortex VF2	Janke & Kunkel, IKA®, Staufen
Timer TR118	Thermo Fisher Scientific GmbH, Frankfurt am Main
Tischzentrifuge (Biofuge Fresco)	Heraeus, Hanau
Ultra-Turax T25	Janke & Kunkel, IKA®, Staufen
Wärmeplatte 13800	Medax Nagel GmbH, Kiel

2.3. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Die nun folgende Tabelle (Tab. 6) gibt eine alphabetische Übersicht über die allgemeinen Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquelle, die für die Anfertigung dieser Arbeit verbraucht wurden.

Tab. 6: Liste der Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle.

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Frankfurt am Main
Einbettkassetten	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Einbettgeschälchen, Metall	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Thermo Fisher Scientific GmbH, Frankfurt am Main
Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Glasgefäße	Labor-Brand, H.Kahlensee, Gießen
Immersionsöl, fluoreszenzfrei	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Laborflaschen, Fisherband	Thermo Fisher Scientific GmbH, Frankfurt am Main
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Mikrotomklingen S-35	Produkte für Medizin AG, Köln
Objektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrick, Labor- u. Medizintechnik, Teningen
PAP-Pen für Immunfärbungen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Reinigungsmilch für Leitz-Objektive	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

2.4. Chemikalien

Die nun folgende Tabelle (Tab. 7) gibt eine alphabetische Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Tab. 7: Liste der Chemikalien mit Bezugsquelle.

Chemikalien	Bezugsquelle
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose LE	Roche Diagnostics AG, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Citronensäure-mono-hydrat (C ₆ H ₈ O ₇)	Merck KGaA, Darmstadt
Depex	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
DNA Standard Ladder 100bp	Promega, Madison, USA
dNTP Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Neu Ulm
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kresylviolett	Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumcarbonat (Li ₂ CO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Luxol-Fast-Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Maxima SYR Green qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH, Frankfurt am Main
Mowiol	Farbwerke Hoechst, Frankfurt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paraffin Paraplast Plus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Salzsäure HCl 0,1N	Merck KGaA, Darmstadt
Serve DNA Stain G	Serva, Heidelberg
TaqDNApolymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Thermo Scientific Maxima SYR Green	Thermo Fisher Scientific GmbH, Frankfurt am Main
To-pro-3 Jodid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-di.hydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ * 2 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

2.5. Verwendete Kits

Die nun folgende Tabelle (Tab. 8) gibt eine alphabetische Übersicht über die Kits und deren Bezugsquelle, die für die Anfertigung dieser Arbeit benutzt wurden.

Tab. 8: Liste der Kits mit Bezugsquelle.

Kits	Bezugsquelle
DNase I, Amp Grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
SuperScript II RT-Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TSA-Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.6. Verwendete Primer

Die nun folgende Tabelle (Tab. 9) gibt eine Übersicht über die Primer mit ihrer Sequenz und weiterer wichtiger Charakteristika relevant für diese Arbeit.

Tab. 9: Liste der verwendeten Primer unter Angabe der Primersequenz.

Gen	Primer-Sequenz 5'-3'	NCBI-RefSeq-Zugriffsnummer	Annealing-Temperatur	Produktgröße (bp)	Effizienz in der qRT-PCR (E)
α-Synuklein BK51/52	Vorwärts: GTCTCAAAGCCTGTGCATCT	NM_009221.2	55°C	96	∅
	Rückwärts: TCCACACTTTCCGACTTCTG				
α-Synuklein BK53/54	Vorwärts: GGGAGTCCTCTATGTAGGTTCC	NM_009221.2	55°C	97	0,938
	Rückwärts: TCCAACATTTGTCACTTGCTCT				
Parkin BK55/56	Vorwärts: AGGTCGATTCTGACACCAGC	NM_016694.3	60°C	97	∅
	Rückwärts: CCGGCAAAAATCACACGCAG				
Parkin BK57/58	Vorwärts: CGTGTGATTTTTGCCGGAAG	NM_016694.3	60°C	197	0,999
	Rückwärts: GTCCACTCGTGTCAAGCTC				
HPRT AJ19/20	Vorwärts: AGTCCCAGCGTTCGTGATTAG	NM_013556.2	60°C	225	0,999
	Rückwärts: TTTCCAATCCTCGGCATAATGA				

2.7. Verwendete Antikörper

Die folgenden Tabellen listen die Primär- (Tab. 10) und Sekundärantikörper (Tab. 11) auf, die für die Immunfluoreszenzfärbungen in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tab. 10: Liste der verwendeten Primärantikörper unter Angabe der Bezugsquelle (Hersteller mit Katalognummer), der Herkunft und der optimalen Verdünnung.

Antigen	Hersteller	Katalognr.	Herkunft	Klonalität	Verdünnung
α-Synuklein	Cell Signaling	4179	Kaninchen	monoklonal	1/8000
Oxidative Phosphorylierung (Oxphos) Complex IV Subunit I	Invitrogen	459600	Maus	monoklonal	1/200
Parkin (PRK8)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-32282	Maus	monoklonal	1/200
SOD2 Superoxid-dismutase 2	Abcam	Ab13533	Kaninchen	polyklonal	1/2000
Vimentin	Sigma-Aldrich	V5255	Maus	monoklonal	1/16000

Tab. 11: Liste der verwendeten Sekundärantikörper unter Angabe der Bezugsquelle (Hersteller mit Katalognummer), der Herkunft und der optimalen Verdünnung.

Antigen	Hersteller	Katalognr.	Herkunft	Klonalität	Verdünnung
Anti-Maus-IgG Texas Red	Vector Labs	TI-2000	Pferd	monoklonal	1/300
Anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor-488	Invitrogen	A21206	Esel	polyklonal	1/300

2.8. Herstellen von Lösungen und Puffern

Die folgende Tabelle (Tab. 12) gibt eine tabellarische Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer und deren Herstellung.

Tab. 12: Liste der Lösungen und Puffer mit Angabe ihrer Herstellung.

Lösungen und Puffer	Herstellung
0,01 % Trypsinlösung	0,01 % Trypsin in PBS
1 % bzw. 4 % PBSA Puffer	1 % (bzw. 4 %) BSA in PBS
Citratpuffer	Lösung A: 1 mM Citronensäure-mono-hydrat ($C_6H_8O_7$) in aqua dest. Lösung B: 50 mM tri-Natriumcitrat-di-hydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$) in aqua dest. Citratpuffer: 15 ml Puffer A, 85 ml Puffer B 900 ml aqua dest., pH 6,0
Gesättigte Lithiumcarbonatlösung	In 100 ml aqua dest. so lange Lithiumcarbonat (Li_2CO_3) lösen, bis ein Bodensatz entsteht
0,1 % Kresylviolett	0,1 g Kresylviolett in 100 ml aqua dest 20 Tropfen 10 % ige Essigsäure ($C_2H_4O_2$)
Lithiumcarbonatlösung	0,68 mM Lithiumcarbonat (Li_2CO_3) in aqua dest.
Luxol-Fast-Blue	1 g Luxol-Fast-Blue in 1000 ml 96 % Ethanol (C_2H_6O) 4 ml 10 % Essigsäure ($C_2H_4O_2$)
Paraformaldehyd	4 % depolymerisiertes Paraformaldehyd in PBS 2 % Saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), pH 7,4
Phosphate-Buffered-Saline (PBS Puffer)	Stammlösung (10fach konzentriert): 1.5 M Natriumchlorid (NaCl) 131 mM Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) in aqua dest., pH 7,4
TAE-Puffer (Laufpuffer)	Stammlösung (50fach konzentriert) 2 M Tris ($C_4H_{11}NO_3$) 1 M Eisessig ($C_2H_5NO_2$) 0,15 M EDTA

3. Methoden

3.1. Herstellung der Paraffinschnitte der Gehirne: Perfusionsfixierung der Mäuse, Paraffineinbettung, Schneiden

Die Versuchstiere wurden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) durch die linke Herzkammer retrograd perfundiert (durchgeführt von Herrn Dr. Dr. Klaus-Peter Valerius). Ein Teil vom Schwanz wurde vorher abgeschnitten, um damit in einer PCR-Analyse den Genotyp zu bestimmen. Anschließend wurden die Gehirne entnommen und in 4 % PFA über Nacht nachfixiert.

Nun wurden die Gehirne für die Paraffineinbettung dehydriert. Hierfür wurden die Proben im Gewebeeinbettautomat jeweils eine Stunde in 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %gem Ethanol gelegt, anschließend drei Stunden in Paraffin (Paraplast) eingebettet und danach gegebenenfalls zur exakteren Orientierung des Gehirns (z.B. coronar) umgebettet. Am Rotations-Mikrotom Leica RM 2135 wurden ca. 2 µm-dicke Serienschnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger gezogen. Dabei wurden von jedem Mausgehirn jeweils vier vorher festgelegt Schnittebenen (C5, C10, C15, C20 nach dem „Atlas of the Prenatal Mouse Brain“ ((Schambra, U. et al. 1992), siehe 4.2.) angeschnitten. Diese Schnittebenen wurden gewählt, um eine möglichst große Anzahl an verschiedenen relevanten Gehirnbereichen abdecken zu können (siehe 4.2.).

3.2. Färbungen

3.2.1. Klüver-Barrera Färbung

Zu Dokumentationszwecken wurden von allen in dieser Arbeit verwendeten Standardebene(n) (C5, C10, C15, C20) Klüver-Barrera Färbungen durchgeführt. Ebenso kann mit ihnen gezeigt werden, dass alle von mir untersuchten Gehirnschnitte die gleiche Ausrichtung haben, damit die Schnitte untereinander verglichen werden können. Bei der Klüver-Barrera Färbung werden mit dem Farbstoff Luxol-Fast-Blue und Kresylviolett die Markscheiden blau und die Nissl-Substanz von Nervenzellen violett angefärbt. Tabelle 13 zeigt das hierfür verwendete Protokoll.

Tab. 13: Protokoll zur Durchführung der Klüver-Barrera Färbung.

Entparaffinieren in Xylol	3x10 min
in 99 % Ethanol eintauchen	6 min
in 96 % Ethanol eintauchen	10 min
in Luxol-Fast-Blue bei 60°C lassen	über Nacht
in 96 % Ethanol, dann in aqua dest. spülen solange in 0,05 % Lithiumcarbonatlösung und in 70 % Ethanol differenzieren, bis das Gewebe mit Ausnahme der Markscheiden entfärbt ist spülen in aqua dest.	~5 s
inkubieren in Kresylviolett bei Raumtemperatur	10 min
differenzieren in 96 % Ethanol, bis die Nissl-Substanz deutlich sichtbar ist	~5 s
aufsteigende Ethanolreihe (99 %, 1:1 Ethanol/Xylol, 3x Xylol) durchführen	jeweils 5 min
zur Konservierung in Depex eindeckeln	

3.2.2. Allgemeines zur Immunfluoreszenzfärbung

Bei Immunfärbungen macht man sich die Spezifität der Antigen-Antikörper Bindung für den Nachweis eines bestimmten Proteins zu Nutze. Zunächst werden die Proteine, die mit PFA kovalent verknüpft sind (insbesondere basische Aminosäuren) mit Trypsin aufgebrochen. Um die Qualität der Färbung zu verbessern, werden die Proteine, die durch die Fixierung mit PFA reagiert haben, wieder von dieser chemischen Verbindung gelöst (Antigen-Retrieval). Hierzu werden die Proben in unserem Protokoll in kochenden Citratpuffer gelegt – das Aufbrechen erfolgt also durch Hitze und Säure. Anschließend werden mit Albumin „universal-bindende“ Antigene geblockt, sodass der nun hinzugesetzte Primärantikörper (fast) ausschließlich an sein spezifisches Antigen bindet. Nun wird mit einem Puffer gewaschen, damit nur fest an Antigen-gebundene Antikörper im Schnitt verbleiben. Anschließend wird mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der an den Primärantikörper bindet und mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Die Kerne können, z.B. mit To-pro-3 Jodid, gegengefärbt werden. Durch das Einbetten der

Hirnschnitte, z.B. in einer Mischung aus Mowiol und Propylgallat und Abdecken mit einem Deckglas sind diese für lange Zeit konserviert.

Für die Auswertung werden die fluoreszenzmarkierten Proben mit monochromatischem Licht einer festgelegten Wellenlänge (im Idealfall entspricht sie dem Exitationsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffs) angeregt, dabei wird Licht in einer anderen Wellenlänge emittiert - es wird also nur der zweite Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Da dieser aber nur an den ersten Antikörper bindet und dieser wiederum nur an das zu untersuchende Protein, kann man Rückschlüsse auf die Verteilung und Menge des Proteins ziehen.

3.2.3. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an ca. 2 µm-dicken Paraffinschnitten der Mäusegehirne aller 4 Regionen (C5, C10, C15, C20) durchgeführt. Dabei wurden drei Doppelfärbungen (α -Syn/Vimentin, α -Syn/Oxph Komplex IV und SOD2/Vimentin) gemacht. Bei allen Färbereihen wurde dasselbe Protokoll verwendet, welches in Tabelle 14 dargestellt wurde.

Tab. 14: Protokoll zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen.

Entparaffinieren in Xylol	3x10 min
in eine absteigende Ethanolreihe (99 %, 99 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 %, 2x aqua dest.) wässern	jeweils 3 min
Permeabilisierung des Gewebes mit 0,01 % Trypsin bei 37°C	7 min
in PBS spülen	3x5 min
in Citratpuffer bei 900 W in der Mikrowelle zum Antigen-Retrieval erhitzen	3x5 min
abkühlen lassen	30 min
in PBS spülen	3x5 min
Die Schnitte werden nun mit einem PAP-Pen umfahren und um unspezifische Antigen-Antikörper Bindungen zu verhindern, mit 4 % PBSA inkubiert	2 Stunden
spülen in PBS	3x5 min
Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in 1 % PBSA + 0,05 % Tween 20) bei Raumtemperatur	über Nacht
in PBS spülen	3x5 min
Inkubation mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in 1 % PBSA + 0,05 % Tween 20)	2 Stunden
in PBS spülen	3x5 min
Kernfärbung mit To-pro-3 Jodid	10 min
in PBS spülen	3x5 min
Eindeckeln in Mowiol und Propylgallat (3:1) zur Konservierung	

Der hier verwendete Antikörper gegen α -Syn erkennt die Region um die Aminosäure 105Glu des Mausproteins und damit die α -Syn Isoform mit 140 (volles Längeprotein) und die 126 (Exon 3 fehlt) Aminosäuren. Die Isoform mit 112 Aminosäuren (Exon 5 fehlt) wird nicht erkannt.

3.2.4. Immunfluoreszenzfärbung mit dem TSA-Kit und Behandlung mit Ameisensäure

Bei der Literaturrecherche stellte sich heraus, dass bei Färbungen mit α -Syn Antikörpern verschiedene Protokolle für die Permeabilisierung benutzt wurden (z.B. Verwendung von Ameisensäure statt Trypsin). Des Weiteren bestand die Befürchtung, dass die Expression von α -Syn im Gehirngewebe von embryonalen Mäusen so gering ist, dass das Signal des Antikörpers verstärkt werden muss. Daher wurde vergleichend zum Standardprotokoll eine Signalverstärkung mit Tyramid Signal Amplification (TSA)-Kit durchgeführt.

Bei diesem Kit macht man sich die Reaktion der Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish-peroxidase=HRP) zu Nutze. Dazu wird ein Sekundärantikörper verwendet, der mit HRP gekoppelt ist. Anschließend wird H_2O_2 hinzugesetzt. Danach führt die enzymatische Reaktion der HRP zu einer kovalenten Bindung des Farbstoffes Alexa Fluor 488 an Proteine mit Tyrosinresten. Somit werden durch eine Bindung des Sekundärantikörpers an einen Primärantikörper mehrere Farbstoffmoleküle in dessen direkter Umgebung synthetisiert, und damit das Signal um etwa das 100-fache verstärkt.

Um das am besten geeigneten Protokoll für meine Versuche zu etablieren, wurden alle Genotypen (*Pex13*^{+/+}, *Pex13*^{+/-}, *Pex13*^{-/-}) mit den vier Protokollen (Permeabilisierung mit Trypsin vs. Ameisensäure und mit Signalverstärkung vs. ohne) vergleichend inkubiert. Die Protokolle werden in den Tabellen 15 und 16 dargestellt.

Standard:

Das Standard-Protokoll (Permeabilisierung mit Trypsin und ohne Verwendung des TSA-Kits) entspricht dem Protokoll aus Tabelle 14.

„mit“ Ameisensäure:

Tab. 15: Protokoll zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Ameisensäure zur Permeabilisierung.

Entparaffinieren in Xylol	3x10 min
in einer absteigenden Ethanolreihe (99 %, 99 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 %, 2x aqua dest.) wässern	jeweils 3 min
Permeabilisierung des Gewebes mit 10 %iger Ameisensäure bei 37°C	7 min
in PBS spülen	3x5 min
in Citratpuffer bei 900 W in der Mikrowelle zum Antigen-Retrieval erhitzen	3x5 min
abkühlen lassen	30 min
in PBS spülen	3x5 min
Die Schnitte werden nun mit einem PAP-Pen umfahren und um unspezifische Antigen-Antikörper Bindungen zu verhindern, werden die Schnitte mit 4 % PBSA inkubiert	2 Stunden
in PBS spülen	3x5 min
Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in 1 % PBSA + 0,05 % Tween 20) bei Raumtemperatur	über Nacht
in PBS spülen	3x5 min
Inkubation mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in 1% PBSA + 0,05 % Tween 20)	2 Stunden
in PBS spülen	3x5 min
Kernfärbung mit To-pro-3 Jodid	10 min
in PBS spülen	3x5 min
Eindeckeln in Mowiol und Propylgallat (3:1) zur Konservierung	

„mit“ TSA-Kit:

Tab. 16: Protokoll zur Durchführung der Immunfluoreszenz-färbung unter Verwendung eines TSA-Kits zur Signalverstärkung.

Entparaffinieren in Xylol	3x10 min
in einer absteigenden Ethanolreihe (99 %, 99 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 %, 2x aqua dest.)	jeweils 3 min
Permeabilisierung des Gewebes mit 0,01 % Trypsin bei 37°C	7 min
in PBS spülen	3x5 min
in kochendem Citratpuffer zum Antigen-Retrival	3x10 min
abkühlen lassen	30 min
in PBS spülen	3x5 min
In 3%iger H ₂ O ₂ -Lösung inkubieren	5 min
Die Schnitte werden nun mit einem PAP-Pen umfahren und um unspezifische Antigen-Antikörper Bindungen zu verhindern, werden die Schnitte mit 4% PBSA inkubiert	2 Stunden
in PBS spülen	3x5 min
Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in 1 % PBSA + 0,05 % Tween 20) bei Raumtemperatur	über Nacht
in PBS spülen	3x5 min
1 %ige HRP-Conjugate-Gebrauchslösung auftragen	2 Stunden
3x5 min spülen in PBS	
1 %ige Tyramid-Lösung auftragen	10 min
in PBS spülen	3x5 min
Kernfärbung mit To-pro-3 Jodid	10min
in PBS spülen	3x5 min
Eindeckeln in Mowiol und Propylgallat (3:1) zur Konservierung	

„mit“ Ameisensäure und „mit“ TSA Kit:

Das Protokoll „mit“ TSA-Kit und „mit“ Ameisensäure entspricht Tabelle 15 mit dem einzigen Unterschied, dass 7 Minuten mit Ameisensäure, anstatt mit 0,01 % Trypsin, permeabilisiert wird.

3.2.5. Bildaufnahme und -bearbeitung

Die Immunfluoreszenzfärbungen der Hirnschnitte wurden an einem Konfokalen Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskop digital aufgenommen (= dokumentiert) und mit dem Quantify-Programm der „Leica Confocal Software“ von Leica ausgewertet. Die in tif-Format aufgenommenen Bilder wurden mit Photoshop CS5 bearbeitet.

Bildaufnahmen der konventionellen Färbungen mit Klüver-Barrera erfolgten an einem herkömmlichen Lichtmikroskop mit der „AxioCam“ von Zeiss. Die Bilder wurden ebenfalls digital im tif-Format gespeichert und später mit Photoshop CS5 bearbeitet.

3.2.6. Humane Gehirnpräparate

Die in dieser Arbeit gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen von humanen, Formalin-fixierten Paraffinschnitten stammen von einer 93-jährigen weiblichen Dauerkörperspenderin (DS13/13), die sich für Lehr- und Forschungszwecke dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig Universität Gießen zur Verfügung gestellt hatte. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden von Frau Elke Rodenberg-Frank des Instituts für Anatomie und Zellbiologie durchgeführt und dienten nur der Prüfung der Reaktivität des anti-Parkin-Antikörpers. Durch die Sondervereinbarung über das Vermächtnis zur Dauerspende entfällt daher ein Antrag zur Genehmigung bei der Ethikkommission der JLU Gießen.

3.3. cDNA Amplifikation durch die semiquantitative polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

3.3.1. Allgemeines zur PCR

Bei der Polymerase-Chain Reaktion (PCR) nutzt man das Enzym DNA-Polymerase I (in diesem Fall die hitzestabile Taq DNA-Polymerase), um die Menge einer bestimmten mRNA zu ermitteln. Dieses Enzym katalysiert die DNA-Replikation in allen Zellen. Dazu setzt es an einem DNA-Einzelstrang an und komplementiert diesen mit den passenden Nukleotiden. Da das Enzym DNA-Polymerase nur DNA replizieren kann, muss die

mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wird das virale Enzym Reverse Transkriptase (RT) verwendet, welches RNA in DNA umschreibt. Anschließend wird die erhaltene cDNA in einem Puffer mit Desoxy-Nukleotiden, der DNA-Polymerase und Primern in einer zyklischen Abfolge bestimmten Temperaturen ausgesetzt und dabei ein Teilstück einer mRNA vervielfältigt (95°C Trennung der Einzelstränge, 50-65°C Primeranlagerung und 72°C Synthese der DNA-Fragmente, die zwischen dem forward und reverse Primer liegen).

Da die cDNA templates aller Proben derselben Zyklenzahl ausgesetzt werden, sind die Mengen an cDNA (vormals mRNA) untereinander semiquantitativ vergleichbar. Um die Proben auszuwerten, werden die amplifizierten PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, welches mit StainG versetzt ist. StainG ist in der Lage mit der DNA zu interkalieren, d.h. es schiebt sich zwischen die Basen der DNA (im Abstand von 10 Basenpaaren). Dabei ändert StainG sein Anregungsspektrum, wodurch unter UV-Licht die DNA in einem Agarosegel sichtbar gemacht werden kann. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des PCR-Produktes. Damit man auch die Größe des PCR-Produktes (Angabe in Basenpaaren, bp) bestimmen kann, lässt man DNA-Marker definierter Größen mitlaufen.

Bei der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) wird nach jedem Zyklus die Menge an PCR-Produkt mittels Fluoreszenzintensität des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR® Green gemessen. Trägt man die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der gelaufenen Zyklen auf, stellt man fest, dass es einen linearen Verlauf oberhalb der detektierbaren Menge und unterhalb der Sättigung gibt. Dies ist dann der Fall, wenn jeder DNA-Einzelstrang mit einem Primer belegt ist und sich dadurch die Zahl der Einzelstränge im Idealfall mit jedem Zyklus verdoppelt. Nach einer gewissen Zeit gibt es mehr Einzelstränge als Primer, wodurch sich die Anzahl der Einzelstränge mit jedem Zyklus nicht mehr verdoppelt und die Kurve daher abflacht.

Durch Festlegung eines Schwellenwerts (CT-Wert) für alle Proben im Bereich des linearen Anteils der Kurve, kann man die Konzentration des PCR-Produktes im Vergleich zu einem Referenzgen berechnen.

3.3.2. RNA-Isolierung

Am 18,5. Embryonaltag wurde die schwangere Maus durch Genickbruch getötet (durchgeführt von Herrn Dr. Dr. Klaus-Peter Valerius). Den Mausembryonen wurde der frontale Neocortex entnommen, kurz in flüssigen Stickstoff gelegt und danach bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung von mRNA aus dem frontalen Neocortex wurde das RNeasy®Lipid Tissue Mini Kit verwendet. Das Protokoll sieht wie folgt aus:

- Zerkleinerung der Gewebeproben mit einer sterilen (RNase-freien) scharfen Klinge
- Aufnehmen der Gewebeproben in 1 ml Qiazol
- Hinzufügen von 200 µl Chloroform und 20 sec vortexen
- Schütteln der Gewebeproben bei 300 rpm für 1 h bei 56°C
- Homogenat bei 12000 xg bei 4°C 15 min lang zentrifugieren. Dabei bleibt die zu untersuchende RNA in der wasserlöslichen oberen Phase, wohingegen DNA und Proteine in die organische Phase übergehen
- ~500 µl von der wässrigen Phase werden entnommen und mit der gleichen Menge an 70 %igem Isopropanol versetzt und zentrifugiert. Anschließend 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- erneutes Zentrifugieren bei 12000 xg bei 4°C für 10 min. Dabei fällt die RNA aus und der Überstand kann verworfen werden
- Nun wird die RNA „gewaschen“, d.h. von Unreinheiten gereinigt. Dazu werden insgesamt zweimal 500 µl RPE-Lösung hinzugegeben und unter den gleichen Bedingungen wie vorher zentrifugiert, der Überstand wird verworfen
- Nun lässt man das Pellet trocknen, in dem man das Tube ein paar Minuten offen stehen lässt und fügt 50 µl RNase-freies aqua dest. hinzu. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert

3.3.3. DNA-Degradierung

Um eine Amplifikation von genomischer DNA (kann in kleiner Menge bei der RNA-Isolierung als Verunreinigung dabei sein) bei der PCR Reaktion zu vermeiden, werden in ein RNase-freies Behältnis folgende Komponenten gegeben:

- 1 µg der RNA-Probe
- 1 µl 10x DNaseI Reaktion Puffer
- 1 µl DNase I Amp Grade
- Mit RNase-freiem aqua dest. auf 10 µl auffüllen

Für 15 min bei 25°C inkubieren

1 µl von der 25 mM EDTA-Lösung hinzugeben und für 10 min auf 65°C erhitzen

um die DNase zu deaktivieren

3.3.4. Umschreiben der mRNA in cDNA

Für das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde das SuperScript II RT-Kit mit folgendem Protokoll verwendet:

- In ein RNase-freies Behältnis werden folgende Komponenten gegeben:
 1. Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) 1 µl
 2. DNase-behandelte RNA (maximal 1 µg) 10 µl
 3. dNTP Mix (10 mM) 1 µl
- Erhitzen des Gemisches auf 65°C für 5 min und anschließend sofort auf Eis abkühlen. Hierdurch binden die Oligo(dt) an die Poly-A Schwänze der mRNAs.
- Nun wird kurz zentrifugiert, um den gesamten Inhalt wieder sammeln zu können und folgende Reagenzien werden hinzugefügt:
 1. 4 µl 5x First-Strand Puffer
 2. 2 µl 0.1 M DTT
 3. 1 µl RNase OUT (40 units/µl)
- nach vorsichtigem Mischen wird alles bei 42°C für 2 min inkubiert
- nun werden 1 µl (200 Units) SuperScript II RT hinzugefügt und mit rauf und runter pipettieren vermischt
- Inkubation bei 42°C für 50 min. Bei diesem Schritt wird der erste Einzelstrang DNA synthetisiert. Um die Reaktion zu unterbrechen wird das Gemisch einer Temperatur von 70°C für 10 min ausgesetzt
- Das Gemisch kann bei -20°C gelagert werden

3.3.5. Messen der RNA-Konzentration

Die Konzentration an RNA in den Proben wurde mit dem NanoDrop 2000 gemessen. Dabei wird die Absorption der Probe bei 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit entspricht hierbei einer Konzentration von 40 µg RNA/ml. Außerdem wurde das Absorptionsverhältnis zwischen 260 und 280 nm gemessen, um die Verunreinigung mit Zellbestandteilen zu überprüfen und zum anderen zwischen 260 und 230 nm gemessen, um zu prüfen, ob die RNA mit den Aufreinigungsreagenzien kontaminiert ist.

3.3.6. PCR und Gelelektrophorese zur Testung der α -Syn und Parkin qRT-PCR-Primer

Es wurden 2,4 g Agarose mit 120 ml TAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben vermischt und solange in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Anschließend wurden 4,5 μ l StainG untergerührt und das Gemisch wurde in eine Gelkammer mit eingehängtem Kamm gegossen. Nun wurde dem Gel 30 min Zeit zum Abkühlen und Erhärten gelassen.

Für die Amplifizierung der cDNA wurden folgende Reagenzien in ein PCR-Behältnis gegeben:

- 2,5 μ l vom 10x PCR Puffer
- 0,2 μ l vom 10 mM dNTP Mix
- jeweils 1 μ l von dem Forward bzw. Reverse Primer (10 μ M)
- 0,2 μ l Taq DNA-Polymerase (5 units/ μ l)
- 1 μ g der cDNA
- auffüllen auf 25 μ l mit aqua dest.

Nun wurden die Proben in den Bio Rad Thermocycler gegeben, wo sie zunächst für 10 min auf 95°C erhitzt wurden. Die Amplifikation der cDNA erfolgte über 35 Zyklen bei Temperaturen von 55 bis 65°C. Ein Zyklus bestand dabei aus folgenden Schritten:

1. 95° C für 15 sec
2. 55° C-65° C für 30 sec
3. 72° C für 30 sec

Anschließend wurden die PCR-Produkte und der DNA-Molekulargewichtsmarker mit einem Loading Dye (2 μ l) versetzt, damit die Proben besser in die Taschen eines Gels absinken und nicht herausdiffundieren. Das Gel wurde für 30 min einer Spannung von 90 V ausgesetzt. Anschließend wurde das Gel mit einer Kamera des Gel Doc 2000 Systems aufgenommen und mit der Gel Doc 2000 Software digital gespeichert.

Es wurden jeweils zwei Primerpaare für die α -Syn- und Parkin-Genexpression mit dem Programm Primer3 designt und von der Firma Eurofins (Ebersberg) synthetisiert. Es wurde zunächst getestet, welches Paar ein stärkeres Signal lieferte und dieses dann für die qRT-PCR verwendet.

3.3.7. cDNA Amplifikation durch die quantitative polymerase Kettenreaktion qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit cDNA Proben (RNA Isolierung, DNaseVerdau und reverse Transkription wie Kap. 3.3.2-3.3.4) unter Verwendung des Thermo Scientific Maxima SYR Green qPCR Master Mix und einem iCycler iQ5 der Firma BioRad durchgeführt. Die hier verwendeten Zyklen sahen wie folgt aus:

1. 95° C für 15 sec
2. 55° C-65° C für 30 sec
3. 72° C für 30 sec

4. Ergebnisse

4.1. Vorstellung der untersuchten Hirnareale in Koronarschnittebenen

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden für alle Gehirne die gleichen Schnittebenen analysiert. Zur Orientierungshilfe und Zuordnung der Koronarschnitte diente das Standardwerk „Atlas of the Prenatal Mouse Brain“ (Schambra et al. 1992). Um dies zu erreichen wurden die Paraffinschnitte zunächst unter dem Lichtmikroskop mit Phasenkontrast begutachtet. Erst wenn die Orientierung komplett coronar, symmetrisch und die gewünschte Schnittebene (z.B. C5 oder C10) erreicht waren, wurden vom restlichen Gehirn 2 µm dicke Folgeschnitte in Serie angefertigt.

Zu Dokumentationszwecken und Vorstellung der in dieser Arbeit verwendeten Standardebenen wurden Klüver-Barrera-Färbungen durchgeführt. Diese werden in den folgenden Abschnitten (4.1.1.-4.1.4.) dargestellt und die auf ihnen sichtbaren Hirnareale kurz erläutert.

4.1.1. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C5

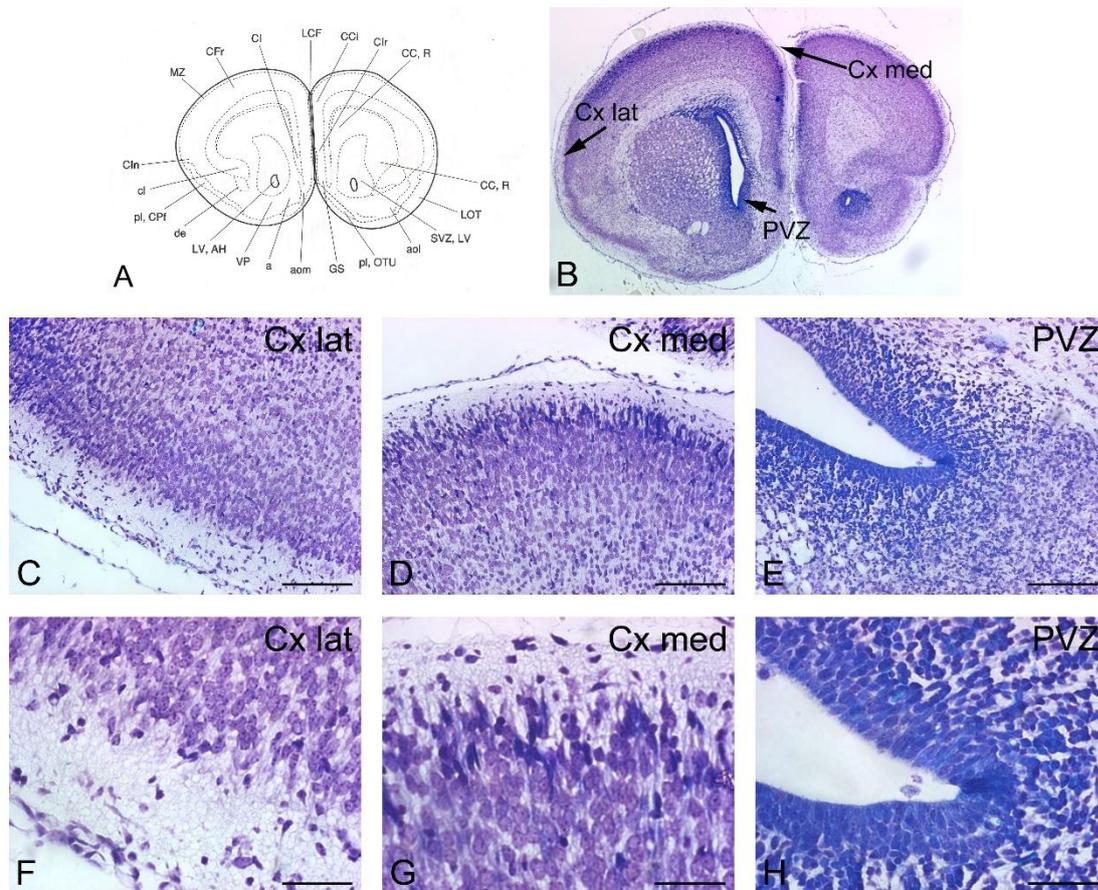


Abb. 5: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C5 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung. A: Originalzeichnung aus dem Mausatlas, die die Schnittebene C5 darstellt. B: Klüver-Barrera-Übersicht über die Schnittebene C5. C-H: Klüver-Barrera Färbung vom Neocortex lateral (Cxlat), Neocortex medial (Cxmed) und der periventrikulären Zone (PVZ). Maßstäbe = 80 μ m (C-E) und 27 μ m (F-H).

Das Hauptaugenmerk wurde, auf den Neocortex gelegt (Abb. 5), da hier die höchsten Mengen an α -Syn zu erwarten sind (Iwai et al. 1995; Adamczyk et al. 2005). Dabei wurden der laterale (Abb.5: C, F) und der mediale Neocortex (Abb.5: D, G) untersucht. Weiterhin wurde das Ventrikependym und die periventrikuläre Zone (PVZ) analysiert (Abb.5: E, H), weil dort eine sehr hohe Anzahl an Peroxisomen vorzufinden sind (Ahlemeyer et al. 2007).

4.1.2. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C10

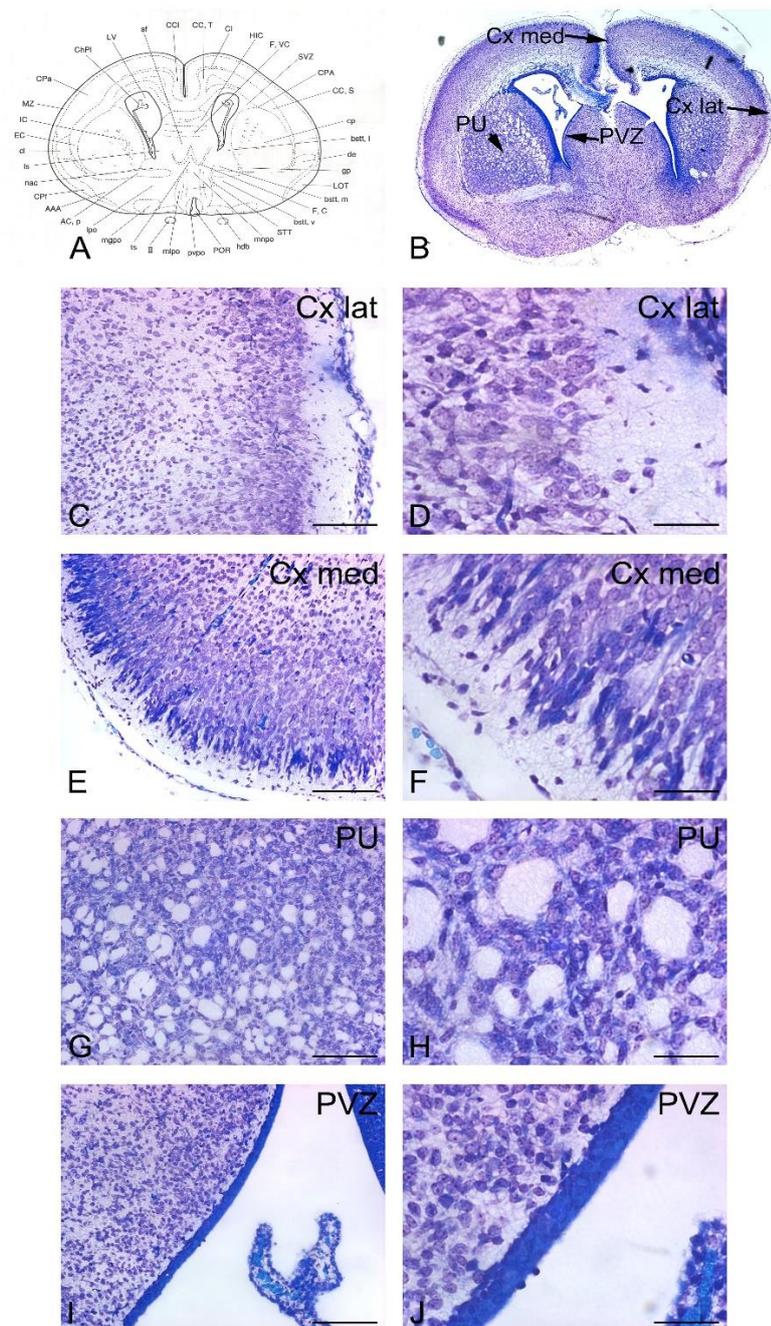


Abb. 6: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C10 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung. A: Originalzeichnung aus dem Mausatlas, die die Schnittebene C10 darstellt. B: Klüver-Barrera Übersicht über die Schnittebene C10. C-J: Klüver-Barrera-Färbung vom Neocortex lateral (Cxlat), Neocortex medial (Cxmed), periventriculäre Zone (PVZ) und dem Putamen (PU (im Schema abgekürzt mit „cp“)). Maßstäbe = 80 µm (C, E, G, I) und 27 µm (D, F, H, J).

In der C10 Schnittebene (Abb. 6) wurden zusätzlich zu den in C5 untersuchten Arealen das Putamen der telencephalen Basalganglien (Abb.6: G, H) analysiert.

4.1.3. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C15

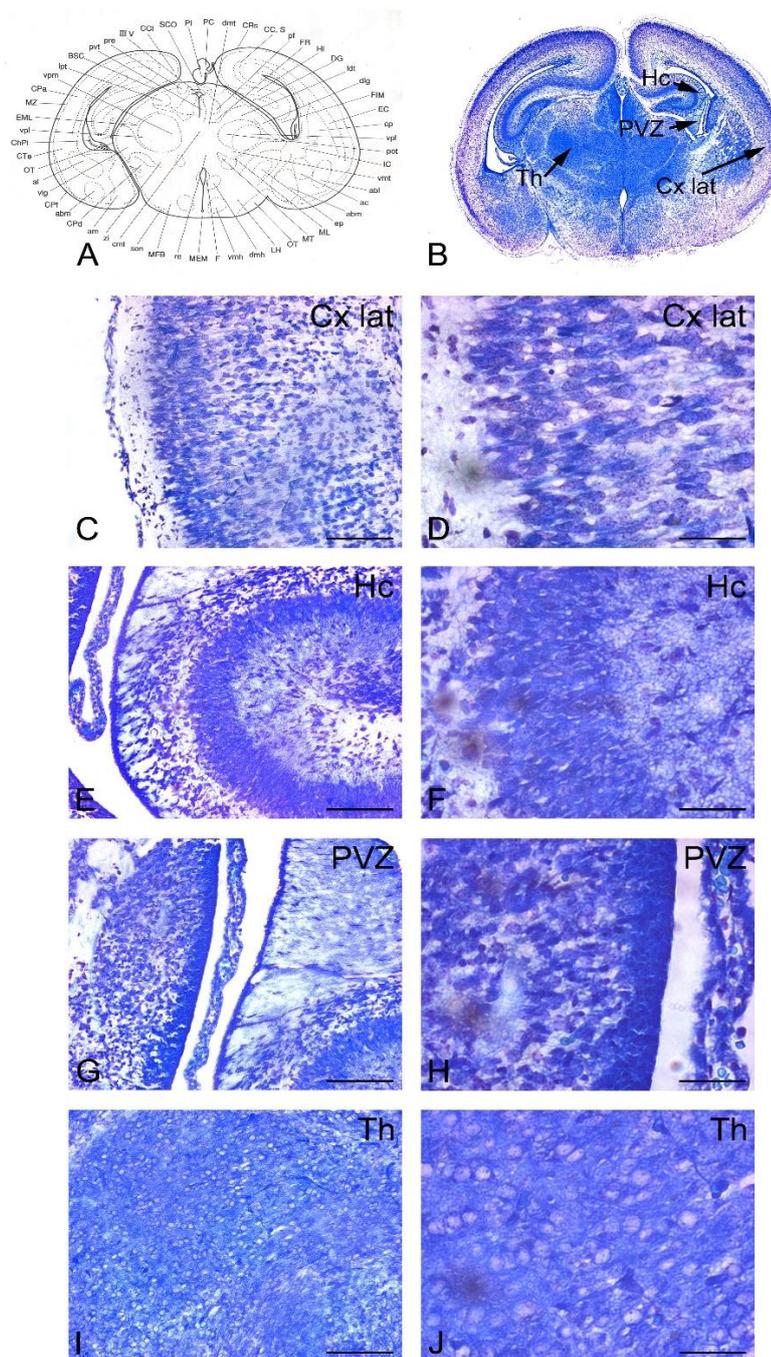


Abb. 7: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C15 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung. A: Originalzeichnung aus dem Mausatlas, die die Schnittebene C15 darstellt. B: Klüver-Barrera-Übersicht über die Schnittebene C15. C-J: Klüver-Barrera-Färbung vom Neocortex lateral (Cxlat), Hippocampus (Hp), der periventriculären Zone (PVZ) und dem Thalamus (Th). Maßstäbe = 80 µm (C, E, G, I) und 27 µm (D, F, H, J).

In dieser Schnittebene C15 (Abb. 7) wurden erneut die PVZ (Abb.7: G, H) und der laterale Neocortex (Abb.7: C, D) untersucht, sowie der Thalamus (Abb.7: I, J) und der Hippocampus (Abb.7: E, F).

4.1.4. Vorstellung der Klüver-Barrera-Färbung der Schnittebene C20

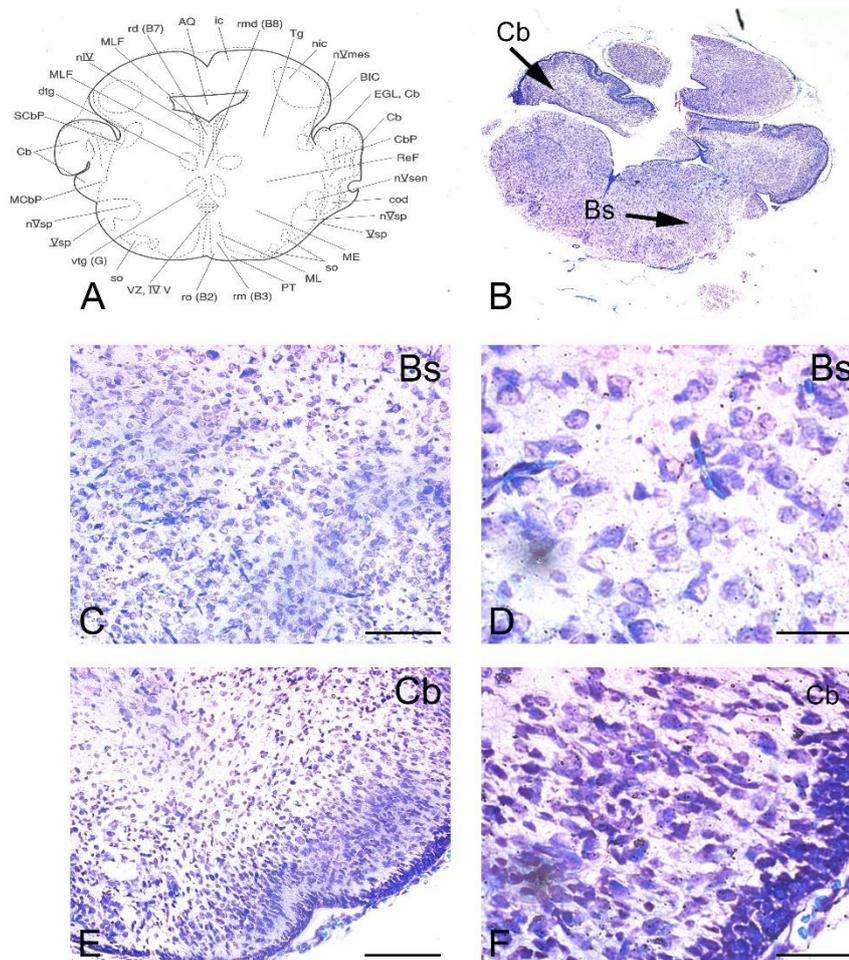


Abb. 8: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C20 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung. A: Originalzeichnung aus dem Mausatlas, die die Schnittebene C20 darstellt. B: Klüver-Barrera-Übersicht über die Schnittebene C20. C-F: Klüver-Barrera-Färbung vom Hirnstamm (Bs) und dem Cerebellum (Cb). Maßstäbe = 80 μ m (C, E) und 27 μ m (D, F).

Auf der Ebene C20 wurden das Cerebellum (Abb.8: E, F) und der Hirnstamm (Abb.8: C, D) untersucht.

4.2. Analyse der Genexpression von α -Syn und Parkin im Neocortex von *Pex13*-defizienten Mäusen

4.2.1. Resultate des Primertests

Es wurden für die Analyse der mRNA von α -Syn und Parkin je zwei Primerpaare passend herausgesucht, synthetisiert und ausgetestet. Die Primerpaare BK53/54 und

BK57/58 (Abb. 9) erbrachten bei der Austestung im Agarosegel stärkere Signale und zeigten damit eine bessere Amplifikationseffizienz als ihre Vergleichsprimerpaare BK51/52 und BK55/56, und wurden daher für die nachfolgenden qRT-PCR-Untersuchungen verwendet.

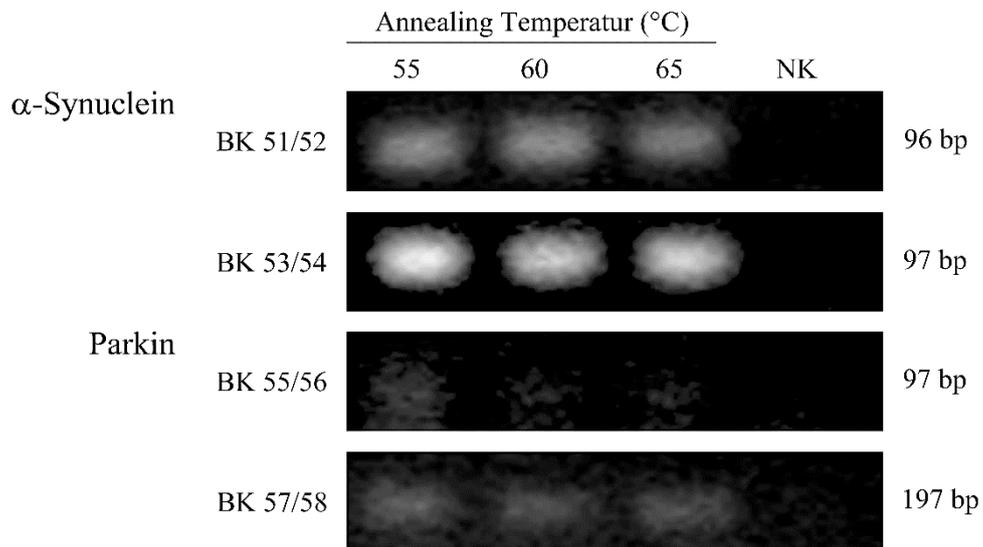


Abb. 9: Testung von qRT-PCR Primern für α -Syn und Parkin. Es wurden mit jeweils zwei Primerpaaren des α -Syn-Gens (BK51/52 und BK53/54) und des Parkin-Gens (BK55/56 und BK57/58) eine PCR mit cDNA des Neocortex einer E19 Wildtyp-Maus bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt. Zu jedem Primerpaar wurde eine PCR zur Negativkontrolle (NK) ohne Zugabe von cDNA durchgeführt.

4.2.2. Resultate der qRT-PCR

Es ließ sich kein Unterschied zwischen den drei Genotypen (*Pex13*^{+/+}, *Pex13*^{+/-} und *Pex13*^{-/-}) in der Expression des α -Syn-Gens feststellen (Abb. 10).

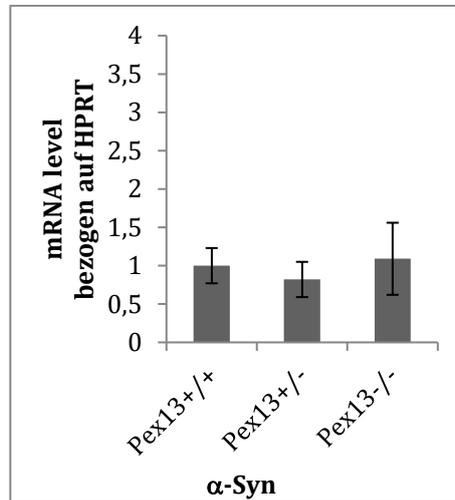


Abb.10. Kein Unterschied in der mRNA Expression von α -Syn im Neocortex von *Pex13*-defizienten Mäusen. qRT-PCR-Analyse von frontalen Neocortices von *Pex13*^{+/+} (n=2), *Pex13*^{+/-} (n=3) und *Pex13*^{-/-} (n=2) Tieren. Die Ergebnisse beziehen sich auf HPRT1 als Referenzgen und sind normiert auf das *Pex13*^{+/+} Tier. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

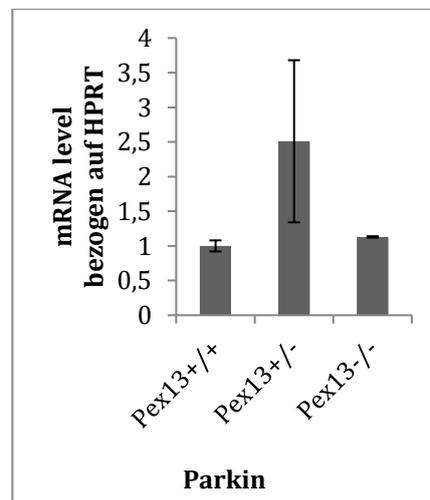


Abb. 11. Die mRNA-Level von Parkin zeigen eine Tendenz für eine Hochregulierung im Neocortex von *Pex13*^{+/-} Tieren. qRT-PCR von ganzen Mausgehirnen von *Pex13*^{+/+} (n=2), *Pex13*^{+/-} (n=3) und *Pex13*^{-/-} (n=2) Tieren. Die Ergebnisse beziehen sich auf HPRT1 als Referenzgen und sind normiert auf das *Pex13*^{+/+} Tier. Die Balken repräsentieren den Standardfehler.

In Gesamt-RNA-Präparationen des telencephalen Neocortex von *Pex13*^{+/-} Tier war ein höherer mRNA-Gehalt des Parkin-Gens als in *Pex13*^{+/+} oder *Pex13*^{-/-} Tieren nachzuweisen (Abb. 11).

4.3. Untersuchungen zur Menge an α -Syn in verschiedenen Hirnarealen von *Pex13*-defizienten Mäusen

4.3.1. Optimierung der Immunfluoreszenzfärbung für α -Syn

4.3.1.1. Verstärkung/Permeabilisierung

Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mit den verschiedenen Protokollen (Trypsin/Ameisensäure und mit/ohne TSA-Kit) ergab folgende Ergebnisse:

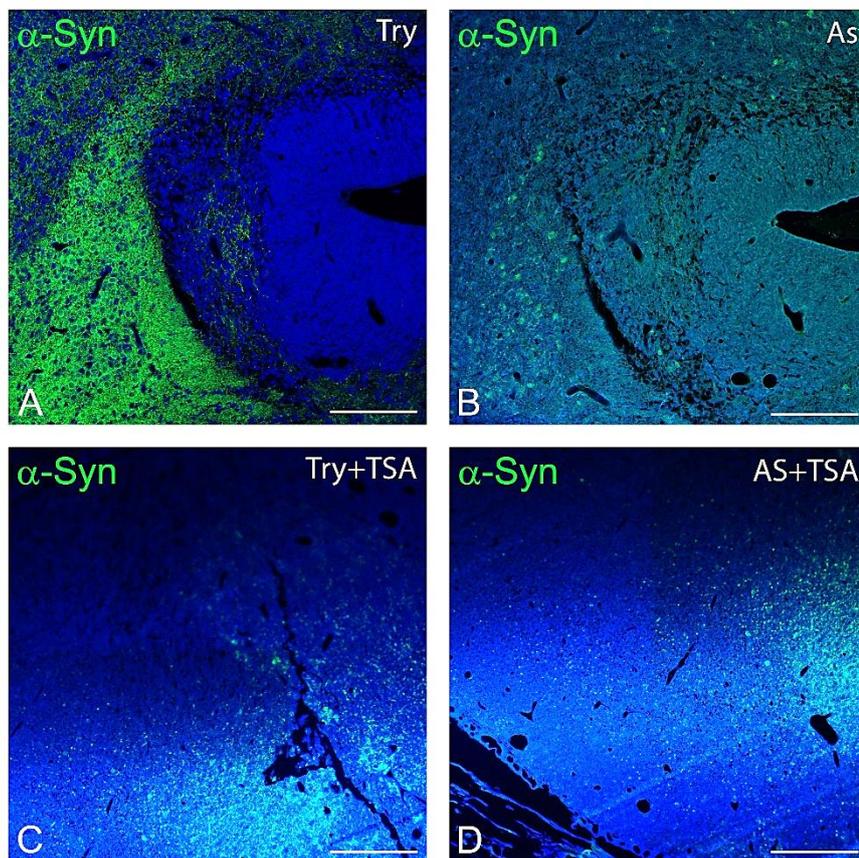


Abb. 12: Das Standardprotokoll (Trypsin, keine Signalverstärkung) eignete sich am besten für eine Immunfluoreszenzfärbung von α -Syn im Neocortex von E19 Mäusen. Zur Optimierung der Immunfluoreszenzfärbung von α -Syn wurde mit Trypsin (Try; A und C) oder Ameisensäure (As; B und D) inkubiert, und danach keine (A und B) oder die zusätzliche Signalverstärkung mit dem TSA-Kit (TSA; C und D) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit To-pro-3 Jodid gegengefärbt. Maßstab = 40 μ m.

Es zeigte sich deutlich, dass das IF-Protokoll mit Trypsin und ohne TSA-Kit das deutlichste und stärkste Signal ergab (Abb. 12). Daher wurden alle folgenden Untersuchungen mit diesem Protokoll durchgeführt.

4.3.1.2. Optimierung der Verdünnungen der Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen von embryonalen Mausgehirnen

Um sicherzustellen, dass die Primärantikörper nicht in einer gesättigten Konzentration angewendet werden, wurden Verdünnungsreihen für alle diejenigen Primärantikörper durchgeführt, für die noch keine Erfahrungswerte im embryonalen Gehirngewebe vorhanden waren. Dies waren: anti- α -Syn, anti-Vimentin, anti-Parkin und anti-Oxphos IV (Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette).

4.3.1.2.1. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen α -Syn

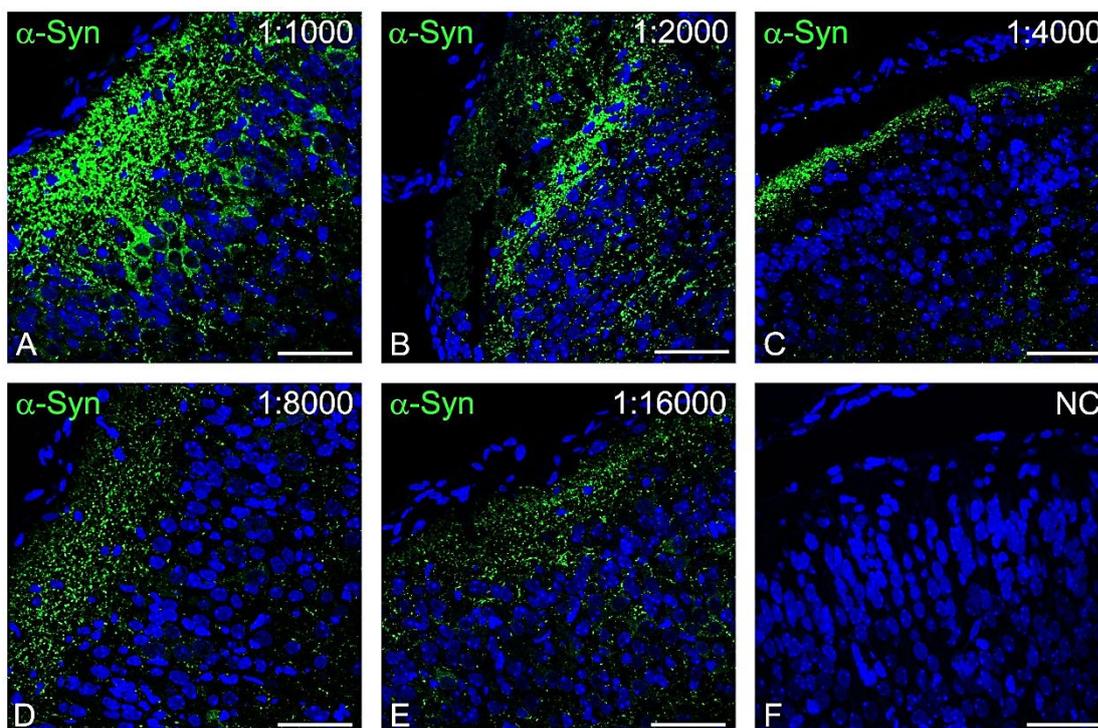


Abb. 13: Immunfluoreszenzfärbung von α -Syn an E19 Wildtypmausgehirnen des lateralen Neocortex. Der anti- α -Syn-Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (A-E); in der Negativkontrolle wurde nur der sekundäre Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488) verwendet (F). Die Zellkerne wurden mit To-pro-3 Jodid gegengefärbt. Maßstab = 40 μ m.

Die Verdünnung von 1:8000 stellte sich als die Beste heraus, da immer noch ein gut sichtbares und monospezifisches Signal bei gleichzeitig geringem Hintergrund vorhanden war (Abb. 13).

4.3.1.2.2. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen Vimentin

Vimentin ist ein Intermediarfilament-Markerprotein für neuronale und gliale Vorläuferzellen. In dieser Arbeit wurde der anti-Vimentin Antikörper deshalb zur Darstellung der neuronalen Zellkörper verwendet und sollte als Orientierungshilfe dienen. Diesbezüglich war es hilfreich eine relativ schwache Verdünnung zu wählen, damit dessen Signal in Doppelfärbungen nicht in den Vordergrund trat und in den anderen Fluoreszenzfilter durchschlug. Daher wurde bei den folgenden Färbungen eine Verdünnung von 1:16000 gewählt (Abb. 14).

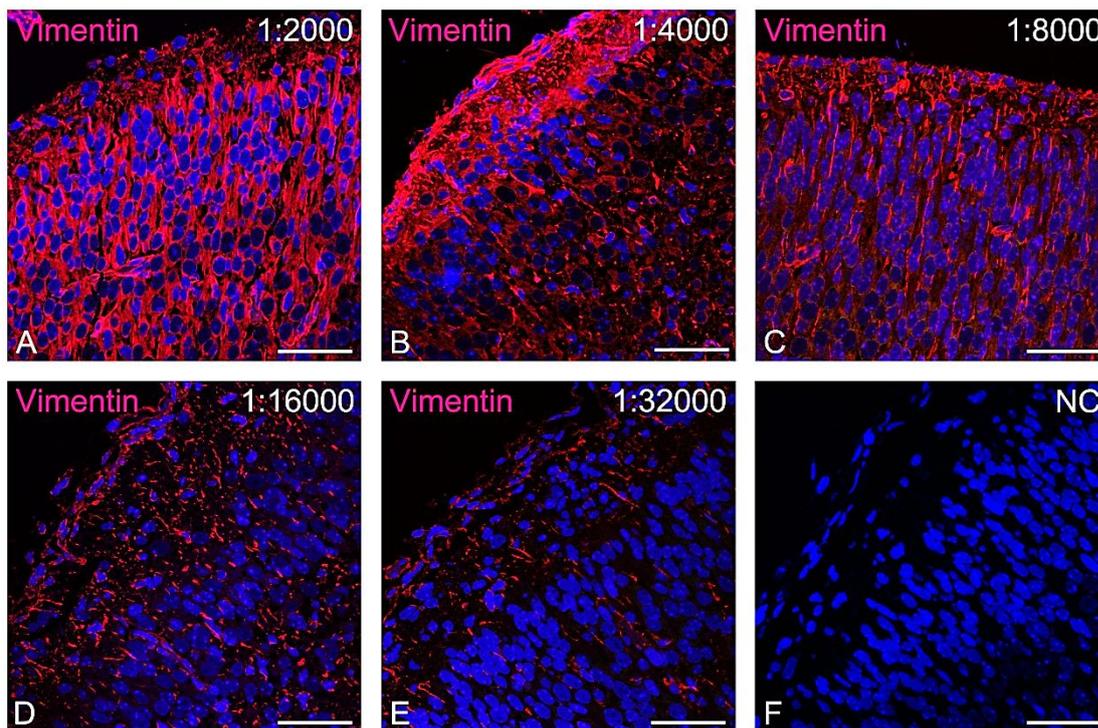


Abb. 14: Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin an E19 Wildtypmausgehirn des lateralen Neocortex. Der Vimentin-Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (A-E), bei der Negativkontrolle wurde nur der sekundäre Antikörper (Pferd anti-Maus IgG Texas Rot) verwendet (F). Die Zellkerne wurden mit To-pro-3 Jodid gegengefärbt. Maßstab = 40 μ m.

4.3.1.2.3. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen Komplex IV Untereinheit I der oxidativen Phosphorylierung (Oxph-IV)

Für den Antikörper gegen Oxph (Komplex IV Untereinheit I) war eine Verdünnung von 1:200 optimal (Abb. 15), da bei dieser die Mitochondrien immer noch gut sichtbar waren im Vergleich zu höheren Konzentrationen mit mehr Hintergrundfluoreszenz auf den Schnitten.

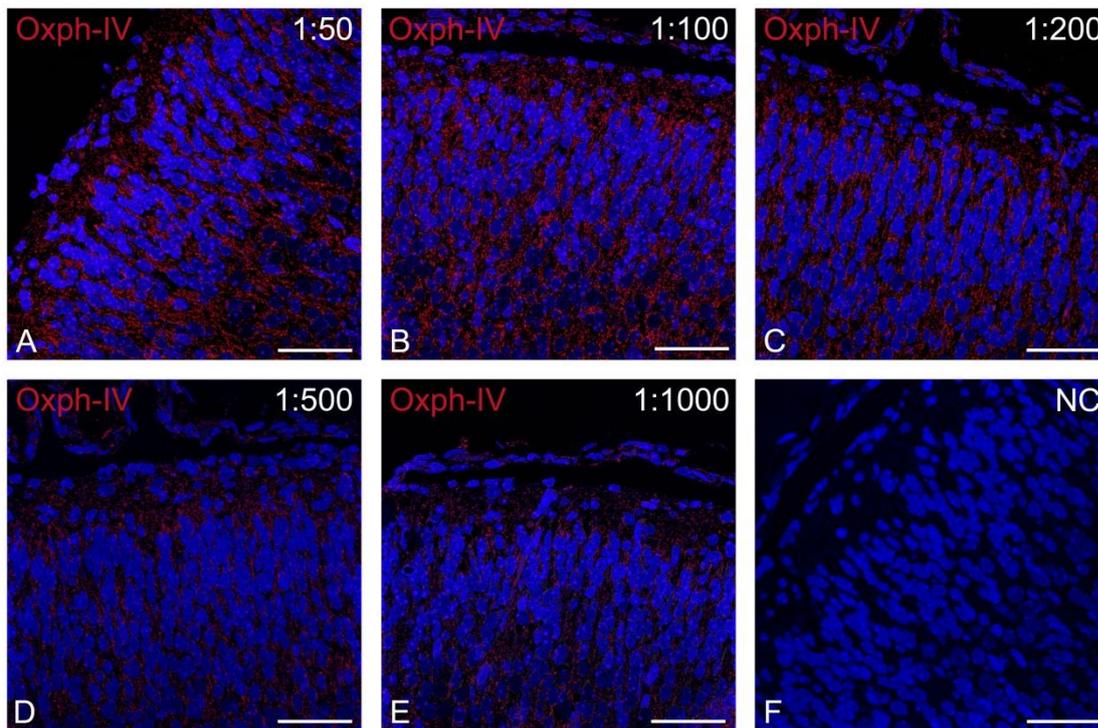


Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung von Komplex IV Untereinheit I der oxidativen Phosphorylierung an E19 Wildtypmausgehirnen des lateralen Neocortex. Der anti-Oxph-Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (A-E); bei der Negativkontrolle wurde nur der sekundäre Antikörper (Pferd anti-Maus IgG Texas Rot) verwendet (F). Die Zellkerne wurden mit To-pro-3 Jodid gegengefärbt. Maßstab = 40 µm.

4.3.1.2.4. Verdünnungsreihe mit dem Primärantikörper gegen
Parkin

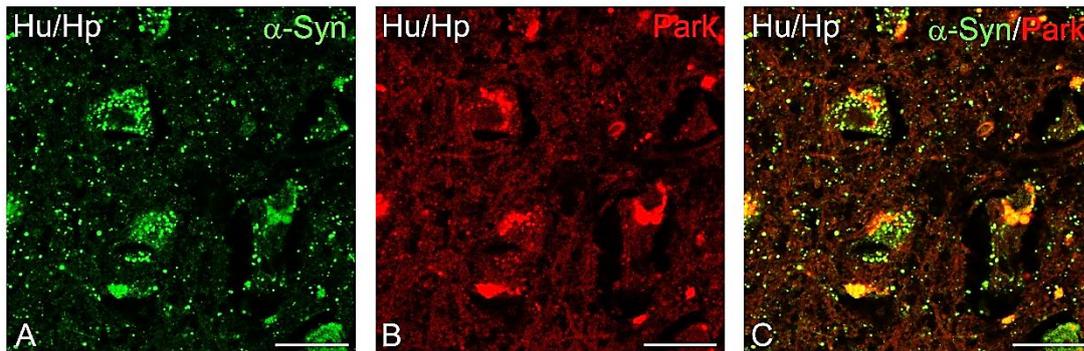


Abb. 16: Prüfung der Reaktivität des anti-Parkin-Antikörpers durch Kolo-kalisation von α -Syn und Parkin in Lewy-Körperchen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Parkin (Park) und α -Syn im Hippocampus einer 93-jährigen Dauerspenderin. Maßstab = 40 μ m

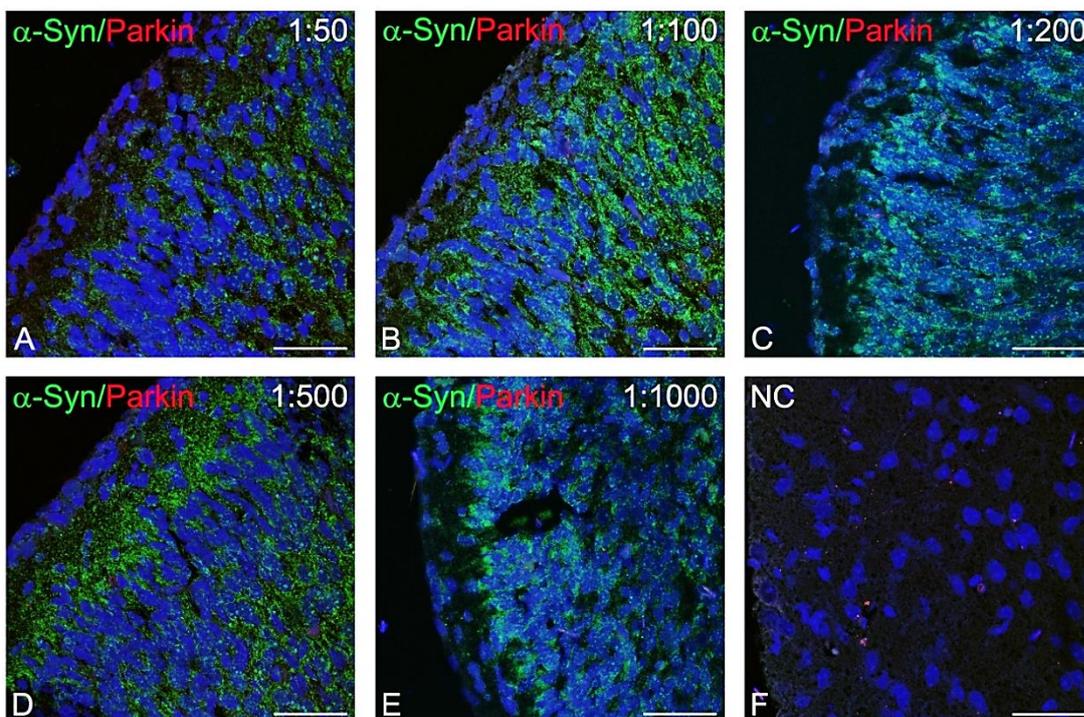


Abb. 17: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Parkin und α -Syn in E19 Wildtypmausgehirnen des lateralen Neocortex. Der anti-Parkin-Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (A-E); bei der Negativkontrolle wurden nur die sekundären Antikörper (Pferd anti-Maus IgG Texas Rot und Esel anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 488) verwendet (F). Die Zellkerne wurden mit To-pro-3 Jodid gegengefärbt. Maßstab = 40 μ m.

Da für das embryonale Mausgehirn nur sehr geringe Mengen an Parkin-Protein zu erwarten sind, war eine gute Positivkontrolle notwendig. Dazu wurde ein Paraffinschnitt eines Formalin-fixierten Gehirns einer 93 Jahre alten weiblichen Dauerspenderin

verwendet. Die in dieser Arbeit gezeigten Bilder (Abb. 16) dienten nur der Prüfung der Reaktivität des anti-Parkin-Antikörpers. Im humanen Gehirn fand sich bei der Verwendung des Primärantikörpers gegen Parkin sowohl eine stark positive Immunfluoreszenz als auch eine deutliche Kolo-kalisation von α -Syn und Parkin; ein Hinweis darauf, dass der Antikörper Parkin detektieren konnte und auf das Vorhandensein von Lewy-Körperchen im Hippocampus der Dauerspenderin.

Im Vergleich dazu zeigte der anti-Parkin-Primärantikörper mit der gleichen Verdünnung beim embryonalen Mausgehirn ein Signal unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 17). Wir vermuten, dass Parkin in dieser Lebensphase der Maus noch nicht stark genug exprimiert wurde, um ein sichtbares Signal unter diesen Bedingungen geben zu können. Andererseits hätte es sein können, dass der Antikörper nur mit Parkin des Menschen und nicht mit dem der Maus reagierte. Daher wurden Neocortices von 19, bzw. 65 Wochen-alten Mäusen unter gleichen Bedingungen sowie zusätzlich mit einer höheren Verdünnung vergleichend mit den embryonalen Mausgehirnen gefärbt (Abb. 18).

Auch mit einer Verdünnung von nur 1:10 zeigte sich im embryonalen Hirnschnitt kein eindeutig sichtbares Signal. Im Gegenzug war bei den älteren Mäusen deutlich eine schwache zytoplasmatische Färbung sichtbar. Die extrazellulären Agglomerate, die in dem 19 Wochen-alten Gehirn und verstärkt im 65 Wochen- alten Gehirn vorkommen, sind auch in den Negativkontrollen sichtbar, weshalb es sich bei diesen Ablagerungen wahrscheinlich um eine unspezifische Färbung der Agglomerate handelt. Im embryonalen Gehirn waren diese Agglomerate nicht vorhanden.

Die Tatsache, dass geringe Mengen an Parkin im erwachsenen Mausgehirn, nicht aber im E.19 Tier nachweisbar waren, lässt die Schlussfolgerung zu, dass der verwendete Antikörper Parkin der spezifisch Maus erkennt und dass die Menge dieses Proteins mit steigendem Alter zunimmt. Diese Vermutung deckt sich mit den Ergebnissen von Kitada und Kollegen (Kitada et al. 2000).

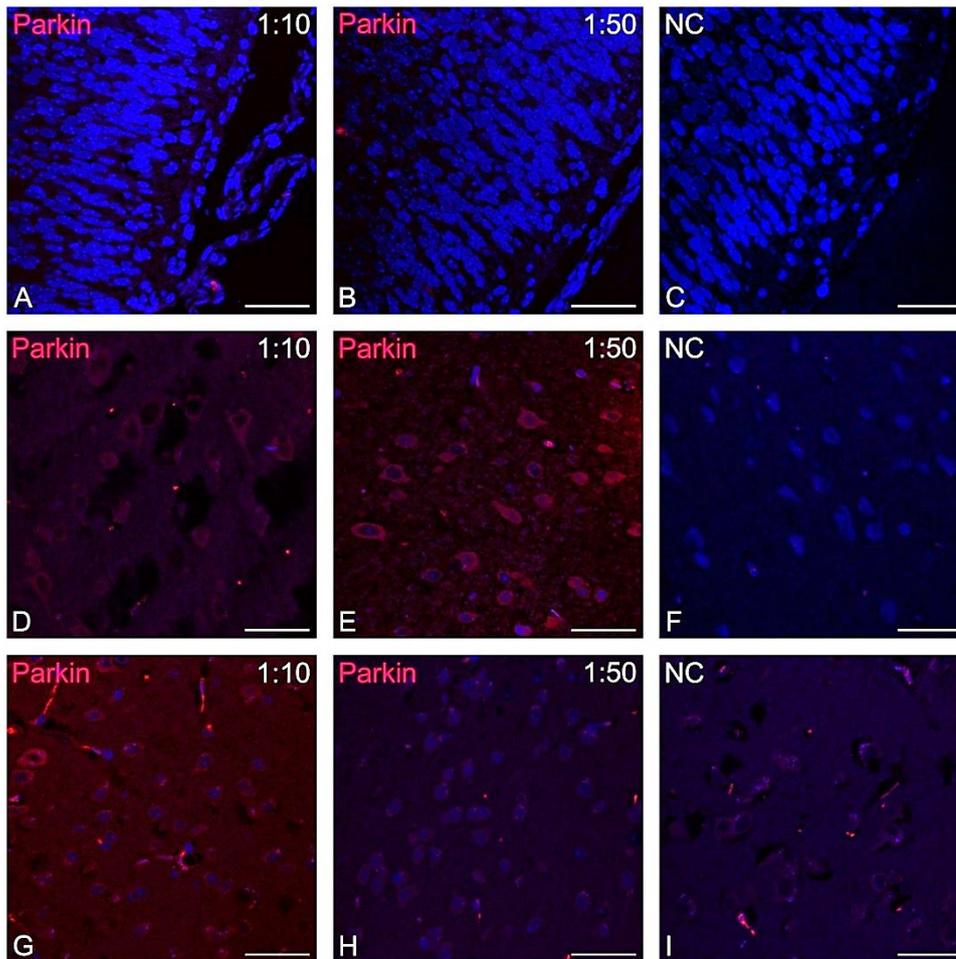


Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbung von Parkin im lateralen Neocortex von E19, P133 und P455 Mäusen. Der anti-Parkin-Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen bei Mäusen unterschiedlichen Alters eingesetzt (E19: A, B; P133: D, E; P455: G, H), bei der Negativkontrolle wurde nur der sekundäre Antikörper (Pferd anti-Maus IgG Texas Rot) verwendet (C, F, I). Die Zellkerne wurden mit To-pro-3 Jodid gegengefärbt. Maßstab= 40 µm.

4.3.2. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Primärantikörpern gegen α -Syn und Vimentin im Gehirn von *Pex13*-defizienten Mäusen (Gruppen 1 und 2)

4.3.2.1. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C5

Neocortex lateral, Gruppe 1

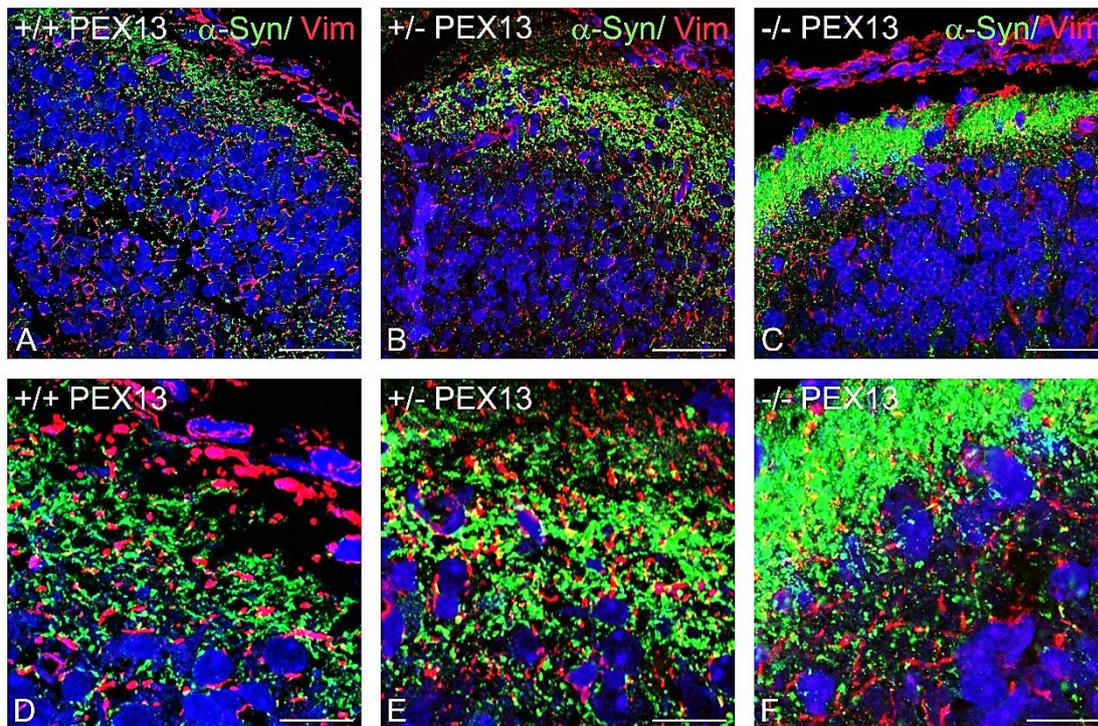


Abb. 19: Erhöhte Menge an α -Syn-Protein im lateralen Neocortex der *Pex13*^{-/-} Maus im Vergleich zur *Pex13*^{+/+} und *Pex13*^{+/-} Maus.

Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des lateralen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstäbe = 40 μ m (A-C) und 23 μ m (D-F).

α -Syn war in allen untersuchten Neocortices (Abb. 19, 20) bevorzugt im Stratum molekulare (Marginalzone der kortikalen Platte) vorzufinden. Ebenso zeigte sich, dass α -Syn im lateralen Neocortex der *Pex13*^{-/-} und in der *Pex13*^{+/-} Maus in höherer Menge vorkommt als im *Pex13*^{+/+} Tier.

Lateraler Neocortex, Gruppe 2

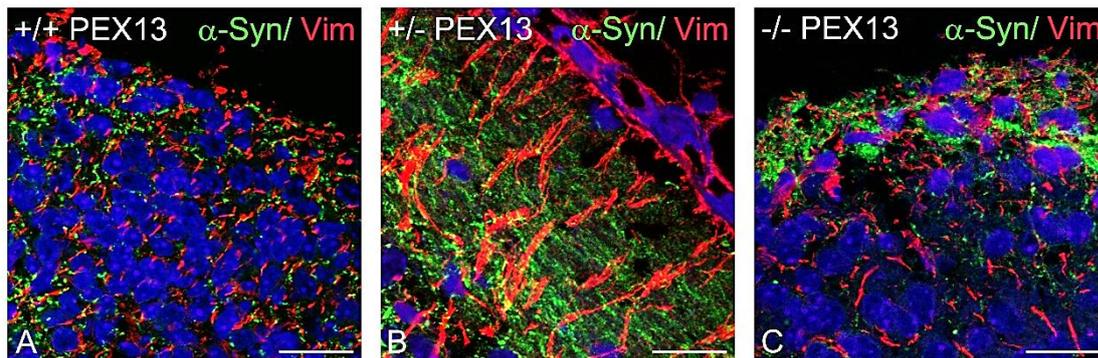


Abb. 20: Im lateralen Neocortex finden wir eine erhöhte Menge an α -Syn im *Pex13+/-* Tier im Vergleich zum *Pex13+/+* Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des lateralen Neocortex von *Pex13+/+* (A), *Pex13+/-* (B) und *Pex13-/-* (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m (A-C).

Medialer Neocortex, Gruppe 1

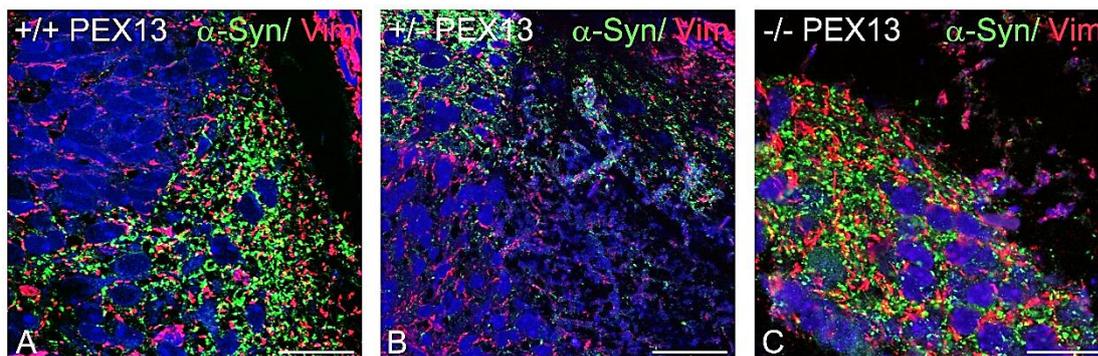


Abb. 21: Im medialen Neocortex findet sich nur eine geringe Menge α -Syn-Protein im *Pex13+/-* Tier im Vergleich zum *Pex13+/+* Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des medialen Neocortex von *Pex13+/+* (A), *Pex13+/-* (B) und *Pex13-/-* (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m (A-C).

In der Gruppe 1 und 2 nahm die Menge an α -Syn im *Pex13-/-* Tier im Vergleich zu den *Pex13* WT- und *Pex13* heterozygoten Tieren nicht zu (Abb. 21, 22). Im heterozygoten Tier war die α -Syn Menge in der Gruppe 1 erniedrigt (Abb. 21B), wohingegen sie in der Gruppe 2 erhöht war (Abb. 22B). Insgesamt war die Menge von α -Syn im medialen Neocortex geringer als im lateralen Neocortex.

Medialer Neocortex, Gruppe 2

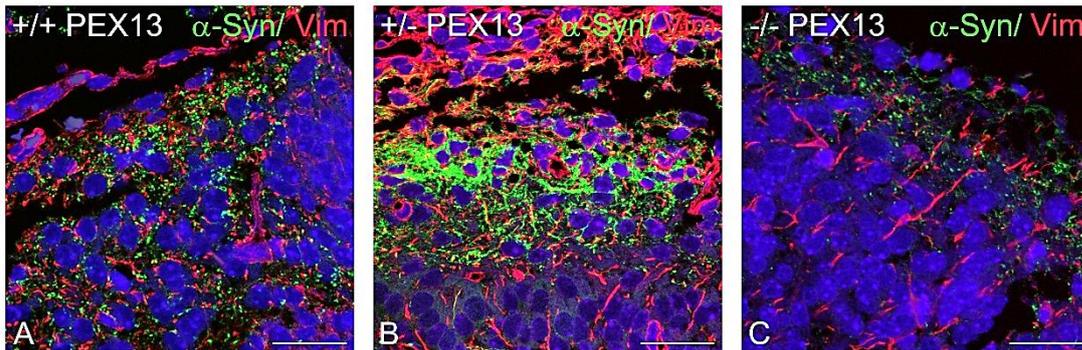


Abb. 22: Erhöhte Menge von α -Syn im medialen Neocortex von *Pex13*^{+/-} Mäusen im Vergleich zum *Pex13*^{+/+} Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des medialen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 33 μ m (A-C).

C5 Periventriculäre Zone (PVZ)

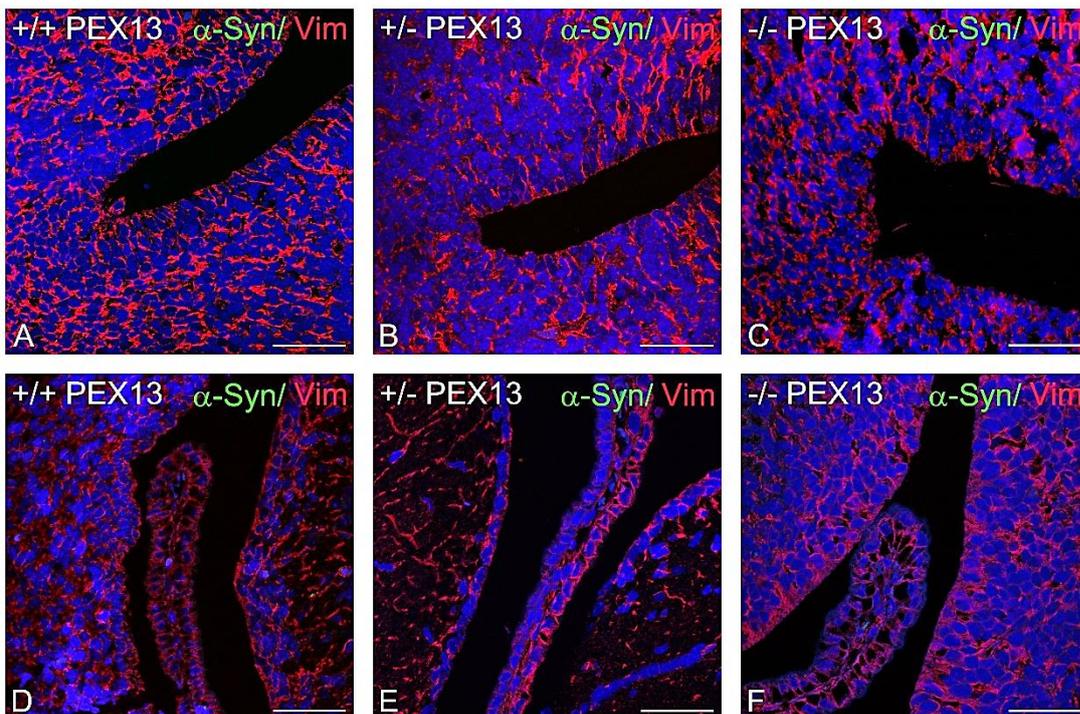


Abb. 23: In der periventriculären Zone liegt die Menge an α -Syn unterhalb der nachweisbaren Grenze. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin der PVZ der Gruppe 1 von C5 (A-C) und C15 (D-F). *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F). Maßstab = 40 μ m.

An dieser Stelle des Ergebnisteils der Dissertation werden α -Syn-Immunfluoreszenzfärbungen der PVZ der 1. Gruppe repräsentativ gezeigt (Abb. 23).

Auch in der PVZ aller anderen untersuchten Gewebeschnitte (C10, C15, C20) und Genotypen lag α -Syn unter der nachweisbaren Grenze.

4.3.2.2. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C10

Lateraler Neocortex, Gruppe 1

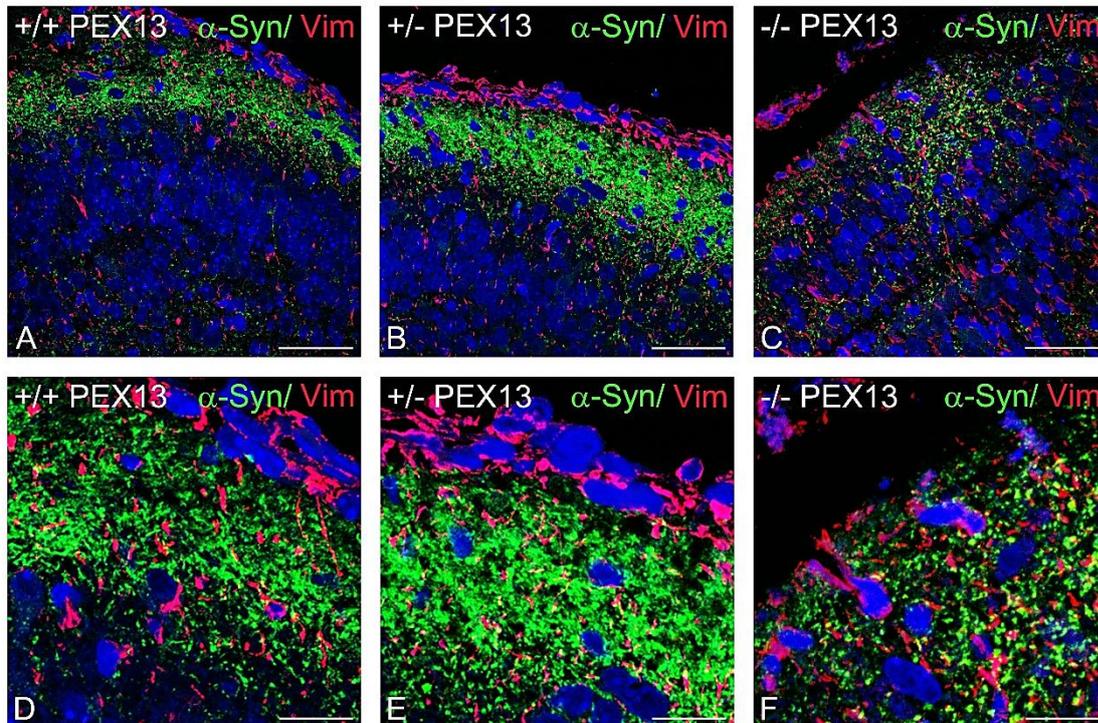


Abb. 24: Verminderte Menge an α -Syn im *Pex13*^{-/-} Tier im Vergleich zum *Pex13*^{+/+} Tier im lateralen Neocortex. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des lateralen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 μ m (A-C) und 23 μ m (D-F).

In der Gruppe 1 wurde im *Pex13*^{-/-} Tier die geringste Menge des Proteins verglichen mit dem Wildtyp-Tier (Abb. 24) nachgewiesen. Das *Pex13*^{+/+} und das *Pex13*^{+/-} Tier besaßen ungefähr gleich viel α -Syn. In der Gruppe 2 hingegen fand sich im WildtypTier die geringste Menge an α -Syn (Abb. 25).

Lateraler Neocortex, Gruppe 2

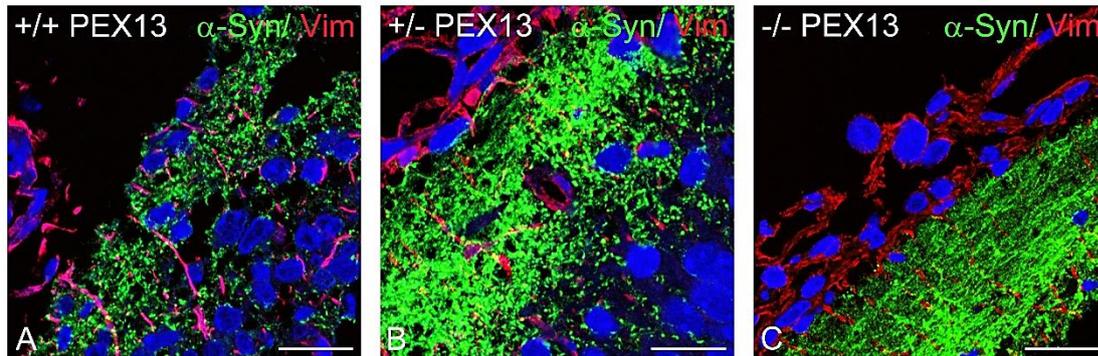


Abb. 25: Im lateralen Neocortex findet sich eine wesentlich geringere Menge an α -Syn im *Pex13*^{+/+} Tier verglichen mit den *Pex13*^{+/-} und *Pex13*^{-/-} Tieren. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des lateralen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 23 μ m.

Medialer Neocortex

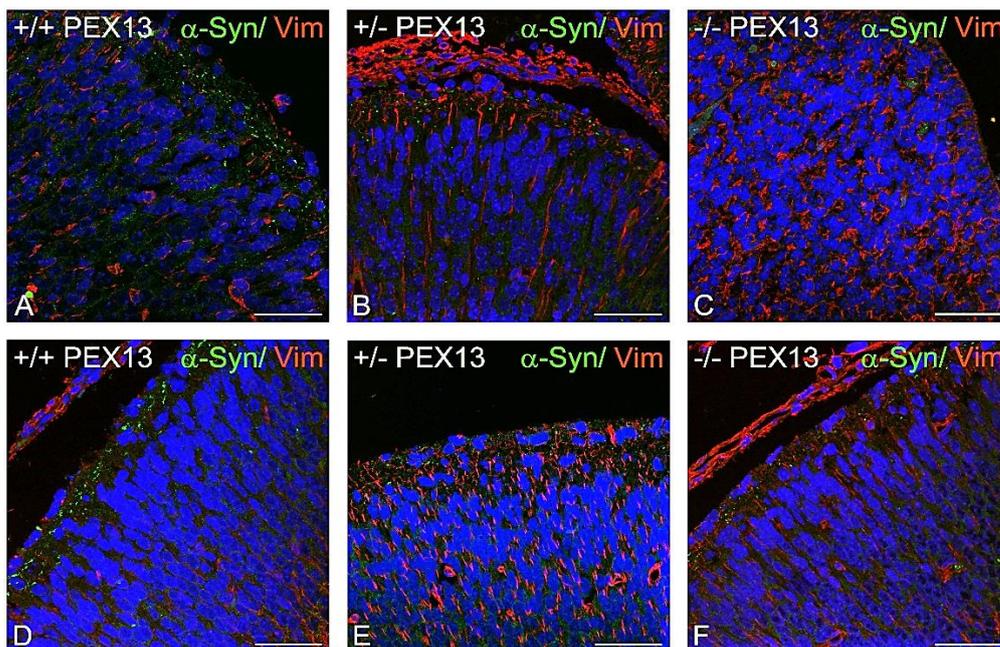


Abb. 26: α -Syn liegt in den medialen Neocortices aller *Pex13* Genotypen der C10 Schnittebene im nicht nachweisbaren Bereich. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin medialen Neocortex der Gruppe 1 (A-C) und Gruppe 2 (D-F) von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

In den medialen Neocortices und den Putamina beider Gruppen lag die α -Syn-Fluoreszenz in der Standardschnittebene C10 unter der nachweisbaren Grenze (Abb. 26, 27).

Putamen

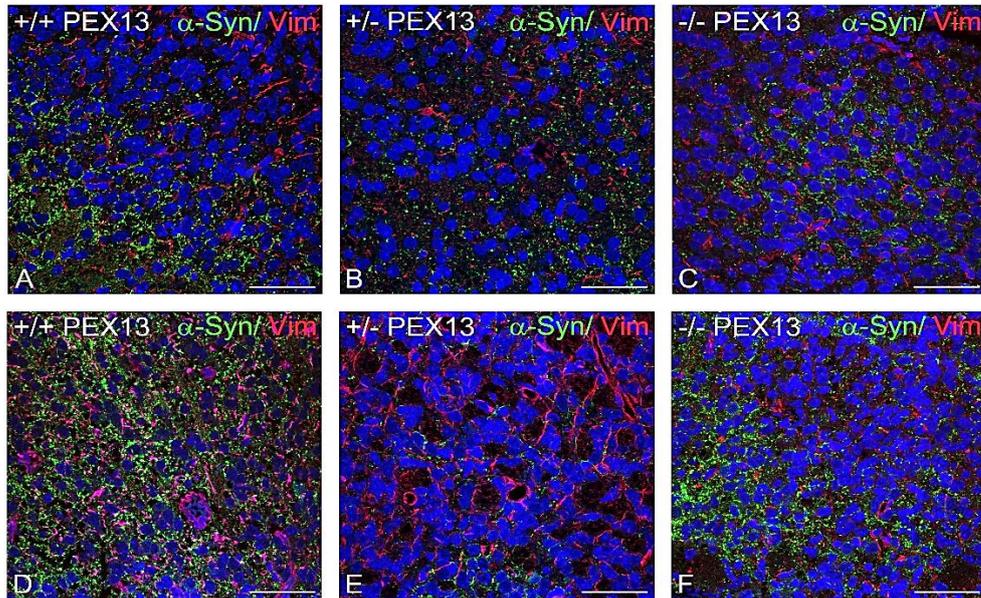


Abb. 27: Im Putamen finden sich keine Unterschiede in der α -Syn Menge zwischen den *Pex13* Genotypen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin an den Putamina der unterschiedlichen Tiere der Gruppe 1 (A-C) und 2 (D-F) von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Tier. Maßstab = 40 μ m.

4.3.2.3. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C15

Lateraler Neocortex, Gruppe 1

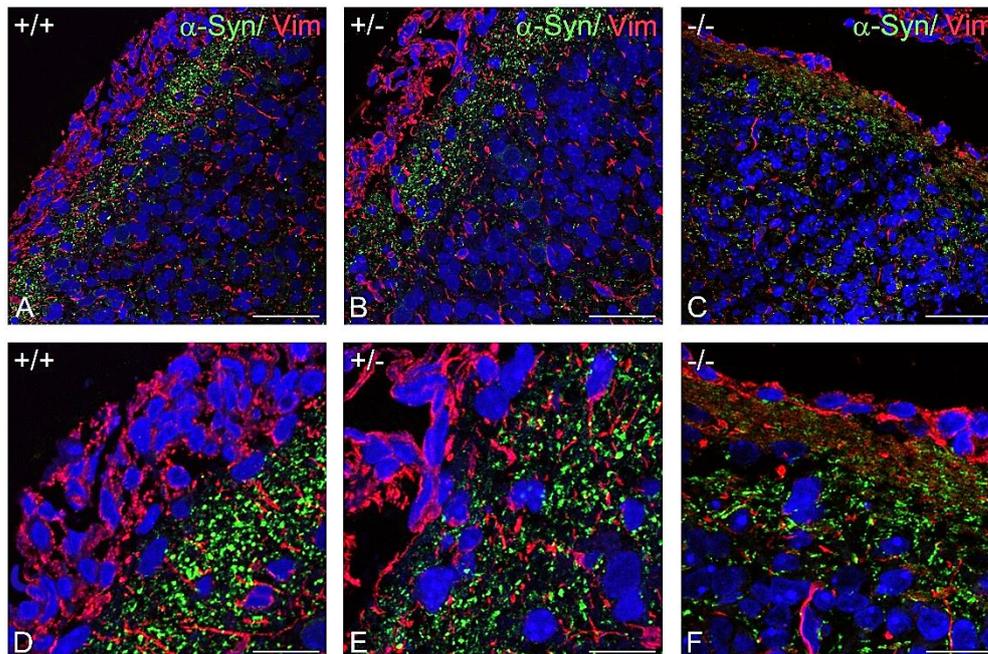


Abb. 28: Im lateralen Neocortex der Schnittebene C15 ist die Menge an α -Syn wesentlich geringer als in den lateralen Neocortices von C5 oder C10. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin an den lateralen Neocortices der

unterschiedlichen Tiere der Gruppe 1 von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 µm (A-C) und 23 µm (D-F).

In der Schnittebene C15 beider Gruppen (Abb. 28, 29) zeigte sich eine deutlich geringere Menge an α -Syn verglichen mit den lateralen Neocortices der mehr frontal liegenden Schnittebenen C5 und C10. Erneut befand sich die α -Syn-Färbung in der Kortikalen Platte und war auch in der Gruppe 1 (Abb. 28) in allen *Pex13*-Genotypen in ähnlich hohen Mengen vorhanden. In der Gruppe 2 jedoch war α -Syn im *Pex13*^{-/-} Tier in erhöhten Mengen vorzufinden (Abb. 29).

Lateraler Neocortex, Gruppe 2

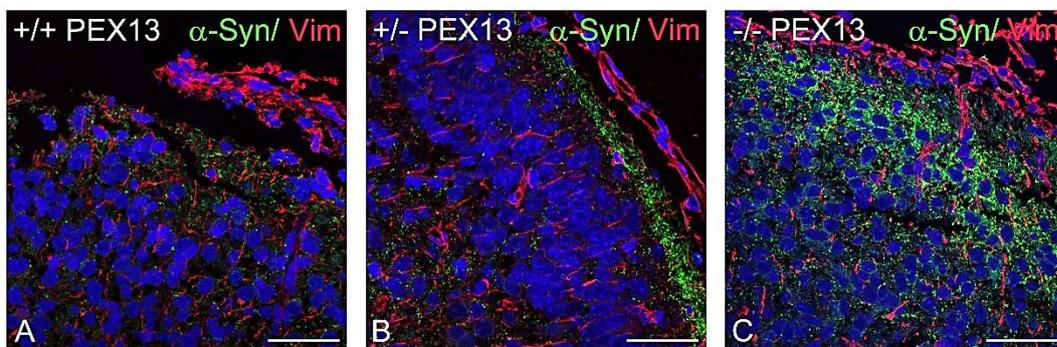


Abb. 29: Im lateralen Neocortex ist α -Syn in der *Pex13*^{-/-} Maus wesentlich stärker vorhanden im Vergleich zum *Pex13*^{+/+} Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin an den lateralen Neocortices der Gruppe 2 von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

Hippocampus, Gruppe 1

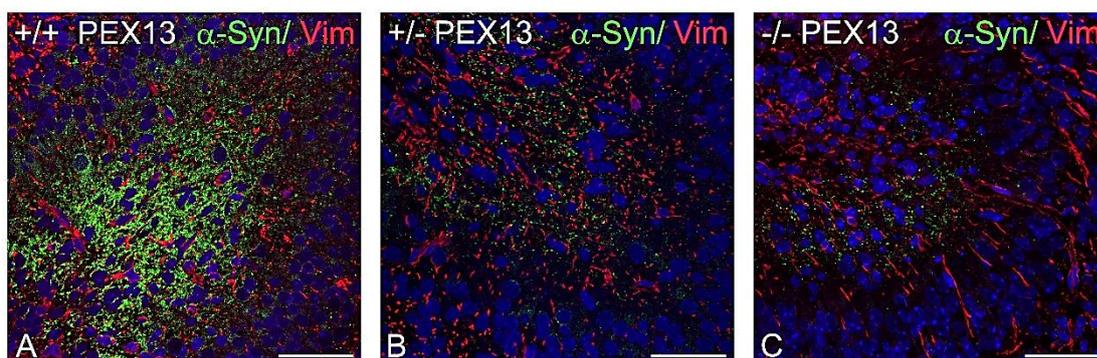


Abb. 30: Im Hippocampus nimmt der Gehalt an α -Syn in PEX13-defizienten Mäusen deutlich ab. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin am Hippocampus der Gruppe 1. Dargestellt sind die Hippocampi von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40µm.

In der ersten Gruppe findet sich im Hippocampus die höchste Menge an α -Syn in der *Pex13*^{+/+} Maus (Abb. 30), in der 2. Gruppe in der *Pex13*^{-/-} Maus (Abb. 31).

Hippocampus, Gruppe 2

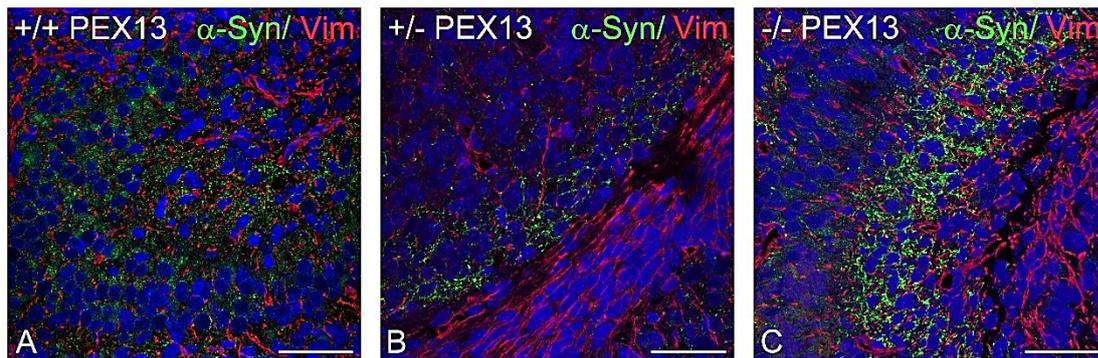


Abb. 31: Erhöhte Menge an α -Syn im Hippocampus im *Pex13*^{-/-} Tier im Vergleich zum Wildtyp. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin am Hippocampus von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

Thalamus

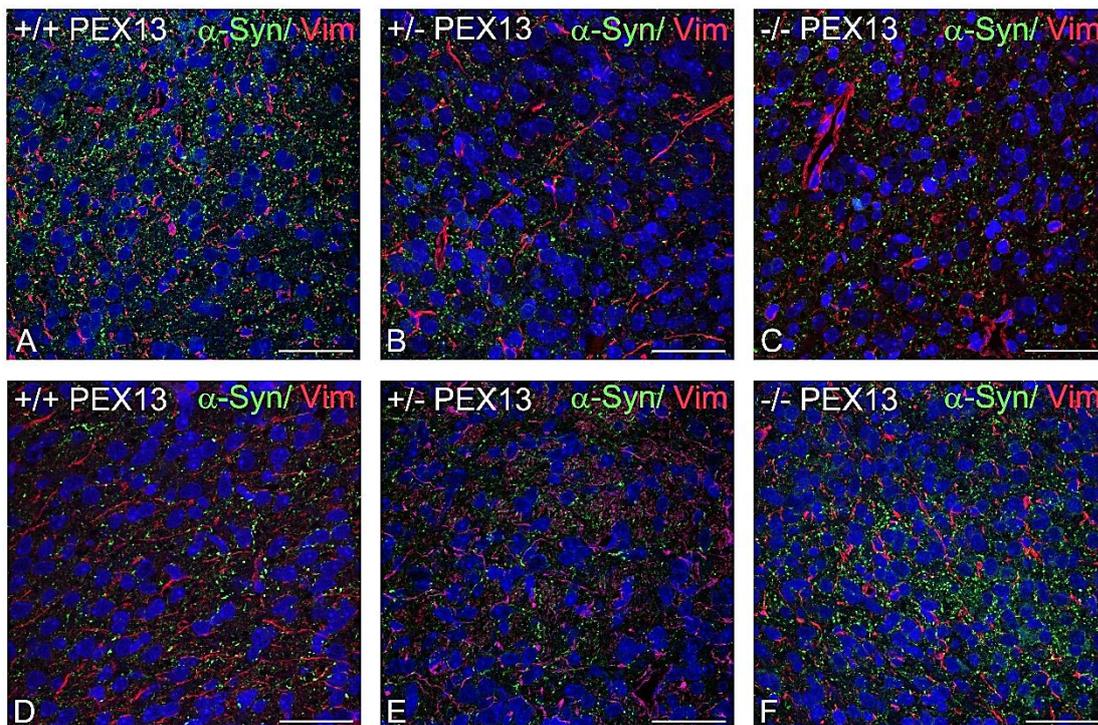


Abb. 32: Im Thalamus waren in allen Genotypen ähnlich hohe Mengen an α -Syn zu finden. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin am Thalamus der Gruppen 1 (A-C) und 2 (D-F) von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

Die Untersuchungen des Thalamus ergaben ein ähnliches Bild wie beim Putamen. In allen Genotypen waren ähnliche Mengen an α -Syn vorzufinden (Abb. 32). Für diese beiden Regionen wie für den Hirnstamm konnten in dieser Dissertation keine Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden.

4.3.2.4. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C20

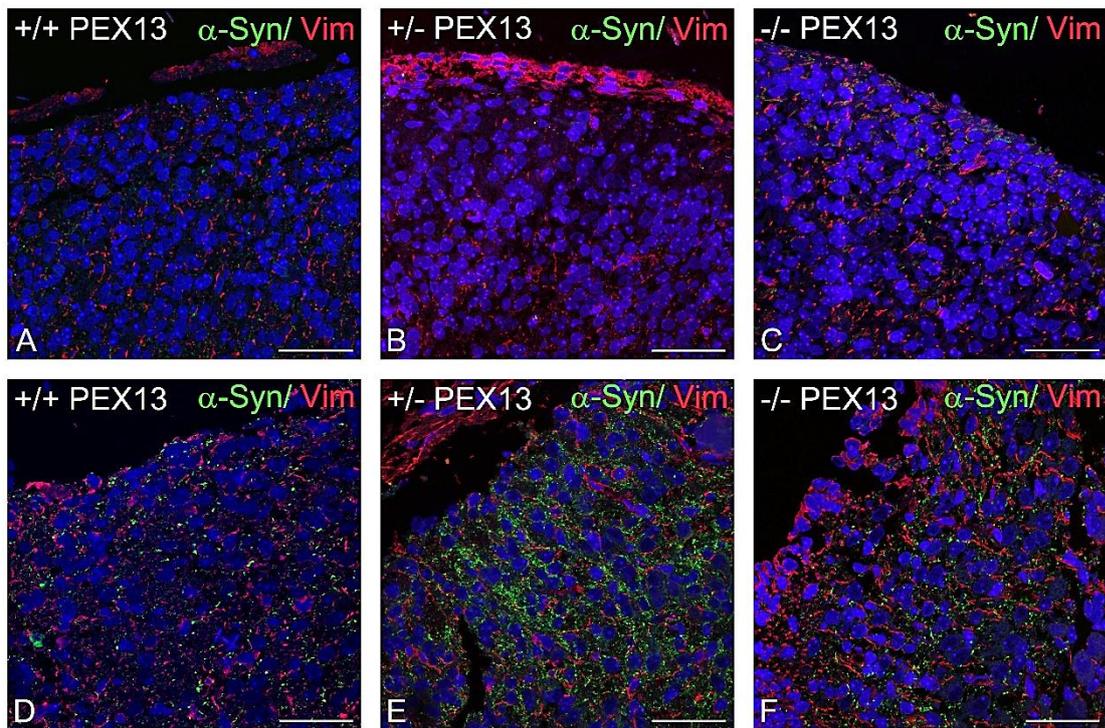


Abb. 33: Keine Unterschiede in der Verteilung von α -Syn im Cerebellum. Im Hirnstamm der Gruppe 1 findet sich im *Pex13*^{+/-} Tier eine erhöhte Menge von α -Syn im Vergleich zum Wildtyp- bzw. *Pex13*^{-/-} Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin am Cerebellum (A-C) und Hirnstamm (D-F) von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

Im Cerebellum waren in allen Genotypen keine Unterschiede in der Proteinmenge von α -Syn nachzuweisen (Abb.33). Im Hirnstamm zeigten jedoch die *Pex13*^{+/-} Tiere eine erhöhte Menge an α -Syn.

4.3.2.5. Vorstellung der Ergebnisse der *Pex11 β* - Mäuse

In den meisten untersuchten Bereichen der Gehirne aller drei *Pex11 β* -Genotypen fanden sich keine Unterschiede im Gehalt von α -Syn (Abb.34, 35, 36, 38), eine Ausnahme hierzu war der Hippocampus (Abb. 37). Hier konnte eine erhöhte α -Syn Menge in *Pex11 β* ^{-/-} Tieren festgestellt werden. Im Folgenden werden nur die Areale dargestellt, die bereits bei den Untersuchungen der *Pex13*-defizienten Tiere eine Veränderung des α -Syn-Proteingehalts aufwiesen.

Neocortex lateral von C5

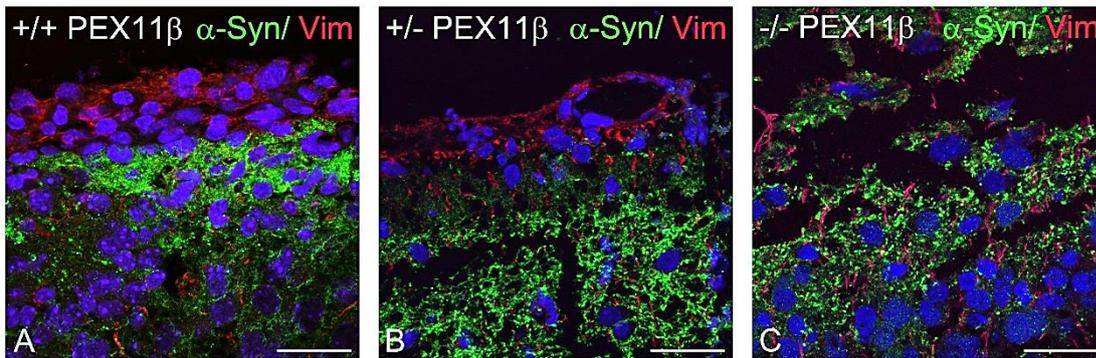


Abb. 34: Keine Unterschiede im α -Syn- Gehalt im lateralen Neocortex in der Schnittebene C5 von *Pex11 β* ^{+/+}, *Pex11 β* ^{+/-} und *Pex11 β* ^{-/-} Mäusen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des lateralen Neocortex von *Pex11 β* ^{+/+} (A), *Pex11 β* ^{+/-} (B) und *Pex11 β* ^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m

Neocortex lateral von C10

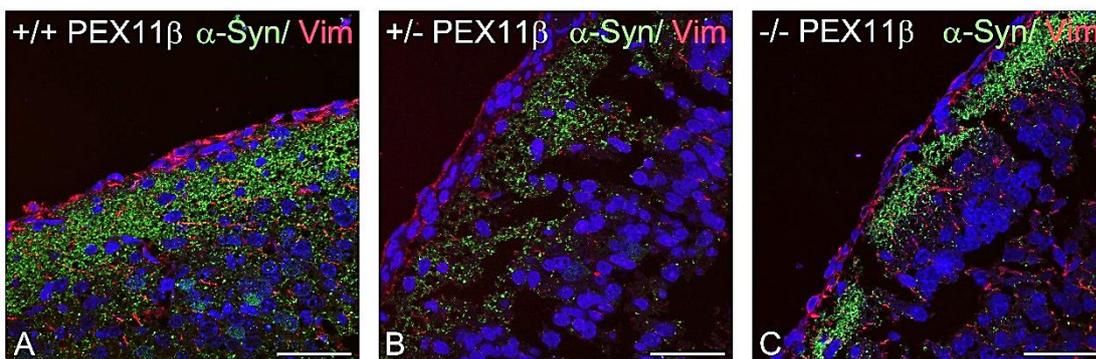


Abb. 35: Keine Unterschiede im α -Syn- Gehalt im lateralen Neocortex in der Schnittebene C10 von *Pex11 β* ^{+/+}, *Pex11 β* ^{+/-} und *Pex11 β* ^{-/-} Mäusen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des lateralen Neocortex von *Pex11 β* ^{+/+} (A), *Pex11 β* ^{+/-} (B) und *Pex11 β* ^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m

Neocortex lateral von C15

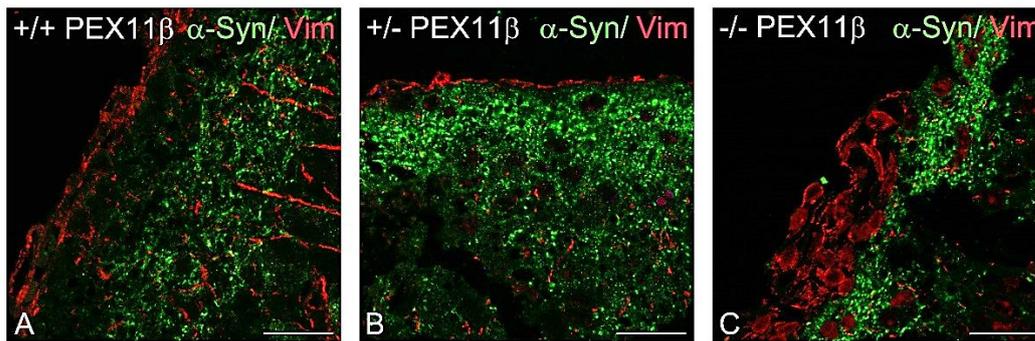


Abb. 36: Keine Unterschiede im α -Syn- Gehalt im lateralen Neocortex in der Schnittebene C15 von $Pex11\beta^{+/+}$, $Pex11\beta^{+/-}$ und $Pex11\beta^{-/-}$ Mäusen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des lateralen Neocortex von $Pex11\beta^{+/+}$ (A), $Pex11\beta^{+/-}$ (B) und $Pex11\beta^{-/-}$ (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m

Hippocampus

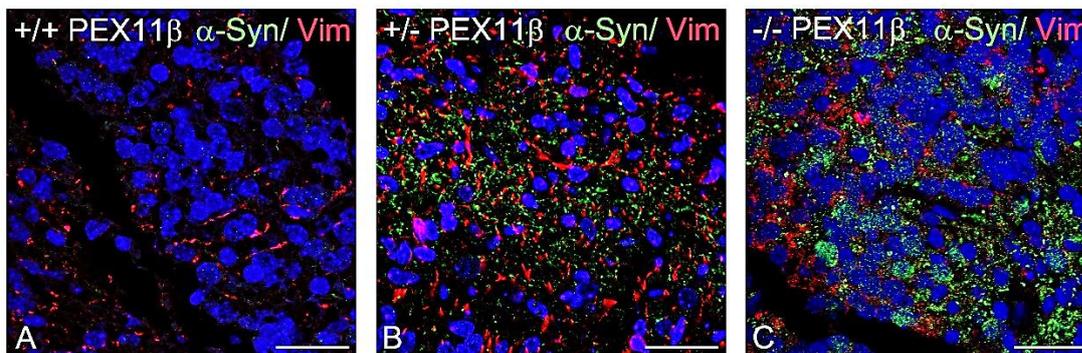


Abb. 37: Erhöhte Menge an α -Syn im Hippocampus von $Pex11\beta^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp- und Heterozygoten-Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin im Hippocampus von $Pex11\beta^{+/+}$ (A), $Pex11\beta^{+/-}$ (B) und $Pex11\beta^{-/-}$ (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m

Cerebellum

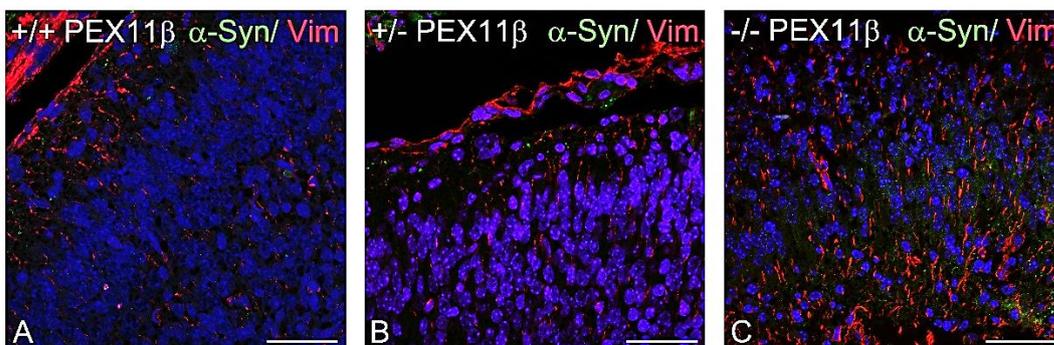


Abb. 38: Im Cerebellum liegt die Menge an α -Syn in allen Genotypen unter der nachweisbaren Grenze. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Vimentin des Cerebellums von $Pex11\beta^{+/+}$ (A), $Pex11\beta^{+/-}$ (B) und $Pex11\beta^{-/-}$ (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m

4.3.3. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Primärantikörpern gegen SOD2 und Vimentin in den Mausgehirnen der Gruppen 1 und 2

4.3.3.1. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C5

Lateraler Neocortex, Gruppe 1

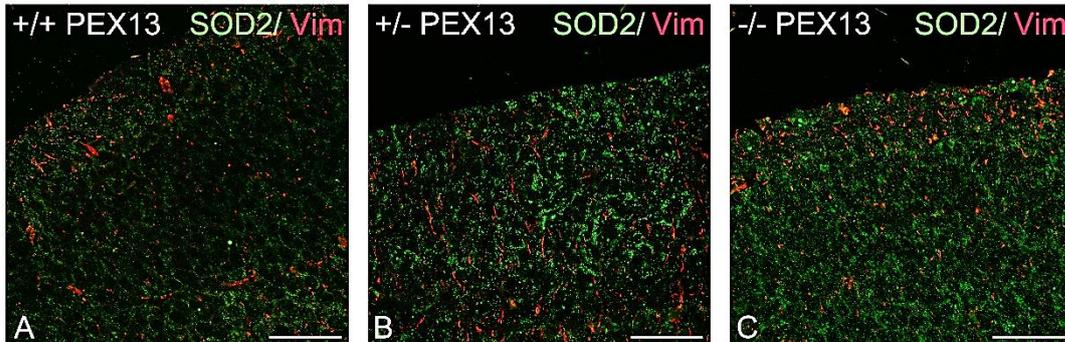


Abb. 39: Im lateralen Neocortex findet sich im *Pex13+/-* Tier die höchste Menge an SOD2 im Vergleich zum Wildtyp. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin am lateralen Neocortex von *Pex13+/+* (A), *Pex13+/-* (B) und *Pex13-/-* (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

Die SOD2 Menge war am höchsten im lateralen Neocortex der *Pex13+/-* Maus im Vergleich zur *Pex13-/-* Maus ausgeprägt. Noch geringere SOD2 Menge wurden in dieser Region in der *Pex13+/+* Maus vorgefunden (Abb. 39).

Lateraler Neocortex, Gruppe 2

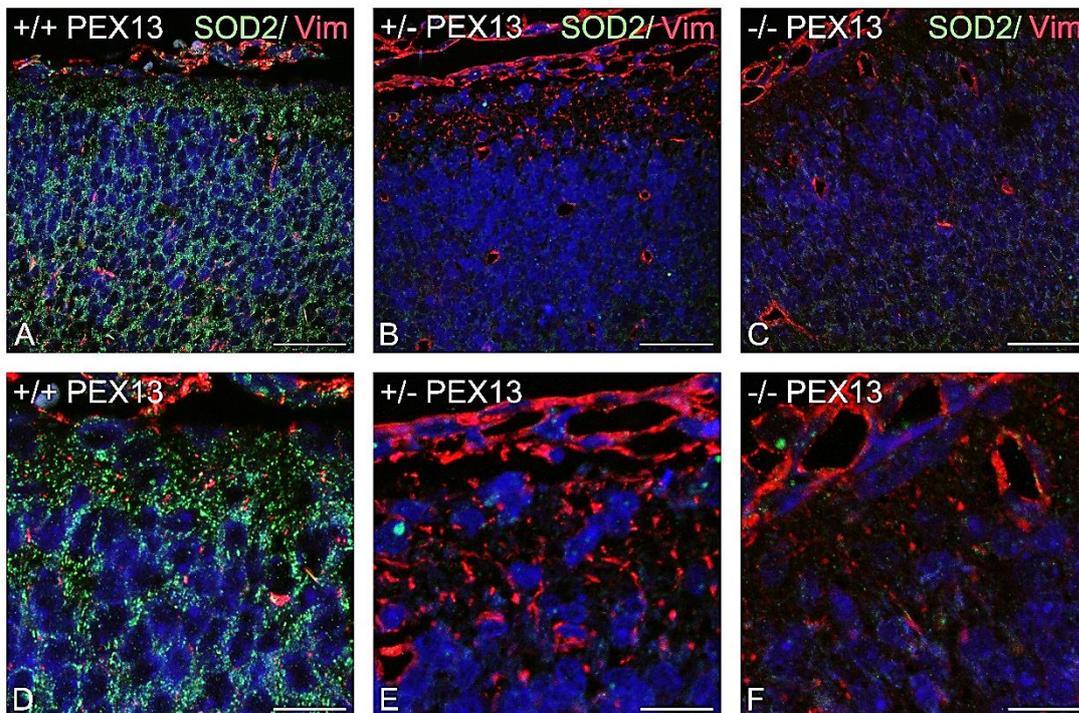


Abb. 40: Figurlegende auf Seite 58

Abb. 40: SOD2 war nur im lateralen Neocortex der *Pex13*^{+/+} Maus oberhalb der nachweisbaren Grenze (siehe Abb. auf Seite 57). Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den lateralen Neocortices von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 µm (A-C) und 23 µm (D-F).

Im lateralen Cortex der *Pex13*^{+/+} Tiere ließ sich die höchste Menge an SOD2 nachweisen (Abb. 40). In den Gehirnen der *Pex13*^{+/-} und *Pex13*^{-/-} Maus war die SOD2 Proteinmenge unterhalb der nachweisbaren Grenze.

Medialer Neocortex, Gruppe 1

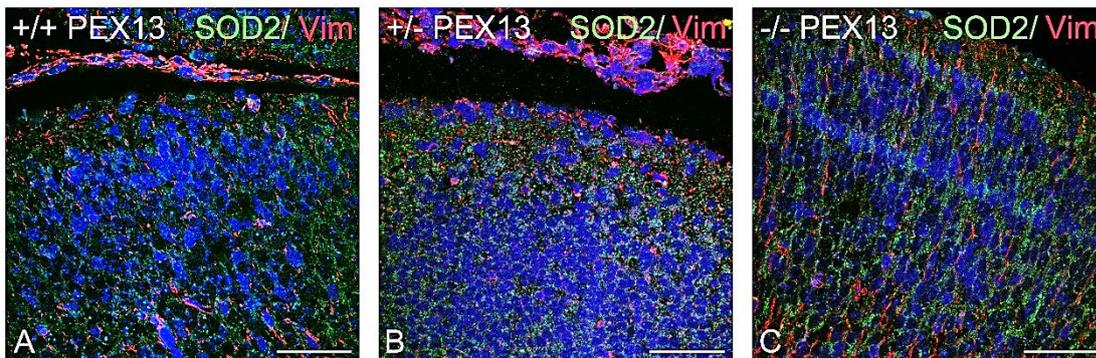


Abb. 41: Im medialen Neocortex wurde SOD2 in allen *Pex13* Genotypen der Gruppe 1 in einer vergleichbar hohen Menge vorgefunden. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin am medialen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

Im medialen Neocortex aller drei *Pex13*-Genotypen beider Gruppen war ein vergleichbar hoher SOD2 Proteingehalt (Abb. 41, 42).

Medialer Neocortex, Gruppe 2

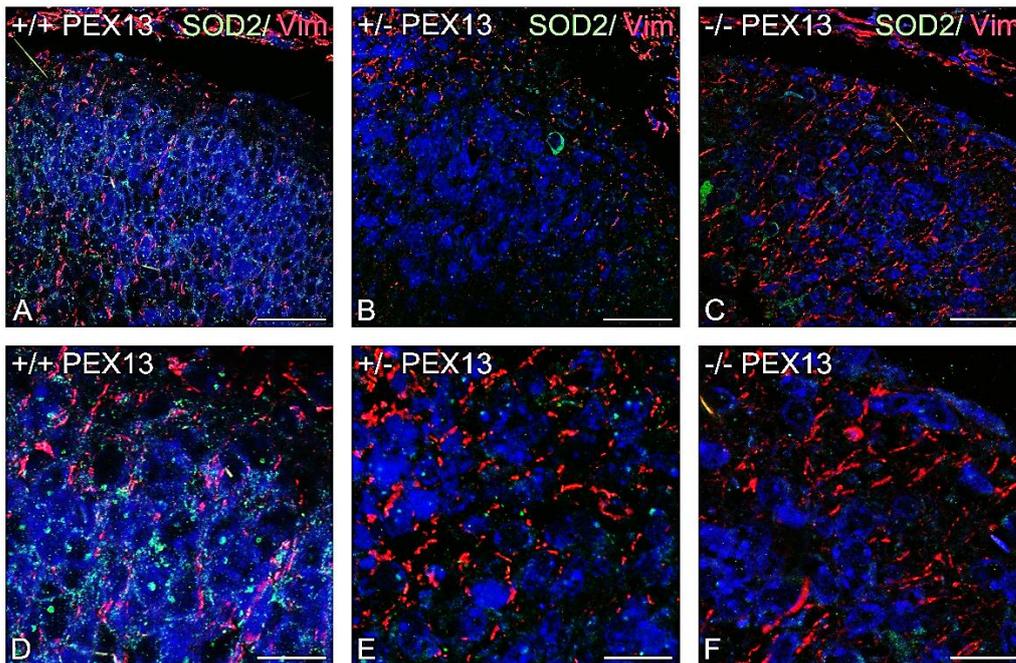


Abb. 42: Im medialen Neocortex wurde SOD2 in der Gruppe 2 in allen *Pex13* Genotypen in einer vergleichbar hohen Menge vorgefunden. Dargestellt sind die medialen Neocortices von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstäbe: A-C = 40 µm, D-F = 23 µm.

PVZ, Gruppe 1

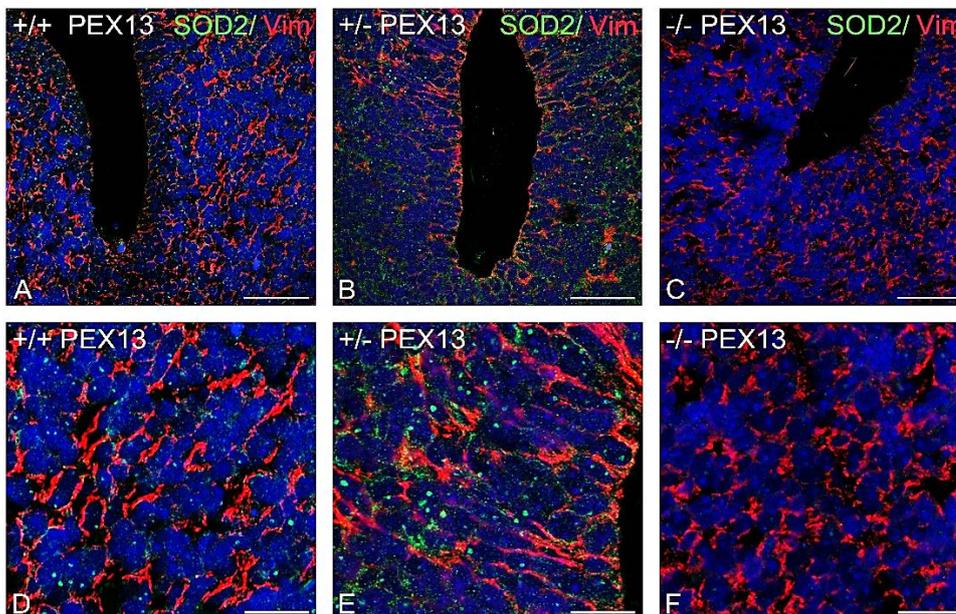


Abb. 43: Die höchste Menge von SOD2 war in der periventriculären Zone der *Pex13*^{+/-} Maus verglichen zum Wildtyp-Tier vorhanden. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den PVZ von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstäbe: A-C = 40 µm, D-F = 23 µm.

Die PVZ der *Pex13*^{+/-} Maus enthielt die größte Menge an SOD2 (Abb. 43).

PVZ, Gruppe 2

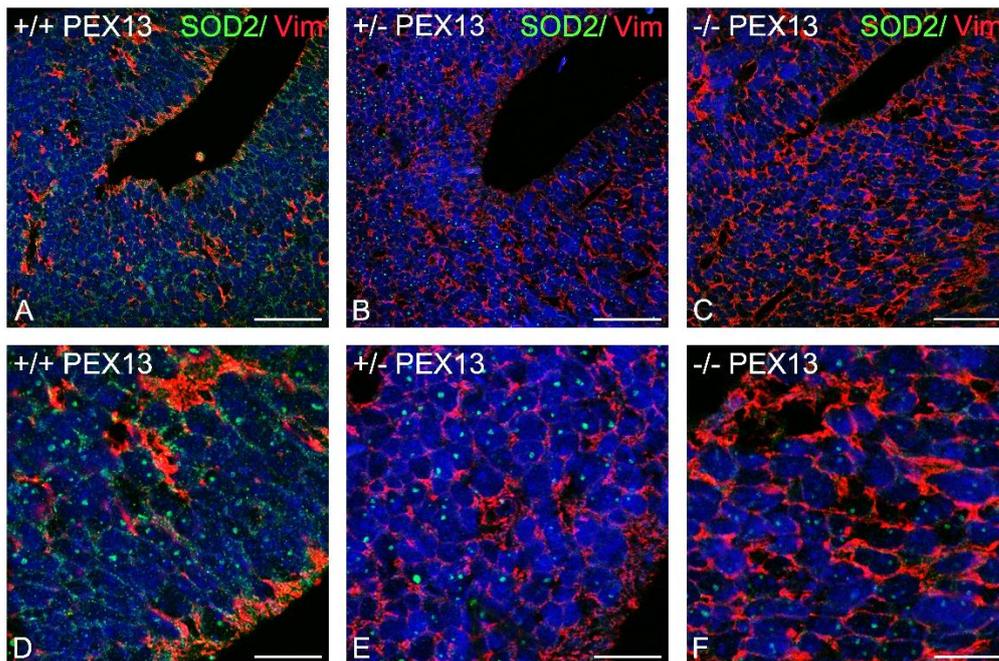


Abb. 44: Die periventriculäre Zone (PVZ) der *Pex13*^{+/+} Maus zeigte den höchsten Gehalt an SOD2 verglichen mit dem *Pex13*^{+/-} oder *Pex13*^{-/-} Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den PVZ von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstäbe: A-C = 40 µm, D-F = 23 µm.

Abweichend von den Ergebnissen aus der 1. Gruppe zeigte sich in Gruppe 2, dass in der PVZ der *Pex13*^{+/+} Maus, verglichen mit den anderen beiden Genotypen, SOD2 die höchste Proteinmenge vorhanden war (Abb. 44).

4.3.3.2. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C10

Lateraler Neocortex, Gruppe 1

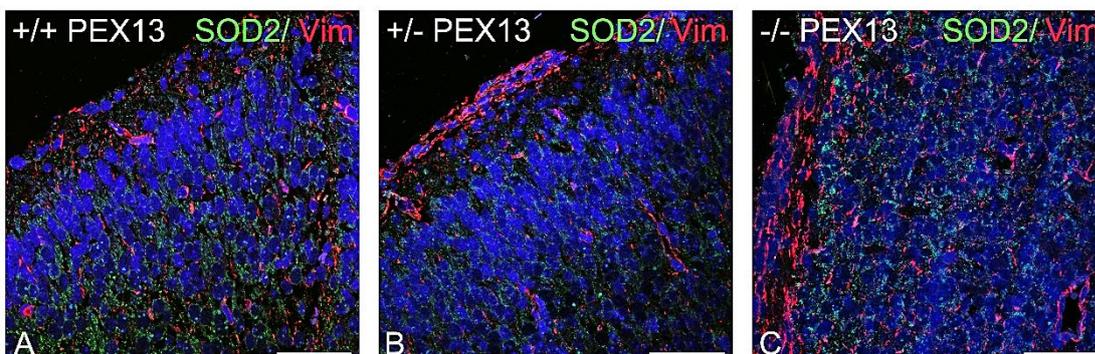


Abb. 45: Im lateralen Neocortex zeigten sich in allen *Pex13* Genotypen vergleichbare Mengen an SOD2. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin am lateralen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

In der Gruppe 1 war die Menge an SOD2 in allen Genotypen identisch (Abb. 45).

Lateraler Neocortex, Gruppe 2

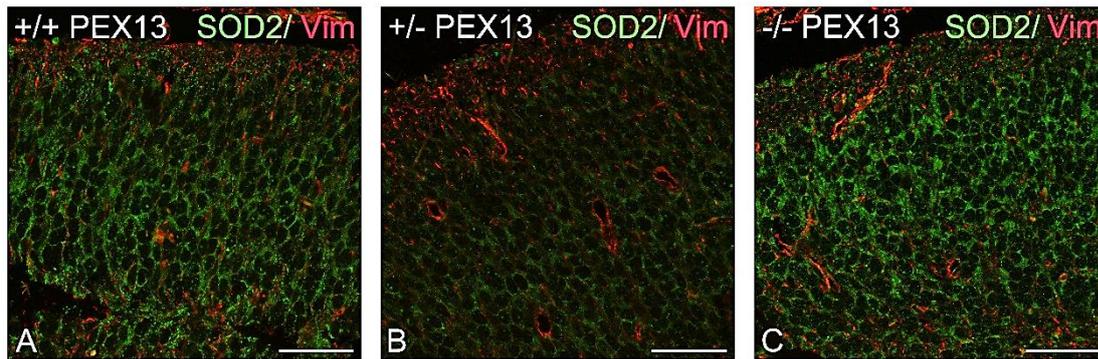


Abb. 46: Im lateralen Neocortex findet sich im *Pex13+/-* Tier die geringste Menge an SOD2 im Vergleich zum *Pex13+/+* oder *Pex13-/-* Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin am lateralen Neocortex der Gruppe 2. Dargestellt sind die lateralen Neocortices von *Pex13+/+* (A), *Pex13+/-* (B) und *Pex13-/-* (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

In den Tieren der Gruppe 2 zeigten sich im lateralen Neocortex eine deutlich reduzierte Menge an SOD2 im *Pex13+/-* Tier verglichen mit dem *Pex13+/+*, bzw. *Pex13-/-* Tier (Abb. 46).

Medialer Neocortex, Gruppe 1

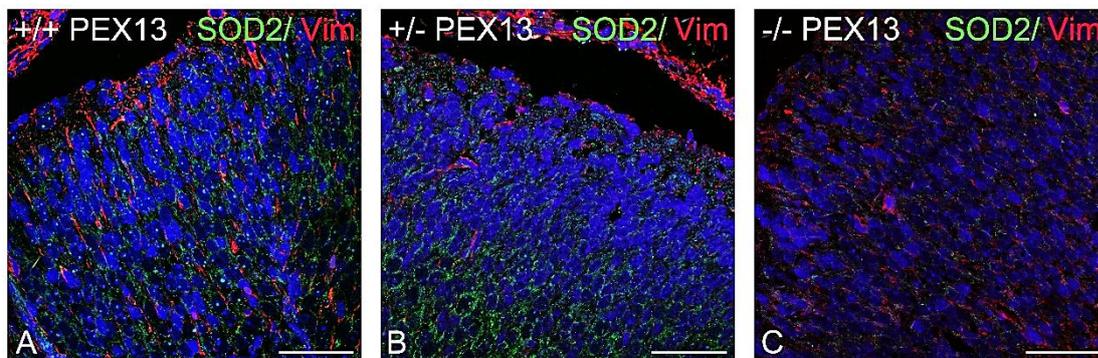


Abb. 47: Die höchste Menge an SOD2 findet sich im medialen Neocortex der *Pex13+/+* und *Pex13+/-* Maus verglichen zum *Pex13-/-* Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin des medialen Neocortex von *Pex13+/+* (A), *Pex13+/-* (B) und *Pex13-/-* (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

Die Menge an SOD2 im medialen Neocortex ist am höchsten in der *Pex13+/-* Maus im Vergleich zur *Pex13+/+* und der noch geringeren Menge in der *Pex13-/-* Maus (Abb. 47).

Medialer Neocortex, Gruppe 2

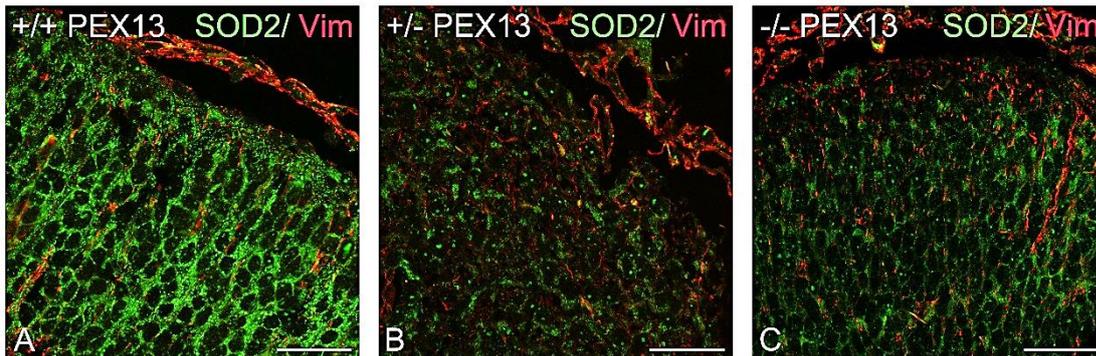


Abb. 48: Die *Pex13*^{-/-} Maus besitzt die niedrigste Menge an SOD2 im medialen Neocortex verglichen mit den anderen beiden Genotypen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin des medialen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

Die Ergebnisse erbrachten eine höhere Menge von SOD2 im *Pex13*^{+/+} Tier im Vergleich zu Tieren mit PEX13-Defizienz (Abb. 48), was sich mit den Ergebnissen dieser Gruppe aus der C5 Schnittebene deckt.

PVZ, Gruppe 1

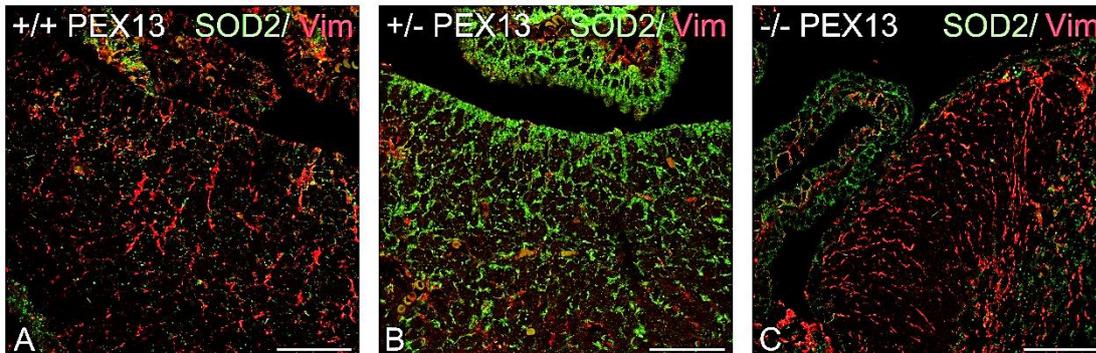


Abb. 49: Es zeigte sich eine erhöhte Menge von SOD2 in der periventriculären Zone (PVZ) der *Pex13*^{+/-} Maus im Vergleich zum Wildtyp-Tier. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin in der PVZ von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

Die Ergebnisse zeigten eine wesentlich erhöhte Menge an SOD2 in der PVZ der *Pex13*^{+/-} Maus, verglichen mit dem *Pex13*^{-/-} Tier und dem Wildtyp Tier (Abb. 49). Dieses Ergebnis stimmte mit dem Ergebnis der 1. Gruppe aus der PVZ in der C5-Schnittebene überein.

PVZ, Gruppe 2

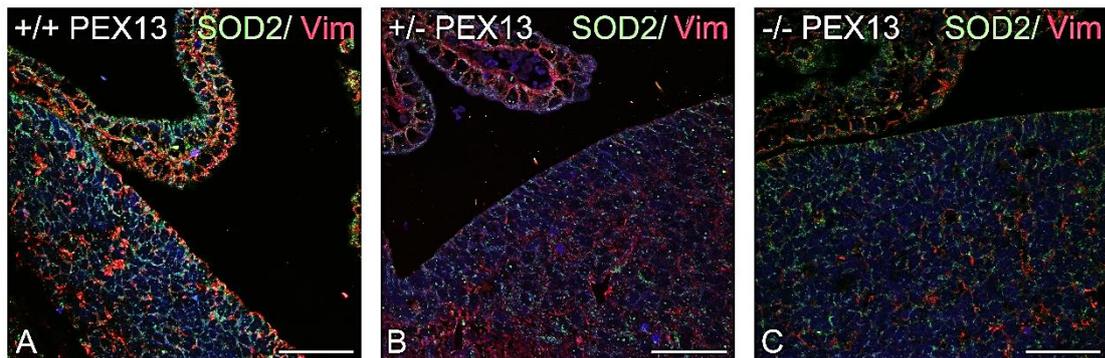


Abb. 50: In der periventriculären Zone (PVZ) zeigt das *Pex13*^{+/+} Tier die größte Menge an SOD2 im Vergleich zum Wildtyp. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin am PVZ von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

In den Tieren der Gruppe 2 ließen sich im WT-Tier höhere Mengen an SOD2-Protein im Vergleich zu den Peroxisomen defizienten Tieren nachweisen (Abb.50). Dieses Ergebnis stimmte ebenfalls mit dem Verteilungsmuster von SOD2 in der C5-Schnittebene überein.

Putamen

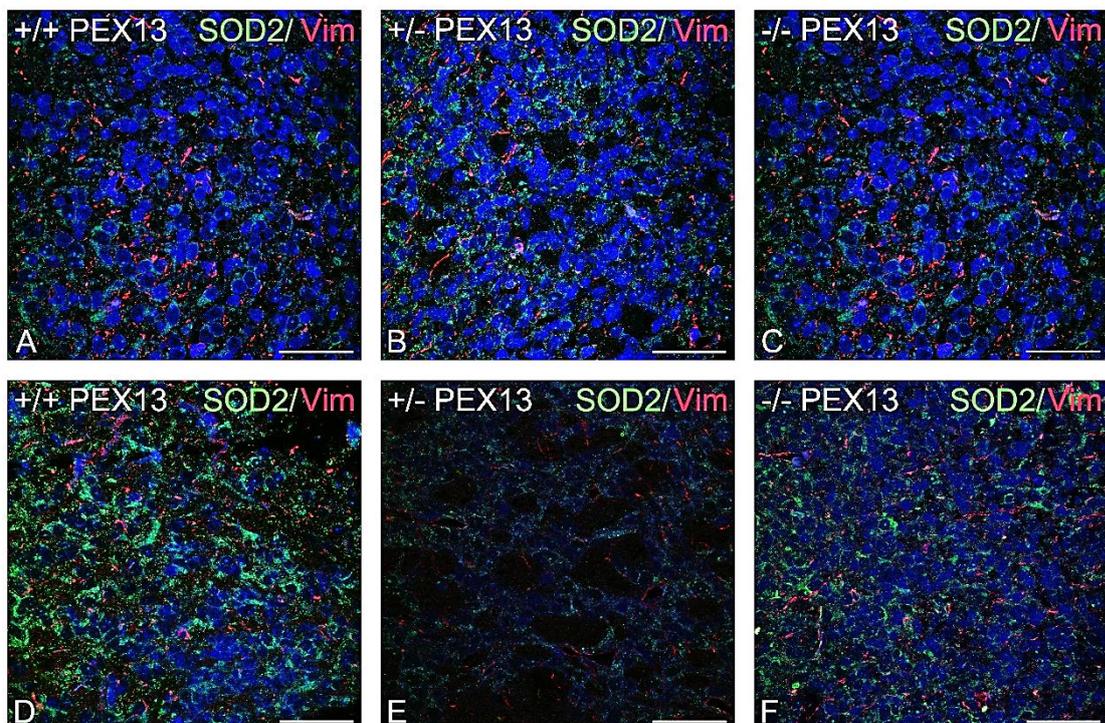


Abb. 51: In allen *Pex13* Genotypen zeigen sich im Putamen keine Unterschiede in der Menge an SOD2, lediglich das *Pex13*^{+/-} der Gruppe 2 zeigt eine reduzierte

Menge. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin am Putamen der Gruppen 1 (A-C) und 2 (D-F). Dargestellt sind die Putamina von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

Die Verteilung von SOD2 in den Putamina der unterschiedlichen Genotypen war vergleichbar. Ausnahme hierzu war die geringere Färbung bei dem *Pex13*^{+/-} Tier. Möglicherweise war die geringere Färbung durch eine geringere Schnittdicke bedingt, was auch die weniger dichte Gewebestruktur erklären könnte (Abb. 51).

4.3.3.3. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C15

Lateraler Neocortex, Gruppe 1

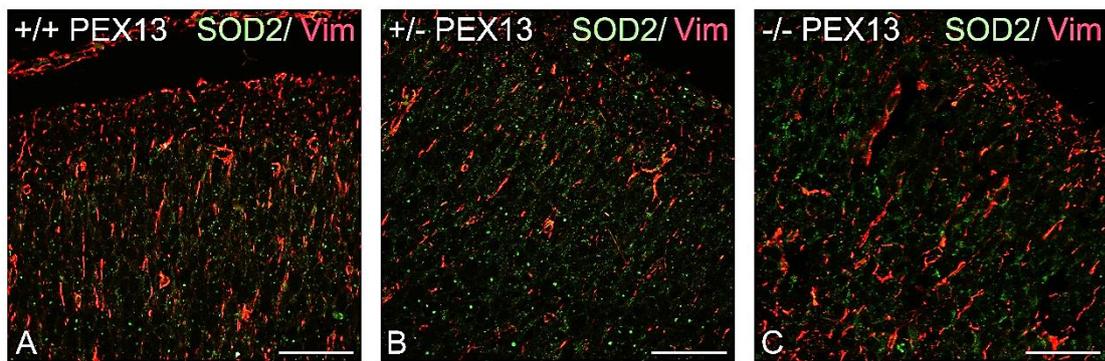


Abb. 52: In allen *Pex13* Genotypen sind nur geringe Mengen an SOD2 im lateralen Neocortex nachweisbar. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den lateralen Neocortices von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

Im lateralen Neocortex zeigte sich in beiden Gruppen (Abb. 52, 53) und bei allen *Pex13* Genotypen eine geringere Menge an SOD2 als im lateralen Neocortex der C10-Schnittebenen. Über alle Genotypen hinweg war jedoch eine konstante, wenn auch geringere Menge von SOD2 in den Schnitten vorhanden.

Lateraler Neocortex, Gruppe 2

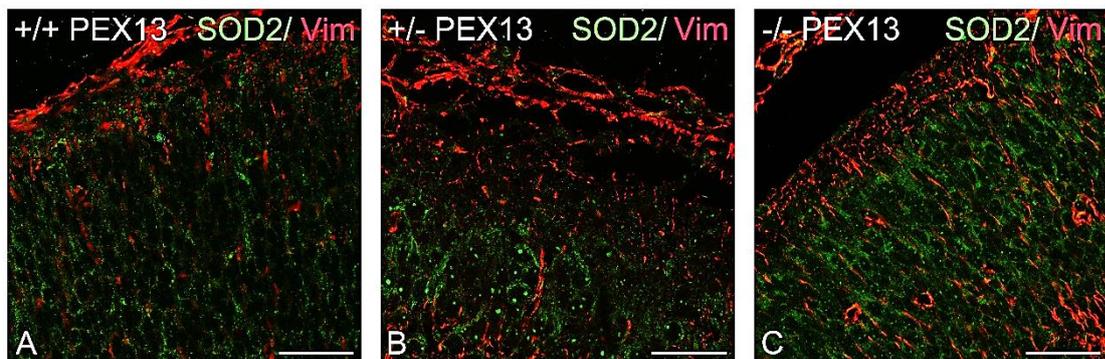


Abb. 53: Geringfügig erhöhte Menge an SOD2 im *Pex13*^{+/-} Tier im lateralen Neocortex verglichen mit dem Wildtyp. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den lateralen Neocortices von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

Hippocampus, Gruppe 1 und 2

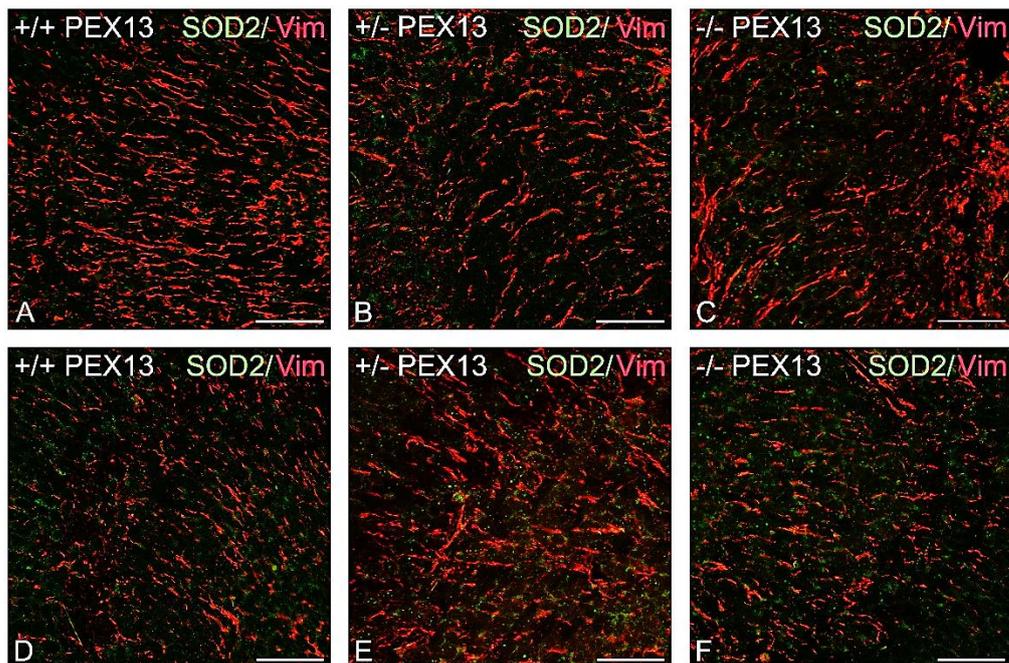


Abb. 54: In allen Hippocampi der untersuchten *Pex13* defizienten Mäuse waren nur geringe Mengen an SOD2 nachweisbar. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den Hippocampi von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

In beiden Gruppen und in allen Genotypen (Abb. 54) zeigten sich nur geringe Mengen an SOD2 im Hippocampus.

Thalamus

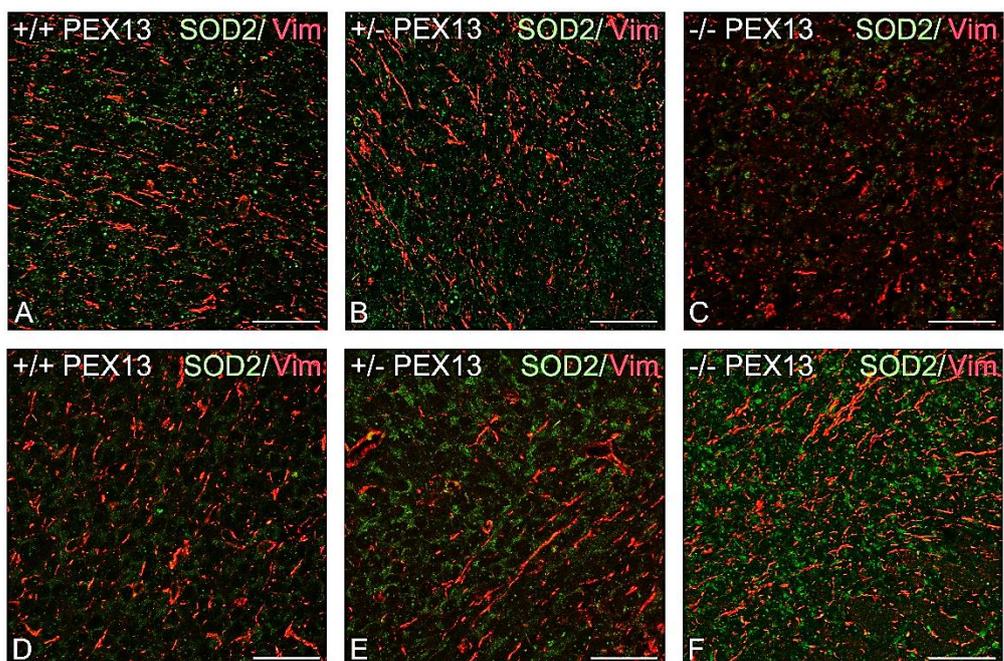


Abb. 55: Figurlegende auf Seite 67

Abb. 55: In allen Genotypen sind im Thalamus nur geringe Mengen an SOD2 nachweisbar (siehe Abb. auf Seite 66). Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den Thalami von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

Auch im Thalamus zeigten sich nur geringe Mengen an SOD2 in allen Genotypen beider Gruppen (Abb. 55).

4.3.3.4. Vorstellung der Hirnareale in der Standardschnittebene C20

Hirnstamm und Cerebellum

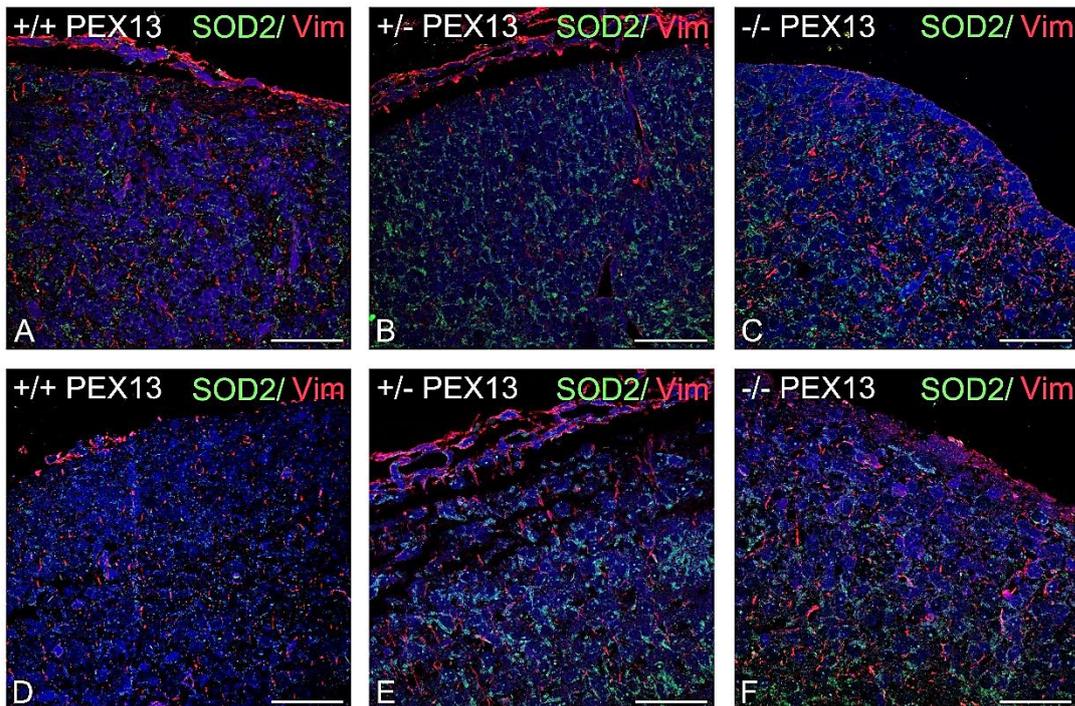


Abb. 56: Im Cerebellum und Hirnstamm der Gruppe 1 sind in allen Regionen nur geringe Mengen an SOD2 nachweisbar. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin am Cerebellum (A-C) und Hirnstamm (D-F) von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen. Maßstab = 40 µm.

Im Hirnstamm und im Cerebellum waren bei allen Genotypen beider Gruppen nur geringe Mengen an SOD2 nachzuweisen (Abb. 56). In der periventriculären Zone hingegen, war beim *Pex13*^{+/-} Tier die höchste Proteinmenge nachzuweisen (Abb. 57)

PVZ

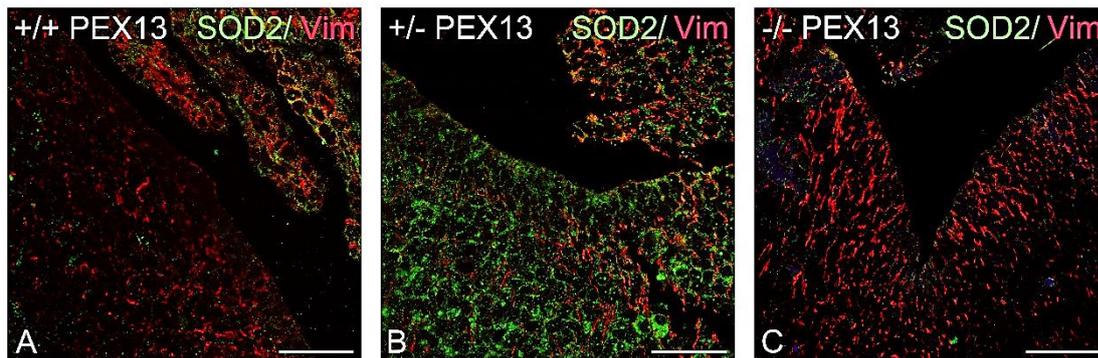


Abb. 57: In der periventriculären Zone (PVZ) findet sich im *Pex13*^{+/-} Tier die höchste Menge an SOD2. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von SOD2 und Vimentin an den PVZ von *Pex13*^{+/+} (A), *Pex13*^{+/-} (B) und *Pex13*^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m.

4.3.4. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Komplex IV der Atmungskette

Eine veränderte mitochondriale Funktion scheint ein kritischer Faktor bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson zu spielen. In dieser Dissertation sollte deshalb untersucht werden, ob die erhöhte Menge von α -Syn mit einer Lokalisation dieses Proteins in Mitochondrien einhergeht.

In allen untersuchten Regionen und Schnittebenen beider Gruppen der *Pex13*-Tiere und der *Pex11 β* -Tiere (Abb. 58-60) konnten wir keine Kolo-kalisation von α -Syn mit Komplex IV Untereinheit I der Atmungskette nachweisen. Im Folgenden werden daher nur einige Hirnregionen dieser Experimente vorgestellt.

Neocortex medial von C5

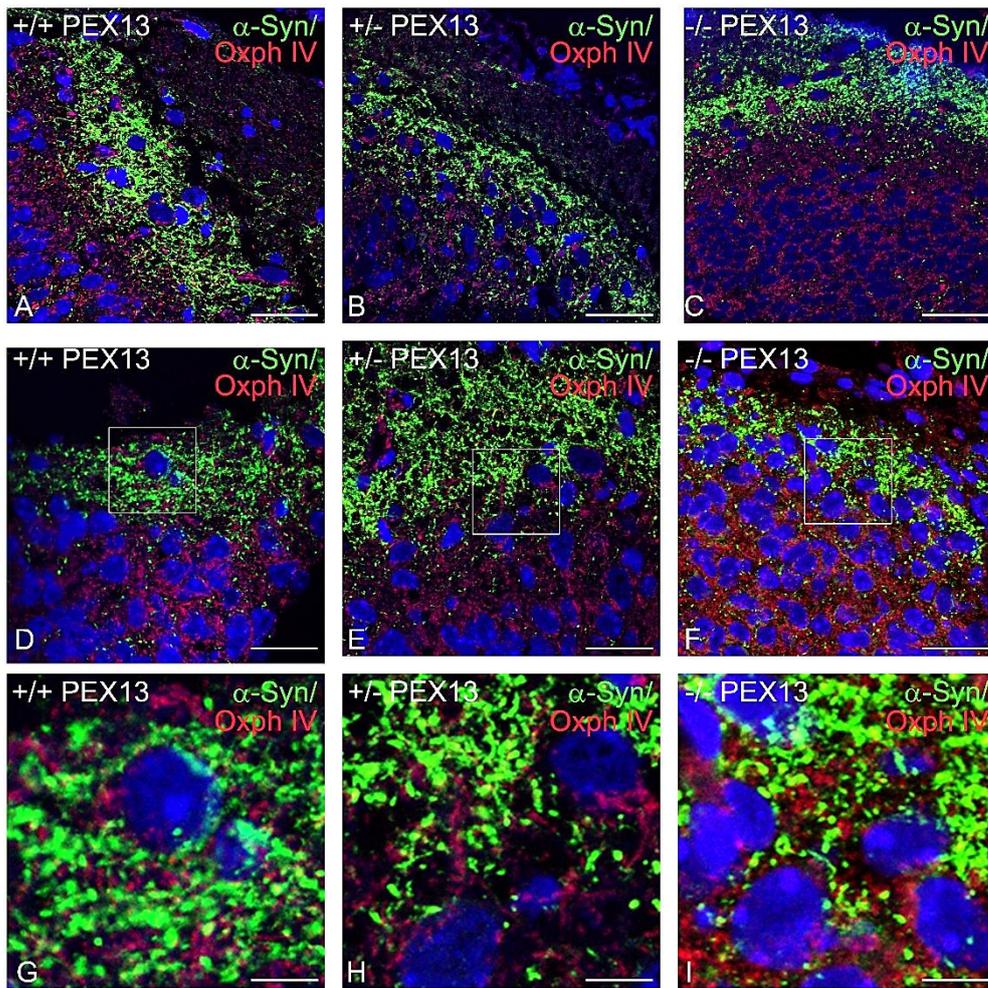


Abb. 58: Keine Kolo-kalisation von α -Syn und Komplex IV, Untereinheit 1 der Atmungskette (Oxph IV) im medialen Neocortex. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und OxPh IV am medialen Neocortex von *Pex13*^{+/+} (A, D, G), *Pex13*^{+/-} (B, E, H) und *Pex13*^{-/-} (C, F, I) Mäusen der Gruppe 1 (A-C) und Gruppe 2 (D-I). Maßstab = 40 μ m (A-F) und 11 μ m (G-I)

Hippocampus

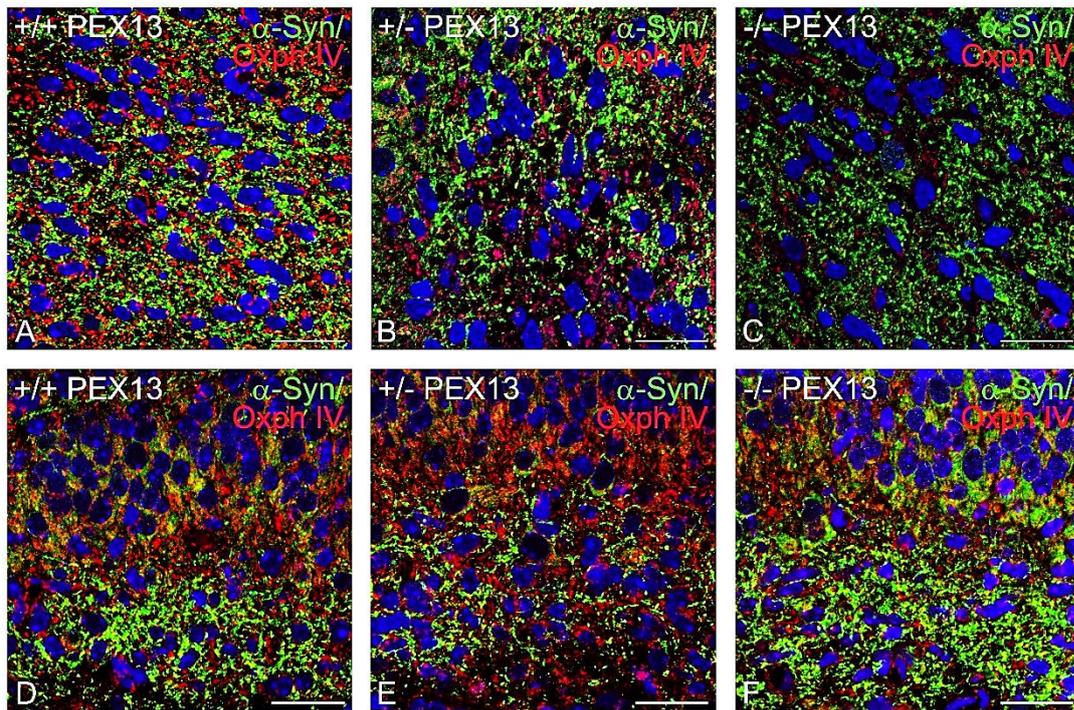


Abb. 59: Keine Kolo-kalisation von α -Syn und Komplex IV, Untereinheit 1 der Atmungskette (Oxph IV) im Hippocampus von *Pex13*-defizienten Mäusen. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und OxPh IV am Hippocampus von *Pex13*^{+/+} (A, D), *Pex13*^{+/-} (B, E) und *Pex13*^{-/-} (C, F) Mäusen der Gruppe 1 (A-C) und Gruppe 2 (D-F). Maßstab = 40 μ m.

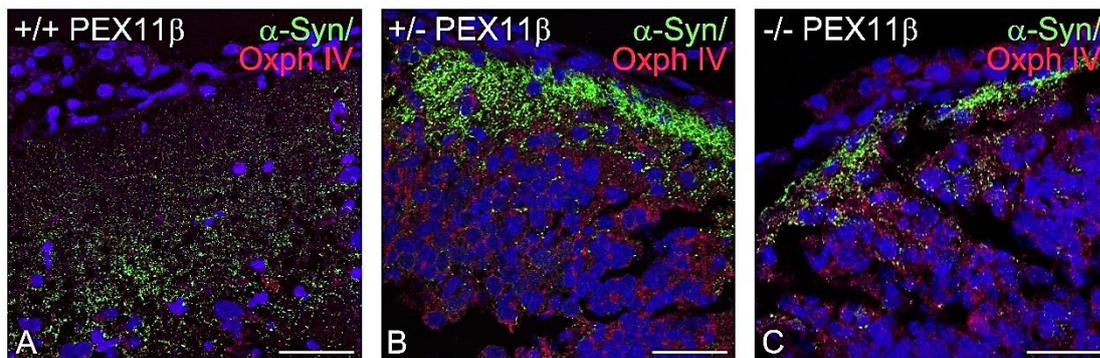


Abb. 60: Im lateralen Neocortex der *Pex11 β* -Tiere sind α -Syn und Komplex IV, Untereinheit 1 Atmungskette (Oxph IV) nicht kolo-kalisiert. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von α -Syn und Oxph IV im lateralen Neocortex von *Pex11 β* ^{+/+} (A), *Pex11 β* ^{+/-} (B) und *Pex11 β* ^{-/-} (C) Mäusen. Maßstab = 40 μ m

5. Diskussion

5.1. α -Syn

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proteinmenge von α -Syn in E18 und E19 Mäusen in verschiedenen Hirnregionen sehr unterschiedlich ist. Im lateralen Neocortex und Hippocampus ließen sich sehr hohe Mengen nachweisen. Im medialen Neocortex wurden im frontalen Teil des Gehirns noch relativ hohe Mengen, im parietalen Teil des Neocortex, sowie im Thalamus und Putamen wurden dagegen nur noch geringe Mengen oder kein α -Syn nachgewiesen. Unterhalb der nachweisbaren Grenze lag α -Syn im Cerebellum, im Hirnstamm und in der periventrikulären Zone des Telencephalons. Unterstützend zu diesen Befunden wurde ein ähnliches Verteilungsmuster von anderen Autoren sowohl auf der mRNA, als auch auf Proteinebene für 4 bzw. 24 Monate alte Mäuse beschrieben (Iwai et al. 1995; Adamczyk et al. 2005). In diesen Publikationen war die Expression im frontalen Neocortex und im Hippocampus doppelt so hoch wie im Thalamus angegeben worden. Im Mittelhirn und Cerebellum waren auch nur sehr geringe Mengen nachweisbar.

Vergleicht man Tiere mit und ohne Störung der peroxisomalen Biogenese (*Pex11 β* -knockout Mäuse – mit defekter Peroxisomenproliferation und *Pex13*-knockout-Mäuse mit einem kompletten Verlust der peroxisomalen metabolischen Funktion), zeigten sich große Unterschiede nur zwischen den *Pex13*-Genotypen und nur im Wurf der 2. Gruppe der *Pex13*-defizienten Tiere. Für den letzteren Punkt könnte das unterschiedliche Alter der Tiere (E18 Gruppe 2 und E19 Gruppe 1) verantwortlich sein, da Peroxisomen besonders zum Zeitpunkt der Geburt an Zahl zunehmen (Itoh et al. 2000; Nardacci et al. 2004; Nagase et al. 2004; Ahlemeyer et al. 2007) und ihnen eine wichtige Rolle bei der Umstellung des plazentaren auf den Lungenkreislauf (höhere Sauerstoffbelastung) zugeschrieben wird. Analysiert man die Veränderungen in den verschiedenen Gehirnregionen, so stellt man fest, dass sich die Menge an α -Syn nur dort signifikant verändert war, wo auch unter normalen Bedingungen hohe Mengen an α -Syn vorhanden sind, also im lateralen Neocortex und Hippocampus. Interessanterweise wurde in einer Studie zur Multiplen Systematrophie beim Menschen herausgefunden, dass α -Syn sich nicht nur in Neuronen, sondern auch in Oligodendrozyten in Form von Lewy bodies ablagert und dass diese schon in sehr frühen Stadien der Krankheit gefunden werden können (Yoshida 2007). Daher wäre es in zukünftigen Studien interessant herauszufinden, ob sich bei den *Pex13*-defizienten Mäusen α -Syn mehr in den Neuronen oder den Oligodendrozyten ablagert.

Die Neuronen des lateralen Neocortex und des Hippocampus besitzen zum einen eine hohe Menge an α -Syn und zum anderen auch eine hohe Anzahl an Peroxisomen, sowohl im embryonalen, als auch im juvenilen (P38) Mausgehirn (Ahlemeyer et al. 2007). Eine Ausnahme bildet das Cerebellum, das trotz einer hohen Anzahl an Peroxisomen in Purkinje- und Körnerzellen eine sehr geringe Menge an α -Syn aufweist. Im lateralen Neocortex und Hippocampus ließen sich erhöhte Mengen dieses Proteins in *Pex13*^{+/-} und *Pex13*^{-/-} Mäusen dieser Dissertation nachweisen. Allerdings wäre es möglich, dass auch in den anderen Gehirnregionen die Menge an α -Syn im *Pex13*^{+/-} bzw. *Pex13*^{-/-} Mausgehirn im Vergleich mit dem *Pex13*^{+/+} Tier erhöht sein könnte, aber dies, aufgrund der generell niedrigen α -Syn Menge, unterhalb der Fluoreszenznachweisgrenze lag. In zukünftigen Studien könnte dies mittels Signalamplifikationsverfahren überprüft werden.

Analog zu unseren Ergebnissen konnte eine biochemische Erhöhung der Gesamtmenge und vor allem der Dimere vom α -Syn-Protein in *Pex2*^{-/-}, *Pex5*^{-/-} und *Pex13*^{-/-} in Gesamthomogenaten von Mausgehirnen im Vergleich zu jeweiligen Wildtyppräparationen gefunden werden. Die α -Syn-Genexpression war jedoch in dieser Studie unverändert (Yakunin et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die mRNA Menge von α -Syn in PEX13-defizienten Mäusen untersucht, allerdings nicht im gesamten Gehirn, sondern nur in den lateralen Neocortices, da hier die höchsten Mengen an α -Syn vorhanden sind. Es war jedoch auch hier keine Veränderung zwischen *Pex13*^{-/-}, *Pex13*^{+/-} oder WildtypTier nachzuweisen. Dies bekräftigt die Vermutung, dass die beobachteten Veränderungen der Proteinmengen nicht auf Ebene der Transkription, sondern der Translation und der Fibrillenbildung ablaufen. Über die Untersuchungen von Yakunin et al. (2010) hinaus, wurde in dieser Dissertation bereits im *Pex13*^{+/-} Mausgehirnen erhöhte Mengen dieses Proteins nachgewiesen. Da PBD autosomal rezessiv vererbt werden, ging man bisher davon aus, dass kein Unterschied zwischen *Pex13*^{+/+} und *Pex13*^{+/-} besteht. Für die *Pex11 β* -defiziente Maus konnte in unserer Arbeitsgruppe jedoch gezeigt werden (Ahlemeyer et al. 2012), dass bereits das Ausschalten eines Allels des *Pex11 β* -Gens eine erhöhte Neurodegeneration verursacht, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei den homozygoten Mäusen des gleichen Wurfs. Die vorliegende Dissertation konnte Evidenz dafür liefern, dass auch das Ausschalten bereits eines Alleles des *Pex13* Gens zu neuronalen Veränderungen, mit Neurodegeneration und erhöhter α -Syn-Ablagerungen führen könnte. Das Fehlen eines funktionierenden PEX11 β Proteins erhöht die Menge an α -Syn lediglich im Hippocampus. In den anderen untersuchten Regionen scheint die Menge in allen Genotypen identisch zu sein.

Normalerweise wandern die Neurone von der PVZ entlang der Radialglia in der Weise in die kortikale Platte ein, so dass die ersten Neurone in den unteren Schichten verbleiben und die später einwandernden Neurone bis nach oben gelangen und sich in den oberen Schichten (I und II) sammeln. Dieser Vorgang wird über Reelin vermittelt, das von den Cajal-Retziuszellen der Marginalzone abgegeben wird (Frotscher et al. 2009). Fehlt Reelin, kommt es zur einer inversen Schichtenbildung, d.h. die zuletzt (zum Zeitpunkt der Geburt) wandernden Neurone liegen nicht in den oberen Schichten, sondern bleiben auf dem Weg dorthin stecken (gestörte Migration) (Kerjan u. Gleeson 2007).

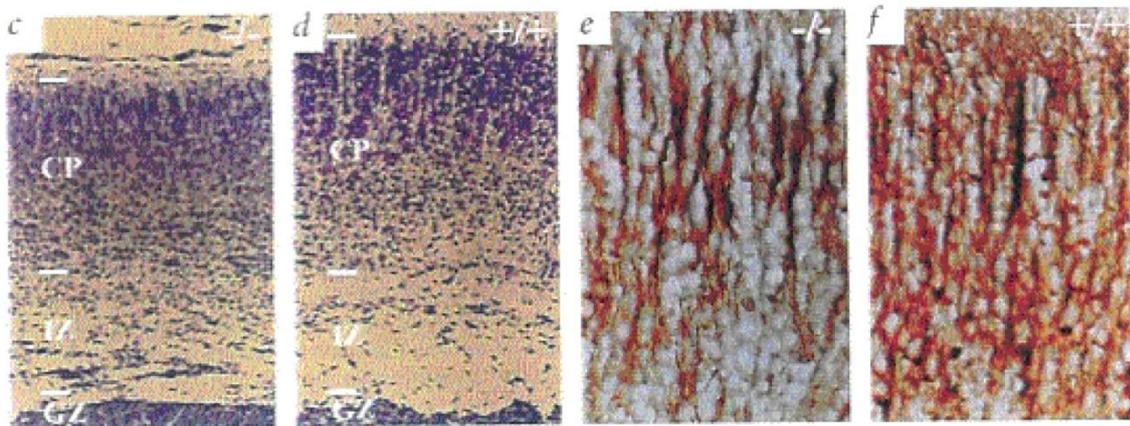


Abb. 61: Verminderte Dicke der Kortikalen Platte und die damit einhergehende erhöhte Zelldichte und gestörte Differenzierung in der Kortikalen Platte von *Pex5*^{-/-} Mäusen. Klüver Barrera (c, d), bzw. MAP-2 Immunfärbung (e, f) von der Kortikalen Platte von P0,5 alten Mäusen von *Pex5*^{-/-} (c, e) und *Pex5*^{+/+} (d, f) Tieren (Baes et al. 1997).

Pex2^{-/-} und *Pex5*^{-/-} Mäuse zeigen ebenfalls eine gestörte neuronale Migration (Abb. 61). Hier führt das langsame Wandern der Neurone zu einer gestörten Bildung der einzelnen Schichten des Neocortex (Lamina), sodass am Tag E18.5 die Schichten V und VI in der Kortikalen Platte noch nicht sichtbar ausgebildet sind (Neurone sind gleichmäßig überall verteilt (Baes et al. 1997; Faust u. Hatten 1997)). In der vorliegenden Dissertation konnte α -Syn im Neocortex am stärksten in der Kortikalen Platte nachgewiesen werden und dort fast ausschließlich in der Marginalzone. Da dies die äußerste Schicht des Neocortex ist, müssen diese Neurone die „längste“ Strecke zurücklegen, wenn sich das fetale Gehirn differenziert. Daher sollten Störungen der neuronalen Migration hier die deutlichsten Veränderungen aufzeigen. Diese Schicht zeichnet sich dadurch aus, dass hier viele Nervenfortsätze konzentriert vorliegen und sehr wenige Neuronensomata vorhanden. Daher sollte sich ein Protein, dessen Hauptwirkort die Synapse ist, bevorzugt hier nachweisen lassen. Im Neocortex von *Pex5*^{-/-} Embryonen (mit einem Verlust der peroxisomalen metabolischen Funktion für alle Proteine mit PTS1-Import) wurde eine schmalere und damit kleinere Kortikale Platte beschrieben, da die Neuronen, aus der

unteren Schicht verzögert wandern (Baes et al. 1997). Des Weiteren zeichnen sich Neurone in der Kortikalen Platte durch eine hohe Anzahl an Peroxisomen aus (Ahlemeyer et al. 2007). Man könnte vermuten, dass die erhöhte Menge an α -Syn in der Marginalzone eine Folge der verzögerten Migration ist; also den Versuch der Zelle darstellt mit einer vermehrten Bildung von α -Syn diesen Prozess zu kompensieren. Oder umgekehrt könnte die erhöhte Menge von α -Syn (möglicherweise auch die Aggregatbildung) in den Neuronen oder der Radialglia zu einer Funktionseinschränkung (z.B. durch oxidativen Stress) führen, und als Folge darauf die Migration verlangsamt werden.

Es könnte vermutlich letzteres sein, denn mehrere Studien haben herausgefunden, dass die präfibrillären α -Syn-Oligomere (β -sheets) (und nicht die unlöslichen Aggregate) für die Neuronen toxisch sind, insbesondere für bereits ausdifferenzierte Zellen (Volles u. Lansbury 2003; Emadi et al. 2009). Es wird vermutet, dass diese präfibrillären α -Syn-Oligomere Poren in der Zellmembran bzw. den gespeicherten Vesikeln von Neuronen ausbilden und so die Zellintegrität stören (Volles u. Lansbury 2003). Diese Oligomere sollen schließlich in eine Amyloid-Form übergehen, die wasserunlöslich ist (Emadi et al. 2009; Gould et al. 2014) und letztendlich die Lewy bodies bildet.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Bildung von α -Syn nicht eine Folge der verzögerten Migration ist, stellt die erhöhte Menge an Parkin mRNA im *Pex13^{+/-}* Tier da. Parkin ist für den Abbau von α -Syn verantwortlich und eine rezessive Form des juvenilen Morbus Parkinson ist mit einer „loss of function“ Mutation von Parkin assoziiert (Shimura et al. 2001). Die erhöhte mRNA Menge dieser als Parkin bezeichneten E3 Ubiquitin Ligase in den *Pex13^{+/-}* Mäusen scheint möglicherweise ein Versuch der Neurone darzustellen, die erhöhten Mengen an α -Syn wieder zu reduzieren. Die *Pex13^{-/-}* Mäuse zeigen dagegen keine Hochregulierung der Parkin mRNA. Es kann vermutet werden, dass die homozygot PEX13-defizienten Zellen stärker geschädigt sind als die der heterozygoten *Pex13^{+/-}* Tiere und nicht mehr adäquat auf die fehlregulierte Menge an α -Syn reagieren können.

Es stellt sich hierbei die Frage, ob eine defekte Funktion der Peroxisomen die Synthese oder die Aggregation von α -Syn steigern könnte. Beides würde zu einer Erhöhung der Menge an α -Syn führen, denn die Präfibrillen (Oligomere), wie auch die Aggregate von α -Syn können nicht mehr im Proteasom abgebaut werden. Also kämen sowohl eine erhöhte Produktion wie auch der verminderte Abbau, getriggert durch die Aggregatbildung, als Erklärung, für die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen in Betracht. Dann wiederum stellte sich die Frage, welche veränderten zellulären

Mechanismen, bei einem Defekt der Funktion der Peroxisomen, die Menge an α -Syn erhöhen.

In früheren Arbeiten konnte in *Pex13*^{-/-} Mäusen eine verzögerte neuronale Migration in die kortikale Platte des Neocortex, sowie oxidativer Stress mit vermehrtem Zelltod im Cerebellum gezeigt werden (Maxwell et al. 2003; Müller et al. 2011). Im Mausgehirn führt eine Herunterregulierung von PGC-1 α zu einer vermehrten α -Syn Oligomerisierung und Toxizität (Eschbach et al. 2015). PGC-1 α ist ein Regulator der mitochondrialen Biogenese und der oxidativen Phosphorylierung (LeBleu et al. 2014). In zukünftigen Studien sollte deshalb überprüft werden, ob PGC-1 α auch in Neuronen mit peroxisomaler Defizienz vermindert vorliegt. Denn tatsächlich sind in *Pex5*^{-/-} Mäusen Hinweise auf einen veränderten Kohlenhydratstoffwechsel, der mit einer Erniedrigung von PGC-1 α einherging beschrieben worden (Peeters et al. 2011).

In der Studie von Yakunin und Kollegen verminderte α -Syn die Proteinmenge und Aktivität des peroxisomalen antioxidativen Enzyms Katalase (Yakunin et al. 2014). Dies führt vermutlich zu erhöhtem oxidativem Stress in Neuronen und neuronalem Zelltod. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress mit Bildung von 8-OH-Desoxyguanosin, der auch bei einer peroxisomalen Dysfunktion auftritt (Ahlemeyer et al. 2012) und mit einer oxidativen DNA-Veränderung einhergeht, schließlich in eine Propagation der Aggregatbildung von α -Syn führt (Basu et al. 2015).

Weitere Faktoren, die generell (und nicht nur bei PBDs) mit einer erhöhten Menge an α -Syn und an α -Syn-Fibrillenbildung einhergehen, wie z.B. die verminderte Menge an Katalase und der damit einhergehende oxidative Stress, lassen sich ebenfalls im „gesunden“ erwachsenen Mausgehirn nachweisen und werden als mögliche Ursachen für den zellulären Alterungsprozess diskutiert (Legakis et al. 2002; Terlecky et al. 2006; Titorenko u. Terlecky 2011). Als Folge auf dieser scheinbar physiologischen altersbedingten Veränderungen im Gehirn lagert sich vermehrt α -Syn ab, gefolgt von neuronalem Zelltod, und könnte so neurodegenerativen Krankheiten, wie den Morbus Parkinson auslösen (Goedert 1999; Valera u. Masliah 2016). Analog soll auch die Anzahl an Peroxisomen im Alter abnehmen (Titorenko et al. 2011)

5.2. Mitochondriale Funktion

Sowohl Peroxisomen als auch α -Syn stehen in engem Zusammenhang mit der mitochondrialen Funktion. Mitochondrien und Peroxisomen arbeiten beim Abbau von Fettsäuren eng zusammen und besitzen eine ähnliche Teilungsmaschinerie (Camões et al. 2009; Schrader et al. 2015; Colasante et al. 2015). Auch führt bei Leberzellen das Fehlen von funktionierenden Peroxisomen (*Pex5*^{-/-}) zu einer verminderten Komplex I Aktivität der mitochondrialen Atmungskette (Baumgart et al. 2001). Ebenso spielen α -Syn, bzw. die Bildung von intrazellulären α -Syn-Aggregaten und Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Morbus Parkinson. Interessanterweise lässt sich - ähnlich wie bei einer *Pex5*-Defizienz - in den Gehirnen von Morbus Parkinson-Patienten eine reduzierte Komplex I Aktivität feststellen und der Komplex I Inhibitor Rotenon ist in der Lage parkinsonähnliche Symptome bei gesunden Probanden hervorzurufen.

Bei der Pathogenese vom Morbus Parkinson scheint oxidativer Stress eine Rolle zu spielen – erneut eine enge Verbindung zwischen Peroxisomen und Mitochondrien. Beide sind wichtige Organellen für die Entstehung und Eliminierung von ROS. In Peroxisomen entstehen ROS hauptsächlich als H_2O_2 bei der β -Oxidation von einer großen Anzahl verschiedener Lipidderivate. H_2O_2 wird durch Katalase direkt in den Peroxisomen abgebaut. In den Mitochondrien entstehen ROS bei der oxidativen Phosphorylierung besonders in Form von O_2^- Radikalen, die durch SOD2 in H_2O_2 umgewandelt werden und durch Glutathionperoxidase in der mitochondrialen Matrix abgebaut werden. Bei einem Patienten mit Morbus Parkinson (verursacht durch eine Mutation im Parkin-Gen) fanden Pacelli und Mitarbeiter (Pacelli et al. 2011) vergrößerte Peroxisomen, eine Erniedrigung von PGC-1 α , Komplex I der oxidativen Phosphorylierung, sowie SOD2 und Katalase und damit ausgelöstem oxidativen Stress. Somit könnte eine Fehlfunktion in genau diesen Stoffwechselwegen an der Entstehung sowohl von α -Syn-Aggregaten, PBDs als auch von Morbus Parkinson beteiligt sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl im lateralen und medialen Neocortex von *Pex13*^{+/-}, als auch von *Pex13*^{-/-} Mäusen die Menge an SOD2 reduziert ist. Außerdem ist sie in den lateralen Neocortices der Schnittebenen C5 und C10 der *Pex13*^{+/-} Tieren reduziert, in denen ebenfalls die Menge von α -Syn erhöht ist. Dieses Ergebnis erscheint zunächst widersprüchlich zu sein, denn das Fehlen von Peroxisomen führt vermutlich zu einer Erhöhung von ROS, da diese für dessen Abbau zuständig sind. Als Reaktion hierauf sollten die Neuronen normalerweise mit einer Erhöhung der Bildung antioxidativer Enzyme, wie z.B. SOD2 reagieren, so wie dies für *Pex5*^{-/-} Leberzellen

(Baumgart et al. 2001), *Pex13*^{-/-} Kleinhirnkörnerzellen (Müller et al. 2011) und *Pex13*^{+/-} kortikale Neurone (Ahlemeyer et al. 2012) gezeigt worden ist. Möglicherweise sind *Pex13*^{-/-} Neurone hierzu nicht (mehr) in der Lage. Wir haben noch geprüft, ob α -Syn in die Mitochondrien importiert wurde, wie dies von Liu (Liu et al. 2009) beschrieben wurde. Dazu wurden Gehirnschnitte (C5, C10, C15, C20) aller Genotypen mit α -Syn und mit Komplex IV Untereinheit II doppelgefärbt. In keinem Fall konnte eine Kolo­kalisierung dieser beiden Proteine nachgewiesen werden.

5.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Unsere Ergebnisse lassen den Schluss ziehen, dass, wie bereits in anderen Arbeiten vermutet, α -Syn einen Einfluss auf die mitochondriale Integrität haben könnte. Zwar konnte keine Lokalisation von α -Syn in die Mitochondrien gezeigt werden, dennoch scheint eine Erhöhung der Proteinmenge von α -Syn mit einer Erniedrigung der Proteinmenge von SOD2 einherzugehen. Daher wäre es interessant herauszufinden, ob eine induzierte Überexpression von α -Syn ebenfalls die Menge an SOD2 reduziert, oder ob diese nur durch den Genotyp (*Pex13*^{+/-} bzw. *Pex13*^{-/-}) bedingt ist oder ob das gleichzeitige Ausknocken von α -Syn und PEX13 die Reduktion von SOD2 wieder aufhebt. Ebenso interessant wäre es experimentell zu untersuchen, ob die reduzierte Menge an SOD2 mit einer reduzierten Aktivität einhergeht, oder ob die Zelle in der Lage ist diesen Mangel zu kompensieren.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass α -Syn im medialen Teil des Neocortex weniger stark exprimiert wird als im lateralen. Außerdem können bereits kleine Unterschiede im Alter der Tiere (E18 vs. E19) zu veränderten α -Syn Verteilungsmustern in den einzelnen Gehirnabschnitten führen. Daher wäre es interessant hier weitere Altersgruppen (z.B. E10, E15, P1, P5 etc.) zu untersuchen, um so den zeitlichen Verlauf der α -Syn Expression in den verschiedenen Gehirnarealen darstellen zu können. Vielleicht könnte man dadurch Rückschlüsse auf die bis jetzt nur unzureichend verstandene Funktion von α -Syn schließen.

6. Zusammenfassung

α -Synuklein (α -Syn) scheint eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten wie dem Morbus Parkinson zu spielen. Dennoch ist weder die Physiologie noch die Pathologie dieses Proteins zufriedenstellend aufgeklärt. Interessanterweise wurde eine erhöhte Menge an α -Syn Oligomeren im Gehirn von *Pex2*^{-/-}, *Pex5*^{-/-} und *Pex13*^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Wildtyp Maus beschrieben.

Wir wollten herausfinden, in welchen Hirnarealen diese Veränderungen auftreten. Diese Arbeit konnte zeigen, dass α -Syn sich besonders im lateralen Kortex, und dort insbesondere im Lobus frontalis, und im Hippocampus von embryonalen (E19) C57BL/6J-Wildtyp Mäusen ablagert. Im medialen Kortex fand sich α -Syn fast ausschließlich im Lobus frontalis, während im Thalamus, Putamen, Cerebellum, der periventrikulären Zone und im Hirnstamm nur geringe Mengen an α -Syn nachweisbar waren.

Damit wurde α -Syn besonders in Bereichen des Gehirns, die sich durch eine hohe Menge an Peroxisomen auszeichnen, aufgefunden. Darüber hinaus findet sich α -Syn fast ausschließlich in der Marginalzone des Cortex, also an einem Ort, der viele Synapsen und viel neuronale Migration aufweist.

Des Weiteren konnte diese Arbeit Evidenz dafür liefern, dass bereits das Ausschalten eines *Pex13*, (bzw. des *Pex11 β*) Allels zu einer erhöhten Menge von α -Syn und einer erniedrigten Menge von mitochondrialem SOD2 führt. Ähnliche Veränderungen lassen sich auch bei Morbus Parkinson-Patienten feststellen. Denn auch dort finden wir in den dopaminergen Neuronen sowohl eine erhöhte Menge an α -Syn als auch in ihrer Funktion eingeschränkte Mitochondrien (reduzierte Komplex I Aktivität, mitochondriale DNA-Deletionen). Daher könnte man vermuten, dass das neurotoxische Dopamin die Funktion der Mitochondrien beeinflusst, z.B. über die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore. Dabei könnte α -Syn, insbesondere wenn es in quantitativ hohen Mengen vorkommt, in das Mitochondrium gelangen und so die Atmungskette stören. Wir konnten keine Lokalisation von α -Syn innerhalb der Mitochondrien nachweisen, so dass α -Syn nicht direkt für die Erniedrigung von SOD2 verantwortlich sein kann. In jedem Fall könnte durch eine verminderte SOD2 Menge die Fähigkeit der Neuronen reaktive Sauerstoffspezies abzufangen, welcher bereits nachgewiesenermaßen ein Faktor bei der Entstehung des Morbus Parkinson ist, geschwächt sein.

Abschließend lässt sich festhalten, dass Peroxisomen nicht nur einen Einfluss auf die Integrität von Mitochondrien haben, sondern auch darüber hinaus die Proteinmenge von α -Syn in Neuronen beeinflussen und damit ein wichtiger Baustein im Verständnis von neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Morbus Parkinson) darstellen.

7. Summary

α -Synuclein (α -Syn) seems to play a key role in the development of neurodegenerative disorders like Parkinson's disease, but neither its physiology, nor its pathology have been fully understood. However, it has been shown that *Pex2*, *Pex5* and *Pex13* knockout mice, models for peroxisomal biogenesis disorders, have elevated α -Syn protein levels in the brain in comparison to their controls.

The present study provides evidence via immunofluorescence analysis, that α -Syn is mainly found in the lateral cortex of the frontal lobe and hippocampus of embryonic (E19) C57BL/6J-wildtype mice. In the medial cortex this protein can only be found in high quantities in the frontal brain. In contrast, the thalamus, putamen, cerebellum, periventricular zone and brainstem show only small amounts of α -Syn.

Hereto, α -Syn can be found in high quantities in those brain regions, that possess a high number of peroxisomes. Furthermore α -Syn is mainly present in the marginal zone of the neocortex, a region rich in synapses and the highest neuronal migration.

Furthermore, this work shows that already the *Pex13*^{+/-} and the *Pex11 β* ^{+/-} genotype exhibits elevated α -Syn and decreased mitochondrial SOD2 protein amounts. Similar changes can also be found in patients with Parkinson's disease. Elevated α -Syn amounts and functionally impaired mitochondria (reduced complex I activity, mitochondrial DNA-deletions) are typical changes in this disorder. Therefore it can be hypothesized, that the neurotoxic dopamine is impairing the function of mitochondria, possibly by opening the mitochondrial permeability transition pore. This could lead to α -Syn crossing into the mitochondria, especially if this protein is found in high amounts in the neuron, resulting in mitochondrial dysfunction. This thesis could not provide any evidence of α -Syn mislocalization into the mitochondria, concluding that α -Syn cannot reduce the amount of SOD2 in a direct way. Nevertheless the ability of the neuronal cell to deal with reactive oxygen species could be impaired, which has been linked to the development of Parkinson's disease.

Finally, it can be concluded, that peroxisomes not only have an impact on mitochondrial integrity, but also on the amount of α -Syn protein levels in neurons, therefore playing an important role in the understanding of neurodegenerative diseases like Parkinson's disease.

8. Abkürzungsverzeichnis

α -Syn	Alpha-Synuklein
Bs	Brainstem (Hirnstamm)
Cb	Cerebellum
Cx	Neocortex
Hp	Hippocampus
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IRD	infantile Refsum's disease (infantiles Refsum-Syndrom)
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NALD	neonatal Adrenoleukodystrophie
Nk	Negativkontrolle
Oxph	oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Morbus Parkinson
PBD	peroxisomale Biogenese Störung
PFA	Paraformaldehyd
PPAR	Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor
PVZ	Periventriculäre Zone
RNS	reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Reverse Transkription
SN	Substantia nigra
WT	Wildtyp
VLCFA	very long chain fatty acids (sehr langkettige Fettsäuren)
X-ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZS	Zellweger-Syndrom

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der repetitiven Aminosäuresequenz von α -Syn	2
Abbildung 2: Darstellung von humanem α -Syn mit bekannten Genmutationen, die mit einer familiären Form des Morbus Parkinson in Verbindung gebracht werden	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion von PEX11 bei der peroxisomalen Biogenese und Proliferation	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Rolle von PEX13 beim peroxisomalen Proteinimport in die Matrix	8
Abbildung 5: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C5 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung	33
Abbildung 6: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C10 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung	34
Abbildung 7: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C15 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung	35
Abbildung 8: Übersicht über die Hirnareale von E18 alten Mäusen in der Schnittebene C20 mit Schema und Klüver-Barrera-Färbung	36
Abbildung 9: Testung von qRT-PCR Primern für α -Syn und Parkin	37
Abbildung 10: Kein Unterschied in der mRNA Expression von α -Syn im Neocortex von <i>Pex13</i> - defizienten Mäusen	38
Abbildung 11: Die mRNA-Level von Parkin zeigen eine Tendenz für eine Hochregulierung im Neocortex von <i>Pex13</i> +/- Tieren.	38
Abbildung 12: Das Standardprotokoll (Trypsin, keine Signalverstärkung) eignete sich am besten für eine Immunfluoreszenzfärbung von α -Syn im Neocortex von E19 Mäusen.	39
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von α -Syn an E19 Wildtypmausgehirnen des lateralen Neocortex	40
Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin an E19 Wildtypmausgehirn des lateralen Neocortex.....	41
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von Komplex IV Untereinheit I der oxidativen Phosphorylierung an E19 Wildtypmausgehirnen des lateralen Neocortex	42
Abbildung 16: Prüfung der Reaktivität des anti-Parkin-Antikörpers durch Kolokalisation von α -Syn und Parkin in Lewy-Körperchen.	43

Abbildung 17: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Parkin und α -Syn in E19 Wildtypmausgehirnen des lateralen Neocortex	43
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung von Parkin im lateralen Neocortex von E19, P133 und P455 -Mäusen.....	45
Abbildung 19: Erhöhte Menge an α -Syn-Protein im lateralen Neocortex der <i>Pex13</i> ^{-/-} Maus im Vergleich zur <i>Pex13</i> ^{+/+} und <i>Pex13</i> ^{+/-} Maus	46
Abbildung 20: Im lateralen Neocortex finden wir eine erhöhte Menge an α -Syn im <i>Pex13</i> ^{+/-} Tier im Vergleich zum <i>Pex13</i> ^{+/+} Tier	47
Abbildung 21: Im medialen Neocortex findet sich nur eine geringe Menge α -Syn-Protein im <i>Pex13</i> ^{+/-} Tier im Vergleich zum <i>Pex13</i> ^{+/+} Tier	47
Abbildung 22: Erhöhte Menge von α -Syn im medialen Neocortex von <i>Pex13</i> ^{+/-} Mäusen im Vergleich zum <i>Pex13</i> ^{+/+} Tier	48
Abbildung 23: In der periventrikulären Zone liegt die Menge an α -Syn unterhalb der nachweisbaren Grenze.	48
Abbildung 24: Verminderte Menge an α -Syn im <i>Pex13</i> ^{-/-} Tier im Vergleich zum <i>Pex13</i> ^{+/+} Tier im lateralen Neocortex.....	49
Abbildung 25: Im lateralen Neocortex findet sich eine wesentlich geringere Menge an α -Syn im <i>Pex13</i> ^{+/+} Tier verglichen mit den <i>Pex13</i> ^{+/-} und <i>Pex13</i> ^{-/-} Tieren.	50
Abbildung 26: α -Syn liegt in den medialen Neocortices aller <i>Pex13</i> Genotypen der C10 Schnittebene im nicht nachweisbaren Bereich	50
Abbildung 27: Im Putamen finden sich keine Unterschiede in der α -Syn Menge zwischen den <i>Pex13</i> Genotypen.	51
Abbildung 28: Im lateralen Neocortex der Schnittebene C15 ist die Menge an α -Syn wesentlich geringer als in den lateralen Neocortices von C5 oder C10	51
Abbildung 29: Im lateralen Neocortex ist α -Syn in der <i>Pex13</i> ^{-/-} Maus wesentlich stärker vorhanden im Vergleich zum <i>Pex13</i> ^{+/+} Tier.	52
Abbildung 30: Im Hippocampus nimmt der Gehalt an α -Syn in <i>Pex13</i> -defizienten Mäusen deutlich ab.	52
Abbildung 31: Erhöhte Menge an α -Syn im Hippocampus im <i>Pex13</i> ^{-/-} Tier im Vergleich zum Wildtyp.....	53
Abbildung 32: Im Thalamus waren in allen Genotypen ähnlich hohe Mengen an α -Syn zu finden.	53
Abbildung 33: Keine Unterschiede in der Verteilung von α -Syn im Cerebellum. Im Hirnstamm der Gruppe 1 findet sich im <i>Pex13</i> ^{+/-} Tier eine erhöhte Menge von α -Syn im Vergleich zum Wildtyp- bzw. <i>Pex13</i> ^{-/-} Tier.....	54
Abbildung 34: Keine Unterschiede im α -Syn- Gehalt im lateralen Neocortex	

in der Schnittebene C5 von <i>Pex11β</i> ^{+/+} , <i>Pex11β</i> ^{+/-} und <i>Pex11β</i> ^{-/-} Mäusen	55
Abbildung 35: Keine Unterschiede im α-Syn- Gehalt im lateralen Neocortex	
in der Schnittebene C10 von <i>Pex11β</i> ^{+/+} , <i>Pex11β</i> ^{+/-} und <i>Pex11β</i> ^{-/-} Mäusen	55
Abbildung 36: Keine Unterschiede im α-Syn- Gehalt im lateralen Neocortex	
in der Schnittebene C15 von <i>Pex11β</i> ^{+/+} , <i>Pex11β</i> ^{+/-} und <i>Pex11β</i> ^{-/-} Mäusen	56
Abbildung 37: Erhöhte Menge an α-Syn im Hippocampus von <i>Pex11β</i> ^{-/-}	
Mäusen im Vergleich zum Wildtyp- und Heterozygoten-Tier	56
Abbildung 38: Im Cerebellum liegt die Menge an α-Syn in allen Genotypen	
unter der nachweisbaren Grenze	56
Abbildung 39: Im lateralen Neocortex findet sich im <i>Pex13</i> ^{+/-} Tier die höchste	
Menge an SOD2 im Vergleich zum Wildtyp	57
Abbildung 40: SOD2 war nur im lateralen Neocortex der <i>Pex13</i> ^{+/+} Maus	
oberhalb der nachweisbaren Grenze	57
Abbildung 41: Im medialen Neocortex wurde SOD2 in allen <i>Pex13</i>	
Genotypen der Gruppe 1 in einer vergleichbar hohen Menge vorgefunden	58
Abbildung 42: Im medialen Neocortex wurde SOD2 in der Gruppe 2 in	
allen <i>Pex13</i> Genotypen in einer vergleichbar hohen Menge vorgefunden	59
Abbildung 43: Die höchste Menge von SOD2 war in der periventrikulären Zone	
der <i>Pex13</i> ^{+/-} Maus verglichen zum Wildtyp-Tier vorhanden	59
Abbildung 44: Die periventrikuläre Zone der <i>Pex13</i> ^{+/+} Maus zeigte den	
höchsten Gehalt an SOD2 verglichen mit dem <i>Pex13</i> ^{+/-} oder	
<i>Pex13</i> ^{-/-} Tier	60
Abbildung 45: Im lateralen Neocortex zeigten sich in allen <i>Pex13</i>	
Genotypen vergleichbare Mengen an SOD2	60
Abbildung 46: Im lateralen Neocortex findet sich im <i>Pex13</i> ^{+/-} Tier die	
geringste Menge an SOD2 im Vergleich zum <i>Pex13</i> ^{+/+} oder <i>Pex13</i> ^{-/-} Tier	61
Abbildung 47: Die höchste Menge an SOD2 findet sich im medialen	
Neocortex der <i>Pex13</i> ^{+/+} und <i>Pex13</i> ^{+/-} Maus verglichen zum <i>Pex13</i> ^{-/-} Tier	61
Abbildung 48: Die <i>Pex13</i> ^{-/-} Maus besitzt die niedrigste Menge an SOD2	
im medialen Neocortex verglichen mit den anderen beiden Genotypen	62
Abbildung 49: Es zeigte sich eine erhöhte Menge von SOD2 in der	
periventrikulären Zone der <i>Pex13</i> ^{+/-} Maus im Vergleich	
zum Wildtyp-Tier	62
Abbildung 50: In der periventrikulären Zone zeigt das <i>Pex13</i> ^{+/+} Tier die	
größte Menge an SOD2 im Vergleich zum Wildtyp	63
Abbildung 51: In allen <i>Pex13</i> Genotypen zeigen sich im Putamen keine	
Unterschiede in der Menge an SOD2, lediglich das <i>Pex13</i> ^{+/-} der Gruppe 2	

zeigt eine reduzierte Menge	63
Abbildung 52: In allen <i>Pex13</i> Genotypen sind nur geringe Mengen an SOD2 im lateralen Neocortex nachweisbar	65
Abbildung 53: Geringfügig erhöhte Menge an SOD2 im <i>Pex13+/-</i> Tier im lateralen Neocortex verglichen mit dem Wildtyp	65
Abbildung 54: In allen Hippocampi der untersuchten <i>Pex13</i> defizienten Mäuse waren nur geringe Mengen an SOD2 nachweisbar	66
Abbildung 55: In allen Genotypen sind im Thalamus nur geringe Mengen an SOD2 nachweisbar	66
Abbildung 56: Im Cerebellum und Hirnstamm der Gruppe 1 sind in allen Regionen nur geringe Mengen an SOD2 nachweisbar.	67
Abbildung 57: In der periventriculären Zone findet sich im <i>Pex13+/-</i> Tier die höchste Menge an SOD2	68
Abbildung 58: Keine Kolo-kalisation von α -Syn und Komplex IV, Untereinheit 1 der Atmungskette (Oxph IV) im medialen Neocortex	69
Abbildung 59: Keine Kolo-kalisation von α -Syn und Komplex IV, Untereinheit 1 der Atmungskette (Oxph IV) im Hippocampus von <i>Pex13</i> -defizienten Mäusen	70
Abbildung 60: Im lateralen Neocortex der <i>Pex11β</i> -Tiere sind α -Syn und Komplex IV, Untereinheit 1 Atmungskette (Oxph IV) nicht kolo-kalisiert	70
Abbildung 61: Verminderte Dicke der Kortikalen Platte und die damit einhergehende erhöhte Zelldichte und gestörte Differenzierung in der Kortikalen Platte von <i>Pex5</i> ^{-/-} Mäusen	73

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller bekannten Gene mit Genlocus und Funktion die nachweisbar an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit involviert sind	6
Tabelle 2: Anzahl der Tiere pro Genotyp für den 1. Wurf (<i>Pex13</i>)	12
Tabelle 3: Anzahl der Tiere pro Genotyp für den 2. Wurf (<i>Pex13</i>)	12
Tabelle 4: Anzahl der Tiere pro Genotyp (<i>Pex11β</i>)	13
Tabelle 5: Liste der Laborgeräte mit Bezugsquelle	13
Tabelle 6: Liste der Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle	14
Tabelle 7: Liste der Chemikalien mit Bezugsquelle	14
Tabelle 8: Liste der Kits mit Bezugsquelle	16
Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer unter Angabe der Primersequenz	16
Tabelle 10: Liste der verwendeten Primärantikörper unter Angabe der Bezugsquelle (Hersteller mit Katalognummer), der Herkunft und der optimalen Verdünnung	17
Tabelle 11: Liste der verwendeten Sekundärantikörper unter Angabe der Bezugsquelle (Hersteller mit Katalognummer), der Herkunft und der optimalen Verdünnung	17
Tabelle 12: Liste der Lösungen und Puffer mit Angabe ihrer Herstellung	18
Tabelle 13: Protokoll zur Durchführung der Klüver-Barrera Färbung	20
Tabelle 14: Protokoll zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen	22
Tabelle 15: Protokoll zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von Ameisensäure zur Permeabilisierung	24
Tabelle 16: Protokoll zur Durchführung der Immunfluoreszenz-färbung unter Verwendung eines TSA-Kits zur Signalverstärkung	25

11. Literaturverzeichnis

- Abeliovich, A.; Schmitz, Y.; Fariñas, I.; Choi-Lundberg, D.; Ho, W.; Castillo, P.; Shinsky, N.; Verdugo, J.; Armanini, M.; Ryan, A.; Hynes, M.; Phillips, H.; Sulzer, D. u. Rosenthal, A. (2000): Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 25 (1): 239–252.
- Adamczyk, A.; Solecka, J. u. Strosznajder, J. (2005): Expression of alpha-synuclein in different brain parts of adult and aged rats. *J Physiol Pharmacol*. 56 (1): 29–37.
- Ahlemeyer, B.; Gottwald, M. u. Baumgart-Vogt, E. (2012): Deletion of a single allele of the Pex11 β gene is sufficient to cause oxidative stress, delayed differentiation and neuronal death in mouse brain. *DMM*. 5 (1): 125–140.
- Ahlemeyer, B.; Neubert, I.; Kovacs, W. u. Baumgart-Vogt, E. (2007): Differential expression of peroxisomal matrix and membrane proteins during postnatal development of mouse brain. *J. Comp. Neurol*. 505 (1): 1–17.
- Alves Da Costa, C.; Paitel, E.; Vincent, B. u. Checler, F. (2002): Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem*. 277 (52): 50980–50984.
- Anderson, J.; Walker, D.; Goldstein, J.; Laat, R.; Banducci, K.; Caccavello, R.; Barbour, R.; Huang, J.; Kling, K.; Lee, M.; Diep, L.; Keim, P.; Shen, X.; Chataway, T.; Schlossmacher, M.; Seubert, P.; Schenk, D.; Sinha, S.; Gai, W. u. Chilcote, T. (2006): Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J. Biol. Chem*. 281 (40): 29739–29752.
- Asayama, K.; Sandhir, R.; Sheikh, F.; Hayashibe, H.; Nakane, T. u. Singh, I. (1999): Increased peroxisomal fatty acid beta-oxidation and enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in diabetic rat liver. *Mol. Cell. Biochem*. 194 (1-2): 227–234.
- Auluck, P.; Chan, H.; Trojanowski, J.; Lee, V. u. Bonini, N. (2002): Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*. 295 (5556): 865–868.
- Baba, M.; Nakajo, S.; Tu, P.; Tomita, T.; Nakaya, K.; Lee, V.; Trojanowski, J. u. Iwatsubo, T. (1998): Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol*. 152 (4): 879–884.

- Baes, M.; Gressens, P.; Baumgart, E.; Carmeliet, P.; Casteels, M.; Fransen, M.; Evrard, P.; Fahimi, D.; Declercq, P.; Collen, D.; van Veldhoven, P. u. Mannaerts, G. (1997): A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat. Genet.* 17 (1): 49–57.
- Basu, S.; Je, G. u. Kim, Y. (2015): Transcriptional mutagenesis by 8-oxodG in α -synuclein aggregation and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp. Mol. Med.* 47: e179.
- Baumgart, E. (1997): Application of in situ hybridization, cytochemical and immunocytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review including novel data. Robert Feulgen Prize Lecture 1997. *Histochem. Cell Biol.* 108 (3): 185–210.
- Baumgart, E.; Fahimi, H.; Steininger, H. u. Grabenbauer, M. (2003): A review of morphological techniques for detection of peroxisomal (and mitochondrial) proteins and their corresponding mRNAs during ontogenesis in mice: application to the PEX5-knockout mouse with Zellweger syndrome. *Microsc. Res. Tech.* 61 (2): 121–138.
- Baumgart, E.; Vanhorebeek, I.; Grabenbauer, M.; Borgers, M.; Declercq, P.; Fahimi, H. u. Baes, M. (2001): Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). *Am. J. Pathol.* 159 (4): 1477–1494.
- Beal, M. (2005): Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58 (4): 495–505.
- Beier, K. u. Fahimi, H. (1991): Environmental pollution by common chemicals and peroxisome proliferation: efficient detection by cytochemistry and automatic image analysis. *Prog. Histochem. Cytochem.* 23 (1-4): 150–163.
- Beier, K.; Völkl, A. u. Fahimi, H. (1993): The impact of aging on enzyme proteins of rat liver peroxisomes: quantitative analysis by immunoblotting and immunoelectron microscopy. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 63 (3): 139–146.
- Bender, A.; Krishnan, K.; Morris, C.; Taylor, G.; Reeve, A.; Perry, R.; Jaros, E.; Hersheson, J.; Betts, J.; Klopstock, T.; Taylor, R. u. Turnbull, D. (2006): High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.* 38 (5): 515–517.
- Berger, J. u. Gärtner, J. (2006): X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763 (12): 1721–1732.

- Betarbet, R.; Sherer, T.; MacKenzie, G.; Garcia-Osuna, M.; Panov, A. u. Greenamyre, J. (2000): Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3 (12): 1301–1306.
- Beyer, K. (2006): Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta Neuropathol.* 112 (3): 237–251.
- Beyer, K.; Lao, J.; Carrato, C.; Mate, J.; López, D.; Ferrer, I. u. Ariza, A. (2004): Differential expression of alpha-synuclein isoforms in dementia with Lewy bodies. *Neuropath. Appl. Neuro.* 30 (6): 601–607.
- Bisaglia, M.; Schievano, E.; Caporale, A.; Peggion, E. u. Mammi, S. (2006): The 11-mer repeats of human alpha-synuclein in vesicle interactions and lipid composition discrimination: a cooperative role. *Biopolymers* 84 (3): 310–316.
- Bonini, N. u. Giasson, B. (2005): Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell* 123 (3): 359–361.
- Bornhorst, J.; Chakraborty, S.; Meyer, S.; Lohren, H.; Brinkhaus, S.; Knight, A.; Caldwell, K.; Caldwell, G.; Karst, U.; Schwerdtle, T.; Bowman, A. u. Aschner, M. (2014): The effects of pdr1, djr1.1 and pink1 loss in manganese-induced toxicity and the role of α -synuclein in *C. elegans*. *Metallomics* 6 (3): 476–490.
- Brenz V.; Bahi, A.; Boyer, F.; Wagner, G. u. Dreyer, J. (2003): Distribution of alpha- and gamma-synucleins in the adult rat brain and their modification by high-dose cocaine treatment. *Eur. J. Neurosci.* 18 (7): 1923–1938.
- Bruening, W.; Giasson, B.; Klein-Szanto, A.; Lee, V.; Trojanowski, J. u. Godwin, A. (2000): Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 88 (9): 2154–2163.
- Buchman, V.; Adu, J.; Pinón, L.; Ninkina, N. u. Davies, A. (1998): Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. *Nat. Neurosci.* 1 (2): 101–103.
- Camões, F.; Bonekamp, N.; Delille, H. u. Schrader, M. (2009): Organelle dynamics and dysfunction: A closer link between peroxisomes and mitochondria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 (2): 163–180.
- Campion, D.; Martin, C.; Heilig, R.; Charbonnier, F.; Moreau, V.; Flaman, J.; Petit, J.; Hannequin, D.; Brice, A. u. Frebourg†, T. (1995): The NACP/synuclein gene:

chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease.

Genomics 26 (2): 254–257.

Chandra, S.; Fornai, F.; Kwon, H.; Yazdani, U.; Atasoy, D.; Liu, X.; Hammer, R.; Battaglia, G.; German, D.; Castillo, P. u. Südhof, T. (2004): Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101 (41): 14966–14971.

Chandra, S.; Gallardo, G.; Fernández-Chacón, R.; Schlüter, O. u. Südhof, T. (2005): Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123 (3): 383–396.

Charles, V.; Mezey, E.; Reddy, P.; Dehejia, A.; Young, T.; Polymeropoulos, M.; Brownstein, M. u. Tagle, D. (2000): Alpha-synuclein immunoreactivity of huntingtin polyglutamine aggregates in striatum and cortex of Huntington's disease patients and transgenic mouse models. *Neurosci. Lett.* 289 (1): 29–32.

Chen, X.; de Silva, H.; Pettenati, M.; Rao, P.; St George-Hyslop, P.; Roses, A.; Xia, Y.; Horsburgh, K.; Uéda, K. u. Saitoh, T. (1995): The human NACP/alpha-synuclein gene: chromosome assignment to 4q21.3-q22 and TaqI RFLP analysis. *Genomics* 26 (2): 425–427.

Colasante, C.; Chen, J.; Ahlemeyer, B. u. Baumgart-Vogt, E. (2015): Peroxisomes in cardiomyocytes and the peroxisome / peroxisome proliferator-activated receptor-loop. *J. Thromb. Haemost.* 113 (3): 452–463.

Conway, K.; Lee, S.; Rochet, J.; Ding, T.; Harper, J.; Williamson, R. u. Lansbury, P. (2000): Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920: 42–45.

Crane, D. I. (2014): Revisiting the neuropathogenesis of Zellweger syndrome. *Neurochem. Int.* 69: 1–8.

de Lau, L. u. Breteler, M. (2006): Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5 (6): 525–535.

Dev, K. (2003): Part II: α -synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology* 45 (1): 14–44.

Dickson, D.; Liu, W.; Hardy, J.; Farrer, M.; Mehta, N.; Uitti, R.; Mark, M.; Zimmerman, T.; Golbe, L.; Sage, J.; Sima, A.; D'Amato, C.; Albin, R.; Gilman, S. u. Yen, S. (1999): Widespread alterations of alpha-synuclein in multiple system atrophy. *Am. J. Pathol.* 155 (4): 1241–1251.

- Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H.; Givel, F.; Helftenbein, G. u. Wahli, W. (1992): Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68 (5): 879–887.
- Duve, C. de u. Baudhuin, P. (1966): Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46 (2): 323–357.
- Ebberink, M.; Koster, J.; Visser, G.; van Spronsen, F.; Stolte-Dijkstra, I.; Smit, G.; Fock, J.; Kemp, S.; Wanders, R. u. Waterham, H. (2012): A novel defect of peroxisome division due to a homozygous non-sense mutation in the PEX11 β gene. *J. Med. Genet.* 49 (5): 307–313.
- Eckert, J. u. Erdmann, R. (2003): Peroxisome biogenesis. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147: 75–121.
- Ekstrand, M.; Terzioglu, M.; Galter, D.; Zhu, S.; Hofstetter, C.; Lindqvist, E.; Thams, S.; Bergstrand, A.; Hansson, F.; Trifunovic, A.; Hoffer, B.; Cullheim, S.; Mohammed, A.; Olson, L. u. Larsson, N. (2007): Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104 (4): 1325–1330.
- Elgersma, Y.; Kwast, L.; Klein, A.; Voorn-Brouwer, T.; van den Berg, M; Metzigg, B.; America, T.; Tabak, H. u. Distel, B. (1996): The SH3 domain of the *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal membrane protein Pex13p functions as a docking site for Pex5p, a mobile receptor for the import PTS1-containing proteins. *J. Cell Biol.* 135 (1): 97–109.
- Emadi, S.; Kasturirangan, S.; Wang, M.; Schulz, P. u. Sierks, M. (2009): Detecting morphologically distinct oligomeric forms of alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 284 (17): 11048–11058.
- Erdmann, R. u. Blobel, G. (1996): Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J. Cell Biol.* 135 (1): 111–121.
- Eriksen, J.; Dawson, T.; Dickson, D. u. Petrucelli, L. (2003): Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron* 40 (3): 453–456.
- Faust, P. u. Hatten, M. (1997): Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J. Cell Biol.* 139 (5): 1293–1305.
- Feany, M. u. Bender, W. (2000): A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404 (6776): 394–398.

Ferdinandusse, S.; Meissner, T.; Wanders, Ronald J. u. Mayatepek, E. (2002): Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (1): 269–273.

Foster, E. u. Lewy, F. (1912): *Pathologische Anatomie. Handbuch der Neurologie. Paralysis agitans.* Springer Verlag. Berlin.

Frotscher, M.; Chai, X.; Bock, H.; Haas, C.; Förster, E. u. Zhao, S. (2009): Role of Reelin in the development and maintenance of cortical lamination. *J. Neural Transm. (Vienna)* 116 (11): 1451–1455.

Fruehauf, J. u. Meyskens, F. (2007): Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin. Cancer Res.* 13 (3): 789–794.

Fujiwara, H.; Hasegawa, M.; Dohmae, N.; Kawashima, A.; Masliah, E.; Goldberg, M. S.; Shen, J.; Takio, K. u. Iwatsubo, T. (2002): alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat. Cell Biol.* 4 (2): 160–164.

Furlong, R.; Narain, Y.; Rankin, J.; Wytttenbach, A. u. Rubinsztein, D. (2000): Alpha-synuclein overexpression promotes aggregation of mutant huntingtin. *Biochem. J.* 346 Pt 3: 577–581.

Ganguly, U.; Ganguly, A.; Sen, O.; Ganguly, G.; Cappai, R.; Sahoo, A. u. Chakrabarti, S. (2019): Dopamine Cytotoxicity on SH-SY5Y Cells: Involvement of α -Synuclein and Relevance in the Neurodegeneration of Sporadic Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* 35 (4): 898–907.

George, J.; Jin, H.; Woods, W. u. Clayton, D. (1995): Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15 (2): 361–372.

Gervois, P.; Torra, I.; Fruchart, J. u. Staels, B. (2000): Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38 (1): 3–11.

Giasson, B.; Duda, J.; Quinn, S.; Zhang, B.; Trojanowski, J. u. Lee, V. (2002): Neuronal α -Synucleinopathy with Severe Movement Disorder in Mice Expressing A53T Human α -Synuclein. *Neuron* 34 (4): 521–533.

Giasson, B.; Murray, I.; Trojanowski, J. u. Lee, V. (2001): A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J. Biol. Chem.* 276 (4): 2380–2386.

Giasson, B.; Uryu, K.; Trojanowski, J. u. Lee, V. (1999): Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J. Biol. Chem.* 274 (12): 7619–7622.

Goedert, M. (1999): Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos. Trans. Royal Soc.* 354 (1386): 1101–1118.

Goedert, M. (2001): Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (4): 308–312.

Goldman, J.; Yen, S.; Chiu, F. u. Peress, N. (1983): Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science (New York, N.Y.)* 221 (4615): 1082–1084.

Golovko, M.; Faergeman, N.; Cole, N.; Castagnet, P.; Nussbaum, R. u. Murphy, E. (2005): Alpha-synuclein gene deletion decreases brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding. *Biochemistry* 44 (23): 8251–8259.

Gould, N.; Mor, D.; Lightfoot, R.; Malkus, K.; Giasson, B. u. Ischiropoulos, H. (2014): Evidence of native α -synuclein conformers in the human brain. *J. Biol. Chem.* 289 (11): 7929–7934.

Gould, S. u. Valle, D. (2000): Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet.* 16 (8): 340–345.

Greenamyre, J. u. Hastings, T. (2004): Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Science (New York, N.Y.)* 304 (5674): 1120–1122.

Greenbaum, E.; Graves, C.; Mishizen-Eberz, A.; Lupoli, M.; Lynch, D.; Englander, S.; Axelsen, P. u. Giasson, B. (2005): The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.* 280 (9): 7800–7807.

Hardy, J. u. Gwinn-Hardy, K. (1998): Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391): 1075–1079.

Hasegawa, M.; Fujiwara, H.; Nonaka, T.; Wakabayashi, K.; Takahashi, H.; Lee, V.; Trojanowski, J.; Mann, D. u. Iwatsubo, T. (2002): Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J. Biol. Chem.* 277 (50): 49071–49076.

Hashimoto, M.; Hsu, L.; Sisk, A.; Xia, Y.; Takeda, A.; Sundsmo, M. u. Masliah, E. (1998): Human recombinant NACP/ α -synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: Relevance for Lewy body disease. *Brain Res.* 799 (2): 301–306.

Hsu, L.; Sagara, Y.; Arroyo, A.; Rockenstein, E.; Sisk, A.; Mallory, M.; Wong, J.; Takenouchi, T.; Hashimoto, M. u. Masliah, E. (2000): alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am. J. Pathol.* 157 (2): 401–410.

Itoh, M.; Suzuki, Y.; Akaboshi, S.; Zhang, Z.; Miyabara, S. u. Takashima, S. (2000): Developmental and pathological expression of peroxisomal enzymes: their relationship of D-bifunctional protein deficiency and Zellweger syndrome. *Brain Res.* 858 (1): 40–47.

Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; de Silva, H.; Kittel, A. u. Saitoh, T. (1995): The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14 (2): 467–475.

Jakes, R.; Spillantini, M. u. Goedert, M. (1994): Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS letters* 345 (1): 27–32.

Jao, C.; Der-Sarkissian, A.; Chen, J. u. Langen, R. (2004): Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling. *PNAS USA.* 101 (22): 8331–8336.

Ji, H.; Liu, Y.; Jia, T.; Wang, M.; Liu, J.; Xiao, G.; Joseph, B.; Rosen, C. u. Shi, Y. (1997): Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res.* 57 (4): 759–764.

Junn, E. u. Mouradian, M. (2002): Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neurosci. Lett.* 320 (3): 146–150.

Karnati, S. u. Baumgart-Vogt, E. (2008): Peroxisomes in mouse and human lung: their involvement in pulmonary lipid metabolism. *Histochem. Cell Biol.* 130 (4): 719–740.

Keeney, P.; Xie, J.; Capaldi, R. u. Bennett, J. (2006): Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J. Neurosci.* 26 (19): 5256–5264.

Keller, G.; Pazirandeh, M. u. Krisans, S. (1986): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase localization in rat liver peroxisomes and microsomes of control and cholestyramine-treated animals: quantitative biochemical and immunoelectron microscopical analyses. *J. Cell Biol.* 103 (3): 875–886.

Kerjan, G. u. Gleeson, J. (2007): A missed exit: Reelin sets in motion Dab1 polyubiquitination to put the break on neuronal migration. *Genes Dev.* 21 (22): 2850–2854.

Kirik, D.; Rosenblad, C.; Burger, C.; Lundberg, C.; Johansen, T.; Muzyczka, N.; Mandel, R. u. Björklund, A. (2002): Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J. Neurosci.* 22 (7): 2780–2791.

Kitada, T.; Asakawa, S.; Minoshima, S.; Mizuno, Y. u. Shimizu, N. (2000): Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mamm. Genome* 11 (6): 417–421.

Kraytsberg, Y.; Kudryavtseva, E.; McKee, A.; Geula, C.; Kowall, N. u. Khrapko, K. (2006): Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat. Genet.* 38 (5): 518–520.

Kruer, M. (2013): The neuropathology of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Int. Rev. Neurobiol.* 110: 165–194.

Krüger, R.; Kuhn, W.; Müller, T.; Voitalla, D.; Graeber, M.; Kösel, S.; Przuntek, H.; Epplen, J.; Schöls, L. u. Riess, O. (1998): Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18 (2): 106–108.

Kuzuhara, S.; Mori, H.; Izumiyama, N.; Yoshimura, M. u. Ihara, Y. (1988): Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol.* 75 (4): 345–353.

Larsen, K.; Schmitz, Y.; Troyer, M.; Mosharov, E.; Dietrich, P.; Quazi, A.; Savalle, M.; Nemani, V.; Chaudhry, F.; Edwards, R.; Stefanis, L. u. Sulzer, D. (2006): Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. *J. Neurosci.* 26 (46): 11915–11922.

Lazarow, P. u. Fujiki, Y. (1985): Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 489–530.

Lee, M.; Stirling, W.; Xu, Y.; Xu, X.; Qui, D.; Mandir, A.; Dawson, T.; Copeland, N.; Jenkins, N. u. Price, D. (2002): Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 - Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *PNAS USA.* 99 (13): 8968–8973.

Legakis, J.; Koepke, J.; Jedeszko, C.; Barlaskar, F.; Terlecky, L.; Edwards, H.; Walton, P. u. Terlecky, S. (2002): Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 13 (12): 4243–4255.

Li, X. u. Gould, S. (2002): PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J. Cell Biol.* 156 (4): 643–651.

- Liang, T.; Spence, J.; Liu, L.; Strother, W.; Chang, H.; Ellison, J.; Lumeng, L.; Li, T.; Foroud, T. u. Carr, L. (2003): Alpha-Synuclein maps to a quantitative trait locus for alcohol preference and is differentially expressed in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *PNAS USA*. 100 (8): 4690–4695.
- Lim, X.; Yeo, J.; Green, A. u. Pal, S. (2013): The diagnostic utility of cerebrospinal fluid alpha-synuclein analysis in dementia with Lewy bodies - a systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism Relat. Disord.* 19 (10): 851–858.
- Lin, M. u. Beal, M. (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443 (7113): 787–795.
- Litvan, I.; Bhatia, K.; Burn, D.; Goetz, C.; Lang, A.; McKeith, I.; Quinn, N.; Sethi, K.; Shults, C. u. Wenning, G. (2003): Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov. Disord.* 18 (5): 467–486.
- Liu, G.; Zhang, C.; Yin, J.; Li, X.; Cheng, F.; Li, Y.; Yang, H.; Uéda, K.; Chan, P. u. Yu, S. (2009): alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* 454 (3): 187–192.
- Liu, Y.; Björkman, J.; Urquhart, A.; Wanders, R.; Crane, D. u. Gould, S. (1999): PEX13 is mutated in complementation group 13 of the peroxisome-biogenesis disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 65 (3): 621–634.
- Liu, Y.; Suckale, J.; Masjkur, J.; Magro, M.; Steffen, A.; Anastassiadis, K. u. Solimena, M. (2010): Tamoxifen-independent recombination in the RIP-CreER mouse. *PLOS ONE* 5 (10): e13533.
- Malatynska, E.; Pinhasov, A.; Croke, J.; Horowitz, D.; Brenneman, D. u. Ilyin, S. (2006): Levels of mRNA coding for alpha-, beta-, and gamma-synuclein in the brains of newborn, juvenile, and adult rats. *J. Mol. Neurosci.* 29 (3): 269–277.
- Maroteaux, L.; Campanelli, J. u. Scheller, R. (1988): Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8 (8): 2804–2815.
- Maroteaux, L. u. Scheller, R. (1991): The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 11 (3-4): 335–343.

Mash, D.; Ouyang, Q.; Pablo, J.; Basile, M.; Izenwasser, S.; Lieberman, A. u. Perrin, R. (2003): Cocaine abusers have an overexpression of alpha-synuclein in dopamine neurons. *J. Neurosci.* 23 (7): 2564–2571.

Masliyah, E.; Rockenstein, E.; Veinbergs, I.; Mallory, M.; Hashimoto, M.; Takeda, A.; Sagara, Y.; Sisk, A. u. Mucke, L. (2000): Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science (New York, N.Y.)* 287 (5456): 1265–1269.

Maxwell, M.; Bjorkman, J.; Nguyen, T.; Sharp, P.; Finnie, J.; Paterson, C.; Tonks, I.; Paton, B.; Kay, G. u. Crane, D. (2003): Pex13 inactivation in the mouse disrupts peroxisome biogenesis and leads to a Zellweger syndrome phenotype. *Mol. Cell Biol.* 23 (16): 5947–5957.

McFarland, M.; Ellis, C.; Markey, S. u. Nussbaum, R. (2008): Proteomics analysis identifies phosphorylation-dependent alpha-synuclein protein interactions. *Mol. Cell. Proteom.* 7 (11): 2123–2137.

Moldovan, L. u. Moldovan, N. (2004): Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem. Cell Biol.* 122 (4): 395–412.

Mosharov, E.; Staal, Roland G.; Bové, J.; Prou, D.; Hananiya, A.; Markov, D.; Poulsen, N.; Larsen, K.; Moore, C.; Troyer, M.; Edwards, R.; Przedborski, S. u. Sulzer, D. (2006): Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *J. Neurosci.* 26 (36): 9304–9311.

Mosser, J.; Douar, A.; Sarde, C.; Kioschis, P.; Feil, R.; Moser, H.; Poustka, A. M.; Mandel, J. u. Aubourg, P. (1993): Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361 (6414): 726–730.

Müller, C.; Nguyen, T.; Ahlemeyer, B.; Meshram, M.; Santrampurwala, N.; Cao, S.; Sharp, P.; Fietz, P.; Baumgart-Vogt, E. u. Crane, D. (2011): PEX13 deficiency in mouse brain as a model of Zellweger syndrome: abnormal cerebellum formation, reactive gliosis and oxidative stress. *Dis. Model. Mech.* 4 (1): 104–119.

Murphy, D.; Rueter, S.; Trojanowski, J. u. Lee, V. (2000): Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20 (9): 3214–3220.

Nagase, T.; Shimozawa, N.; Takemoto, Y.; Suzuki, Y.; Komori, M. u. Kondo, N. (2004): Peroxisomal localization in the developing mouse cerebellum: implications for neuronal abnormalities related to deficiencies in peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1671 (1-3): 26–33.

Nakajo, S.; Omata, K.; Aiuchi, T.; Shibayama, T.; Okahashi, I.; Ochiai, H.; Nakai, Y.; Nakaya, K. u. Nakamura, Y. (1990): Purification and characterization of a novel brain-specific 14-kDa protein. *J. Neurochem.* 55 (6): 2031–2038.

Nardacci, R.; Falciatori, I.; Moreno, S. u. Stefanini, S. (2004): Immunohistochemical localization of peroxisomal enzymes during rat embryonic development. *J. Histochem. Cytochem.* 52 (4): 423–436.

Narhi, L.; Wood, S.; Steavenson, S.; Jiang, Y.; Wu, G. M.; Anafi, D.; Kaufman, S.; Martin, F.; Sitney, K.; Denis, P.; Louis, J. C.; Wypych, J.; Biere, A. L. u. Citron, M. (1999): Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.* 274 (14): 9843–9846.

Ostremova, N.; Petrucelli, L.; Farrer, M.; Mehta, N.; Choi, P.; Hardy, J. u. Wolozin, B. (1999): alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.* 19 (14): 5782–5791.

Pacelli, C.; Rasmø, D.; Signorile, A.; Grattagliano, I.; Di Tullio, G.; D'Orazio, A.; Nico, B.; Comi, G. P.; Ronchi, D.; Ferranini, E.; Pirolo, D.; Seibel, P.; Schubert, S.; Gaballo, A.; Villani, G. u. Cocco, T. (2011): Mitochondrial defect and PGC-1 α dysfunction in parkin-associated familial Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812 (8): 1041–1053.

Perez, R.; Waymire, J.; Lin, E.; Liu, J.; Guo, F. u. Zigmond, M. (2002): A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* 22 (8): 3090–3099.

Perrin, R.; Woods, W.; Clayton, D. u. George, J. (2000): Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275 (44): 34393–34398.

Perrin, R.; Woods, W.; Clayton, D. u. George, J. (2001): Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins. *J. Biol. Chem.* 276 (45): 41958–41962.

Pinhasov, A.; Ilyin, S.; Crooke, J.; Amato, F.; Vaidya, A.; Rosenthal, D.; Brenneman, D. u. Malatynska, E. (2005): Different levels of gamma-synuclein mRNA in the cerebral cortex of dominant, neutral and submissive rats selected in the competition test. *Genes Brain Behav.* 4 (1): 60–64.

Polymeropoulos, M.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Pike, B.; Root, H.; Rubenstein, J.; Boyer, R.; Stenroos, E.; Chandrasekharappa, S.; Athanassiadou, A.; Papapetropoulos, T.; Johnson, W.; Lazzarini, A.; Duvoisin, R.; Di Iorio, G.; Golbe, L. u. Nussbaum, R. (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene

identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* 276 (5321): 2045–2047.

Reddy, J. u. Mannaerts, G. (1994): Peroxisomal lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 343–370.

Rhodin, J. (1954): Thesis, Karolinska Institutet, Aktiebolaget Godvil, Stockholm.

Schambra, U.; Lauder, J. u. Silver, J. (1992): Atlas of the prenatal mouse brain. Acad. Press. San Diego. 327.

Schapira, A. (1993): Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 60: 288–291.

Schrader, M.; Bonekamp, N. u. Islinger, M. (2012): Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1822 (9): 1343–1357.

Schrader, M. u. Fahimi, H. (2004): Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* 122 (4): 383–393.

Schrader, M.; Godinho, L.; Costello, J. u. Islinger, M. (2015): The different facets of organelle interplay-an overview of organelle interactions. *Front. Cell Dev. Biol.* 3: 56.

Schrader, M.; Grille, S.; Fahimi, H. u. Islinger, M. (2013): Peroxisome interactions and cross-talk with other subcellular compartments in animal cells. *Subcell. Biochem.* 69: 1–22.

Shimura, H.; Schlossmacher, M.; Hattori, N.; Frosch, M.; Trockenbacher, A.; Schneider, R.; Mizuno, Y.; Kosik, K. u. Selkoe, D. (2001): Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* 293 (5528): 263–269.

Singleton, A.; Farrer, M.; Johnson, J.; Singleton, A.; Hague, S.; Kachergus, J.; Hulihan, M.; Peuralinna, T.; Dutra, A.; Nussbaum, R.; Lincoln, S.; Crawley, A.; Hanson, M.; Maraganore, D.; Adler, C.; Cookson, M.; Muenter, M.; Baptista, M.; Miller, D.; Blancato, J.; Hardy, J. u. Gwinn-Hardy, K. (2003): alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)* 302 (5646): 841.

Siraki, A.; Pourahmad, J.; Chan, T.; Khan, S. u. O'Brien, P. (2002): Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 32 (1): 2–10.

Smith, W.; Jiang, H.; Pei, Z.; Tanaka, Y.; Morita, H.; Sawa, A.; Dawson, V.; Dawson, T. u. Ross, C. (2005): Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death

pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 14 (24): 3801–3811.

Spillantini, M.; Crowther, R.; Jakes, R.; Cairns, N.; Lantos, P. u. Goedert, M. (1998): Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* 251 (3): 205–208.

Spillantini, M.; Schmidt, M.; Lee, V.; Trojanowski, J.; Jakes, R. u. Goedert, M. (1997): Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388 (6645): 839–840.

Spillantini, M. u. Goedert, M. (2000): The α -Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920 (1): 16–27.

Steidl, J.; Gomez-Isla, T.; Mariash, A.; Ashe, K. u. Boland, L. (2003): Altered short-term hippocampal synaptic plasticity in mutant alpha-synuclein transgenic mice. *Neuroreport* 14 (2): 219–223.

Steinberg, S.; Dodt, G.; Raymond, G.; Braverman, N.; Moser, A. u. Moser, H. (2006): Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763 (12): 1733–1748.

Subramani, S.; Koller, A. u. Snyder, W. (2000): Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 399–418.

Surguchov et al. (1999): Synoretin—A New Protein Belonging to the Synuclein Family. *Mol Cell. Neurosci.* 13 (2): 95–103.

Swerdlow, R.; Parks, J.; Miller, S.; Tuttle, J.; Trimmer, P.; Sheehan, J.; Bennett, J.; Davis, R. u. Parker, W. (1996): Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 40 (4): 663–671.

Terlecky, S.; Koepke, J. u. Walton, P. (2006): Peroxisomes and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763 (12): 1749–1754.

Thomas, B. u. Beal, M. (2007): Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 16 Spec No. 2: R183-94.

Titorenko, V. u. Terlecky, S. (2011): Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic* 12 (3): 252–259.

Tu, P.; Galvin, J.; Baba, M.; Giasson, B.; Tomita, T.; Leight, S.; Nakajo, S.; Iwatsubo, T.; Trojanowski, J. u. Lee, V. (1998): Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Ann. Neurol.* 44 (3): 415–422.

- Uéda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, D.; Kondo, J.; Ihara, Y. u. Saitoh, T. (1993): Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *PNAS USA*. 90 (23): 11282–11286.
- Uéda, K.; Saitoh, T. u. Mori, H. (1994): Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205 (2): 1366–1372.
- Valera, E. u. Masliah, E. (2016): Therapeutic approaches in Parkinson's disease and related disorders. *J. Neurochem.* 139 (1): 346–352.
- van den Bosch, H; Schutgens, R.; Wanders, R. u. Tager, J. (1992): Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 157–197.
- Volles, M. u. Lansbury, P. (2003): Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 42 (26): 7871–7878.
- Wakabayashi, K.; Engelender, S.; Yoshimoto, M.; Tsuji, S.; Ross, C. u. Takahashi, H. (2000): Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 47 (4): 521–523.
- Wanders, R. u. Waterham, H. (2005): Peroxisomal disorders I: biochemistry and genetics of peroxisome biogenesis disorders. *Clin. Genet.* 67 (2): 107–133.
- Watson, J.; Hatami, A.; David, H.; Masliah, E.; Roberts, K.; Evans, C. u. Levine, M. (2009): Alterations in corticostriatal synaptic plasticity in mice overexpressing human alpha-synuclein. *Neuroscience* 159 (2): 501–513.
- Weinreb, P.; Zhen, W.; Poon, A.; Conway, K. u. Lansbury, P. (1996): NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35 (43): 13709–13715.
- Xu, J.; Kao, S.; Lee, Frank J.; Song, W.; Jin, L. u. Yankner, B. (2002): Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat. Med.* 8 (6): 600–606.
- Yakunin, E.; Moser, A.; Loeb, V.; Saada, A.; Faust, P.; Crane, D.; Baes, M. u. Sharon, R. (2010): alpha-Synuclein abnormalities in mouse models of peroxisome biogenesis disorders. *J. Neurosci. Res.* 88 (4): 866–876.
- Yan, D.; Liu, C.; Tan, X.; Ma, Z.; Wang, C.; Deng, Y.; Liu, W.; Xu, Z. u. Xu, B. (2019): Mn-Induced Neurocytes Injury and Autophagy Dysfunction in Alpha-Synuclein

Wild-Type and Knock-Out Mice: Highlighting the Role of Alpha-Synuclein. *Neurotox. Res.* 36 (1): 66–80.

Yavich, L.; Tanila, H.; Vepsäläinen, S. u. Jäkälä, P. (2004): Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J. Neurosci.* 24 (49): 11165–11170.

Yoshida, M. (2007): Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration. *Neuropathology* 27 (5): 484–493.

Zarranz, J.; Alegre, J.; Gómez-Esteban, J.; Lezcano, E.; Ros, R.; Ampuero, I.; Vidal, L.; Hoenicka, J.; Rodriguez, O.; Atarés, B.; Llorens, V.; Gomez Tortosa, E.; del Ser, T.; Muñoz, D. u. de Yebenes, J. (2004): The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55 (2): 164–173.

12. Publikationsverzeichnis

Endogenous Murine Amyloid- β Peptide Assembles into Aggregates in the Aged C57BL/6J Mouse Suggesting These Animals as a Model to Study Pathogenesis of Amyloid- β Plaque Formation.

Ahlemeyer B, Halupczok S, Rodenberg-Frank E, Valerius KP, Baumgart-Vogt E.

J Alzheimers Dis. 2018;61(4):1425-1450. doi: 10.3233/JAD-170923

PMID:29376876

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14. Danksagung

Als Erstes würde ich meinen Dank an Prof. Dr. Baumgart-Vogt aussprechen, die diese Theses erst ermöglicht hat und mir stets geholfen hat, diese Arbeit zu verwirklichen. Ebenso möchte ich Frau PD. Dr. Barbara Ahlemeyer danken, die mir die Methoden und Techniken gezeigt hat, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Ebenso hat sie mir stets beratend zur Seite gestanden, wenn die Experimente mal nicht so funktioniert haben wie sie sollten.

Des Weiteren möchte ich Frau Elke Rodenberg-Frank, Andrea Textor, Petra Hahn-Kohlberger, Bianca Pfeiffer, Susanne Pfreimer und Silvia Heller für ihre Geduld, ihre Unterstützung in technischen Fragen und ihrer Erfahrung danken, die sie mir während meiner gesamten Zeit im Labor gezeigt haben. Es war eine Freude mit Ihnen zusammenarbeiten zu dürfen.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, deren Liebe und Ruhe stets dafür gesorgt hat, dass mir so manche langen und eventuell sehr frustrierendem Tage im Labor nicht den letzten Nerv geraubt haben.

Und zum Schluss möchte ich den wichtigsten Personen in meinem Leben danken, und zwar meiner Frau Rocio und meiner Tochter Elizabeth, die mir zwar auch manchmal den letzten Nerv rauben, aber mir gleichzeitig stets eine starke Motivation geben auch in schwierigen Situationen nicht aufzugeben.