

**Charakterisierung der P-Typ ATPase Ypk9
in *Saccharomyces cerevisiae* als Modell für die
ATP13A2-bedingte Form der
Neurodegeneration**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Barbara Stiller
aus Bonn

Köln 2009

Die vorliegende Dissertation wurde mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln am Institut für Humangenetik (Direktorin: Prof. Dr. Brunhilde Wirth) der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Langer und Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Langer

Prof. Dr. Christian Kubisch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.1.1	Parkinsonismus.....	1
1.1.1.1	<i>SNCA</i> und α -Synuclein.....	4
1.1.1.2	<i>ATP13A2</i> und das Kufor-Rakeb Syndrom.....	4
1.2	P-Typ ATPasen.....	5
1.2.1	Stofftransport durch biologische Membranen	5
1.2.2	ATP betriebene Pumpen.....	6
1.2.3	Struktur von P-Typ ATPasen	6
1.2.4	Funktionsmechanismus der P-Typ ATPasen.....	7
1.2.5	Klassifizierung der P-Typ ATPasen	8
1.2.5.1	Typ I ATPasen	9
1.2.5.2	Typ II ATPasen	10
1.2.5.3	Typ III ATPasen.....	11
1.2.5.4	Typ IV ATPasen	11
1.2.5.5	Typ V ATPasen.....	11
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Chemikalien	14
2.3	Allgemeine Lösungen	14
2.4	Kommerzielle Reagenziensysteme	15

2.5	Verwendete Geräte.....	15
2.6	Datenbanken und Internetseiten.....	16
2.7	Software.....	16
2.8	Verwendete Plasmide	17
2.9	Grundlegende molekulargenetische Methoden	18
2.9.1	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	18
2.9.2	Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)	20
2.9.3	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	20
2.9.3.1	Primerdesign	20
2.9.4	PCR-Reaktionsansätze.....	21
2.9.5	PCR-Temperaturprofile	21
2.9.5.1	2-Schritt-PCR (2-step-PCR)	21
2.9.5.2	Splicing by overlap extension-PCR (SOE-PCR)	22
2.9.6	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	23
2.9.7	Agarose-Gel-Elektrophorese	24
2.9.7.1	Aufreinigung der DNA aus dem Agarose-Gel	25
2.9.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop.....	25
2.9.9	Sequenzierung von PCR-Fragmenten und Plasmiden.....	26
2.10	Klonierung	27
2.10.1	<i>Escherichia coli</i>-Stämme	28
2.10.2	Kultivierung und Transformation von <i>E. coli</i>-Stämmen.....	28
2.10.3	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen.....	29
2.10.4	TA-Klonierung in den pcDNA3.1/V5His(-) Expressionsvektor	30
2.10.5	Klonierung über Restriktionsendonuclease-Schnittstellen	30
2.10.6	Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	31
2.10.7	Dephosphorylierung.....	31

2.10.8	Ligation über Restriktionsendonuclease-Schnittstellen.....	32
2.10.9	Transformation chemisch kompetenter Zellen	32
2.10.10	Glycerolstocks von transformierten Bakterien	33
2.10.11	Das Gateway-System®	33
2.10.12	DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (Plasmid-Präparation)	33
2.10.13	Kontrollverdau isolierter Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzymen.....	34
2.11	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.11.1	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	34
2.11.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen.....	35
2.11.3	Bestimmung der optischen Dichte von <i>S. cerevisiae</i> Kulturen.....	36
2.11.4	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	36
2.11.5	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	37
2.11.6	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	38
2.11.7	Aufschluss von <i>S. cerevisiae</i> Zellen	38
2.11.8	Aufschluss von <i>S. cerevisiae</i> Zellen mittels Glasperlen.....	38
2.11.9	Wachstumstests	39
2.11.9.1	Verdünnungsreihen auf Platten.....	39
2.11.9.2	Flüssigkultur	39
2.11.10	Gen-Deletion in <i>S. cerevisiae</i>	39
2.11.11	Bestimmung der Autophagierate mit dem GFP-Atg8-Assay	40
2.11.12	Bestimmung der Autophagierate von <i>S. cerevisiae</i> mit dem Pho8Δ60-Assay.....	40
2.11.13	Bestimmung der replikativen Lebensspanne von <i>S. cerevisiae</i> Zellen	41
2.12	Arbeiten mit Säugerzellen	42
2.12.1	Kultivierung von Säugerzellen	42
2.12.2	Isolierung von DNA Säugerzellen	43
2.12.3	Isolierung von RNA aus Säugerzellen	43

2.12.4	Transfektion humaner Fibroblasten mit dem Nucleofector® System	44
2.12.5	Transfektion von SH-S5Y5-Zellen mit siRNA.....	44
2.12.6	Mangan-Sensitivität - MTT-Assay.....	44
2.13	Proteinbiochemische Methoden	45
2.13.1	Western-Blot-Analyse	45
2.13.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
2.13.1.2	Elektrophoretische Auftrennung der Proteine im SDS-Gel.....	46
2.13.1.3	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	47
2.13.1.4	Spezifische Chemilumineszenz-Detektion.....	47
2.13.2	Antikörper.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	<i>In silico</i> Analysen.....	50
3.1.1	Ypk9 ist das <i>S. cerevisiae</i> Homolog von Atp13a2	50
3.1.2	Bioinformatische Charakterisierung von Ypk9	53
3.2	Subzelluläre Lokalisierung von Ypk9	56
3.3	Einfluss von Ypk9 auf die Autophagie	57
3.3.1	Der GFP-Atg8-Assay	57
3.3.2	Der Pho8Δ60-Assay	59
3.4	Einfluss von Ypk9 auf das Altern	63
3.5	α-Synuclein.....	66
3.5.1	Einfluss von Ypk9 auf die α-Synuclein Toxizität in <i>S. cerevisiae</i>	66
3.5.2	Die Toxizität von α-Synuclein und Mangan wirkt nicht additiv.....	68
3.6	Einfluss von <i>YPK9</i> auf die Homöostase von Metallionen	69
3.7	Δ <i>ypk9</i> ist sensitiv gegenüber Mangan	72
3.8	Komplementation von Ypk9 mit dem humanen Atp13a2.....	76

3.9	Die Rolle von Ypk9 im Manganstoffwechsel von <i>S.cerevisiae</i>	78
3.9.1	Ypk9 und der vakuoläre Transporter Ccc1	78
3.9.2	Ypk9 und das ACDP-Membranprotein Mam3	80
3.9.3	Ypk9 und die Ca²⁺/Mn²⁺ ATPase Pmr1	83
3.10	Übertragbarkeit der Mangan-Sensitivität des <i>S. cerevisiae</i> Modells auf Mammalia	86
3.10.1	Mangan-Sensitivität humaner Fibroblasten	86
3.10.1.1	Reversibilität der Mangan-Sensitivität der Fibroblasten durch Expression von exogenem <i>ATP13A2</i>	91
3.10.2	Mangan-Sensitivität dopaminerger Neuroblastomzellen SH-SY5Y unter siRNA <i>knockdown</i> von <i>ATP13A2</i>	93
4	Diskussion	95
4.1	Ypk9 ist das <i>S. cerevisiae</i> Homolog zu <i>Atp13a2</i> und lokalisiert in der vakuolären Membran	95
4.2	Der Einfluss von <i>YPK9</i> auf die Autophagie	97
4.2.1	Der GFP-Atg8-Assay und der <i>Pho8Δ60</i>-Assay zur Prüfung einer Beteiligung von Ypk9 an der Autophagie	99
4.3	Der Einfluss von <i>YPK9</i> auf das Altern	101
4.4	α-Synuclein	103
4.5	Schwermetalle	104
4.6	Mangan-Sensitivität	106
4.6.1	$\Delta ypk9$ ist sensitiv gegenüber Mangan	106
4.6.2	Komplementation von $\Delta ypk9$ mit dem humanen <i>Atp13a2</i>-Protein	107
4.6.3	Die Rolle von Ypk9 in der Mangan-Homöostase von <i>S. cerevisiae</i>	109
4.6.4	Übertragung der Mangan-Sensitivität von $\Delta ypk9$-Zellen auf Mammalia	113

5	Zusammenfassung	117
6	Summary	119
7	Literaturverzeichnis	121
8	Anhang	132
8.1	Liste aller verwendeten Oligonukleotide.....	132
8.2	Vektorkarten.....	135

Publikationen

Danksagung

Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5'FOA	<i>5'-Fluoroovatic Acid</i>
A. dest.	destilliertes Wasser
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACDP	<i>ancient conserved domain protein</i>
AD	autosomal dominant
ALP	alkalische Phosphatase
AK	Antikörper
AR	autosomal rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CMA	<i>chaperon-mediated autophagy</i>
CLS	<i>chronological life span</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DLBD	diffuse Lewy-Körperchen Erkrankung
DMEM	Dubecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dethiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
FKS	fötales Kälberserum
HRP	Meerrettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KRS	Kufor-Rakeb Syndrom
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium (Bakterienkultivierung)

Mb	Megabasen
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
OD _n	Optische Dichte (Extinktion bei einer Wellenlänge von n nm)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pgk	Phosphoglyceratkinase
PSP	progressive supranukleäre Paralyse
RLS	<i>replicative life span</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription / -Transkriptase
SC-Medium	<i>synthetic complete</i> -Medium (<i>S. cerevisiae</i> Kulturmedium)
SD(-N)-Medium	<i>synthetic-dextrose</i> -Medium ohne Ammoniumsulfat und Aminosäuren (<i>S. cerevisiae</i> Kultivierung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMKT	<i>salt mediated killer toxin</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>unit</i> (definierte Einheit der Enzymaktivität)
UPR	<i>unfolded protein response</i>
WT	Wildtyp
YNB	<i>yeast nitrogen base</i> (für <i>S. cerevisiae</i> Kultivierung)
YPD	<i>yeast peptone dextrose</i> (<i>S. cerevisiae</i> Kulturmedium)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen, wie z. B. die Parkinson-, Huntington- oder Alzheimer-Krankheiten, zeichnen sich durch einen graduellen und progressiven Verlust von Nervenzellen und neuralem Gewebe aus, der sich häufig gerade mit zunehmendem Alter manifestiert. Da sich die Lebenserwartung der Bevölkerung durch verschiedene Faktoren, wie z. B. bessere medizinische Versorgung und ein gesünderes Nahrungsangebot stetig erhöht, nimmt auch die Anzahl der Neuerkrankten immer weiter zu. Eine verbesserte Diagnose und Therapie durch die Erforschung dieser Erkrankungen sind daher von allgemeinem Interesse.

1.1.1 Parkinsonismus

Unter Parkinsonismus werden verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst, bei denen die Patienten unter einer Trias aus Akinese (Bewegungsarmut), Rigor (Steife) und Ruhetremor (Zittern in der Ruhe) leiden und unter anderem eine mangelhafte oder fehlende Mimik, eine Verlangsamung der Bewegungen, eine gebückte Haltung und einen kleinschrittigen und zum Teil schlurfenden Gang aufweisen (Pschyrembel). Pathologische Charakteristika sind so genannte Lewy-Körperchen (Abbildung 1-1), d. h. cytoplasmatische Einschlüsse in dopaminergen Neuronen der *substantia nigra* (Klockgether, 2004), die hauptsächlich aus den Proteinen Ubiquitin und α -Synuclein bestehen (Engelender, 2008) und wahrscheinlich zu einer progressiven Degeneration selbiger Neurone führen.

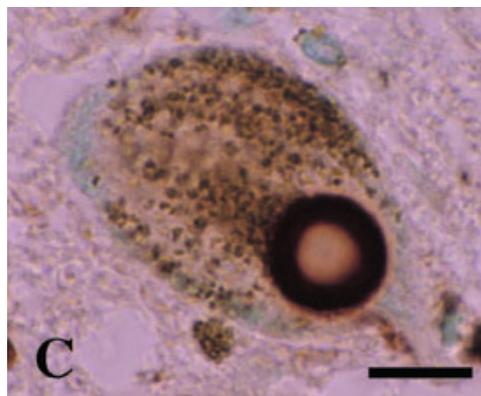


Abbildung 1-1: Lewy-Körperchen eines pigmentierten Neurons der *substantia nigra* eines Parkinson Patienten. Gefärbt mit einem anti- α -Synuclein Antikörper. Entnommen aus: Wakabayashi *et al.*, 2007.

Durch das Absterben der nigrostriatalen Neuronen kommt es zu einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin im Striatum, einer zentralen Komponente der Basalganglien welches für die Regulierung von Bewegungsabläufen zuständig ist (Obeso et al., 2008). Dies führt zu einer Störung der Koordination selbiger und verursacht somit letztendlich die auftretenden Symptome.

Die mit ca. 75 % aller Fälle am häufigsten auftretende Form des Parkinsonismus ist die idiopathische Parkinson Krankheit (auch Morbus Parkinson genannt). Sie tritt im Allgemeinen zwischen dem 50. und 85. Lebensjahr auf und die jährliche Inzidenz pro 100 000 Menschen liegt bei 16 bis 19 (Farrer, 2006).

Neben dem idiopathischen Parkinsonismus gibt es verschiedene weitere Formen, deren Entstehungsursache bekannt ist. Man unterscheidet zwischen Parkinson-ähnlichen Krankheitsbildern, wie z. B. der diffusen Lewy-Körperchen Erkrankung (DLBD) und der progressive supranukleären Paralyse (PSP), und symptomatischen Parkinson Syndromen (Weiner, 2004). Letztere können u. a. Medikamenten-induziert sein oder durch Vergiftungen mit verschiedenen Stoffen, wie z. B. 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP), Kohlenmonoxid oder Mangan ausgelöst werden (Landrigan *et al.*, 2005).

Eher selten kommt der familiäre Parkinsonismus vor. Es sind einige monogen vererbte Formen von Parkinsonismus beschrieben, die sich teilweise anhand des klinischen Phänotyps vom klassischen Parkinsonismus unterscheiden. Mutationen in einem der folgenden Gene machen 2 % bis 3 % aller Fälle von klassischem Parkinsonismus aus: *SNCA*, welches für das in den Lewy-Körperchen vorkommende Protein α -Synuclein codiert, *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1* und *LRRK2* (Klein *et al.*, 2007). Zudem konnte vor kurzem für das Gen *FBXO7* eine Assoziation mit Parkinsonismus gezeigt werden (Shojaee *et al.*, 2008 und Di Fonzo *et al.*, 2009). Auch Mutationen in dem Gen *ATP13A2* führen zu einer weiteren Form von Parkinsonismus, dem Kufor-Rakeb Syndrom (KRS) (Ramirez *et al.*, 2006). Tabelle 1-1 zeigt eine Übersicht der bislang bekannten Gene, die mit monogenen Formen des Parkinsonismus assoziiert sind.

Tabelle 1-1: Darstellung der bislang eindeutig mit einer monogen vererbten Form des Parkinsonismus assoziierten Gene, ihrer Lage, dem Vererbungsmechanismus, dem jeweiligen Erkrankungsalter der Patienten und einem Charakteristikum des jeweils codierten Proteins (Nach Farrer, 2006 und Klein *et al.*, 2007).

Akronym	Erkrankungsalter	Vererbung	Lokus	Gen	Protein
PARK1/4	38-65 (Duplikationen) 24-48 (Triplikationen)	AD	4q22.1	<i>SNCA</i>	Hauptkomponente der Lewy-Körperchen
PARK2	16-72 im Mittel ca. 30	AR	6q26	<i>Parkin</i>	E3 Ubiquitin-Protein Ligase
PARK6	20-40	AR	1p36.12	<i>PINK1</i>	Mitochondriale Protein Kinase
PARK7	20-40	AR	1p36.27	<i>DJ-1</i>	Chaperon, Schutz vor oxidativem Stress
PARK8	32-79 im Mittel 50-70	AD	12q12	<i>LRRK2</i>	Protein Kinase
PARK9	12-18	AR	1p36.13	<i>ATP13A2</i>	Lysosomale P-Typ ATPase
-	10-19	AR	22q12p3	<i>FBXO7</i>	E3 Ubiquitin-Protein Ligase

AD-Autosomal dominant, AR-Autosomal rezessiv

Anhand der bisher bekannten Funktion der jeweiligen Gene lassen sich erste Rückschlüsse auf die Beteiligung von zwei wesentlichen zellulären Prozessen ziehen: der Proteinabbau und der Erhalt mitochondrialer Funktionen (Fahn und Sulzer, 2004).

Störungen innerhalb der mitochondrialen Funktion sind auch an dem Pathomechanismus umweltbedingter Formen des Parkinsonismus, wie z. B. der durch MPTP induzierten Form, beteiligt. MPTP ist ein Nebenprodukt bei der Herstellung von Heroin und wurde in den 1980er Jahren als Auslöser eines Parkinson-ähnlichen Phänotyps bei Heroinabhängigen identifiziert. MPTP wird nach einer Umwandlung in MPP^+ selektiv in dopaminerge Neuronen transportiert, wo es spezifisch den Komplex I der Atmungskette der Mitochondrien hemmt und somit zum Zelltod führt (Singer und Ramsay, 1999). Ein weiteres Beispiel ist der durch längere, meist mehrjährige Aufnahme von Mangan induzierte Manganismus, welcher ein dem Parkinsonismus ähnelndes Krankheitsbild zeigt. Es wird vermutet, dass die Mangan-induzierte Neurodegeneration durch mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress ausgelöst wird (Stredrick *et al.*, 2004).

1.1.1.1 SNCA und α -Synuclein

Das SNCA-Gen war das erste Gen, in dem pathogene Mutationen bei Parkinson Patienten mit monogener Krankheitsform identifiziert worden sind (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Neben den drei bekannten Aminosäure-Austausch-Mutationen A30P, G46L und A53T sind auch Fälle von genomischen Duplikationen und Triplikationen des SNCA-Gens bekannt, die zum Parkinsonismus führen. Die Gendosis des Wildtyp (WT)-Proteins korreliert dabei mit dem Erkrankungsalter, Krankheitsverlauf und Schweregrad der Krankheit (Eriksen *et al.*, 2005).

α -Synuclein ist ein 140 Aminosäuren großes Protein, welches hauptsächlich an den präsynaptischen Nervenenden vorkommt (Jakes *et al.*, 1994).

Zur Erklärung des Pathomechanismus gibt es bereits einige Ansätze. *In vitro* wird α -Synuclein sowohl über das Proteasom als auch über die Autophagie abgebaut (Webb *et al.*, 2003) und es konnte gezeigt werden, dass die beiden Mutanten A30P und A53T im Gegensatz zum WT α -Synuclein nicht durch eine Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperon-mediated autophagy*-CMA) abgebaut werden. Zudem verhindern sie auch den Abbau andere Proteine, indem sie den vermittelnden Rezeptor Lamp-2a (*lysosomal associated membrane protein type 2A*) blockieren (Cuervo *et al.*, 2004).

Studien in *S. cerevisiae*, welche selbst kein Homolog von SNCA besitzt, zeigen, dass auch hier die Gendosis mit dem Grad der Toxizität korreliert (Outeiro *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl in humanen dopaminergen Neuronen als auch in Hefezellen ähnliche toxische Reaktionen, wie z. B. eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Xu *et al.*, 2002, Flower *et al.*, 2005), ausgelöst werden. In gewissem Maße sind somit auch niedere Organismen, wie die Hefe *S. cerevisiae*, als Modell für die Erforschung von Parkinsonismus geeignet.

1.1.1.2 ATP13A2 und das Kufor-Rakeb Syndrom

Die bereits im Alter von 12 bis 16 Jahren erkrankenden KRS Patienten leiden neben den drei Kardinalsymptomen des Parkinsonismus zusätzlich unter Spastik, supranukleärer Blickparese und einer fortschreitenden Beeinträchtigung der geistigen Fähigkeiten bis hin zur Demenz (Najim Al-Din *et al.*, 1994). Das KRS erhielt seinen Namen durch den in Jordanien liegenden Ursprungsort des konsanguinen Elternpaares der von Najim Al-Din *et al.* beschriebenen Patienten, Kufor-Rakeb. Es wird durch Mutationen in dem Gen *ATP13A2*, welches für eine lysosomale Typ V P-Typ ATPase codiert, verursacht. Für drei verschiedene Mutationen, von

denen eine in homozygoter Form in der von Al-Din *et al.* beschriebenen Familie vorliegt (1632-1653dup22) und zwei *compound*-heterozygot vorliegende Mutationen in einer nicht-konsanguinen chilenischen Familie (1306+5G→A und 3057delC), konnte gezeigt werden, dass die aus den Mutationen resultierenden, trunkeierten Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurück bleiben und über das Proteasom abgebaut werden (Ramirez *et al.*, 2006). Über die Funktion des Atp13a2-Proteins, den zugrunde liegenden Pathomechanismus in KRS-Patienten sowie die Substratspezifität der ATPase liegen bisher kaum Erkenntnisse vor. Eine mögliche Erklärung wäre jedoch, dass der Funktionsverlust von Atp13a2 zu einer lysosomalen Fehlfunktion führen könnte, die wiederum eine beeinträchtigte Degradierung von Proteinen durch das Lysosom zur Folge haben könnte (Ramirez *et al.*, 2006). Es wäre aber auch denkbar, dass es durch die Retention des mutierten Atp13a2-Proteins im ER und dessen Abbau durch das Proteasom zu einer Überlastung des Proteasoms und somit zur Bildung von toxischen Proteinaggregaten kommen könnte (Ramirez *et al.*, 2006).

1.2 P-Typ ATPasen

Die Gen-Familie der P-Typ ATPasen ist eine von insgesamt vier Klassen von ATP betriebenen Pumpen, deren Aufgabe der Transport von Ionen und Molekülen durch biologische Membranen ist.

1.2.1 Stofftransport durch biologische Membranen

Biologische Membranen bilden eine natürliche Barriere für Ionen sowie größere polare Moleküle, die den hydrophoben inneren Teil der aus Phospholipiden, Glykolipiden, Cholesterin, Proteinen und Kohlenhydraten zusammengesetzten Lipid-Doppelschicht nicht passieren können und grenzen somit Reaktionsräume innerhalb der Zelle ab (Daleke, 2003). Um den Austausch von Ionen und Molekülen zwischen diesen Kompartimenten und dem Cytoplasma zu gewährleisten, ist die Membran von Proteinen durchzogen, die den Stofftransport auf zwei verschiedene Arten aufrechterhalten. Beim passiven Transport wird größeren und polaren Molekülen, die die Membran nicht selbst passieren können, die Diffusion durch spezifische kanalbildende Moleküle erleichtert. Hier wird im Gegensatz zum aktiven Transport, unter dem man die energieabhängige Translokation eines Stoffes entgegen seines Konzentrationsgefälles versteht, keine Energie benötigt. Der aktive Transport wird von

verschiedenen membrandurchspannenden Proteinen gewährleistet. Die benötigte Energie kann dabei durch den Co-Transport eines anderen Stoffes entlang seines Konzentrationsgradienten bereitgestellt, oder durch die direkte Spaltung von ATP gewonnen werden.

1.2.2 ATP betriebene Pumpen

Die ATP-spaltenden integralen Membranproteine sind in vier Klassen unterteilt:

Die erste Klasse wird von den ABC-Transportern (*ATP binding cassette*) gebildet. Es wird zwischen Import- und Export-Transporten unterschieden, wobei die für den Import von Molekülen verantwortlichen Transporter nur in Prokaryoten vorkommen, in denen sie z. B. Nährstoffe in die Zelle transportieren. Für den Export verantwortliche ABC-Transporter kommen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor. Sie transportieren unter anderem giftige Stoffe aus der Zelle heraus. Einige ABC-Transporter werden von verschiedenen Polypeptidketten gebildet, bei anderen werden hingegen alle vier Domänen von einem einzigen Protein gebildet.

Die zweite Klasse umfasst die V-Typ ATPasen, welche aus zwei verschiedenen funktionellen Komplexen, dem membranständigen V_0 -Teil und dem V_1 -Teil bestehen. Sie pumpen Protonen vom Cytoplasma zur exoplasmatischen Seite der Membran und sorgen so für den niedrigen pH-Wert in aciden Kompartimenten wie Lysosomen und Vakuolen (Wilkens *et al.*, 1999).

F-Typ ATPasen sind für die Synthese von ATP verantwortlich. Die dazu benötigte Energie wird aus einem bestehenden Protonengradienten bezogen. Im Aufbau ähneln F-Typ ATPasen den V-Typ ATPasen. Sie bestehen aus einem membranständigen F_0 -Teil und einem hydrophilen F_1 -Teil. F-Typ ATPasen sind in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert.

Die zur vierten Klasse gehörenden P-Typ ATPasen sind die einzigen ATP betriebene Pumpen, die während der Hydrolyse des ATPs eine kovalente Bindung zu seinem γ -Phosphatrest bilden und somit in einem phosphorylierten Zwischenzustand vorliegen.

1.2.3 Struktur von P-Typ ATPasen

P-Typ ATPasen sind 70-150 kDa große Membranproteine mit einer geraden Anzahl an Transmembranhelices, da sich sowohl ihr C-terminales als auch ihr N-terminales Ende auf der cytoplasmatischen Seite der Membran befinden. Sie können neben der katalytischen

α -Untereinheit zusätzlich aus einer oder zwei regulatorischen β -Untereinheiten bestehen (Geering, 2001).

Untersuchungen der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA) mittels Röntgenkristallographie ermöglichten eine genauere Betrachtung mit einer Auflösung von bis zu 2,6 Å. SERCA besteht aus vier verschiedenen Protein-Domänen: die Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne) enthält das für P-Typ ATPasen charakteristische Phosphorylierungsmotiv DKTGTLT. Desweiteren sind jeweils eine Nukleotidbindedomäne (N-Domäne), Aktuator-domäne (A-Domäne) und Membrandomäne (M-Domäne) vorhanden. Aufgrund von Sequenzhomologien wird angenommen, dass diese Domänen innerhalb der gesamten Familie der P-Typ ATPasen konserviert sind. Abbildung 1-2 zeigt eine schematische Darstellung der Struktur der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase.

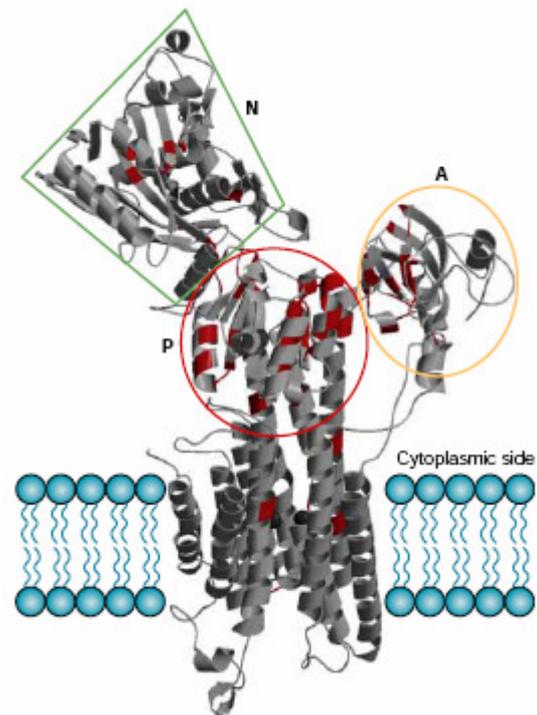


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der mittels Röntgenkristallographie aufgelösten Struktur der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase. Die vier verschiedenen Domänen sind entsprechend gekennzeichnet. Entnommen aus: Kühlbrandt, 2004.

1.2.4 Funktionsmechanismus der P-Typ ATPasen

Ein generelles Modell für die Ionen-Translokation der P-Typ ATPasen ist der Post-Albers Zyklus, der auf dem Zyklus der Na^+/K^+ -ATPase basiert (Abbildung 1-3). Zu Beginn bindet ein Ion-1 aus dem Cytoplasma an die hoch affine Bindestelle des Enzyms im E1-Zustand. Es erfolgt eine Phosphorylierung der ATPase durch Mg^{2+} -ATP, was zum E1-P-Zustand führt. Nach einer Konformationsänderung liegt der E2-P-Zustand vor, der wiederum nur noch eine

sehr geringe Affinität gegenüber Ion-1 hat und dieses somit auf die Außenseite entlässt. Nun wird von der Außenseite Ion-2 aufgenommen, welches nach der Abspaltung des Phosphatrestes ins Cytoplasma dissoziiert, wodurch der E1-Zustand wieder hergestellt ist.

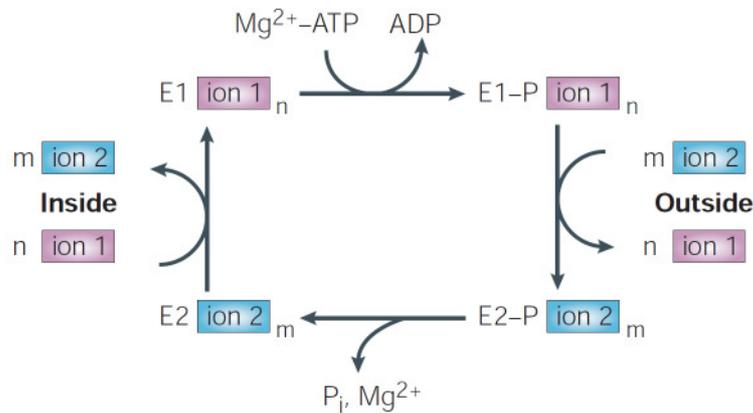


Abbildung 1-3: Dargestellt ist der schematische Ablauf des katalytischen Kreislaufs von P-Typ ATPasen anhand des Post-Albers Zyklus. n und m können Zahlen zwischen 1 und 3 sein, P_i steht für inorganisches Phosphat. Entnommen aus: Kühlbrandt, 2004.

1.2.5 Klassifizierung der P-Typ ATPasen

P-Typ ATPasen sind sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten zu finden und übernehmen Aufgaben, wie z. B. die Generierung und Aufrechterhaltung von Membranpotenzialen oder der zellulären Ca²⁺-Homöostase. Aufgrund von Sequenzhomologien werden die P-Typ ATPasen in fünf verschiedene Gruppen unterteilt, welche wiederum bezüglich ihrer Substratspezifität in weitere Subgruppen gegliedert sind. Abbildung 1-4 zeigt einen phylogenetischen Baum dieser Subgruppen bestehend aus acht verschiedenen Spezies (Axelsen und Palmgren, 1998).

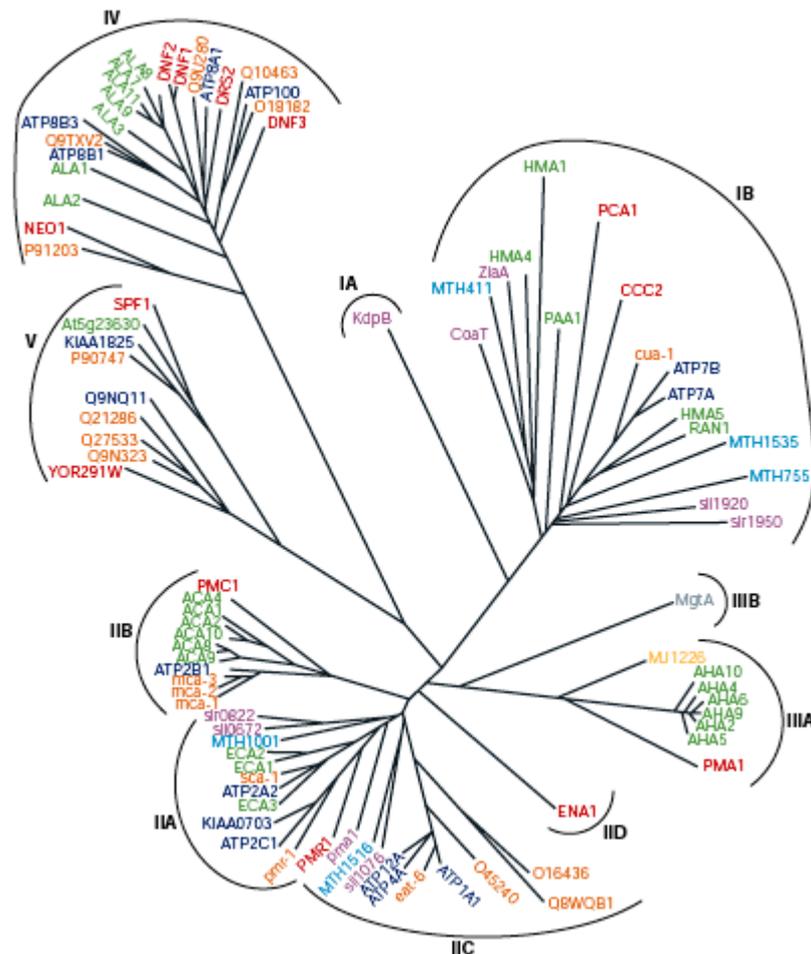


Abbildung 1-4: Dargestellt ist ein phylogenetischer Baum der Familie der P-Typ ATPasen, nach Axelsen und Palmgren, 1998. Die verschiedenen Farben der Proteine stehen für die verschiedenen Spezies: grün: *Arabidopsis thaliana*, orange: *Caenorhabditis elegans*, grau: *Escherichia coli*, dunkelblau, *Homo sapiens*, hellblau: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, gelb: *Methanococcus jannaschii*, lila: *Synechocystis PCC6803*, rot: *S. cerevisiae*. Entnommen aus: Kühlbrandt, 2004.

1.2.5.1 Typ I ATPasen

Die Typ I ATPasen sind die einfachsten und vermutlich ursprünglichsten P-Typ ATPasen. Sie sind in die beiden Subgruppen Typ IA und Typ IB unterteilt. Erstere ist eine relativ kleine Klasse, die die bakteriellen K^+ -Ionen-Pumpen umfasst, wobei die Kdp- K^+ -Pumpe (*E. coli*), welche aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist (Altendorf *et al.*, 1998), als Prototyp dieser Gruppe gilt. Typ IB ATPasen, auch Schwermetall-ATPasen genannt, sind für den Transport von Metallionen wie Ag^+ , Cu^+ , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , und Cu^{2+} zuständig. Sie sorgen sowohl für den Import essentieller Ionen als auch für die Entfernung der in größeren

Mengen toxisch wirkenden Metalle aus der Zelle. Typ IB ATPasen besitzen insgesamt acht Transmembranhelices, wobei die sechste Transmembrandomäne, welche für die Transportaktivität essentiell ist (Argüello, 2003), das Motiv C-P-X oder X-P-C enthält (X steht für C, S). Zudem enthalten diese ATPasen charakteristische Sequenzmotive, die den P-loop flankieren und eine Einteilung in mindestens vier weitere Untergruppen erlauben, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden: IB-1: Cu^+ , IB-2: Zn^{2+} , IB-3: Cu^{2+} , IB-4: Co^{2+} (Argüello *et al.*, 2007). Viele der Typ IB ATPasen besitzen im N- oder C-terminalen Bereich auch so genannte cytoplasmatische Metall-Binde-Domänen, welche vermutlich eine substratabhängige, regulatorische Rolle übernehmen (Wu *et al.*, 2008).

Durch Mutationen bestimmter Typ IB ATPasen kann es beim Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen kommen. Die X-chromosomal rezessiv vererbte Menkes-Krankheit z. B. ist auf Mutationen des auf Chromosom Xq21.1 liegenden Gens *ATP7A* zurückzuführen. Das Protein transportiert Kupfer in der Plazenta, dem Magen-Darm-Trakt und über die Blut-Hirn-Schranke. Auswirkungen dieses Gendefektes zeigen sich in Wachstumsstörungen und schweren neurodegenerativen Schäden in der frühen Kindheit. Bei den männlichen Patienten sind unter anderem eine fehlende Pigmentierung, abnormale Haarstrukturen (*pili torti*) und Knochendysplasien zu beobachten, was auf eine fehlerhafte Aktivität von Kupferenzymen zurückzuführen ist (Schäfer und Gitlin, 1999). Bei der autosomal rezessiv vererbten Wilson-Krankheit, die durch Mutationen in dem auf Chromosom 13q14.3 lokalisierten *ATP7B*-Gen hervorgerufen wird, kommt es zu einer Kupferansammlung in der Leber. Die Krankheit äußert sich durch das Auftreten von Hepatitis und Leberzirrhose (Bull *et al.*, 1993). Eine spätere Akkumulation des Kupfers im Gehirn führt zu motorischen Störungen.

1.2.5.2 Typ II ATPasen

Die Klasse der Typ II ATPasen wird von elektrogenen Ionen-Pumpen gebildet, welche für die Generierung und Aufrechterhaltung von Membranpotenzialen zuständig sind. Sie werden in vier Subgruppen unterteilt. Die Gruppe IIA wird von den sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen gebildet, während die Gruppe IIB durch Ca^{2+} -ATPasen der Plasmamembran definiert wird. Zur Gruppe IIC gehören die Na^+/K^+ - sowie die im Magen exprimierten H^+/K^+ -ATPasen. Die Gruppe IID wird von Na^+ -ATPasen gebildet.

Durch einen Funktionsverlust der Typ-IIA ATPasen wird cytoplasmatisches Ca^{2+} nicht mehr vollständig in das ER zurückgepumpt und es können dadurch Störungen in Ca^{2+} -abhängigen

Signalwegen auftreten. Beispiele humaner Erkrankungen sind das autosomal-dominant vererbte Darier-White-Syndrom, bei dem es durch Mutationen in *ATP2A2* zu Störungen in den Epidermiszellen kommt (Sakuntabhai *et al.*, 1999), und die Brody-Myopathie, bei der die Funktion der Skelettmuskulatur durch Mutationen in *ATP2A1* beeinträchtigt ist (Odermatt *et al.*, 1996). Die Hailey-Hailey-Krankheit ist eine autosomal-dominant vererbte Hauterkrankung, welche auf Mutationen des ebenfalls für eine Ca^{2+} -ATPase codierenden Gens *ATP2C1* zurückzuführen ist (Hu *et al.*, 2000, Sudbrak *et al.*, 2000, Dobson-Stone *et al.*, 2002).

1.2.5.3 Typ III ATPasen

Typ III ATPasen sind in zwei Subgruppen unterteilt. Die Gruppe IIIA besteht hauptsächlich aus Protonenpumpen der Plasmamembran von Pflanzen und Pilzen. Die Gruppe IIIB umfasst bakterielle Mg^{2+} -ATPasen.

1.2.5.4 Typ IV ATPasen

Die zur Gruppe IV zählenden ATPasen wurden bis dato ausschließlich in Eukaryoten nachgewiesen, stellen dort aber die größte Gruppe an P-Typ ATPasen dar (Muthusamy *et al.*, 2009). Die so genannten Phospholipid-Translokasen (Flippasen) sind vermutlich durch das Pumpen von Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) auf die cytosolische Seite der Lipiddoppelschicht für die Generierung und den Erhalt ihrer Asymmetrie verantwortlich (Tang *et al.*, 1996). Mutationen in der Typ IV ATPase *ATP8B1* auf Chromosom 18q21 sind für die familiäre Cholestase verantwortlich. Es kommt bei dieser Krankheit zu einem Gallenstau in der Leber, durch den diese schwer geschädigt wird (Bull *et al.*, 1998).

1.2.5.5 Typ V ATPasen

Bei den Typ V ATPasen handelt es sich wahrscheinlich um Ionenpumpen, deren Substratspezifität und biologische Rolle bis dato jedoch nicht geklärt sind. Sie sind eng mit den Schwermetall-transportierenden Typ I ATPasen verwandt und konnten bisher nur in Eukaryoten nachgewiesen werden. Aufgrund neuester und umfassender phylogenetischer Analysen wurde die Gruppe der Typ V ATPasen in die zwei Subgruppen P_{5A} und P_{5B}

unterteilt (Møller *et al.*, 2008). Diese Untergliederung wurde anhand einer kurzen Motivsequenz in der vierten Transmembranomäne, welche in der P_{2A} Ca²⁺-ATPase aus den Aminosäuren PEGLP besteht und maßgeblich an der Bildung einer Ca²⁺-Bindestelle beteiligt ist, vorgenommen (Møller *et al.*, 2008). Die P_{5A}-ATPasen zeichnen sich durch das Motiv PP(D/E)LPXE aus und wurden in allen untersuchten Eukaryoten gefunden. Die P_{5B} ATPasen hingegen fehlten in drei eukaryotischen Linien, den Excavata, Entamoeba und Landpflanzen (Møller *et al.*, 2008). In höheren Eukaryoten, wie auch dem Menschen, wurden bis zu vier verschiedene P_{5B} ATPasen gefunden. Das Motiv PP(A/V)LPAX zeichnet den Subtyp der P_{5B} ATPasen aus, wobei X für einen hydrophoben Aminosäurerest steht, und weist durch den Austausch von zwei negativ geladenen Aminosäuren im P_{5A}-Motiv (blau gekennzeichnet) gegen zwei hydrophobe Aminosäuren im P_{5B}-Motiv (rot gekennzeichnet) laut Møller *et al.* möglicherweise auf eine unterschiedliche Substratspezifität hin.

Die bisher am besten charakterisierte Typ V P-Typ ATPase ist das Hefe-stämmige Protein Spf1, welches zur Subgruppe A gehört. Es wurde im Zusammenhang mit dem *salt mediated killer toxin* (SMKT) beschrieben, gegen das Δ *spf1*-Mutanten eine Resistenz aufweisen (Suzuki und Shimma, 1999). Das Spf1 Protein ist in der ER-Membran lokalisiert (Cronin *et al.*, 2002) und spielt bei der Regulation der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) eine Rolle (Cronin *et al.*, 2000). Zudem führt der Funktionsverlust des Spf1-Proteins zu einer Hypoglykosylierung von Invertase und zu einer Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR) (Vashist *et al.*, 2002). Andere Studien lassen vermuten, dass Spf1 über einen Einfluss auf die Ionen-Homöostase im ER den Transport von Proteinen kontrolliert (Ando und Suzuki, 2005).

Weitere Untersuchungen wurden in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*, welche drei putative Typ V P-Typ ATPasen besitzt, durchgeführt. Die zunächst in die Gruppe der Typ IV P-Typ ATPasen eingeordnete ATPase Cta4 ist wie das Spf1 Protein, mit dem es zu 49 % identisch ist und eine Ähnlichkeit von 69 % besitzt, in der ER-Membran lokalisiert und spielt ebenfalls eine Rolle in der Ca²⁺-Homöostase der Zelle (Façanha *et al.*, 2002). Cta5 ist unter Abwesenheit der beiden Typ II P-Typ ATPasen Pmc1 und Pmr1 essentiell für die Ca²⁺- und Mn²⁺-Homöostase von *S. pombe* (Furune *et al.*, 2008).

Typ V P-Typ ATPasen scheinen somit durch die Regulierung der Ionen-Homöostase in der Zelle an einer Reihe von Prozessen beteiligt zu sein.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen der humanen Typ V P-Typ ATPase *ATP13A2* verursachen KRS, eine Form des juvenilen Parkinsonismus. Über den möglichen molekularen Pathomechanismus, die Funktion von *Atp13a2* innerhalb der Zelle oder dessen Substratspezifität gibt es bisher jedoch keine fundierten Erkenntnisse. Der einzellige Eukaryot *S. cerevisiae* hat sich bereits sowohl als Modellorganismus für Untersuchungen des Pathomechanismus des ebenfalls Parkinsonismus verursachenden Proteins α -Synuclein als auch für Analysen zur Funktion von Typ V P-Typ ATPasen bewährt. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war daher anhand des Modellorganismus *S. cerevisiae* nähere Erkenntnisse über die Rolle der Typ V P-Typ ATPasen innerhalb der Zelle zu gewinnen. Somit könnte möglicherweise zur Aufklärung der molekularen Defekte, die dem Kufor-Rakeb Syndrom zugrunde liegen, beigetragen werden.

Zunächst sollte die subzelluläre Lokalisierung des *Atp13a2* Homolgs der Hefe, *Ypk9*, ermittelt werden, um die Beteiligung von *Ypk9* an den zellulären Prozessen eines Organells einzugrenzen und so erste Hinweise über dessen mögliche Funktion zu erhalten. Ausgehend von der ermittelten Lokalisation sollte der für *Ypk9* defiziente $\Delta ypk9$ -Stamm in Anbetracht möglicher Defekte bezüglich des Proteinabbaus oder des Erhalts mitochondrialer Funktionen untersucht werden, da diesen Prozessen bereits in anderen Formen des Parkinsonismus eine Rolle im Pathomechanismus zugeschrieben wurde.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob mögliche Defekte des $\Delta ypk9$ -Stammes durch das humane *Atp13a2* komplementiert werden können. So könnte zum einen eine mögliche gemeinsame Funktion der beiden Proteine aufgezeigt werden, zum anderen aber auch ein System etabliert werden, in dem Mutationen des humanen *ATP13A2* auf ihre Pathogenität hin getestet werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße und Plastikwaren wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.2 Chemikalien

Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysis“ und wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Freiburg)

Applichem (Darmstadt)

BD Biosciences (Heidelberg)

Difco Lab. (über Becton Dickinson) (Sparks - USA)

Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot)

Fluka (Taufkirchen)

Invitrogen (Karlsruhe)

Merck (Darmstadt)

New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Stratagene (La Jolla - USA)

WERNER BioAgents (Jena)

2.3 Allgemeine Lösungen

Für große Ansätze von Puffern und Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, destilliertes Wasser (A. dest) verwendet. Kleine Ansätze (bis 2 ml) wurden mit LiChrosolv (Wasser für Chromatographie) von Merck hergestellt. Wenn erforderlich wurde der pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt.

2.4 Kommerzielle Reagenziensysteme

BCA Protein Assay Reagent	Pierce
Basic Nucleofector® Kit for Primary Mammalian Fibroblasts	Amamax
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	ABI
GenElute™ Plasmid Mini-Prep Kit	Sigma
HiSpeed® Plasmid Midikit	Qiagen
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR-Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen

2.5 Verwendete Geräte

Tabelle 2-1: Geräteliste

	Modell	Hersteller
Autoklav	Typ 500	H+P Labortechnik
Brutschrank	Typ B6060	Heraus
Elektrophoresekammern	Sub-Cell GT	Bio-Rad
	X-Cell Sure Lock	Invitrogen
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa
Gel-Dokumentations-System	Chemidoc XRS	BioRad
Heiz-/Rührplatte	RCT basic	IKA
Inkubationsschüttler	Series 25	New Brunswick Scientific
Fluoreszenz-Mikroskop	Axioplan 2	Zeiss
Nukleinsäure-Meßgerät	Nanodrop: ND-1000	Spektrometer PeqLab
pH-Messgerät	Inolab pH Level 1	WTW
Pipettierhilfen	CellMateII	Matrix
	HandyStep	Brand
	Impact2	Matrix
	Research (Pro)	Eppendorf
Plattenlesegerät	Tecan Safire2	Tecan
Real-time PCR System	7500 Real Time PCR System (Taq-Man)	Applied Biosystems
Reinstwasseranlage	Milli-Q; Q-Gard® 2	Millipore
Sequenzierer	E-Pure	Barnstead
	ABI Prism 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems
Spannungsgeräte	PowerPac Basic	Bio-Rad
	Power Ease500	Invitrogen
Sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus
Thermocycler	iCycler	BioRad
	Gene Amp PCR System 9700	Perkin Elmer

Thermomixer	Compact	Eppendorf
Tischschüttler	KS 260 basic	IKA
Transfermodul	X-Cell II Blot-Modul	Invitrogen
Vortex	Reax Top	Heidolph
	MS1	IKA
Waagen	AccuLab Vicon	Sartorius
	1083	Kern
Wasserbad	WB22	Memmert
Zentrifugen	Multifuge1 S-R	Heraus
	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Centrifuge 5415C	Eppendorf
	Galaxy Mini	VWR

2.6 Datenbanken und Internetseiten

BioTools: wwwtacg v3.0	http://biotools.umassmed.edu/tacg/WWWtacg.php
CBS Prediction Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
Expasy	http://au.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl
Mobyle	http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py
NEB	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
P-TYPE ATPase DATABASE	http://www.patbase.kvl.dk/
PAT	http://bioserv.cbs.cnrs.fr/htbin-post/pat/new/wpat.pl
Saccharomyces Genome Database	http://www.yeastgenome.org/
UCSC – Genome Browser	http://genome.cse.ucsc.edu/index.html
VectorDesigner	https://vectordesigner.invitrogen.com/login.cfm

2.7 Software

Chromas Lite Version 2.0	Conor McCarthy
ClustalX Version 2.0.11	Conway Institute UCD Dublin
DNASTAR Lasergene SeqMan Pro	SeqMan.Inc
iCycler Version 4.006	Biorad
GeneAmp PCR System 9700 Version 2.01	ABI
MACAW Version 2.05 Win 32i	Schuler <i>et al.</i> , 1991
Microsoft Office 2003	Microsoft
Sequencing Analysis Version 3.7	ABI

Vector NTI Suite 9

Informax 2003Software

2.8 Verwendete Plasmide

Tabelle 2-2: Verwendete Transformationsvektoren (Vektorkarten teilweise im Anhang)

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
pRS316-GFP-ATG8	GFP-Atg8	Yoshinori Ohsumi
pDONR221-ccdB	Klonierungsvektor	Invitrogen
pTN9	pho8 Δ 60	Yoshinori Ohsumi
pAG303GAL-ccdB-GFP	Hefe-Expressionsvektor	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG305GAL-ccdB-GFP	Hefe-Expressionsvektor	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG426GPD-GFP-ccdB	Hefe-Expressionsvektor	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG426GPD-ccdB	Hefe-Expressionsvektor	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG426GPD-ccdB-GFP	Hefe-Expressionsvektor	Alberti <i>et al.</i> , 2007
YEplac195	Hefe-Expressionsvektor	Gietz <i>et al.</i> , 1988
YEplac181-ADH	Hefe-Expressionsvektor	Gietz <i>et al.</i> , 1988
pAG25	natMX4	Goldstein <i>et al.</i> , 1999
pYES2	Hefe-Expressionsvektor	Jerry Kaplan
pYES2-CCC1	Ccc1-His	Lin <i>et al.</i> , 2008
psM1052-GFP-YPK9	GFP-Ypk9	Rajini Rao
pcDNA3.1-V5	Mammalia-Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3.1-ATP13A2-V5	Atp13a2-V5	Ramirez <i>et al.</i> , 2006
pDONR221- α -syn-WT	Klonierungsvektor mit α -syn-WT	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pDONR221- α -syn-A53T	Klonierungsvektor mit α -syn-A53T	Alberti <i>et al.</i> , 2007
pAG303- α -syn-WT	α -syn-WT-GFP	diese Arbeit
pAG305- α -syn-WT	α -syn-WT-GFP	diese Arbeit
pAG303- α -syn-A53T	α -syn-A53T-GFP	diese Arbeit
pAG305- α -syn-A53T	α -syn-A53T-GFP	diese Arbeit
YEplac195-YPK9	Ypk9	diese Arbeit
YEplac195-YPK9-DN	Ypk9	diese Arbeit
pDONR221-ATP13A2	Klonierungsvektor mit ATP13A2	diese Arbeit
pAG426GPD-ATP13A2-GFP	Atp13a2-GFP	diese Arbeit

pAG426GPD-GFP-ATP13A2	GFP-Atp13a2	diese Arbeit
pAG426GPD-ATP13A2	Atp13a2	diese Arbeit
YEplac181-ADH-ATP13A2-V5	Atp13a2-V5	diese Arbeit
pDONR221-MAM3	Klonierungsvektor mit MAM3	diese Arbeit
pAG426GPD-GFP-MAM3	GFP-Mam3	diese Arbeit
pDONR221-PMR1	Klonierungsvektor mit PMR1	diese Arbeit
pAG426GPD-GFP-PMR1	GFP-Pmr1	diese Arbeit
pDONR221-YPK9	Klonierungsvektor mit YPK9	diese Arbeit
pAG426GPD-YPK9-GFP	Ypk9-GFP	diese Arbeit

2.9 Grundlegende molekulargenetische Methoden

2.9.1 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR ist eine Methode zur *in-vitro*-Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten, durch enzymatische Vervielfältigung. Neben thermostabilen Polymerasen werden dNTPs und spezifische Primer benötigt. Zur Generierung der Primer muss die Sequenz der flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden Fragments bekannt sein. Die Primer werden so gewählt, dass sie jeweils komplementär homolog zum *sense*-Strang des einen Endes und zum *antisense*-Strang des anderen Endes des zu amplifizierenden Bereichs sind.

Die PCR ist in drei verschiedene Phasen unterteilt, denen unterschiedliche Temperaturen zugrunde liegen.

In der ersten Phase erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge bei einer Temperatur von 90 bis 97°C. Durch die hohe Temperatur lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Nukleotiden. Dabei werden zunächst AT-reiche Abschnitte „aufgeschmolzen“, anschließend erfolgt die Dissoziation der restlichen Bereiche. Die Paarung zwischen Adenin und Thymin ist durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen gekennzeichnet. Bei der Paarung von Guanin und Cytosin werden drei Wasserstoffbrückenbindungen gebildet, sie ist somit stabiler. Die Schmelztemperatur der DNA, also die Temperatur bei der die Hälfte der DNA-Doppelstränge in denaturierter Form vorliegt, ist von mehreren Parametern abhängig. Bei einem hohen GC-Gehalt der DNA, bei ansteigendem Salzgehalt des Puffers oder bei zunehmender Länge des DNA-Stranges, erhöht sich die Schmelztemperatur.

Die zweite Phase dient der Anlagerung der Primer an die komplementären Bereiche der DNA-Einzelstränge (*Annealing*). Hierzu wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass die Schmelztemperatur der Oligonukleotide um 2 bis 5°C unterschritten wird. Die Schmelztemperatur (T_m) für Primer mit einer Länge bis zu 25 bp errechnet sich wie folgt:

$$T_m = 4^\circ\text{C} * (\text{C}+\text{G}) + 2^\circ\text{C} * (\text{A}+\text{T})$$

Eine zu hohe *Annealing*-Temperatur resultiert meist in einer Verringerung der Ausbeute, gleichzeitig aber auch in einer Erhöhung der Spezifität. Niedrigere *Annealing*-Temperaturen hingegen erhöhen die Ausbeute, verringern aber die Spezifität der Primerbindung, was zu unspezifischen Produkten führen kann.

In der dritten Phase erfolgt die DNA-Synthese durch die Polymerase. Die einzelnen Nukleotide werden am 3`-Ende an die freie OH-Gruppe des Primer angefügt, wobei die zu wählende Temperatur vom Optimum der verwendeten Polymerase abhängig ist. Die Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C und eine Elongationsrate von ca. 1 kb/min. Geringere Elongationsraten werden von der AccuTaq-Polymerase mit 800 Nukleotiden pro Minute und einer optimalen Temperatur von 68°C, und der Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) mit 0,6 kb/min und einer optimalen Temperatur von 72°C erreicht. Demnach ist die zu wählende Extensionszeit von der Elongationszeit der jeweiligen Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängig. Sie lag in der Regel zwischen zwei und sechs Minuten.

Durch eine 25- bis 40-fache Wiederholung der drei Phasen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Eine längere Denaturierungszeit vor dem ersten Zyklus soll gewährleisten, dass die DNA-Doppelstränge komplett aufgeschmolzen werden. Durch eine verlängerte Extensionszeit am Ende des letzten Zyklus soll der Polymerase ermöglicht werden alle Produkte vollständig zu amplifizieren. Zur Optimierung der PCR kann DMSO (1 bis 5 %) zu dem Reaktionsansatz gegeben werden, wodurch die Schmelztemperatur der DNA-Doppelstränge herabsetzt wird.

Die Taq-Polymerase besitzt im Gegensatz zu der AccuTaq-Polymerase und der Pfu-Polymerase keine Korrekturlesefunktion (proof reading), bei der der Einbau „falscher“ Nukleotide durch eine 3`-5`Exonuklease korrigiert wird. Hier ist mit einer höheren Fehlerrate zu rechnen.

2.9.2 Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs)

Die Stammlösungen der dNTPs enthielten jeweils 100 mM dNTP und wurden von den Firmen NEB und Fermentas bezogen. Alle Arbeitslösungen wurden auf 10 mM verdünnt.

2.9.3 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martensried) hergestellt und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Die Oligonukleotide wurden in steril-filtrierte TE⁴-Puffer gelöst, so dass die Stammlösung eine Konzentration von 100 pmol/μl hatte. Für die Gebrauchslösungen wurden 1:10 Verdünnungen der Stammlösungen in TE⁴-Puffer angefertigt. Die Lagerung der Primerlösungen erfolgte bei -20°C.

2.9.3.1 Primerdesign

Die kurzen synthetischen Oligonukleotide dienen der Polymerase bei der PCR als Startpunkt der Strangsynthese. Die Polymerase benötigt das freie 3'-OH-Ende des Primers zum Anbau der freien Nukleotide.

Für die Generierung der Primer werden die flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden Fragments nach geeigneten Sequenzen abgesucht. Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen, die die Primerbindung beeinträchtigen, und unspezifischen Primerbindungen sollten einige Kriterien bei dem Design der Oligonukleotide beachtet werden:

- Länge: 18-24 bp
- gleichmäßige Verteilung aller vier Basen
- GC-Gehalt: 50 bis 60 %
- keine repetitiven Sequenzen
- maximal drei aufeinander folgende gleiche Basen
- letzte und vorletzte Base des 3'-Endes: G oder C

2.9.4 PCR-Reaktionsansätze

Der Standard-PCR-Reaktionsansatz mit der AccuTaq-Polymerase hatte ein Volumen von 25 μ l. Er wurde auf Eis pipettiert und enthielt folgende Komponenten:

	Mengenangabe	Endkonzentration
Template-DNA	0,5 μ l	1,75 ng
F-Primer [10 pmol/ μ l]	1 μ l	0,2 pmol/ μ l
R-Primer [10 pmol/ μ l]	1 μ l	0,2 pmol/ μ l
dNTP [10 mM]	1 μ l	0,2 mM
Puffer (10X)	2,5 μ l	1X
AccuTaq [5U/ μ l]	0,25 μ l	1,75 U
Wasser	ad 25 μ l	

2.9.5 PCR-Temperaturprofile

2.9.5.1 2-Schritt-PCR (2-step-PCR)

Bei der 2-step-PCR erfolgt die Primer-Hybridisierung bei zwei unterschiedlichen Temperaturen. Zunächst wird eine höhere Temperatur für die *Annealing*-Phase gewählt (15 Zyklen). Das Prinzip dieses Schrittes besteht darin, dass die Primerbindung und somit auch die DNA Synthese, sehr spezifisch ist. Die zweite *Annealing*-Temperatur wird um etwa 2 °C niedriger gewählt (25 Zyklen), wobei erreicht wird, dass sich die Ausbeute des amplifizierten Fragmentes erhöht.

Die folgende Tabelle Tabelle 2-3 zeigt das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Standard-2-step-PCR-Temperaturprofil für die AccuTaq-Polymerase mit ihrer optimalen Polymerisierungstemperatur.

Tabelle 2-3: 2-step-PCR-Temperaturprofil

	Temperatur [°C]	Dauer in [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	0,5	15
<i>Annealing</i>	66	0,5	
Polymerisierung	68	3	
Denaturierung	95	0,5	20
<i>Annealing</i>	64	0,5	
Polymerisierung	68	3	
Finale Polymerisierung	68	6	1
Reaktionsende	4	∞	1

2.9.5.2 Splicing by overlap extension-PCR (SOE-PCR)

Die SOE-PCR wird zur gezielten Einführung von Mutationen in bekannte DNA Abschnitte verwendet. Bei dieser Technik werden vier verschiedene Primer benötigt: ein *forward*- sowie ein *reverse*-Primer im Bereich der zu mutagenisierenden Sequenz, die die einzuführende Mutation enthalten (innere Primer), und einen *forward*- sowie einen *reverse*-Primer im 5'- bzw. im 3'-Bereich der zu mutagenisierenden Sequenz (äußere Primer). Zunächst werden in zwei getrennten PCR-Ansätzen die sich überlappenden 3'- und die 5'- Hälften, der durch die äußeren Primer begrenzten Zielsequenz, mit je einem inneren und einem äußeren Primer amplifiziert. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte über die Agarose-Gel-Elektrophorese wurden sie in einer Verdünnung von 1:200 zusammen mit den äußeren Primern in eine finale PCR eingesetzt. Bei der Renaturierung während der *Annealing*-Phase kommt es zur Hybridisierung der beiden sich überlappenden PCR-Produkte, die 3' Enden werden verlängert und es entsteht ein Doppelstrang, der die Mutation enthält. Dieser kann durch weitere Zyklen vervielfältigt werden. In Abbildung 2-1 ist das Prinzip der SOE-PCR dargestellt.

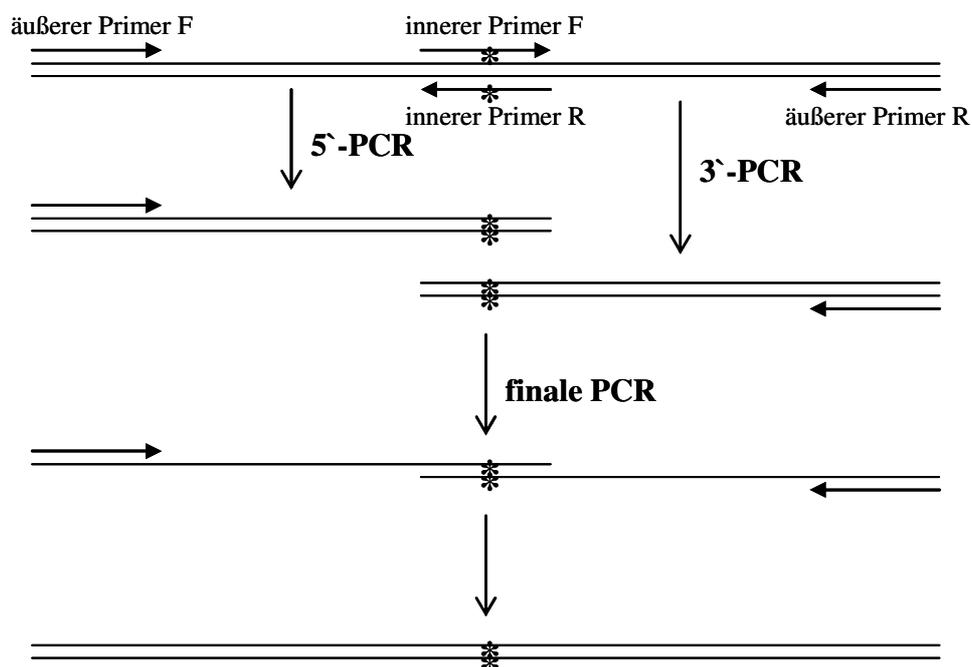


Abbildung 2-1: Darstellung des Prinzips der SOE-PCR. Zunächst erfolgt die Amplifikation der 5'- und 3'-Hälften mit jeweils einem inneren und einem äußeren Primer in getrennten Reaktionen. Die einzuführende Mutation ist mit einem Stern (*) gekennzeichnet. In der finalen PCR hybridisieren die sich überlappenden 5'- und 3'-Hälfte und werden in 3'-Richtung aufgefüllt. Anschließend erfolgt die Vervielfältigung mittels der beiden äußeren Primer.

2.9.6 Quantitative *Real-Time* PCR

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge des *ATP13A2*-Gens wurde das Quantitect™ SYBR® Green Kit for One-step PCR verwendet und die quantitative *Real-Time*-PCR durchgeführt. SYBR-Green ist ein Cyan-Fluoreszenzfarbstoff der sich in doppelsträngige DNA einlagern kann. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei 522 nm. Diese Lichtemissionen werden nach jedem Zyklus der quantitativen *Real-Time*-PCR mittels eines Fluorimeters gemessen, wobei die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase proportional zur Menge an doppelsträngigem PCR-Produkt ist. Das Quantitect™ SYBR® Green Kit for One-step PCR ermöglicht die Umschreibung von RNA in doppelsträngige cDNA sowie die Amplifikation mit Einbau des SYBR-Green-Farbstoffes zur Quantifizierung in einer Reaktion.

Primer-Mix für *ATP13A2* - Quantitect® Primer Assay-Hs_ATP13A2_1_SG (Qiagen)

Quantitativer *Real-Time*-PCR-Ansatz

H ₂ O (RNase frei)	5,35 µl
Quantitect-RT-SYBR Green Mix (2 X)	10 µl
Primer-Mix [10 pmol/µl]	2 µl
RNA (4 ng/µl)	2,5 µl
Quantitect-RT-Enzym-Mix	0,15 µl

Die Messung erfolgte im Real-Time PCR System 7500 (TaqMan, Applied Biosystems) über ein Geräte-internes Fluorimeter. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte jeweils in der exponentiellen Phase, der Extension vor dem nächsten Denaturierungsschritt.

Tabelle 2-4: Quantitative *Real-Time*-PCR -Temperaturprofil

	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Reverse Transkription	50	30 min	1
DNA-Polymerase Aktivierung	95	15 min	1
Denaturierung	94	15 sec	40
<i>Annealing</i>	63	30 sec	
Polymerisierung	72	35 sec	

2.9.7 Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der Agarose-Gel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Durch die negative Ladung der Phosphatgruppen des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrates der DNA erfolgt die Auftrennung in Richtung der Anode. Kleinere Fragmente bewegen sich dabei schneller durch die vernetzten Strukturen des Agarose-Gels als größere. Die Wandergeschwindigkeit der einzelnen Fragmente ist neben der Molekülgröße auch von der Konformation der DNA abhängig. So gelangen superspiralisierte zirkuläre DNA-Moleküle durch ihre kompaktere Struktur schneller durch das Agarose-Gel als entspannte zirkuläre DNA-Moleküle gleicher Größe.

Die Wandergeschwindigkeit ist auch von der im Gel enthaltenen Menge an Agarose abhängig. Für Fragmente mit einer Größe zwischen 0,1 kb bis 2 kb werden Gele mit einem Agaroseanteil von 2 % verwendet, wohingegen größere DNA-Moleküle wie z. B. Plasmide in 1 % igen Gelen aufgetrennt wurden.

Zur Visualisierung der im Gel aufgetrennten DNA wird Ethidiumbromid (EtBr) verwendet. Einzelne EtBr-Moleküle können aufgrund ihrer planaren Struktur in die helikale Struktur der DNA interkalieren (bis zu 3 Moleküle je 10 Basen). Dadurch kommt es zu einem veränderten Verhalten bei der Anregung durch UV-Licht. Die Fluoreszenz ist im Gegensatz zu freien EtBr-Molekülen stark erhöht, so dass die DNA unter UV-Licht fluoresziert. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorhandenen DNA-Menge. Zur Größenbestimmung und groben Quantifizierung der zu untersuchenden DNA dient ein DNA-Größenstandard, ein Gemisch aus DNA-Strängen unterschiedlich definierter Längen und Mengen. In der Regel werden dazu 20 µl des Standards neben den zu bestimmenden Proben aufgetragen.

Zur Längenbestimmung wird die Probe in einem Verhältnis von 1:10 mit Gelladepuffer versetzt, auf ein Gel aufgetragen und bei 150 V ca. 30 bis 60 Minuten aufgetrennt.

TAE (1X)

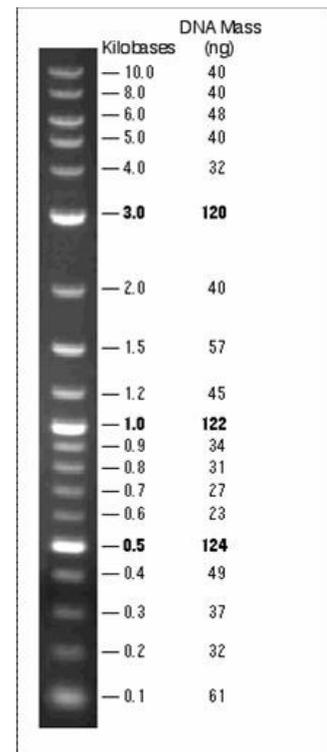
500 ml TAE (10X; kommerziell)
ad 5 l A. dest.

Agarose-Gel

4-8 g Agarose
ad 400 ml TAE (1X)
in der Mikrowelle aufkochen, unter Rühren auf
ca. 50-60°C abkühlen
30 µl Ethidiumbromid
zugeben und in den Gelträger gießen

Ladepuffer (pH 8)	10 ml Formamid
	10 mg Xylencyanol
	10 mg Bromophenolblau
	0,5 M EDTA
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
	Lagerung bei 4°C; lichtgeschützt
2-Log DNA-Größenstandard	50 µl Marker [1000µg/ml] (NEB)
	850 µl 1X TAE
	100 µl Ladepuffer

Abbildung 2-2: Verwendeter 2-log DNA-Standard zur Längen- oder Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäure. Diese DNA-Mengen pro Bande gelten bei 1 µg/20 µl des eingesetzten Markers. Visualisierung durch EtBr auf einem 2 % TAE-Agarose-Gel.



2.9.7.1 Aufreinigung der DNA aus dem Agarose-Gel

Nach erfolgreicher Amplifikation von DNA Fragmenten oder nach einem Restriktionsverdau von Plasmiden und Kontrolle mittels Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die Proben für die weitere Verwendung aus dem Gel aufgereinigt. Hierzu wurden die gewünschten DNA-Banden zunächst mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und dann mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt

2.9.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop

Die Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 (PeqLab).

DNA hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, RNA bei 230 nm und Proteine sowie Salze bei 280 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen proportional zur Absorption bei 260 nm, daraus ergibt sich folgende Formel:

$$c(\text{DNA}) \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = OD_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure. Proben mit Werten zwischen 1,7 und 1,9 gelten als relativ rein, abweichende niedrigere Werte weisen dagegen auf eine Verunreinigung der Probe durch Proteine hin.

2.9.9 Sequenzierung von PCR-Fragmenten und Plasmiden

Zur Sequenzbestimmung von PCR-Produkten und ligierten Fragmenten in Expressionsvektoren wurden die entsprechenden DNA-Proben sequenziert.

Das Prinzip dieser Methode ist die Erzeugung von Kettenabbrüchen während einer enzymatischen DNA-Synthese in Gegenwart basenspezifischer dNTPs und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs). Der Einbau der ddNTPs verursacht einen Abbruch des wachsenden DNA-Strangs, da durch ihre Hydroxylgruppe am C2-Atom keine weiteren Phosphodiesterbindungen gebildet werden können und somit keine weiteren Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut werden können.

Eine DNA-Polymerase amplifiziert den zu sequenzierenden DNA-Strang mit einem spezifischen Primer nach einem ähnlichen Prinzip wie bei der PCR. Die Konkurrenz zwischen den ddNTPs und ihren dNTP-Analoga beim Einbau in die wachsende DNA-Kette führt zu einem Gemisch von Fragmenten verschiedener Länge. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt über eine Kapillare im Sequenziergerät. Durch einen Laser werden die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs angeregt und deren Fluoreszenz detektiert. Mittels eines Computerprogramms werden die Ergebnisse verarbeitet und in die entsprechende DNA-Sequenz übersetzt.

Im Folgenden sind der Sequenzier-PCR-Ansatz und das entsprechende Sequenzier-Programm angegeben:

	Mengenangabe	Endkonzentration
DNA	1-13 μ l	50-60 ng
Big Dye	2,5 μ l	
Puffer (5X)	4 μ l	1X
Primer [10 pmol/μl]	0,5 μ l	[5 pmol/ μ l]
Wasser	ad 20 μ l	

Tabelle 2-5: Temperaturprofil für eine Sequenzierreaktion

	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Prä-Denaturierung	94	5	1
Denaturierung	96	0,2	25
Primer-Hybridisierung	50	0,12	
Polymerisierung	60	4	
finale Polymerisierung	60	20	1
Reaktionsende	10	∞	

Die Sequenzierungen wurden vom Sequenzierservice des Cologne Center of Genomics (CCG; AG Nürnberg), Institut für Genetik, Universität zu Köln, durchgeführt.

2.10 Klonierung

Bei der Klonierung werden beliebige DNA-Fragmente in bakterielle Vektoren integriert und diese anschließend von Bakterien-Zellen aufgenommen (transformiert). Als Vektoren werden kommerziell veränderte bakterielle Plasmide verwendet, in die die DNA meist über multiple Klonierungsstellen ligiert wird und die über Selektionsmarker wie z. B. Ampicillinresistenz verfügen. Somit können in antibiotikahaltigen Medien Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid gezielt kultiviert werden. Die zirkulären Vektoren nehmen sogenannte coiled-coiled Strukturen an. Diese sind wesentlich kompakter als linearisierte DNA und werden somit besser in Bakterien, wie z. B. *E. coli* aufgenommen und als eigenständige Einheit bei der Zellteilung weiter vererbt. Das Plasmid wird beim Wachstum der transformierten Bakterien ebenfalls vervielfältigt und kann anschließend für Funktionsanalysen isoliert werden.

2.10.1 *Escherichia coli*-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten *E. coli*-Stämme verwendet.

Tabelle 2-6: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
ccdB Survival	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> <i>fhuA::IS2</i>	Invitrogen

2.10.2 Kultivierung und Transformation von *E. coli*-Stämmen

Für die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein wenig Zellmaterial einer entsprechenden Kolonie in ein Reaktionsgefäß mit LB-Medium überführt. Ggf. wurde zur Selektion Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

LB-Medium (pH 7,0)

1,0 % Trypton
0,5 % Hefe-Extrakt
1,0 % NaCl → Autoklavieren

vor dem Animpfen der Bakterienkultur wurde 1 μ l/ml einer Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) bzw. 4 μ l/ml einer Kanamycin-Stammlösung (10 mg/ml) zugeben.

LB-Nährboden (pH 7,0)

siehe Protokoll für LB-Medium
+ 1,5 % (w/v) Agar → Autoklavieren

Nach dem Abkühlen auf 55°C wurden 1 μ l/ml einer Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) bzw. 4 μ l/ml einer Kanamycin-Stammlösung (10 mg/ml) zugeben. Anschließend wurde das Medium dünnsschichtig in

sterile Kulturschalen (10 cm) gegossen und bei 4°C gelagert.

Ampicillin-Stammlösung

100 mg Ampicillin
ad 1ml A. dest.
steril filtriert; Lagerung bei -20°C

Kanamycin-Stammlösung

10 mg Kanamycin
ad 1 ml A. dest.
steril filtriert; Lagerung bei -20°C

2.10.3 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Bakterien, die für die Transformation eingesetzt werden, werden mit bestimmten Puffern behandelt, um die Effizienz der DNA Aufnahme zu erhöhen.

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden zunächst 5 ml LB mit 10 µl bereits kompetenter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 ml LB-Medium mit der Über-Nacht-Kultur auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 angeimpft und für drei bis vier Stunden bei 37° im Schüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden dann für 15 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 6000 rpm und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml kaltem Tfb I-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 6000 rpm und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert: Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml kaltem Tfb II Puffer resuspendiert und in 100 µl Portionen aliquotiert. Bis zum Gebrauch werden die chemisch kompetenten Bakterien bei -70°C gelagert.

Tfb1-Puffer (pH 5,8)

100 mM Rubidiumchlorid
50 mM Manganchlorid
30 mM Kaliumacetat
10 mM Calciumchlorid
15 % Glycerin

Tfb2-Puffer (pH 6,8)

10 mM MOPS
10 mM Rubidiumchlorid
75 mM Calciumchlorid
15 % Glycerin
steril filtriert, Lagerung bei 4°C

2.10.4 TA-Klonierung in den pcDNA3.1/V5His(-) Expressionsvektor

Für die TOPO ®-Klonierung in den pcDNA3.1/V5His(-) Expressionsvektor wurde zunächst das zu klonierende Fragment mittels PCR amplifiziert, im Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Amplifikate, die nicht durch eine Polymerase amplifiziert wurden und somit keinen 3`-A-Überhänge besitzen, mussten nach der Aufreinigung für 30 Minuten in dem folgenden Reaktionsansatz bei 72°C inkubiert werden:

	Mengenangabe	Endkonzentration
Taq-Polymerase [5U/µl]	0,5 µl	2,5U
dATPs [10 pmol/µl]	2 µl	0,25 pmol/µl
MgCl [50 mM]	1,2 µl	1,5 mM
Taq-Puffer (10X)	4 µl	1X
Aufgereinigtes PCR-Produkt	15-30 µl	
H2O	ad 40 µl	

Die Taq-Polymerase generiert dabei die für die TA-Klonierung nötigen 3`-A-Überhänge.

Für die Ligation wurden dann 4 µl des obigen Ansatzes mit 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor gemischt und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

2.10.5 Klonierung über Restriktionsendonuclease-Schnittstellen

Restriktionsendonukleasen dienen Bakterien zum Schutz gegen fremde DNA, indem sie fremde DNA sequenzspezifisch zerteilen (verdauen). Die Bakterien-DNA selbst ist dabei gegen den Abbau durch eigene Restriktionsendonukleasen aufgrund der Methylierung einzelner Nukleotide in der Erkennungssequenz geschützt. Restriktionsendonukleasen erkennen vier bis acht Basenpaare einer meist palindromischen Sequenz und hydrolysieren den Doppelstrang durch Lösen der Phosphodiesterbindungen. Bei der Hydrolyse können entweder Fragmente mit bündigen Enden (*blunt ends*) oder mit 3`- oder 5`-Überhängen (*sticky ends*) entstehen. Letztere sind insofern von Vorteil, dass der Überhang ein gezieltes Zusammenfügen bestimmter Restriktionsfragmente durch eine DNA-Ligase erleichtern kann. Die DNA-Ligase knüpft Phosphodiesterbindungen zwischen einzelnen DNA-Fragmenten und ligiert diese somit.

2.10.6 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für den Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen müssen optimale Bedingungen für das jeweils verwendete Enzym geschaffen werden. Inkubationstemperatur und Salzgehalt des Reaktionsansatzes sind dem Enzym nach Herstellerangaben anzupassen. Die entsprechenden Puffer werden vom Hersteller mitgeliefert. Für einen Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen wurde ein Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität zeigten.

Ein Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau könnte wie folgt aussehen:

	Mengenangabe	Endkonzentration
DNA	1-2 μ g	
Enzym [5-20U/ μ l]	0,25-1 μ l	5-10U
BSA (10X)	3 μ l	1X
Puffer (10X)	3 μ l	1X
H₂O	ad 30 μ l	

Der Verdau wurde für zwei bis fünf Stunden bzw. über Nacht bei der für das Enzym optimalen Temperatur, i. d. R. 37°C, im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, die benötigten Fragmente ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.10.7 Dephosphorylierung

Um die Ligation eines linearisierten Vektors ohne *Insert* (Re-Ligation) zu verhindern, wird dem Restriktionsverdau-Ansatz alkalische Phosphatase (AP) und ein entsprechender Puffer zugesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert die 5`-Enden des linearisierten Vektors und verhindert somit die Re-Ligation, da die Ligase auf die Phosphorylierung angewiesen ist. Zum Restriktionsansatz mit einem Volumen von 30 μ l wurden 1,5 μ l AP (1,5U) und 3,5 μ l Puffer (10X) gegeben. Anschließend wurde die verdaute und dephosphorylierte DNA auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und die benötigten Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt.

2.10.8 Ligation über Restriktionsendonuclease-Schnittstellen

Für die Ligation von Vektor und *Insert* wurde laut Vertreiber der Ligase ein Verhältnis von 1:1 bis 1:3 für eine *sticky-end*-Ligation eingesetzt, während für eine *blunt-end*-Ligation ein Verhältnis von 1:5 empfohlen wurde. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen angesetzt:

Vektor	4µl
Insert	5,5µl
Ligase	1µl
Puffer (10X)	2,5µl
H₂O	ad 25µl

Die Ligation erfolgte für vier bis sechs Stunden oder über Nacht bei 16°C.

2.10.9 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden 4 µl (TA-Klonierung) bzw. 8 µl (Klonierung über Restriktionsendonuklease-Schnittstellen) des Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen gegeben. Um ein bereits isoliertes und analysiertes Plasmid weiter zu vervielfältigen wurden Bakterien mit dieser Plasmid-DNA re-transformiert. Es wurden 20-40 ng Plasmid-DNA zu den kompetenten Zellen gegeben.. Diese wurden anschließend fünf bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationsphase erfolgte die Anlagerung der Fremd-DNA an die Bakterienzellmembran. Durch einen Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden wurde die Bakterienmembran so destabilisiert, dass die Aufnahme der DNA in die Wirtszelle erfolgen konnte. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 800 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Kultur für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als Nächstes wurden 100-200 µl der Kultur auf die bei 37°C vorgewärmten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium	2 % Bacto Trypton
	0,5 % Hefe-Extrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl

Ansatz autoklavieren und anschließend
10 mM MgCl₂
20 mM Glucose
zugeben, steril filtrieren

2.10.10 Glycerolstocks von transformierten Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von transformierten Bakterien werden Glycerolstammlösungen angelegt. Das Glycerin soll dabei die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens verhindern und somit das Intaktbleiben der Zellen gewährleisten. So können auch nach Monaten oder Jahren die entsprechenden Bakterien rekultiviert werden.

Für eine Aufbewahrung der Proben bei -20°C wurde eine Bakterien-Übernachtskultur mit Glycerol im Verhältnis 1:1 versetzt. Bei der Aufbewahrung bei -70°C im Verhältnis 1:3.

2.10.11 Das Gateway-System[®]

Das Gateway[®]-System der Firma Invitrogen nutzt das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ . Es beruht auf der Verwendung der λ -Rekombinase und deren entsprechenden Rekombinationsstellen (*attachment-sites*) und ermöglicht eine schnelle Klonierung von Genen und Genfragmenten unabhängig von Restriktionsschnittstellen. Zur Klonierung einzelner Gene in den Gateway[®] Donor-Vektor pDONR221 wurden diese laut Angaben des Herstellers mit Primern, welche die entsprechenden *attachment-sites* enthielten, amplifiziert. Die Rekombination der Gene in den Donor- bzw. anschließend in den Expressionsvektor erfolgte mit der Gateway[®] BP/LR Clonase[®] II nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen).

2.10.12 DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (Plasmid-Präparation)

Für die Kontrolle der transformierten Plasmide mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung oder für weitere Arbeiten mit den Plasmiden, wie z. B. Transfektion von Säugerzellen, musste die Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur isoliert werden. Dazu wurden 4 ml (Mini-Präparation) bzw. 100 ml (Midi-Präparation) Bakterienkultur verwendet und mittels kommerzieller Kits von Sigma (Mini-Präparation) für die Isolation von bis zu 40 μ g Plasmid, bzw. Qiagen (Midi-Präparation) für die Isolation von bis zu 400 μ g Plasmid, aufgearbeitet.

Das Prinzip dieser Kits beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Aufreinigung der Plasmid-DNA durch eine Silica-Gelmembran.

Die entsprechenden Protokolle sind den Angaben des Herstellers zu entnehmen.

2.10.13 Kontrollverdau isolierter Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzymen

Zur Kontrolle, ob das transformierte Plasmid auch das gewünschte *Insert* in der gewünschten Orientierung enthielt, wurde ein Kontrollverdau mittels Restriktionsenzymen durchgeführt. Dazu wurden ein oder mehrere Enzyme ausgewählt, die das Plasmid so verdaut haben, dass anhand der entstehenden Fragmente Rückschlüsse gezogen werden konnten, ob die Ligation des *Inserts* erfolgreich war. Dadurch ließ sich außerdem die Orientierung des *Inserts* überprüfen. Der Reaktionsansatz enthielt die bereits für einen Verdau aufgeführten Komponenten.

2.11 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.11.1 *S. cerevisiae*-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten *S. cerevisiae*-Stämme verwendet.

Tabelle 2-7: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
BY4741 (WT)	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	Euroscarf
$\Delta ypk9$	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; ypk9::kanMX4	Euroscarf
$\Delta atg1$	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; atg1::kanMX4;	Euroscarf
WT- <i>pho8Δ60</i>	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pho8 Δ 60	diese Arbeit
$\Delta ypk9$ - <i>pho8Δ60</i>	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; ypk9::kanMX4; pho8 Δ 60	diese Arbeit
$\Delta atg1$ - <i>pho8Δ60</i>	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; atg1::kanMX4; pho8 Δ 60	diese Arbeit

WT-Vektor	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pAG303; pAG305	diese Arbeit
WT- α -syn-WT	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pAG303- α -syn-WT; pAG305- α -syn-WT	diese Arbeit
WT- α -syn-A53T	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pAG303- α -syn- A53T; pAG305- α -syn-A53T	diese Arbeit
Δ ypk9-Vektor	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; ypk9::natMX4; pAG303; pAG305	diese Arbeit
Δ ypk9- α -syn-WT	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; ; ypk9::natMX4; pAG303- α -syn-WT; pAG305- α -syn-WT	diese Arbeit
Δ ypk9- α -syn-A53T	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; ypk9::natMX4; pAG303- α -syn-A53T; pAG305- α -syn-A53T	diese Arbeit
Δ ccc1	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; ccc1::kanMX4	Euroscarf
Δ ccc1 Δ ypk9	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; ccc1::kanMX4; ypk9::natMX4	diese Arbeit
Δ mam3	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; mam3::kanMX4	Euroscarf
Δ mam3 Δ ypk9	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; mam3::kanMX4; ypk9::natMX4	diese Arbeit
Δ pmr1	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pmr1::kanMX4	Euroscarf
Δ pmr1 Δ ypk9	BY4741; Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pmr1::kanMX4; ypk9::natMX4	diese Arbeit

2.11.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*-Stämmen

YPD-Medium

1 % Hefeextrakt

2 % Pepton

2 % Glukose

SD-Medium

0,67 % YNB (ohne Aminosäuren)

2 % Glukose

0,083 % Aminosäuremix

Aminosäuremix

2 g Adenin hemisulfate

2 g Arginin HCl

2 g Histidin HCl
2 g Isoleucin
2 g Leucin
2 g Lysin HCl
2 g Methionin
3 g Phenylalanin
2 g Serine
2 g Threonin
3 g Tryptophan
2 g Tyrosin
1,2 g Uracil
9 g Valin

SD(-N)-Medium

0,67 % YNB (ohne Aminosäuren)
2 % Glukose

2.11.3 Bestimmung der optischen Dichte von *S. cerevisiae* Kulturen

Die Zelldichte wurde mit einem Spektralphotometer (Eppendorf BioPhotometer plus) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Die Kulturen wurden soweit verdünnt, dass die gemessene OD₆₀₀ im linearen Bereich von 0,1 bis 1 lag. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei ca. 3×10^7 Zellen pro ml Kultur.

2.11.4 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Von einer *S. cerevisiae* Übernachtskultur wurden drei bis fünf ml bei RT für fünf Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert und das Pellet zwei Mal mit H₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und mit 3 µl lytischem Enzym versetzt. Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und dabei gelegentlich invertiert. Als nächstes folgte ein Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 14000 rpm und nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 200 µl Zellysepuffer aufgenommen. Nach einer zehn-minütigen Inkubation bei 65°C wurden 150 µl 5M KAc zugegeben und der Ansatz wurde für zehn Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde für drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand mit ein ml eiskaltem Ethanol (EtOH) oder Isopropanol gemischt und für weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer einminütigen

Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das Pellet mit 75 %igem EtOH gewaschen, bei RT getrocknet und in TE aufgenommen.

Resuspensionspuffer

50 mM Tris/HCl (pH 7,5)

25 mM EDTA

Lytisches Enzym

150 mg Lyticase

1 ml 50 % Glycerin

bei -20°C lagern

Zellysepuffer

0,2 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

0,01 M Tris/HCl (pH 7,5)

25 mM EDTA

2.11.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Mit einer *S. cerevisiae* Übernackkultur wurden 10-50 ml YPD Medium auf eine $OD_{600} \approx 0,2$ angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer $OD_{600} \approx 0,6-0,8$ bei 30°C inkubiert und anschließend bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach zwei- bis drei-maligem Waschen mit sterilem H₂O wurden die Zellen pelletiert und mit 360 µl Transformationsmix versetzt, wobei pro Transformationsansatz jeweils 5 ml der ursprünglichen Kultur verwendet wurden. Nach der Zugabe von 0,2-2 µg Plasmid DNA oder 10-20 µl PCR Produkt wurde der Ansatz auf dem Vortex gemischt und für 40 Minuten bei 42°C inkubiert. Es folgte das Pelletieren der Zellen für eine Minute bei 14000 rpm, eine Resuspension der Zellen in 1 ml H₂O und das Ausstreichen von 100-200 µl Zellsuspension auf einer entsprechenden Selektionsplatte. Die Platten wurden für zwei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert.

Transformationsmix

240 µl PEG 3500 50 % (w/v)

36 µl LiAc 1M

74 µl H₂O

10 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zuvor für fünf Minuten bei 95°C kochen, auf Eis abkühlen

2.11.6 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Für die Dauerhafte Lagerung von *S. cerevisiae* Zellen wurden Glycerolstocks angelegt, welche bei -80°C gelagert wurden. Dafür wurde mit einer sterilen Impföse etwas Zellmaterial von einer Hefeplatte genommen und in 30 %igem Glycerin resuspendiert.

2.11.7 Aufschluss von *S. cerevisiae* Zellen

Zur Präparation von *S. cerevisiae* Proteinen wurden 3 OD₆₀₀ Zellen einer Übernachtskultur bei 14000 rpm für eine Minute abzentrifugiert und nach einmaligem Waschen mit 1 mM EDTA in 200 µl 1M NaOH resuspendiert und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl 50 % Trichloressigsäure (TCA) wurde das Gemisch für mindestens zwei Stunden bei -20°C inkubiert und anschließend bei 4°C und 14000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm für 20 Minuten in 100 µl 5 % SDS resuspendiert. Nun folgte eine Messung der Proteinkonzentration mittels der BCA Methode und eine anschließende Zugabe von 4X SDS-Probenpuffer.

2.11.8 Aufschluss von *S. cerevisiae* Zellen mittels Glasperlen

10 OD₆₀₀ Zellen wurden aus einer Übernachtskultur entnommen, bei 14000 rpm für eine Minute abzentrifugiert und in 300 µl eiskaltem SHKCl mit 1X Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert. Es wurden 200 µl gekühlte Glasperlen zugegeben und das Gemisch wurde vier Mal für 30 Sekunden gevortext, wobei die Proben zwischendurch für jeweils mindestens 30 Sekunden auf Eis abgekühlt wurden. Anschließend wurden 400 µl eiskaltes SHKCl zugegeben und die Glasperlen wurden bei 3000 rpm für drei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für zehn Minuten bei 4°C und 1400 rpm zentrifugiert. Das Pellet, welches Membranproteine enthielt, wurde in 20 µl Ladepuffer resuspendiert. 100 µl des Überstandes wurden zur Fällung der verbleibenden löslichen Proteine mit 20 µl 72 %iger TCA versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 1400 rpm wurde das Pellett zwei Mal mit eiskaltem Aceton gewaschen, bei RT für kurze Zeit getrocknet und in 40 µl Ladepuffer aufgenommen.

SHKCl

0,6 M Sorbitol
50 mM HEPES
80 mM KCl

Ladepuffer

500 µl NuPage®SDS Ladepuffer (4X) Invitrogen
400 µl H₂O
100 µl Protease Inhibitor Cocktail (10X)

2.11.9 Wachstumstests

Um das Wachstum verschiedener Hefe-Stämme unter verschiedenen Bedingungen beobachten zu können wurden zwei verschiedene Wachstumstests angewendet.

2.11.9.1 Verdünnungsreihen auf Platten

Für die Analyse des Wachstums von Hefezellen auf Platten wurden die zu testenden Stämme in entsprechendem Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden nach Bestimmung der OD₆₀₀ sechs Verdünnungen im Verhältnis 1/5, beginnend mit 10⁷ Zellen/ml, angefertigt und jeweils 3,5 µl auf die entsprechenden Platten aufgetropft. Die Platten wurden bei den angegebenen Temperaturen für zwei bis fünf Tage inkubiert.

2.11.9.2 Flüssigkultur

Für die Beobachtungen des Wachstums von *Δypk9*-Zellen in flüssigem Medium wurden diese in YPD angeimpft und über Nacht bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal in sterilem H₂O gewaschen und das Pellet auf eine OD₆₀₀ von 10 verdünnt. 96-well-Platten welche 200 µl SC-Medium mit verschiedenen MnCl₂ Konzentrationen wurden mit 3,5 µl der Kultur pro well angeimpft. Die Platten wurden 24 bis 48 Stunden bei 30°C inkubiert und die OD₆₀₀ mit einem Plattenlesegerät gemessen (Tecan Safire2).

2.11.10 Gen-Deletion in *S. cerevisiae*

Die Gen-Deletion in *S. cerevisiae* erfolgte mittels homologer Rekombination durch die Integration einer natMX4-Kassette, welche eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin vermittelt, mit gleichzeitiger Deletion des *YPK9*-Gens (nach Wach *et al.*, 1994). Das Plasmid pAG25 (Goldstein *et al.*, 1999) diente dabei als Matrize für die Amplifikation der Deletions-Kassette mit den Primern YOR291wdel_F und YOR291wdel_R. Diese bestehen aus einem zu dem *YPK9*-Gen homologen Überhang von 40 bp und aus 20 bp,

welche homolog zur natMX4-Kassette sind und somit deren Amplifikation gewährleisten. Die so amplifizierte Deletionskassette, die von den zum *YPK9*-Gen homologen Sequenzen flankiert wird, wird in die Hefezellen transformiert und dort durch homologe Rekombination in den entsprechenden Locus integriert. Es erfolgte jeweils eine Verifizierung der Deletion mittels PCR.

2.11.11 Bestimmung der Autophagierate mit dem GFP-Atg8-Assay

Der GFP-Atg8-Assay beruht darauf, dass das GFP-Atg8 Fusionsprotein im Autophagosom in die Vakuole transportiert wird, wo es nach der Lyse des Autophagosoms degradiert wird. Da GFP jedoch relativ resistent gegen die Proteolyse in der Vakuole ist, bleibt es im Gegensatz zu dem Atg8-Protein erhalten und spiegelt somit den Grad an Autophagie wieder (Shintani und Klionsky, 2004). Für diesen Assay wurde das Plasmid pRS316-GFP-ATG8 freundlicherweise von Yoshinori Ohsumi *Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan*, zur Verfügung gestellt (Suzuki et al., 2001). Das Plasmid wurde in die Hefezellen transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Plasmids überprüft, SC-URA kultiviert und während der logarithmischen Wachstumsphase zwei- bis dreimal in SD(-N) gewaschen. Nach Induktion der Autophagie durch SD(-N)-Medium wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (60, 120 und 180 Minuten) Proben entnommen. Nach der Isolierung der Proteine erfolgte eine Westernblot-Analyse der Proteinlysate mittels eines α -GFP Antikörpers.

2.11.12 Bestimmung der Autophagierate von *S. cerevisiae* mit dem Pho8 Δ 60-Assay

Die Bestimmung der Autophagierate wurden an *S. cerevisiae* Stämmen durchgeführt, die eine Deletion im *PHO8*-Gen tragen, was zu einem Verlust von 60 Aminosäuren in der von *PHO8* codierten alkalischen Phosphatase (ALP) führt (Pho8 Δ 60). Durch die Deletion, die die N-terminale Transmembrandomäne des Proteins beinhaltet, verbleibt die sonst vakuoläre Phosphatase im Cytosol und kann so nicht durch das Abspalten des C-terminalen Propeptids in der Vakuole in seine enzymatisch aktive Form überführt werden. Pho8 Δ 60 kann jedoch über Autophagie in die Vakuole transportiert werden, was zu einer Abspaltung des Propeptids und zur enzymatischen Aktivität führt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase korreliert also mit der Rate der Autophagie und kann zu dessen Bestimmung herangezogen werden.

Die zu untersuchenden Pho8 Δ 60-Stämme wurden über Nacht in YPD- oder Selektionsmedium bei 30°C kultiviert und am nächsten Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Nach einem weiteren Wachstum von zwei bis fünf Stunden wurden die Zellen zwei Mal in SD(-N)-Medium gewaschen, zur Aktivierung der Autophagie in SD(-N)-Medium resuspendiert und für vier Stunden bei 30°C im Schüttler inkubiert. Vor der Inkubation, also zum Zeitpunkt 0, sowie nach einer, zwei und vier Stunden wurden jeweils 3-5 OD₆₀₀ Zellen entnommen, abzentrifugiert und nach der Abnahme des Überstandes bei -20°C gelagert.

Für den Enzym Test wurde das Pellet mit H₂O gewaschen, in 200 μ l Assay-Puffer aufgenommen und nach der Zugabe von 100 μ l Glasperlen vier Mal für 30 Sekunden gevortext, wobei die Proben zwischendurch für jeweils mindestens 30 Sekunden auf Eis abgekühlt wurden. Die Glasperlen wurden bei 3000 rpm für drei Minuten abzentrifugiert und 50 μ l des Überstandes zu 500 μ l Assay-Puffer gegeben. Nun wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 50 μ l des Substrats α -Naphthylphosphat (55 mM) gestartet und der Reaktionsansatz für 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Zum Reaktionsstopp wurden 500 μ l 2 M Glycin/NaOH-Lösung (pH 11) zugegeben und 200 μ l der Ansätze wurden in schwarzen 96-well-Platten bei folgenden Einstellungen im TECAN analysiert: Anregung /Emission = 345/472 nm.

Zur Normalisierung der Werte wurde von jeder Probe die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt.

Assay-Puffer

250 mM TrisHCl pH9

10 mM MgSO₄

10 μ M ZnSO₄

2.11.13 Bestimmung der replikativen Lebensspanne von *S. cerevisiae* Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl an Tochterzellen, die eine Mutterzelle produzieren kann, wurden die zu testenden Stämme auf YPD-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Stämme erneut auf YPD-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde ein wenig Zellmaterial auf einer frischen YPD-Platte ausgestrichen und für zwei bis drei Stunden bei 30°C inkubiert. Nun wurden 50 bis 100 Einzelzellen der zuvor ausgestrichenen Zellen mit dem Micromanipulator in

ausreichendem Abstand in Zehnergruppen positioniert. Nach einer weiteren Inkubation von 1,5 Stunden bei 30°C wurden nun die neu produzierten Tochterzellen, welche sich noch nicht geteilt haben, behalten. Alle anderen Zellen wurden hingegen mit dem Micromanipulator an den Rand der Agarplatte positioniert. Von jetzt an wurden die neu entstandenen Tochterzellen der 50 bis 100 Zellen nach je ca. zwei Stunden Inkubation bei 30°C gezählt und mit dem Mikromanipulator an den Rand der Agarplatte positioniert, bis die Zellen sich nicht mehr teilten. Über Nacht wurden die Platten bei 4°C gelagert, um ein zu häufiges Teilen der Zellen zu verhindern.

2.12 Arbeiten mit Säugerzellen

2.12.1 Kultivierung von Säugerzellen

Aufgrund der allgemein hohen Anfälligkeit von Säugerzellen für Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze wurde bei der Kultivierung ausschließlich unter der Sterilbank gearbeitet und es wurden sterile Lösungen und Geräte verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), einem Medium, das Vitamine, Aminosäuren, Salze, Glucose und einen pH Indikator enthält, mit dem Zusatz von fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert. FKS stellt die Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren und Proteinen sicher. Zudem wurden dem Medium Antibiotika und Antimykotika zugefügt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Zellen wurden bei 5 % CO₂ und 37°C in 100 mm Kulturschalen in einem Brutschrank kultiviert. Um ein Überwachsen der Zellen und somit ihr Absterben zu verhindern, wurden die Zellen alle vier bis fünf Tage passagiert. Dazu wurden sie in einer 1:10 Verdünnung in eine neue Kulturschale überführt. Das Medium einer nahezu konfluenten Kultur wurde abgesaugt, die Zellen in PBS gewaschen und anschließend für eine Minute bei 5 % CO₂ und 37°C in einer Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die Trypsin-EDTA-Lösung sorgt für das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale. Während das Trypsin Arginin- und Lysin-Reste der zugänglichen Adhärenzproteine spaltet, bindet EDTA die in der Lösung enthaltenen und für die Stabilisierung zellbindender Membranproteine notwendigen, zweiwertigen Kationen, wie Mg²⁺ und Ca²⁺. Das Trypsin wird durch die Zugabe von 10 ml frischem Medium und dessen Bestandteilen inaktiviert und die Zellen werden gleichzeitig verdünnt. Durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vom Boden der Kulturschale und voneinander gelöst. Die gewünschte Menge an Zellsuspension wurde mit frischem Medium in eine neue Kulturschale gegeben. Die Kultivierung erfolgte weiterhin im

Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Während die humanen Fibroblasten in der Regel im Verhältnis 1:3 bis 1:2 ausgesäht wurden, wurden die SH-SY5Y-Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet.

PBS (10X, pH 7,4)

80 g NaCl
2 g KCl
14,4 g Na₂HPO₄
2,4 g KH₂PO₄
ad 800 ml H₂O
pH-Wert einstellen
ad 1 l H₂O
autoklavieren, Lagerung bei RT

Kultivierungsmedium für humane Fibroblasten

500 ml DMEM + Glutamax (PAA)
10% FKS (Invitrogen)
1 mM Natrium Pyruvat (PAA)
1X Nicht-essentielle Aminosäuren (PAA)
L-Glutamin (2 mM)
100 µg/ml Penicillin / Streptomycin (PAA)

Kultivierungsmedium für SH-SY5Y-Zellen

DMEM (Lonza)
FKS (Invitrogen)
Penicillin / Streptomycin (Sigma)
Amphotericin B (Sigma)

Trypsin-EDTA (1X) Sigma**2.12.2 Isolierung von DNA Säugerzellen**

Zur Isolierung von DNA aus Säugerzellen wurde das peqGOLD Tissue DNA Kit (peqlab) verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.12.3 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Zur Isolierung von RNA aus Säugerzellen wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.12.4 Transfektion humaner Fibroblasten mit dem Nucleofector® System

Zur Transfektion der humanen Fibroblasten wurde das Basic Nucleofector® Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Amaxa) verwendet. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Das Programm U-023 erwies sich für das beigefügte Kontroll-Plasmid am effizientesten und wurde für die Transfektion der Plasmide pcDNA3.1-ATP13A2-V5 und pcDNA3.1-V5 verwendet. Ca. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und 48 Stunden mit Mangan behandelt und anschließend im MTT-Assay analysiert.

2.12.5 Transfektion von SH-S5Y5-Zellen mit siRNA

Die hier verwendete Transfektionsmethode beruht auf der Aufnahme von Liposomen in die Zelle durch Endocytose. Durch die Mischung von siRNA und kationischen Lipiden (DharmaFECT®I, ThermoScientific) bilden sich Liposome, die die siRNA enthalten und von der Zelle aufgenommen werden können. Zur Transfektion wurden zwei Reaktionsgefäße, die OPTIMEM-Medium enthielten, mit der zu transfizierenden siRNA bzw. mit dem DharmaFECT®I gemischt. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei RT wurden beide Ansätze in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt, für 20 Minuten bei RT inkubiert und auf die zu transfizierenden Zellen getropft. Nach einer Inkubation von sechs Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank wurde die Transfektion ein zweites Mal wiederholt. Weitere 15 Stunden später wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und 48 Stunden mit Mangan behandelt und anschließend im MTT-Assay analysiert.

siRNA gegen ATP13A2 - Stealth™ Select RNAi - HSS118711 (Invitrogen)

siRNA Transfektion

100 µl siRNA [1 µM]+	100 µl OPTIMEM (Gibco)
4µl DharmaFECT®I +	196 µl OPTIMEM (Gibco)

2.12.6 Mangan-Sensitivität - MTT-Assay

Die Analyse verschiedener Zellen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Mangan wurde im 96-well-Format getestet. Pro well wurden ca. 8000 humane Fibroblasten, bzw. ca. 14000

SH-SY5Y ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde das Medium abgenommen und gegen Medium mit den entsprechenden Mangan-Konzentrationen ersetzt. Es erfolgte eine Inkubation der Zellen für 48 Stunden im Brutschrank, welcher eine Messung der lebenden Zellen mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) folgte. Das Tetrazolium-Salz MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma) kann nur durch die Aufnahme von lebenden Zellen in blaue Kristalle umgesetzt werden und kann daher zur Messung der Anzahl an lebenden Zellen herangezogen werden (Mosmann 1983).

Zur Messung wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch 225 µl frisches Medium mit 25 µl einer MTT Lösung (50 mg MTT auf 10 ml PBS) ersetzt. Es folgte eine Inkubation von zwei Stunden im Brutschrank und das Abnehmen des Mediums. Nun wurde mit HCl versetztes Isopropanol (50 ml Isopropanol 100 % + 165 µl HCl 37 %) zu den Zellen gegeben und – nachdem sich alle Formazan Kristalle gelöst hatten – wurde die photometrische Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm in einem Plattenlesegerät (Tecan Safire2) bestimmt.

2.13 Proteinbiochemische Methoden

2.13.1 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot dient der Visualisierung von bestimmten Proteinen eines Proteingemischs mittels spezifischer Antikörper. Das Proteingemisch wird per SDS-Gel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt, die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend durch Antikörper visualisiert. Dadurch können Größe und Menge des untersuchten Proteins ermittelt werden.

NuPage™ 3-8 % Tris Acetat Gel	Invitrogen
NuPage™ 4-8 % Bis-Tris Gel	Invitrogen
Ladepuffer	500 µl NuPage®SDS Ladepuffer (4X) Invitrogen 350 µl H ₂ O 100 µl Protease Inhibitor Cocktail (10X) 50 µl DTT (2M)
<i>SeeBlue Plus 2</i> (Protein-Leiter)	Invitrogen
<i>MagicMark XP</i> (Protein-Leiter)	Invitrogen

Laufpuffer	50 ml NuPage [®] Laufpuffer (20X) 950 ml A. dest.
Antioxidant	Invitrogen
Hybond [™] -P PVDF Membran	Amersham Biosciences
Transferpuffer	50 ml NuPage [®] Transferpuffer (20X) 950 ml A. dest.
PBST	2 ml Tween 20 100 ml PBS (10X) ad 1 l A. dest.
Blockierungs-Lösung	2-4 g Milchpulver ad 100 ml PBST
Chemilumineszenz-Lösung	750 µl <i>Super Signal[®] West Dura</i> <i>Luminol/Enhancer Solution</i> (Perbio) 750 µl <i>Super Signal[®] West Dura</i> <i>Stable Peroxide Buffer</i> (Perbio)

2.13.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce Chemical). Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.13.1.2 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine im SDS-Gel

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Größenauftrennung von Proteinen. Dazu wird das denaturierende, negativ geladene Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) verwendet. SDS lagert sich unter Zerstörung der Tertiärstruktur an die Proteine an, wobei etwa 1,4 g SDS an 1 g Protein binden. Die Eigenladung des Proteins ist im Vergleich zur negativen Gesamtladung der Komplexe vernachlässigbar: Es entsteht ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine müssen reduzierende Agenzien, wie z. B. 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), zugesetzt werden, um die kovalenten Disulfidbrücken zu lösen.

Die hier verwendeten SDS-Gele werden von der Firma Invitrogen bezogen. Das Trägermaterial der Gele ist Polyacrylamid (PAA), ein Polymer aus Acrylsäureamid und Bisacrylsäureamid. Es handelt sich um diskontinuierliche Gele, welche durch die

unterschiedliche Zusammensetzung innerhalb des Gels eine schärfere Auftrennung der Proteine ermöglichen. So besitzt das verwendete NuPage[®]-Tris-Acetat Gel einen Gradienten, bei dem im oberen Gelbereich der PAA-Anteil bei 3 % liegt. Die Poren sind verhältnismäßig groß, was der Fokussierung der Proteinprobe auf eine schmale Bande dient. Durch die kontinuierliche Zunahme des PAA-Anteils auf bis zu 8 % werden die Poren engmaschiger. Dadurch wird die eigentliche Proteinauftrennung ermöglicht. Im NuPage[®]-Bis-Tris Gel steigt der PAA-Anteil von 4-12 % an.

Nachdem die Proben zur vollständigen Denaturierung für fünf Minuten auf 95°C erhitzt wurden, konnten 15 µl der Proben in die Taschen des Gels, welches sich in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer befand, aufgetragen werden. Bei jedem Gel wurden 10 µl Proteinstandard (Seeblye Plus2 und MagicMarkXP im Verhältnis 1:1) zur Bestimmung der relativen Protein-Größe in eine separate Geltasche aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 Volt für 45 Minuten.

2.13.1.3 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im SDS-Gel erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF). Durch die angelegte Spannung wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran.

Vor dem Proteintransfer wurde die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran zur Erhöhung der Transfereffizienz für 30 Sekunden in Methanol inkubiert. Die zum Blot benötigten Blotting-Polster, Filterpapiere und die in Methanol inkubierte Membran wurden in Transferpuffer equilibriert. Nachdem die Membran auf das SDS-Gel aufgelegt und von Blotting-Polstern und Filterpapieren umgeben so in das Transfer-Modul eingesetzt wurde, dass die Proteine sich in Richtung Anode bewegen und auf der Membran haften bleiben konnten, wurde die Blot-Kammer mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 32V. Anhand des Seeblye Plus2-Proteinmarkers konnte der Transfer auf die Membran überprüft werden.

2.13.1.4 Spezifische Chemilumineszenz-Detektion

Die auf die Membran transferierten Proteine konnten mit Hilfe von Antikörpern (AK) visualisiert werden. Hierzu wurde die Chemilumineszenz-Detektion verwendet, bei der zum einen ein aus der Maus oder dem Kaninchen stammender Primärantikörper, der gegen das

gewünschte Protein gerichtet ist, und zum anderen ein Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt wird. Der Sekundärantikörper ist an eine Meerrettich-Peroxidase (*horse-radish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Diese ist für die Chemilumineszenz verantwortlich. Luminol wird unter alkalischen Bedingungen, der Anwesenheit von H_2O_2 und der katalytischen Wirkung der Meerrettich-Peroxidase oxidiert. Die freiwerdende Energie wird in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 400 bis 700 nm abgegeben. Durch das Auflegen eines Röntgenfilms kann das Ausmaß der Reaktion quantifiziert werden. Je stärker die Oxidation, desto intensiver ist das Signal auf dem entwickelten Film.

Die proteinbeladene Membran wurde zum Blocken von Bindestellen für unspezifische AK-Reaktionen für eine Stunde in einer PBST-Lösung mit einem Milchpulver-Anteil von 2,5 % bis 4 % bei RT geschüttelt. Zur Inkubation des Primärantikörpers wurde sie anschließend mit der Proteinseite nach außen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das Röhrchen enthielt 3 ml der Milchpulver-PBST-Lösung und die vom Vertreiber angegebenen Mengen an Primärantikörpern. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde nicht-gebundener AK durch dreimaliges Waschen für jeweils fünf Minuten in PBST entfernt. Zur Bindung des Sekundärantikörpers wurde die Membran in 30 ml einer Milchpulver-PBST-Lösung inkubiert, welche mit je 6 μl α -Maus IgG-HRP (Ziege) (sofern ein Primärantikörper aus der Maus verwendet wurde) und α -Kaninchen IgG-HRP (Ziege) (1:5000) versetzt. Der α -Kaninchen IgG-HRP-AK diente unter anderem zur Detektion der Protein-Leiter MagicMarkXP. An beide Sekundärantikörper war HRP gekoppelt. Nach einer Inkubation von einer Stunde auf dem Schüttler wurde die Membran zur Beseitigung ungebundener AK drei Mal für 15 Minuten in PBST gewaschen. Während des letzten Waschschrilles wurde für die eigentliche Chemilumineszenz-Reaktion ein Gemisch aus Luminol und einen Peroxidpuffer (1:1) vorbereitet. Die Membran wurde anschließend mit der Proteinseite nach oben auf eine Glasplatte gelegt und 1,5 ml der Chemilumineszenz-Lösung gleichmäßig aufgetropft. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei RT wurde die Membran abgetropft, in Folie verpackt und in eine Filmkassette eingelegt. Zur Quantifizierung wurde ein Röntgenfilm über unterschiedlich lange Zeiträume exponiert.

2.13.2 Antikörper

Primärantikörper

α -GFP	Maus (IgG ₁)	(Roche)
α -HA	Maus (IgG _{2b})	(Roche)
α - Pgk	Maus (IgG ₁)	(Invitrogen)
α - V5	Maus (IgG ₁)	(Invitrogen)

Sekundärantikörper

α -Maus IgG-HRP - Ziege	(Perbio)
α -Kaninchen IgG-HRP - Ziege	(Perbio)

3 Ergebnisse

3.1 *In silico* Analysen

3.1.1 Ypk9 ist das *S. cerevisiae* Homolog von Atp13a2

Zu Beginn dieser Arbeit sollte eine bioinformatische Analyse der humanen und *S. cerevisiae* stämmigen Typ V P-Typ ATPasen durchgeführt werden, um ein mögliches Homolog von Atp13a2 zu identifizieren und eine erste Charakterisierung vornehmen zu können.

Vorangegangene Datenbankanalysen hatten bereits gezeigt, dass das humane Genom insgesamt fünf verschiedene Typ V P-Typ ATPasen enthält. Ähnliche Untersuchungen sollten Aufschluss über homologe Proteine bei *S. cerevisiae* geben. Zunächst wurde anhand der Proteinsequenz von Atp13a2 mittels des NCBI Programms BLAST eine Suche nach homologen Sequenzen im *S. cerevisiae* Genom durchgeführt. Die offenen Leserahmen *YOR291w* (*YPK9*) und *YEL031w* (*SPF1*) zeigten dabei die größte Ähnlichkeit. Weitere Treffer waren u. a. die Gene *DNF1*, *PMR1* und *PMC1*, welche jedoch den Typ IV, IIA bzw. IIB P-Typ ATPasen zuzuordnen sind. Um genauere Vergleiche mit anderen Typ V ATPasen ziehen zu können, wurde ein Abgleich der Proteinsequenz von *SPF1* und *YPK9* mit anderen ATPasen aus der Subgruppe V mit dem Programm ClustalW angefertigt. Somit sollte die Zugehörigkeit der Proteine zu der Subgruppe der Typ V P-Typ ATPasen ermittelt werden. Abbildung 3-1 zeigt Ausschnitte eines Alignments verschiedener P-Typ ATPasen der Subgruppe V aus unterschiedlichen Organismen mit den Proteinen Spf1 und Ypk9. In blau gekennzeichnet sind mehrere Motive, die speziell innerhalb der Subgruppe V konserviert sind. Gelb gekennzeichnete Aminosäuren sind allgemein bei den P-Typ ATPasen konserviert. Das für die P-Typ ATPasen charakteristische DKTGT-Motiv kann für die Subgruppe V um einige Aminosäuren auf FDKTGTLT erweitert werden. Des Weiteren ist bei allen Proteinen das für Typ V P-Typ ATPasen charakteristische PPXLPXX-Motiv zu finden, welches seit neuestem zur Unterteilung der Typ V ATPasen in die Subgruppen A und B herangezogen wird (Møller *et al.*, 2008). Es befindet sich in einem größeren hydrophilen Bereich des Proteins, in dem auch das Phosphorylierungsmotiv zu finden ist. Anhand dieses Alignments lässt sich deutlich erkennen, dass sowohl Spf1 als auch Ypk9 zur Gruppe V der P-Typ ATPasen gezählt werden können.

Q27533- <i>C.elegans</i>	---PHGCLMQCDSVLMNGTVIVNESVLTGESPITKVALT-----DET	311
Q9N323- <i>C.elegans</i>	---PQGCMYCDAVLLNGTCIVNESMLTGESIPITKSAIS-----DDG	343
Q21286- <i>C.elegans</i>	---SNTFILPCDCLLMNGTVIVNEAMLTGESVPVTKASLKE-----ADEC	349
ATP13A2- <i>human</i>	---QEGGLMPCDAALVAGECMVNESSLTGESIPVLTALP-----EGL	361
ATP13A3- <i>human</i>	---LNGTIMPCDAVLLNGTCIVNESMLTGESVPVTKTNLNP-SVDVKG	344
Ypk9- <i>S.cerevisiae</i>	---PNITILPCDSILLSSDCIVNESMLTGESVPVSKFPATEETMYQLCDD	626
P90747- <i>C.elegans</i>	--GAEEECVPCDLLLRGPCIVDESMLTGESVPQMKPEPIED-----VEK	318
ATP13A1- <i>human</i>	--SPQENLVPCDVLRLRRCIVDEAMLTGESVPQMKPEPIED-----LSP	369
Q9LT02- <i>A.thaliana</i>	QTGGEDKTVPADMLLLVGSIAIVNEAILTGESTPQWVPIV-----QRS	330
Spf1- <i>S.cerevisiae</i>	--TAEESAIPCDLILLDGSIAIVNEAMLSGESTPLLKESIKL-----RPS	324
	. : .* * : . : * * * : * : * * * * * *	
Q27533- <i>C.elegans</i>	RG-NTLRRIIVRSLDIITITVPPALPAAMSVGIINAQLRLKKKEIFCISP	450
Q9N323- <i>C.elegans</i>	RG-SSIGKIIIRALDLVTIVVPPALPAVMGIGIFYARRLRQKSIYCISP	482
Q21286- <i>C.elegans</i>	RG-ESLKHIIIRSLDIITITVPPALPAAMSVGIINANSRLKKKKIFCTSP	488
ATP13A2- <i>human</i>	NR-VPLNEIVIRALDLVTVVPPALPAAMTVCTLYAQSRLRQGFICHP	498
ATP13A3- <i>human</i>	NE-VQVGVIIIESLDIITITVPPALPAAMTAGIVYAQRRLKKIGIFCISP	483
Ypk9- <i>S.cerevisiae</i>	LG-LDKKTMILRALDIITIVVPPALPATLTIGTNFALSRLKEKGFICISP	766
P90747- <i>C.elegans</i>	DETRSKYKLFLECTLILTSVPPPELPIELSLAVNSSLMALQKLGIFCTEP	468
ATP13A1- <i>human</i>	DPTRSNRYKLFLECTLILTSVPPPELPIELSLAVNTSLIALAKLYMYCTEP	518
Q9LT02- <i>A.thaliana</i>	DPTRSKYKLLLGCSLIITSVPPPELPELSIAVNTSLALVRRGIFCTEP	476
Spf1- <i>S.cerevisiae</i>	MG-RIQSKLILDCILITSVVPPPELPELTMAVNSSLAALAKFYVYCTEP	472
	::: . : * : * * * * * * : : * . : * * *	
Q27533- <i>C.elegans</i>	STINTCGAINVCFDMTGTLTEDGLDFHVVRPVMsAVNQEIQVKLEKSN	500
Q9N323- <i>C.elegans</i>	TTINTCGAIDVVCDFMTGTLTEDGLDFYALRVVNDAK-----	519
Q21286- <i>C.elegans</i>	TTVNVCGLINVACDFMTGTLTEDGLDFNCLKAIRKNE-----G	527
ATP13A2- <i>human</i>	LRINLGGKLQLVCFDMTGTLTEDGLDVMGVVPLKQGA-----	535
ATP13A3- <i>human</i>	QRINICGQLNLVCFDMTGTLTEDGLDLWGIQRVENAR-----	520
Ypk9- <i>S.cerevisiae</i>	TRLNISGKIDVMCFDMTGTLTEDGLDVLGVQISEPNGVRGQKFG--ELLS	814
P90747- <i>C.elegans</i>	FRIPFAGKVDICCFDMTGTLTEDGLDVLVVEGVA-LNNQKEGM-----	507
ATP13A1- <i>human</i>	FRIPFAGKVEVCCFDMTGTLTSDSLVVRGVAGLRDGKE-----	556
Q9LT02- <i>A.thaliana</i>	FRIPFAGKVDLCCFDMTGTLTSDSDDMEFRGVGGLSNCEEA-----	515
Spf1- <i>S.cerevisiae</i>	FRIPFAGRIDVCCFDMTGTLTGEDLVFEGLAGISADSENIR-----	513
	: * : * : * * * * * * * * : : . :	

Abbildung 3-1: Dargestellt sind Ausschnitte aus einem Protein-Alignment von zehn P-Typ ATPasen der Subgruppe V von vier verschiedenen Organismen. Die Farbcodierung der Aminosäuren beruht auf ihren biophysikalischen Eigenschaften. An den mit einem Stern gekennzeichneten Positionen liegt in allen Sequenzen die gleiche Aminosäure vor. Ein Doppelpunkt kennzeichnet das Vorliegen von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (angelehnt am Farbschema). Ein Punkt steht für das Vorliegen von ähnlichen Aminosäuren in jeder Sequenz. Das *alignment* wurde mit dem Programm ClustalW erstellt. Die Zahlen am rechten Rand der *alignments* geben die Position der letzten Aminosäure der jeweiligen Sequenz an. Gelb unterlegt sind Motive, die innerhalb der P-Typ ATPasen konserviert sind. Blau unterlegt sind Motive, die für die Subgruppe V charakteristisch sind.

Während im humanen Genom somit insgesamt fünf Typ V ATPasen, *ATP13A1-ATP13A5* vorliegen, existieren im *S. cerevisiae* Genom lediglich zwei, *SPF1* und *YPK9*. Tabelle 3-1 zeigt jeweils die chromosomale Lokalisation dieser Gene, die Anzahl ihrer Exone und die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Proteine mit ihrem Molekulargewicht in kDa. Zudem ist die jeweilige Identität bzw. Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der Proteine mit dem

Spf1- bzw. Ypk9-Protein, welche anhand einer BLAST-Analyse ermittelt wurden, in Prozent angegeben.

Innerhalb der humanen Typ V P-Typ ATPasen lässt sich erkennen, dass *ATP13A3-5* in einem chromosomalen Cluster angeordnet sind (innerhalb von 1,15 MB) und zudem eine sehr hohe Homologie zueinander aufweisen (41-59 % Identität und 60-74 % Ähnlichkeit). Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese aus jüngeren Genduplikationsereignissen entstanden sind. Zudem lässt sich anhand der Homologie-Analysen der Proteine bereits eine Abgrenzung von *Atp13a1* (29-30 % Identität und 47-50 % Ähnlichkeit gegenüber 13A2-13A5) in Bezug auf die vier anderen Proteine erkennen (39-41 % Identität und 56-58 % Ähnlichkeit untereinander). Diese Tendenz lässt sich auch im Vergleich der humanen mit den *S. cerevisiae* Proteinsequenzen erkennen (Tabelle 3-1). Während Spf1 mit 41 % Identität und 61 % Ähnlichkeit eine größere Homologie zu *Atp13a1* aufweist als zu *Atp13a2-Atp13a5* (28-29 % Identität und 47-49 % Ähnlichkeit), zeigt Ypk9 eine stärkere Homologie zu *Atp13a2-Atp13a5* (33-36 % Identität und 54-57 % Ähnlichkeit) als zu *Atp13a1* (27 % Identität und 49 % Ähnlichkeit). Die stärksten Homologien für Ypk9 liegen bei 36 % Identität und 57 % Ähnlichkeit zu *Atp13a2* und *Atp13a3* gleichermaßen.

Tabelle 3-1: Dargestellt ist die chromosomale Lokalisation der humanen und der *S. cerevisiae* Gene und die Anzahl der Exone. Zudem sind die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen Proteine und ihr Molekulargewicht in kDa angegeben. Weiterhin ist die jeweilige Identität bzw. Ähnlichkeit der einzelnen Proteinsequenz mit dem Spf1- bzw. Ypk9-Protein in % angegeben, welche anhand des BLASTp Programms von NCBI ermittelt wurde.

	chromosomale Lokalisation	Anzahl der Exone	Anzahl der Aminosäuren	MW in kDa	identische/ähnliche AS (Spf1) in %	identische/ähnliche AS (Ypk9) in %
<i>ATP13A1</i>	19p13.11	26	1204	130	41/61	27/49
<i>ATP13A2</i>	1p36.13	30	1180	130	29/49	36/57
<i>ATP13A3</i>	3q29	32	1257	142	28/49	36/57
<i>ATP13A4</i>	3q29	34	1196	134	29/49	34/54
<i>ATP13A5</i>	3q29	30	1222	138	29/47	33/54
<i>SPF1</i>	V	1	1215	135	100/100	29/49
<i>YPK9</i>	XV	1	1472	167	29/49	100/100

Abbildung 3-2 zeigt ein mit ClustalX erstelltes Dendrogramm der Proteinsequenzen der fünf humanen und der beiden *S. cerevisiae* ATPasen, in dem sich ebenfalls die Distanz zwischen Atp13a1 und Spf1 zu Atp13a2-Atp13a5 und Ypk9 erkennen lässt.

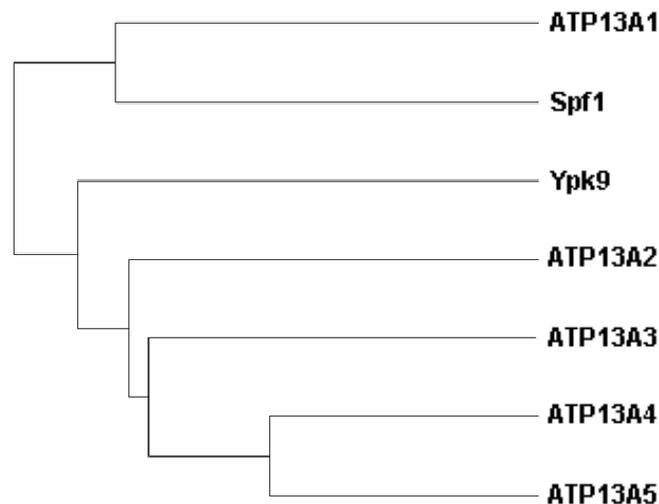


Abbildung 3-2: Mit ClustalX erstelltes Dendrogramm der fünf humanen und zwei *S. cerevisiae* P-Typ ATPasen der Subgruppe V. *Accession numbers:* ATP13A1: Q9HD20, ATP13A2: Q9NQ11, ATP13A3: Q9H7F0, ATP13A4: Q4VNC1, ATP13A5: Q4VNC0, Spf1: P39986, Ypk9: Q12697.

Die durchgeführten Analysen lassen darauf schließen, dass das Ypk9-Protein unter den *S. cerevisiae* Typ V P-Typ ATPasen die größte Homologie zu Atp13a2 aufweist.

Das *YPK9*-Gen ist für die Hefe-Zelle nicht essentiell. Zu Beginn der Durchführung dieser Arbeit lagen in der Literatur keinerlei Erkenntnisse über einen möglichen Phänotyp des *Δypk9*-Deletionsstamms durch systematische Untersuchungen oder über die Lokalisation des Ypk9-Proteins vor. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Hypothesen bezüglich eines möglichen Phänotyps getestet, um somit Aussagen über die Funktion des Proteins machen zu können und ein System zu etablieren, in dem Mutationen des humanen *ATP13A2* auf ihre Pathogenität hin getestet werden könnten.

3.1.2 Bioinformatische Charakterisierung von Ypk9

Um erste Erkenntnisse über die Struktur von Ypk9 zu erhalten, sollten weitere *in silico* Analysen bezüglich der Proteinsequenz durchgeführt werden.

Analysen der Primärstruktur des Proteins mittels der NCBI Datenbank *Conserved Domain* zeigten, dass das Ypk9-Protein eine E1-E2-ATPase-Domäne enthält, welche kennzeichnend für alle P-Typ ATPasen ist. Zudem konnte eine hohe Homologie zu dem TIGRFAM-Eintrag 01657, welcher die Typ V P-Typ ATPasen repräsentiert und somit auch das charakteristische DKTGLT-Motiv enthält, ermittelt werden (Abbildung 3-3), was die Zugehörigkeit von Ypk9 zu den Typ V P-Typ ATPasen noch einmal bestätigt. Weitere Untersuchungen der Ypk9-Proteinsequenz mit verschiedenen Prädiktionsprogrammen und Datenbanken ließen keine eindeutige Prädiktion bezüglich der subzellulären Lokalisation des Proteins zu.

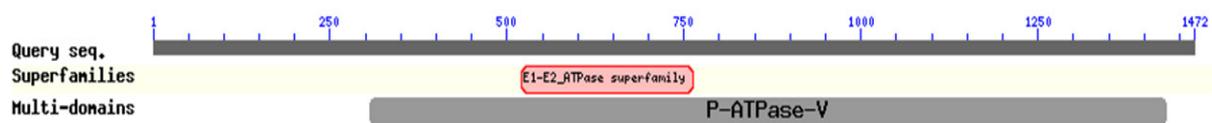


Abbildung 3-3: Dargestellt sind die für eine Suche nach konservierten Domänen erhaltenen Ergebnisse der NCBI Datenbank *Conserved Domain*. Diese erlauben neben der Einordnung von Ypk9 in die auch E1-E2 ATPasen genannte Familie der P-Typ ATPasen auch eine Klassifizierung des Proteins in die Subgruppe V.

Da für Typ V P-Typ ATPasen zehn Transmembrandomänen (TMD) charakteristisch sind, sollte auch für Ypk9 eine Prädiktion möglicher TMDs durchgeführt werden. Anhand der Primärstruktur eines Proteins lassen sich über die hydrophilen oder hydrophoben Eigenschaften der Aminosäuren mögliche Membran-durchspannende Domänen vorhersagen. Um eine Membran zu durchspannen, werden in der Regel mindestens 19 Aminosäuren benötigt, welche vorwiegend hydrophob sind. Für die Hydrophobizitätsberechnungen von Proteinen werden den einzelnen Aminosäuren aufgrund ihrer Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln oder theoretischer Kalkulationen Hydrophobizitätswerte zugeordnet. Anhand dieser wird die Hydrophobizität einzelner Abschnitte des Proteins berechnet. Häufig wird nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) vorgegangen. Abbildung 3-4 zeigt die schematische Darstellung eines auf dieser Methode basierenden Hydrophobizitätsplots für Ypk9, welcher mit dem Programm TopPred der Mobyle Plattform angefertigt wurde. Dargestellt ist eine Prädiktion, die aufgrund ihrer Anordnung und Anzahl der Transmembrandomänen den für P-Typ ATPasen charakteristischen zehn Transmembrandomänen sowie den konservierten cytoplasmatischen Domänen zwischen TMD 2 und 3 und TMD 4 und 5 sehr nahe kommt.

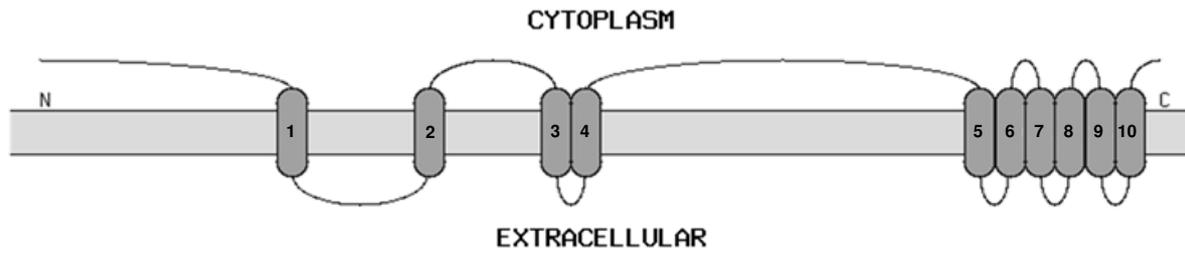


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung einer auf der Methode von Kyte und Doolittle basierendem Transmembrandomänenprädiktion für Ypk9. Erstellt mit dem Programm TopPred der Mobyle Plattform. Zu sehen sind die für P-Typ ATPasen charakteristischen zehn Transmembrandomänen und die konservierten cytoplasmatischen Domänen zwischen TMD 2 und 3 und TMD 4 und 5.

3.2 Subzelluläre Lokalisierung von Ypk9

Da die subzelluläre Lokalisation eines Proteins eine Einordnung in die in der Zelle vorgehenden Prozesse, an denen es möglicherweise beteiligt ist, erleichtert, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine Lokalisierung von Ypk9 vorgenommen werden. Das *green fluorescent protein* (GFP) der Qualle *Aequorea victoria*, welches nach optischer Anregung grün fluoresziert, ist bei einer solchen Fragestellung ein nützliches Werkzeug. Mit GFP fusionierte Proteine lassen sich im Mikroskop gut detektieren.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmid mit einem C-terminal GFP-gekoppeltem *YPK9*-Gen (psM1052-GFP-*YPK9*) wurde freundlicherweise von Minghui Xiang aus der Gruppe von Rajini Rao, *Department of Physiology, Johns Hopkins University School of Medicine*, Baltimore, USA zur Verfügung gestellt. Das Plasmid wurde in den Ypk9 defizienten Hefestamm $\Delta ypk9$ transformiert, die Zellen wurden in SC-Medium angezogen und die Lokalisierung von GFP-Ypk9 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Abbildung 3-5 zeigt exemplarisch die Lokalisation des GFP-Ypk9 Proteins in der vakuolären Membran. Somit beschränkt sich die mögliche Funktion des Proteins auf zelluläre Prozesse an denen die Vakuole beteiligt ist. Da die Vakuole das zu den Lysosomen der Säugetierzelle analoge Hefe-Organell ist, stimmt die Lokalisation des *S. cerevisiae* Proteins mit der des humanen Atp13a2-Proteins in der lysosomalen Membran überein. Dies könnte auch auf eine mögliche gemeinsame Funktion der beiden Proteine hinweisen und bestätigt die vorangegangene Sequenzanalyse.

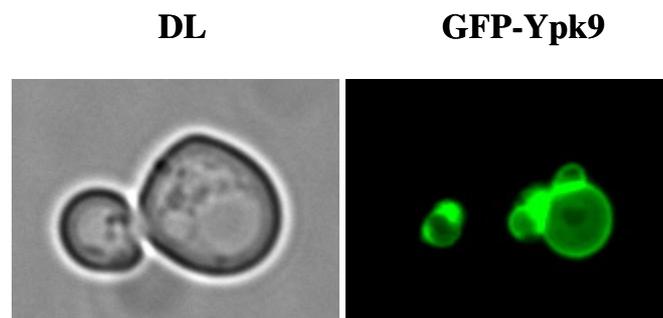


Abbildung 3-5: Gezeigt ist die Lokalisierung des GFP-Ypk9-Proteins in $\Delta ypk9$ -Zellen. Der mit dem Plasmid psM1052-GFP-*YPK9* transformierte Stamm wurde in SC-URA bei 30°C kultiviert und die lebenden, nicht fixierten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Auf der linken Seite ist ein mit Durchlicht aufgenommenes Bild zu sehen. Rechts ist die subzelluläre Lokalisation des GFP-Ypk9-Proteins derselben Zellen im Fluoreszenzbild zu erkennen. DL-Durchlicht.

3.3 Einfluss von Ypk9 auf die Autophagie

Da bei den vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeit eine Lokalisierung von GFP-markiertem Ypk9 in der Vakuolenmembran ermittelt wurde, sollten weitere Experimente zu einer möglichen Funktion des Ypk9-Proteins in Bezug auf bekannte vakuoläre Funktionen durchgeführt werden.

Die Vakuole der Hefe spielt eine zentrale Rolle sowohl in der pH- und Ionen-Homöostase als auch im Abbau von Proteinen, Makromolekülen und Organellen durch Autophagie (Mijaljica *et al.*, 2007). Ein Zusammenhang zwischen Autophagie und Neurodegeneration wurde bereits mehrfach beschrieben (Lee, 2009). Über eine Verknüpfung zwischen Autophagie und Parkinsonismus wurde ebenfalls bereits berichtet (Cuervo *et al.*, 2004, Kabuta *et al.*, 2008). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit anhand des Hefemodells überprüft werden, ob der Verlust des Ypk9-Proteins bzw. dessen Überexpression zu Veränderungen in der Autophagie führt.

3.3.1 Der GFP-Atg8-Assay

Der GFP-Atg8-Assay beruht darauf, dass das GFP-Atg8 Fusionsprotein im Autophagosom in die Vakuole transportiert wird, wo es nach der Lyse des Autophagosoms degradiert wird. Da GFP jedoch relativ resistent gegen die Proteolyse in der Vakuole ist, bleibt es im Gegensatz zu dem Atg8-Protein erhalten und spiegelt somit den Grad an Autophagie wieder (Shintani und Klionsky, 2004). Für diesen Assay wurde das Plasmid pRS316-GFP-ATG8 freundlicherweise von Yoshinori Ohsumi *Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan*, zur Verfügung gestellt (Suzuki *et al.*, 2001). Das Plasmid wurde sowohl in WT-Hefezellen, als auch in die für Ypk9 bzw. Atg1 defizienten Stämme $\Delta ypk9$ und $\Delta atg1$ transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Plasmids überprüft. Das *ATG1*-Gen ist für die Vesikelbildung, die für die Autophagie benötigt wird, essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der $\Delta atg1$ -Stamm als Kontrolle, in der keine Autophagie stattfindet, verwendet.

Alle drei Stämme wurden in Selektionsmedium ohne Uracil (SC-URA) kultiviert und während der logarithmischen Wachstumsphase zwei- bis dreimal in einem Hungermedium ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (SD(-N)) gewaschen. Zur Induzierung der Autophagie wurden die Zellen für vier Stunden in SD-N-Medium inkubiert. Nach der Isolierung der Proteine erfolgte eine Westernblot-Analyse der Proteinlysate mittels eines

α -GFP Antikörpers (Abbildung 3-6). Für alle drei Stämme konnte für die Inkubation in SC-URA-Medium kein freies GFP nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass in diesen Zellen keine Autophagie stattfindet. Nach der Induktion der Autophagie durch das Hungermedium SD(-N) ließ sich für den Kontrollstamm $\Delta atg1$ wie erwartet auch weiterhin kein freies GFP nachweisen. Für den WT- und $\Delta ypk9$ -Stamm zeigte sich eine etwa gleich starke Bande mit einer Größe von ca. 25 kDa, was der molekularen Masse von freiem GFP entspricht. Als Ladekontrolle diente die Phosphoglyceratkinase (P_{gk}). Die mit einem anti-P_{gk}-Antikörper detektierten Banden für den $\Delta ypk9$ -Stamm zeigten für beide Proben ein schwächeres Signal als für die WT- und $\Delta atg1$ -Proben. Mit der Annahme, dass für den in SD(-N)-Medium inkubierten $\Delta ypk9$ -Stamm weniger Gesamtprotein aufgetragen wurde als für den in SD(-N)-Medium inkubierten WT-Stamm, wäre die relative Menge an freiem GFP für den $\Delta ypk9$ -Stamm größer als für den WT-Stamm und könnte somit auf eine geringfügig erhöhte Rate der Autophagie hinweisen.

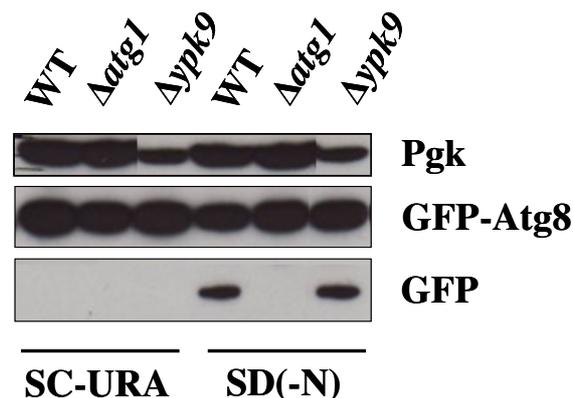


Abbildung 3-6: Dargestellt ist eine Westernblot-Analyse der Proteinlysate GFP-Atg8 exprimierender WT-, $\Delta ypk9$ - und $\Delta atg1$ -Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen in SC-URA-Medium und unter Hungerbedingungen nach einer vierstündigen Inkubation in SD(-N)-Medium. Es erfolgte eine Proteindetektion mittels eines α -GFP-Antikörpers zur Visualisierung des exprimierten GFP-Atg8-Proteins und des durch die Autophagie entstehenden freien GFPs. Als Ladekontrolle diente die Detektion mit einem α -PGK-Antikörper.

Um einen Einblick in den zeitlichen Verlauf der Autophagie zu bekommen, wurde mit den oben verwendeten Stämmen ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem zu verschiedenen Zeitpunkten (60, 120 und 180 Minuten) nach Induktion der Autophagie durch SD(-N)-Medium Proben genommen wurden. Dadurch sollte überprüft werden, ob es durch den

Verlust des Ypk9-Proteins evtl. zu Verzögerungen oder Beschleunigungen der Auslösung der Autophagie kommt.

Anhand von Abbildung 3-7 ließ sich ein leicht verstärktes Signal für alle Banden freien GFPs der WT-Proteinlysate gegenüber der $\Delta ypk9$ -Lysate feststellen. Diese gehen allerdings mit einem leicht stärkeren Pgc-Signal der WT-Lysate gegenüber der $\Delta ypk9$ -Proteinlysate einher. Dies lässt somit vermuten, dass der Anteil an freiem GFP in beiden Stämmen relativ gleich ist. Insgesamt ließen sich keine größeren Abweichungen der Autophagierate zwischen WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen nach der Induktion der Autophagie feststellen.

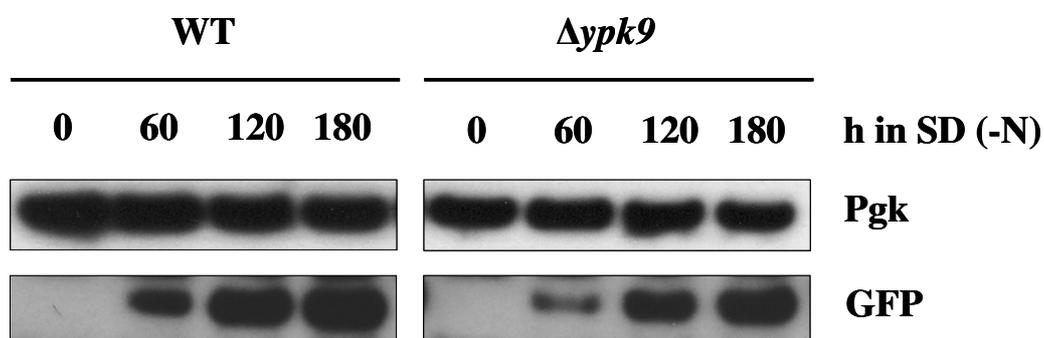


Abbildung 3-7: Zeitlicher Verlauf der Autophagie in WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen anhand von Proben, die zu den Zeitpunkten 0, 60, 120 und 180 Minuten nach der Induktion der Autophagie durch das Hungermedium SD(-N) genommen wurden. Die Proteinlysate wurden mittels eines SDS-Polyacrylamid-Gels elektrophoretisch aufgetrennt und es erfolgte eine Detektion von freiem GFP, dessen Menge mit der Autophagierate korreliert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von Pgc.

3.3.2 Der Pho8 Δ 60-Assay

Der vorangegangene GFP-Atg8-Assay gab keinen Hinweis auf eine stark veränderte Autophagierate in $\Delta ypk9$ -Zellen. Dieses Ergebnis sollte anhand eines zweiten, unabhängigen Versuchs überprüft werden. Hierfür bot sich der Pho8 Δ 60-Assay an (Klionsky 2007), da es sich hier um eine äußerst sensitive Methode handelt, bei der auch geringe Veränderungen gut detektiert werden können. Bei dem Pho8 Δ 60-Assay korreliert die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) Pho8, die durch die Umsetzung des Substrats α -Naphthylphosphat photometrisch bestimmt werden kann, mit der Rate der Autophagie und kann somit zu deren Bestimmung herangezogen werden. Die zu überprüfenden Stämme müssen allerdings eine genomische Deletion von 180 bp im *PHO8*-Gen aufweisen, durch die ein verkürztes Protein

(Pho8 Δ 60) entsteht, dessen N-terminale Transmembrandomäne fehlt. Dadurch verbleibt die sonst vakuoläre Phosphatase im Cytosol und kann somit nicht durch das Abspalten des C-terminalen Propeptids durch vakuoläre Proteinasen in seine enzymatisch aktive Form überführt werden. Über Autophagie kann das Pho8 Δ 60-Protein jedoch in die Vakuole transportiert werden, wo es dann prozessiert wird und somit ein enzymatisch aktives Protein durch die Abspaltung des Propeptids entsteht.

In den zu prüfenden Stämmen mussten zunächst die 180 bp im *PHO8*-Gen, welche für die Transmembrandomäne des Proteins codieren, deletiert werden. Dies erfolgte über einen Austausch des endogenen *PHO8*-Gens durch das trunkierte *PHO8 Δ 60*-Gen in dem Plasmid pTN9 (Noda *et al.*, 1995), welches ebenfalls freundlicherweise von Yoshinori Ohsumi, *Department of Cell Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan*, zur Verfügung gestellt wurde. Nach der Linearisierung des pTN9-Expressionskonstruktes, welches einen Uracil-Marker enthält, wurde dieses in WT-, Δ *yph9*- und Δ *atg1*-Zellen transformiert, wo es durch homologe Rekombination in das Genom eingebaut wurde. Dadurch befand sich jeweils eine Kopie des WT-*PHO8*-Gens und eine Kopie des trunkierten *PHO8 Δ 60*-Gens im Genom. Die so erhaltenen Stämme wurden mittels 5'-fluorouracil (*5*'FOA), welches während der Uracil-Synthese in Ura⁺-Stämmen in das toxische 5'-Fluorouracil umgewandelt wird - in Ura⁻-Stämmen jedoch keine Auswirkungen hat - auf einen Ausschluss des in pTN9 enthaltenen Uracil-Markers durch intrachromosomale Rekombination selektioniert. Anschließend wurde mittels PCR überprüft, welche Klone das trunkierte *pho8 Δ 60*-Gen enthielten, da es durch die intrachromosomale Rekombination sowohl zum Ausschluss des WT-*PHO8*-Gens als auch zum Ausschluss des integrierten Bereiches inklusive des *pho8 Δ 60*-Gens kommen kann.

Die so erhaltenen Pho8 Δ 60-Stämme wurden nun analog zu den im GFP-Atg8-Assay analysierten Stämmen kultiviert und in SD(-N)-Medium inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 und 60, 120 und 240 Minuten später wurden jeweils Proben entnommen. Nach Beendigung der Probennahme wurden die Zellen mittels Glasperlen aufgeschlossen und es erfolgt die photometrische Bestimmung der Pho8 Δ 60-Enzymaktivität durch den Umsatz von α -Naphthylphosphat in Abhängigkeit der Autophagierate (siehe Kapitel 2.11.12). Es wurden WT-, Δ *yph9*- und Δ *atg1*-Zellen getestet, wobei die Δ *atg1*-Zellen erneut als Kontrolle dienten, in denen es zu keiner Auslösung der Autophagie kommen und somit auch keine Enzymaktivität messbar sein sollte.

Abbildung 3-8 zeigt die Ergebnisse einer repräsentativen Messung, die im Duplikat durchgeführt wurde. Es ist die relative ALP-Aktivität pro eingesetztem μg Protein angegeben, welche für die $\Delta atg1$ -negativ-Kontrolle, wie erwartet, keinen Anstieg bei zunehmender Inkubationszeit in SD(-N) zeigte. Durch die Deletion des *ATG1*-Gens konnte keine Autophagie ausgelöst werden und somit auch kein enzymatisch aktives ALP generiert werden. Für WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen gleichermaßen war jedoch ein deutlicher Anstieg der ALP-Aktivität mit längerer Inkubationszeit in SD(-N)-Medium zu erkennen. Die Autophagie konnte somit erfolgreich ausgelöst werden, es lagen jedoch keine signifikanten Unterschiede der Autophagierate zwischen WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen vor.

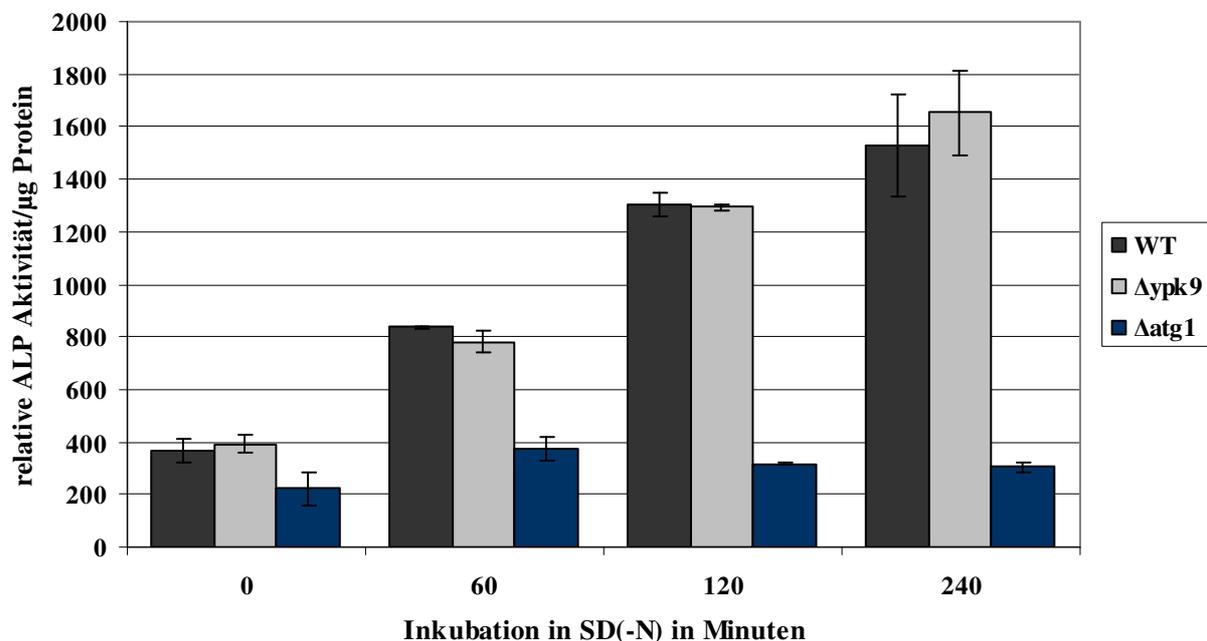


Abbildung 3-8: Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Pho8 Δ 60-assays, der im Duplikat durchgeführt wurde. Für WT-, $\Delta ypk9$ - und $\Delta atg1$ -Zellen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen ALP-Aktivität, die mit der Autophagierate korreliert, pro eingesetztem μg Protein für die Zeitpunkte 0, 60, 120 und 240 Minuten nach der Induktion der Autophagie durch das Hungermedium SD(-N) angegeben.

Neben der Untersuchung möglicher Änderungen im Ablauf der Autophagie durch die Abwesenheit des Ypk9-Proteins in $\Delta ypk9$ -Zellen sollte des Weiteren ein möglicher Unterschied durch eine Überexpression des Ypk9-Proteins in WT- bzw. $\Delta atg1$ -Zellen überprüft werden. Dazu wurden die bereits generierten Pho8 Δ 60-Stämme mit dem Expressionsvektor 426-GPD-YPK9-GFP bzw. mit dem entsprechenden Leervektor transformiert. Die Versuchsdurchführung erfolgt wie bereits oben beschrieben und es wurden

Proben nach 0, 60, 120 und 240 Inkubationszeit in SC(-N)-Medium entnommen. Abbildung 3-9 zeigt die erhaltenen Mittelwerte und Standardabweichungen für die relative ALP-Aktivität pro μg eingesetzten Proteins eines repräsentativen Versuchsansatzes, der in dreifacher Ausführung angefertigt wurde. Ähnlich wie für den in Abbildung 3-8 dargestellten Versuch war hier für die mit dem Leervektor transformierten Δatg1 -Kontrollzellen und die Ypk9 exprimierenden Δatg1 -Zellen bei zunehmender Inkubationszeit in SD(-N)-Medium kein Anstieg der ALP-Aktivität zu beobachten. Für die mit dem leeren Vektor transformierten WT-Zellen und die Ypk9 exprimierenden WT-Zellen ist ein deutlicher Anstieg mit zunehmender Inkubationszeit in SD(-N)-Medium zu erkennen, wobei hier leicht erhöhte Werte für die Ypk9 exprimierenden WT-Zellen gegenüber der mit dem Leervektor transformierten WT-Zellen für alle vier Zeitpunkte zu erkennen waren. Diese sind jedoch nicht signifikant.

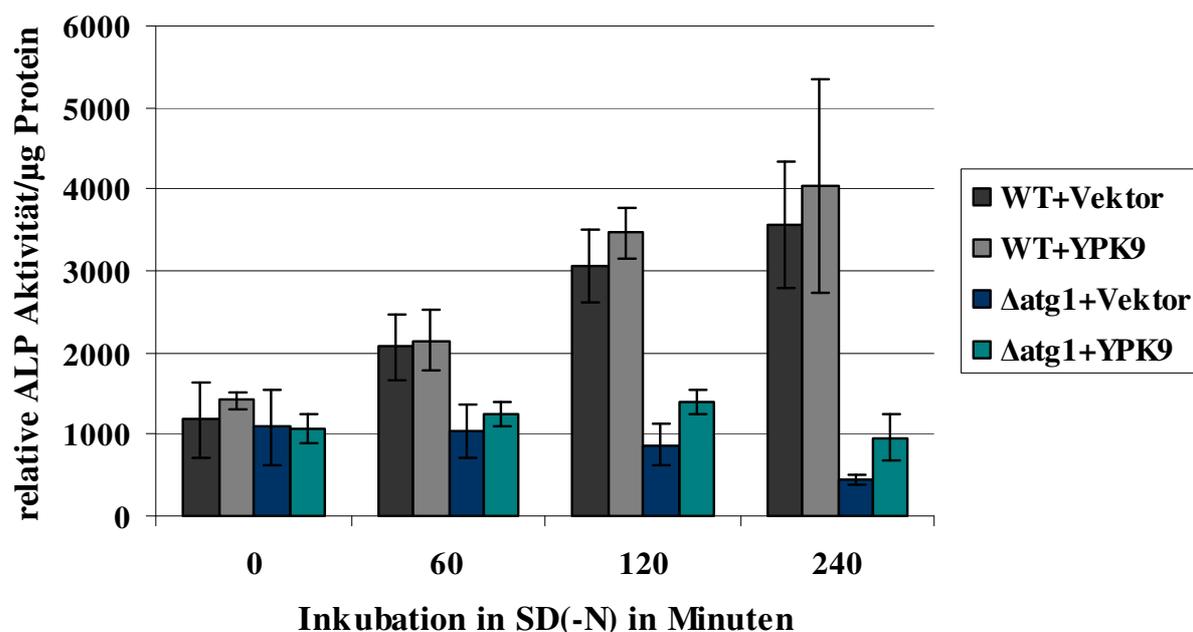


Abbildung 3-9: Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen in dreifacher Ausführung angefertigten Pho8 Δ 60-assays für die mit dem Plasmid 426-GPD-YPK9-GFP (+YPK9) bzw. mit dem entsprechenden Leervektor (+Vektor) transformierten WT- und Δatg1 -Zellen WT+Vektor, WT+YPK9, Δatg1 +Vektor und Δatg1 +YPK9. Zur Überprüfung einer Änderung der Autophagierate durch eine Überexpression von Ypk9 sind hier die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen ALP-Aktivität pro μg eingesetzten Proteins für die entsprechenden Stämme bei einer Probenentnahme zu den Zeitpunkten 0, 60, 120 und 240 Minuten nach der Induktion der Autophagie durch das Hungermedium SD(-N) dargestellt.

Anhand der vorangegangenen Versuche ließ sich für das YPK9-Protein in der Hefe keine Beteiligung an den Prozessen der Autophagie feststellen.

3.4 Einfluss von Ypk9 auf das Altern

Neurodegenerative Erkrankungen treten meist mit zunehmendem Alter auf. Sowohl beim Altern als auch bei der Neurodegeneration finden sich dieselben Zeichen zellulären Stresses, wie z. B. die Anhäufung missgefalteter Proteine.

Ein direkter Zusammenhang mit dem Altern findet sich für verschiedene P-Typ ATPasen, für die eine altersbezogene Aktivitätsänderung in Synaptosomen beobachtet werden konnte, die aus Rattengehirnen isoliert wurden (Torlinska und Grochowalska, 2004).

Zudem wurde 2002 von Haptemichael und Kovacs von einer verstärkten Expression der humanen Typ V P-Typ ATPase *ATP13A3* in alternden, parenchymalen Nierenzellen berichtet. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung des Ypk9-Proteins an den Prozessen des Alterns untersucht werden.

Für die Hefe *S. cerevisiae* haben sich im Wesentlichen zwei Arten der Messung des Alterns etabliert, die zwischen proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen unterscheiden (Bitterman *et al.*, 2003). Unter der replikativen Lebensspanne (*replicative life span*-RLS) versteht man die Anzahl an Tochterzellen, die von einer Mutterzelle produziert werden, wohingegen die chronologische Lebensspanne (*chronological life span*-CLS) als die Dauer definiert ist, die eine Zelle in einem sich nicht teilenden Zustand überleben kann (Kaeberlein *et al.*, 2007).

Ausgehend von den Beobachtungen von Haptemichael und Kovacs in replikativ seneszenten Zellen sollte in diesem Zusammenhang die RLS als Modell des Alterns in mitotisch aktiven Zellen für den $\Delta ypk9$ -Stamm im Vergleich zu WT-Zellen untersucht werden. Durch die asymmetrische Teilung der *S. cerevisiae*-Zellen ist die Unterscheidung zwischen Mutter- und Tochterzelle anhand ihrer Größe möglich (Fabrizio und Longo, 2003) und es wurden, wie in Kapitel 2.11.13 beschrieben, die Anzahl an Tochterzellen analysiert, die sowohl von $\Delta ypk9$ -Zellen als auch von WT-Zellen produziert wurden.

Abbildung 3-10 zeigt jeweils die so erhaltene Anzahl an durchlaufenen Generationen für 25 $\Delta ypk9$ - und 47 Wildtyp-Zellen, aus denen sich ein Mittelwert von 19,44 Generationen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und ein Mittelwert von 20,34 Generationen für den WT ergab.

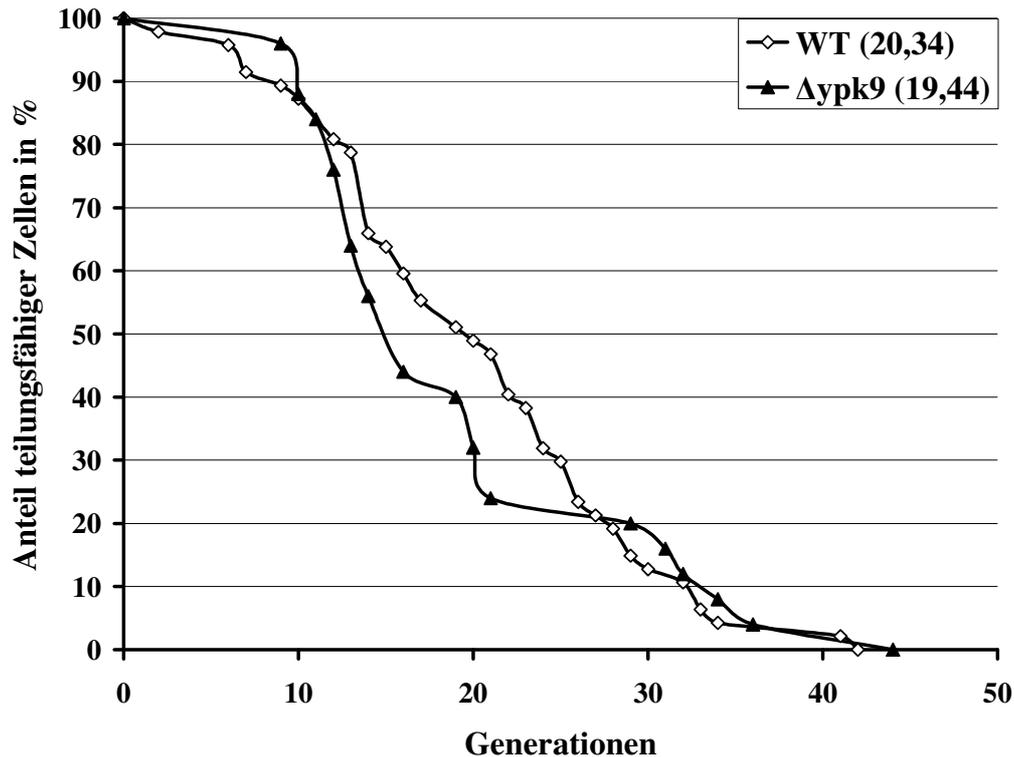


Abbildung 3-10: Dargestellt ist die replikative Lebensspanne anhand von $N=25$ Zellen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und $N=47$ Zellen für den WT-Stamm. Der Anteil an teilungsfähigen Zellen wurde gegen die Anzahl an bereits produzierten Tochterzellen (Generationen) aufgetragen. Für die RLS ergibt sich ein Mittelwert von 19,44 Generationen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und 20,34 Generationen für den WT-Stamm

In einem zweiten, unabhängigen Experiment wurde die RLS für 46 $\Delta ypk9$ - und 41 Wildtyp-Zellen ermittelt, aus denen sich ein Mittelwert von 21,96 Generationen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und ein Mittelwert von 20,51 Generationen für den WT ergab (Abbildung 3-11). Wurden die Daten aus beiden Experimenten zusammengefasst, ergab sich eine Anzahl an untersuchten Zellen von $N=71$ für den $\Delta ypk9$ -Stamm und $N=88$ für den WT. Es zeigte sich sowohl für den $\Delta ypk9$ -Stamm, als auch für den WT eine bereits in den beiden Einzelexperimenten andeutungsweise zu erkennende Kurve mit sigmoide Verlauf, was für eine Überlebenskurve dieser Art üblich ist (Steffen *et al.*, 2009). Es gibt kaum Abweichungen der beiden Kurven voneinander und auch der Wert für die mittlere RLS von 21,07 Generationen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und 20,42 Generationen für den WT liegen sehr nah beieinander (Abbildung 3-12). Aus diesen Werten würde sich durch die Abwesenheit des Ypk9 Proteins eine gegenüber dem WT um 4,3 % erhöhte RLS ergeben. Dieser Wert ist vernachlässigbar klein, womit gezeigt wurde, dass der $\Delta ypk9$ -Stamm keine auffälligen Veränderungen der RLS gegenüber dem WT zeigt.

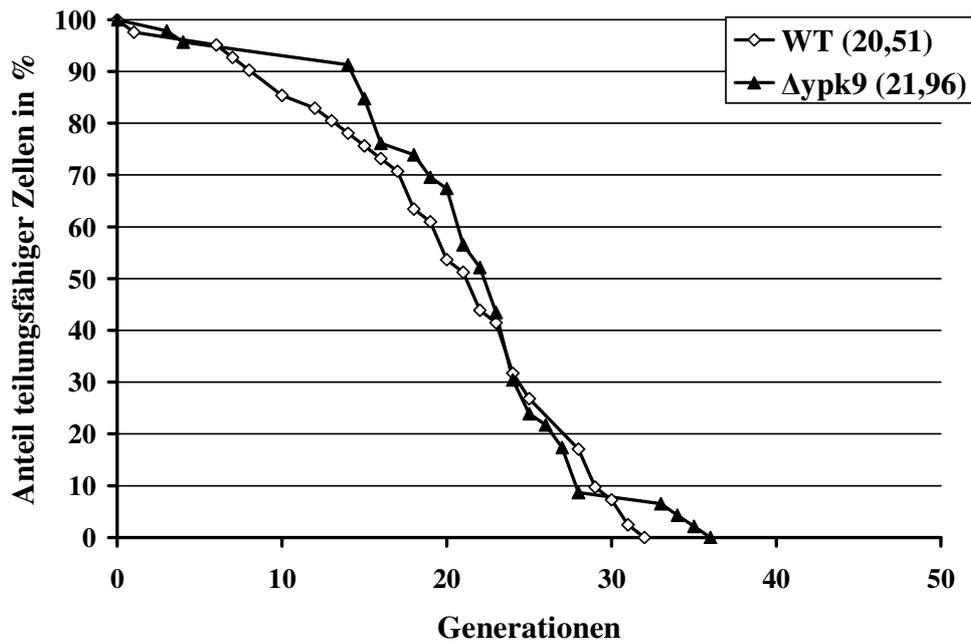


Abbildung 3-11: Gezeigt ist die replikative Lebensspanne eines zweiten unabhängigen Experiments anhand von N=46 Zellen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und N=41 Zellen für den WT. Der Anteil an teilungsfähigen Zellen wurde gegen die Anzahl an bereits produzierten Tochterzellen (Generationen) aufgetragen. Es ergaben sich für die RLS ein Mittelwert von 21,96 Generationen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und ein Mittelwert von 20,51 Generationen für den WT.

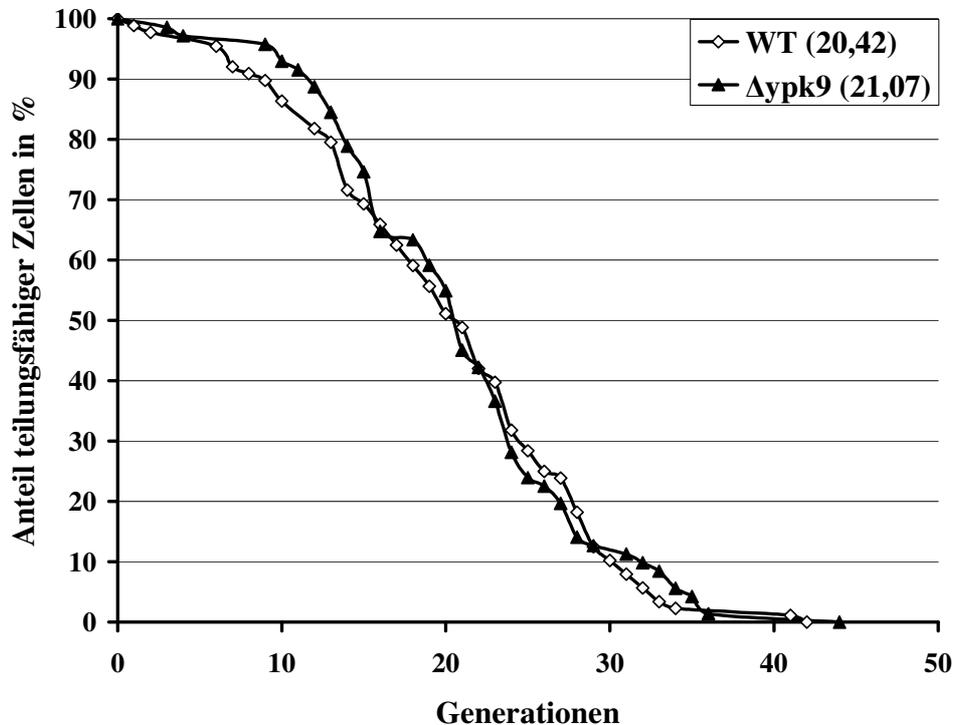


Abbildung 3-12: In diesem Diagramm ist die Überlebensrate für N=71 Zellen für den $\Delta ypk9$ -Stamm und N=88 Zellen für den WT zweier unabhängiger Experimente dargestellt. Der Anteil an teilungsfähigen Zellen wurde gegen die Anzahl an bereits produzierten Tochterzellen (Generationen) aufgetragen. Für den $\Delta ypk9$ -Stamm ergab sich eine mittlere RLS von 21,07 Generationen und für den WT von 20,42 Generationen.

3.5 α -Synuclein

3.5.1 Einfluss von Ypk9 auf die α -Synuclein Toxizität in *S. cerevisiae*

Wie bereits in Kapitel 1.1.1.1 erwähnt, verursachen Multiplikationen und Mutationen in dem für α -Synuclein codierenden Gen *SNCA* Parkinsonismus und es wurden bereits einige Untersuchungen bezüglich der Pathogenität von α -Synuclein in *S. cerevisiae* durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der α -Synuclein-Toxizität in *S. cerevisiae* und dem Ypk9-Protein untersucht werden. Vorausgegangene Studien zeigten, dass die *SNCA*-Gendosis mit dem Grad der Toxizität korreliert (Outeiro *et al.*, 2003), wobei bei einer Integration von zwei Kopien des *SNCA*-WT-Gens und der p.A53T Mutante in das Hefegenom ein toxischer Effekt gezeigt werden konnte. Zunächst sollten sowohl $\Delta ypk9$ - als auch WT-Stämme generiert werden, die α -Synuclein über einen Galaktose-induzierbaren Promoter in toxischen Mengen exprimieren können.

Zur Herstellung dieser Stämme wurden GATEWAY-Donor-Plasmide, welche das *SNCA*-Gen als WT und in Form der p.A53T Mutante enthielten und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Susan Lindquist, *Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge, USA, zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Die Gene wurden in einen integrativen Vektor gebracht und jeweils in zweifacher Kopie, einmal in den Leucin-Lokus (LEU) und einmal in den Histidin-Lokus (HIS), in den $\Delta ypk9$ -Stamm und den WT integriert. Der verwendete Vektor enthielt einen Galaktose-Promoter, welcher das Anschalten der Expression mittels Galaktose erlaubte und bei dem keine Expression unter einem Wachstum in Glukose stattfand. Die erhaltenen Stämme enthielten somit zwei Galaktose induzierbare Kopien des *SNCA*-WT-Gens oder der p.A53T-Mutante. Zur Kontrolle diente ein Stamm, bei dem der leere Vektor in den LEU- und den HIS-Lokus integriert wurde.

Von den verschiedenen α -Synuclein-Stämmen wurden während der logarithmischen Wachstumsphase Verdünnungsreihen erstellt, welche auf Selektionsplatten, die entweder Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle enthielten, aufgetropft und für zwei bis fünf Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

Abbildung 3-13 zeigt das Wachstum der verschiedenen α -Synuclein exprimierenden Stämme auf Glukose, d. h. ohne α -Synuclein Expression, und auf Galaktose, welche die α -Synuclein Expression induziert. Alle aufgetropften Stämme wachsen auf Glucose sowohl bei 30°C als auch bei 37°C gleichermaßen. Die mit dem leeren Vektor transformierten Kontrollstämme der WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen zeigten bei beiden Temperaturen wie erwartet kein verschlechtertes

Wachstum auf Galaktose. Sowohl WT- als $\Delta ypk9$ -Zellen, welche α -Synuclein-WT exprimierten, zeigten bei 30°C ein leicht verschlechtertes Wachstum auf Galaktose, bei 37°C konnte für beide Stämme gar kein Wachstum beobachtet werden. WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen, welche α -Synuclein-A53T exprimierten, zeigten bei 30°C nur ein sehr schwaches Wachstum auf Galaktose, bei 37°C konnte für beide Stämme gar kein Wachstum beobachtet werden. In den Stämmen, die α -Synuclein-WT exprimierten, scheint das α -Synuclein-WT-Protein bei 30°C eine nur sehr schwache Toxizität auszulösen, welche jedoch durch den zusätzlichen Zellstress bei 37°C so stark ist, dass die Zellen kein Wachstum mehr zeigten. Das mutierte α -Synuclein-A53T-Protein ruft bereits bei 30°C eine starke Toxizität hervor; auch bei 37°C war kein Wachstum zu beobachten. Unterschiede zwischen dem $\Delta ypk9$ -Stamm und dem WT konnten für keine der Bedingungen festgestellt werden. Die Toxizität des α -Synucleins wurde also durch einen Funktionsverlust von Ypk9 nicht noch zusätzlich verstärkt.

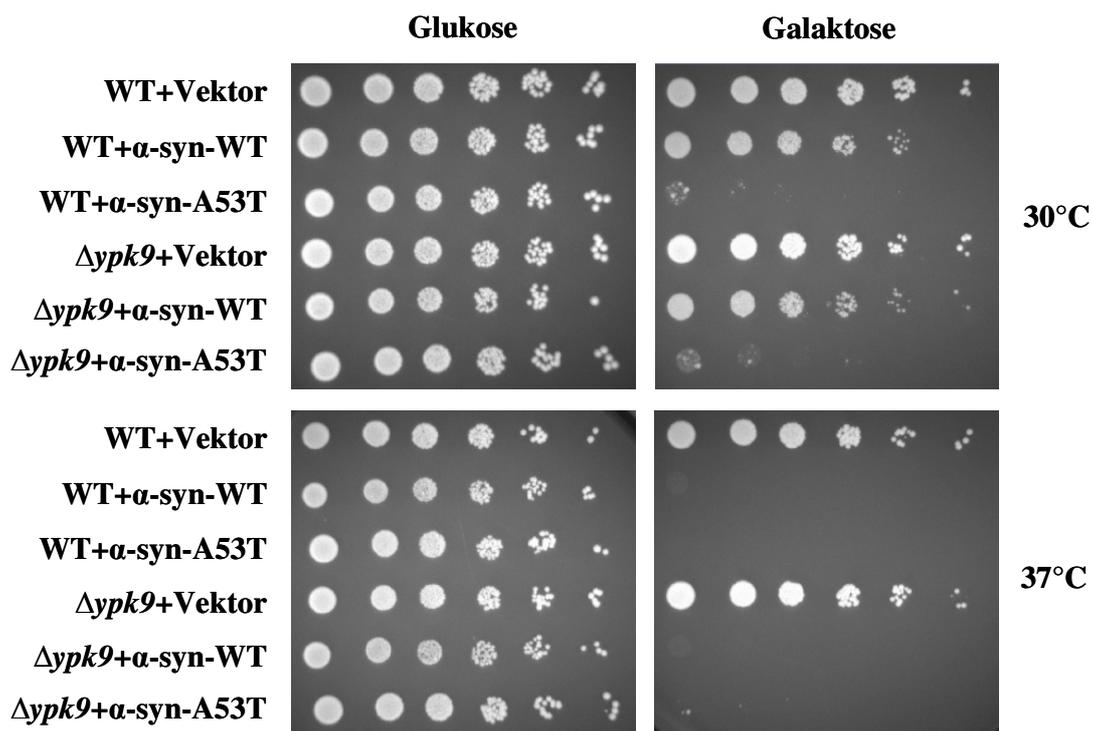


Abbildung 3-13: Gezeigt ist das Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen, die mit verschiedenen α -Synuclein-Konstrukten transformiert wurden. Die α -Synuclein Expression wird erst durch das Wachstum auf Galaktose induziert.

3.5.2 Die Toxizität von α -Synuclein und Mangan wirkt nicht additiv

Wie in Kapitel 3.5.1 gezeigt, wird die durch Überexpression induzierte Toxizität von α -Synuclein nicht durch die Abwesenheit des Ypk9-Proteins verstärkt. Um einen möglichen additiven Effekt der Toxizität von α -Synuclein und Mangan (siehe 3.7) in WT oder $\Delta ypk9$ Zellen feststellen zu können, wurden die bereits in Kapitel 3.5 beschriebenen α -Synuclein exprimierenden Stämme auch auf SC-Platten mit Galaktose und Mangan getropft. Abbildung 3-14 zeigt, dass sowohl für den WT-, als auch für den $\Delta ypk9$ -Stamm keine erhöhte Toxizität für die α -Synuclein-WT- und α -Synuclein-A53T-exprimierenden Stämme auf den SC-Platten mit Galaktose und Mangan zu erkennen ist. Gerade anhand der α -Synuclein-WT-exprimierenden Stämmen, bei denen auf der SC-GAL Platte nur ein sehr geringes Wachstumsdefizit zu erkennen ist, welches jedoch durch das generell schlechtere Wachstum aller Stämme auf den manganhaltigen Platten nicht mehr zum Vorschein kommt, ist erkennbar, dass vermutlich kein additiver Effekt vorliegt.

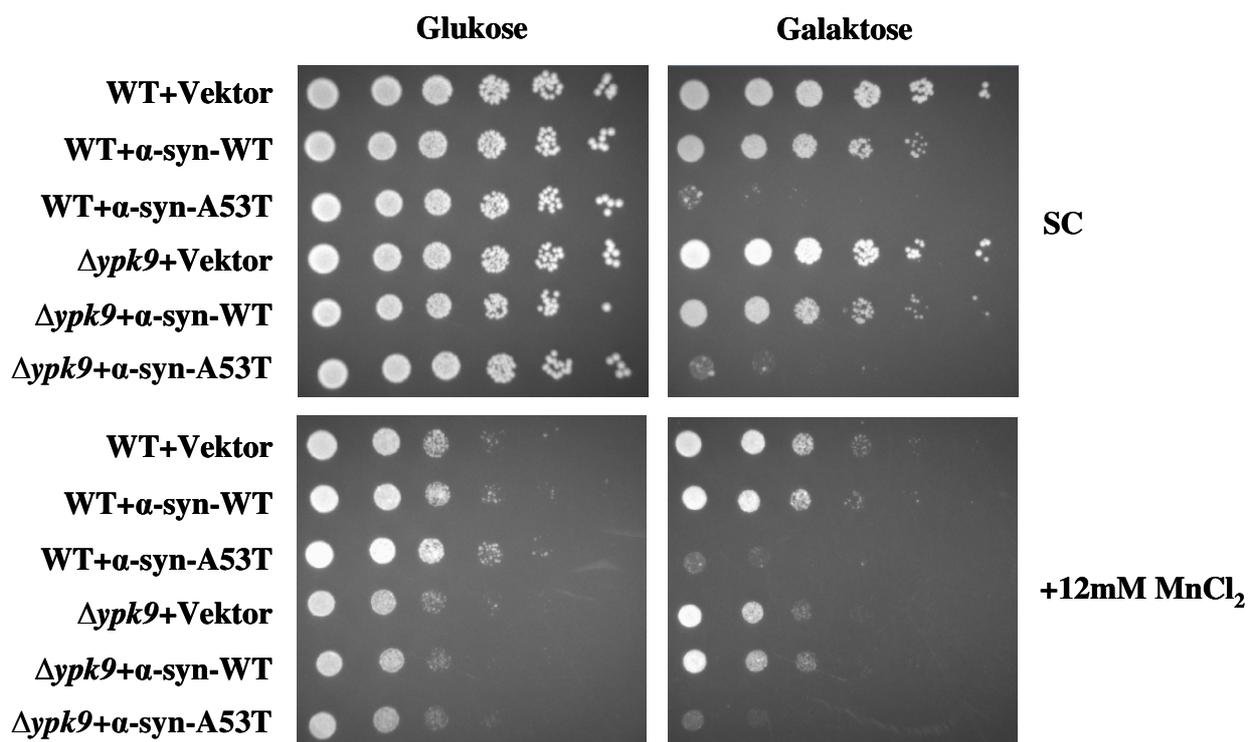


Abbildung 3-14: Gezeigt ist das Wachstum von WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen, die mit verschiedenen α -Synuclein-Konstrukten transformiert wurden, auf SC-Platten mit Glukose oder Galaktose mit und ohne 12 mM Mangan. Die α -Synuclein-Expression wird erst durch das Wachstum auf Galaktose induziert.

3.6 Einfluss von *YPK9* auf die Homöostase von Metallionen

Über die Substrate von Typ V P-Typ ATPasen liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. Für P-Typ ATPasen der anderen Subgruppen ist jedoch ein breites Spektrum an Substraten bekannt, zu denen u. a. verschiedene Metallionen gehört. Einige Leichtmetalle, wie die zu den Alkalimetallen gehörenden Elemente Natrium und Kalium, sowie das zu den Erdalkalimetallen gehörende Calcium, sind Substrate der Typ II ATPasen. Typ IB ATPasen sind hingegen zum einen für die Entfernung von toxischen Schwermetallionen, wie z. B. Cu^{2+} und Zn^{2+} , welche der 11. und 12. Gruppe des Periodensystems angehören, aus der Zelle zuständig. Sie können aber zum anderen auch für deren Bereitstellung in verschiedene Organellen sorgen.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Ypk9 und dem Transport oder einer Detoxifizierung verschiedener Metallionen zu untersuchen, wurde das Wachstum des $\Delta ypk9$ -Stammes unter semitoxischen Konzentrationen verschiedener Leicht- und Schwermetalle getestet. Die verwendeten Chloride, Sulfate und Oxide der entsprechenden Metalle und ihre Konzentrationen sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

Metalle	Konzentration
NaCl_2	1M
KCl	500mM/750mM
CaCl_2	500mM
MnCl_2	2-12mM
FeCl_3	6mM/9mM
NiCl_2	2,5mM
CuSO_4	1,2mM/2,4mM
ZnCl_2	5mM
MoO_3	15mM/30mM

Tabelle 3-2: Dargestellt sind die verschiedenen Metalle und deren Konzentrationen, die bezüglich eines möglichen Wachstumsphänotyps für den $\Delta ypk9$ -Stamm getestet wurden.

Für die Prüfung auf Sensitivität gegenüber den Metallen wurden sowohl vom $\Delta ypk9$ -Stamm als auch vom WT während der logarithmischen Wachstumsphase Verdünnungsreihen erstellt. Diese wurden auf die verschiedenen metallhaltigen Platten aufgetropft und für zwei bis fünf Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

Bei dem Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen auf YPD-Platten, welche die in Tabelle 3-2 angegebenen Konzentrationen an Natrium und Kalium enthielten, konnte keine erhöhte Sensitivität oder Resistenz von $\Delta ypk9$ -Zellen gegenüber dem WT beobachtet werden. Sowohl bei 30°C als auch bei 37°C wuchsen beide Stämme gleichermaßen.

Für das Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen auf YPD-Platten mit relativ hohen Konzentrationen von Calcium (500 mM) konnte jedoch eine leicht erhöhte Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stammes gegenüber WT-Zellen festgestellt werden. Dies galt jedoch nur bei 37°C, während für 30°C kein verändertes Wachstum festgestellt werden konnte (Abbildung 3-15). Für niedrigere Calcium-Konzentrationen (100 und 250 mM) ließ sich sowohl bei 30°C als auch bei 37°C kein Wachstumsdefizit beobachten.

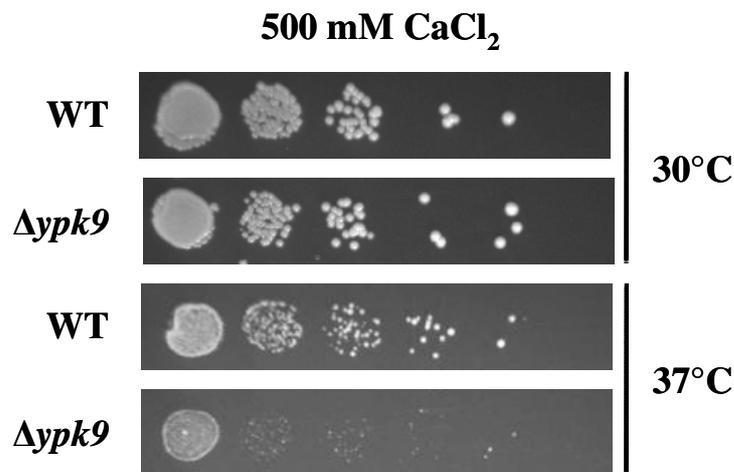


Abbildung 3-15: : Dargestellt ist das Wachstum von Verdünnungsreihen von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen, die auf YPD-Platten mit 500 mM CaCl₂ aufgetragen und bei 30°C und 37°C inkubiert wurden.

Abbildung 3-16 zeigt das Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen mit den Schwermetallen Eisen, Nickel und Zink für die in Tabelle 3-2 angegebenen Konzentrationen bei 30°C und bei 37°C. Es zeigte sich für keines dieser Metalle ein verändertes Wachstum der $\Delta ypk9$ -Zellen verglichen mit dem WT.

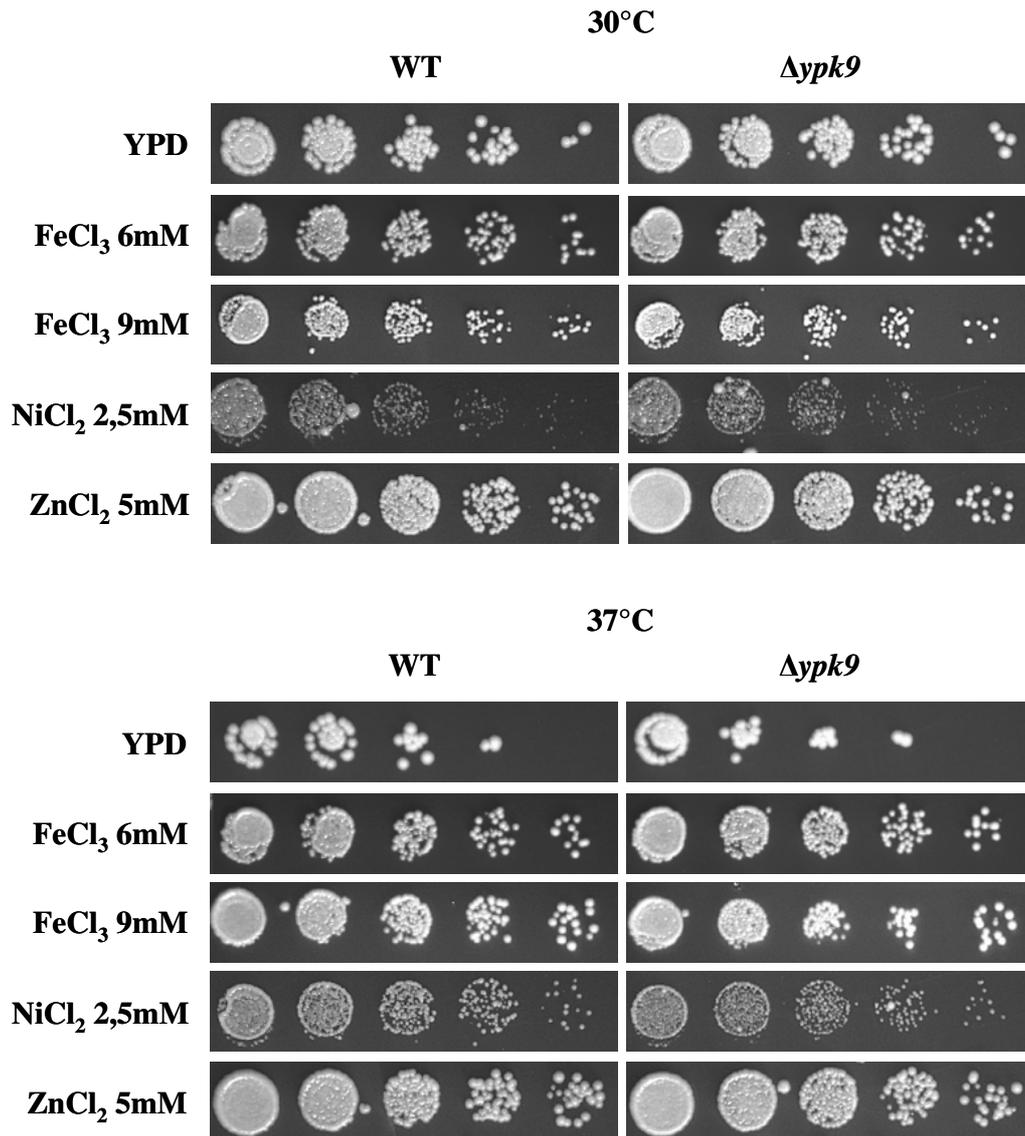


Abbildung 3-16: Dargestellt ist das Wachstum von Verdünnungsreihen von *Δypk9*- und WT-Zellen, die auf YPD-Platten, die verschiedene Metalle in teilweise unterschiedlichen Konzentrationen enthielten, aufgetropft wurden.

Bei dem Wachstum von *Δypk9*- und WT-Zellen auf YPD-Platten, welche die in Tabelle 3-2 angegebenen Konzentrationen an Kupfer und Molybdän enthielten, konnte ebenfalls keine erhöhte Sensitivität oder Resistenz des *Δypk9* Stammes gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden. Sowohl bei 30°C, als auch bei 37°C wuchsen beide Stämme gleichermaßen.

Unter allen bisher getesteten Metallen konnte für den *Δypk9*-Stamm somit lediglich ein leichter Wachstumsdefekt für hohe CaCl₂-Konzentrationen bei einer Inkubationstemperatur von 37°C festgestellt werden.

3.7 $\Delta ypk9$ ist sensitiv gegenüber Mangan

Ein weiteres Metall, auf das der $\Delta ypk9$ -Stamm getestet wurde, ist Mangan. Mangan ist das erste Element der 7. Gruppe des Periodensystems, welche daher auch als Mangangruppe bezeichnet wird. Es ist das auf der Erde am zwölft häufigsten vorkommende Element und zählt mit einer Dichte von $7,47 \text{ g/cm}^3$ zu den Schwermetallen. Mangan ist als Kofaktor von Enzymen ein für alle Lebewesen essentielles Element, kann aber bei zu hohen Konzentrationen leicht toxisch wirken. Beim Menschen führt es bei einer längeren, meist mehrjährigen Aufnahme vor allem durch die Atemwege zum so genannten Manganismus. Häufig sind Arbeiter von Bergwerken oder Batteriefabriken von diesem, dem Parkinsonismus ähnelnden, Krankheitsbild betroffen und zeigen u. a. Schädigungen des Nervensystems.

Während der logarithmischen Wachstumsphase von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen wurden Verdünnungsreihen erstellt, die auf YPD-Platten mit verschiedenen Mangan-Konzentrationen aufgetropft und für zwei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert wurden.

Abbildung 3-17 zeigt die Ergebnisse des Wachstums von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen auf YPD-Platten mit 0, 2 und 4 mM Mangan. Hierbei zeigte sich ein leichtes Wachstumsdefizit für die $\Delta ypk9$ -Zellen gegenüber den WT-Zellen bei 4 mM Mangan. Bei einer Konzentration von 8 mM Mangan in YPD fand sowohl bei den $\Delta ypk9$ - als auch bei den WT-Zellen kein Wachstum mehr statt. Für eine Inkubation bei 37°C ließen sich ähnliche Beobachtungen machen.

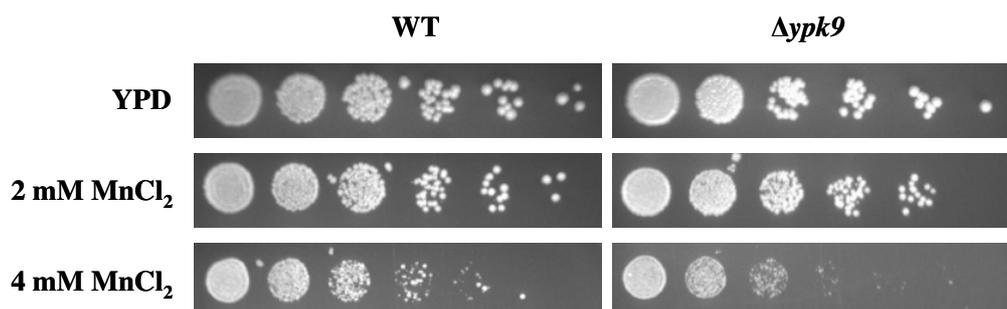


Abbildung 3-17: Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen auf YPD Platten mit 0, 2 und 4 mM Mangan bei 30°C .

In SC-Medium, welches zwar alle nötigen Bestandteile zum Wachstum der Hefezellen enthält, im Gegensatz zu YPD-Medium jedoch nicht als optimales Wachstumsmedium gilt, lassen sich oft von einem Wachstum in YPD-Medium abweichende Beobachtungen machen.

Aus diesem Grund sollte das Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen in Gegenwart von Mangan auch in SC-Medium untersucht werden. Abbildung 3-18 zeigt das Wachstum der beiden Stämme auf SC-Platten mit 0, 2, 4 und 8 mM Mangan. Abweichend von den YPD-Platten ist hier kein Unterschied zwischen dem Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen bei 4 mM Mangan zu beobachten. Dagegen hemmt die Zugabe von 8 mM Mangan das Wachstum beider Stämme zwar nicht komplett, hier ist aber ein leichtes Wachstumsdefizit für die $\Delta ypk9$ Zellen gegenüber den WT Zellen zu erkennen.

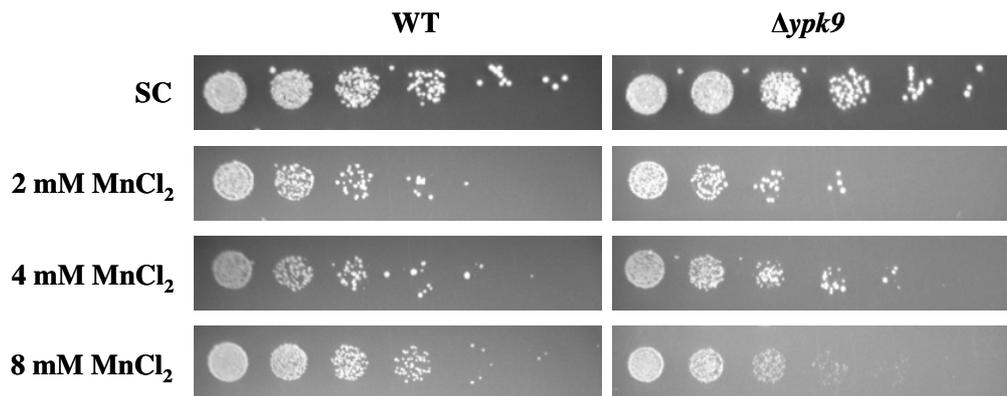


Abbildung 3-18: Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen auf YPD Platten mit 0, 2, 4 und 8 mM Mangan bei 30°C.

Um möglicherweise ein deutlicheres Wachstumsdefizit erkennen zu können, wurden zwei weitere Mangan-Konzentrationen in SC-Medium getestet. Abbildung 3-19 zeigt das Wachstum von $\Delta ypk9$ und WT-Zellen mit 10 und 12 mM Mangan.

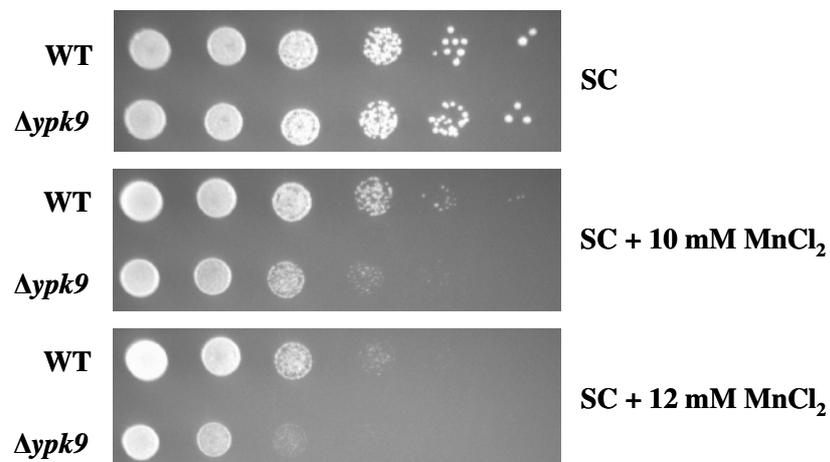


Abbildung 3-19: Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen auf YPD Platten mit 0, 10 und 12 mM Mangan bei 30°C.

Sowohl auf SC+10 mM Mangan als auch auf SC+12 mM Mangan lässt sich ein größerer Unterschied des Wachstums von $\Delta ypk9$ -Zellen gegenüber den WT-Zellen erkennen. Am deutlichsten ist das Wachstumsdefizit bei 12 mM Mangan.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob dieser Wachstumsphänotyp auch in einer Flüssigkultur zu beobachten ist. Dies wurde im 96-well-Format durchgeführt, wobei $\Delta ypk9$ - und WT-Kulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, zum Animpfen der 200 μ l Medium enthaltenen wells verwendet wurden. Für jeden Stamm wurden für jede der getesteten Mangan-Konzentrationen sechs wells angeimpft. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 30°C erfolgte die Messung der OD₆₀₀ in einem Plattenlesegerät. Abbildung 3-20 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments. Für beide Stämme lässt sich deutlich eine statistisch signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen, wobei mit einem zunehmenden Mangangehalt im Medium auch die Differenz des Wachstums zwischen $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen steigt. Bei einer Konzentration von 8 mM Mangan beträgt die Differenz 10 %, bei einer Konzentration von 14 mM Mangan beträgt sie 19 %.

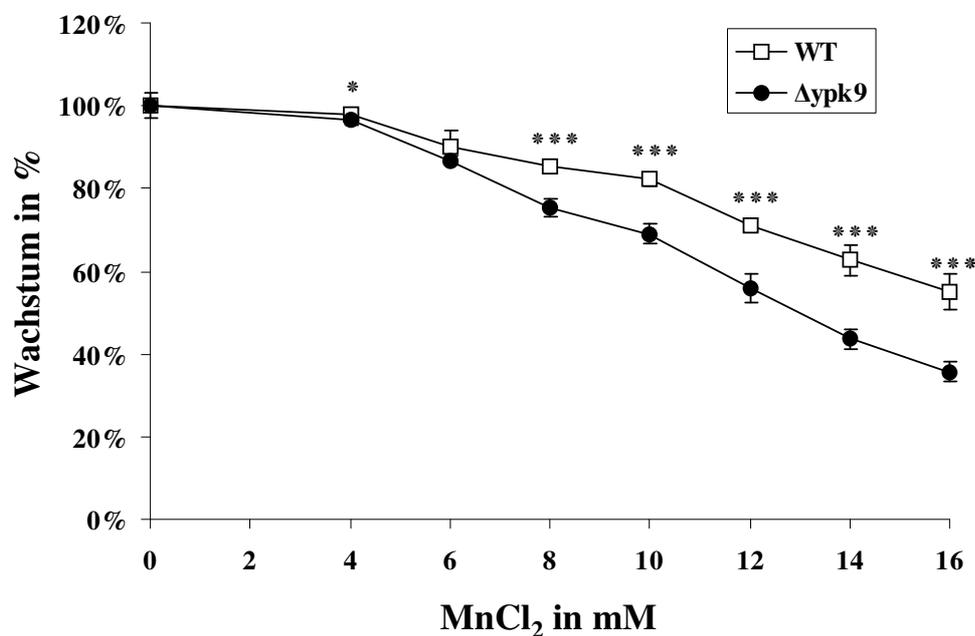


Abbildung 3-20: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, von jeweils sechs Messwerten, des Wachstumsverhaltens von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen in einer Flüssigkultur bei Mangan-Konzentrationen von 0-16 mM. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 24 Stunden bei 30°C. P-Werte: * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001, t-Test nach Student.

Um zu prüfen, ob die beobachtete Sensitivität gegenüber Mangan des $\Delta ypk9$ -Stammes wirklich auf den Verlust des Ypk9-Proteins zurückzuführen ist, sollte getestet werden, ob es durch die Expression des Ypk9-Proteins von einem Expressionsvektor zu einer Rettung des Phänotyps kommt. Dazu wurde das *YPK9*-Gen inklusive ca. 500bp *upstream* des Startcodons und ca. 300bp *downstream* des Stoppcodons mittels PCR von aus WT-Hefezellen isolierter genomischer DNA amplifiziert. Mittels der Restriktionschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I, welche sich auch in den verwendeten Primern befanden, wurde das amplifizierte Gen in den episomalen Vektor YEplac195 (Gietz und Sugino, 1988) kloniert. Als Kontrolle dienten zum einen der Leervektor, zum anderen die Mutante Ypk9_{D781N}, die durch einen Austausch der während der ATP-Hydrolyse phosphorylierten Asparaginsäure gegen Asparagin keine ATPase-Aktivität mehr besitzen sollte und somit als Null-Mutante gelten darf. Die verschiedenen Plasmide wurden in $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen transformiert und die Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe auf die verschiedenen Platten aufgetropft. Abbildung 3-21 zeigt das Wachstum der verschiedenen Stämme nach einer Inkubation von drei Tagen bei 30°C. Die Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stamms gegenüber dem Zusatz von 12 mM Mangan ließ sich durch die Expression des Ypk9-Proteins vom Plasmid retten, die Expression der Mutante Ypk9_{D781N} zeigte jedoch keinen Effekt. Somit lässt sich eindeutig sagen, dass der Verlust der Aktivität des Ypk9-Proteins zu einer Hypersensitivität gegenüber Mangan führt.

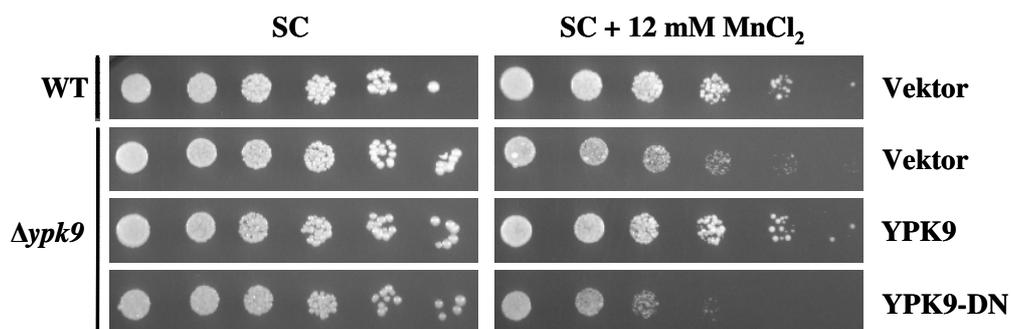


Abbildung 3-21: Dargestellt ist das Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen, die mit einem Leervektor transformiert wurden und von $\Delta ypk9$ -Zellen, die Ypk9 oder die funktionslose Mutante Ypk9_{D781N} von einem Plasmid exprimieren. Es wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Stämme auf SC-URA-Platten mit und ohne 12 mM Mangan aufgetropft und die Platten wurden bei 30°C inkubiert.

3.8 Komplementation von Ypk9 mit dem humanen Atp13a2

Da die Beteiligung des Ypk9-Proteins an der erhöhten Mangan-Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stammes anhand der Ergebnisse in Abbildung 3-21 deutlich zu erkennen ist, sollte überprüft werden, ob die Funktion des Ypk9-Proteins in der Hefezelle auch durch das humane Atp13a2-Protein übernommen werden kann. Auf diesem Weg könnte zum einen gezeigt werden, dass beide Proteine eine ähnliche Funktion ausüben; zum anderen könnte so ein System zur Prüfung der Pathogenität verschiedener in Patienten identifizierter Mutationen im *ATP13A2*-Gen generiert werden. Zu diesem Zweck wurde das *ATP13A2*-Gen in verschiedene Hefevektoren kloniert, welche wiederum in $\Delta ypk9$ -Zellen transformiert wurden. Abbildung 3-22 zeigt das Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen, die mit dem leeren Vektor 426-GPD-GFP transformiert wurden und von $\Delta ypk9$ -Zellen, die Atp13a2-GFP von selbigem Plasmid über einen GPD-Promoter exprimieren. Die Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stammes gegenüber dem Zusatz von 12 mM Mangan lässt sich durch die Expression von Atp13a2-GFP nicht supprimieren. Zur Überprüfung des Expressionslevels wurden Westernblot-Analysen der Zell-Lysate durchgeführt. Diese zeigten kein Signal für Atp13a2. Somit liegt die Vermutung nahe, dass das humane Protein bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Hefezelle abgebaut wird.

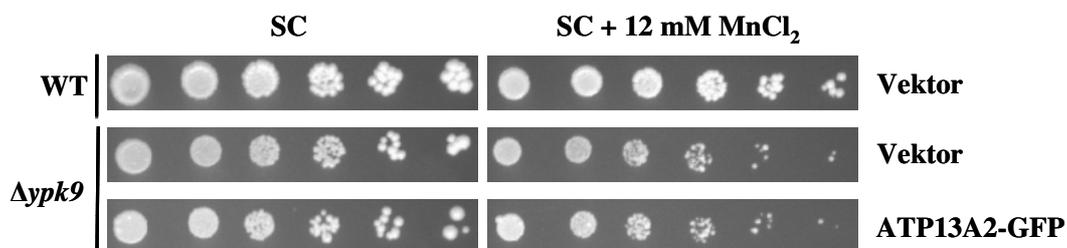


Abbildung 3-22: Dargestellt ist das Wachstum von $\Delta ypk9$ und WT Zellen, die mit dem leeren Vektor 426-GPD-GFP transformiert wurden und von $\Delta ypk9$ -Zellen, die ATP13A2-GFP von selbigem Plasmid über einen GPD-Promoter exprimieren. Es wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Stämme auf SC-URA-Platten mit und ohne 12 mM Mangan aufgetropft und die Platten wurden bei 30°C inkubiert.

Um auszuschließen, dass das GFP durch eine mögliche Beeinflussung auf die korrekte Faltung der ATPase beim Abbau des Proteins eine Rolle spielt und somit dafür verantwortlich ist, dass es zu keiner Rettung der Mangan-Sensitivität durch Atp13a2 kommt, wurde die

Expression des Proteins mit verschiedenen anderen Plasmiden getestet. Das Protein sollte von verschiedenen Promotoren und mit verschiedenen *tags* im N- und C-terminalen Bereich bzw. ohne *tag* exprimiert werden. Abbildung 3-23 zeigt anhand des Wachstums von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen, die mit dem leerem Vektor YEplac181-ADH transformiert wurden, und von $\Delta ypk9$ -Zellen, die Atp13a2-V5 von selbigem Plasmid über einen ADH-Promoter exprimieren, dass die Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stammes gegenüber dem Zusatz von 12 mM Mangan durch keines der getesteten Konstrukte revidiert werden konnte.

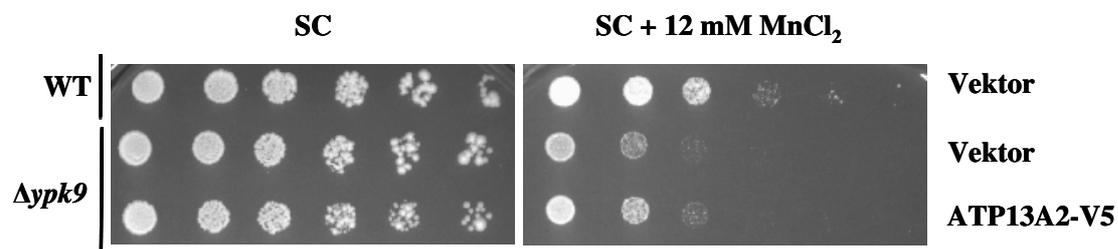


Abbildung 3-23: Gezeigt ist das Wachstum von $\Delta ypk9$ - und WT-Zellen, die mit dem leerem Vektor YEplac181-ADH transformiert wurden und von $\Delta ypk9$ -Zellen, die ATP13A2-V5 von selbigem Plasmid über einen ADH-Promoter exprimieren. Es wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Stämme auf SC-URA-Platten mit und ohne den Zusatz von 12 mM Mangan aufgetropft und die Platten wurden bei 30°C inkubiert.

Es konnte somit keine übereinstimmende Funktion der beiden Proteine Ypk9 und Atp13a2 nachgewiesen werden, was aber durchaus darauf zurückzuführen sein könnte, dass das Atp13a2-Protein nicht in funktionsfähiger Form in der vakuolären Membran vorlag.

3.9 Die Rolle von Ypk9 im Manganstoffwechsel von *S.cerevisiae*

Wie viele andere Schwermetalle ist auch Mangan ein wichtiger Bestandteil der Zelle. Es ist als Kofaktor für verschiedene Metalloenzyme, wie z. B. Oxidasen, Dehydrogenasen, Glycosyltransferasen oder DNA-Polymerasen unerlässlich, und wird in verschiedenen Zellkompartimenten benötigt. Ein zu hoher Gehalt an Mangan in der Zelle ist jedoch toxisch; daher benötigt die Zelle ein System, um ein Gleichgewicht zur Gewährleistung der richtigen Menge an Mangan zu schaffen. Zum Erhalt der Mangan-Homöostase ist neben der Bereitstellung von Mn^{2+} -Ionen innerhalb der Zelle eine Entgiftung bei zu hohen Mn^{2+} -Konzentrationen, z. B. durch das Ausschleusen der Ionen aus der Zelle, notwendig (Culotta *et al.* 2005). Die Vakuole spielt dabei neben dem sekretorischen Pfad eine große Rolle zur Entgiftung von überschüssigem Mangan, da durch die Aufnahme des Mangans in die Vakuole andere Organellen vor Schäden durch Mn^{2+} -Ionen geschützt werden.

3.9.1 Ypk9 und der vakuoläre Transporter Ccc1

Es wird vermutet, dass überschüssiges Mangan in der Hefe über den vakuolären putativen Fe^{2+}/Mn^{2+} -Transporter Ccc1 in die Vakuole transportiert und die Zelle so geschützt wird. Ccc1 ist ein membranständiger Transporter der Vakuole, der jedoch neben der Anreicherung von Mangan auch für die Akkumulierung von Eisen in der Vakuole sorgt (Li *et al.*, 2001). Lapinskas *et al.* zeigen, dass $\Delta ccc1$ -Zellen sensitiv gegenüber Mangan sind (ab 10 mM) und Ccc1 in der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert. Die subzelluläre Lokalisation konnte von Li *et al.* jedoch nicht bestätigt werden.

Um eine mögliche Interaktion zwischen Ypk9 und dem Netzwerk der an der Erhaltung der Mangan-Homöostase beteiligten Proteine besser zu verstehen, sollten Untersuchungen des Doppel-Deletionsstamms $\Delta ccc1\Delta ypk9$ durchgeführt werden. Die Deletion des *YPK9*-Gens in dem $\Delta ccc1$ -Stamm erfolgte dabei mittels homologer Rekombination durch die Integration einer natMX4-Kassette, welche eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Nourseothricin vermittelt, mit gleichzeitiger Deletion des *YPK9*-Gens (Goldstein *et al.*, 1999).

Von den verschiedenen Stämmen wurden Verdünnungsreihen von Kulturen der logarithmischen Wachstumsphase angefertigt und auf Platten aufgetropft. Abbildung 3-24 zeigt das Wachstum der Stämme auf SC-Platten mit und ohne den Zusatz von 12 mM $MnCl_2$ bei 30 und 37°C. Für den $\Delta ccc1$ -Stamm ist hier entgegen der Erwartung keine Sensitivität gegenüber Mangan zu erkennen. Der $\Delta ccc1\Delta ypk9$ -Stamm zeigt eine gleich starke Sensitivität

gegenüber Mangan wie der $\Delta ypk9$ -Stamm. Die Abwesenheit beider Proteine scheint somit keinen additiven Effekt zu haben.

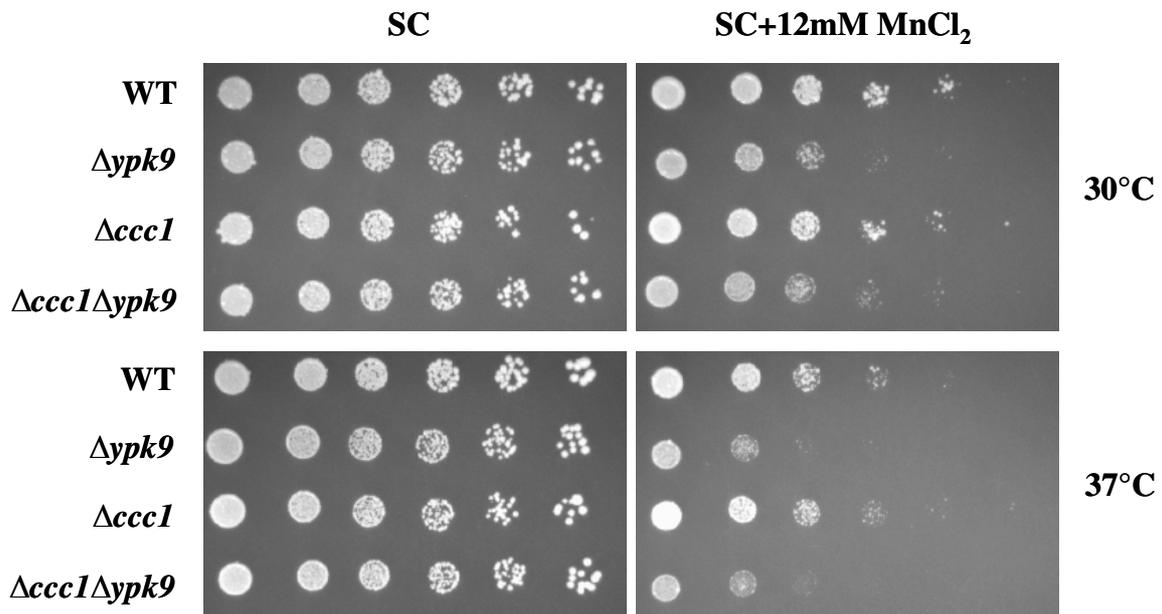


Abbildung 3-24: Dargestellt ist das Wachstum von WT-, $\Delta ypk9$ - und $\Delta ccc1$ -Zellen sowie des Doppel-Deletionsstamms $\Delta ccc1\Delta ypk9$ auf SC-Platten mit und ohne den Zusatz von 12 mM Mangan bei 30°C und 37°C.

Um zu prüfen, ob die Überexpression von Ccc1 einen Effekt auf den Phänotyp der $\Delta ypk9$ -Zellen hat und diesen möglicherweise retten kann, wurden $\Delta ypk9$ -Zellen mit dem Expressionsvektor pYES2-CCC1 transformiert. Dieser wurde freundlicherweise von Jerry Kaplan, *Department of Pathology, University of Utah, Salt Lake City, USA*, zur Verfügung gestellt. Die Expression von Ccc1 erfolgt durch einen Galaktose Promoter.

Abbildung 3-25 zeigt das Wachstum von WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen, die mit dem Leervektor oder mit dem Expressionsvektor pYES-CCC1 transformiert wurden, auf SC-URA-Platten mit Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle und mit und ohne den Zusatz von 12 mM Mangan bei 30°C. Die auf den SC-URA-Platten mit Glukose und 12 mM Mangan vorliegende Sensitivität der Ccc1-exprimierenden $\Delta ypk9$ -Zellen gegenüber Mangan ist auf SC-URA-Platten mit Galaktose und 12 mM Mangan nicht zu beobachten. Die Mangan-Sensitivität der $\Delta ypk9$ -Zellen kann somit durch eine Überexpression von Ccc1 supprimiert werden.

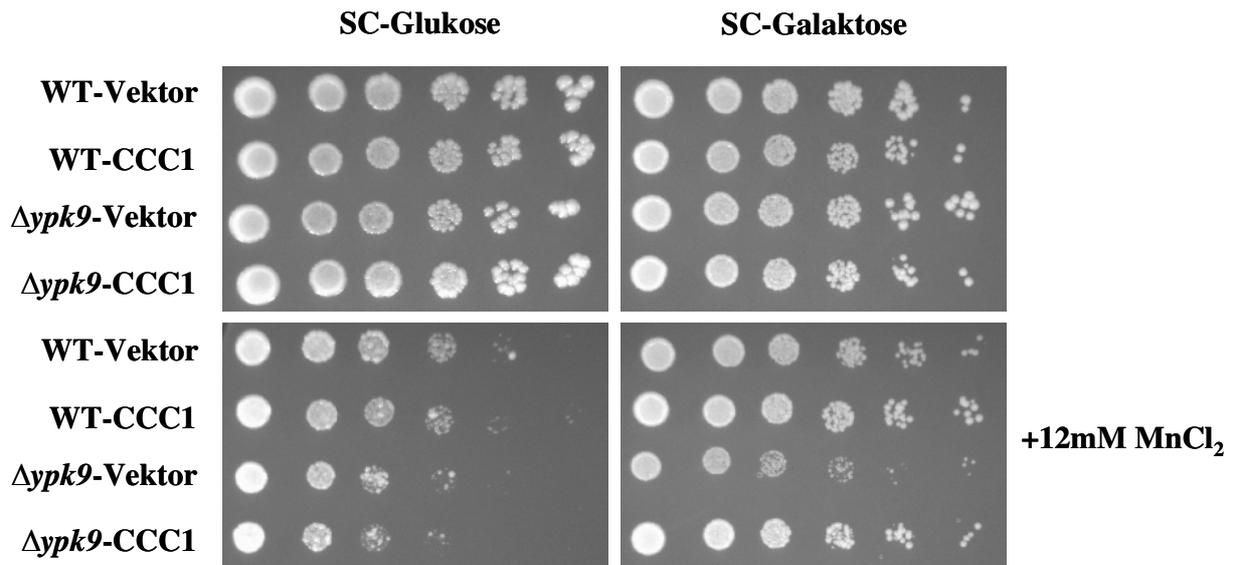


Abbildung 3-25: Dargestellt ist das Wachstum von WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen, die mit dem Expressionsvektor pYES-CCC1 oder dem entsprechenden Leervektor transformiert wurden. Die Stämme wurden auf SC-URA-Platten mit Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle und mit und ohne den Zusatz von 12 mM Mangan aufgetropft und bei 30°C inkubiert.

3.9.2 Ypk9 und das ACDP-Membranprotein Mam3

Ein weiteres Protein der vakuolären Membran, welches an der Mangan-Homöostase beteiligt ist, ist Mam3, welches zur Familie der *ancient conserved domain proteins* (ACDP) gehört (Wang *et al.*, 2003). Mam3 defiziente Zellen sind dabei im Gegensatz zu den bisher erwähnten Proteinen tolerant gegenüber hohen Mangan-Konzentrationen; bisher ist über den beteiligten molekularen Mechanismus jedoch nichts bekannt. Interessanterweise konnten in $\Delta mam3$ Zellen keine Veränderungen der Mangan-Konzentration in der Vakuole detektiert werden und es konnte außerdem keine Interaktion mit bereits bekannten Mangan-Transportpfaden festgestellt werden (Yang *et al.*, 2004).

Um eine mögliche Interaktion zwischen Ypk9 und Mam3 untersuchen zu können, wurde der Doppel-Deletionsstamm $\Delta mam3\Delta ypk9$ hergestellt und zusammen mit WT-, $\Delta ypk9$ - und $\Delta mam3$ -Zellen in Verdünnungsreihen auf SC-Platten mit und ohne den Zusatz von 12 mM bzw. 50 mM Mangan aufgetropft und bei 30 und 37°C inkubiert. Abbildung 3-26 zeigt das Wachstum dieser Stämme. Für $\Delta mam3$ ist deutlich die Toleranz gegenüber hohen Mangan-Konzentrationen zu erkennen. Der Doppel-Deletionsstamm $\Delta mam3\Delta ypk9$ verhält sich ebenso

wie der $\Delta mam3$ -Stamm und zeigt ein etwa gleiches Wachstum bei 50 mM Mangan. Die durch den Verlust der Ypk9-Aktivität induzierte Mangan-Sensitivität wird somit durch die erhöhte Toleranz durch den Verlust der Mam3-Aktivität aufgehoben.

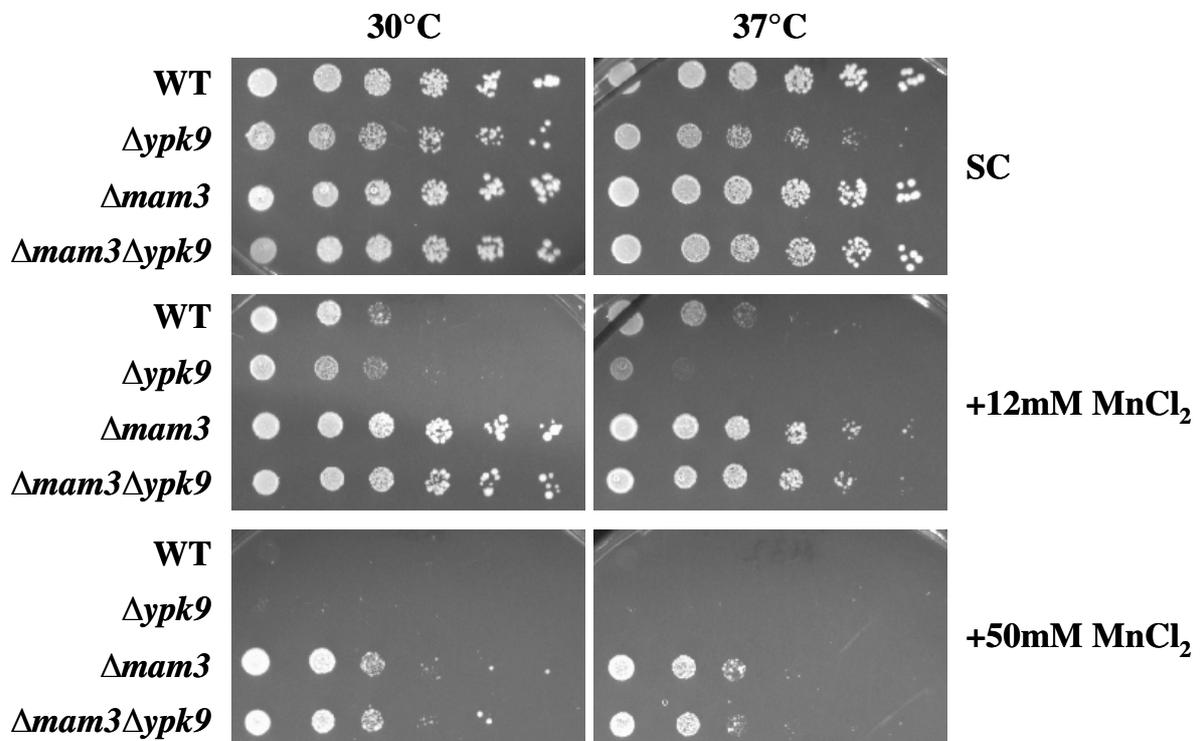


Abbildung 3-26: Gezeigt ist das Wachstum von WT-, $\Delta ypk9$ -, $\Delta mam3$ -Zellen und dem Doppel-Deletionsstamm $\Delta mam3\Delta ypk9$ auf SC-Platten mit und ohne den Zusatz von 12 bzw. 50 mM Mangan bei 30°C und 37°C.

Um zu prüfen, ob die Überexpression von Ypk9 einen Effekt auf den Phänotyp der $\Delta mam3$ -Zellen hat, wurden diese mit dem Vektor 426-GPD-YPK9 transformiert. Abbildung 3-27 zeigt das Wachstum der Stämme auf SC-URA mit und ohne 30 mM bzw. 50 mM Mangan. Es scheint keine großen Unterschiede beim Wachstum des Ypk9-exprimierenden $\Delta mam3$ -Stamms gegenüber dem mit dem leeren Vektor transformierten $\Delta mam3$ -Stamm zu geben.

Es sollte zudem überprüft werden, ob die Überexpression von Mam3 einen Effekt auf die Mangan-Sensitivität von $\Delta ypk9$ -Zellen hat. Der Expressionsvektor 426-GPD-GFP-MAM3 wurde sowohl in WT- als auch in $\Delta ypk9$ -Zellen transformiert. Von den verschiedenen Stämmen wurden Verdünnungsreihen von Kulturen der logarithmischen Wachstumsphase angefertigt und auf SC-URA-Platten mit und ohne 12 mM Mangan aufgetropft.

Abbildung 3-28 zeigt, dass es durch die Überexpression von Mam3 in WT-Zellen zu einer leicht erhöhten Sensitivität gegenüber Mangan kommt. Diese Beobachtung wurde bereits von Yang *et al.*, 2005 beschrieben. Die mit dem Leervektor transformierten $\Delta ypk9$ -Zellen zeigen die gleiche Sensitivität gegenüber Mangan wie die MAM3-überexprimierenden Zellen. Für die Überexpression von Mam3 in $\Delta ypk9$ -Zellen konnte somit kein additiver Effekt beobachtet werden.

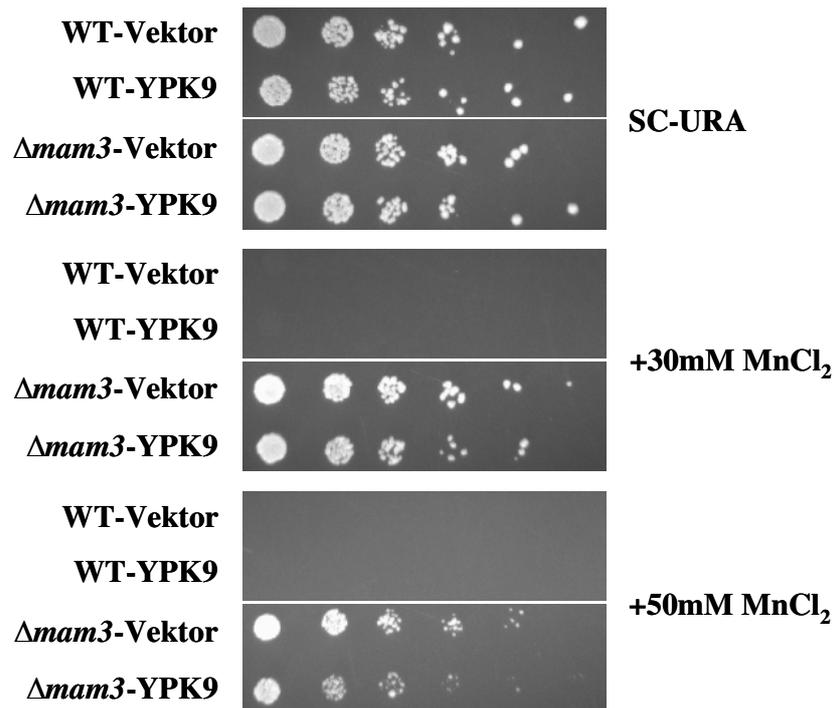


Abbildung 3-27: Dargestellt ist das Wachstum von mit leerem Vektor und YPK9 transfizierten WT- und $\Delta mam3$ -Zellen auf SC-URA-Platten mit und ohne den Zusatz von 30 bzw. 50 mM Mangan bei 30°C.

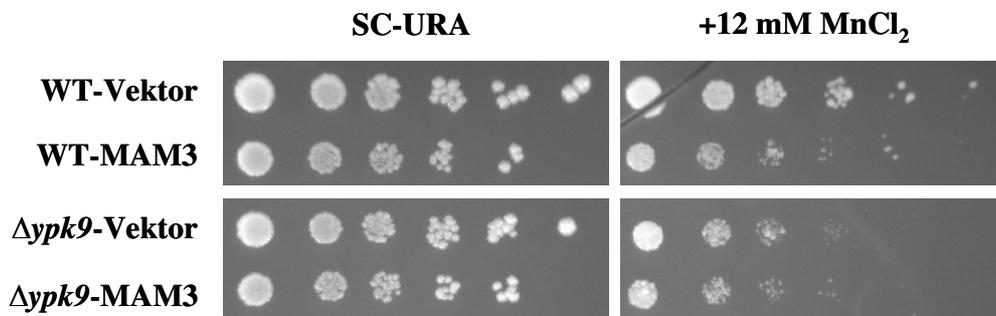


Abbildung 3-28: Dargestellt ist das Wachstum von WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen, die mit dem Expressionsvektor 426-GPD-GFP-MAM3 oder dem entsprechenden Leervektor transformiert wurden. Die Stämme wurden auf SC-URA-Platten mit und ohne den Zusatz von 12 mM Mangan aufgetropft und bei 30°C inkubiert.

3.9.3 Ypk9 und die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPase Pmr1

Neben der Vakuole spielt auch der Golgi-Apparat und der sekretorische Pfad eine große Rolle bei der Detoxifizierung von Mn^{2+} -Ionen. Die in der Golgimembran residierende P-Typ ATPase Pmr1 übernimmt eine wichtige Rolle im Schutz der Zelle vor überschüssigem Mangan. Sie stellt nicht nur Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen für die Prozessierung von Proteinen, die den sekretorischen Pfad durchlaufen, bereit (Dürr *et al.*, 1998), sondern sorgt durch das Pumpen überschüssiger Mn^{2+} -Ionen aus dem Cytosol in den Golgi-Apparat auch dafür, dass das Mangan die Zelle über den sekretorischen Pfad wieder verlässt (Culotta *et al.* 2005). Pmr1 defiziente Hefezellen sind extrem sensitiv gegenüber Mangan und akkumulieren große Mengen der Ionen hauptsächlich im Cytosol (Lapinskas *et al.*, 1995).

Auch hier wurde ein Doppel-Deletionsstamm $\Delta\text{pmr1}\Delta\text{ypk9}$ hergestellt, um eine mögliche Interaktion zwischen Ypk9 und Pmr1 untersuchen zu können. Der $\Delta\text{pmr1}\Delta\text{ypk9}$ -Stamm wurde zusammen mit WT und Δpmr1 -Zellen in Verdünnungsreihen auf SC-Platten mit und ohne den Zusatz von 0,1, 0,25 oder 0,5 mM Mangan aufgetropft und bei 30 und 37°C inkubiert.

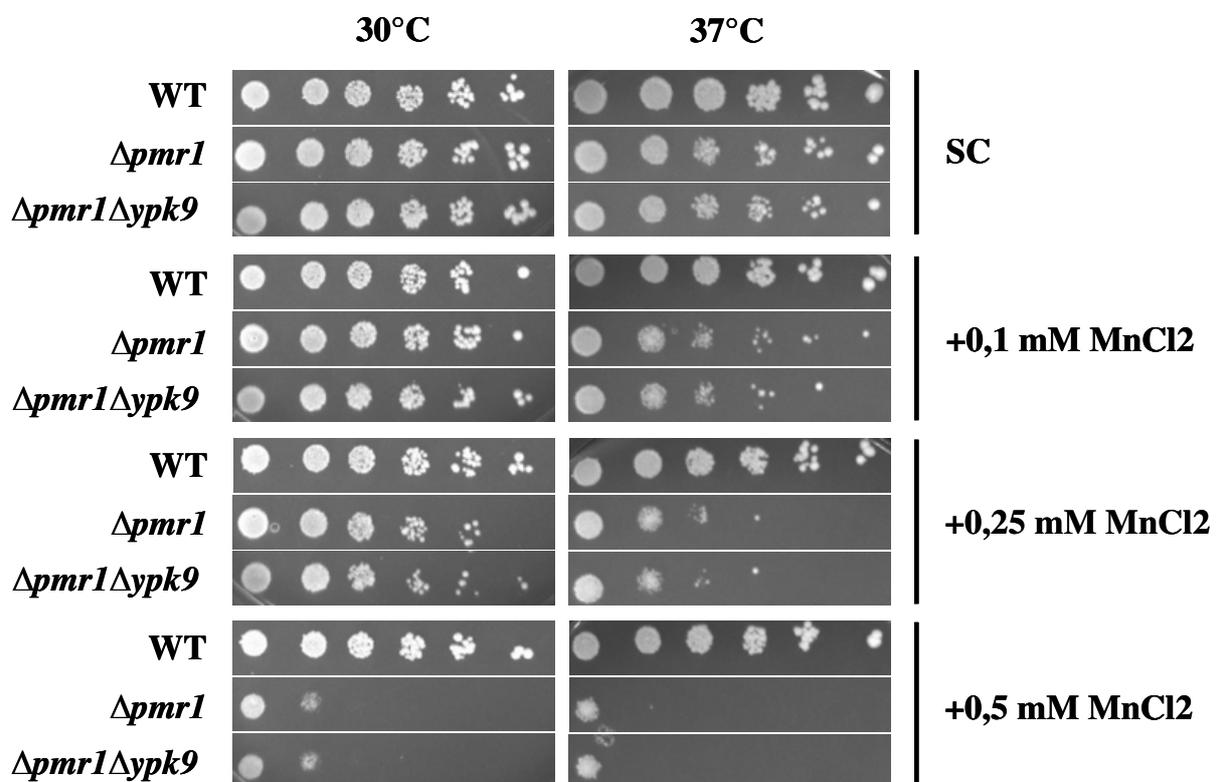


Abbildung 3-29: Gezeigt ist das Wachstum von WT- und Δpmr1 -Zellen mit dem Doppel-Deletionsstamm $\Delta\text{pmr1}\Delta\text{ypk9}$ auf SC-Platten mit und ohne den Zusatz von 0,1, 0,25 oder 0,5 mM Mangan bei 30°C und 37°C.

Abbildung 3-29 zeigt, dass sich der Doppel-Deletionsstamm $\Delta pmr1\Delta ypk9$ genauso verhält wie der $\Delta pmr1$ -Stamm. Pmr1 und Ypk9 scheinen in voneinander unabhängigen Pfaden zu agieren: es ist kein additiver Effekt zu beobachten.

Auch hier sollte getestet werden, ob die Überexpression von Ypk9 einen Effekt auf den Phänotyp der Δpmr -Zellen hat und diesen möglicherweise retten kann. Δpmr -Zellen wurden ebenfalls mit dem Vektor 426-GPD-YPK9 transformiert. Abbildung 3-30 zeigt das Wachstum der Stämme auf SC-URA mit und ohne den Zusatz von 0,1 oder 0,5 mM Mangan bei 30°C und 37°C. Es scheint keine Unterschiede beim Wachstum des Ypk9-exprimierenden $\Delta pmr1$ -Stamms gegenüber den $\Delta pmr1$ -Zellen, die mit dem leeren Vektor transformiert wurden, zu geben. Die Mangan-Sensitivität der $\Delta pmr1$ -Zellen kann somit nicht durch eine Überexpression von Ypk9 gerettet werden.

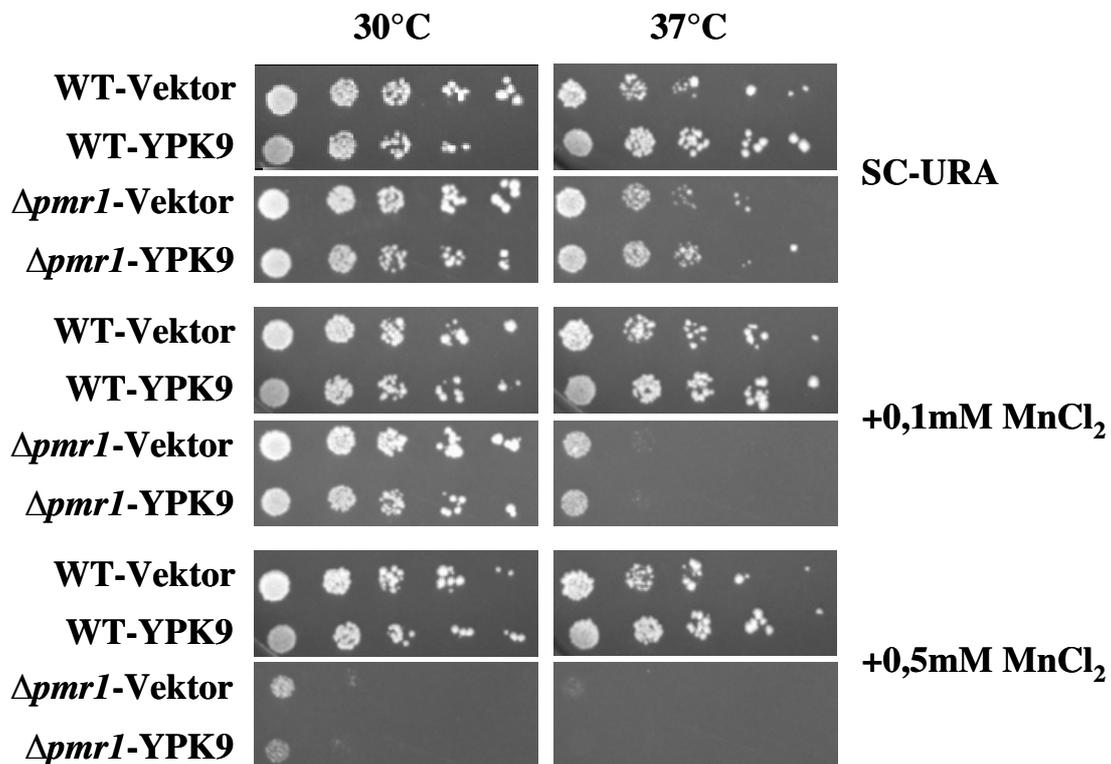


Abbildung 3-30: Dargestellt ist das Wachstum der Stämme WT-Vektor, WT-YPK9, $\Delta pmr1$ -Vektor und $\Delta pmr1$ -YPK9 auf SC-URA mit und ohne den Zusatz von 0,1 oder 0,5 mM Mangan bei 30°C und 37°C.

Die Überexpression von Pmr1 in $\Delta ypk9$ sollte ebenfalls untersucht werden, um zu prüfen, ob die Mangan-Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stammes durch Pmr1 supprimiert werden kann. Der Expressionsvektor 426-GPD-GFP-PMR1 wurde sowohl in WT- als auch in $\Delta ypk9$ -Zellen

transformiert. Von den verschiedenen Stämmen wurden Verdünnungsreihen von Kulturen der logarithmischen Wachstumsphase angefertigt und auf verschiedene SC-URA-Platten mit und ohne 12 mM Mangan aufgetropft. Es konnte jedoch kein verändertes Wachstum der Pmr1-exprimierenden $\Delta ypk9$ -Zellen gegenüber der mit dem Leervektor transformierten $\Delta ypk9$ -Zellen beobachtet werden (Abbildung 3-31).

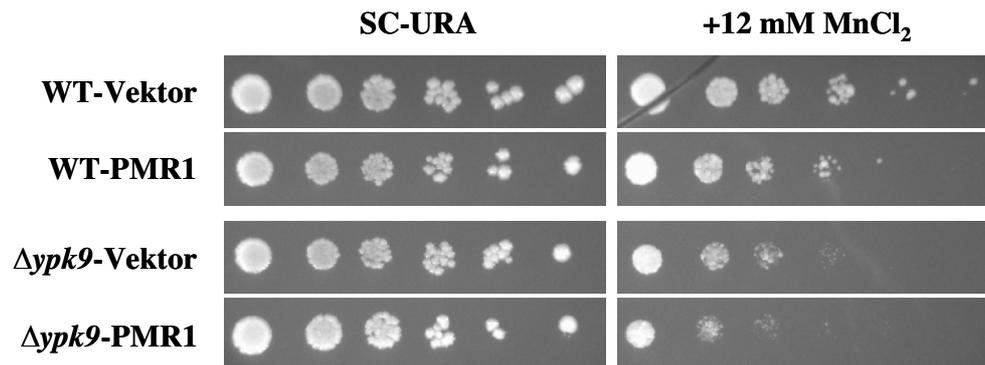


Abbildung 3-31: Dargestellt ist das Wachstum von WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen, die mit dem Expressionsvektor 426-GPD-GFP-PMR1 oder dem entsprechenden Leervektor transformiert wurden. Die Stämme wurden auf SC-URA-Platten mit und ohne den Zusatz von 12 mM Mangan aufgetropft und bei 30°C inkubiert.

3.10 Übertragbarkeit der Mangan-Sensitivität des *S. cerevisiae* Modells auf Mammalia

S. cerevisiae ist durch die vielen konservierten zellulären Prozesse und Stoffwechselwege zu höheren Eukaryoten ein guter Modellorganismus. Um zu überprüfen, ob in diesem speziellen Fall die Sensitivität des *S. cerevisiae* $\Delta ypk9$ -Stamms gegenüber Mangan auch auf andere Zellsysteme übertragbar ist, sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Versuche bezüglich einer Mangan-Sensitivität durch einen Atp13a2-Funktionsverlust in Mammalia-Zellen durchgeführt werden.

3.10.1 Mangan-Sensitivität humaner Fibroblasten

Zur Untersuchung eines Säuger-Zellsystems wurden aus Hautstanzen gewonnene Fibroblasten eines betroffenen und eines gesunden Individuums der von Ramirez *et al.* beschriebenen, am Kufor-Rakeb Syndrom leidenden, chilenischen Familie von Christine Klein vom Institut für Neurologie der Universität Lübeck zur Verfügung gestellt (Abbildung 3-32). Die zu untersuchenden Fibroblasten des betroffenen Kufor-Rakeb-Patienten weisen aufgrund der beschriebenen Mutationen (s. u.) kein funktionelles Atp13a2-Protein auf. Somit boten diese die Möglichkeit, ein Säuger-Zellsystem ohne funktionsfähiges Atp13a2-Protein bezüglich der Mangansensitivität experimentell zu analysieren.

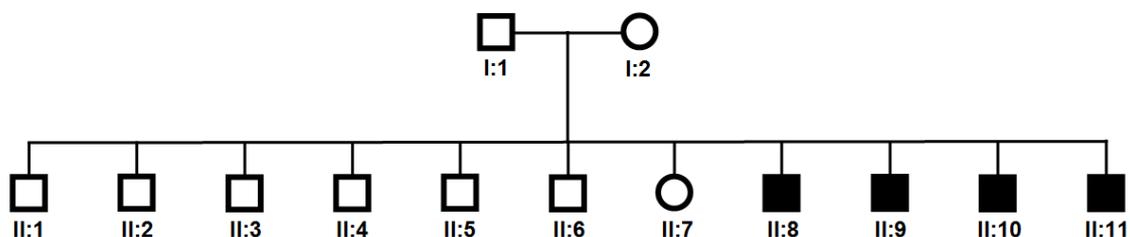


Abbildung 3-32: Dargestellt ist der Stammbaum der von Ramirez *et al.* beschriebenen am Kufor-Rakeb Syndrom leidenden Familie. Zur experimentellen Analyse standen Fibroblasten des Patienten II:9 und des gesunden Bruders II:6 zur Verfügung.

In der nicht-konsanguinen chilenischen Familie lagen zwei verschiedene Mutationen in *compound*-heterozygoter Form vor. Durch den Vater (I:1) wurde die Transition $c.1306+5G \rightarrow A$ in Intron 13 vererbt, die zu einem *skipping* von Exon 13 führte. Auf Proteinebene hat diese einen Verlust eines großen Teils der Transmembrandomäne M3 zur Folge. Die Mutter (I:2) trägt auf einem Allel die Deletion $c.3057delC$ in Exon 26, welche durch einen *frameshift* nach zwei weiteren Aminosäuren in einem Stop-Codon resultiert und somit auf Proteinebene zum Verlust der Transmembrandomönen M8 bis M10 und des C-Terminus führt (Ramirez *et al.*, 2006). Die in Abbildung 3-33 schematisch dargestellte Struktur des Atp13a2-Proteins gibt die Lokalisation dieser beiden Mutationen wieder. Analysen von Ramirez *et al.* zeigten, dass die mutierten Proteine im ER zurückbleiben und somit vermutlich keine Funktion in den Lysosomen übernehmen können.

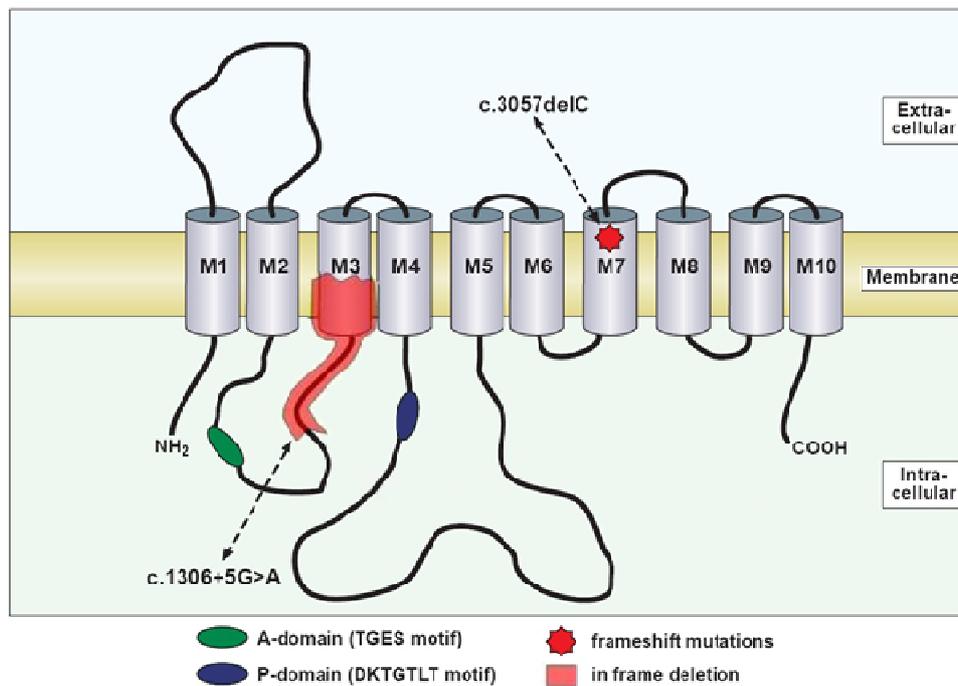


Abbildung 3-33: Gezeigt ist hier ein Modell der Proteinstruktur von ATP13A2 inklusive der Lokalisation und der Effekte der Kufor-Rakeb-Mutationen $c.1306+5G \rightarrow A$ und $c.3057delC$. Das den Leserahmen erhaltende *skipping* von Exon 13 ist durch eine rote Schattierung gekennzeichnet, die *frameshift* Deletion durch einen roten Stern. Modifiziert nach Ramirez *et al.*, 2006.

Nach Erhalt der Fibroblasten wurde zunächst eine Prüfung des Genotyps mittels Amplifizierung und direkter Sequenzierung der jeweiligen Positionen der Mutationen vorgenommen. Dazu wurde aus den jeweiligen Zellen DNA isoliert, welche dann als Matrize

zur Amplifikation der entsprechenden Fragmente in die PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Nach einer Aufreinigung des PCR-Produkts wurden die jeweiligen Fragmente als Matrize zusammen mit den entsprechenden Sequenzierprimern für eine Sequenzierreaktion eingesetzt. Abbildung 3-34 zeigt die für die Patienten- und Kontroll-Fibroblasten erhaltenen Elektropherogramme für die Bereiche um die Basen c.1306+5 und c.3057 der *ATP13A2* cDNA Sequenz. Für die Patienten-Fibroblasten (II-9) lassen sich eindeutig beide heterozygot vorliegenden Mutationen erkennen, die Sequenzierung der Kontroll-Fibroblasten DNA (II-6) zeigt hingegen in beiden Positionen die WT-Sequenz (Abbildung 3-34).

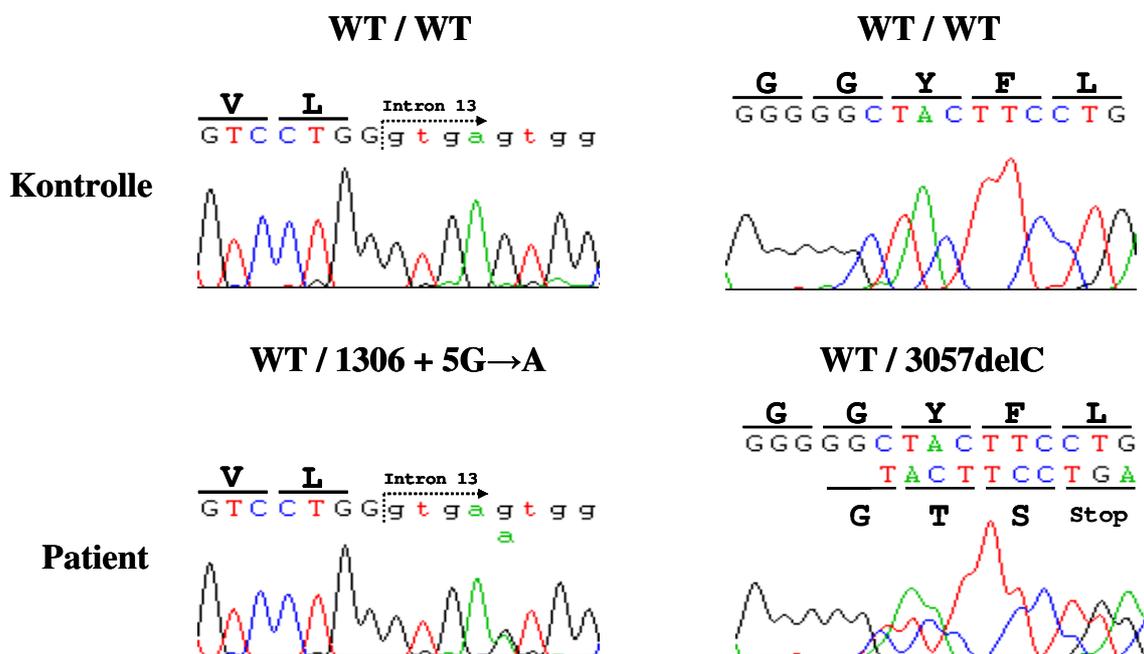


Abbildung 3-34: Dargestellt sind Elektropherogramme der direkten Sequenzierung der genomischen DNA der Kontroll- und Patienten-Fibroblasten. Sequenziert wurde der DNA-Abschnitt zwischen Exon und Intron 13 für den Nachweis der Mutation c.1306+5G→A, sowie Exon 26 für den Nachweis der Mutation c.3057delC.

Anhand dieses nun für die Mutationen im *ATP13A2*-Gen geprüften Zellsystems sollte eine mögliche Hypersensitivität gegenüber Mangan getestet werden. Zur Kultivierung wurden die Zellen in DMEM mit 10 % FKS und verschiedenen anderen Zusätzen in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank gehalten. Zunächst sollten anhand von verschiedenen Versuchsbedingungen in Form von unterschiedlichen Mangan-Konzentration und Inkubationszeiten die optimalen Parameter für die Beobachtung der Mangan-Sensitivität der Patienten-Fibroblasten bestimmt werden. Die verschiedenen Bedingungen wurden im

96-well-Format getestet, wobei pro well ca. 8000 Zellen ausgesät wurden. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurde das Medium abgenommen und gegen Medium mit den entsprechenden Mangan-Konzentrationen, die zwischen 0 mM und 5 mM MnCl_2 lagen, ersetzt. Es erfolgte nun eine Inkubation der Zellen für 6-48 Stunden im Brutschrank, welcher eine Messung der lebenden Zellen mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) folgte. Dazu wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium, welches MTT enthielt, ersetzt. Es folgte eine Inkubation von zwei Stunden im Brutschrank und das Abnehmen des Mediums. Nun wurde mit HCl versetztes Isopropanol auf die Zellen gegeben und nachdem sich alle Formazan Kristalle gelöst hatten wurde die photometrische Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm in einem Plattenlesegerät bestimmt. Abbildung 3-35 zeigt die so erhaltenen Ergebnisse für die Inkubation der Patienten-Fibroblasten mit Mangan-Konzentrationen von 0 mM bis 5 mM und Inkubationszeiten von 6, 15, 24 und 48 Stunden, wobei für jeden Wert sechs bis acht wells gemessen wurden. Die Werte für die unbehandelten Zellen wurden dabei als 100 % definiert.

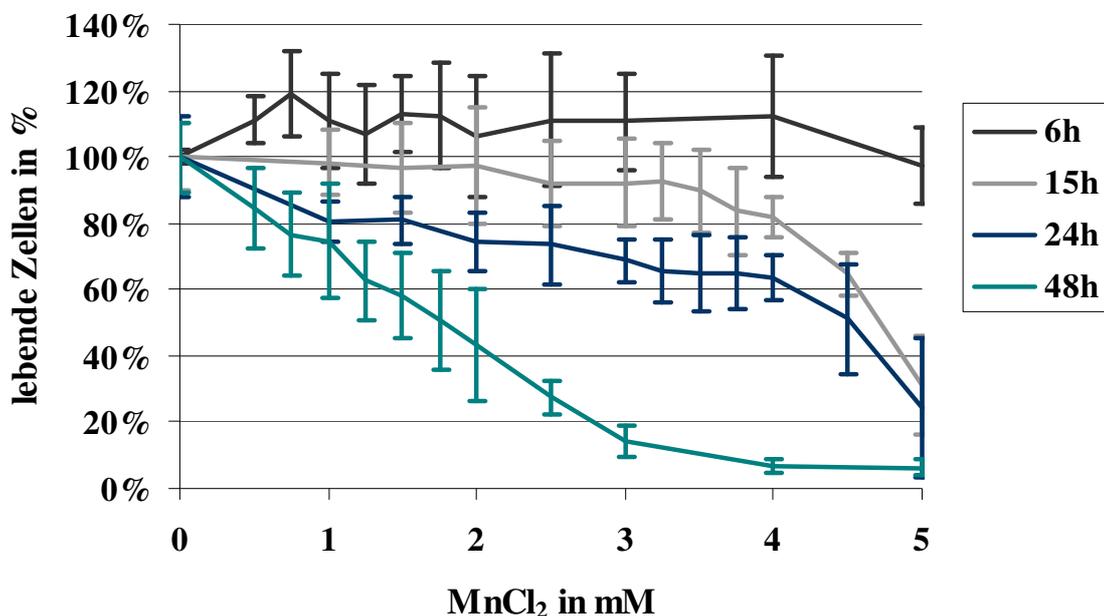


Abbildung 3-35: Dargestellt sind die Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) der initialen Messungen zur Mangan-Sensitivität von ATP13A2-defizienten, humanen Fibroblasten. Die Zellen wurden für 6, 15, 24 bzw. 48 Stunden mit Mangan-Konzentrationen von 0 mM bis 5 mM inkubiert und einer anschließenden Messung der lebenden Zellen mittels MTT unterzogen, wobei für jeden Wert wurden sechs bis acht wells gemessen.

Anhand der in Abbildung 3-35 dargestellten Ergebnisse ließ sich erkennen, dass für eine Inkubation von 48 Stunden eine gute Dosis-Wirkungsbeziehung der Patienten-Fibroblasten vorlag, wobei bei Konzentrationen ab 3 mM Mangan nahezu keine lebenden Zellen mehr detektiert werden konnten. Für die Inkubation der Zellen für 6 Stunden ließ sich für die hier angegebenen Konzentrationen keine Sensitivität gegenüber Mangan feststellen. Bei den Inkubationen von 15 bzw. 24 Stunden ließen sich erst bei höheren Mangan-Konzentrationen deutliche Effekte erkennen. Bei einer Inkubation von 15 Stunden mit 4 mM Mangan lagen noch 80 % lebende Zellen gegenüber den unbehandelten Ansätzen vor, bei einer Inkubation von 24 Stunden waren es nur noch 60 %. Anhand dieser Vorversuche sollte anschließend das Verhalten der Patienten- und Kontroll-Fibroblasten nach einer 48-stündigen Behandlung mit Mangan-Konzentrationen von 0 mM bis 3 mM getestet werden, um eine mögliche Hypersensitivität der Patienten-Fibroblasten feststellen zu können. Jeweils ca. 8000 Zellen wurden mit Mangan im 96-well-Format inkubiert, wobei für jede der Konzentrationen acht einzelne wells gemessen wurden. Abbildung 3-36 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen neun unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. Da für jeden Wert jeweils acht Messungen der neun Versuche herangezogen wurden, ergaben sich die Mittelwerte und Standardabweichungen demzufolge aus 72 Einzelwerten.

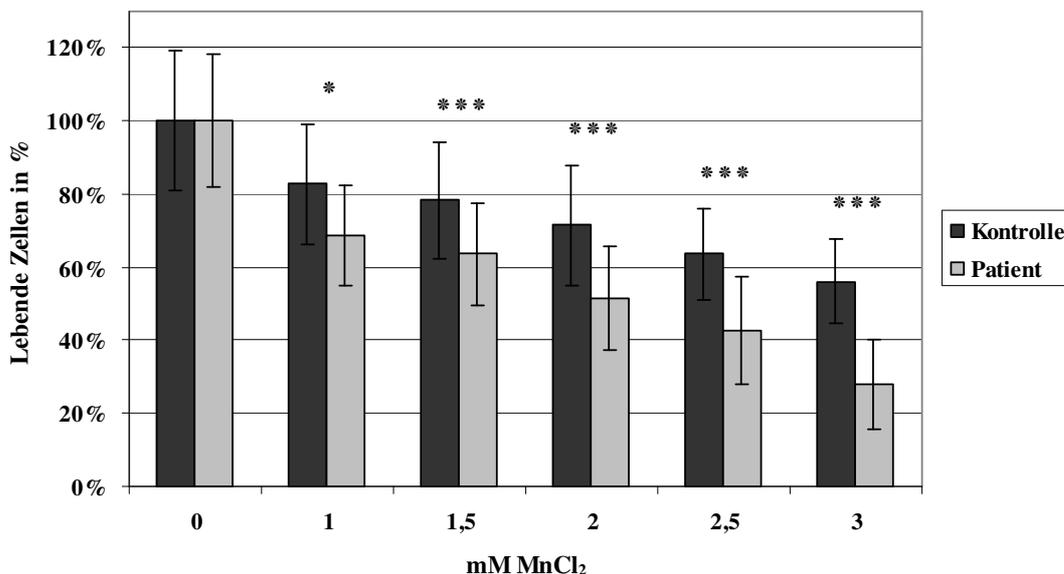


Abbildung 3-36: Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen zur Mangan-Sensitivität von Patienten- und Kontroll-Fibroblasten. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit Mangan-Konzentrationen von 0 mM bis 3 mM inkubiert und einer anschließenden Messung der lebenden Zellen mittels MTT unterzogen. Die Werte geben die Ergebnisse neun unabhängig voneinander durchgeführter Versuche in jeweils achtfacher Ausführung an. P-Werte: * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001, t-Test nach Student.

Für beide Zelllinien lässt sich deutlich eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen. Für die Patienten-Fibroblasten lässt sich zudem für jede der fünf verschiedenen Mangan-Konzentrationen eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten beobachten. Die Differenz steigt mit zunehmender Mangan-Konzentration, bei 1 mM Mangan beträgt der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Patienten- und Kontroll-Fibroblasten ca. 14 %, bei 2 mM sind es etwa 20 % und bei 3 mM Mangan erhöht sie sich auf 28 %. Dies spiegelt sich auch in den Signifikanzen wieder. Während für die Inkubation in 1 mM Mangan ein p-Wert von 0,015 bestimmt werden konnte, lag dieser bei einer Konzentration von 3 mM bei $0,3 \cdot 10^{-5}$.

Somit lässt sich feststellen, dass nicht nur im Modellsystem *S. cerevisiae* eine Deletion des *YPK9*-Gens eine erhöhte Sensitivität gegenüber Mangan bedingt, sondern dass diese Sensitivität auch in humanen Zellen, welche *Atp13a2*-defizient sind, nachgewiesen werden konnte.

3.10.1.1 Reversibilität der Mangan-Sensitivität der Fibroblasten durch Expression von exogenem *ATP13A2*

Um zu prüfen, ob die in Kapitel 3.10.1 gezeigte Sensitivität der humanen Patienten-Fibroblasten gegenüber Mangan wirklich auf den Funktionsverlust des *Atp13a2*-Proteins zurückzuführen ist, sollte ein weiteres Experiment durchgeführt werden. Die Fibroblasten sollten mit einem *ATP13A2*-Expressionsvektor transfiziert und darauf geprüft werden, ob die Mangan-Sensitivität der Zellen durch die Expression des exogenen *ATP13A2*-WTs reversibel ist.

Ein limitierender Faktor der Expression exogener Proteine ist die Transfektionseffizienz, welche sich zwischen den verschiedenen angewandten Systemen stark unterscheidet. Neben der stabilen viralen Transfektion, welche sehr effizient aber auch sehr aufwendig ist, bieten zum einen die Methode der Lipofektion und zum anderen die der Elektroporation weitere Transfektionsmöglichkeiten. Das Nucleofector[®] System (Amaya) beruht auf dem direkten Einschleusen von DNA in den Nukleus durch Elektroporation der Zellen und ist somit für primäre Zellen gut geeignet.

Zur Transfektion der Patientenfibroblasten wurde hier das Basic Nucleofector[®] Kit for Primary Mammalian Fibroblasts (Amaya) verwendet. Zunächst wurde nach Protokoll das am besten geeignete Programm für die Transfektion der Zellen ermittelt. Dazu wurde das

Kontrollplasmid pmaxGFP transformiert und die Transfektionseffizienz durch die Expression des GFPs im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Das Programm mit der höchsten Transfektionseffizienz (ca. 50 %) wurde dann für die Transfektion der Patienten-Fibroblasten mit dem Plasmid pcDNA3.1-ATP13A2-V5 und dem leeren Vektor als Kontrolle verwendet. Ca. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und wie bereits in Kapitel 3.10.1 beschrieben für 48 Stunden mit Mangan behandelt und anschließend im MTT-Assay analysiert. Abbildung 3-37 zeigt die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten in jeweils sechsfacher Ausführung. Sowohl bei einer Mangan-Konzentration von 1,5 mM als auch bei 2,5 mM ist kein signifikanter Unterschied zwischen den mit dem leeren Vektor und mit *ATP13A2* transfizierten Zellen zu erkennen. Es konnte somit keine Reversibilität der Mangan-Sensitivität der Patienten-Fibroblasten durch die Expression von exogenem *ATP13A2* gezeigt werden.

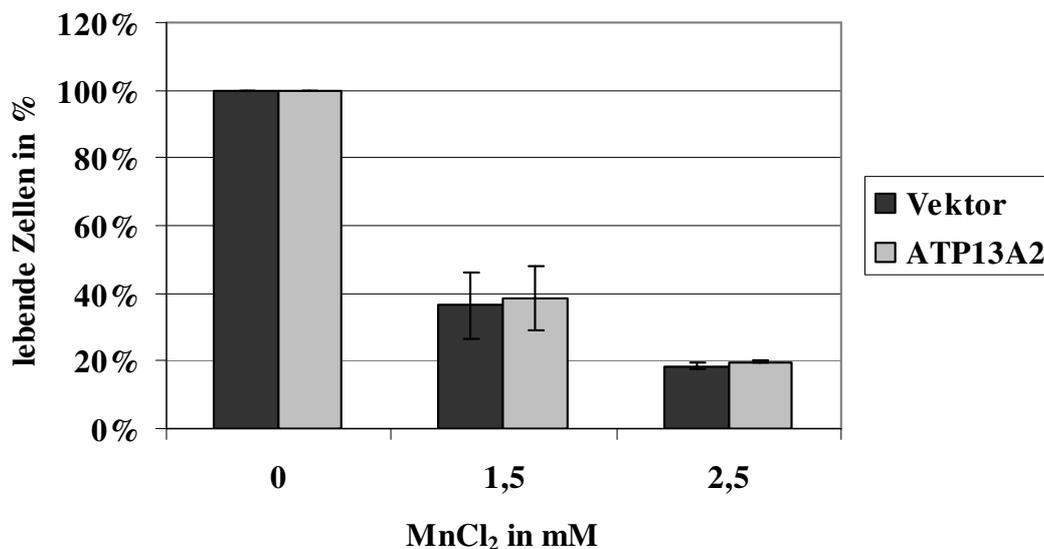


Abbildung 3-37: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten in jeweils sechsfacher Ausführung zur Mangan-Sensitivität von mit leerem Vektor und ATP13A2 transfizierten Patienten-Fibroblasten. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem Nucleofector®-System (Amaxa) für 48 Stunden mit Mangan-Konzentrationen von 0 mM bis 2,5 mM inkubiert und einer anschließenden Messung der lebenden Zellen mittels MTT unterzogen.

Im Allgemeinen ist hier eine stärkere Sensitivität der Zellen gegenüber Mangan im Vergleich mit den untransfizierten Zellen in Abbildung 3-36 in Kapitel 3.10.1 zu erkennen. Für beide hier verwendeten Mangan-Konzentrationen verringert sich der Anteil der lebenden Zellen um jeweils 20 %. Möglicherweise ist diese erhöhte Sensitivität auf den zusätzlichen Stress durch die Transfektion selbst zurückzuführen. Dieser führte vermutlich auch dazu, dass unbehandelte Zellen ein stark vermindertes Wachstum zeigten.

3.10.2 Mangan-Sensitivität dopaminerger Neuroblastomzellen SH-SY5Y unter siRNA knockdown von ATP13A2

Da es sich bei dem Kufor-Rakeb Syndrom um eine neurodegenerative Erkrankung handelt und bereits von Ramirez *et al.* gezeigt wurde, dass *ATP13A2* hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird, sollte eine weitere Zelllinie auf Mangan-Sensitivität getestet werden, die die Zusammenhänge der Vorgänge der Neurodegeneration möglicherweise besser repräsentieren kann. Hierzu wurde die humane, neuronale Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Diese dopaminergeren Neuroblastom-Zellen sollten zunächst mit siRNA behandelt werden, um die *ATP13A2*-Expression auf ein Minimum herunterzuregeln. Die Zellen wurden dazu auf 96-well-Platten ausgesät und 15 Stunden später mittels des auf Lipiden basierenden Transfektionsreagenzes DharmaFECT[®]I im Abstand von sechs Stunden zwei Mal mit siRNA gegen *ATP13A2* transfiziert. Die RNA-Menge von *ATP13A2* konnte auf diese Weise auf 30 bis 40 % herunterreguliert werden. Etwa 15 Stunden nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und wie in Kapitel 3.10.1 beschrieben auf 96-well-Platten ausgesät, für 48 Stunden mit Mangan behandelt und anschließend im MTT-Assay analysiert. Im Gegensatz zu den Fibroblasten wurden ca. 14.000 Zellen pro well ausgesät und durch die generell erhöhte Sensitivität gegenüber Mangan nur Konzentrationen von bis 1 mM MnCl₂ verwendet. Abbildung 3-38 zeigt exemplarisch die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen in jeweils sechsfacher Ausführung. Die Werte für die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigten ähnliche Mittelwerte mit einer jeweils relativ hohen Standardabweichung. Im Allgemeinen konnte kein Trend in Bezug auf eine höhere Sensibilität der mit *ATP13A2*-siRNA behandelten Zellen beobachtet werden.

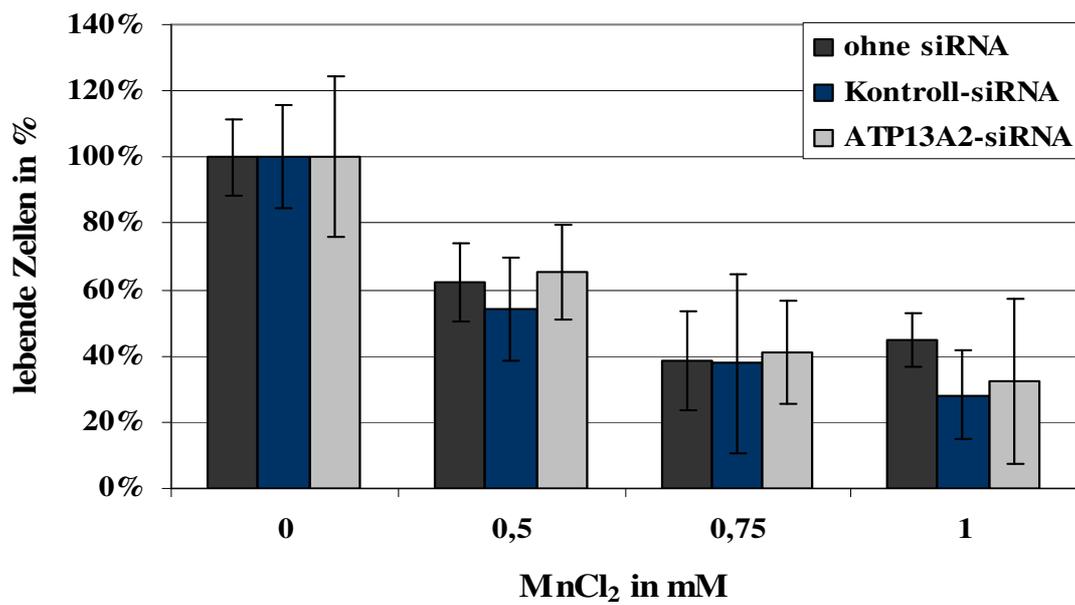


Abbildung 3-38: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in jeweils sechsfacher Ausführung zur Mangan-Sensitivität von mit siRNA-behandelten SH-SY5Y-Zellen. Diese wurden 15 Stunden nach der Transfektion für 48 Stunden mit Mangan-Konzentrationen von 0 mM bis 1 mM inkubiert und einer anschließenden Messung der lebenden Zellen mittels MTT unterzogen.

4 Diskussion

Mutationen in der humanen Typ V P-Typ ATPase *ATP13A2* führen zum Kufor-Rakeb Syndrom, einer juvenilen Form des Parkinsonismus, welches neben den drei Kardinalsymptomen des Parkinsonismus zusätzlich eine Spastik, eine supranukleäre Blickparese und eine fortschreitende Beeinträchtigung der geistigen Fähigkeiten bis hin zur Demenz zeigt (Najim Al-Din *et al.*, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe des Modellorganismus *S. cerevisiae* Erkenntnisse über die Funktion dieser bisher kaum untersuchten Gruppe von P-Typ ATPasen gewonnen werden, um somit das Verständnis für die Mechanismen der Neurodegeneration bei Erkrankungen wie dem Parkinsonismus zu erweitern.

4.1 Ypk9 ist das *S. cerevisiae* Homolog zu *Atp13a2* und lokalisiert in der vakuolären Membran

Über die Funktion der Gruppe V der P-Typ ATPasen gibt es erst wenige Erkenntnisse. Ihnen wird zwar eine Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen, wie z. B. der Glykosylierung von Proteinen, der Biosynthese der Zellwand und dem Transport von Proteinen in den Golgi-Apparat zugesprochen (Suzuki und Shimma, 1999, Vashist *et al.*, 2002), über ihre molekulare Funktionsweise und ihre Substratspezifität liegen bislang jedoch keine Erkenntnisse vor. Typ V P-Typ ATPasen wurden bis dato nur in Eukaryoten identifiziert, was vermuten lässt, dass sie auf ein jüngeres Ereignis der evolutionären Entwicklung zurückzuführen sind (Møller *et al.*, 2008).

Bioinformatische Analysen haben gezeigt, dass das humane Genom insgesamt fünf Typ V P-Typ ATPasen enthält, *ATP13A1-ATP13A5*. Anhand einer BLAST-Analyse nach homologen Sequenzen von *Atp13a2* im *S. cerevisiae*-Genom und weiterer Untersuchungen, wie einem Protein-Alignment dieser homologen Sequenzen mit verschiedenen Typ V P-Typ ATPasen, konnten für *S. cerevisiae* zwei verschiedene ATPasen dieser Subgruppe identifiziert werden. Die *S. cerevisiae* Proteine Spf1 und Ypk9 zeigten unterschiedlich starke Homologien zu den humanen ATPasen. Während Spf1 eine größere Homologie zu *Atp13a1* aufweist (41 % Identität und 61 % Ähnlichkeit, gegenüber 28-29 % Identität und 47-49 % Ähnlichkeit zu *Atp13a2-Atp13a5*) zeigt Ypk9 eine stärkere Homologie zu *Atp13a2-Atp13a5* (33-36 % Identität und 54-57 % Ähnlichkeit, gegenüber 27 % Identität und 49 % Ähnlichkeit zu

Atp13a1). Die höchste Homologie für Ypk9 zeigt sich mit 36 % Identität und 57 % Ähnlichkeit zu Atp13a2 und Atp13a3 gleichermaßen. Somit kann Spfl als Ortholog zu Atp13a1 angesehen werden, Ypk9 hingegen als mögliches Ortholog zu Atp13a2. Atp13a3 zeigt jedoch eine gleich starke Homologie zu Ypk9 und auch Atp13a4 und Atp13a5 weisen eine große Ähnlichkeit zu Ypk9 auf. Die Zuordnung einer einzelnen humanen Typ V P-Typ ATPase als Ypk9-Ortholog ist daher durch Sequenzvergleich allein nicht möglich.

Das Vorkommen mehrerer Typ V P-Typ ATPasen in höheren Eukaryoten ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in komplexeren Organismen eine „Aufgabenverteilung“ stattfindet, wobei die verschiedenen Typ V P-Typ ATPasen durch verschiedene Expressionsmuster an unterschiedlichen Vorgängen beteiligt sein könnten. Dies ist z. B. bei den humanen Typ IB P-Typ ATPasen Atp7a und Atp7b, welche Kupfer transportieren und für die Menkes- und Wilson-Krankheiten verantwortlich sind, der Fall. Während *ATP7A* mit Ausnahme der Leber nahezu ubiquitär exprimiert wird (Vulpe *et al.*, 1993), findet die stärkste Expression von *ATP7B* in der Leber und im Gehirn statt (Tanzi *et al.*, 1993). In *S. cerevisiae* findet sich nur ein homologes Gen zu *ATP7A* und *ATP7B*, das *CCC2*-Gen (Yuan *et al.*, 1995). Komplementationstests mit dem $\Delta ccc2$ -Stamm zeigten, dass das Wachstumsdefizit von $\Delta ccc2$ -Zellen in Medium ohne Kupfer und Eisen sowohl durch die Expression von *ATP7A* als auch von *ATP7B* reversibel war (Hung *et al.*, 1997, Forbes *et al.*, 1998). Beide humanen ATPasen konnten somit die Funktion des hefespezifischen Proteins ersetzen. Eine ähnliche Aufspaltung ist demnach auch für die humanen P-Typ ATPasen Atp13a2-Atp13a5 der Subgruppe Typ V denkbar.

Atp13a2 ist in der Membran des Lysosoms, welches das analoge Organell zu der Vakuole in *S. cerevisiae* ist, lokalisiert. Der hier erbrachte Nachweis der Lokalisation von GFP-markiertem Ypk9 in der vakuolären Membran von *S. cerevisiae* stärkt somit die Annahme einer gemeinsamen/evolutiv homologen Funktion dieser beiden Proteine. Des Weiteren konnte für Atp13a3 eine Lokalisation im Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Heimbach und Kubisch, unveröffentlicht), was darauf hinweist, dass es funktionelle Unterschiede zwischen Ypk9 und Atp13a3 gibt, da sie in verschiedenen Organellen agieren.

Die Lokalisation des Ypk9-Proteins in der vakuolären Membran wurde zudem kürzlich in anderen Studien bestätigt (Wiederhold *et al.*, 2009 und Gitler *et al.*, 2009) und bestärkt die Vermutung der funktionellen Überlappung des humanen Atp13a2- und des *S. cerevisiae* Ypk9-Proteins. Außerdem wird durch die Lokalisierung die mögliche Funktion von Ypk9 auf diejenigen Prozesse eingegrenzt, an denen die Vakuole direkt oder indirekt beteiligt ist.

4.2 Der Einfluss von *YPK9* auf die Autophagie

Eine Aufgabe, an der die Vakuole maßgeblich beteiligt ist, ist die Autophagie. Sie ist ein in allen Eukaryoten vorkommender Prozess zum Abbau cytoplasmatischen Materials, wie z. B. Proteinen, Proteinaggregaten und sogar kompletten Organellen (Klionsky und Emr, 2000).

Es wird unter anderem zwischen der durch Nährstoffmangel ausgelösten unspezifischen- oder auch Makroautophagie und verschiedenen Arten spezifischer Formen der Autophagie, wie z. B. der Chaperon-vermittelten Autophagie (chaperon-mediated autophagy, CMA) oder Mitophagie unterschieden (Dengjel *et al.*, 2008).

Durch die Ausbildung so genannter Autophagosomen, welche eine Doppelmembran besitzen, werden bei der unspezifischen Autophagie cytosolische Bestandteile zu den Lysosomen bzw. der Vakuole in *S. cerevisiae* transportiert, wo sie durch Hydrolasen abgebaut werden. Die einzelnen Bausteine können so wieder in neu zu synthetisierende Moleküle eingebaut werden. Diese Art des Recyclings ist ein Prozess, der vor allem bei Nährstoffmangel aktiviert wird. Er dient aber auch zur Beseitigung missgefalteter cytosolischer Proteine und Proteinaggregate. Aufgrund dieser Funktion spielt die Autophagie eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen es häufig zur Bildung von Proteinaggregaten und dadurch zur Degeneration neuronalen Gewebes kommt.

Bei der CMA handelt es sich um den spezifischen Abbau einzelner cytosolischer Proteine, die durch das Aminosäuremotiv KFERQ von einem cytoplasmatischen Chaperonkomplex erkannt, entfaltet und zur lysosomalen Membran transportiert werden. Dort interagiert das abzubauende Protein mit dem Rezeptor Lamp-2a und wird dann zum Abbau durch die lysosomale Membran transloziert (Massey *et al.*, 2006, Dice, 2007). CMA wurde bisher nur in Säugetierzellen beschrieben und konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt in *S. cerevisiae* nicht nachgewiesen werden (Klionsky *et al.*, 2007).

Mitophagie dient vermutlich der Qualitätskontrolle von Mitochondrien, wobei das erst kürzlich beschriebene mitochondriale Atg32-Protein über eine Bindung mit dem Atg11-Adaptor-Protein zusammen mit dem Mitochondrion in die Vakuole rekrutiert wird, wo dieses degradiert wird (Kanki *et al.*, 2009 und Okamoto *et al.*, 2009).

Bezüglich der Beteiligung der Autophagie an neurodegenerativen Prozessen haben zwei verschiedene Studien gezeigt, dass Autophagie-defiziente Mäuse ausgeprägte Merkmale einer Neurogeneration aufweisen. Sowohl für Atg5 *-/-* als auch für Atg7 *-/-* Mäuse zeigte sich eine Bildung von Proteinaggregaten in Neuronen und deren Degeneration. Zudem konnten

schwere motorische Störungen der Mäuse beobachtet werden (Komatsu *et al.*, 2006 und Hara *et al.*, 2006).

Von Xilouri *et al.* und Yu *et al.* konnte gezeigt werden, dass Makroautophagie bei dem Abbau von WT- α -Synuclein in Neuronen beteiligt ist. Auch Mitophagie spielt bei neurodegenerativen Prozessen eine Rolle; sie ist für den selektiven Abbau geschädigter Mitochondrien verantwortlich, welche z. B. durch *PINK1* Mutationen entstehen (Dagda *et al.*, 2009). Zudem ist Parkin an dem Mechanismus der Mitophagie beteiligt, es wird zu den defekten Mitochondrien rekrutiert und induziert so deren Abbau (Narendra *et al.*, 2008). Sowohl der Verlust der Parkin-Aktivität als auch der Verlust der *PINK1*-Aktivität bei Parkinson Patienten kann also zu einer Akkumulation von defekten Mitochondrien und somit zum Absterben von Neuronen führen. Ein Zusammenhang zwischen Parkinsonismus und der spezifischen Chaperon-vermittelten Autophagie konnte, wie bereits in Kapitel 1.1.1.1 erwähnt, anhand des Proteins α -Synuclein beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass die beiden pathogenen α -Synuclein-Mutanten p.A30P und p.A53T den Abbau anderer Proteine durch CMA verhindern, indem sie den membranständigen Rezeptor LAMP-2A blockieren (Cuervo *et al.*, 2004).

Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von CMA an neurodegenerativen Erkrankungen zeigten Untersuchungen der Mutation I93M des Uchl1-Proteins (*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*). Diese Mutation wurde in einer deutschen, unter Parkinson leidenden Familie entdeckt (Leroy *et al.*, 1998). Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die p.I93M-Mutation im Gegensatz zum WT-Protein ebenfalls zu einer verstärkten Bindung des Proteins mit der cytosolischen Region von Lamp-2a führt (Kabuta *et al.*, 2008). Dies würde analog zu den Beobachtungen für die beiden α -Synuclein Mutanten zu einer Inhibierung der CMA und somit zu einer Anhäufung von Proteinen führen. Bisher wurden neben p.I93M keine weiteren *UHCLI*-Mutationen bei Parkinsonpatienten identifiziert, welche die Pathogenität bestätigen könnten. Für den Polymorphismus p.S18Y in Exon 3 des *UCHLI*-Gens wurde allerdings eine inverse Assoziation, also ein protektiver Effekt, mit M. Parkinson postuliert (Maraganore *et al.*, 2004). Healy *et al.* (2006) konnten diesen protektiven Effekt in einem größeren Kollektiv jedoch nicht bestätigen und auch Tan *et al.* (2009) fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der p.S18Y-Variante von *UCHLI* und M. Parkinson in einem über 4000 Individuen umfassenden chinesischen Kollektiv. Molekulargenetische Befunde, die zeigen, dass *UCHLI* hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird und dort auch in Lewy

Körperchen enthalten ist, stärken aber zumindest den möglichen Zusammenhang zwischen Mutationen im *UCHL1*-Gen und M. Parkinson.

Durch die bereits mehrfach gezeigte Beteiligung der Autophagie an neurodegenerativen Prozessen und der Lokalisierung des Ypk9-Proteins in der vakuolären Membran, welche das Protein zudem in einen direkten Zusammenhang mit dem für die Autophagie benötigten Organell bringt, liegt die Untersuchung der Beteiligung des Ypk9-Proteins an dem Ablauf der Autophagie nahe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Beteiligung des Ypk9-Proteins an den Prozessen der Makroautophagie, also der unspezifischen Autophagie, in *S. cerevisiae*-Zellen untersucht. Es wurden hier zwei verschiedene Methoden angewandt, die zum einen auf der Degradierung des an der Autophagie maßgeblich beteiligten Proteins Atg8 (GFP-Atg8-Assay) und zum anderen auf der Prozessierung der Alkalischen Phosphatase (ALP) Pho8 in der Vakuole basierten (Pho8 Δ 60-Assay).

4.2.1 Der GFP-Atg8-Assay und der Pho8 Δ 60-Assay zur Prüfung einer Beteiligung von Ypk9 an der Autophagie

Die Beteiligung von Ypk9 an der Autophagie sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst durch den Abbau von GFP-Atg8 im Vergleich zwischen WT-Zellen und dem $\Delta ypk9$ -Deletionsstamm überprüft werden. In beiden Stämmen wurde GFP-Atg8 durch das chromosomale Plasmid pRS316-GFP-Atg8 exprimiert. Nach einer Induktion der Autophagie durch ein Hungermedium ohne Stickstoff (SD(-N)-Medium) wurde die Menge an freiem GFP gemessen. Über die Mechanismen der Autophagie gelangt das an die innere Membran des Autophagosoms gebundene GFP-Atg8-Fusionsprotein in die Vakuole. Dort wird das ubiquitin-ähnliche Atg8-Protein, im Vergleich zu dem stabileren GFP-Anteil des Fusionsproteins, von den dort vorhandenen Proteasen relativ schnell abgebaut. Je höher also die Autophagierate ist, desto mehr Fusionsprotein wird in die Vakuole transportiert und desto mehr freies GFP entsteht. Anhand von Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Autophagie konnten keine signifikanten Unterschiede, wie z. B. eine komplette Abwesenheit von freiem GFP, für den $\Delta ypk9$ -Stamm beobachtet werden. Letzteres war bei dem ebenfalls untersuchten $\Delta atg1$ -Stamm der Fall, welcher durch das Fehlen des *ATG1*-Gens, das an der für die Autophagie essentiellen Vesikelbildung maßgeblich beteiligt ist, autophagiedefizient ist. Die Abwesenheit von freiem GFP in nicht induzierten $\Delta ypk9$ -Zellen

zeigte zudem, dass die Abwesenheit von Ypk9 ebenfalls nicht zu einer konstitutiv aktivierten Autophagie führt, wie es z. B. in $\Delta ure2$ -Zellen der Fall ist (Chan *et al.*, 2001). Ypk9 ist demzufolge weder für den Ablauf der Makroautophagie essentiell noch kommt es allein durch die Abwesenheit des Proteins zu einer Aktivierung der Autophagie. Die Ergebnisse des GFP-Atg8-Assays zeigten jedoch eine leichte Reduktion an freiem GFP für alle in Hungermedium inkubierten $\Delta ypk9$ -Proben gegenüber den WT-Proben; da diese allerdings mit einem leicht stärkeren P_{gk}-Signal einherging, welches als Ladekontrolle diente, ließ sich keine Relevanz von Ypk9 für die Regulierung der Mechanismen der Autophagie feststellen.

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde mit dem Pho8 Δ 60-Assay eine weitere, unabhängige Methode gewählt, anhand derer Unterschiede bezüglich der Autophagierate wesentlich sensitiver erfasst werden können. Bei dem Pho8 Δ 60-Assay korreliert die Aktivität einer trunkierten Form der alkalischen Phosphatase Pho8 mit der Autophagierate, da das Protein nur dann in seine enzymatisch aktive Form prozessiert wird, wenn es durch Autophagie aus dem Cytosol in die Vakuole gelangt. Der Pho8 Δ 60-Assay ließ ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen $\Delta ypk9$ -Zellen und WT-Zellen erkennen. Es zeigte sich einzig für die 240 Minuten nach der Induktion mit Hungermedium entnommenen Proben eine leicht erhöhte ALP-Aktivität der $\Delta ypk9$ -Lysate gegenüber den WT-Lysaten, die jedoch statistisch gesehen nicht signifikant war (P-Wert=0,282). Der Pho8 Δ 60-Assay wurde nicht nur für den $\Delta ypk9$ -Stamm durchgeführt, sondern auch zur Analyse von Ypk9-überexprimierenden WT-Zellen verwendet. Hier ließen die Ergebnisse ebenfalls keine signifikanten Änderungen gegenüber der mit dem Leervektor transfizierten WT-Zellen erkennen.

Sowohl mittels des GFP-Atg8-Assays als auch anhand des Pho8 Δ 60-Assays ließ sich somit keine Beteiligung des Ypk9-Proteins an der unspezifischen Autophagie erkennen.

Aufgrund der Lokalisation des Ypk9-Proteins in der vakuolären Membran wäre ein putativer Defekt der Autophagie durch einen Funktionsverlust bzw. eine Überexpression von Ypk9 durch eine veränderte Zusammensetzung des vakuolären Milieus denkbar. Da ein genereller Einfluss von Ypk9 auf den Abbau von Proteinen in Form von GFP-Atg8 bzw. auf die Prozessierung vakuolärer Enzyme in Form von Pho8 Δ 60 nicht beobachtet werden konnte, scheint die Funktion der Vakuole in diesen Punkten nicht beeinträchtigt zu sein. Eine Beteiligung von Ypk9 auf spezifische Formen der Autophagie, welche zwar durch andere Mechanismen ausgelöst und durchgeführt werden, für die aber letztendlich ebenfalls eine intakte Vakuole zur Degradierung der jeweiligen Substrate notwendig ist, scheint daher eher

unwahrscheinlich. Dennoch kann ein möglicher Einfluss von Ypk9 bzw. Atp13a2 am spezifischen Abbau von Proteinen durch Mitophagie bzw. CMA nicht komplett ausgeschlossen werden. Da CMA bisher nur in höheren Eukaryoten nachgewiesen wurde, konnte diese Form der Autophagie nicht in Bezug auf das Ypk9-Protein in *S. cerevisiae* untersucht werden. Trotz der großen Anzahl an konservierten Stoffwechselwegen und zellulären Prozessen zwischen *S. cerevisiae* und höheren Eukaryoten ist die Verwendung von *S. cerevisiae* als Modellorganismus limitiert und kann an dieser Stelle nicht herangezogen werden. Die Beteiligung des humanen Atp13a2-Proteins an der CMA im Speziellen müsste demnach in höheren Eukaryoten untersucht werden. Bezüglich der Untersuchung der Mitophagie ließen sich jedoch verschiedene Assays in *S. cerevisiae* durchführen (Camougrand *et al.*, 2008). Aufgrund der in Bezug auf den Abbau von Proteinen generell intakten Vakuole von Ypk9 defizienten bzw. überexprimierenden Zellen wurde die Beteiligung von Ypk9 an den Formen der spezifischen Autophagie im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter thematisiert.

4.3 Der Einfluss von *YPK9* auf das Altern

Neurodegenerative Erkrankungen treten vermehrt mit zunehmendem Alter auf. Sowohl beim Altern als auch bei der Neurodegeneration finden sich dabei oft dieselben Formen zellulären Stresses, z. B. in Form der Anhäufung missgefalteter Proteine. Haptemichael und Kovacs berichteten zudem über eine verstärkte Expression der humanen Typ V P-Typ ATPase *ATP13A3* in replikativ seneszenten parenchymalen Nierenzellen. Um eine mögliche Beteiligung des Ypk9-Proteins an einem Prozess des Alterns feststellen zu können sollte im Rahmen dieser Arbeit die replikative Lebensspanne von *S. cerevisiae* als Modell des Alterns in mitotisch aktiven Zellen für den $\Delta ypk9$ -Stamm im Vergleich zu WT-Zellen untersucht werden,.

Insgesamt wurde die Bestimmung der replikativen Lebensspanne für 88 WT- und 71 $\Delta ypk9$ -Zellen durchgeführt, wobei sich eine mittlere Lebensspanne von 20,42 Generationen für die WT-Zellen ergab. In der Literatur finden sich für den WT von Hefestämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund verschiedene Werte bezüglich der mittleren replikativen Lebensspanne; sie reichen von 12 Generationen für den SP1-Stamm bis hin zu 29 Generationen für den PSY142-Stamm (Bitterman *et al.*, 2003). Für den WT des S 288C Stamms, aus dem der hier verwendete BY4741 Stamm generiert wurde (Brachmann *et al.*,

1998) ergab sich eine mittlere replikative Lebensspanne von 28 Generationen. Kaeberlein *et al.* (2005) berichten von einer mittleren replikativen Lebensspanne von 27,3 Generationen für den WT-BY4741-Stamm (Analyse von 60 Zellen). Eine Studie von Smith *et al.* zeigt verschiedene Werte für die mittlere replikative Lebensspanne von WT-BY4741-Zellen, die zwischen einzelnen Versuchen variieren und bei 23,4-28,6 Generationen liegen. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte mittlere Lebensspanne von 20,42 Generationen für WT-BY4741-Zellen scheint also zwar gegenüber den Angaben der Literatur etwas geringer, lässt sich aber vermutlich auf Schwankungen der mittleren replikativen Lebensspanne von WT-BY4741-Zellen, die allgemein in der Literatur gefunden wurden und wahrscheinlich durch leicht variable Versuchsbedingungen entstanden sind, zurückführen. Die Verwendung verschiedener lang- bzw. kurzlebiger Kontrollen wie z. B. der Stämme $\Delta sch9$ oder $\Delta sir2$ welche die replikative Lebensspanne innerhalb des genetischen Hintergrunds des BY4742-Stamms um 38 % erhöhen, bzw. um 47 % verringern konnten (Kaeberlein *et al.*, 2006), hätten evtl. mehr Aufschluss über die Reliabilität der ermittelten Ergebnisse geben können. Die nach der graphischen Auftragung der für die WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen ermittelten Werte erhaltenen Kurven zeigten jedoch den für Überlebenskurven dieser Art üblich sigmoidem Verlauf (Steffen *et al.*, 2009). Somit lässt sich die gegenüber der Literatur leicht verringerte mittlere Lebensspanne der WT-BY4741-Zellen vermutlich auf Differenzen innerhalb der Versuchsbedingungen zurückführen und hat wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Vergleich zwischen den hier untersuchten WT- und $\Delta ypk9$ -Zellen.

Im Gegensatz zu der für WT-Zellen ermittelten mittleren Lebensspanne von 20,42 Generationen ergab sich im Rahmen dieser Arbeit für $\Delta ypk9$ -Zellen eine mittlere Lebensspanne von 21,07 Generationen. Die daraus resultierende Erhöhung der Lebensspanne von Ypk9-defiziente Zellen um 4,3 % ist statistisch nicht signifikant und lässt somit keinen Einfluss von Ypk9 auf die replikative Lebensspanne von *S. cerevisiae* erkennen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit der replikativen Lebensspanne (RLS), also der Anzahl an Tochterzellen, die von einer Mutterzelle produziert werden können, jedoch ausschließlich proliferierende Zellen untersucht. Es wäre aber durchaus möglich, dass *YPK9* bei nicht proliferierenden Zellen in Bezug auf die chronologische Lebensspanne (CLS), also die Dauer, die eine Zelle in einem sich nicht teilenden Zustand überleben kann, eine Rolle spielt. RLS und CLS zeigen zwar, z. B. mit dem nahrungsabhängigen TOR-Signalweg, Gemeinsamkeiten innerhalb ihrer Regulation auf, werden jedoch teilweise auch durch unterschiedliche Prozesse reguliert (Kaeberlein *et al.*, 2007). So führt z. B. die Deletion von *SIR2* unter normalen

Wachstumsbedingungen zu einer verminderten replikativen Lebensspanne, hat jedoch keine Auswirkungen auf die chronologische Lebensspanne (Kaeberlein *et al.*, 2007). Obwohl *YPK9* nicht an der Regulierung der RLS involviert zu sein scheint, schließt dies eine Beteiligung des Gens an der Regulierung der CLS nicht aus. Die CLS in *S. cerevisiae* gilt zudem als Modell für das Altern postmitotischer Gewebe (Powers *et al.*, 2006), zu denen auch das Gehirn und die Neurone gehören, und wäre somit ebenfalls eine sinnvolle Methode zur Überprüfung einer Beteiligung von *YPK9* am Altern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also nur ein Einfluss von Ypk9 auf die replikative Lebensspanne von *S. cerevisiae* ausgeschlossen werden, nicht jedoch auf das Altern im Allgemeinen.

4.4 α -Synuclein

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bezüglich α -Synuclein-exprimierender *S. cerevisiae* Stämme zeigten zum einen, dass die Deletion von *YPK9* nicht zu einer erhöhten Toxizität von α -Synuclein führt. Zum anderen konnte auch gezeigt werden, dass es bei einem Wachstum mit erhöhten Mangan-Konzentrationen weder in WT-Zellen noch in Δ ypk9-Zellen zu einer erhöhten α -Synuclein-Toxizität kommt (siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Diese Ergebnisse weisen demnach nicht auf eine Interaktion zwischen *SNCA* und *YPK9* hin und zeigen, dass die durch α -Synuclein induzierte Toxizität vermutlich unabhängig von einer intakten Mangan-Homöostase ist, oder zumindest durch einen gestörten Manganstoffwechsel (siehe Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) nicht verstärkt wird.

Gitler *et al.* bestätigen die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse, dass die α -Synuclein-Toxizität durch eine Deletion von *YPK9* nicht verstärkt wird. Sie konnten jedoch nachweisen, dass es in *S. cerevisiae* durch eine Überexpression von Ypk9 zu einer Supprimierung der α -Synuclein-Toxizität kommt. Zudem konnte analog zum *S. cerevisiae*-Modell gezeigt werden, dass auch in *C. elegans* eine Schwächung der α -Synuclein-Toxizität anhand einer Überexpression des *C. elegans*-Homologs zu *ATP13A2*, W08D2.5 erfolgte. Eine durch α -Synuclein verursachte Degeneration dopaminergener Neuronen konnte dadurch teilweise gerettet werden (Gitler *et al.*, 2009). Abschließend konnte auch in primären dopaminergen Ratten-Fibroblasten eine Supprimierung der α -Synuclein-Toxizität durch *Atp13a2* gezeigt werden (Gitler *et al.*, 2009). Es scheint somit eine Interaktion beider Proteine

stattzufinden, bei der Atp13a2 bzw. Ypk9 oder W08D2.5 die durch α -Synuclein verursachte Toxizität in der Zelle mindern. Für *C. elegans* konnte im Gegensatz zu *S. cerevisiae* zudem eine verstärkte α -Synuclein-Aggregation bei einer Herunterregulierung von W08D2.5 über den Mechanismus der RNAi gezeigt werden (Gitler *et al.*, 2009).

Untersuchungen von Yeager-Lotem *et al.* an Mutanten, welche die α -Synuclein-Toxizität in *S. cerevisiae* ändern, ergaben, dass die Überexpression von dem $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Transporter Ccc1 (siehe Kapitel 4.6.3) ebenso wie die Überexpression von Ypk9 in einer Supprimierung der α -Synuclein-Toxizität resultiert. Dieser Befund spricht wie die Supprimierung der Mangan-Sensitivität von Δypk9 -Zellen durch eine Ccc1-Überexpression (siehe Kapitel 4.6.3) dafür, dass die Funktionen von Ccc1 und Ypk9 überlappen und die α -Synuclein-Toxizität möglicherweise durch eine veränderte Mangan-Konzentration im Cytoplasma abgeschwächt wird. Interessanterweise führte die Überexpression von Pmr1 zu einer Verstärkung der α -Synuclein-Toxizität (Yeager-Lotem *et al.*, 2009). Ein möglicher Einfluss der Mangan-Homöostase auf die α -Synuclein-Toxizität scheint also denkbar. Da die Analyse des Pathomechanismus von α -Synuclein jedoch nicht das Ziel dieser Arbeit war, wurden diese Punkte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter analysiert.

4.5 Schwermetalle

Neben der zentralen Beteiligung an der Autophagie spielt die Vakuole außerdem eine große Rolle bei der Detoxifizierung von Schwermetallen. Zudem sind die den Typ V P-Typ ATPasen bezüglich der Sequenz sehr nahe verwandten Typ IB ATPasen Schwermetalltransporter, die zum einen für die Versorgung der Zelle mit den entsprechenden Spurenelementen zuständig sind, zum anderen die Zelle aber auch vor Vergiftungen durch zu großen Mengen dieser Ionen schützen (Kühlbrandt, 2004).

Es bestand somit die Möglichkeit, dass auch Ypk9 am Transport von Schwermetallen beteiligt sein könnte. Liegt in der *S. cerevisiae* Zelle ein Defekt eines Schwermetalltransporters vor, kommt es häufig zu einer Hypersensitivität oder einer erhöhten Toleranz gegenüber erhöhten Konzentrationen des jeweiligen Metalls. Bei einer durch einen Gendefekt verursachten Mangelversorgung mit einem bestimmten Metall kann es dagegen bei dessen Abwesenheit im Wachstumsmedium zu einem Wachstumsdefizit der Zelle kommen. Die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase Pmr1 z. B. versorgt verschiedene Enzyme des Golgi-Apparats mit Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen und sorgt zudem für die Detoxifizierung von Mangan über den

sekretorischen Pfad. Der für Pmr1 defiziente $\Delta pmr1$ -Stamm ist zum einen sensitiv gegenüber der Abwesenheit von Ca^{2+} im Medium, zum anderen aber auch sensitiv gegenüber hohen Mn^{2+} -Konzentrationen (Ton *et al.*, 2002), da überschüssiges Mangan nicht mehr zur Entgiftung aus der Zelle heraus transportiert werden kann.

Um die mögliche Beteiligung von Ypk9 an der Homöostase verschiedener Metalle zu prüfen, wurde das Wachstumsverhalten des $\Delta ypk9$ -Stammes in Anwesenheit semitoxischer Konzentrationen verschiedener Metalle getestet. Es konnte jedoch zuerst nur ein leichtes Wachstumsdefizit für eine sehr hohe Ca^{2+} -Ionenkonzentration (500 mM) bei einem zusätzlichem Temperaturstress von 37°C festgestellt werden. Eine Hypersensitivität gegenüber einer erhöhten extrazellulären Ca^{2+} -Ionen-Konzentration (ab 62,5 mM) wurde bereits bei $\Delta spf1$ -Zellen beobachtet, es konnte jedoch kein direkter Ca^{2+} -Transport für das Spf1-Protein nachgewiesen werden (Cronin *et al.*, 2002). Auch das Spf1-Homolog Cta4 aus *S. pombe* (49 % Identität und 69 % Ähnlichkeit) spielt eine Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase der Zelle (Façanha *et al.*, 2002). Zum einen ist der $\Delta cta4$ -Stamm sensitiv gegenüber erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen (ab 10 mM), zeigt zum anderen aber auch ein Wachstumsdefizit, wenn extrazelluläres Calcium durch EGTA cheliiert wurde. Zudem lässt sich auch ein Anstieg des intrazellulären Calciumlevels der Zelle beobachten, welcher vermutlich dadurch entsteht, dass das Calcium in den $\Delta cta4$ -Zellen nicht mehr vollständig in interne Calciumspeicher eingeschleust werden kann (Façanha *et al.*, 2002). Spf1 und Cta4 sind beide im ER lokalisiert, welches als Calciumspeicher eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielt. Eine weitere *S. pombe* Typ V P-Typ ATPase, Cta5 (zu 20 % identisch zu Spf1 und zu 27 % identisch zu Ypk9), ist hingegen in der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert und scheint ebenfalls in die Ca^{2+} -Homöostase involviert zu sein (Furune *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* besitzt *S. pombe* noch eine dritte Typ V P-Typ ATPase, SPCC1672.11c, welche eine größere Homologie zu Ypk9 aufweist als Cta5 (44 % Identität zu Ypk9, 21 % Identität zu Spf1). Anhand der Calciumsensitivität der jeweiligen Doppel-Deletionsstämme konnte für diese ATPase wie für Cta5 ein epistatischer Effekt mit der vakuolären Ca^{2+} -Pumpe Pmc1 festgestellt werden (Furune *et al.*, 2008). Die jeweiligen Einzelmutanten zeigten jedoch keine erhöhte Sensitivität gegenüber Calcium-Konzentrationen bis 30 mM.

Die beobachtete Ca^{2+} -Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stammes wurde nur bei einer sehr hohen Calcium-Konzentration (500 mM) und zudem nur bei einem zusätzlichen Temperaturstress von 37°C gefunden. Die physiologische Calcium-Konzentration in der Hefe *S. cerevisiae* ist mit ca. 100-200 nM im Cytoplasma (Rees *et al.*, 1997) wesentlich niedriger und auch die

Konzentration in dem Haupt-Calciumspeicher der Hefe, der Vakuole, liegt mit ca. 1,3 mM (Halachmi und Eilam 1989) noch deutlich unter der hier verwendeten Konzentration von 500 mM. Es ist also eher unwahrscheinlich, dass es unter physiologischen Bedingungen durch den Verlust der Ypk9 Funktion zu einer Calcium-induzierten Wachstumsstörung kommen könnte. Zudem ist Calcium eines der am häufigsten auftretenden Signalmoleküle, welches an den verschiedensten Pfaden und Prozessen der zellulären Signalübermittlung beteiligt ist (Petersen *et al.*, 2005). Die Abhängigkeit einer solchen Vielfalt zellulärer Mechanismen von Calcium-Ionen führt dazu, dass die Calciumsensitivität ein weit verbreiteter Phänotyp ist. Ob und auf welche Weise Ypk9 wirklich zum Erhalt der Ca²⁺-Homöostase beiträgt, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht klären und wurde im Rahmen dieser Arbeit auch nicht weiter thematisiert.

4.6 Mangan-Sensitivität

4.6.1 *Δypk9* ist sensitiv gegenüber Mangan

Neben der Sensitivität des *Δypk9*-Stammes gegenüber Calcium konnte ebenfalls eine Sensitivität gegenüber Mangan festgestellt werden; diese zeigte sich zudem in deutlicherem Ausmaß und bei der für *S. cerevisiae* optimalen Wachstumstemperatur von 30°C. Das Wachstumsdefizit der *Δypk9*-Zellen trat am stärksten in SC-Medium auf und konnte sowohl auf festem als auch in flüssigem Medium beobachtet werden. Die Reversibilität des Wachstumsdefizits durch die Expression von Ypk9 von einem Expressionsvektor bestätigte, dass die Sensitivität des *Δypk9*-Stamms auf die fehlende Funktion von Ypk9 zurückzuführen ist und nicht etwa von einer, durch die Deletion des *YPK9*-Gens verursachten, Änderung in der Expression eines benachbarten Gens (60 bp stromaufwärts endet *YOR292c*) verursacht wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Funktion von Ypk9 für die Reversibilität benötigt wird, da die Expression der Punktmutante Ypk9_{D781N} keinen komplementierenden Effekt zeigte. Ypk9_{D781N} sollte durch einen Austausch der während der ATP-Hydrolyse phosphorylierten Asparaginsäure gegen Asparagin keine ATPase-Aktivität mehr besitzen und somit als Null-Mutante gelten.

Ähnlich wie für die Beteiligung bei der Calcium-Homöostase konnte auch für andere Typ V P-Typ ATPasen bereits ein Zusammenhang mit der Mangan-Homöostase hergestellt werden. Während in *S. Pombe* für *Δcta4*-Zellen eine Sensitivität gegenüber erhöhten Mangan-Konzentrationen (0,25 mM) festgestellt werden konnte (Façanha *et al.*, 2002), zeigte der *S.*

cerevisiae Stamm $\Delta spf1$ in einer Studie von Cronin *et al.* (2000) keine gegenüber dem WT erhöhte Sensitivität bei Konzentrationen bis zu 8 mM (YPD Medium). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch unter gleichen Bedingungen für die auch die erhöhte Mangan-Sensitivität der $\Delta ypk9$ -Zellen festgestellt wurde, eine in etwa gleich starke Sensitivität für den $\Delta spf1$ Stamm beobachtet werden. Für die *S. Pombe* Stämme $\Delta cta5$ und $\Delta SPCC1672.11c$ liegen keine Daten für das Wachstum mit erhöhten Mangan-Konzentrationen vor; Façanha *et al.* zeigten jedoch eine Sensitivität gegenüber einem Mangel an Mangan bei gleichzeitiger Deletion eines zweiten Gens, nämlich der Ca^{2+}/Mn^{2+} -ATPase *PMR1*. Weder der Einzeldelentionsstamm $\Delta cta5$ noch $\Delta SPCC1672.11c$ oder $\Delta pmr1$ zeigten ein Wachstumsdefizit in manganarmen Medium, was vermuten lässt, dass bei *Pmr1* defizienten Zellen sowohl *Cta5* als auch *SPCC1672.11c* für den Erhalt der Mangan-Homöostase benötigt werden (Furune *et al.*, 2008).

Neben *Ypk9* scheinen also auch anderer Typ V P-Typ ATPasen an der Mangan-Homöostase beteiligt zu sein, wobei mit *Spf1* sowohl eine überlappende Funktion innerhalb derselben Spezies als auch mit *Cta4*, *Cta5* und *SPCC1672.11c* eine Spezies übergreifende Funktionsüberlappung besteht. Dies könnte auf eine konservierte Funktion der Typ V P-Typ ATPasen innerhalb der Mangan-Homöostase hinweisen, die möglicherweise bis hin zum humanen *Atp13a2* erhalten geblieben sein könnte.

Von Gitler *et al.* wurde in einer unabhängigen Studie ebenfalls eine erhöhte Sensitivität von $\Delta ypk9$ -Zellen gegenüber Mangan beobachtet, welche in SC Medium bei 10-14 mM Mangan am ausgeprägtesten vorlag und die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bestätigt. Auch hier konnte bis auf eine leichte Resistenz des $\Delta ypk9$ -Stammes gegenüber Kupfer (10 mM) keine Wachstumsveränderung für weitere Metalle, wie Eisen, Cobalt und Zink, gemacht werden, was im Einklang mit den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen auf eine relativ spezifische Beteiligung von *Ypk9* an der Mangan-Homöostase hinweist.

4.6.2 Komplementation von $\Delta ypk9$ mit dem humanen *Atp13a2*-Protein

Nachdem mit der Mangan-Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stammes ein eindeutiger Phänotyp identifiziert werden konnte, sollte überprüft werden, ob das humane *Atp13a2*-Protein die Funktion des *Ypk9*-Proteins in der Hefezelle übernehmen kann. Trotz der Verwendung verschiedener Expressionsvektoren, von denen das *Atp13a2*-Protein durch verschiedene

Promotoren und mit verschiedenen *tags* exprimiert wurde, konnte die Funktionsübernahme des humanen Proteins anhand einer Supprimierung der Mangan-Sensitivität nicht beobachtet werden. Das Atp13a2-Protein konnte zudem weder im Westernblot noch durch Fluoreszenzmikroskopie in der Zelle und somit auch nicht in der vakuolären Membran nachgewiesen werden.

Da die evolutionäre Distanz zwischen Mensch und Hefe relativ groß ist und somit nicht alle zellulären Prozesse konserviert sind, kann es in *S. cerevisiae* durchaus zu einer fehlerhaften Expression heterologer Proteine kommen (Ton und Rao, 2004). Dies könnte z. B. auf eine unvollständige Glykosylierung (Murakami-Sekimata *et al.*, 2009) oder einer Retention speziell von heterolog exprimierten Membranproteinen im ER (Froissard *et al.*, 2006) zurückzuführen sein. Atp13a2 ist ein Membranprotein mit zehn Transmembrandomänen und könnte somit möglicherweise in der Hefe nicht korrekt synthetisiert werden, folglich könnte auch keine Komplementation des Verlusts von Ypk9 stattfinden. Es kann zudem auch nicht komplett ausgeschlossen werden, dass Ypk9 und Atp13a2 trotz der gleichen subzellulären Lokalisation möglicherweise doch unterschiedliche Funktionen innehaben und somit eine Komplementation trotz intaktem Atp13a2 prinzipiell nicht möglich wäre.

In den Studien von Gitler *et al.* konnte eine Komplementation der Mangan-Sensitivität von $\Delta ypk9$ -Zellen mit humanem Atp13a2 ebenfalls nicht gezeigt werden. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass die Komplementation im Rahmen dieser Arbeit am wahrscheinlichsten deswegen nicht nachgewiesen werden konnte, da es in *S. cerevisiae* zu einer fehlerhaften Synthese des humanen Atp13a2-Proteins kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit bisher kein System zur Prüfung der Pathogenität putativer Mutationen im humanen *ATP13A2* etabliert werden. Eine Möglichkeit, dennoch einzelne Mutationen im *ATP13A2*-Gen in der Hefe analysieren zu können, wäre die Übertragung äquivalenter Mutationen auf das *YPK9*-Gen. Die Übereinstimmung der Aminosäuren der beiden Proteine von 36 % ist für einen solchen Ansatz jedoch relativ gering. Eine mögliche Analyse putativer *missense*-Mutationen müsste im Einzelfall auf das Vorliegen identischer Aminosäuren im Ypk9-Protein geprüft werden und wäre für Mutationen in nicht-konservierten Bereichen wahrscheinlich nicht durchführbar. Die Analyse von nonsense-Mutationen in humanem *ATP13A2* mittels der Übertragung äquivalenter Mutationen auf *YPK9* wurde bereits von Gitler *et al.* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die den humanen Mutationen c.3057delC und c.1632_1653dup22 (Ramirez *et al.*, 2006) entsprechenden, trunkierten Proteine Ypk9 _{Δ 833-1472} und Ypk9 _{Δ 1329-1472} zum einen die

lysosomale Membran nicht erreichten und im Cytoplasma bzw. im ER lokalisierten und zum anderen, dass beide Proteine auch nicht wie das WT-Ypk9-Protein zu einer Supprimierung der erhöhten Mangan-Sensitivität von $\Delta ypk9$ -Zellen führen konnten (Gitler et al., 2009).

4.6.3 Die Rolle von Ypk9 in der Mangan-Homöostase von *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* sind hauptsächlich zwei Metall-Transporter für die Aufnahme und den intrazellulären Transport von Mangan zuständig (Culotta et al., 2005). Smf1 und Smf2 gehören der Nramp (*natural resistance associated macrophage protein*)-Familie an (Portnoy et al., 2002). Während Smf1 in der Plasmamembran lokalisiert ist (Supek et al., 1996), befindet sich Smp2 in Golgi-ähnlichen Vesikeln (Luk und Culotta, 2001). Beide Proteine werden bei ausreichenden extrazellulären Mangan-Konzentrationen in der Vakuole abgebaut (Lui und Culotta, 1999, Portnoy et al., 2000). Bei Mangan-Mangel hingegen fungieren sie in der Aufnahme und der intrazellulären Verteilung von Mangan und werden nicht abgebaut. Bei einem Mangan-Überschuss und vermutlich zum Teil auch unter normalen Bedingungen wird Mangan hauptsächlich durch den in der Plasmamembran lokalisierten Phosphattransporter Pho84 als Metall-Phosphat-Komplex $MnHPO_4$ aufgenommen (Jensen et al., 2003).

Zur Detoxifizierung von zu hohen Mengen aufgenommenen Mangans wird dieses entweder über die in der Golgi-Membran lokalisierte Ca^{2+}/Mn^{2+} -ATPase Pmr1 über den sekretorischen Pfad wieder aus der Zelle herausgeschleust oder durch den in der vakuolären Membran lokalisierten putativen Fe^{2+}/Mn^{2+} -Transporter Ccc1 (Li et al., 2001) in die Vakuole eingelagert (Culotta et al., 2005). Ein weiteres Protein, welches an der Mangan-Homöostase beteiligt ist, ist das ebenfalls in der vakuolären Membran lokalisierte Protein Mam3 (Yang et al., 2004).

Um die Funktion des Ypk9-Proteins für die Aufrechterhaltung der Mangan-Homöostase besser einordnen zu können, wurde die Interaktion zwischen *YPK9* und einigen bekanntermaßen an der Mangan-Homöostase beteiligten Genen überprüft.

$\Delta pmr1$ -Zellen akkumulieren große Mengen Mangan im Cytosol (Lapinskas et al., 1995) und sind daher sensitiv gegenüber hohen extrazellulären Mangan-Konzentrationen. Durch einen zusätzlichen Ausfall des Ypk9-Proteins im $\Delta pmr1\Delta ypk9$ -Stamm wäre es gut möglich, dass eine erhöhte Mangan-Sensitivität hervorgerufen wird, also ein additiver Effekt beider Phänotypen erkennbar ist. Zudem könnte eine Veränderung der Mangan-Homöostase durch

die Überexpression von Ypk9 in $\Delta pmr1$ -Zellen ebenfalls zu einer veränderten Mangan-Sensitivität führen. Eine Überexpression von *CCC1* z. B. schützt $\Delta pmr1$ -Zellen vor toxischen Mengen an cytosolischem Mangan, indem dieses in die Vakuole transportiert wird (Lin *et al.*, 2009).

Für eine Interaktion von *YPK9* mit dem *PMR1*-Gen konnten im Rahmen dieser Arbeit allerdings keine Anhaltspunkte gefunden werden. Für den Doppel-Deletionsstamm $\Delta pmr1\Delta ypk9$ konnte kein Effekt bezüglich der Mangan-Sensitivität beobachtet werden; die $\Delta pmr1\Delta ypk9$ -Zellen verhielten sich bei erhöhten extrazellulären Mangan-Konzentrationen wie der $\Delta pmr1$ -Stamm. $\Delta pmr1$ -Zellen reagieren bereits gegenüber leicht erhöhter extrazellulärer Mangan-Konzentration (0,5 mM) äußerst sensitiv, $\Delta ypk9$ -Zellen zeigen hingegen erst bei einer wesentlich höheren Konzentration (ab 10 mM) ein Wachstumsdefizit. Daher wäre es durchaus möglich, dass der zusätzliche Verlust der Ypk9-Aktivität in $\Delta pmr1$ -Zellen die ohnehin schon stark beeinträchtigte Mangan-Homöostase nur in einem äußerst geringen Maß zusätzlich beeinflusst und somit keinen additiven Effekt beider Phänotypen erkennen lässt.

Bezüglich der Überexpression von Ypk9 lagen keine Wachstumsunterschiede zwischen $\Delta pmr1$ -Zellen, die mit einem Leervektor transformiert worden waren, und Ypk9-überexprimierenden $\Delta pmr1$ -Zellen vor. Die Mangan-Sensitivität von $\Delta pmr1$ -Zellen konnte also nicht durch die Überexpression von *YPK9* supprimiert werden. Es scheint hier nicht wie bei der Überexpression von *CCC1* zu einer Einlagerung ausreichender Mengen überschüssigen cytosolischen Mangans in die Vakuole zu kommen. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass Ypk9 möglicherweise an dem Transport von Mn^{2+} -Ionen aus der Vakuole heraus beteiligt ist, anstatt das Metall in die Vakuole einzulagern. Ob Ypk9 überhaupt direkt Mangan transportiert, müsste ebenfalls in weiterführenden Experimenten verifiziert werden.

Für den $\Delta ccc1\Delta ypk9$ -Stamm könnte man ebenfalls vermuten, dass die durch den Verlust der *Ccc1*-Funktion ausgelöste Sensitivität gegenüber Mangan (Lapinskas *et al.*, 1996) und der in Ypk9-defizienten Zellen beobachteten erhöhten Mangan-Sensitivität einen additiven Effekt zeigen und somit gegenüber der Einzeldelentionsstämmen eine erhöhte Mangan-Sensitivität vorliegen könnte. Entgegen der in der Literatur gemachten Beobachtung, dass der $\Delta ccc1$ Stamm eine erhöhte Sensitivität gegenüber 10 mM Mangan zeigt, konnte im Rahmen dieser Arbeit für diesen Stamm keine erhöhte Sensitivität gegenüber vergleichbaren Konzentrationen festgestellt werden. Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein,

dass im Rahmen dieser Arbeit ein Hefestamm mit einem anderen genetischen Hintergrund als von Lapinskas *et al.* verwendet wurde. Neben allgemeinen Phänotypen, die durchweg innerhalb verschiedener Hefe-Stämme auftreten, werden immer wieder stammspezifische Beobachtungen in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds gemacht, was z. B. auch bezüglich der Beteiligung von Genen an den Prozessen des Alterns in verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen beschrieben wurde (Kaeberlein *et al.*, 2006). Möglicherweise sind bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten BY4741- $\Delta ccc1$ -Stamm aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds höhere Mangan-Konzentrationen zum Auslösen eines Wachstumsdefizits nötig, was experimentell überprüft werden müsste.

Der $\Delta ccc1\Delta ypk9$ -Stamm zeigte gegenüber dem $\Delta ypk9$ -Stamm keine erhöhte Mangan-Sensitivität, somit scheint auch in diesem Fall kein additiver Effekt vorzuliegen. Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob der im Rahmen dieser Arbeit verwendete $\Delta ccc1$ -Stamm eine erhöhte Sensitivität gegenüber höheren Mangan-Konzentrationen als den hier verwendeten 12 mM zeigen würde. Durch die Beobachtung einer verringerten Mangan-Konzentration im Cytoplasma (Lapinskas *et al.*, 1996) bzw. einer erhöhten Mangan-Konzentration in der Vakuole (Li *et al.*, 2001) von Ccc1 überexprimierenden Zellen konnte bereits eine direkte Beteiligung von Ccc1 an der Mangan-Homöostase gezeigt werden, unabhängig von einem Wachstumsphänotyp. Ein zusätzlicher Funktionsverlust von Ccc1 in $\Delta ypk9$ -Zellen scheint das Gleichgewicht der Mangan-Homöostase jedoch nicht in dem Maße zu beeinflussen, dass es in $\Delta ccc1\Delta ypk9$ -Zellen zu einer verstärkten Mangan-Sensitivität kommt.

Die Überexpression von Ccc1 in $\Delta ypk9$ -Zellen führte jedoch interessanterweise zu einer Supprimierung der Mangan-Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stamms; dies geschieht vermutlich durch den von Ccc1-vermittelten Transport von Mn^{2+} -Ionen in die Vakuole und stützt die These, dass das Ypk9-Protein selbst Mangan in die Vakuole transportieren könnte. Durch einen Funktionsverlust von Ypk9 könnte es möglicherweise zu einem erhöhten cytoplasmatischen Mangan-Gehalt kommen, der wiederum die erhöhte Sensitivität gegenüber extrazellulärem Mangan erklären könnte. Durch die Überexpression von Ccc1 kommt es zu einer Verringerung der Mn^{2+} -Konzentration des Cytosol und einer Erhöhung der Mn^{2+} -Konzentration der Vakuole (Lapinskas *et al.*, 1996 und Li *et al.*, 2001). Es wird also vermutlich cytosolisches Mangan in die Vakuole transportiert, was das Gleichgewicht der Mangan-Homöostase in den $\Delta ypk9$ -Zellen wieder herstellen würde und so möglicherweise eine Supprimierung der Mangan-Sensitivität hervorrufen könnte. Zu einem solchem

Mechanismus kommt es auch in $\Delta pmr1$ -Zellen, die durch eine Überexpression von Ccc1 vor toxischen Mengen an cytosolischem Mangan geschützt werden, indem dieses von Ccc1 in die Vakuole transportiert wird (Lin *et al.*, 2009). Ob in $\Delta ypk9$ -Zellen jedoch wirklich eine erhöhte cytoplasmatische Mn^{2+} -Konzentration vorliegt, müsste experimentell überprüft werden. Neben der von Lapinskas *et al.* beschriebenen Mangan-Sensitivität des $\Delta ccc1$ -Stamms, der im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht für eine Konzentration von 12 mM Mangan bestätigt werden konnte, zeigen $\Delta ccc1$ -Zellen zudem eine erhöhte Sensitivität gegenüber Eisen (3 mM) (Li *et al.*, 2004). Zwar konnte weder im Rahmen dieser Arbeit noch von Gitler *et al.* für $\Delta ypk9$ -Zellen eine Sensitivität gegenüber Eisen (bis 9 mM) festgestellt werden, dennoch könnte anhand von weiteren Analysen der putativen Interaktion zwischen Ccc1 und Ypk9 in Anbetracht der Eisen-Homöostase nähere Informationen über den hier zugrunde liegenden Mechanismus gewonnen werden. Es sollte überprüft werden, ob die Überexpression von *YPK9* möglicherweise die in $\Delta ccc1$ -Zellen vorliegende Sensitivität gegenüber Eisen supprimieren könnte.

Für den Mangan-toleranten $\Delta mam3$ -Stamm konnten keine Veränderungen der Mangan-Konzentration in der Vakuole detektiert werden und es konnte zudem bisher keine Interaktion mit bereits bekannten Mangan-Transportwegen festgestellt werden (Yang *et al.*, 2004). Auch im Zusammenhang mit *YPK9* zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit keine Interaktion. In dem Doppel-Deletionsstamm $\Delta mam3\Delta ypk9$ scheint die aus dem Verlust der Ypk9-Aktivität resultierende Mangan-Sensitivität durch die aus dem Verlust der Mam3-Aktivität resultierende Toleranz gegenüber Mangan aufgehoben zu werden. Auch die Überexpression des Ypk9-Proteins in $\Delta mam3$ -Zellen zeigte keinen Wachstumsunterschied. Da über den molekularen bzw. physiologischen Mechanismus der Mangan-Toleranz des $\Delta mam3$ -Stamms bisher keinerlei Erkenntnisse vorliegen, können die mit diesem Stamm durchgeführten Versuche zum jetzigen Zeitpunkt nicht zur Aufklärung der Funktion des Ypk9 Proteins beitragen und wurden im Rahmen dieser Arbeit auch nicht weiter bearbeitet. Die Supprimierung der Mangan-Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stamms durch den Funktionsverlust von Mam3 sollte jedoch für zukünftige Überlegungen bezüglich möglicher Therapieansätze für das Kufor-Rakeb Syndrom nicht außer Acht gelassen werden.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit bezüglich der Einordnung von Ypk9 in die Mangan-Homöostase von *S. cerevisiae* also eine Interaktion von Ccc1 und Ypk9 aufgezeigt werden. Die durch den Funktionsverlust von Ypk9 ausgelöste erhöhte Sensitivität gegenüber Mangan konnte durch eine Überexpression von Ccc1 supprimiert werden. Um ein genaueres

Verständnis dieser Interaktion zu erlangen, müssen jedoch weitere Untersuchungen gemacht werden. Interaktionen mit zwei weiteren *S. cerevisiae* Genen, die an der Mangan-Homöostase beteiligt sind, *PMR1* und *MAM3*, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Um einen genaueren Einblick über die Beteiligung von Ypk9 an der Mangan-Homöostase zu bekommen, könnte eine Messung des zellulären Mangan Gehalts z. B. mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (Luk *et al.*, 2003) in $\Delta ypk9$ -Zellen durchgeführt werden. Bei vorheriger Isolation der Vakuolen (Padilla-López und Pearce, 2006) könnte überprüft werden, ob sich der Mangangehalt der Vakuole in Ypk9-defizienten Zellen von dem in WT-Zellen unterscheidet. Zudem könnte so auch eine mögliche Änderung des Mangangehalts durch eine Überexpression von Ypk9 überprüft werden. Eine direkter Prüfung des Transports von Mangan durch Ypk9 könnte über eine ATP-Hydrolyse durch aufgereinigtes Ypk9 in Anwesenheit von Mangan durchgeführt werden (Mandal *et al.*, 2000). Die Abhängigkeit der Ypk9-ATPase Aktivität könnte in einem ähnlichen Ansatz auch im Zusammenhang mit anderen Metallen, wie z. B. Eisen bestimmt werden. Eine ATP-Hydrolyse sollte dabei nur in Anwesenheit eines Substrats von Ypk9 stattfinden.

4.6.4 Übertragung der Mangan-Sensitivität von $\Delta ypk9$ -Zellen auf Mammalia

Anhand des Modellorganismus *S. cerevisiae* konnte im Rahmen dieser Arbeit und der unabhängigen Studie von Gitler *et al.* eine Verbindung zwischen der Mangan-Homöostase der Zelle und dem *S. cerevisiae* Homolog der Typ V P-Typ ATPase Atp13a2, welche mit Parkinsonismus assoziiert ist, hergestellt werden.

Weitergehend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch humane Fibroblasten, welche durch zwei im *compound*-heterozygoten Zustand vorliegende Mutationen Atp13a2-defizient sind, eine erhöhten Mangan-Sensitivität gegenüber gesunden Kontroll-Fibroblasten aufweisen. Somit konnte diese Assoziation bestätigt werden und es wurde zum erstem mal eine Verbindung zwischen dem humanen Atp13a2 und der Mangan-Homöostase hergestellt. Diese Überlappung der Beteiligung des *S. cerevisiae* Ypk9 und des humanen Atp13a2 am Mangan-Stoffwechsel deutet somit wahrscheinlich auf eine spezieübergreifende Konservierung der Funktion beider Proteine hin.

In einem unabhängigen Kontrollversuch, bei dem durch die transiente Expression von Atp13a2-WT-Protein in den Patienten-Fibroblasten die erhöhte Mangan-Sensitivität supprimiert werden sollte, konnte die Beteiligung von Atp13a2 an der Mangan-Homöostase

jedoch nicht definitiv bestätigt werden. Obwohl mit dem Nucleofector® System (Amaxa) eine relativ effiziente Methode für die schwer zu transfizierenden primären Fibroblasten zur Verfügung stand (Jakobsen *et al.*, 2006), war die Mangan-Sensitivität der Fibroblasten nicht reversibel. Es ist möglich, dass die Transfektion der Zellen nicht effizient genug gewesen ist. Da das transfizierte *Atp13a2* nicht GFP-gekoppelt war, konnte die tatsächliche Transfektionsrate letztendlich nicht bestimmt werden. Die Transfektionsrate für das Kontrollplasmid war mit ca. 50 % jedoch relativ gering. Die Zellen wurden durch die Nucleofektion zudem stark gestresst und es konnte generell ein verlangsamtes Wachstum beobachtet werden. Möglicherweise konnten sich die untransfizierten Zellen schneller von diesem Stress erholen, so dass sich hauptsächlich untransfizierte Zellen geteilt haben, wodurch sich ihr Anteil erhöht hat und somit kaum transfizierte Zellen auf ihre Mangan-Sensitivität hin getestet werden konnten.

Um zukünftig dennoch eine mögliche Supprimierung der Mangan-Sensitivität der Patienten-Fibroblasten aufzeigen zu können, könnte z. B. zunächst eine Anreicherung von *Atp13a2*-GFP exprimierenden Zellen mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) vorgenommen werden (Singh Roy *et al.*, 2005). Somit könnte eine höhere Rate an transfizierten Zellen innerhalb des Mangan-Assays gewährleistet werden. Eine weitere Möglichkeit der Erhöhung der Rate an transfizierten Zellen bestünde in der Verwendung eines Systems zur stabilen Transfektion z. B. mittels Retroviren (Recillas-Targa *et al.*, 2006). Diese Methode der Transfektion ist zwar sehr aufwendig, bietet aber eine hohe Effizienz.

Durch das Herunterregulieren von *ATP13A2* in neuronalen SH-SY5Y-Zellen und eine möglicherweise so induzierte Sensitivität der Zellen gegenüber Mangan sollten die Befunde aus den Patienten-Fibroblasten durch eine weitere Methode bestätigt werden. Es konnte jedoch bei einem durchschnittlichen Restgehalt von 30-40 % *ATP13A2*-RNA keine erhöhte Sensitivität gegenüber Mangan beobachtet werden. Da die Expression von *ATP13A2* trotz der siRNA-Behandlung nicht komplett ausgeschaltet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die Aktivität der verbleibenden ATPase ausreicht, um die Zellen vor den hohen Mangan-Konzentrationen zu schützen. Dafür spricht insbesondere die Tatsache, dass das Kufor-Rakeb Syndrom autosomal rezessiv vererbt wird und es somit nur auftritt, wenn beide Kopien des *ATP13A2*-Gens defekt sind. Das Vorhandensein einer intakten Kopie hingegen mit 50 % Restfunktion ist für eine normale Entwicklung ausreichend. Da die Herunterregulierung zudem nur auf RNA-Ebene und nicht auf Protein-Ebene überprüft wurde, wäre es durchaus möglich, dass trotz der siRNA Behandlung größere Mengen an *Atp13a2*-Protein in der Zelle

vorliegen. Ramirez *et al.* berichten zwar von einem Abbau des Atp13a2-Proteins innerhalb von 12 Stunden. Diese Beobachtungen wurden jedoch für ein *ATP13A2*-überexprimierendes Zellsystem gemacht und treffen möglicherweise nicht für endogen exprimiertes *ATP13A2* zu. Der limitierende Faktor der Methode der RNA-Interferenz liegt in diesem Fall darin, dass die Expression des *ATP13A2*-Gens nicht komplett ausgeschaltet werden konnte. Selbst mittels höchst effizienter siRNAs gelingt meist nur eine Herunterregulierung der jeweiligen RNA um bis zu 90 % und es liegt immer ein gewisser Anteil an Rest-RNA vor, welcher im Falle von Atp13a2 zu einer Aufrechterhaltung der Mangan-Homöostase ausreichen könnte. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse scheint die Methode der RNA-Interferenz für die hier vorliegende Fragestellung eher ungeeignet und wurde daher nicht für weitere Analysen verwendet.

Obwohl die Mangan-Sensitivität der Atp13a2-defizienten Patienten-Fibroblasten bisher noch nicht in einem unabhängigen Versuch bestätigt werden konnte, wurde dennoch gezeigt, dass wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Mangan-Homöostase in Säugetierzellen und dem Atp13a2-Protein besteht.

Zukünftig könnte weiterhin überprüft werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Sensitivität der Patienten-Fibroblasten Mangan-spezifisch ist, oder ob eine allgemeine Sensitivität gegenüber zellulärem Stress vorliegt. Dies könnte durch die Inkubation der Patienten- und Kontroll-Fibroblasten mit semitoxischen Konzentrationen anderer Schwermetalle, wie z. B. Eisen, Zink oder Kupfer überprüft werden (Issa *et al.*, 2008). Um die generelle Beteiligung von Atp13a2 an der Mangan-Homöostase zu bestätigen und auszuschließen, dass es sich bei der Mangan-Sensitivität der Patienten-Fibroblasten um einen spezifischen Effekt für diese Zelllinie und ihren genetischen Hintergrund handelt, könnten prinzipiell Fibroblasten von Betroffenen aus anderen Familien untersucht werden (Di Fonzo *et al.*, 2007), die jedoch z. Zt. nicht zur Verfügung stehen. Auch könnten für die humanen Atp13a2-defizienten Fibroblasten Messungen zum zellulären Mangangehalt z. B. mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektrometrie (Luk *et al.*, 2003) im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten durchgeführt werden. Bei vorheriger Isolation der Lysosomen könnten auch Veränderungen speziell für den lysosomalen Mangangehalt detektiert werden (Radisky und Kaplan, 1998).

Ein weiterer interessanter Punkt wäre die Analyse, ob Mangan den programmierten Zelltod, also Apoptose, in Patienten-Fibroblasten vermittelt oder ob der zum nekrotischen Zelltod

kommt. Für neuronale Stammzellen der Ratte konnte z. B. ein Mitochondrien-vermittelter Zelltod über die Apoptose gezeigt werden (Tamm *et al.*, 2008).

Ein Zusammenhang zwischen der Mangan-Homöostase und Neurodegeneration ist bereits bekannt. Beim Menschen kommt es bei einer längeren (meist mehrjährigen) Aufnahme von Mangan zum so genannten Manganismus. Dieses dem Parkinsonismus ähnelnde Krankheitsbild betrifft häufig Menschen, die durch ihre Arbeit z. B. in Batteriefabriken oder durch das Schweißen hohen Mangan-Konzentrationen ausgesetzt sind. Die Patienten leiden neben den typischen Symptomen des Parkinsonismus, wie z. B. verlangsamten Bewegungen, mangelhafter oder fehlender Mimik, einer gebückten Haltung und einem kleinschrittigen und zum Teil schlurfenden Gang, außerdem unter Halluzinationen, Psychosen und Sprachstörungen (Huang, 2007). Im Gegensatz zur Parkinson-Krankheit konnte bisher jedoch keine durch Manganismus ausgelöste Bildung von Lewy-Körperchen beobachtet werden (Jankovic, 2005). Ob hingegen Mutationen des *ATP13A2*-Gens bei Kufor-Rakeb-Patienten zu einer Bildung von Lewy-Körperchen führen, konnte bis dato nicht geklärt werden. Der Nachweis von Lewy-Körperchen erfolgt *post mortem* und wurde bisher noch bei keinem KRS-Patienten durchgeführt. Somit können über eine Übereinstimmung der Abwesenheit von Lewy-Körperchen und daher über einen möglicherweise ähnlichen Pathomechanismus von KRS und Manganismus keine Aussagen getroffen werden. Zudem gibt es bisher kaum Erkenntnisse über den Mechanismus, wie Mangan den Parkinsonismus-ähnlichen Phänotyp des Manganismus auslöst. Es wird allerdings vermutet, dass oxidativer Stress, eine mitochondriale Dysfunktion und eine Neuroinflammation maßgeblich beteiligt sind (Milatovic *et al.*, 2009).

Die in den Patienten-Fibroblasten beobachtete Verbindung zwischen der Mangan-Homöostase und den Parkinsonismus-verursachenden Mutationen in *ATP13A2* zeigen eine Verknüpfung von genetischen und umweltbedingten Ursachen des Parkinsonismus und könnten möglicherweise auf einen gemeinsamen Pathomechanismus hindeuten. Eine Analyse der mitochondrialen Funktion sowie einer möglichen Akkumulierung von ROS, wie sie bereits für α -Synuclein exprimierende Hefestämmen beschrieben wurde (Witt *et al.*, 2006), sowohl für den *S. cerevisiae* Stamm Δ ypk9 als auch für die humanen *Atp13a2*-defizienten Fibroblasten, könnte weitere Erkenntnisse bezüglich dieses Hinweises liefern.

5 Zusammenfassung

Mutationen in der humanen Typ V P-Typ ATPase *ATP13A2* führen zum Kufor-Rakeb Syndrom, einer juvenilen Form des Parkinsonismus, welche neben den drei klinischen Kardinalsymptomen der Parkinsonerkrankung auch eine Spastik, eine supranukleäre Blickparese und eine Demenz zeigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe des Modellorganismus *S. cerevisiae* Erkenntnisse über die Funktion dieser bisher relativ wenig untersuchten Gruppe von P-Typ ATPasen gewonnen werden, um somit letztlich das Verständnis über molekulare Mechanismen der Neurodegeneration zu erweitern.

Mittels bioinformatischer Analysen konnten im *S. cerevisiae* Genom zwei Typ V P-Typ ATPasen, *SPF1* und *YPK9*, identifiziert werden, von denen *YPK9* mit 36 % Identität und 57 % Ähnlichkeit die größte Homologie zu *ATP13A2* aufzeigte. Anhand einer durchgeführten subzellulären Lokalisierung konnte das Ypk9-Protein in der vakuolären Membran nachgewiesen werden. Da die Vakuole das zu den Lysosomen der Säugetierzelle analoge Hefe-Organell ist und *Atp13a2* lysosomal lokalisiert, schien es aufgrund der Sequenzanalyse und der subzellulären Lokalisation plausibel, dass *YPK9* das Specieshomolog von *ATP13A2* ist.

Für die nicht letale Deletion von *YPK9* in *S. cerevisiae* war zu Beginn der Arbeit im Rahmen systematischer Untersuchungen kein Phänotyp gefunden worden. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene spezifische Hypothesen bezüglich eines möglichen Phänotyps des $\Delta ypk9$ -Stamms getestet werden, um somit möglicherweise zu der Aufklärung der Funktion des Proteins beitragen und gleichzeitig ein zelluläres System hinsichtlich der Pathogenitätsprüfung humaner *ATP13A2*-Mutation etablieren zu können.

Da die Degradation von Proteinen eine zentrale vakuoläre/lysosomale Funktion darstellt und ein gestörter lysosomaler Proteinabbau bereits häufig mit Neurodegeneration in Verbindung gebracht worden war, sollte zuerst der Prozess der Autophagie anhand zweier verschiedener Assays überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Funktionsverlust als auch die Überexpression von Ypk9 keinen Einfluss auf die Rate der Makroautophagie hatte, so dass die Vakuole also trotz des Funktionsverlustes bzw. der Überexpression von Ypk9 zu einem Abbau zellulären Materials fähig zu sein scheint.

Die nächste Hypothese adressierte den Prozess des Alterns, bei dem häufig dieselben Formen zellulären Stresses auftreten, die auch bei neurodegenerativen Erkrankungen zu finden sind.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Funktionsverlust von Ypk9 keine Veränderungen der replikativen Lebensspanne von *S. cerevisiae* bedingt.

Da über das Substrat von Ypk9 und anderen Typ V P-Typ ATPasen bisher keine Erkenntnisse vorlagen, wurde das Wachstum des $\Delta ypk9$ -Stammes bei semitoxischen Konzentrationen verschiedener Leicht- und Schwermetalle getestet, die als mögliche Substrate in Frage kommen könnten. Neben einer schwachen Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stamms gegenüber einer hohen Konzentration von Calcium konnte weiterhin eine erhöhte Sensitivität gegenüber Mangan, welches bei chronischer Belastung Auslöser des dem Parkinsonismus ähnelnden Krankheitsbild Manganismus ist, beobachtet werden. Diese erhöhte Mangantoxizität zeigte sowohl auf festem als auch in flüssigem Medium eine Dosis-Wirkungsbeziehung und konnte durch exogene Ypk9-Expression supprimiert werden. Zudem konnte eine Unterdrückung des Phänotyps durch die Überexpression des ebenfalls in der vakuolären Membran lokalisierten putativen Fe^{2+}/Mn^{2+} -Transporters Ccc1 beobachtet werden. Dies könnte auf eine mögliche überlappende Funktion beider Proteine hinweisen und evtl. zur Einordnung der Rolle des Ypk9-Proteins im Mangan-Stoffwechsel von *S. cerevisiae* beitragen. Interaktionen von *YPK9* mit zwei weiteren in die Mangan-Homöostase involvierten Genen, *PMR1* und *MAM3*, konnten demgegenüber nicht beobachtet werden. Eine Komplementation der Mangan-Sensitivität des $\Delta ypk9$ -Stamms mit humanem Atp13a2, was die Basis für die Etablierung eines Assay-Systems zur Analyse putativer *ATP13A2*-Mutationen darstellen würde, konnte nicht nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es in *S. cerevisiae* zur Instabilität des humanen Atp13a2-Proteins kommt, welches im Westernblot nicht nachweisbar war.

Weiterführende Analysen bezüglich der Sensitivität gegenüber Mangan in einem Säuger-Zellsystems zeigten für Atp13a2-defiziente humane Fibroblasten ebenfalls eine statistisch signifikant erhöhte Mangan-Sensitivität gegenüber gesunden Kontrollfibroblasten. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch das humane Atp13a2 an der zellulären Mangan-Homöostase beteiligt ist. Diese Beobachtung weist auf eine mögliche Verbindung von genetischen und umweltbedingten Ursachen des Parkinsonismus hin und könnte somit möglicherweise bei der weiteren Aufklärung des molekularen Pathomechanismus dieser multifaktoriellen neurodegenerativen Erkrankung hilfreich sein.

6 Summary

Mutations in *ATP13A2*, a human type V P-type ATPase, cause Kufor-Rakeb syndrome, which is a form of juvenile parkinsonism showing spasticity, supranuclear gaze palsy and dementia besides the typical triad of parkinsonism symptoms. The aim of this thesis was to gain new insights into this so far poorly understood group of P-type ATPases through the model organism *S. cerevisiae* to extend the current understanding of the molecular mechanisms of neurodegeneration.

Bioinformatical analyses led to the identification of two type V P-type ATPases within the *S. cerevisiae* genome, *SPF1* and *YPK9*, with *YPK9* showing the highest homology to *ATP13A2* with 36 % identity and 57 % similarity. While the subcellular localization of human *Atp13a2* is the lysosomal membrane, *Ypk9* could be localized to the membrane of the analogous organelle in *S. cerevisiae*, the vacuole. Thus, besides the sequence analyses also the shared subcellular localizations support the assumption that *YPK9* is the species homologue of *ATP13A2*.

At the start of this thesis, none of the already performed systematic studies showed any phenotype for the non-lethal deletion of *YPK9* in *S. cerevisiae*. Hence different specific hypotheses concerning possible phenotypes for $\Delta ypk9$ should be addressed within this thesis to help to uncover protein function and to establish a system to analyse *ATP13A2*-mutations with respect to their pathogenicity.

Degradation of proteins is a central vacuolar/lysosomal process and a defect in lysosomal protein degradation is known to play a role in neurodegeneration. Therefore, autophagy should initially be analyzed using two different methods. It could be shown that neither a defect in *Ypk9* function nor *Ypk9* overexpression influenced autophagic rate, suggesting that the vacuole is still capable of degrading cellular material under these conditions.

The next hypothesis addressed a process which often shows the same kind of cellular stress as neurodegenerative diseases: ageing. However, loss of *Ypk9* function did not alter *S. cerevisiae* replicative life span.

Substrate specificity of *Ypk9* and of the other type V P-type ATPases is still unknown. For this reason, $\Delta ypk9$ growth was tested with semitoxic concentrations of different light and heavy metals which could be putative substrates. Apart from a weak sensitivity of $\Delta ypk9$ to a high concentration of calcium, sensitivity to manganese, which after chronic exposure leads to the parkinsonism like disease manganism, could also be observed. Manganese sensitivity

occurred in $\Delta ypk9$ cells grown on solid as *well* as in liquid media in a dose-dependent manner and could be rescued through exogenous Ypk9 expression. Furthermore, the putative $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -transporter Ccc1, which also localizes to the vacuolar membrane, was able to rescue the phenotype. Pointing to a shared function of both proteins, this observation may help to elucidate the part of Ypk9 within *S. cerevisiae* manganese homeostasis. Interactions with *PMR1* and *MAM3*, which are also involved in manganese homeostasis, could not be observed. Complementation of $\Delta ypk9$ sensitivity with the human Atp13a2, which would be essential for an assay testing putative *ATP13A2* mutations with respect to their pathogenicity, could not be seen. This is possibly due to the instability of the human Atp13a2 protein in *S. cerevisiae*, as it could not be detected by western blot analysis.

Further investigation of manganese sensitivity in a mammalian system led to the observation that Atp13a2-deficient human fibroblasts also showed statistically significant higher manganese sensitivity than healthy control fibroblasts. Thus, it could be shown for the first time that human Atp13a2 is involved in cellular manganese homeostasis. This observation suggests a link between genetic and environmental causes of parkinsonism and may help to further elucidate the molecular pathomechanism of this multifactorial neurodegenerative disorder.

7 Literaturverzeichnis

Alberti, S., Gitler AD, Lindquist S. (2007). "A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast. **24**(10): 913-9.

Altendorf, K., Gassel, M., Puppe, W., Mollenkamp, T., Zeeck, A., Boddien, C., Fendler, K., Bamberg, E., Drose, S. (1998). "Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*." Acta Physiol Scand Suppl. **643**: 137-46.

Ando, A., Suzuki, C. (2005). "Cooperative function of the CHD5-like protein Mdm39p with a P-type ATPase Spf1p in the maintenance of ER homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Genet Genomics. **273**(6): 497-506.

Argüello, J. M. (2003). "Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases." J Membr Biol. **195**(2): 93-108.

Argüello, J. M., Eren E, González-Guerrero M (2007). "The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases." Biometals. **20**(3-4): 233-48.

Au, C., Benedetto A, Aschner M. (2008). "Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1." Neurotoxicology. **29**(4): 569-76.

Axelsen, K., Palmgren, MG. (1998). "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily." J Mol Evol. **46**(1): 84-101.

Bitterman, K. J., Medvedik O, Sinclair DA. (2003). "Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin." Microbiol Mol Biol Rev. **67**(3): 376-99.

Brachmann, C. B., Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." Yeast. **14**(2): 115-32.

Bull, L., van Eijk MJ, Pawlikowska, L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, Klomp LW, Lomri N, Berger R, Scharschmidt BF, Knisely AS, Houwen RH, Freimer NB. (1998). "A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis." Nat Genet. **18**(3): 219-24.

Bull, P., Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. (1993). "The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene." Nat Genet. **5**(4): 327-37.

Camougrand, N., Kissová I, Salin B, Devenish RJ. (2008). "Monitoring mitophagy in yeast." Methods Enzymol. **451**: 89-107.

Chan, T. F., Bertram PG, Ai W, Zheng XF (2001). "Regulation of APG14 Expression by the GATA-type Transcription Factor Gln3p." J. Biol. Chem. **276**(9): 6463-6467.

- Cronin, S., Khoury A, Ferry DK, Hampton RY. (2000). "Regulation of HMG-CoA reductase degradation requires the P-type ATPase Cod1p/Spf1p." J Cell Biol **148(5)**: 915-24.
- Cronin, S., Rao R, Hampton RY. (2002). "Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis." J Cell Biol. **157(6)**: 1017-28.
- Cuervo, A., Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D (2004). "Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy." Science **305(5688)**: 1292-5.
- Culotta, V. C., Yang M, Hall MD. (2005). "Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*." Eukaryot Cell. 2005 Jul;4(7):1159-65. **4(7)**: 1159-65.
- Dagda, R. K., Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Tandon A, Park D, Chu CT. (2009). "Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission." J Biol Chem. **284(20)**: 13843-55.
- Daleke, D. L. (2003). "Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry." J Lipid Res **44(2)**: 233-42.
- Dengjel, J., Kristensen AR, Andersen JS. (2008). "Ordered bulk degradation via autophagy." Autophagy. **4(16)**: 1057-9.
- Di Fonzo, A., Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G, Fabbrini G, Marconi R, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, Squitieri F, Horstink MW, Montagna P, Libera AD, Stocchi F, Goldwurm S, Ferreira JJ, Meco G, Martignoni E, Lopiano L, Jardim LB, Oostra BA, Barbosa ER; Italian Parkinson Genetics Network, Bonifati V. (2007). "ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease." Neurology. **68(19)**: 1557-62.
- Di Fonzo, A., Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LO, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJ, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V. (2009). "FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome." Neurology. **72(3)**: 240-5.
- Dice, J. F. (2007). "Chaperone-mediated autophagy." Autophagy **3(4)**: 295-9.
- Dobson-Stone, C., Fairclough R, Dunne E, Brown J, Dissanayake M, Munro CS, Strachan T, Burge S, Sudbrak R, Monaco AP, Hovnanian A. (2002). "Hailey-Hailey disease: molecular and clinical characterization of novel mutations in the ATP2C1 gene." J Invest Dermatol **118(2)**: 338-43.
- Dürr, G., Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK. (1998). "The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation." Mol Biol Cell. **9(5)**: 1149-62.
- Engelender, S. (2008). "Ubiquitination of alpha-synuclein and autophagy in Parkinson's disease." Autophagy. **1(4)**: 372-4.

- Eriksen, J. L., Przedborski S, Petrucelli L. (2005). "Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease." Trends Mol Med. **11**(3): 91-6.
- Fabrizio, P., Longo VD. (2003). "The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*." Aging Cell. **2**(2): 73-81.
- Façanha, A. L., Appelgren H, Tabish M, Okorokov L, Ekwall K. (2002). "The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics." J Cell Biol. **157**(6): 1029-39.
- Fahn, S., Sulzer D (2004). "Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease." NeuroRx. **1**(1): 139-54.
- Farrer, M. J. (2006). "Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects." Nat Rev Genet. **7**(4): 308-18.
- Flower, T., Chesnokova LS, Froelich CA, Dixon C, Witt SN. (2005). "Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease." J Mol Biol. **351**(5): 1081-100.
- Forbes, J. R., Cox DW (1998). "Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant?" Am J Hum Genet. **63**(6): 1663-74.
- Froissard, M., Belgareh-Touzé N, Buisson N, Desimone M, Frommer WB, Haguenaer-Tsapis R. (2006). "Heterologous expression of a plant uracil transporter in yeast: improvement of plasma membrane targeting in mutants of the Rsp5p ubiquitin protein ligase." Biotechnol J. **1**(3): 308-20.
- Furune, T., Hashimoto K, Ishiguro J. (2008). "Characterization of a fission yeast P(5)-type ATPase homologue that is essential for Ca(2+)/Mn(2+) homeostasis in the absence of P(2)-type ATPases." Genes Genet Syst. **83**(5): 373-81.
- Geering, K. (2001). "The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases." J Bioenerg Biomembr. **33**(5): 425-38.
- Gietz, R. D., Sugino A (1988). "New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites." Gene **74**: 527-534.
- Gitler, A. D., Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Cooper AA, Rochet JC, Lindquist S. (2009). "Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity." Nat Genet. **41**(3): 308-15.
- Goffeau, A., Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. (1996). "Life with 6000 genes." Science. **274**(5287): 563-7.
- Goldstein, A. L., and McCusker, J.H. (1999). "Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **15**(1541-15.).

- Halachmi, D., Eilam Y. (1989). "Cytosolic and vacuolar Ca²⁺ concentrations in yeast cells measured with the Ca²⁺-sensitive fluorescence dye indo-1." FEBS Lett. **256**(1-2): 55-61.
- Hara, T., Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." Nature. 2006 Jun 15; **441**(7095): 885-9.
- Healy, D., Abou-Sleiman, P. M.; Casas, J. P.; Ahmadi, K. R.; Lynch, T.; Gandhi, S.; Muqit, M. M. K.; Foltynie, T.; Barker, R.; Bhatia, K. P.; Quinn, N. P.; Lees, A. J.; Gibson, J. M.; Holton, J. L.; Revesz, T.; Goldstein, D. B.; Wood, N. W. (2006). "UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene." Ann. Neurol. **59**: 627-633.
- Hu, Z., Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T, Epstein EH Jr. (2000). "Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease." Nat Genet. **24**(1): 61-5.
- Huang, C. (2007). "Parkinsonism induced by chronic manganese intoxication--an experience in Taiwan." Chang Gung Med J. **30**(5): 385-95.
- Hung, I. H., Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD (1997). "Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem. **272**(34): 21461-6.
- Issa, Y., Brunton P, Waters CM, Watts DC. (2008). "Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity." Dent Mater. **24**(2): 281-7.
- Jacinto, E., Hall MN. (2003). "Tor signalling in bugs, brain and brawn." Nat Rev Mol Cell Biol. **4**(2): 117-26.
- Jacobsen, F., Mertens-Rill J, Beller J, Hirsch T, Daigeler A, Langer S, Lehnhardt M, Steinau HU, Steinstraesser L. (2006). "Nucleofection: a new method for cutaneous gene transfer?" J Biomed Biotechnol. **2006**(5): 26060.
- Jakes, R., Spillantini MG, Goedert M. (1994). "Identification of two distinct synucleins from human brain." FEBS Lett. **345**(1): 27-32.
- Jankovic, J. (2005). "Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease." Neurology. **64**(12): 2021-8.
- Jencks, W. P. (1989). "Utilization of binding energy and coupling rules for active transport and other coupled vectorial processes." Methods Enzymol. **171**: 145-64.
- Jensen, L. T., Ajua-Alemanji M, Culotta VC. (2003). "The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis." J Biol Chem. **278**(43): 42036-40.

- Jorgensen, P. L. (1975). "Purification and characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool." Biochim Biophys Acta **401(3)**: 399-415.
- Kabuta, T., Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. (2008). "Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy." J Biol Chem. **283(35)**: 23731-8.
- Kaeberlein, M., Burtner CR, Kennedy BK (2007). "Recent developments in yeast aging." PLoS Genet. **3(5)**: e84.
- Kaeberlein, M., Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK. (2005). "Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background." Mech Ageing Dev. **126(4)**: 491-504.
- Kanki, T., Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ. (2009). "Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy." Dev Cell. 2009 Jul;17(1):98-109 **17(1)**: 98-109.
- Klein, C., Lohmann-Hedrich, K. (2007). "Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease." Curr Opin Neurol. **20(4)**: 453-64.
- Klionsky, D. (2007). "Monitoring autophagy in yeast: the Pho8Delta60 assay." Methods Mol Biol **390**: 363-71.
- Klionsky, D., Cuervo AM, Seglen PO (2007). "Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human." Autophagy **3(3)**: 181-206.
- Klionsky, D., Emr SD (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science. **290(5497)**: 1717-21.
- Klockgether, T. (2004). "Parkinson's disease: clinical aspects." Cell Tissue Res. **318(1)**: 115-20.
- Komatsu, M., Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." Nature. 2006 Jun 15; **441(7095)**: 80-4.
- Kuhlbrandt, W. (2004). "Biology, structure and mechanism of P-type ATPases." Nat Rev Mol Cell Biol. **5(4)**: 282-95.
- Landrigan, P. J., Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. (2005). "Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life." Environ Health Perspect. **113(9)**: 1230-3.
- Lapinskas, P. J., Cunningham KW, Liu XF, Fink GR, Culotta VC (1995). "Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase." Mol Cell Biol. **15(3)**: 1382-8.
- Lapinskas, P. J., Lin SJ, Culotta VC. (1996). "The role of the *Saccharomyces cerevisiae* CCC1 gene in the homeostasis of manganese ions." Mol Microbiol. **3**: 519-28.

- Lee, J. (2009). "Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin." BMB Rep. **42**(6): 324-30.
- Lewinson, O., Lee AT, Rees DC. (2009). "A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals." Proc Natl Acad Sci U S A. **106**(12): 4677-82.
- Li, L., Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J. (2001). "CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast." J Biol Chem. **276**(31): 29515-9.
- Lin, H., Kumánovics A, Nelson JM, Warner DE, Ward DM, Kaplan J. (2008). "A single amino acid change in the yeast vacuolar metal transporters ZRC1 and COT1 alters their substrate specificity." J Biol Chem. **283**(49): 33865-73.
- Lin, H., Burton D, Li L, Warner DE, Phillips J, Ward DM, Kaplan J. (2009). "Gain of function mutations identify amino acids within transmembrane domains of the yeast vacuolar transporter Zrc1 that determine metal specificity." Biochem J.
- Liu, X. F., Culotta VC. (1999). "Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the BSD2 gene." J Biol Chem. 1999 Feb 19;274(8):4863-8 **274**(8): 4863-8.
- Luk, E., Carroll M, Baker M, Culotta VC. (2003). "Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family." Proc Natl Acad Sci U S A. **100**(18): 10353-7.
- Luk, E. E., Culotta VC (2001). "Manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae* acquires its metal co-factor through a pathway involving the Nramp metal transporter, Smf2p." J Biol Chem. **276**(50): 47556-62.
- Lutsenko, S., Kaplan, J.H. (1995). "Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity." Biochemistry **34**(48): 15607-13.
- Mandal, D., Woolf TB, Rao R. (2000). "Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport." J Biol Chem. **275**(31): 23933-8.
- Mandal, D., Woolf TB, Rao R. (2000). "Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport." J Biol Chem. **275**(31): 23933-8.
- Maraganore, D., Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JP, de Andrade M, Rocca WA (2004). "UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene." Ann Neurol. **55**(4): 512-21.
- Massey, A., Zhang C, Cuervo AM. (2006). "Chaperone-mediated autophagy in aging and disease." Curr Top Dev Biol **73**: 205-35.
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Yu Y, Aschner M. (2009). "Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity." Toxicol Appl Pharmacol.

- Møller, A., Asp T, Holm PB, Palmgren MG. (2008). "Phylogenetic analysis of P5 P-type ATPases, a eukaryotic lineage of secretory pathway pumps." Mol Phylogenet Evol. **46**(2): 619-34.
- Murakami-Sekimata, A., Sato K, Sato K, Takashima A, Nakano A. (2009). "O-Mannosylation is required for the solubilization of heterologously expressed human beta-amyloid precursor protein in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Cells. **14**(2): 205-15.
- Muthusamy, B. P., Natarajan P, Zhou X, Graham TR. (2009). "Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport." Biochim Biophys Acta. **1781**(7): 612-9.
- Najim al-Din, A., Wriekat A, Mubaidin A, Dasouki M, Hiari M. (1994). "Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome." Acta Neurol Scand. **89**(5): 347-52.
- Narendra, D., Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." J Cell Biol. **183**(5): 795-803.
- Noda, T., Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y (1995). "Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun. **210**(1): 126-32.
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. (2008). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." Mov Disord. **23**(Suppl 3): S548-59.
- Odermatt, A., Taschner PE, Khanna VK, Busch HF, Karpati G, Jablecki CK, Breuning MH, MacLennan DH. (1996). "Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease." Nat Genet. **14**(2): 191-4.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. (2009). "Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy." Dev Cell. **17**(1): 87-97.
- Outeiro, T., Lindquist S. (2003). "Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology." Science. **302**(5651): 1772-5.
- Padilla-López, S., Pearce DA. (2006). "*Saccharomyces cerevisiae* lacking Btn1p modulate vacuolar ATPase activity to regulate pH imbalance in the vacuole." J Biol Chem. **281**(15): 10273-80.
- Paidhungat, M., Garrett S. (1998). "Cdc1 and the vacuole coordinately regulate Mn²⁺ homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics. **148**(4): 1787-98.
- Petersen, O. H., Michalak M, Verkhratsky A. (2005). "Calcium signalling: past, present and future." Cell Calcium. **38**(3-4): 161-9.
- Polymeropoulos, M., Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI,

- Nussbaum RL. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science. **276**(5321): 2045-7.
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., van Meer, G., Holthuis, J. C. (2003). "Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis." Mol Biol Cell. **14**(3): 1240-54.
- Portnoy, M. E., Jensen LT, Culotta VC. (2002). "The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast." Biochem J. **15**(362): 119-24.
- Portnoy, M. E., Liu XF, Culotta VC. (2000). "Saccharomyces cerevisiae expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters." Mol Cell Biol. **20**(21): 7893-902.
- Powers, R. W. I., Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. (2006). "Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling." Genes Dev. **20**(2): 174-84.
- Radisky, D. C., Kaplan J (1998). "Iron in cytosolic ferritin can be recycled through lysosomal degradation in human fibroblasts." Biochem J. **336**((Pt 1)): 201-5.
- Ramirez, A., Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. (2006). "Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase." Nat Genet. **38**(10): 1184-91.
- Recillas-Targa, F. (2006). "Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals." Mol Biotechnol. **34**(3): 337-54.
- Rees, E. M. R., Stewart GG. (1997). "The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts." Journal of the Institute of Brewing **103**(5): 287-291.
- Ruiz-Perez, V. L., Carter SA, Healy E, Todd C, Rees JL, Steijlen PM, Carmichael AJ, Lewis HM, Hohl D, Itin P, Vahlquist A, Gobello T, Mazzanti C, Reggolini R, Nagy G, Munro CS, Strachan T. (1999). "ATP2A2 mutations in Darier's disease: variant cutaneous phenotypes are associated with missense mutations, but neuropsychiatric features are independent of mutation class." Human Molecular Genetics **8**(9): 1621-1630.
- Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S, Smith M, Munro CS, O'Donovan M, Craddock N, Kucherlapati R, Rees JL, Owen M, Lathrop GM, Monaco AP, Strachan T, Hovnanian A. (1999). "Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease." Nat Genet. **21**(3): 271-7.
- Schaefer, M., Gitlin, J. D. (1999). "Genetic Disorders of Membrane Transport IV. Wilson's disease and Menkes disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **276**: G311-G314.

Schuler, G. D., Altschul SF, Lipman DJ. (1991). "A workbench for multiple alignment construction and analysis." Proteins. **9**(3): 180-90.

Sherman, F. (1991). "Getting started with yeast." Methods Enzymol. **194**(3-21).

Shintani, T., Klionsky DJ (2004). "Cargo Proteins Facilitate the Formation of Transport Vesicles in the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway." J Biol Chem. **279**(29): 29889–29894.

Shojaee, S., Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M, Elahi E. (2008). "Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays." Am J Hum Genet. **82**(6): 1375-84.

Singer, S. J., and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**: 720-731.

Singer, T., Ramsay RR. (1990). "Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update." FEBS Lett. **274**(1-2): 1-8.

Singh Roy, N., Nakano T, Xuing L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. (2005). "Enhancer-specified GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells." Exp Neurol. **196**(2): 224-34.

Smith, E. D., Tsuchiya M, Fox LA, Dang N, Hu D, Kerr EO, Johnston ED, Tchao BN, Pak DN, Welton KL, Promislow DE, Thomas JH, Kaeberlein M, Kennedy BK. (2008). "Quantitative evidence for conserved longevity pathways between divergent eukaryotic species." Genome Res. **18**(4): 564-70.

Steffen, K. K., Kennedy BK, Kaeberlein M. (2009). "Measuring replicative life span in the budding yeast." J Vis Exp. **28**.

Stredrick, D. L., Stokes AH, Worst TJ, Freeman WM, Johnson EA, Lash LH, Aschner M, Vrana KE (2004). "Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells." Neurotoxicology. **25**(4): 543-53.

Sudbrak, R., Joanna Brown, Carol Dobson-Stone, Simon Carter, Juliane Ramser, Jacqueline White, Eugene Healy, Manel Dissanayake, Marc Larrègue, Marc Perrussel, Hans Lehrach, Colin S. Munro, Tom Strachan, Susan Burge, Alain Hovnanian and Anthony P. Monaco (2000). "Hailey–Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca²⁺ pump." Human Molecular Genetics **9**(7): 1131-1140.

Supek, F., Supekova L, Nelson H, Nelson N. (1996). "A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria." Proc Natl Acad Sci U S A. **14**(93): 5105-10.

Suzuki, C. (2001). "Immunochemical and mutational analyses of P-type ATPase Spf1p involved in the yeast secretory pathway." Biosci Biotechnol Biochem **65**(11): 2405-11.

Suzuki, C., Shimma YI. (1999). "P-type ATPase spf1 mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT." Mol Microbiol. **32**(4): 813-23.

- Suzuki, K., Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. (2001). "The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation." EMBO J. **20**(21): 5971-81.
- Tamm, C., Sabri F, Ceccatelli S. (2008). "Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese." Toxicol Sci. **101**(2): 310-20.
- Tan, E., Lu CS, Peng R, Teo YY, Wu-Chou YH, Chen RS, Weng YH, Chen CM, Fung HC, Tan LC, Zhang ZJ, An XK, Lee-Chen GJ, Lee MC, Fook-Chong S, Burgunder JM, Wu RM, Wu YR. (2009). "Analysis of the UCHL1 genetic variant in Parkinson's disease among Chinese." Neurobiol Aging.
- Tang, X., Halleck MS, Schlegel RA, Williamson P (1996). "A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity." Science. **272**(5267): 1495-7.
- Tanzi, R., Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, et al. (1993). "The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene." Nat Genet. **5**(4): 344-50.
- Ton, V. K., Mandal D, Vahadji C, Rao R (2002). "Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca(2+), Mn(2+)-ATPase defective in Hailey-Hailey disease." J Biol Chem. **277**(8): 6422-7.
- Ton, V. K., Rao R. (2004). "Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases." Am J Physiol Cell Physiol. **287**(3): C580-9.
- Torlinska, T., Grochowalska A (2004). "Age-related changes of NA(+), K(+) - ATPase, Ca(+2) - ATPase and Mg(+2) - ATPase activities in rat brain synaptosomes." J Physiol Pharmacol. **55**(2): 457-65.
- Vashist, S., Frank CG, Jakob CA, Ng DT. (2002). "Two distinctly localized p-type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control." Mol Biol Cell. **13**(11): 3955-66.
- Vulpe, C., Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. (1993). "Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase." Nat Genet. **3**(1): 7-13.
- Wach, A., Brachat A, Pöhlmann R, Philippsen P (1994). "New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast. **10**(13): 1793-808.
- Wakabayashi, K., Tanji K, Mori F, Takahashi H. (2007). "The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates." Neuropathology. **27**(5): 494-506.
- Wang, C. Y., Shi JD, Yang P, Kumar PG, Li QZ, Run QG, Su YC, Scott HS, Kao KJ, She JX. (2003). "Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP)." Gene. **306**: 37-44.

- Webb, J., Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. (2003). "Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome." J Biol Chem. **278**(27): 25009-13.
- Weiner, W. J. (2005). "A differential diagnosis of Parkinsonism." Rev Neurol Dis. **2**(3): 124-31.
- Wiederhold, E., Gandhi T, Permentier HP, Breitling R, Poolman B, Slotboom DJ. (2009). "The yeast vacuolar membrane proteome." Mol Cell Proteomics. **8**(2): 380-92.
- Wilkens, S., Vasilyeva E, Forgac M. (1999). "Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy." J Biol Chem. **274**(45): 31804-10.
- Witt, S. N., Flower TR. (2006). "alpha-Synuclein, oxidative stress and apoptosis from the perspective of a yeast model of Parkinson's disease." FEMS **6**(8): 1107-16.
- Wu, C. C., Rice WJ, Stokes DL (2008). "Structure of a Copper Pump suggests a Regulatory Role for its Metal Binding Domain." Structure. **16**(6): 976–985.
- Xilouri, M., Vogiatzi T, Vekrellis K, Stefanis L. (2008). "alpha-synuclein degradation by autophagic pathways: a potential key to Parkinson's disease pathogenesis." Autophagy. **4**(7): 917-9.
- Xu, J., Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA. (2002). "Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease." Nat Med. **8**(6): 600-0.
- Yang, M., Jensen LT, Gardner AJ, Culotta VC. (2005). "Manganese toxicity and *Saccharomyces cerevisiae* Mam3p, a member of the ACDP (ancient conserved domain protein) family." Biochem J. **386**(Pt 3): 479-87.
- Yu, W. H., Dorado B, Figueroa HY, Wang L, Planel E, Cookson MR, Clark LN, Duff KE. (2009). "Metabolic activity determines efficacy of macroautophagic clearance of pathological oligomeric alpha-synuclein." Am J Pathol. **175**(2): 736-47.
- Yuan, D. S., Stearman R, Dancis A, Dunn T, Beeler T, Klausner RD (1995). "The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake." Proc Natl Acad Sci U S A. **92**(7): 2632-6.

8 Anhang

8.1 Liste aller verwendeten Oligonukleotide

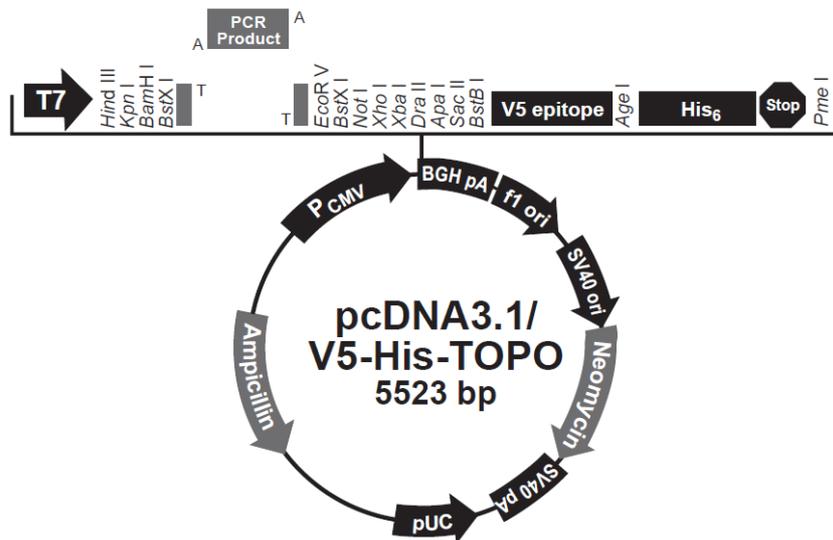
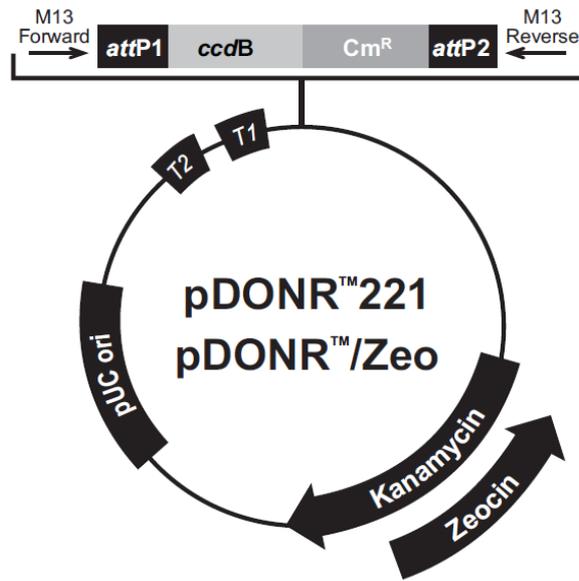
Tabelle 8-1: Aufgeführt sind alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer. Angegeben ist der jeweilige Name, die Sequenz in 5'→3'-Richtung und Funktion des Primers.

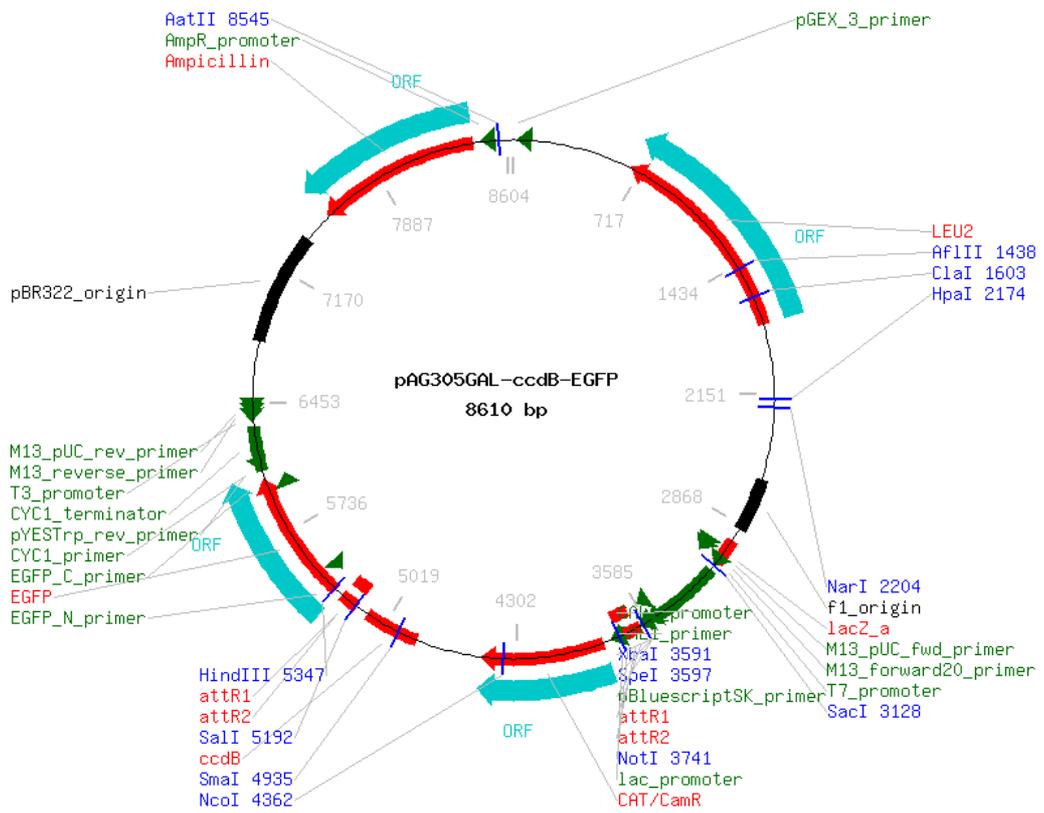
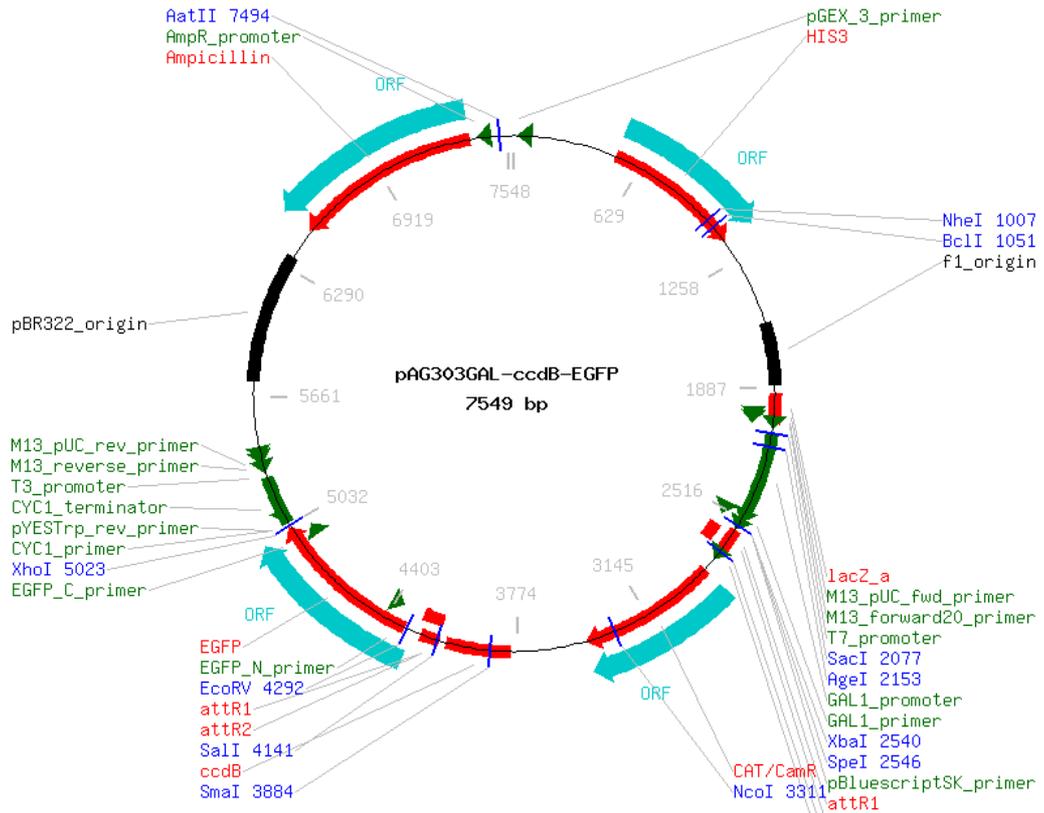
Primer	Sequenz	Funktion
YOR291w_A	acactgtgttctaagaaaggctct	Deletionskontrolle <i>Δypk9</i>
YOR291w_B	agggtgatggaatgatacaatagaa	Deletionskontrolle <i>Δypk9</i>
YOR291w_C	gactgctatagtttctctgtgggt	Deletionskontrolle <i>Δypk9</i>
YOR291w_D	tttattcgccaatctctctattg	Deletionskontrolle <i>Δypk9</i>
GWYOR291w_F	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctctccggaatggatattccc	Gateway-Klonierung <i>YPK9</i>
GWYOR291wRstop	ggggaccactttgtacaagaagctgggttttaactctttaatttc	Gateway-Klonierung <i>YPK9</i>
GWYOR291wRstopless	ggggaccactttgtacaagaagctgggtttgaactctttaatttc	Gateway-Klonierung <i>YPK9</i>
YOR291w-F1	gatcggatccaatagtggcgaatgattgg	Klonierung <i>YPK9</i> <i>BamHI</i>
YOR291w-R1	gtacgtcgacgatggaaggtggagataagg	Klonierung <i>YPK9</i> <i>Sall</i>
291w_F2	ataccatagagttggaggttgg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_R7	tgtggccgccgtagaagtagtggc	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_F3	tccagtttatcgagatatacgacc	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_R6	cgcttcagatcgctactatctg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_F4	atgatatcaattgagccaccacc	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_R5	ggtacttaaatccaccagtcagg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_F5	tttggcagtggtgtaaggacagg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_R4	aattgcgattaatgacatgaatcc	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_F6	actacgttftactactataacgg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_R3	tgactcaacctcttcctagatac	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_F7	ctggtacatcaagccaatcgttgg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_R2	tgacatcggtctctatatgttgg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
291w_F8	gctcaactgtatataccgccatcg	Sequenzierung <i>YPK9</i>
Ccc1-A	cgaatgtctcacaatgaagatgtaa	Deletionskontrolle <i>Δccc1</i>
Ccc1-B	aagatagaccagctgttagagcaaa	Deletionskontrolle <i>Δccc1</i> /Sequenzierung
Ccc1-C	gcttaacagctggtctatcttcac	Deletionskontrolle <i>Δccc1</i> /Sequenzierung
Ccc1-D	atgacgaattagatccaatgaaaaa	Deletionskontrolle <i>Δccc1</i>
Pmr1-A	ccctagataaccacttaacagcaaa	Deletionskontrolle <i>Δpmr1</i>
Pmr1-B	cagtgctccagttttctagagcttc	Deletionskontrolle <i>Δpmr1</i>
Pmr1-C	ggactgtctctgttaggtcaaatgt	Deletionskontrolle <i>Δpmr1</i>

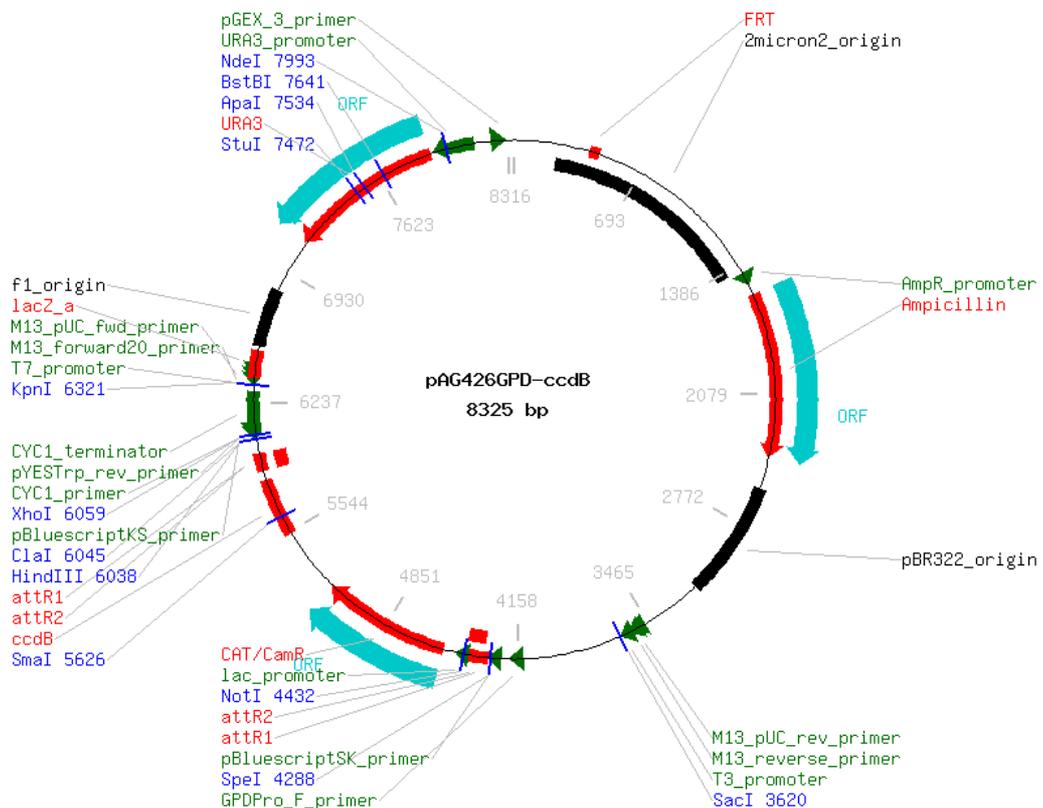
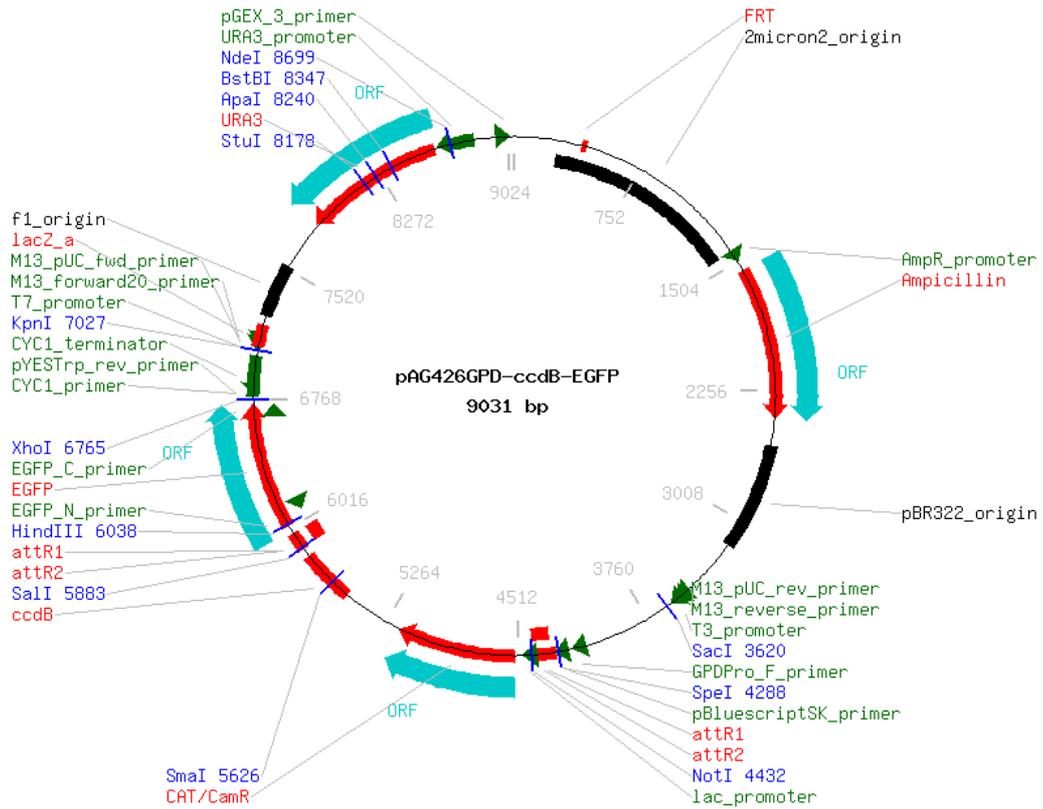
Pmr1-D	ttgtcgaaggtataaatgaggaag	Deletionskontrolle $\Delta pmr1$
GW-Pmr1-F	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttatgagtgacaatccatttaatgc	Gateway-Klonierung <i>PMR1</i>
GW-Pmr1-R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtatcaaacatttgagaatacgttgag	Gateway-Klonierung <i>PMR1</i>
Pmr1-F1	tctgagagatctgtatagc	Sequenzierung <i>PMR1</i>
pmr1_F1.1	ggtgcttgacagtatgtcc	Sequenzierung <i>PMR1</i>
Pmr1-R1	tccattgtaactgcaatgg	Sequenzierung <i>PMR1</i>
Pmr1-F2	gaaggttgcgtgctttgg	Sequenzierung <i>PMR1</i>
Pmr1-R2	gatggcaaattaacgttcg	Sequenzierung <i>PMR1</i>
Pmr1-F3	gccattgaagagggtaaagg	Sequenzierung <i>PMR1</i>
pmr1_R3	aactatgctcagggtagc	Sequenzierung <i>PMR1</i>
Mam3-A	accgttcattaagcagggtattat	Deletionskontrolle $\Delta mam3$
Mam3-B	taacattagaagcagcagtgtagc	Deletionskontrolle $\Delta mam3$
Mam3-C	gttactacctgactaaaccacga	Deletionskontrolle $\Delta mam3$
Mam3-D	ggtgaagcaattagaagaatccata	Deletionskontrolle $\Delta mam3$
GW-MAM3-F	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctatatgtcgttttgcactaagg	Gateway-Klonierung <i>MAM3</i>
GW-MAM3-R	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttcatctttttatggtcgacgagg	Gateway-Klonierung <i>MAM3</i>
MAM3-F1	aaatacgggctgcaagttgg	Sequenzierung <i>MAM3</i>
MAM3-R1	ggtgaccaaaagtcttaagc	Sequenzierung <i>MAM3</i>
MAM3-F2	caaatgatggttacgacagg	Sequenzierung <i>MAM3</i>
MAM3-R2	attttcggaacattggcagg	Sequenzierung <i>MAM3</i>
MAM3-F3	tacgaagaatggtattgtgg	Sequenzierung <i>MAM3</i>
GW_ATP13A2_F	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctccatgagcgcagacagcagccc	Gateway-Klonierung <i>ATP13A2</i>
GW_ATP13A2_Rstop	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtactacctcagggggccggcg	Gateway-Klonierung <i>ATP13A2</i>
GW_ATP13A2_Rstopless	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtacaacctcagggggccggcg	Gateway-Klonierung <i>ATP13A2</i>
Atg1_A1_F	gaattctaagcgtcatttagttgg	Deletionskontrolle $\Delta atg1$
Atg1_A4_R	tagccaaaggcaagtactaaacgc	Deletionskontrolle $\Delta atg1$
Phopro_F1	agattgaagtacaagttagc	Integrationskontrolle Pho8 Δ 60
Pho8_R1	tgctggtgaaatgatcttgc	Integrationskontrolle Pho8 Δ 61
LEU2_F1	atagcttctaacgacaatgg	Integrationskontrolle α -Synuclein

LEU2_F2	caacagtaccaccgaagtgc	Integrationskontrolle α -Synuclein
LEU2-R2	tgaagaggaggtcgactacg	Integrationskontrolle α -Synuclein
His3_F3	ctggaccatagatacatgc	Integrationskontrolle α -Synuclein
HIS3_R4	cttcagtatcatactgttcg	Integrationskontrolle α -Synuclein
ATP13A2_13F	ttgcaactccagaggcacgggtcg	Sequenzierung ATP13A2
ATP13A2_15R	tagacaggacctggcatcctgtgg	Sequenzierung ATP13A2
ATP13A2_26F	gggcctctgctatcagactagg	Sequenzierung ATP13A2
ATP13A2_27R	gtgcacgccagtctccactcg	Sequenzierung ATP13A2
CYC_R	gcgtgaatgtaagcgtgac	Sequenzierung Plasmide
T3	attaacctcactaaag	Sequenzierung Plasmide
T7	taatacactcactataggg	Sequenzierung Plasmide
BGHrev	tagaaggcacagtcgagg	Sequenzierung Plasmide
M13F	gtaaacgacggccagt	Sequenzierung Plasmide
M13R	ggaaacagctatgaccatg	Sequenzierung Plasmide
GDPpro_F	cggtaggtattgattgtaattctg	Sequenzierung Plasmide
GAL1	aatatacctctatactttaacgtc	Sequenzierung Plasmide
EGFP-N	cgtcgccgtccagctcgaccag	Sequenzierung Plasmide
pBluescriptSK	tctagaactagtggatc	Sequenzierung Plasmide
pBluescriptKS	tcgaggctgacgggtatc	Sequenzierung Plasmide
kanB	ctgcagcgaggagccgtaat	Deletionskontrolle
kanC	tgattttgatgacgagcgtaat	Deletionskontrolle

8.2 Vektorkarten







Publikationen

Teilpublikationen dieser Arbeit:

Schmidt K, Wolfe DM, **Stiller B**, Pearce DA. Cd²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Se²⁺ toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 May 29;383(2):198-202. Epub 2009 Apr 5.

Stiller B, Kubisch C. Investigation of the ATP13A2 yeast homolog YPK9. Young Scientists Program of the 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 2009, Shanghai, China

Weitere Publikationen:

Rakovic A*, **Stiller B***, Djarmati A, Flaquer A, Freudenberg J, Toliat MR, Linnebank M, Kostic V, Lohmann K, Paus S, Nürnberg P, Kubisch C, Klein C, Wüllner U, Ramirez A. Genetic association study of the P-type ATPase ATP13A2 in late-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008 Dec 18;24(3):429-433.

*The first two authors contributed equally to this work

Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, **Stiller B**, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet*. 2006 Oct;38(10):1184-91.

Stiller B, Coria C, Cornejo I, Fuentealba A, Heimbach A, Cid LP, Ramirez A. Paramyotonia congenita: Clinical and genetic characterisation of a Chilean family. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik* 2006, Heidelberg

Danksagung

Ich danke...

- Prof. Dr. Christian Kubisch für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung und Unterstützung.
- Prof. Dr. Thomas Langer für die Übernahme des Koreferats.
- Prof. Dr. Günter Schwarz für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.
- allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Kubisch für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung der kleinen und großen Probleme des Laboralltags.
- den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Dr. Christof Osman und Dr. Tanja Engmann aus der AG Langer für die Versorgung mit Hefe-Stämmen, -Plasmiden, -Protokollen und -Erfahrung.
- Dr. Boi-Dinh Chung, Dr. Inga Ebermann und Dr. Gökhan Yigit für die Durchsicht des Manuskripts.
- meiner Familie für die Unterstützung, Geduld und Hilfsbereitschaft.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Christian Kubisch und Prof. Dr. Thomas Langer betreut worden.

Barbara Stiller

Köln, den 25. August 2009