

**TARTU ÜLIKOOL**  
**BIOLOOGIA - GEOGRAAFIATEADUSKOND**  
**ZOOLOOGIA JA HÜDROBIOLOOGIA INSTITUUT**

**Mario Plaas**

**Alfa-SYN Ala30Pro punktmütatsiooniga ja beeta-SYN deletsiooniga  
hiireliinide loomine:  
uued Parkinsoni haiguse mudelid**

Magistritöö arengubioloogias

juhendajad: Sulev Kõks, PhD

Raivo Raid, PhD

Tartu 2005

# SISUKORD

|   |    |
|---|----|
| <b>KASUTATUD LÜHENDID JA MÕISTED</b> .....  | 4  |
| <b>SISSEJUHATUS</b> .....   | 6  |
| <b>KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....  | 7  |
| <b>1. Alfa-sünukleini roll Parkinsoni tõve väljakujunemisel</b> .....                 | 7  |
| 1.1 Alfa-syn valgu struktuur.....   | 8  |
| 1.1.1 Alfa-syn valgu aminotermiinaale domään.....                                     | 9  |
| 1.1.2 Alfa-syn valgu NAC domään.....  | 10 |
| 1.1.3 Alfa-syn valgu karboksütermiinaalne domään.....                                 | 10 |
| 1.2 Alfa-syn'i füsioloogiline funktsioon.....   | 11 |
| 1.2.1 Alfa-syn ja <i>chaperon</i> 14-3-3.....   | 12 |
| <b>2. Alfa-syn'i agregatsioon ja toksilisus koekultuuris</b> .....                    | 13 |
| 2.1 Oksüdatiivse stressi põhjustatud tsütotoksilisus.....                             | 13 |
| 2.2 MPTP indutseeritud tsütotoksilisus.....   | 14 |
| 2.3 Raud indutseerib ja magneesium inhibeerib alfa-syn'i agregatsiooni.....           | 16 |
| <b>3. Alfa-syn'i agregatsioon ja toksilisus <i>in-vivo</i></b> .....                  | 18 |
| 3.1 Oksüdatiivne stress, MPTP ja mitokondri inhibiitorid põhjustavad PD fenotüübi.... | 18 |
| väljakujunemist   |    |
| 3.2 Alfa-syn'i üleekspressiooni <i>in-vivo</i> mudelid.....                           | 19 |
| 3.3 Alfa-syn „ <i>knock-out</i> ” hiir.....   | 20 |
| <b>4. Alfa-sünukleini homologid beeta- ja gamma-sünukleini</b> .....                  | 22 |
| 4.1 Beeta-syn inhibeerib alfa-syn'i fibrillisatsiooni.....                            | 23 |
| 4.2 Metioniini oksüdatsioon inhibeerib alfa-syn'i agregatsiooni.....                  | 24 |
| 4.3 Rifampitsiin inhibeerib alfa-syn'i agregatsiooni.....                             | 26 |
| 4.4 Dopamiin inhibeerib alfa-syn valgu fibrillisatsiooni.....                         | 26 |
| 4.5 Co-chaperon CHIP vahendab alfa-sünukleini degradatsiooni.....                     | 27 |
| <b>5. Geen Parkin</b> .....   | 29 |
| <b>6. PINK-1</b> .....  | 31 |
| <b>7. DJ-1</b> .....  | 32 |
| <b>8. Ubikvitiin karboksütermiinaalne hüdrolaas L1</b> .....                          | 33 |
| <b>EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....   | 34 |
| <b>1. Materjalid ja meetodika</b> .....   | 34 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.1 Lahused ja töövahendid.....  | 34        |
| 1.2 Alfa-sünukleiini „ <i>knock-in</i> ” konstrukti strateegia.....  | 35        |
| 1.3 Beeta-sünukleiini „ <i>knock-out</i> ” konstrukti strateegia.....  | 36        |
| 1.4 <i>Neo</i> -resistentse hiire embrüonaalse feeder rakuliini eraldamine ja mitomütsiin-C<br>töötusega rakkude paljunemise blokeerimine..... | 37        |
| 1.5 Uue tüvirakuliini loomine C57bl/c hiireliinist ja <i>WT germ-line</i> testimine.....   | 38        |
| 1.6 W4, R1 ja 1B10/c ES-rakuliinide viimine koekultuuri.....   | 39        |
| 1.7 W4, R1 ja 1B10/c ES-rakuliinide külmutamine.....   | 39        |
| 1.8 Elektroporatsioonid W4, R1 ja 1B10/c ES-rakuliinidesse.....  | 40        |
| 1.9 Individuaalsed ES-rakukolooniate eraldamine.....   | 40        |
| 1.10 W4, R1 ja 1B10/c ES-rakkude injektsiooniks ettevalmistamine.....  | 41        |
| 1.11 3,5 päeva vanuste blastotsüstide eraldamine.....  | 42        |
| 1.12 Injektsioonikambri ettevalmistamine.....  | 42        |
| 1.13 ES-rakkude injekteerimine blastotsüsti.....   | 42        |
| 1.14 Anesteesia ja analgeesia.....   | 43        |
| 1.15 Blastotsüstide tagasiirdamine emakasarve ja munajuha ampulli.....   | 43        |
| 1.16 Vasektomiseerimine.....   | 44        |
| 1.17 Poomil kõndimise test.....  | 45        |
| <b>2. Tulemused.....</b>   | <b>46</b> |
| 2.1 Alfa-syn „ <i>knock-in</i> ” ES-rakuliini loomine.....   | 46        |
| 2.2 Alfa-syn „ <i>knock-in</i> ” ES-rakkude injektsioonid hiire blastotsüsti.....  | 46        |
| 2.3 Beeta-syn „ <i>knock-out</i> ” ES-rakkude loomine.....   | 46        |
| 2.4 Beeta-syn „ <i>knock-out</i> ” ES-rakkude injektsioonid hiire blastotsüsti.....  | 47        |
| 2.5 C57bl/6 hiireliinist uue ES-rakuliini loomine.....   | 47        |
| 2.6 Alfa-syn „ <i>knock-in</i> ” hiirte poomil kõnni käitumiskatse.....  | 48        |
| <b>3. Arutelu.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>KOKKUVÕTE.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>SUMMARY.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>TÄNUAVALDUSED.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>  | <b>56</b> |

## KASUTATUD LÜHENDID JA MÕISTED

6-OHDA - 6-hüdroksüdopamiin

A (Ala) – alaniin

Akt - proteiinkinaas B

Alfa-syn ( $\alpha$ -syn) – alfa-sünukleiin

A $\beta$  –  $\beta$ -amüloid

BAD - proapotootiline valk Bcl-2 perekonnas

Bcl-2 - proto-onkogeen

Beeta-syn ( $\beta$ -syn) – beeta-sünukleiin

CDCrel-1- sünapsi vesiikulitega seotud valk

CKI ja CKII – seriin/treoniin proteiin kinaasid

COS-7 - ahvi neeru rakuliin

Cre -  $\lambda$ -integraaside superperekonda kuuluv bakteriaalne kohtspetsiifiline rekombinaas, mis katalüüsib DNA rekombinatsiooni

DAT - dopamiini transporter

D - asparagiin hape

dpc- coitus`st möödunud aeg päevades (days post coitum)

E – glutamiin

ERK - ekstratsellulaarselt reguleeritud kinaas

ESM – embrüonaalsete tüvirakkude sööde

ES-rakud – embrüonaalsed tüvirakud

Fyn ja c-Src - Src perekonna proteiin türosiin kinaasid

g- maa raskuskiirendus ( $g = 9,8 \text{ m/s}^2$ )

G – glütsiin

Gamma-syn ( $\gamma$ -syn) – gamma-sünukleiin

*gem-line* - idutee

GRK - G-valguga seotud retseptorkinaas

GT1-7 - hiire hüpotaalamuse neuraalne rakuliin

HEK293 - inimese embrüonaalsest neerust pärit rakuliin

Hsp70 – *heat shock* proteiin

I - isoleutsiin

*in-vitro* – katseklaasis

*in-vivo* – elusas organismis  
 JNK - c-jun N-terminaalne kinaas  
 K – lüsiin  
*kimäär* – erinevat geneetilist päritolu rakkudest koosnev organism  
*knock-in* – uue funktsioneeriva geeni sisseviimine *WT* lookusesse  
*knock-out* – geeni inaktivatsioon  
 L – leutsiin  
 Lif – leukeemia inhibiitorfaktor  
 Mdm2 - onkoproteiin, mis paikneb tsütoplasmas  
 MPP+ - Metüül-4-fenüülpiridiin  
 MPTP - metüül-4-fenüül-1,2,3,6-tetrahüdropüridiin  
 NAC – Alzheimeri haigete amüloidinaastu mitte-alfa-beeta komponent  
 P (pro) – proliin  
 P53 – raku apoptoosi geen  
 Pael-R - G-valguga seotud transmembraane valk  
 PC 12 – roti neerupealse rakuliin (transplantable rat adrenal pheochromocytoma line)  
 PD – Parkinsoni haigus (Parkinson`s disease)  
 PKC – proteiinkinaas C  
 PLD<sub>2</sub> - fosfolipaas D2  
 Rab5A - RAS onkogeeni perekonna valk  
 ROS - reaktiivsed hapniku osakesed  
 Ser – seriin  
 SNpc - *substantia nigra pars compacta* (musttuum)  
 Sünphiliin-1 - alfa-syn`ga interakteeruv valk, mis lokaliseerub sünapsis  
 SY5Y rakud - inimese dopamiinergilised neuroblastooma rakud  
 syn-1 – sünnukleiin-1, mis on rotis hiire alfa-sünnukleini analoog  
 T (Thr) – treoniin  
 TH – türosiinhüdrosülaas  
 tsükliin E - valk mis reguleerib neuraalset apoptoosi  
 Tyr – türosiin  
 U373 - astroglia rakuliin  
 V – valiin  
*WT*- metsik tüüp (*wild type*)

## SISSEJUHATUS

Parkinsonism (PD) on teine enam levinud neurodegeneratiivne haigus maailmas Alzheimeri tõve järel. Seda haigust põeb üks protsent 65 aastaste inimeste populatsioonist. Tõve sümptomiteks on kontrollimatu võbelemine, lihaste jäikus, kehareflekside kontrollimatus ja liigutuste aeglus. Patoloogiliselt hävinevad parkinsonismi puhul musttuuma dopamiinergilised neuronid, mille tagajärjel langeb ajus dopamiini tase, ning häirub juttkeha korrektne funktsioon. Neurodegeneratsiooniga kaasnevad Lewy kehade ja põletikuliste võõrkehade teke elavates dopamiinergilistes rakkudes ning teistes mõjutatud kesknärvisüsteemi osades. Lewy kehad sisaldavad palju erinevaid valke ja proteosoomi subühikuid, kuid peamiselt leidub seal agregeerunud alfa-sünukleini. Kuidas Lewy kehad tekivad, pole veel päris selge.

Uurides Parkinsoni haiguse patoloogiat on loodud palju erinevaid hiiremudeleid. Enim on valmistatud inimese mutantseid Ala53Thr, Ala30Pro ja *WT* alfa-syn'i üleekspresserivaid transgeene. Kahjuks ei ole aga need hiiremudelid piisavalt head uurimaks PD haigust, kuna erinevate töögruppide poolt valmistatud transgeenid omavad mittekattuvaid fenotüüpe ning ei sarnane eriti PD-ga.

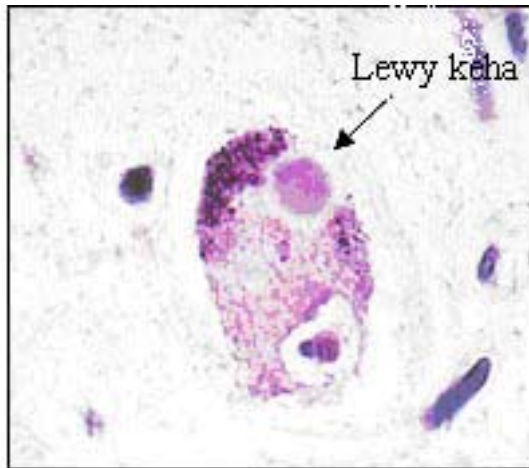
Käesoleva töö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse põhjalikult alfa- ja beeta-sünukleini rolli parkinsonismi väljakujunemises ning antakse kokkuvõtlik ülevaade Parkin, Pink-1, DJ-1 ja UCHL1 geenidest, milledes olevad mutatsioonid põhjustavad samuti PD haiguse väljakujunemise.

Praktilise töö eesmärkideks oli luua uusi PD hiiremudeleid, kes imiteeriksid võimalikult täpselt alfa-syn'i agregatsioonist põhjustatud PD patogeneesi. Sellepärast valmistasimegi kaks uut ja ainulaadset, alfa-sünukleini Ala30Pro punktmutatsiooniga „*knock-in*” ja beeta-sünukleini deletsiooniga „*knock-out*”, transgeenset hiireliini.

## Kirjanduse ülevaade

### 1. Alfa-sünukleiini roll Parkinsoni tõve väljakujunemises

Parkinsoni tõbi on teine enamlevinud nerogeneratiivne haigus Alzheimeri tõve järel. Seda esineb ühel protsendil 65 aastaste inimeste populatsioonis, eelistatult meesterahvastel. Tavaliselt ilmnevad esimesed haiguse tunnused 50-60 aastasel. Selle tõve sümptomiteks on kontrollimatu võbelemine, lihaste jäikus, keha reflekside kontrollimatus ja liigutuste aeglus. Patoloogiliselt hävinevad Parkinsoni tõve puhul dopamiinergilised neuronid *substantia nigra pars compacta*'s (musttuum), mida kajastab dopamiini vähenemine striatumis ja teistes ajutüve rakkudes, rikkudes ära juttkeha funktsiooni, mis vastutab motoorika koordineerimise eest. Neurodegeneratsiooniga kaasnevad Lewy kehade (joonis 1) ja põletikuliste võõrkehade teke elavates dopamiinergilistes rakkudes ning teistes mõjutatud kesknärvisüsteemi osades. Mehhanism, kuidas patoloogilised muutused tekivad, pole veel selge. Parkinsoni haigusega selgelt seotavaid genee on tänaseks näidatud 5: alfa-sünukleiin ( $\alpha$ -syn), parkin, DJ1, PINK ning ubikvitiin karboksüterminaalne hüdrolaas L1. Kaudselt mõjutavad selle haiguse kulgu aga veel mitmed geenid. Perekondlikest Parkinsoni juhtudest vastavad mingitele spetsiifilistele defektidele ainult 10% haigusjuhtudest. Alfa-syn's olevaid mutatsioone on hakatud uurima, kuna avastati, et Lewy kehad ja põletikulised võõrkehad koosnevad peamiselt fibrillaarsest  $\alpha$ -syn'i agregaatidest, nii perekondlikes kui ka harva esinevates Parkinsoni haigustes. Kuna alfa-syn on erinevates Parkinsoni haigusjuhtudes harva muteerunud, siis peavad olema veel mingid olulised rakulised protsessid, mis viivad läbi selle valgu ebanormaalsel metabolismi ja akumulierumist, mängides tähtsat rolli nii sporaadiliste kui perekondlike haigusjuhtude väljakujunemises (Recchia *et al.*, 2004).



**Joonis 1.** Lewy kehad lokaliseeruvad raku tsütöplasmas ja on 5–25 µm diameetriga. Peale alfa-syn`i sisaldavad Lewy kehad suuremas osas ubikvitiini, 26S proteosoomi subühikuid, Parkin valku, 14-3-3, sümfilliin-1 ning palju teisi komponente ([http://www.cumc.columbia.edu/news/in-vivo/Vol1\\_Iss19\\_nov20\\_02/img/LewyBody.jpg](http://www.cumc.columbia.edu/news/in-vivo/Vol1_Iss19_nov20_02/img/LewyBody.jpg); Recchia *et al.*, 2004).

## 1.1 Alfa-syn valgu struktuur

Alfa-syn geen paikneb inimese 4 kromosoomis (4q21). Sünukeiini perekonna valgud leiti algselt 1988 a. Maroteaux töögrupi poolt, kui uuriti cDNA kloone, mis olid tehtud Vaikse Ookeani angerja *Torpedo californica* elektrilise organi kolinergilisest terminaalist. (Maroteaux *et al.* 1988). Kõrgemates organismides nagu inimene, lind, hiir, rott ja veis on alfa-syn väga konserveerunud, kuid suurt homoloogust ei ole leitud madalamate organismidega nagu; *E. coli*, *C. elegans*, *D. melanogaster* (Recchia *et al.*, 2004). Inimese alfa-syn on presünaptiline valk, mis lokaliseerub tsütöplasmas ja rakumembraanidel. Esmalt leiti alfa-syn kui prekursor-peptiid mõnede Alzheimeri haigete amüloidnaastust, millele avastajad panid nimeks amüloidi mitte-alfa-beeta komponent ehk NAC. Alfa-syn on äärmiselt termostabiilne ning koosneb 140`st aminohappe jäägist (Ueada *et al.*, 1993). Alfa-syn on lahustuv, tavaliselt mitte-kokku pakitud, väljasirutatud struktuuriga koosnedes eelkõige juhuslikest keerdudest, kuid ta võib ka moodustada sekundaarstruktuure, peale interakteerumist mõnede valkude või ligandidega, mis muudavad tema tavalist konformatsiooni ja võivad selle valgu kokku voltida (Recchia *et al.*, 2004).



### 1.1.1 Alfa-syn valgu aminoterminaalne domään

Alfa-syn`i valk on molekulmassiga 14,463 kDa ja tema sekvensi võib jaotada 3 ossa (joonis 2). Kõrgelt konserveerunud aminoterminaalne domään (aminohappe jäägid 1-65), sisaldab 6-te koopiat ebatavalist 11 aminohappe pikkust kordust, mis erinevad pisut üksteisest järjestuses KTKEGV. See domään on lahuses ebakorrapärane, kuid võib moodustada alfa-heeliksi struktuure (Recchia *et al.*, 2004). Rekombinantne  $\alpha$ -syn seob negatiivselt laetud fosfolipiide alfa-heeliksi struktuuridele, mis viitab, et alfa-syn võib normaalses olekus paikneda membraanidel (Perrin *et al.*, 2000).

Kasutades tuuma magnetresonantsi, näidati, et mittestruktuurses lahustuvas alfa-syn valgus on päripäeva  $\alpha$ -heeliksi struktuurid, millest iga 11 aminohappest koosnev kordus sisaldab täpselt 3 täieliku heeliksi pööret (Jao *et al.*, 2004). Eksperimendid näitasid, et alfa-syn`i sekundaarstruktuurid on determineeritud inkubatsiooni keskkonna koostise poolt, eeldades, et endogeense alfa-syn`i konformatsioon sõltub sellest, kas ta paikneb tsütoplasmas või on membraanidega seotud (Jao *et al.*, 2004). Paljud uurimused on näidanud, et need lipiidid, mis põhjustavad alfa-syn`i kokkuvoltimist, võivad põhjustada ka selle valgu agregeerumist, mis viitab, et lipiidseotud alfa-syn`i vale konformatsioon võib olla oluline neurodegeneratiivsete haiguste väljakujunemises. Alfa-heelikseid moodustavas domäänis on ka kaks üldtuntud mutatsiooni, mis põhjustavad PD väljakujunemist (joonis 2). Ala53Thr, kus on vahetunudalaniin positsioonis 53 treoniiniks ja Ala30Pro, kus on omavahel vahetunudalaniin proliiniks positsioonis 30. Ala53Thr mutatsioon leiti Itaalia-Kreeka ja Ala30Pro ühest Saksamaa PD haigete perekonnast. Need mutatsioonid põhjustavad valgus ebakorrapärase keerdustruktuuri, mis võimaldab tal paremini agregeeruda ning filamente moodustada (Recchia *et al.*, 2004). Hiljuti on leitud kolmest Hispaania PD haigete perekonnast uus alfa-syn`i mutatsioon, mis põhjustas positsioonis 46 glutamaadi vahetuse lüsiiniks (Glu46Lys). Lisaks on hiljuti veel näidatud, et väga varajased Parkinsoni tõve ilmingud tekivad nendel patsientidel, kellel on tekkinud alfa-syn geeni triplikatsioonid (Zarranz *et al.*, 2004; Glaser *et al.*, 2005).

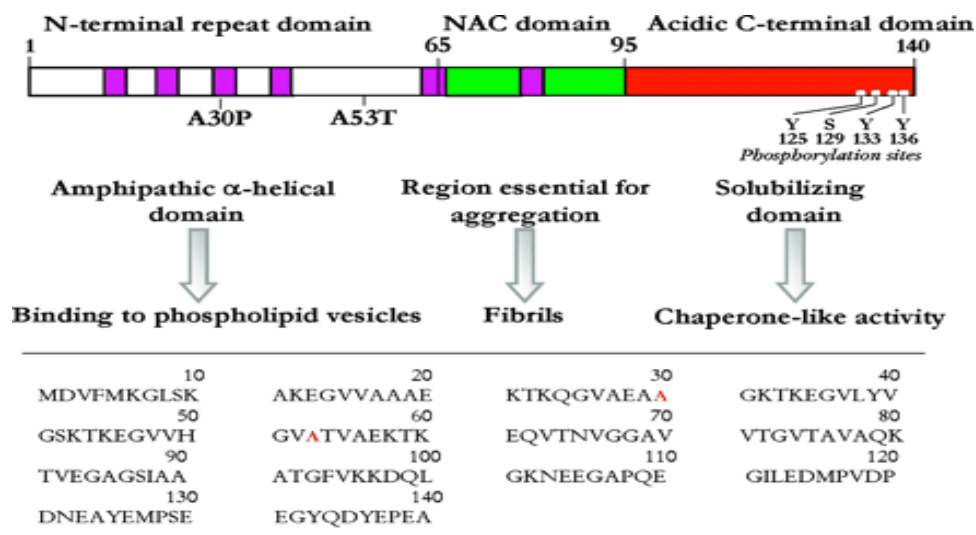
### 1.1.2 Alfa-syn valgu NAC domään

Keskne hüdrofoobne domään on tuntud nimega amüloidnaastu mitte A $\beta$ -komponent (NAC), mis on Alzheimeri haigete naastu teine kõige tähtsam komponent (joonis 2). See

piirkond vastutab valgu konformatsiooni ülemineku eest kerajalt struktuurilt  $\beta$ -leht struktuurile, et formuleeruda A $\beta$ -sarnaseid protofibrille ja fibrille. NAC regioonis on ka fosforüleerimis-*sait* seriin 87 (Recchia *et al.*, 2004).

### 1.1.3 Alfa-syn valgu karboksüterminaalne domään

Happeline karboksüterminaalne domään (joonis 2) alfa-syn`'s (jäägid 96-140) ei oma mingeid äratuntavaid struktuurseid elemente, kuid on väga tugevalt negatiivselt laetud, kuna ta koosneb peamiselt happelistest aminohapetest. Erinevalt kahest esimesest domäänist ei ole viimane looduses kõrgelt konserveerunud, vaid varieerub nii pikkuse kui ka järjestuse poolest. Sellel domäänil on *chaperon`'i* sarnane aktiivsus, ning seal on ka mitu fosforüleerimis-*sait`'i* (Tyr-125, -133, ja-136 ning Ser-129). Tyr-125 aminohappe jääki fosforüleerivad Src perekonna türosiinkinaasid c-Src ja Fyn. Selle perekonna kinaasid mõjutavad läbi fosforüleerimise alfa-syn`'i tendentsi polümeriseeruda. Kui Thr fosforüleeritakse türosiinkinaaside poolt, siis alfa-syn kaotab võime moodustada oligomeere, mis tähendab, et selle perekonna kinaasidel võib olla anti-neurodegeneratiivne toime. Alfa-syn Ser jääke fosforüleerivad proteiinkinaas CKI ja CKII. Aminohappejääk Ser129 on fosforüleeritud G-valk-seotud retseptor proteiinkinaasi poolt. *In-vitro* katsed näitavad, et kui alfa-syn on fosforüleeritud positsioonis Ser129, siis ta moodustab alfa-syn`'i filamente ja oligomeere, kuna muutub laengu jaotus valgu karboksü-terminaalses domäänis. 90 protsenti Lewy kehaes olevast alfa-syn`'st on fosforüleeritud aminohappejäägist Ser129. Samas võivad alfa-syn`'i agregatsiooni mõjutada ka teised post-translatsioonilised modifikatsioonid karboksüterminaalses domäänis, nagu Ser-129 glükolüseerimine ning Tyr-125, -133, ja-136 nitrifitseerimine (Recchia *et al.*, 2004).



**Joonis 2.** Inimese alfa-syn`i järjestus ja domäänid. Mittetäielikud KTKEGV järjestused on värvitud lillaks (Recchia *et al.*, 2004).

## 1.2 Alfa-syn`i füsioloogiline funktsioon

Vaatamata esialgsele arvamusele, et alfa-syn valk paikneb nii raku tuumas kui ka tsütoplasmas, tõestati elektronmikroskoopiliselt, uurides roti aju hippokampust, et tuumas see valk siiski ei paikne. Näidati, et alfa-syn on presünaptiline valk, mis võtab osa membraan-seotud protsessidest presünaptlisel tasemel, ning ta paikneb närvirakkude tsütoplasmas, dentriitides ja aksonites (Hurtig *et al.*, 2000). Arvatakse, et alfa-syn võib reguleerida vesiikulite transporti membraanidel. Alfa-syn „*knock-out*” hiire ajus detekteeriti võimendatud dopamiini vabanemine musttuumast ainult vastuseks järjestikulistele elektriimpulsidele, mis näitab, et alfa-syn on aktiivsusest sõltuv dopamiini neurotransmissiooni negatiivne regulaator (Recchia *et al.*, 2004).

Suur osa alfa-syn`st on membraan-seotud ning inhibeerib seal selektiivselt PLD<sub>2</sub>-te. Muskariini retseptori stimulatsioon karbakooliga aktiveerib GRK (G-valk seotud retseptorkinaas), mis fosforüleerib alfa-syn`i seriin 129 aminohappe jäägi. Lühiajaline seriin 129 jäägi fosforüleerimine vabastab monomeerse alfa-syn`i tsütoplasmasse, põhjustades sellega ka PLD<sub>2</sub>-e aktiveerumise. PLD<sub>2</sub> hüdrolüüsib seejärel fosfatidüülkoliini, mis on rakumembraani peamine lipiidne komponent, fosfaathappeks. Fosfaathape vabastab sekretoorsete vesiikulite produktsiooni. Kiire alfa-syn`i defosforüratsioon lubab tal seonduda varajase endosoomi membraanile. Huvitav on märkida asjaolu, et normaalsetes füsioloogilistes tingimustes on 4% rakusisesest  $\alpha$ -syn`st fosforüleeritud positsioonist ser 129.

Lewy kehaades on see number 90%. Seega on PD haiguse patoloogias väga olulised alfa-syn'i postranslatsioonilised modifikatsioonid (Fujiwara *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Alfa-syn ja *chaperon* 14-3-3

Alfa-syn seondub tsütoplasmaatilise *chaperon*'i 14-3-3, ning on temaga ka 40% ulatuses homoloogne. On vihjatud, et alfa-syn funktsioneeribki kui *chaperon* valk, kuna ta seob endaga lisaks lipiididele veel palju rakulisi molekule ja valke, mis mõjutavad tema aktiivsust. 14-3-3 osaleb neuraalses arengus ja raku kasvu kontrollis ning akumulereub ka Lewy kehaadesse. 14-3-3 kaitseb rakke BAD (proapoptootiline valk Bcl-2 perekonnas) antagonisti indutseeritud apoptoosi eest (joonis 3). Alfa-syn seondub paljude samade valkudega, millega ka 14-3-3, kaasa arvatud 3 valku, mis mõjutavad otseselt raku elujõulisust; proteiinkinaas C (PKC), BAD ja ekstratsellulaarselt reguleeritud kinaasiga (ERK). Sama seondub alfa-syn ka 14-3-3-ga. Seondudes 14-3-3-ga produtseeritakse 54-83kDa suurune valgukompleks, mida on leitud PD haigete ajudest, selektiivselt just musttuumast. PD haigete neuronites seobki alfa-syn 14-3-3, vähendades muudkui tema rakusisest koguhulka. 14-3-3 ei saa siis enam apoptoosi inhibeerida ning rakud muutuvad rohkem vastuvõtlikuks erinevate stressorite suhtes. Nii 14-3-3 kui ka alfa-syn seovad türosiinhüdrosülaasi (TH), mis on oluline ensüüm dopamiini sünteesiks. Alfa-syn inhibeerib ja 14-3-3 initseerib selle ensüümi aktiivsust. On oletatud, et kui  $\alpha$ -syn on kogunenud Lewy kehaadesse, siis selle valgu normaalset funktsionaalset vormi on rakus väga vähe ning tõuseb türosiinhüdrosülaasi aktiivsus ja suureneb dopamiini tase, mis omakorda põhjustab neurotoksilisust (Zigmond *et al.*, 2002; Recchia *et al.*, 2004).

## 2. Alfa-syn`i agregatsioon ja toksilisus koekultuuris

Paljudes töödes on näidatud alfa-syn`i ja tema mutantsete isovormide erinevaid efekte rakkude elujõulisusele. On tõestatud, et alfa-syn või tema NAC fragment, võivad olla tsütotoksilised. Toksilisuse mehhanism mõnedel juhtudel sõltub eksogeense alfa-syn`i Rab5A (RAS onkogeeni perekonna valk) vahendatud endotsütoosist (Sung *et al.*, 2001). Alfa-syn`i üleekspressioon hiire hüpotaalamuse neuraalses rakuliinis GT1-7 põhjustab alfa-syn`i agregatsiooni tsütoplasmas, mitokondrite kahjustusi ja suure hulga vabu radikaale, samas ei suudetud näidata rakkude elujõu vähenemist (Hsu *et al.*, 2000). Kui transfekteeriti mõlemaid, nii inimese *WT* kui ka C-terminaalselt lühendatud alfa-syn U373 astroglia rakkudesse, põhjustas see tsütoplasmaatilisi valgukogumeid ja rakkude apoptoosi (Stefanova *et al.*, 2001). Kui üleekspresseeriti PC 12 rakuliinis Ala53Thr mutatsiooniga alfa-syn`i, siis see rikkus nii lüsoosomide kui ka proteosoomide funktsiooni, põhjustas tsütoplasmaatilisi alfa-syn`i agregate, ning võimendas basaalselt mitteapoptootilist rakkude surma (Stefanis *et al.*, 2001). Kui üleekspresseeriti nii *WT* kui ka Ala53Thr alfa-syn`i primaarsetes rakuliinides, mis olid saadud inimese embrüonaalsest keskajast, põhjustas see spetsiifiliselt just dopamiinergiliste rakkude märkimisväärse kao. Sealjuures mutantne põhjustas 2 korda rohkem rakkude elujõu vähenemist kui *WT* (Zhou *et al.*, 2002).

### 2.1 Oksüdatiivse stressi põhjustatud tsütotoksilisus

Alfa-syn ja tema erinevad variatsioonid võimendavad erinevate tsütotoksiinide efekti. Dopamiini metabolismil musttuuma rakkudes produtseeritakse kõrgelt reaktiivseid hapniku osakesi (ROS), nagu dopamiini kinoonid või peroksüniitriidid, mis võivad põhjustada oksüdatiivset stressi, mitokondrite väärtalitlust, DNA kahjustusi ja rakusurma (joonis 3; Recchia *et al.*, 2004).

Zhou ja tema töögrupp näitasid 2000 aastal, et adenoviiruse transfektsioon primaarsetesse ja immortaliseeritud roti keskaju rakkudesse põhjustas alfa-syn`i üleekspressiooni. Ala53Thr mutatsiooniga alfa-syn`i üleekspressioon põhjustab rakkudes apoptoosi ning võimendab dopamiini sõltuva 6-OHDA toksilisust, kusjuures *WT* alfa-syn üleekspressioon ei ole nii võimsalt neurotoksiin, kuid põhjustab siiski 6-OHDA tundlikuse suurenemist (Zhou *et al.*, 2000). Kui üleekspresserida alfa-syn`i *WT* ja mutantseid vorme inimese dopamiinergilistes neuroblastooma rakkudes SY5Y, siis suureneb intratsellulaarsetes

tasemetes reaktiivse hapniku osakeste arv, mis põhjustab toksilisust. Mutantset alfa-syn`i üleekspresseerivates rakkudes on sel juhul toksilisus suurem kui *WT* valku ületootvates (Junn & Mouradian, 2002). Sarnane on toksilisuse tundlikus inimese embrüonaalsest neerust pärit rakuliinis HEK293, kus Ala53Thr mutantset alfa-syn`i üleekspresseerivad rakud olid rohkem vastuvõtlikud dopamiini toksilisusele kui *WT* alfa-syn`i üleekspresseerivad rakud (Tabrizi *et al.*, 2000).

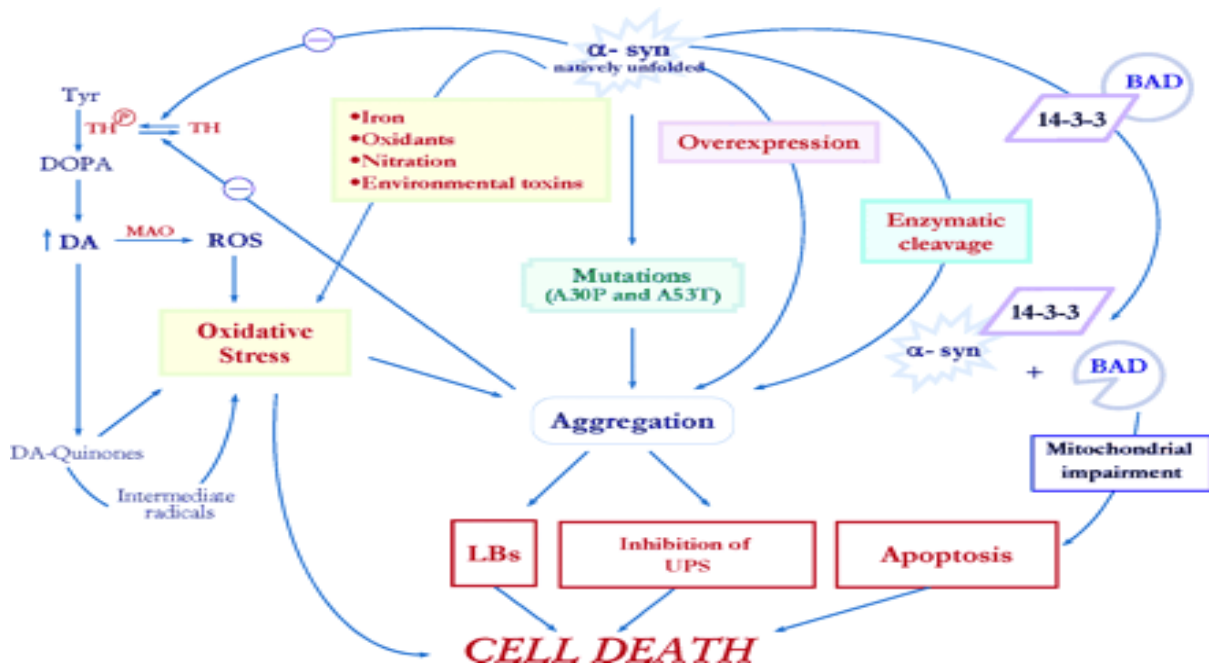
Lee ja teised avastasid suurenenud dopamiini tundlikuse mehhanismi alfa-syn`i toksilisusele, kotransfekteerides mõlemaid nii alfa-syn`i kui ka inimese dopamiini transporterit (DAT). Nad märkisid, et DAT seondub otseselt alfa-syn`ga NAC-regioonist, mis põhjustab DAT`i kobardumise, kiirendades dopamiini sissevõttu ja põhjustades sellega rakulist apoptoosi (Lee *et al.*, 2001).

PD haiguse üks patogeneesi mehhanisme on ka mitokondrite väärtalitus, eriti just elektroni transpordi kompleksi 1 väärtalitus. Lee koos kaastöötajatega näitas mitokondrite ensüümide inhibitsiooni toimet neeru rakuliinis COS-7, mis ekspresseeris inimese *WT* alfa-syn`i. Mõlema, nii rotenooni (kompleks 1 inhibiitor) kui ka oligomütsiini (kompleks 5 inhibiitor) eksponeerimine 72 tunni jooksul, põhjustas alfa-syn`i agregatsiooni mittelahustuvateks kõrge molekulmassiga kompleksideks. Need inhibiitorid ei põhjustanud alfa-syn`i agregatsiooni, kui neid eksponeeriti mitterakulises lahuses, mis näitab, et mitokondrite inhibiitorid põhjustavad alfa-syn`i agregatsiooni ainult funktsioneerivates rakkudes (Lee *et al.*, 2002). Krooniline pikaajaline väga madala kontsentratsiooniga rotenooni (5nM) eksponeerimine põhjustas rakulisi muutusi pikaks ajaks. Selle tulemusena formeerusid SDS-lahustumatud ubikvitinüleeritud alfa-syn`i agregaadid, oksüdatiivne stress põhjustas DNA ja valkude kahjustusi, suurenes tsütokroom c/kaspaas-3 vahendatud apoptoos vastuseks H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-le ning pisut kõrgenes ka basaalne apoptoos (joonis 3; Sherer *et al.*, 2002).

## 2.2 MPTP indutseeritud tsütotoksilisus

Metüül-4-fenüülpiridiin (MPP+) on metüül-4-fenüül-1,2,3,6-tetrahüdropiridiini (MPTP) toksiline metaboliit. See neurotoksiin avastati juhuslikult illegaalselt toodetud narkootikumide kontaminandina. MPTP kutsub esile PD sümptomite välja kujunemist, mida märgati esmakordselt narkomaanide peal. MPP+ põhjustab dopamiini neuronite apotootilist surma läbi DAT-sõltuva mitokondri kompleksi 1-e inhibitsiooni. (joonis 3; Lehmensiek *et al.*, 2002).

Tekitati SY5Y rakuliinid, mis üleekspresseerisid stabiilselt nii *WT*, Ala30Pro, Ala53Thr ja C-terminaalselt lühendatud alfa-syn valku. Neid rakuliine testiti oksüdatiivsete stressoritega H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja MPP<sup>+</sup>. Leiti, et tsütotoksilisus oli kõrgenenud nii Ala53Thr kui ka C-terminaalselt lühendatud alfa-syn`i üleekspresseerivates rakuliinides, aga mitte *WT* rakuliinis (Kanda *et al.*, 2000). Lehmsiek kaastöötajatega lõi aga HEK293 rakuliini, mis stabiilselt koekspreseeris inimese DAT-i ja *WT*, Ala53Thr või Ala30Pro alfa-syn`i. Nad märkisid, et väga madala MPP<sup>+</sup> kontsentratsiooni puhul tõuseb DAT-sõltuv toksilisus mutantseid alfa-syn`i ekspresseerivates rakuliinides, mitte aga *WT*-s. Samas näidati, et kõik rakuliini variandid, kaasa arvatud *WT*, olid tundlikud DAT-sõltumatu toksiinile rotenoonile. Nad järeldasid, et mutantne alfa-syn seondub ebanormaalselt DAT`le ja potenseerib tsütotoksilisust tänu mitokondrite väärtalilusele (joonis 3; Lehmsiek *et al.*, 2002).



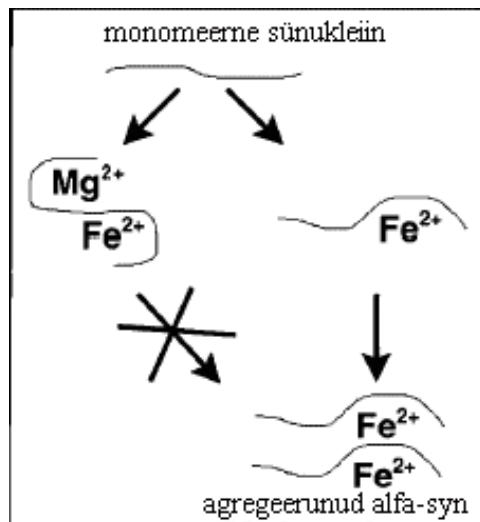
**Joonis 3.** Alfa-syn`i agregatsioon ja toksilisus dopamiinergilistes neuronites. Skeem seletab erinevaid radu kuidas tekivad alfa-syn`i agregaadid dopamiinergilistes neuronites. Oksüdatiivne stress ja mitokondrite rikkumine viivad rakud surmale. DA-dopamiin, DOPA - dihüdroksüfenüülalaniin, LBs - Lewy kehad, MAO - monoamiid oksüdaas, ROS - reaktiivne hapniku osake, TH- türosiin hüdroksülaas, THp - fosfolüeeritud türosiin hüdroksülaas, Tyr - türosiin, UPS - ubikvitiin proteosoom süsteem (Recchia *et al.*, 2004).

## 2.3 Raud indutseerib ja magneesium inhibeerib alfa-syn`i agregatsiooni

Sünukleopaatiate põhjustajad võivad olla ka metallid, näiteks raud, mis tekitab alfa-syn`i agregatsiooni mitterakulistes tingimustes (joonis 4). Raud esinemine raku sees võib stimuleerida alfa-syn`i agregatsiooni ning põhjustada tsütotoksilisust. On näidatud, et raud seondub otseselt alfa-syn`ga ning kolokaliseerub ka Lewy kehasse. See, kuidas seandumine täpselt toimub, pole teada. Samas võib magneesiumi seandumine alfa-syn`ga põhjustada sellise konformatsiooni muutuse, et raud temaga enam ei interakteeru, inhibeerides nii agregaatide teket ja tsütotoksilisust (Golts *et al.*, 2002).

Inimese närvirakuliini BE-M17, mis üleekspresseerib *WT*, Ala53Thr või Ala30Pro alfa-syn`i, kasvatati raua ja vabade radikaalide generaatorite dopamiini ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juuresolul. Nendes tingimustes indutseeris raud intratsellulaarsete agregaatide massi, mis sisaldasid alfa-syn`i ja ubikvitiini. Märgati, et tsütotoksilisus tõusis kuni 4 korda Ala53Thr üleekspresseerivas rakuliinis. Ala30Pro ja *WT* üleekspresseerivas rakuliinis suurenes toksilisus ning agregaatide mass vastavalt 3 ja 2 korda. Samas töös näidati ka, et suured raua kontsentratsioonid (0,1-0,25 mM) indutseerivad rakkudes lipiidide peroksüdatsiooni, ebanormaalsel mitokondrite morfoloogiat ja alfa-syn`i agregate, põhjustades sellega rakkude surma (Ostrerova-Golts *et al.*, 2000). Kuna musttuumas eksisteerib füsioloogiliselt väga suur raua kontsentratsioon, siis on ka selge, miks just selles piirkonnas on tähendatud alfa-syn valgu ebanormaalsel kõrget agregatsiooni taset (Golts *et al.*, 2002). On näidatud, et intratsellulaarne raud on kriitiline MPP+ indutseeritud apoptoosilises rakusurmas. Alfa-syn`i üleekspressioon võimendab MPP+ toksilisust, seda on võimalik aga blokeerida transferrini retseptori (TfR) antikehaga, mis inhibeerib TfR-vahendatud raua ülevõttu (Kalivendi *et al.*, 2004).





**Joonis 4.** Rauda seondumine alfa-syn valguga põhjustab agregatsiooni. Magneesium seondub alfa-syn`le teise kohta kui Fe, kuid ei takista Fe seondumist, vaid muudab alfa-syn`i struktuuri nii, et ta ei saa enam agregeeruda (Golts *et al.*, 2002).

Mitte kõik eksperimendid ei näita, et *WT*  $\alpha$ -syn`i ekspressioon on kahjulik raku elutegevusele. Alfa-syn`i transfekteerimine neuraalsesse rakuliini GT1-7, kaitseb rakke  $H_2O_2$  oksüdatiivse toksilisuse ja c-jun N-terminaalse kinaasi (JNK) aktivastiooni vastu (Hashimoto *et al.*, 2002). *WT* alfa-syn kaitseb koekultuuris dopamiinergiliste rakke MPP+ toksiini, rotenooni, kompleks 2 inhibiitor 3-nitropropioon happe vastu, kuid ei kaitse 6-OHDA ja  $H_2O_2$  eest (Jensen *et al.*, 2003). Alfa-syn`i üleregulatsioon SY5Y rakkudes vastuseks MPP+ eksponeerimisele põhjustab rakkude pääsu surmast (Gomez-Santos *et al.*, 2002).

Paljud toksiinid, kaasa arvatud MPP+, suurendavad endogeense alfa-syn`i hulka, aga ei ole teada, millal see stimulatsioon on kompensatsiooniks vastusele reguleerimaks raku kaitset, või on tegu toksilisuse kaskaadiga. Nanomolaarsetes kontsentratsioonides kaitseb alfa-syn neuroneid seerumi äravõtmise, oksüdatiivse stressi ja eksitotoksilisuse eest. Samas on näidatud, et alfa-syn`i nii mikromolaarne kui ka kõrge kontsentratsioon põhjustab vastupidiselt eelnevatele väidetele tsüstotoksilisust. Seega alfa-syn`i rakulised üleekspressioonid, mis põhjustavad selle valgu mittefüsioloogilisi kõrgendatud tasemeid, võivad indutseerida toksilisust, seda ei ole aga leitud normaalse füsioloogilise kontsentratsiooni puhul (Seo *et al.*, 2002).

### 3. Alfa-syn`i agregatsioon ja toksilisus *in-vivo*

Uurimaks alfa-syn`i loomorganismides on olnud ajapikku mitu erinevat lähenemist. Eeskätt on loodud just selliseid mudelsüsteeme, mis imiteerivad PD haigust. Sellega seoses on tehtud erinevaid transgeenseid ja „*knock-out*” loomudelid just alfa-syn geeni põhjal (Joonis 5).

#### 3.1 Oksüdatiivne stress, MPTP ja mitokondri inhibiitorid põhjustavad PD fenotüübi väljakujunemist

Aegade jooksul on kujunenud 3 põhilist farmakoloogilist PD mudelit. Esimene baseerub 6-OHDA sisendamisel dopamiini neuronite lähedusse, mis seotakse DAT-ile nagu vale neurotransmitter, põhjustades otsest neurotoksilisust. Teine lähenemine on MPTP või tema metaboliidi MPP+ kasutamine, mis on ka DAT sõltuv ja mõlemad mürgid lülituvad elektrontsütoplasma ahela ensüümkompleksi 1 (joonis 5). Kolmas mudel baseerub ka mitokondrite töö häirimisel, selleks kasutatakse aga mitokondrit inhibeerivaid ensüüme, mis ei ole DAT sõltuvad, nagu oligomütsiin, 3-nitropropioon hape, tsüaniid, karboon monooksiid ja kõige tuntumad rotenooni. Neid kolme mudelit saab kasutada põhjustamaks toksilisust musttuuma süsteemis ja nad kõik indutseerivad ka motoorika häireid, mis vastavad PD haigusele. Need neurotoksiinid mõjutavad ka alfa-syn`i. Kowall ja teised näitasid, et MPTP manustamine põhjustas paavianide ajus ebanormaalse alfa-syn`i ümberjaotuse presünaptilistes vesiikulites ja selle valgu agregatsioon musttuuma dopamiini rakkudes (SNpc) (Kowall *et al.*, 2000). Sarnaselt eelnevale, põhjustab krooniline rotenooni manustamine rottidele alfa-syn1 intratsellulaarsed agregatsioone ajutüve neuronites ja motoorika sümptomeid, mis vastavad PD-haigusele (Betarbet *et al.*, 2000). Koekultuuris on näidatud, et dopamiini neurotoksilisus kõrgendab alfa-syn`i ekspressiooni (Xu *et al.*, 2002). Samamoodi on näidatud, et hiires, keda on töödeldud neurotoksiiniga MPTP, on silmnähtavalt suurenenud alfa-syn`i mRNA hulk ja selle valgu kogus keskajus, ning musttuuma neuronites (Vila *et al.*, 2000).

### 3.2 Alfa-syn`i üleekspressiooni *in-vivo* mudelid

On loodud palju erinevaid transgeenseid hiiri, kes üleekspresseerivad alfa-syn`i erinevaid vorme ning on tehtud ka alfa-syn „*knock-out*” hiir (joonis 5).

Masliah oma töögrupiga tegi transgeense hiireliini, kes üleekspresseeris inimese *WT* alfa-syn`i. Nad nägid alfa-syn positiivsete valgukobarate moodustumist neurokorteeksi rakkude tuumades ja tsütoplasmas, hippokampuses, haistmissibulas ja *substantia nigra*`s. Nendel transgeenidel oli häiritud motoorika ja kadunud olid ka dopamiinergilised neuronid. Neuronites moodustusid intraneuraalsed niitjad valgukobarad, mis sisaldasid alfa-syn`i, ning häiritud oli liikumine (Masliah *et al.*, 2000). Lee töögrupi poolt loodud *WT* alfa-syn`i üleekspresseerival hiirel aga ei esinenud märgatavaid neuroloogilisi kahjustusi (Lee *et al.*, 2002).

Sarnaseid lahustumatuid alfa-syn`i akumulatsioone, mida on leitud parkinsoni haigete ajudest, detekteeriti ka inimese Ala30Pro ja *WT* üleekspresseerivate transgeensete hiirte keha- ja närvirakkudest, millest järeldati, et selle valgu degradeerimine võib olla rikutud (Kahle *et al.*, 2000). Kahle töögruppi poolt tehtud hiired ei näidanud mingeid neuriitide apoptoosi ja motoorika häireid kuni vanuseni üks aasta, võrreldes Masliah`i transgeenidega, kellel tekkisid motoorikahäired ja alfa-syn`i agregaadid juba 2 kuu vanuses hiires (Kahle *et al.*, 2000; Masliah *et al.*, 2000).

Gomez-Isla töögrupp näitas 2003 aastal, et inimese alfa-syn`i Ala30Pro mutantse valgu üleekspressioon hiires põhjustas progressiivselt motoorika muutust, alfa-syn`i akumulatsiooni ning CNS kasvaja. Üllatuseks ei olnud motoorne väärtalitlus kaasnev musttuuma dopamiinergilise süsteemi halvenemisega (Gomez-Isla *et al.*, 2003). Vastupidiselt eelnevale näitas aga Lee töögrupp, et nende transgeenidel, kes üleekspresseerisid inimese Ala30Pro mutantset alfa-syn`i, ei olnud tekkinud neuroloogilisi kahjustusi (Lee *et al.*, 2002).

Gisperti töögrupi poolt valmistatud inimese Ala53Thr mutantset alfa-syn`i üleekspresseerivatel hiirtel tekkisid ka progressiivsed motoorika häired, aga neist ei leitud ühtegi jälge valkude agregatsioonist (Gispert *et al.*, 2003). See tulemus erineb Lee töögrupi poolt tehtud Ala53Thr üleekspresseerivatest hiirtest, kellel leiti musttuuma neuronitest alfa-syn`i agregate, kuid ei tähendatud musttuumas dopamiini taseme langust. Fenomen, miks alfa-syn`i agregatsioon ei põhjusta hiire dopamiinergiliste rakkude surma sama efektiivsusega kui inimesel, võib tuleneda sellest, et näriliste musttuuma rakud on rohkem resistentsed alfa-syn`i toksilisuse vastu kui inimese neuronid (Gispert *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002).

PD uurimiseks rottides on kasutatud adenoviirus vektoreid, et nakatada dopamiini neuroneid. Kirk kaastöötajatega tekitas adenoviirusvektoritega roti ajus *WT* ja Ala53Thr alfa-syn`i üleekspressiooni, mis põhjustas düstroofsetes neuriitides alfa-syn`i võõrkehade tekke, dopamiini neurodegeneratsiooni ja motoorika häireid (joonis 5; Kirik *et al.*, 2003). DNA-d, mis kodeerib Ala30Pro mutantset alfa-syn`i, seoti adenoviirus vektoriga ja süstiti roti keskajju. Aasta pärast märgati, et alfa-syn oli akumulunud *SNpc* rakkudesse ja düstroofsetesse neuriitidesse nii *substantia nigras* kui ka striatumis. Üle poolte musttuuma dopamiinergilistest neuronitest olid kadunud, aga motoorika häireid ei leitud ikkagi. Arvati, et see patoloogia imiteerib ikkagi PD haigust, kuna motoorika häired ei pruugi tekkida enne, kui suurem osa dopamiinergilistest neuronitest on kadunud (Klein *et al.*, 2002).

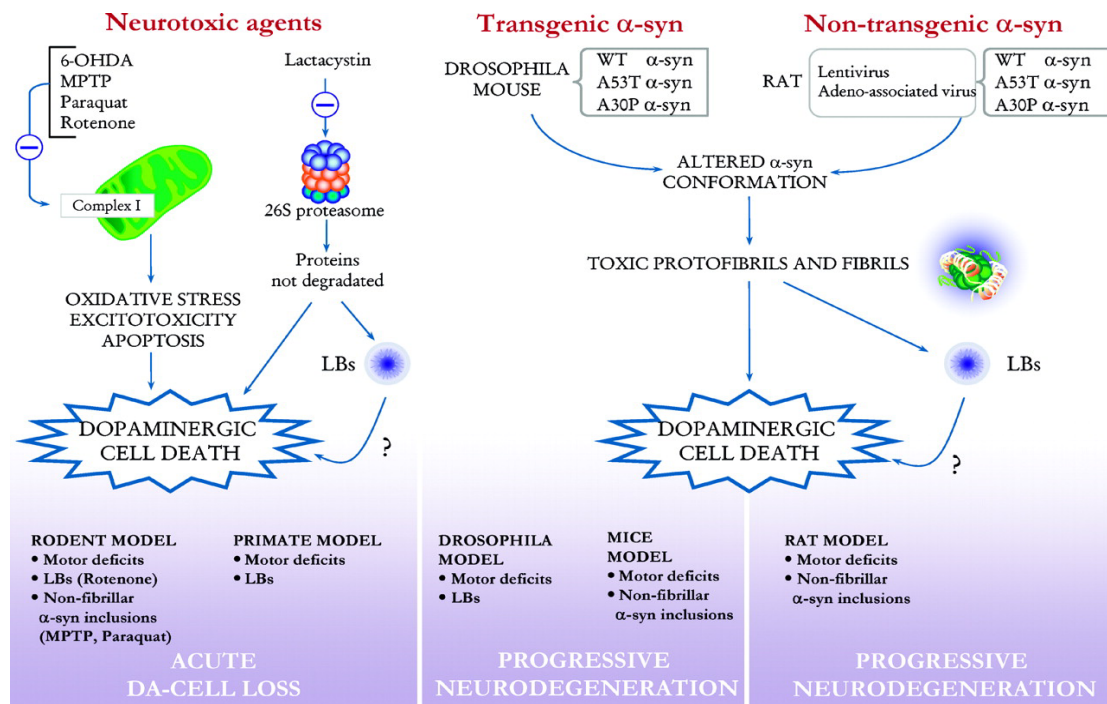
*C. elegans*`i transgeensetes mudelites, mis üleekspresserivad inimese *WT* alfa-syn`i või Ala53Thr mutantset valgu vormi, kaovad samuti dopamiinergilised neuronid ja tekivad motoorika häired (Lakso *et al.*, 2003). On näidatud, et *WT* alfa-syn`i ja *heat shock*`i valku HSP70 ko-ekspresserimine pehmendab dopamiini kadu nii hiirtes kui ka *Drosophila*`s, mis viitab, et see molekulaarne *chaperon* võib nõrgendada alfa-syn`i toksilisust (Shin *et al.*, 2005).

### 3.3 Alfa-syn „*knock-out*” hiir

On tehtud ka alfa-syn mutantne („*knock-out*”) hiir, kes on elujõuline, viljakas ja ei oma mingeid patoloogilisi anomaaliaid. Täheledatakse ka, et alfa-syn ei ole oluline närvisüsteemi arengus, ega ka presünaptiliste terminalide formuleerumisel. Olgugi, et selle hiire kesknärvisüsteemi morfoloogia on korras, kannatab ta neurokeemiliste ning elektrofüsioloogiliste defektide all. Alfa-syn *-/-* hiirtel on häiritud musttuuma dopamiinergilistest rakkudest dopamiini vabastamine. Neil on märkimisväärselt kahanenud totaalse dopamiini hulk striatumis, mida peamiselt säilitatakse vesiikulites. Vastuseks korduvatele elektriimpulssidele leiti, et *-/-* hiirtel oli muutunud dopamiini vabanemise dünaamika, st. et nad vabastavad küll dopamiini vesiikuleid, kuid dopamiini taseme taastamine võtab neil oluliselt rohkem aega kui *WT* hiirtel. MPTP ei põhjusta alfa-syn *-/-* hiirel musttuumas dopamiinergiliste rakkude surma. Samas ei ole ta resistentne rotenoonile. Hoolimata avastusest *in-vitro* eksperimentides, kus MPTP toksilisus oli võimendatud alfa-syn`i seondumisel DAT`ga, siis alfa-syn *-/-* hiire resistentus MPTP suhtes näib olevat vahendatud DAT-ist sõltumatu raja kaudu (Abeliovich *et al.*, 2000; Dauer *et al.*, 2002).

Mõned uurimused näitavad, et alfa-syn ei ole neurotoksiline, vaid aja jooksul võib vahendada ka närvirakkude kaitset. Arengu käigus on *roti syn-1* mRNA ja tema valgu ekspressioon ülereguleeritud dopamiini neuronite poolt, mis surevad loomuliku apoptootilise mehhanismi käigus. See näitab, et alfa-syn võib „kaitsta” arenevaid neuroneid (Kholodilov *et al.*, 1999). Transgeenne hiir, kes üleekspresseerib *WT* alfa-syn`i oli kaitstud toksiini *paraquat* efekti vastu (Manning-Bog *et al.*, 2003).

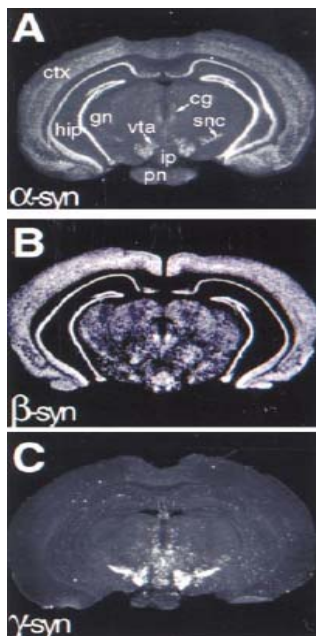
Paljud riskifaktorid, mis põhjustavad inimesel PD haigust, moduleerivad samuti ka *WT* alfa-syn`i ja tema erinevaid mutatsioone üleekspresseerivaid hiireliine. See tähendab, et need neurotoksiinid põhjustavad eri transgeenides erinevaid fenotüüpe, olgugi, et algne mutatsioon on sama. Selle põhjustab transgeenide omavaheline mitte-kattuvus, mis tuleneb koopiate arvust, integreeritud konstrukti asukohast, geneetilisest taustast jne, mis omakorda toob esile tulemuste mitte-kattumise uurimaks PD patogeneesi. Samuti esinevad lahknevused ka koekultuuri katsetes, kuna alfa-syn`i ja tema isovormide ekspressiooni ajastus ja kontsentratsioon ning eksogeense toksiini toimemehhanismid, võivad olla täiendavad riskifaktorid saamaks sarnaseid tulemusi (Thiruchelvam *et al.*, 2004).



**Joonis 5.** Parkinsoni haiguse loomudelid. LBs - Lewy kehad, MPTP1 - metüül-4-fenüül-1,2,3,6-tetrahydropüridiin, 6-OHDA - 6-hüdroksüdopamiin, *WT*  $\alpha$ -syn - metsik tüüp  $\alpha$ -sünukleiin (Recchia *et al.*, 2004).

## 4. Alfa-sünukleiini homologid beeta - ja gamma-sünukleiin

Alfa-syn`l on kaks homologit, beeta-sünukleiin ( $\beta$ -syn) ja gamma-sünukleiin ( $\gamma$ -syn). Monomeerne beeta-ja gamma-syn on alfa-syn valguga sarnase konformatsiooniga. Beeta-syn on lokaliseerunud 5 (5q35 22) ning gamma-syn 10 (10q23 21) kromosoomi. Inimese beeta-syn on 78% ja gamma-syn 60% identne alfa-syn`ga. Kõik kolm on ekspresseerunud kesknärvisüsteemis (joonis 6). Kõigil neil kolmel on ka N-terminaalses osas heksameersed kordusjärjestused. Beeta-syn`l on osa NAC regioonist ning gamma-syn`l osa karboksüterminaalsest domäänist puudu. Kõik nad on füsioloogilistes tingimustes kokku voltimata. Nii beeta kui ka gamma-syn genereerivad struktuurseid oligomeere, aga ainult gamma-syn oligomeerid käituvad nagu alfa-syn protofibrillid, seondudes hästi sünteetiliste fosfatidüülglütserooli vesiikulitega. Beeta-syn`i protofibrillid ei formuleeru ka amüloidseteks poorideks (amyloid-pores, neurotoksilised oligomeeri osad), erinevalt gamma - ja alfa-syn`st. Beeta-syn ei oma mingit võimet interakteeruda membraanidele, mis sobib kokku ka tema võimetusega siduda sünteetilisi vesiikuleid. See näitab, et syn valkudes on aminohappe jäägid 71-84 vajalikud fibrilli ja amüloid-poori moodustumiseks (Park & Lansbury 2003; Recchia *et al.*, 2004).



**Joonis 6.** Sünukleiin perekonna geenide ekspressioon kesknärvisüsteemis. A) alfa-syn on enam ekspresseerunud väikeaju koores (ctx), hippokampuses (hip), musttuumas (snc) ja ventraalses tegmentaalses alas (vta). B) beeta-syn` ekspressioon on väga laiaulatuslik, samas kui gamma-syn ekspressioon (C) on peamiselt vta`s ja snc`s. Pn- aju sillatum, cg- cingulum, gn-gyrus dentatus e. Hammaskäär, ip-interpedurkulaarse tuuma jalake (Abeliovich *et al.*, 2000).

## 4.1 Beeta-syn inhibeerib alfa-syn`i fibrillisatsiooni

On teada, et alfa-syn`i protofibrillid on patoloogilised osakesed PD tõves. Kui neid blokeerida, siis võiks loota mingit terapeutilist efekti. Kui omavahel ristata mutantseid alfa-syn valke (2 eri hiireliini, mis üleekspresseerivad vastavalt Ala53Thr ja Ala30Pro mutatsiooniga alfa-syn`i) ja beeta-syn valku üleekspresseerivaid hiiri, siis järglastel ei esine Parkinsoni tõvele iseloomulikke fenotüüpe (motoorika häiritus, valgu kobarad, dopamiinergiliste neuronite kadu). Beeta-syn inhibeerib ka *WT* alfa-syn`i fibrillisatsiooni (Park & Lansbury 2003).

Beeta ja gamma-syn valgud moodustavad väga aeglaselt protofibrille. *In-vitro* katsetes on näidatud, et kui inkubeerida *WT* alfa-syn`i, siis esimesi protofibrille saab lahuses detekteerida 28 tunni pärast. Samadel tingimustel inkubeerides tekivad Ala53Thr mutatsiooniga alfa-syn`i protofibrillid 16 tunni jooksul. Beeta – ja gamma-syn valgu puhul mingit erilist signaali enne 14 päeva möödumist ei täheldatud. Ala53Thr puhul oli aga esimesi oligomeere näha juba 5h pärast. Mitte ühtegi beeta-syn`i oligomeeri ei suudetud detekteerida isegi mitte 30 päeva järgsel inkubeerimisel 37 °C juures. Gamma-syn oligomeere produtseeriti väga aeglaselt ja nad ei akumulunud ega konverteerunud ka fibrillideks. Siit järeldub, et nii beeta - kui ka gamma-syn valgud ei ole alati genereerima protofibrille ja fibrille (Park & Lansbury 2003).

On näidatud, et ainult beeta-syn inhibeerib *WT* ja Ala53Thr alfa-syn`i agregatsiooni ning fibrillide ja protofibrillide formatsiooni *in-vivo*. Need 2 homoloogi (alfa ja beeta) interakteeruvad omavahel ning beeta-syn inhibeerib alfa-syn`i agregaatide teket. Seda näidati ka *in-vitro* katses, kus inkubeeriti koos beeta-syn`i ja Ala53Thr mutantset alfa-syn valku. Selgus, et beeta-syn inhibeeris fibrillisatsiooni. Sama inhibitsioon toimis ka *WT* alfa-syn valgu puhul. Gamma-syn`i ja alfa-syn`i koinkubeerimine ei andnud mitte mingit inhibitsiooni efekti, isegi kui gamma-syn valku oli 4 korda rohkem (Park & Lansbury 2003).

Beeta-syn`i neuroloogiline kaitsemehhanism võib olla seotud tema seondumisega Akt valguga (proteiinkinaas B). Koekultuuri katsetes näidati, et beeta-syn`i üleekspressioon tõi kaasa ka Akt aktiivsuse tõusu ja kaitse rotenooni ja 6-hüdroksüdopamiini toksilisuse vastu. Samas põhjustas suure tundlikuse rotenooni suhtes Akt`i alaregulatsioon. Hiljutised uurimused näitavad, et alfa-syn`i üleekspressioon pärsib ekstratsellulaarse signaal-reguleeritud kinaasi (ERK) ning reguleerib Bcl-2 (proto-onkogeen) ekspressiooni läbi fosfatidüülinoositol 3-kinaasi (PI3-K/Akt) signaaliraja, põhjustades rakkude surma, kuna ERK mängib tähtsat rolli neuraalses kasvus, sünapsite formulatesioonis ja plastilisuses. On näidatud,

et P53 (apoptoosi geen) ekspressioon on reguleeritud Mdm2-e poolt. Mdm2 on onkoproteiin, mis normaalsetes tingimustes paikneb tsütoplasmas. Kui Mdm2 fosforüeeritakse Akt'i poolt, siis ta aktiveerub ja läheb rakutuuma. Tuumas seondub ta P53'ga ning inhibeerib tema apoptootilist aktiivsust, lubades sel teel rakul edasi elada. See näitab, et beeta-syn vahendatud Akt signaaliraja aktivatsioon võib indutseerida teiste hulgas ka Mdm2-e fosforüratsiooni, luues nii kaitsemehhanismi läbi p53 inaktivatsiooni toksiinide vastu. On võimalik, et ka beeta-syn'i kaitsemehhanism agregeerunud alfa-syn'i vastu on vahendatud läbi Akt signaaliraja. Fenomen, et beeta-syn kaitseb närvisüsteemi kahjustuste eest interakteerudes otseselt Akt'ga viitab, et PI3-K signaalirada võiks olla üks terapeutiline sihtmärk ravimaks PD-tõve (Hashimoto *et al.*, 2004).

Parkinsoni tõve kutsub esile alfa-syn'i agregaatide akumulatsioon *substantia nigra*'s. On näidatud, et agregeerunud alfa-syn seondub 19S subühiku S6'komponendile 26S proteosoomis ja inhibeerib nii ubikvitiinist sõltuvat kui ka sõltumatut proteosomaalset degradatsiooni. Proteosoom 26S koosneb kahest subühikust 20S (tuum) ning 19S (cap). Alfa- ja beeta-syn'i monomeerid inhibeerivad ainult väga nõrgalt 20S ja 26S ubikvitiin sõltumatut proteosomaalset aktiivsust, kuid gamma-syn inhibeerib väga tugevalt. Monomeerse valguna ei inhibeeri neist kolmest mitte ükski 26S ubikvitiin sõltuvat proteosomaalset aktiivsust. Kuigi beeta-syn ei oma mingit otsest efekti proteosomaalsele aktiivsusele, siis koinkubeerides monomeerset beeta-syn'i koos agregeerunud alfa-syn valguga, pidurdab ta 26S ubikvitiinist sõltuvat proteosomaalset inhibitsiooni, mida on põhjustanud agregeerunud alfa-syn. Eksperimendid näitavad, et alfa-syn seondub meelsamini beeta-syn'le kui S6'subühikule. Katsed tõestavad, et rekombinantne monomeerne beeta-syn ei interakteeru proteosomaalse subühiku S6'-ga. Beeta-syn konkureerib S6'-ga seondumaks alfa-syn valku. Siit järeldub, et alfa- ja gamma-sünukleiinid reguleerivad proteosoomide funktsiooni ning beeta-syn käitub kui alfa-syn'i negatiivne regulaator (Snyder *et al.*, 2005).

## 4.2 Metioniini oksüdatsioon inhibeerib alfa-syn'i agregeerumist

Sarnaselt sulfoksiididele konverteerib vesinik peroksiid alfa-syn valgus oksüdatsioonil ümber kõik 4 metioniini aminohappe jääki. Oksüdeeritud ja mitte oksüdeeritud alfa-syn valk on sarnase konformatsiooniga. Alfa-syn valgu fibrillisatsioon on täielikult füsioloogilistes tingimustes inhibeeritud, kui metioniin on oksüdeeritud. Oksüdatsioon põhjustab lahustuva oligomeeri stabilisatsiooni ning pärsib edasist agregatsiooni. Ajus genereeritakse väga palju



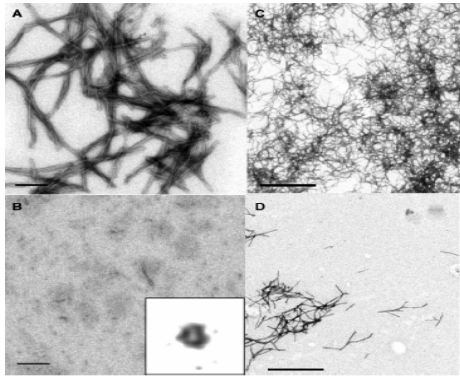
reaktiivseid hapniku radikaale (ROS) ja nitrogeenseid osakesi, samas ei suudeta neid ära kasutada. Haigused, mis kaasnevad oksüdatiivse stressiga, on põhjustatud ebavajaliku materjali elimineerimise vigadest, antioksüdantide vähesest kontsentratsioonist, vabade radikaalide ja oksüdantide üleproduktioonist või kõige selle kombinatsioonist. Normaalse mitokondriaalse hingamise käigus genereeritakse hapnikust vett, kuid samas produtseeritakse superoksiidide anione, hüdrogeenseid peroksiide ja vabu hüdroksüül radikaale. Musttuuma dopamiinergilised rakud on aga väga tundlikud vabade radikaalide suhtes. Musttuumas on ka kõige kõrgem dopamiini ja raua kontsentratsioon. Sealne alfa-syn valgu agregatsioon ongi põhjustatud valgu valesti pakkimisest, ebanormaalsest ubikvitiin-proteosomaalsest ja *chaperon* `i süsteemist või on kõik eelnevalt loetud anomaaliad koos (Glaser *et al.*, 2005)

MPTP põhjustab otseselt oksüdatiivset stressi, inhibeerides mitokondrite funktsiooni ja vabastab ROS-e, põhjustades dopamiinergiliste rakkude kao. Metioniin ja tsüsteiin on väga hõlpsasti oksüdeeritavad  $H_2O_2$  juuresolekul metioniini sulfoksiid, kloroamiini, peroksünitraadi ja hüpokloriid poolt, mis on kõik ka bioloogilise oksüdatsiooni produktid. Katsetes näidati, et metioniin-oksüdeeritud alfa-syn ei moodustanud lahuses (100mM NaCl, 37 °C, pH 7,4) fibrille. Veelgi enam, kui teda lisati *WT* alfa-syn lahusesse, mis agregeerub nendes tingimustes, siis ta inhibeeris ka selle fibrillisatsiooni. Sarnaselt met oksüdatsioonile inhibeerib alfa-syn `i agregatsiooni türosiini nitrifitseerimine. Türosiini aminohappe jäägi oksüdeerimine selles valgus, aga soodustab fibrillisatsiooni. *In-vivo* katsetes on tõestatud, et nitrifitseeritud alfa-syn `i oligomeerid on tsütotoksilised (Glaser *et al.*, 2005).

Met-oksüdeeritud alfa-syn valgu fibrillisatsiooni inhibitsiooni tase on proportsionaalne oksüdeeritud metioniinide arvuga (st. kui kõik 4 on oksüdeeritud, siis efekt kõige parem). On oluline teada, et metallide juuresolekul met-oksüdeeritud alfa-syn enam agregatsiooni ei inhibeerib. Samas võivad olla oksüdeeritud oligomeerid tsütotoksilised ja kutsuda ise esile PD väljakujunemist. Arvatakse, et dopamiinergilistes rakkudes oksüdeeritakse suurem osa alfa-syn valgu met-jääkidest just siis, kui rakus hakkavad toimima kahjulikud mõjud, nagu türosiini nitrifikatsioon või *crosslinking*, interaktsioonid metallidega, kaitstes nii rakke valgu agregatsiooni eest. Alfa-syn valgu oksüdatsiooni efektid, agregatsioon ja sadestumine, degradatsioon ning interaktsioonid lipiididega *in-vivo* pole veel päris selged ja vajavad edasist uurimist (Glaser *et al.*, 2005).

### 4.3 Rifampitsiin inhibeerib alfa-syn`i agregatsiooni

Rifampitsiin ja tema oksüdatsiooni produktid inhibeerivad *in-vitro* alfa-syn valgu agregatsiooni (joonis 7). Veelgi enam, rifampitsiini disagregerib alfa-syn agregaadid üksikuteks monomeerideks ja lahustuvateks oligomeerideks, seondudes neile kovaletselt. Kuidas ja kuhu seondumine toimub pole veel päris selge. Katsetes on tõestatud, et rifampitsiini oksüdatsiooni produktid on parema inhibitsiooni ja disagregatsiooni võimega, kui ravim ise. Samas ei ole teada, kas inhibitsiooni ja disagregatsiooni jääkproduktid on neurotoksilised. Seega, kui seda ravimit kasutada Lewy kehade raviks musttuuma dopamiinergilistes rakkudes, peab ennem selgeks tegema tema kõrvaltoimed (Li *et al.*, 2004).



**Joonis 7.** Rifampitsiin inhibeerib alfa-syn`i fibrillide moodustumist ja põhjustab ka disagregatsiooni. A) 72 h möödudes 35µM alfa-syn`i inkubeerimisel 37 °C ja pH 7,4 juures. B). Samadel tingimustel alfa-syn`i inkubeerimisel 100 µM rifampitsiini juuresolekul on näha väga vähe fibrille. Leiti vaid üksikuid rõngakujulisi vahepealseid oligomeere (vahepilt, millede välidiameter oli 40-50nm) ja üksikuid väga lühikesi fibrille. C) Alfa-syn`i fibrillide (mida eelnevalt oli kasvatatud 96h) inkubeerimine ilma ravimita veel 68h ja samadel tingimustel 100 µM rifampitsiini juuresolekul inkubeerimine (D) näitab, et rifampitsiini disagregerib alfa-syn`i agregate (Li *et al.*, 2004).

### 4.4 Dopamiin inhibeerib alfa-syn valgu fibrillisatsiooni

Alfa-sünukleini fibrillisatsiooni võib inhibeerida ka dopamiin. Dopamiini auto-oksüdatsioonil tekib ühend nimega dopamiinokroom, mis põhjustab alfa-syn valgus selliseid konformatsioonilisi ümberkorraldusi, et ta kaotab võime agregeeruda. On näidatud, et konformatsioonilised ümberkorraldused on seotud alfa-syn`i aminohappejääkidega 125-129. Dopaminokroom interakteerub selle motiiviga (125-129), muudab selle valgu konformatsiooni, ning alfa-syn kaotab võime agregeeruda. Seda näidati *in-vitro* katsetes, kus

inkubeeriti koos nii *WT* kui ka inimese Ala53Thr mutatsiooniga alfa-syn`i ning dopamiini. Leiti, et inhibitsioon toimub vaid siis, kui dopamiin oksüdeerub. Seega, vähene dopamiini tase musttuuma neuraalsetes rakkudes võib soodustada alfa-syn`i agregatsiooni ning tekitada PD tõve. Kuna dopamiini oksüdatsioonil ei teki toksilisi jääkprodukte, siis oleks võimalik seda alfa-syn`i agregatsiooni inhibitsiooni mehhanismi ära kasutada uute PD ravimite väljatöötamiseks (Norris *et al.*, 2005).

#### 4.5 *Co-chaperon* CHIP vahendab alfa-sünukleiini degradatsiooni

Elusrakkudes põhjustavad erinevad stressorid valkude agregatsiooni. *Heat shock* valgud tunnevad ebakorrektsed valgud ära ning aitavad neid taastada. Lisaks *chaperon`i* aktiivsusele, võivad *heat shock* valgud vahendada ka degradatsiooni, transportides valesti pakitud valke ubikvitiin proteosoomi süsteemi (Shin *et al.*, 2005).

CHIP on Hsp70 karboksüterminaalse domääniga interakteeruv valk. Ta lokaliseerub PD haigust põdevate patsientide dopamiinergiliste neuronite Lewy kehadesse koos Hsp70-ga. *Co-chaperon* CHIP koosneb kolmest domäänist; aminotermiinaalne *three tandem tetratricopeptide* (TPR), kõrgelt laetud tsentraalne domään ja karboksüterminaalne U-box domään. Koekultuuris põhjustab CHIP`i üleekspressioon alfa-syn`i agregaatide inhibitsiooni ja vähendab ka alfa-syn valgu rakusisest nivood. CHIP võib vahendada alfa-syn`i degradatsiooni kahe erineva raja vahel. TPR-domään on oluline proteosomaalse ja U-box domään lüsosomaalse degradatsiooni läbiviimiseks. On näidatud, et CHIP interakteerub otseselt nii alfa-syn`i, sünfiliin-1 kui ka Hsp70`ga. Fakt, et CHIP seondub Hsp70`ga ning viib läbi alfa-syn`i ubikvitiin sõltuvat proteosomaalset degradatsiooni näitab, et need kaks valku töötavad selles protsessis koos. Lisaks on tõestatud, et kui üleekspresserida CHIP`i, siis tõuseb ka Hsp70 rakusisene tase, mis viitab nende ko-regulatsioonile (Shin *et al.*, 2005).

On näidatud, et Hsp70`ne üleekspressioon vähendab alfa-syn`i poolt indutseeritud dopaminergiliste rakkude kadu *Drosophila`*s ja alandab ka mittelahustuvate alfa-syn agregaatide akumulatsiooni transgeensetes hiirtes (Shin *et al.*, 2005).

CHIP interakteerub Hsc70/Hsp70`ga nii TPR kui ka laetud domääni kaudu, reguleerides nii *chaperon`i* aktiivsust. CHIP`i U-box domään on sarnane ubikvitiin ligaaside ühe olulise motiiviga. On leitud, et CHIP ongi „pesuehtne” E3 ubikvitiini ligaas ja soodustab ka *chaperon`i* substraatide ubikvitatsiooni. Veelgi enam, CHIP interakteerub otseselt Parkin valguga ja reguleerib positiivselt PARKIN E3 ubikvitiin ligaasi aktiivsust, kaitstes nii

dopamiinergilisi neuroneid alfa-syn`i poolt endoplasmaatilisse retiikulumi tekitatud kahjustuste eest (Shin *et al.*, 2005).

CHIP`i üleekspressioon koekultuuris vähendab alfa-syn`i agregatsiooni ja võimendab tema degradatsiooni. Samas täheldati alfa-syn agregaatide struktuuri muutusi, suurtest agregaatidest oli moodustunud palju väikesi agregate (Shin *et al.*, 2005).

Kokkuvõttes inhibeerib CHIP alfa-syn`i agregatsiooni sel teel, et ta lülitab Hsp70`ne tagasipakkimise rajast (*refolding*) valgu degradeerimisele. Parkinsoni tõve puhul on arvatavalt häiritud alfa-syn`i degradatsioon ja õige voltimine, mis põhjustab selle valgu agregaatide tekke, Lewy kehade moodustumise ning musttuuma dopamiinergiliste rakkude surma (Shin *et al.*, 2005).

## 5. Geen Parkin

Geen Parkin paikneb 6 kromosoomis 6q25.2-27 lookuses. Parkin geenis olevad mutatsioonid põhjustavad väga varajast Parkinsoni haiguse esilekutsumist (keskmine eluiga, mil haigus algab, on 32 aastat). Parkin geenist on leitud mutatsioone 49% perekondlikest ja 15% sporaatilistest juveniilsetest PD juhtudest. Harva kirjeldatakse Parkin geeni mutatsioone vanas eas esinevatel PD juhtudel. Tõve kutsuvad esile Parkin geenis tekkinud punktmutatsioonid, suured ja väikesed deletsioonid ning eksonite multiplikatsioonid. Parkin geeni mutatsioonidest tulenenud varajane PD erineb teistest PD tüüpidest veel selle poolest, et musttuumas puuduvad tavaliselt Lewy kehad, samas esinevad aga üldtuntud PD tunnused, nagu liikumise häired ja liigutuste kontrollimatus ning dopamiinergiliste rakkude kadu. Arvatakse, et juveniilset PD põhjustavad Parkini substraatide akumulatsioonid nagu; CDCrel-1, sünapsi vesiikulitega seotud valk; Sünfiliin-1, alfa-syn'ga interakteeruv valk, mis lokaliseerub sünapsis; Pael-R, G-valguga seotud transmembraane valk; ja tsükliin E, valk mis reguleerib neuraalset apoptoosi. Parkin vahendab vale konformatsiooniga lahustumatu Pael-R'i degradeerimist, mis muidu põhjustaks endoplasmaatilises retiikulumis stressi ning raku surma. Yang'i töögrupi poolt näidati, et transgeenses *Drosophila*'s, kus üleekspresseeriti inimese Pael-R valku, olid kahjustunud spetsiifiliselt just dopamiinergilised neuronid. Samas mutandis inimese Parkin'i üleekspresseerides inhibeeriti aga Pael-R'i neurotoksilisus. See näitab, et vähene või vigane Parkin valk ei suuda Pael-R'i degradeerimist läbi viia (Yang *et al.*, 2003)

Parkin on E3 ubikvitiin modifitseeritud valk, mis on vajalik proteosomaalseks katabolismiks ning ta on kõrgelt substraadi spetsiifiline, seonduses ainult mõne substraatvalguga (Shimura *et al.*, 2001). On tõendeid, et  $\alpha$ -syn on parkini substraat ja ta vahendab alfa-syn'i proteosomaalset katabolismi. Seega, Parkin võib olla põhiline valk, mis kaitseb organismi  $\alpha$ -syn'i neurotoksilisuse eest (Oluwatosin-Chigbu *et al.*, 2003). Mutantsete  $\alpha$ -syn valkude ekspressioon põhjustab ubikvitineeritud agregaatide tekke, viies rakud surmale. See näitab, et parkin seondub, kuid ei suuda läbi viia valede konformatsioonidega  $\alpha$ -syn valkude proteosomaalset degradeerimist (Stefanis *et al.*, 2001). Samas põhjustavad ka mutatsioonid Parkin geenis seda, et ta ei suuda enam  $\alpha$ -syn'i katabolismi läbi viia, põhjustades sellega Lewy kehade ja Parkinsoni haiguse väljakujunemist. Üldtuntud on teadmine, et alfa-syn on primaarselt kataboliseeritud ubikvitiin-proteosoomi rada mööda, kuid

on ka näidatud otsest katabolismi proteosoomi 26S subühiku, lüsoosoomide ja autofaagia poolt. Häired alfa-syn`i katabolismi radades põhjustavad selle valgu agregeerumist ning otsest neurotoksilisust (Webb *et al.*, 2003; Recchia *et al.*, 2004).

## 6. PINK-1

Valente töögrupp näitas, et Pink-1 geen (PTEN-mõjutatud oletatav kinaas) on seotud varajase autosomaale retsessiivse Parkinsonismi väljakujunemisega. Pink-1 paikneb 1 kromosoomis 1p35-36 lookuses. Itaalia ja Hispaania PD põdevatetest perekondadest on leitud ka kaks mutatsiooni selles geenis, G309D punktmutatsioon ja W4370PA deletsioon, mis põhjustavad PD-d. Mõlemal juhul on mutatsioon eeldatavas kinaases domäänis (Valente *et al.*, 2004).

Pink-1 geen koosneb kaheksast eksonist (1,8 kB) ja kodeerib 581 aminohapet. Transkript kodeerib 34 aminohappelist mitokondri lokalisatsiooni motiivi ja kõrgelt konserveerunud kinaasidomääni (aminohappe jäägid 156-509). *In-vitro* katsetes näidati, et *WT* Pink-1`te üleekspresseerides paranes rakkude elujõulisus, vastuseks oksüdatiivsele stressile ja mitokondri kompleksi 1 inhibitsioonile. Kui üleekspresseeriti mutantset G309D Pink-1 valku, põhjustas oksüdatiivne stress rakkude märgatava elujõulisuse vähenemise. Sellest järeldati, et Pink-1 võib neuroneid kaitsta stressi põhjustatud apoptoosi eest (Valente *et al.*, 2004).

On väga palju erinevaid tõendeid, mis näitavad, et mitokondrite töö rikkumine võib põhjustada PD patogeneesi. Mürgid nagu MPTP ja rotenoon põhjustavad läbi mitokondri kompleksi 1 inhibitsiooni selektiivselt just dopamiinergiliste rakkude surma. On ka näidatud, et mitokondrite kahjustustele kaasneb veel oksüdatiivne stress, mis võib ajendada alfa-syn valku agregeeruma. Samas ei ole leitud ühegi patsiendi (kes põeb Pink-1 geeni defektist tulenevat Parkinsoni haigust) dopamiinergilistest rakkudes Lewy kehasid (Valente *et al.*, 2004).

Pink-1 geenis olevad mutatsioonid, mis esinevad PD haigetel, paiknevad seriin/treoniin kinaasi domäänis. Need mutatsioonidest põhjustatud ümberkorraldused võivad mõjutada kinaasi aktiivsust või substraadi äratundmist. Arvatakse, et Pink-1 võib fosforüleerida mitokondri valke vastuseks rakulisele stressile, kaitstes nii mitokondreid erinevate stressiorite, inhibiitorite ja toksiinide eest, vältides sel teel apoptoosi. Pink-1 geeni defekte kandvatel inimestel on see kaitsemehhanism häiritud, põhjustades musttuuma dopamiinergiliste rakkude kao ja väga varajase PD väljakujunemise (Valente *et al.*, 2004).

## 7. DJ-1

DJ-1 geen paikneb esimeses kromosomis (1p36) üsna lähedal Pink-1 geeni lookusele. Selles geenis olevad mutatsioonid ja deletsioonid põhjustavad väga varajast autosomaalset retsessiivset PD väljakujunemist (haigus algab keskmiselt juba 40 aastasel). DJ-1 L166P punktmutatsiooni on leitud erinevate juveniilset Parkinsoni põdevatest perekondadest. DJ-1 kodeerib 189 aminohappelist ThiJ domäänset valku. On näidatud, et ThiJ domääniga valgud omavad nii proteosomaalset kui ka *chaperon*’i aktiivsust. Arvatakse, et DJ-1 funktsioneeribki kui redoks-reguleeritud molekulaarne *chaperon*, mis aktiveeritakse oksüdeeritud keskkonnas (Shandelman *et al.*, 2004).

DJ-1 paikneb normaalsetes füsioloogilistes tingimustes raku tsütoplasmas ning on inaktiivne. Oksüdatiivne stress, proteosoomide ja mitokondri kompleksi I inhibiitorid põhjustavad DJ-1’e aktiveerumise läbi oksüdatsiooni. Arvatakse, et oksüdeeritud DJ-1 lokaliseerub mitokondri välismembraanile ja supresseerib raku apoptoosi (Shandelman *et al.*, 2004).

Vastuseks toksilisele keskkonnale üleekspressioneerivad kõik organismi rakud *heat shock* valke. Paljud nendest funktsioneerivad kui molekulaarsed *chaperon*’id, aidates teisi valke pakkida (kaasa arvatud ThiJ domäänsed valgud). On näidatud, et üks DJ-1’e substraat on alfa-syn. *In-vitro* katsed näitasid, et DJ-1 inhibeerib alfa-syn potofibrillide teket ja agregatsiooni. Arvatakse, et DJ-1 võib soodustada valesti volditud valkude degradatsiooni läbi proteosoomi, lüsoosoomi või *chaperon*-vahendatud autofaagia raja kaudu (Shandelman *et al.*, 2004).

DJ-1 struktuuris on ka kaks kõrgelt reaktiivset tsüsteiini (106 ja 53 positsioonis). Mutatsioon positsioonis 53 halvab täielikult nii DJ-1’e *chaperon*’i aktiivsuse kui ka tema võime hoiatada ja kaitsta rakke oksüdatiivse stressi eest (Shandelman *et al.*, 2004).

On näidatud, et L166P mutantne DJ-1 valk on mittestabiilne, ei oma mingit *chaperon*’i aktiivsust ning ei suuda ka tõenäoliselt kaitsta rakke oksüdatiivse stressi eest. See põhjustabki nendel patsientidel dopamiinergiliste neuronite kao, alfa-syn’i agregatsiooni ning Parkinsonismi väljakujunemise (Shandelman *et al.*, 2004).



## 8. Ubikvitiin karboksü-terminaalne hüdrolaas L1

Ubikvitiin karboksü-terminaalne hüdrolaas L1 (UCHL1) paikneb 4 kromosoomis 4p14 lookuses. Geeni kogupikkus on umbes 10kb ja sisaldab 9 eksonit. UCHL1 on ajus kõige rohkem esindatud valk, moodustades 2% totaalse aju valgu hulgast. Seda valku on leitud ka PD haigete Lewy kehades. UCHL1 kuulub deubikvitineerivate ensüümide perekonda ja ta ülesandeks on lammutada polümeerset ubikvitiini monomeerideks ja hüdrolüüsida ahelad ubikvitiini molekulde ja väikeste liidentite, nagu glutatiooni (glutathione) ja rakuliste amiinide vahele. See valk on kõrgelt ekspresseerunud neuronites ja testistes (Leroy *et al.*, 1998).

UCHL1 rohke esinemine inimese ajus, tema paiknemine Lewy kehades ja tema osalus ubikvitiin-sõltuvas proteolüütilises rajas, vihjavad tema osalusele Parkinsoni haiguse patoloogias. Koekultuuri katsetes on näidatud, et vigane UCHL1 geen põhjustab alfa-syn valgu akumulatsiooni. UCHL1 defektne hiir (gag-hiir, kellel on puudu UCHL1 geenist 42 aminohappe pikkune katalüütiline järjestus), omab sensorite ataksia juba väga varajases eas, millele kaasneb ka mootorika ataksia. Patoloogiliselt toimub selles hiires „dying-back” aksonite degeneratsioon ja sferoid kehade formuleerumine närvi terminalides (Saigoh *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 1998).

UCHL1 geenis olevaid mutatsioone on leitud ka Parkinsoni põdevate inimeste perekondadest. 1998 aastal leiti UCHL1 geenis ühest Saksamaa PD perekonnast Ile93Met ja 1999 aastal ühest Kaukaasia perekonnast Ser18Tyr mutatsioon. Kokkuvõttes põhjustasid need mõlemad mutatsioonid muutusi proteolüüsi rajas, mis tõi endaga kaasa valkude agregatsiooni, Lewy kehade tekke ja PD haiguse väljakujunemise (Lincoln *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 1998).

# EKSPERIMENTAALNE OSA

## 1. MATERJALID JA METOODIKA

### 1.1 Lahused ja töövahendid

1. M2-sööde (Sigma-Aldrich), valmistatud vastavalt tootja protokollile.
2. M16-sööde (Sigma-Aldrich), valmistatud vastavalt tootja protokollile.
3. Dormicum (Roche, midazolam 5mg/ml)
4. Hypnorm (Janssen, fentanüülsitraat 0,315 mg/ml ja fluanison 10 mg/ml)
5. PBS - Phosphate Buffered Saline (PAA)
6. 0,1% Zelatiin (Gibco BRL)

#### 7. Embrüonaalsete tüvirakkude sööde

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| DMEM <i>high glucose</i>        | 500 ml (PAA, sisaldab juba L-glutamiin, sodiumpüruvaati) |
| Veise loote seerum              | 90 ml (PAA, ES-rakkudel testitud seerum)                 |
| Asendamatud aminohapped         | 6 ml (PAA)   |
| Penitsiliin-streptomütsiin      | 6 ml (PAA, 100x)   |
| Beeta-merkaptotoetanool         | 6 ml (7 µl 100% beeta-merkaptotoetanooli 10ml PBS's)     |
| Leukeemia inhibiitor faktor LIF | 60 µl (Chemicon)   |

#### 8. Feeder rakkude sööde

|                          |   |
|--------------------------|---|
| DMEM <i>high glucose</i> | 500 ml (PAA sisaldab juba L-glutamiin, sodiumpüruvaati) |
| Veise loote seerum       | 55,5 ml (PAA)   |

#### 9. Feeder rakkude külmutussegu

- 80% feeder rakkude sööde
- 20% Dimetüülsulfoksiid (DMSO)

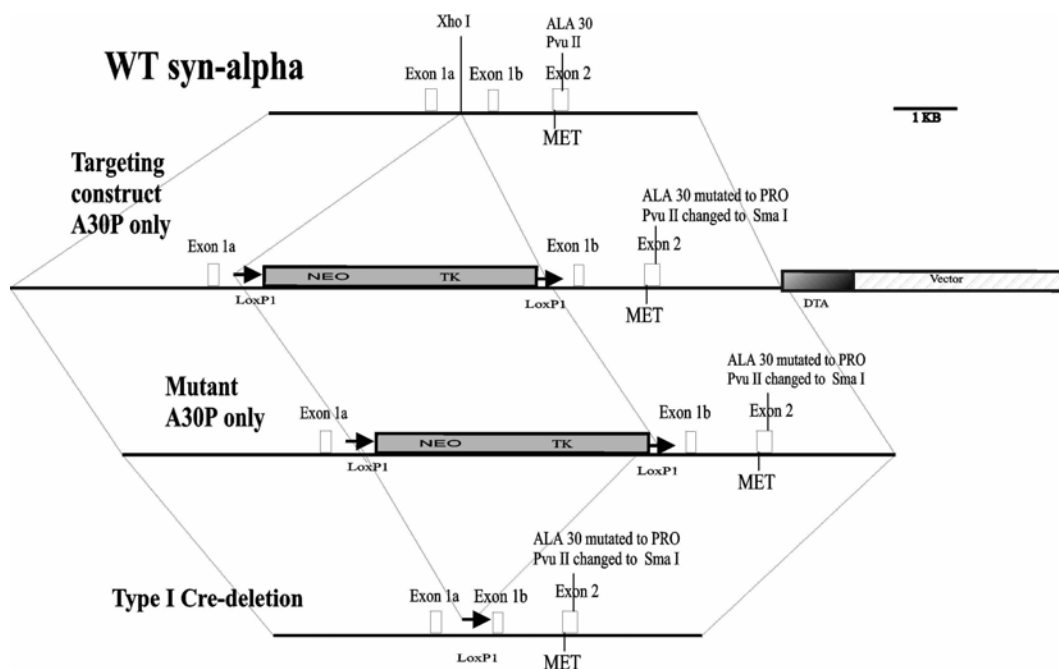
#### 10. ES-rakkude külmutussegu

- 80% ESM
- 20% Dimetüülsulfoksiid (DMSO)

11. Trüpsiin (Gibco BRL)
12. Parafiinõli (Sigma-Aldrich)
13. Koekultuuri plastik (Nalge Nunc international, Corning)
14. Klaaskapillaarid sisediameetriga 1,17 mm (Clarc)
15. Stereomikroskoop Zeiss Stemi 2000 (suurendusega 16,25-125 korda)
16. Stereomikroskoop Zeiss Stemi 1000 (suurendusega 7-35 korda)
17. Stereomikroskoop Zeiss Axiovert S100 (suurendusega 10 x (5; 10; 20; 40))
18. Stereomikroskoop Olympus CK2 (suurendusega 10 x (4;10, 20))
19. Koekultuuri inkubaator (Heraeus)
20. Kirurgiline niit koos nõelaga (Sherwood Davis & Geck)
21. Operatsiooni klambri kinnitaja (Autoclip)
22. Operatsiooniklambrid (Becton Dickinson)
23. Operatsiooni pintsetid, klamber, käärid (LINK)
24. Insuliinisüstlad (Monoject)
25. Suupipett
26. Automaatpipetid (Eppendorf)
27. Mikromanipulaator (Eppendorf)
28. Tsentrifuug (Eppendorf)
29. Vibratsioonivaba laud (Retent)
30. Koekultuuri vertikaalne tõmbekapp (ESCO)
31. Mitomütsiin-C (Aplichem)

## 1.2 Alfa-sünukleiin „*knock-in*” konstrukti strateegia

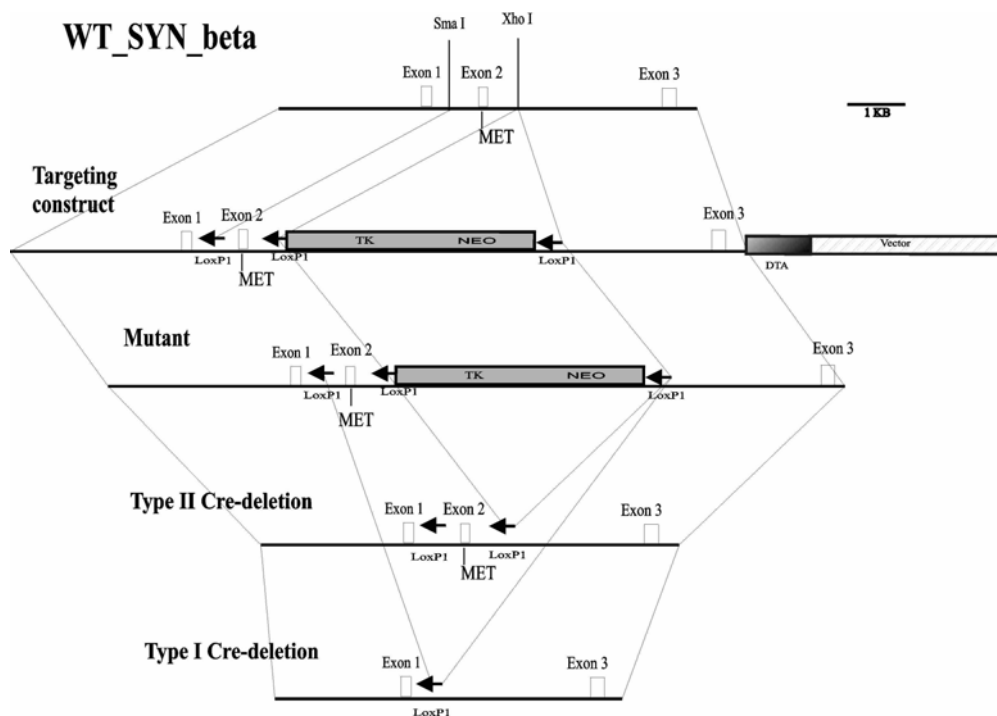
Euroopa Liidu viienda raamprogrammi projekti Neuropark sihiks oli luua uusi strateegiaid uurimaks Parkinsoni haigust. Visgenyx`i ettepanek oli genereerida alfa-syn punktmutatsiooniga transgeene hiir (joonis 8). Parkinsoni põdevatel inimestel on alfa-syn geenis enam kirjeldatud kahte erinevat punktmutatsiooni Ala53Thr ja Ala30Pro. Visgenyx`i strateegia oli luua Ala30Pro mutatsiooniga hiir, kuna Ala53Thr mutatsioon on hiires juba olemas. Ülesandeks oli asendada *WT* hiires 30 triplett (GCT-Ala) CCC tripletti vastu (Pro). Vektor sisaldas TKNeo kassetti, mis eemaldati *cre*-rekombinaasiga ES-rakkude selektsiooni protsessi käigus (konstrukt valmistati Visgenyx`s, Olev Kahre poolt)



**Joonis 8.** Alfa-syn „knock-in” hiireliini loomine. „Knock-in” strateegiaks oli asendada 30 triplett, mis kodeeribalaniini (GCT), proliini vastu (CCC triplett).

### 1.3 Beeta-sünukleiin „knock-out” konstrukti strateegia

Euroopa Liidu viienda raamprogrammi projekti Neuropark sihiks oli luua ka beeta-syn „knock-out” hiir. Kuna beeta-syn'i täpne funktsioon pole teada, siis otsustati, et kõige otstarbekam on tekitada täis „knock-out” hiir (joonis 9). Valmistati konstrukti, millest saaks hiljem tekitada nii konvensionaalseid kui ka konditsionaalseid „knock-out” hiiri. Konstrukti sisaldas kolme LoxP järjestust. Esimene nendest disainiti eksoni kahe ette (mis sisaldas ka Met'i), teine ja kolmas LoxP järjestus pandi aga TKNeo kassetti ette ja taha, et hiljem see koekultuuris selektsiooni ajal *cre*-rekombinaasiga välja lõigata. Nii valmistati vektor, mis rakkude *cre*-rekombinaasiga töötlemise käigus andis kahesuguseid deletante a) konvensionaalseid ja b) konditsionaalseid (konstrukti valmis Visgenyx's, valmistas Olev Kahre).



**Joonis 8.** Beeta-syn konstrukti strateegia. Konstrukt sisaldas kolme LoxP järjestust. Esimene nendest disainiti ekson 2 ette (mis sisaldas ka Met'i), teine ja kolmas LoxP järjestus pandi aga TKNeo kassetti ette ja taha, et hiljem see koekultuuris selektsiooni ajal *cre*-rekombinaasiga välja lõigata. Nii valmiski vektor, mis rakkude *cre*-rekombinaasiga töötlemise käigus andis kahesuguseid deletante a) konvensionaalseid ja b) konditsionaalseid

Transgeensete hiirte valmistamiseks oli minu töö eesmärgiks luua alfa-syn „*knock-in*” ja beeta-syn „*knock-out*” embrüonaalsed tüvirakuliinid, süstida neid hiire blastotsüsti saamaks kimäärset isendit, kes annab ka *germ-line* järglasi. Hilisem eesmärk oli uurida saadud hiirte käitumise motoorseid tegureid, et teada saada, kas meie loodud transgeenid omavad PD fenotüüpi. Selleks, et neid hiiri genereerida, pidin ma tegema alljärgnevat.

#### 1.4 *Neo*-resistentse hiire embrüonaalse feeder rakuliini eraldamine ja mitomütsiin-C töötlemisega rakkude paljunemise blokeerimine

Embrüodoonorina kasutasin transgeenset hiireliini kelle rakud olid resistentsed antibiootikum neomütsiini suhtes. Selleks eraldasid steriilselt laminaar all doonorhiire emakasarvedest 14,5 dpc embrüod. Pesin neid kolm korda PBS's ja asetasin 10 cm Petri tassi. Seejärel eemaldasid embrüotel pead ja kõhuosad (kõik punased organid) ja asetasin nad uuele 10 cm Petri tassile. Siis purustasin embrüokorjused, kasutades pintsette, väikesteks tükkideks

ning panin neile peale 10 ml trüpsiini. Järgnes 10 minutiline inkubeerimine koekultuuri inkubaatoris 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juures. Peale inkubatsiooni suspendeerisin rakke, lisasin veel 5 ml trüpsiini ja inkubeerisin järgmised 10 minutit. Sama kordasin ka kolmandat korda. Peale 30 minutilist trüpsiini töötlust oli moodustunud üksikute rakkude suspensioon. Seejärel peatasin trüpsiini reaktsiooni, lisades Petri tassile 20 ml feeder`i söödet. Tsentrifuugisin rakke 5 min. 190 g, aspireerisin söötme, ning suspendeerisin rakud ülesse 10 ml söötmes. Seejärel külvasin rakud 10 cm Petri tassidele (1 embrüo ühele tassile, st et kui oli 15 embrüot siis ka 15 tassi), panin neile peale 10 ml Feederi söödet ning kasvasin rakud subkonfluentseks (2-3 päeva). Siis passeerisin rakke, suhtega üks viiele ning kasvasin nad uuesti subkonfluentseks (2-3 päeva). Kui rakukultuur oli subkonfluentne, aspireerisin kõikidelt tassidelt söötme, panin neile peale 5 ml värsket söödet, mis sisaldas ka 50 µl mitomütsiin-C`d ( 1mg/ml). Järgnes kahe tunnine inkubatsioon. Seejärel pesin rakke kolm korda PBS`ga, trüpsiinisin nad tassi küljest lahti, tsentrifuugisin, aspireerisin söötme ja suspendeerisin rakud ülesse 0,5 ml feeder raku söötmes ühe 10 cm Petri tassi kohta (kui oli 15 tassi, siis 7,5 ml söötmes). Seejärel lisasin raku suspensioonile võrdse mahu 20% DMSO külmutussegu, ning villisin rakud külmutustuubidesse laiali (üks 10 Petri-tass ühte tuubi), ning tõstsin rakud -80 °C kappi. Kahe päeva möödudes viisin külmutatud rakud üle vedelasse lämmastikku.

## 1.5 Uue tüvirakuliini loomine C57bl/6 hiireliinist ja *WT germ-line* testimine

Tänu oma heale võimele säilitada pluripotentsust on enim kasutatavad ES-rakuliinid 129 geneetilise taustaga. Kõige rohkem uuritud ja nõutud hiire geneetiline taust on aga C57bl/6. Seega viiakse tavaliselt algne mutatsioon 129 tausta, millele järgneb pikk ja palju aega nõudev C57bl/6 geneetilisse tausta tagasi paljundamine (u. 10 põlvkonda). Siit tuligi idee, teha ise uus tüvirakuliin C57Bl/6 hiirest, et meid huvitavaid mutatsioone kohe õigesse geneetilisse tausta saada ja nii väga palju aega võita.

Selleks valmistasin ette mitomütsiiniga arestitud 6 cm feederi tassid. Selleks sulatasin ülesse kaks arestitud feederi külmutustuubi (igas tuubis ühe 10 cm tassi jagu rakke) ja asetasin rakud 10 ml ESM`i (ES-rakkude sööde), tsentrifuugisin 5 min 190 g, aspireerisin söötme, suspendeerisin rakud üles 20 ml ESM`s ja jagasin rakud laiali 3 x 3 ml 6 cm Petri tassi ja ühe 24 koekultuuri plaadi vahel (450 µl ühte auku). Seejärel eraldasin 3,5 dpc hiire emakasarvedest blastotsüsti staadiumis embrüod (vaata 1.11 blastostüstide eraldamine) ning

asetasin embrüod 6 cm Petri tassile, mille põhi oli kaetud juba feeder rakkudega. Kuue päeva möödudes olid osa embrüotest „lõhki kasvanud” ja oli võimalik detekteerida ES-raku kolooniaid. Seejärel pikkisin ära „ilusamad” kolooniad, trüpsiinisin nad üksikute rakkude suspensiooniks ning asetasin nad üksikult 24 auguga koekultuuri plaadile, millele olid juba kinnitunud feederi rakud. Järgnes 5 päevane inkubeerimine ning 10-nest pikitud rakukloonist oli ainult üks korrektse morfoloogiaga. Siis trüpsiinisin selle ainsa klooni tassi põhjast lahti ning tõstsin ta edasi 6 cm Petri tassile, kasvasin rakud subkonfluentseks, ning külmutasin (vaata 1.7 ES-rakkude külmutamine).

Saadud uut rakuliini süstisin ma Balb/c embrüotesse (albiino hiir), et kontrollida, kas nendega on üldse võimalik *germ-line* kimäärset hiirt saada.

## 1.6 W4, R1 ja 1B10/c ES-rakuliinide viimine koekultuuri

Võtsin rakususpensiooni vedelast lämmastikust ja sulatasin selle ülesse (külmutus 1/3 6 cm tassist). Tõstsin suspensiooni 10 ml ESM'i 15 ml tuubi, et neutraliseerida rakkudele toksilist, kuid külmutamiseks hädavajalikku dimetüülsulfoksiidi (DMSO). Seejärel fuugisin rakud tuubi põhja (5 minutit 190 g). Aspireerisin tuubist söötme ning suspendeerisin rakud 3,5 ml ESM's. Seejärel panin rakud 6 cm Petri tassile, mille põhja olid kinnitunud juba mitomütsiiniga arestitud feederi rakud ning asetasin rakud koekultuuri inkubaatorisse 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juurde.

## 1.7 W4, R1 ja 1B10/c ES-rakuliinide külmutamine

Aspireerisin rakkudelt vana söötme, pesin kaks korda PBS'ga ja trüpsiinisin rakud lahti. Seejärel tõstsin rakususpensiooni 10 ml ESM'i 15 ml tsentrifuugituubi ja fuugisin rakud tuubi põhja (5 minutit 190 g). Aspireerisin tuubist söötme ja suspendeerisin rakke jääolnud 1,5 ml ESM'ga (1,5 ml iga 6 cm tassi kohta). Seejärel lisasin suspensioonile võrdse mahu 20% DMSO külmutussegu (lõppkonstratsioon 10%) ning villisin rakud külmutustuubidesse laiali (igasse tuubi 1 ml). Siis tõstsin rakud -70 °C külmutuskappi. Järgmisel päeval panid rakud vedelasse lämmastikku.

## 1.8 Elektroporatsioonid W4, R1 ja 1B10/c ES-rakuliinidesse

Peale ES-rakkude koekultuuri viimist (vaata materjalid ja meetodika 1.6) kasvatasin nad subkonfluentseks. Seejärel passeerisin rakud 6 cm tassilt 10 cm tassile, mille põhja olid kinnitunud juba mitomütsiiniga arestitud feederi rakud, ning kasvatasin rakud uuesti subkonfluentseks (24 tundi). Siis pesin rakke 2 korda PBS'ga ning trüpsiinisin nad tassi küljest lahti üksikute rakkude suspensiooniks, blokeerisin trüpsiini reaktsiooni 10 ml ESM'ga, ning asetasin rakud kümneks minutiks inkubaatorisse. Selle aja jooksul vajuvad feederi rakud tassi põhja (kuna nad on suuremad) ning ES-rakud jäävad rakuksuspensiooni. Peale inkubeerimist eemaldasın tassilt ettevaatlikult suspensiooni, tõstsin selle 15 ml tsentrifuugi tuubi ja fuugisin rakud põhja (5 minutit 190 g). Seejärel aspireerisin söötme, ning suspendeerisin rakud ülesse 0,9 ml ESM's ning panin nad elektroporatsiooni küveti. Lisasin küveti ka konstrukti (0,1 ml 30-40 µg DNA-d). Elektroporeerisin tingimustel, 250 mV ja 500µF. Peale elektroporatsiooni hoidsin rakke 5 minutit jääl ning jagasin rakuksuspensiooni nelja 10 cm Petri tassi vahel ära (10 cm tasside põhja olid kinnitunud juba *neo*-resistentsed feederi rakud). 24 tunni pärast aspireerisin tassidelt söötmed ja panin neile peale 10 ml neomütsiini (250 µg/ml) sisaldavat ESM'i. Söödet vahetasin iga päev. Tavaliselt kestis selektsioon 8-10 päeva, olenevalt rakkude kasvukiirusest.

## 1.9 Individuaalsete ES-rakukolooniate eraldamine

Peale selektsiooni (8-10 päeva) olid elektroporeeritud ES-raku kolooniad piisavalt suured, et neid individuaalselt eraldada ehk pikkida. Selleks valmistasin ma ette a) 96-auguga koekultuuri plaadid, millele olid kinnitunud juba feederi rakud ja b) 96-auguga trüpsiini plaadid (igas augus 30 µl trüpsiini). Seejärel kasutasin automaatpipetti ja koekultuuri mikroskoopi pikkisin üksikshaaval 30-40 kolooniat. Siis asetasin pikitud rakud 5 minutiks koekultuuri inkubaatorisse. Peale inkubatsiooni arestisin trüpsiini reaktsiooni 70 µl ESM'ga, suspendeerisin kolooniad üksikuteks rakkudeks ja tõstsin nad üle feederi plaadile. Seda kõike kordasin seni, kuniks kõik kolooniad said pikitud.

Kolme-nelja päevaga kasvasid rakuklooniid 96 plaadil subkonfluentseks. Siis passeerisin nad kaheks a) külmutusplaadile ja b) analüüsiplaadile. Külmutusplaadil olid eelnevalt kinnitunud feederi rakud ja analüüsiplaati oli töödeldud 0,1 % želatiiniga



(želatiintöötlus on vajalik rakkude kinnitumiseks, selleks panin 96-se plaadi aukudesse paariks minutiks 0,1% želatiini lahust).

Kui külmutusplaat (tavaline 96 auguga koekultuuri plaat) oli subkonfluentseks kavanud (24 tundi), siis aspireerisin kõikidelt plaadil olevatelt kloonidelt söötmed, pesin neid PBS`ga, trüpsiinisin rakud lahti (30µl trüpsiini igasse auku), blokeerisin trüpsiini toime 70 µl ESM`ga ja suspendeerisin kõik kloonid üksikuteks rakkudeks. Siis panin igale ES-raku kloonile peale 100µl 20 % DMSO külmutussegu ning tõstsin plaadi -70 °C külmkappi.

Seejärel trüpsiinisin lahti ka analüüsiplaadil olevad rakukloonid ja tõstsin nad individuaalselt *eppendorf* i tuubidesse ja kirjutasin peale klooni numbri.

## 1.10 W4, R1 ja 1B10/c ES-rakkude injektsiooniks ettevalmistamine

12-24 tundi peale külmutatud rakkude kultuuri viimist, vahetasin ära söötme (pesin rakke kaks korda PBS`ga ja panin neile peale värske söötme). Olenevalt rakkude kasvukiirusest muutus kultuur 3-4 päevaga subkonfluentseks, misjärel passeerisin rakud kolmeks. Selleks aspireerisin vana söötme, pesin rakke PBS`ga ja lisasin trüpsiini. Seejärel inkubeerisin rakke 4-6 minutit 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juures, jälgides, et moodustuks üksikute rakkude suspensioon. Seejärel arestisin trüpsiini toime ESM`ga ja fuugisin rakud tuubi põhja (5 minutit 190g). Aspireerisin tsentrifuugi tuubist söötme, suspendeerisin rakud ESM`s ülesse ning jagasin rakud kolme tassi vahel ära (6 cm Petri tassid), milledele olid kinnitunud juba feederi rakud. Seejärel tõstsin rakud inkubaatorisse ja kasvatasin kultuuri uuesti subkonfluentseks.

Kui rakukultuur oli subkonfluentne (24 h), siis kasutasin neid saamaks kimäärseid hiiri. Selleks tegin rakkudele taas trüpsiinitöötlust, arestisin reaktsiooni ESM`ga ning asetasin tassi kümneks minutiks inkubaatorisse tagasi (kümne minuti jooksul vajuvad feederi rakud tassi põhja ja ES-rakud jäävad suspensiooni). Peale inkubeerimist eemaldasid ettevaatlikult suspensiooni ja panin selle tsentrifuugituubi. Seejärel fuugisin rakud tuubi põhja (5 minutit 190g), aspireerisin söötme, suspendeerisin rakud ülesse 3 ml M2 söötmes ning panin rakud pooleks tunniks külmkappi 8 °C juurde jääle. Selle aja jooksul vajuvad elus ja terved rakud tuubi põhja ja surnud ning vigased jäävad suspensiooni. Seejärel eemaldasid ettevaatlikult 2/3 rakususpensioonist ja astetasin rakud jääle injektsiooni ootama.

### 1.11 3,5 päeva vanuste blastotsüstide eraldamine

C57bl/6 liini hiired surmati tservikaalse dislokatsiooni teel. Puhastasin hiire kõhu 70 % etanooliga. Lõikasin lahti kõhunaha ja seejärel kõhukelme. Puhastasin emakasarved rasvkoest, eraldasid nad ning asetasin Petri tassi kaanele. Seejärel, kasutades 1 ml insuliinisüstalt, loputasin M2-söötmega igast emakasarvest blastotsüstid välja kumera põhjaga alusklaasile (selleks torkasin süstla nõela emakasarve munajuhapoolsest otsast ja loputasin igat sarve 200-300 µl M2'ga). Kumerpõhjaga alusklaas soodustab blastotsüstide kogunemist klaasi keskele ja tänu sellele on neid lihtsam üles leida. Blastotsüstid korjasin alusklaasilt kokku suupipeti klaaskappillaariga, kasutades selleks stereomikroskoopi Zeiss Stemi 1000. Seejärel tõstsin embrüod 35 mm Petri tassile tehtud 70 µl suurustesse M16-söötme tilkadesse parafiinõli alla ja asetasin tassi koekultuuri inkubaatorisse 37 °C ja 5% CO<sub>2</sub> juurde. Tavaliselt sain ühest hiirest 2-4 ilusat blastotsüsti. Superovoleeritud hiirtest aga 10-15 ilusat embrüot.

### 1.12 Injektsioonikambri ettevalmistamine

Injektsioonikambrina kasutasin ma 35 mm Petri tassi kaant, kuhu tegin 100-150 µl suuruse M2-söötme tilga, mille katsin parafiinõliga. Süstimiseks kasutasin stereomikroskoopi Zeiss Axiovert S100. Siis võtsin jäält eelnevalt ettevalmistatud ES-rakud, mis olid M2-söötmes, suspendeerisin ja täitsin nendega 50% injektsioonikambri M2 tilga põhjast, jättes ruumi ka süstitud ja süstimata blastotsüstidele.

### 1.13 ES-rakkude injekteerimine blastotsüsti

Asetasin blastotsüstid injektsioonikambri M2-söötme tilgas sinna, kus polnud ES-rakke. Kasutades mikromanipulaatorit, kogusin süstimisnõela 12-18 ES-rakku. Seejärel võtsin blastotsüstist hoidjanõelaga kinni nii, et tekkis parim võimalus injektsiooninõelaga läbi trofoblasti rakkude embrüosse tungida ja süstisin blastotsööli ES-rakud sisse. Süstitud embrüod kogusin suupipeti klaaskappillaari ja asetasin nad Petri tassile M16-söötme tilka õli alla koekultuuri inkubaatorisse (37 °C ja 5% CO<sub>2</sub>) tagasi. Päevas injekteerisin keskmiselt 16-32 blastotsüsti. Injektsioonikambris olevaid ES-rakke vahetasin iga 20 minuti tagant.

## 1.14 Anesteesia ja analgeesia

Selleks kasutasin – Dormicum`i (valuvaigisti, midazolam 5 mg/ml) ja Hypnorm`i (uinuti, fenüültsitraat 0,315 mg/ml ja fluanison 10 mg/ml). Mõlemad komponendid lahjendasin 1:1 dd H<sub>2</sub>O-ga ja valmistasin uinuti, segades neid võrdses suhtes omavahel kukku. Uinutit süstisin intraperitonaalselt (ühe grammi kehakaalu kohta 6 µl uinutit).

## 1.15 Blastotsüstide tagasisiirdamine emakasarve ja munajuha ampulli

Retsipienthiirtena („võõrasemad”) kasutasin ma B/CBA (C57bl/6 x CBA) ja CD1 hiireliini emaseid vanuses 3-6 kuud. Manipuleeritud embrüote tagasisiirdamiseks on kaks meetodit.

- a) Emakasarve tagasi siirdamine. „Võõrasema” pseudotiinusega 2,5 dpc. Operatsiooniks asetasin narkoosi all oleva hiire stereomikroskoop Zeiss Stemi 2000 alla. Võtsin koekultuuri inkubaatorist M16-söötme tilgast 8-10 blastotsüsti, loputasin neid M2` s ja tõmbasin nad suupipeti klaaskappillaari (võimalikult üksteise ligidale). Seejärel puhastasin 70% etanooliga hiire vasaku (või parema) külje. Lõikasin naha ja kõhukelme lahti selgmiselt, munasarja rasvapadja koha pealt (lõige mitte suurem kui 1 cm). Tõstsin emakasarve kõhuõõnest välja ning kinnitasin munasarja rasvapadjale klambri, et emakasarv kõhuõõnde tagasi ei vajuks. Seejärel, hoides pintsettidega emakasarvest kinni, tegin sellesse insuliinisüstla nõela otsaga pisikese augu, vältides seejuures veresoonte vigastamist. Siirdasin suupipeti klaaskapillaariga läbi selle augu embrüod emakasarve. Eemaldasid klambri rasvapadjalt ja asetasin ettevaatlikult emakasarve kõhuõõnde tagasi. Seejärel õmblesin kinni kõhukelme (1 õmblus) ja naha kinnitasin kirurgilise klambriga. Tõstsin hiired kahe kaupa uude puhtasse puuri operatsioonijärgseks toibumiseks (kahe kaupa selle pärast, et emad aitavad hiljem üksteise poegi toita ja kasvatada). Kuna narkoos põhjustab alajahtumist, katsin hiired soojendamise eesmärgil paberkäterätikuga.
- b) Blastotsüstide tagasisiirdamine munajuha ampulli. Retsipienthiir pseudotiinusega 0,5 dpc. See meetod on eelmisega võrreldes pisut keerulisem. Operatsiooniks kasutasin jällegi stereomikroskoopi Zeiss Stemi 2000. Võtsin koekultuuri inkubaatorist M16-söötme tilgast 8-10 blastotsüsti, loputasin neid M2-es ja tõmbasin nad klaaskapillaari

nii, et embrüod jäid kahe väikese õhumulli vahele (mullid sama suured kui embrüod). Seejärel puhastasin 70% etanooliga hiire vasaku külje (või ka parema). Lõikasin naha ja kõhukelme lahti selgmiselt, munasarja rasvapadja koha pealt (lõige 1 cm). Tõstsin emakasarve kõhuõõnest välja ning kinnitasin munasarja rasvapadjale klambri, et emakasarv kõhuõõnde tagasi ei vajuks. Seejärel lõikasin väga ettevaatlikult läbi munajuha limapauna (bursa), et mitte vigastada veresooni, ega ka munasarja. Siis torkasin suupipeti klaaskapillaari (milles embrüod) infundiibulisse, fikseerisin asendi, hoides pintsettidega kapillaari seal sees, ja siirdasin embrüod munajuhasse. Kui munajuha ampullaarses osas oli peale operatsiooni näha kahte väikest õhumulli, siis oli lõikus 100% õnnestunud. Eemaldas klambri rasvapadjalt ja asetasin ettevaatlikult emakasarve kõhuõõnde tagasi. Seejärel õmblesin kinni kõhukelme (1 õmblus) ja naha kinnitasin kirurgilise klambriga. Tõstsin hiired kahe kaupa uude puhtasse puuri operatsioonijärgseks toibumiseks. Kuna narkoos põhjustab alajahtumist, katsin hiired soojendamise eesmärgil paberkäterätikuga.

## 1.16 Vasektomeerimine

Vasektomeerisin CBA hiireliini isaseid. Operatsiooniks asetasin narkoosi all oleva hiire stereomikroskoop Zeiss Stemi 2000 alla. Puhastasin 70% piiritusega hiire kõhu. Lõikasin naha ja kõhukelme lahti testiste rasvapadjade kohalt (lõige 0,5-1 cm). Seejärel tõstsin välja vasaku testise, et kätte saada seemnejuha. Puhastasin seemnejuha rasvkoest. Kasutades kirurgilist niiti, tegin seemnejuhale kaks ligatuuri (üksteisest 2-3 mm kaugusele) ning lõikasin peale seda seemnejuha läbi kahe sõlme vahelisest alast. Seejärel asetasin ettevaatlikult testise kõhuõõnde tagasi. Sama kordasin ka parema testisega. Siis õmblesin kinni kõhukelme (üks õmblus) ning kõhunaha kinnitasin kirurgilise nahakinnitus klambriga. Tõstsin hiire uude puhtasse puuri ja katsin ta soojendamise eesmärgil paberkäterätikuga. Nädala möödudes eemaldas nahakinnitus klambrid ning testisin saadud vasektomeeritud isaseid, pannes neid kokku emastega. Kuuekümnest vasektomeeritud CBA isasest ei andnud ükski järglasi, kuid kõik nad suutsid emastel hiirtel esile kutsuda pseudotiinust.

## 1.17 Poomil kõndimise test

Väga hea ja tundlik meetod on mõõta hiire koordinatsiooni ja tasakaalu tema võimega ületada kitsaid poome, mis on suletud ja ohututel platvormidel. Poomid koosnevad pikast sirgest pulgast (1m), mis võivad olla nii lamedapõhjalised (diameetriga 5-28 mm) kui ka ümarad (diameetriga 11-28 mm). Pulgad asetatakse horisontaalselt 50 cm kõrgusele karkassile, mille ühes otsas on kitsas avatud platvorm ning teises otsas suletud karp, kuhu hiir saab põgeneda. Starti pannakse ka 2 valgustit (ülesse ja ühele poole). Treeningu käigus pannakse hiired 12mm läbimõõduga lamedale poomile ja treenitakse neid 3 päeva (iga päev 4 korda). Siis kui hiirtel on poomilkõnd selge (st. nad läbivad teekonna kiiremini kui 20 sekundit), algab katse, kus nad peavad ületama kõik eri mõõtu lamedaid ja ümaraid poome. Hiirtel lubatakse poomil olla kuni 60 sekundit. Poomi ületamise aeg ja iga koperdamise/libisemise kord pannakse kirja (Carter *et al.*, 1999).

Poomil kõnni katses kasutati alfa-syn homosügootseid (13tk) ja samast pesakonnast pärit *WT* emaseid hiiri (13tk). Esmalt treeniti hiiri 20 mm läbimõõduga ümmargusel pulgal 3 päeva (iga päev 4 korda). Vahetult enne katset lubati hiirtel veelkordelt harjutada kaks korda 20mm diameetriga ümmargust pulgal, millele järgnes katse 17,5 mm, 14 mm ja 9mm diameetriga ümmargusel pulgal. Katse ajal pandi kirja iga hiire poomi läbimise aeg ja koperdamiste arv. Katset korrati iga kuu aja tagant.

## 2. Tulemused

### 2.1 Alfa-syn „*knock-in*” ES-rakuliini loomine

*WT* tüvirakuliinina kasutati E14.1. ES-rakke. Pikiti 200 rakuklooni, milledest viiel oli toimunud homoloogiline rekombinatsioon. Rekombinatsiooni kontrolliti PCR meetodil. Seejärel valiti nendest viiest välja üks kloon (kolooniade morfoloogia järgi), loeti kromosoomid, ning viidi läbi *cre*-rekombinaasiga LoxP saitide vahelise ala väljalõikamine. Pikiti jällegi 50 kloon, kelledest 6 olid positiivsed, see tähendab, et loxP saitide vaheline ala oli välja lõigatud (rakud valmistati Visgenyx`'s, Kaia Taltsi poolt).

### 2.2. Alfa-syn „*knock-in*” ES-rakkude injektsioonid hiire blastotsüsti

Injektsiooniks valmistasin ette 2 samast elektroporatsioonist pärit alfa-syn „*knock-in*” rakuklooni (1A2, 2C7). Injekteerisin neist igaühega 50 blastotsüsti. Embrüodoonorina kasutasin C57bl/6 hiireliini (must hiir). Retsipient hiireliinina kasutasin B/CBA emaseid. Igasse „võõrasemasse” siirdasin tagasi 8 embrüot. Elussünde sain 30, mis on 30 % süstitud blastotsüstidest. Kimääre sain 1-e rakuklooniga, kokku 13; 3 x 90%isa, 1 x 100%isa 5 x 70%isa, 4 x 20% ema (kimäärsust hindasin silma järgi, mida pruunim seda suurem protsent, kuna E14.1 ES-rakuliin on võetud pruuni värvi 129/Ola hiireliinist). Saadud kimäärseid isaseid paaritasin C57bl/6 emastega, et saada *germ-line* järglast. Üheksast kimäärst andsid germline 8 (v.a 100% kimäär, kes oli suguvõimetu). *Germ-line* järglasi kontrolliti PCR meetodil (kuna ES-rakud on heterosügootsed meie sisse viidud mutatsiooni suhtes, siis ainult pooled sündinud pruuni värvi järglastest on heterosügootid). Saadud heterosügootseid paaritati omavahel. Sündinud homosügootseid ja sama pesakonna *WT* hiiri (kontrolliks, kuna geneetiline taust sama) kasutati käitumiskatsetes. Homosügootseid, heterosügootseid ja *WT* järglasi määrati PCR meetodil.

### 2.3 Beeta-syn „*knock-out*” ES-rakkude loomine

Kuna *WT* tüvirakuliinina otsustasin kasutada W4 ES-rakuliini, mis tahab kasvamiseks ja pluripotentsuse säilitamiseks kinnituda feeder rakkudele, eraldas ja testisin

ma kõigepealt *neo*-resistentsed feederrakud. Seejärel elektroporeerisin ja pikkisin 230 ES-rakuklooni, kellest ühes oli toimunud homoloogiline rekombinatsioon. Rekombinatsiooni kontrolliti PCR meetodil. Saadud rakuklooni elektroporeerisin *cre*-rekombinaasi ekspressiooni konstrukti, et LoxP saitide vahelised järjestused välja lõigata. Pikkisin 50 rakuklooni ning sain kahesuguseid deletante a) 6 konventsionaalset rakuklooni b) 2 konditsionaalset rakuklooni. Saadud rakukloone kontrolliti jällegi PCR meetodil. Kuna prioteediks number üks oli luua beeta-syn „*knock-out*” transgeene hiir, siis injekteeeringi esialgu just konventsionaalseid ES-raku kloone.

## 2.4 Beeta-syn „*knock-out*” ES-rakkude injektsioonid hiire blastotsüsti

Kuna W4 ES-rakuliin pärineb 129 geneetilisest taustast (pruun hiir), siis süstisin neid rakke C57Bl/6 blastotsüstidesse. Injekteerisin kolme rakuklooni (1A2, 1G2, 1C2), igähega 30 embrüot, ning siirdasin süstitud embrüod CD1-e ja B/CBA hiireliini emaste nii munajuhadesse kui ka emakasarvedesse. Elussünde sain 32, kellest suure kimäärsus protsendiga olid 9; 4 x 90% isa, 95% isa, 4 x 80% isa. Need kimäärid sain ma 1A2 rakuklooniga. Saadud kimääre paaritasin C57bl/6 hiireliini emastega, et kontrollida kas meie mutatsiooniga tüvirakud olid idutee arengust osa võtnud. Seitsmest emastega kokku pandud kimäärsest isasest andsid *germ-line* 3 (nelja hiire kohta veel ei tea, kuna töö valmimise ajal ei ole nad veel ühtegi pesakonda järglasi andnud). Saadud *germ-line* hiiri analüüsi PCR meetodil, et teha kindlaks heterosügoote.

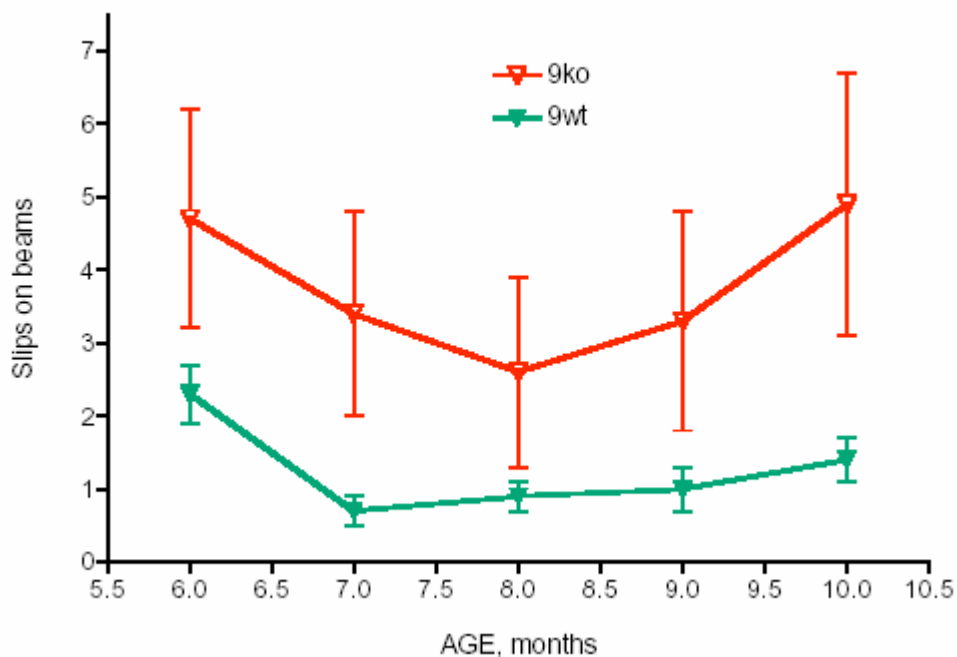
## 2.5 C57bl/6 hiireliinist uue ES-rakuliini loomine

Kümnest pikitud kolooniast oli ainult üks korrektse morfoloogiaga. Saadud klooni süstisin ma Balb/c (valge hiir) blastotsüstidesse, et kontrollida, kas eraldatud rakuliiniga on võimalik *germ-line* kimäärset hiirt genereerida. Süstisin 24 embrüot, sain 8 elussündi, kellest 5 olid kimäärid, kellest omakorda kaks olid 60% ja üks 80-90 % isane (kimäärid olid musta-pruuni-valge kirjud, mida tumedam seda suurem protsent). Kuna uus eraldatud ES-rakuliin oli C57bl/6 geneetilise taustaga, siis paaritasin kimääre C57bl/6 emastega, et kontrollida, kas uus tüvirakuliin on suuteline *germ-line* inkorporeeruma (st. et kõik musta värvi sündivad pojad on *germ-line* järglased ja pruunid on negatiivsed ehk siis *WT*, kuna valge

ja must hiir annavad paaritamisel pruuni järglase). 90% isasel olid 100% järglastest ja 60% isastel pooled pojad musta värvi ehk *germ-line*'d. Seega oli eesmärk täidetud ja edaspidi saab meid huvitavaid mutatsioone otse C57bl/6 taustale viia, pääsedes nii aega ja raha nõudvast tagasipaaritamisest.

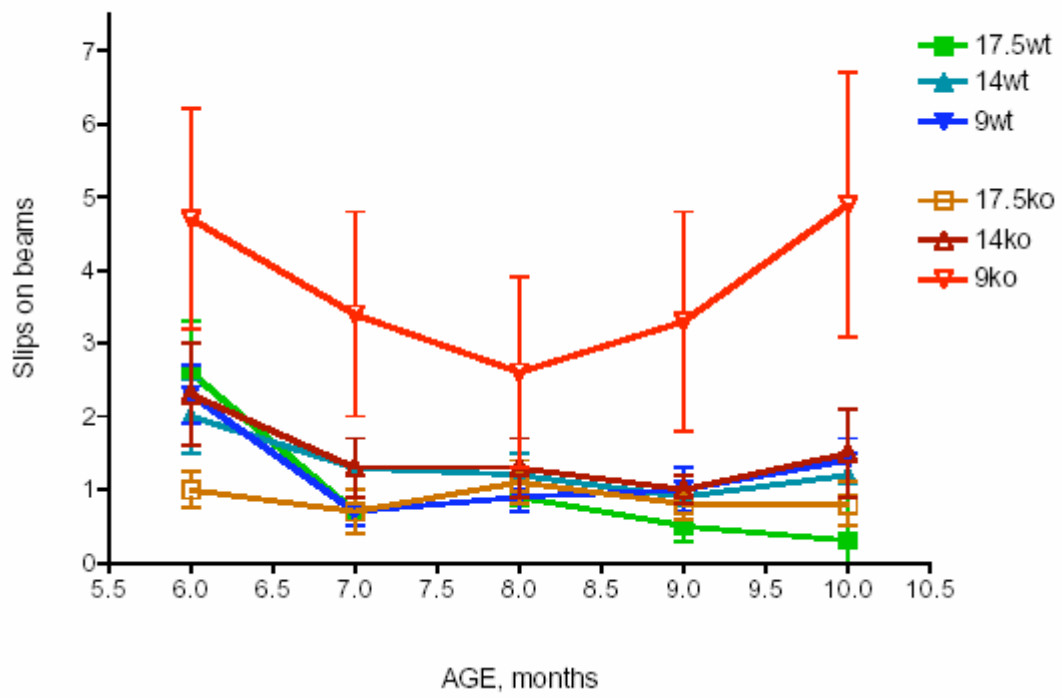
## 2.6. Alfa-syn „*knock-in*” hiirte poomil kõnni käitumiskatse

Poomil kõndimise käitumiskatse viidi läbi Biomedikumis füsioloogia instituudis. Katsetes osales 13 alfa-syn Ala30Pro punktmutatsiooniga homosügootset emast ja samast pesakonnast pärit 13 *WT* emast (kontrollgrupp). Nagu jooniselt näha (joonis 9), koperdavad kümne kuu vanused mutatsned hiired 1m pikkusel ja 9mm läbimõõduga ümmargusel poomil ligi 3,5 korda rohkem kui *WT* hiired. 17,5 mm ja 14 mm läbimõõduga poomil esialgu silmatorkavalt suuri erinevusi ei tulnud (joonis 10).



**Joonis 9.** Poomil kõnni käitumiskatse. Katses kasutati 9mm diameetriga ümmargust 1m pulka. 9ko - 9mm pulgal -/- alfa-syn`i emased. 9wt - 9 mm pulgal wt- metsiktüüp kontroll hiired.





**Joonis 10.** Poomil kõnni katse. Poomid olid ümmargused 17,5mm, 14mm ja 9mm diameetriga. *WT*- metsik tüüp, ko - alfa-syn „*knock-in*”.

### 3. Arutelu

Euroopa Liidu viienda raamprogrammi projekti Neuropark eesmärgiks oli luua uusi hiiremudeleid uurimaks Parkinsoni haigust. Ülesandeks oli genereerida transgeensed hiired, kes imiteeriksid võimalikult täpselt alfa-syn`i agregatsioonist põhjustatud PD patogeneesi. Otsustasime teha kaks, alfa-sünukleiin punktmutatsiooniga „*knock-in*” ja beeta-sünukleiin deletsiooniga „*knock-out*”, transgeenset hiireliini.

Tänapäevaks on tehtud mitu erinevat alfa-syn`i transgeenset mudelit, nagu Ala53Thr ja Ala30Pro ja *WT* alfa-syn`i üleekspresseerivad hiired. Kõik nad omavad PD haigusele fenotüüpi, kuid igaühel neist on ka omad puudused. Inimese *WT* alfa-syn`i üleekspresseerivates hiirtes leiti alfa-syn positiivsed valgukobarad hippokampusest, haistmissibulast, musttuumast ja keharakkudes. Nendel transgeenidel oli häiritud motoorika, ning kadunud olid ka dopamiinergilised neuronid (Masliah *et al.*, 2000). See mudel imiteerib küll PD tõve, kuid tema puuduseks on liiga kiire ja äge haiguse süvenemine. Inimese Ala30Pro alfa-syn`i üleekspresseerivatel hiirtel leiti alfa-syn`i akumulatsioone nii keha- kui ka närvirakkudest, põhjustades progressiivset motoorika muutust ning CNS`i kasvajaid. Motoorne väärtalitlus ei olnud põhjustatud musttuuma dopamiinergilise süsteemi halvenemisega (Gomez-Isa *et al.*, 2003). Samas on näidatud aga otse vastupidist, et nii Ala30Pro kui ka *WT* alfa-syn üleekspresseerivates hiirtes ei arene välja neuroloogilisi kahjustusi (Lee *et al.*, 2002). Kiiret ja progressiivset motoorika väärtalitlust on tähendatud ka inimese Ala53Thr mutantset alfa-syn`i üleekspresseerivates hiirtes, kuid nendest transgeenidest ei leitud ühtegi jälge alfa-syn valgu agregatsioonist (Gispert *et al.*, 2003), erinevalt Lee töögrupi poolt tehtud samast transgeenist, kellel tekkisid musttuuma närvirakkudes alfa-syn`i agregaadid, kuid märgatavat dopamiini taseme langust nad ei täheldanud (Lee *et al.*, 2002).

Nagu näha omavad erinevate töögruppide poolt tehtud transgeenid erinevaid fenotüüpe. Millest see tuleneb? Transgeensete hiireliinide viga ongi see, et nad kõik on erinevad. See tuleneb üleekspresseeritavate geenikoopiate arvust, konstrukti lokaliseerumise asukohast, erinevatest promootoritest ja geneetilisest taustast, kuhu vektor sisestati. Seega ei ole ime, et erinevate töögruppide poolt valmistatud alfa-syn`i transgeenid omavad mittekattuvaid fenotüüpe.

Meie projekti ülesanne oligi genereerida võimalikult täpne PD hiiremudel, kes imiteeriks selle haiguse patogeneesi. Selleks otsustati teha hiire alfa-syn geeni mutatsioon,

mis põhjustas 30 positsioonisalaniini vahetumise proliiniks (Ala30Pro). Et hiiremudel tuleks võimalikult täpne, otsustasime kasutada homoloogilist rekombinatsiooni. Selle tulemusena vahetasime hiires tema *WT* alfa-syn geeni meie valmistatud Ala30Pro mutantse geeniga vastu. Mutatsiooni tegemise asukoht valiti kolmel põhjusel. Esiteks, sarnane mutatsiooni põhjustab inimestel PD. Teiseks, hiires alfa-syn geenis on juba 53 positsioonis treoniin olemas. Kolmandaks arvasime, et see aminohappe vahetus võiks muuta alfa-syn valgu stabiilsemaks, et teda rakus ei degradeeritaks. Nii valmiski transgeene hiir, kelle genoomis oli *WT* alfa-syn lookuses Ala30Pro mutantne alfa-syn geen.

Saadud Ala30Pro „*knock-in*” homosügootseid hiiri uurisime edasi poomil kõndimise käitumiskatsetes. Kuna parkinsonism algab juba väga varajases eas, kuid lööb välja alles siis kui enamus musttuuma dopamiinergilistest rakkudest on hävinenud, arvasime, et ainult poomil kõnni katse näitaks meile noortes hiirtes PD tõvest tingitud varajasi mootorika häireid. Samuti viitavad kirjanduse allikad asjaolule, et poomil kõndimise katse on piisavalt tundlik sedastamaks Parkinsoni tõvele iseloomulikke märkamatuid motoorseid defekte. Selleks kasutasime kolme eri diameetriga ümmargust poomi (17,5 mm, 14mm, 9mm). Tehtud käitumiskatsetest selgus, et mutantseid hiired ei omanud mingit fenotüüpi laiade (17,5mm ja 14 mm) poomide peal, kuid väga suur vahe võrreldes *WT* hiirtega tuli sisse kõige peenema (9mm) poomi peal, mis näitab väga selgelt varajasi PD tõve poolt põhjustatud mootorika häireid. Samas on esialgsete käitumiskatsete põhjal ka näha, et haigus süveneb progressiivselt, iga kuuga suureneb mutantsete hiite keskmine koperdamiste arv. Kui mutantseid hiired koperdasid kuue kuu vanuselt poomil keskmiselt 3 korda, siis kümme kuu vanuselt oli see komistamise arv juba viis, võrreldes *WT* kontroll grupiga, kes libastusid poomil kõndides olenemata vanusest stabiilselt 1-1,5 korda.

Poomil kõnni test näitab, et juba varajases eas tekivad mutantsetel hiirtel kerged mootorika häired, mis ajas vähehaaval süvenevad (st. haiguskulg ei ole äge), täpselt nagu enimlevinud PD juhtudel, kus haigus ilmneb inimestel alles 50-60 aastasel. Juba esimeste käitumiskatsete tulemuste põhjal arvame, et oleme loonud tõenäoliselt tänapäeval maailmas kõige parema ja täpsema hiiremudeli, imiteerimaks alfa-syn`st tingitud PD haigust, olgugi, et me ei ole veel histoloogiliselt tõestanud alfa-syn`i agregaatide olemasolu musttuuma dopamiinergilistes rakkudes. Histoloogia ongi meil käesoleva magistritöö valmimise ajal tegemisel ning üsna pea on oodata ka esialgseid tulemusi.

Koostööprojekti raames oli meie ülesandeks luua ka beeta-sünukleiin „*knock-out*” hiir. On näidatud, et beeta-syn inhibeerib alfa-syn valgu fibrillisatsiooni *in-vitro*. Veelgi enam, kui omavahel ristata beeta-syn`i ja mutantseid Ala53Thr või Ala39Pro alfa-syn`i

üleekspresserivaid hiiri, siis järglastel ei esine Parkinsoni tõvele iseloomulikke fenotüüpe (motoorika häiritus, valgu kobarad, dopaminergiliste neuronite kadu). Beeta-syn inhibeerib *in-vivo* ka *WT* alfa-syn`i fibrillisatsiooni (Park & Lansbury 2003). On teada, et agregeerunud alfa-syn seondub 19S subühiku S6`komponendile 26S poteosoomis ja inhibeerib nii ubikvitiinist sõltuvat kui ka sõltumatut proteosomaalset degradatsiooni. Samas on näidatud, et beeta-syn konkureerib S6`komponendiga sidumaks alfa-syn valku, mis näitab, et beeta-syn käitub kui alfa-syn`i negatiivne regulaator (Snyder *et al.*, 2005). Arvatakse, et beeta-syn`i kaitsemehhanism agregeerunud alfa-syn`i vastu võib käia ka läbi (PI3-K/Akt) signaaliraja. Agregeerunud alfa-syn põhjustab beeta-syn`i seondumise Akt`ga, mis fosfolüeerib Mdm2 (proonkogeen), kes omakorda siirdub tuuma. Tuumas seondub ta p53`ga ning inhibeerib tema apoptootilist aktiivsust, lubades sel teel rakul edasi elada (Hashimoto *et al.*, 2004).

Sellest tuligi meil idee, luua beeta-syn „*kncok-out*” hiir, et teada saada, kas selle geeni puudumine võimendab *WT* alfa-syn`i agregatsiooni ja PD väljakujunemist. Plaanis on tekitada ka topeltnutandid, ristates omavahel beeta-syn „*knock-out*” ja alfa-syn Ala30Pro „*knock-in*” hiiri, et uurida, kas beeta-syn valgu puudumine kiirendab PD väljakujunemist. Samas võime ka omavahel võrrelda topeltnutandi ja alfa-syn Ala30Pro punktmutatsiooniga hiirte PD väljakujunemise kiirust, mille põhjal saame teada, kas beeta-syn inhibeerib mingil määral ka Ala30Pro mutantse alfa-syn valgu agregatsiooni. Käesoleva magistritöö kirjutamise ajal on meil olemas beeta-syn heterosügootsed hiired, seega esialgseid käitumiskatsete tulemusi on oodata umbes aasta pärast.

Need kaks väga head Parkinsoni haiguse mudelsüsteemi aitavad meil paremini mõista PD haiguse patogeneesi. Arvan ka, et need hiireliinid muutuvad maailma PD uurijate seas ülipopulaarseks ja aitavad neil palju küsimusi lahendada. Samas saab neid hiiri kasutada ka uute ravimite väljatöötamiseks ja testimiseks, leidmaks uusi medikamente, maailmas teise enimlevinud neurodegeneratiivse tõve, parkinsonismi vastu.

## Kokkuvõte

Maailmas teine enimlevinud neurodegeneratiivne haigus on parkinsonism. Selle tõve sümptomiteks on kontrollimatu võbelemine, lihaste jäikus, keha reflekside kontrollimatus ja liigutuste aeglus. Patoloogiliselt hävinevad Parkinsoni tõve puhul dopamiinergilised neuronid *substantia nigra pars compacta*’s mida kajastab dopamiini vähenemine striatumis, rikkudes ära juttkeha funktsiooni. Neurodegeneratsiooniga kaasneb dopamiinergilistes neuronites Lewy kehade formuleerumine, mis peamiselt koosnevad agregeerunud alfa-syn valgust.

Kasutades uusi biotehnoloogilisi võimalusi, nagu transgeenne tehnoloogia, on võimalik biomeditsiinile valmistada asendamatuid mudelorganisme, uurimaks erinevate haiguste patogeneesi. Kirjanduse ülevaates kirjeldatakse põhjalikult alfa- ja beeta-sünukleiini rolli parkinsonismi väljakujunemises ning antakse kokkuvõtlik ülevaade Parkin, Pink-1, DJ-1 ja UCHL1 geenidest, millede olevad mutatsioonid põhjustavad samuti PD haiguse väljakujunemise.

Eksperimentaalses töös valmistati alfa-syn Ala30Pro punktmutatsiooniga „*knock-in*” ja beeta-syn deletsiooniga „*knock-out*” hiired, kasutades embrüonaalseid tüvirakke. Seejärel viidi homosügootsete alfa-syn transgeensete hiirtega läbi poomil kõndimise käitumiskatse, et uurida parkinsonismist tingitud varajasi motoorika häireid. Suur vahe, võrreldes *WT* hiirtega, tekkis kõige peenema (9mm) poomi peal. Mutantsed hiired komistasid kuue kuu vanuselt poomil keskmiselt 3 korda ning kümne kuu vanuselt oli komistamiste arv juba viis. *WT* kontroll grupi hiired komistasid 9mm diameetriga poomil olenemata vanusest stabiilselt 1-1,5 korda. See näitab väga selgelt varajasi PD tõve poolt põhjustatud motoorika kahjustusi. Samas on esialgsete käitumiskatsete tulemuste põhjal näha, et haigus süveneb progressiivselt, iga kuuga suureneb mutantsete hiite keskmine komistamiste arv.

On näidatud, et beeta-syn inhibeerib nii *in-vitro* kui ka *in-vivo* alfa-syn`i agregatsiooni. Sellepärast ongi meil tulevikus plaanis tekitada topeltmutandid, ristates omavahel beeta-syn deletsiooniga ja alfa-syn Ala30Pro punktmutatsiooniga hiiri, et uurida, kas beeta-syn valgu puudumine kiirendab PD väljakujunemist. Lisaks saame topeltmutantide pealt teada, kas beeta-syn on võimeline inhibeerima ka mutantse Ala30Pro alfa-syn`i agregatsiooni.

Need uued PD mudelorganismid on hetkel maailmas ainulaadsed ja aitavad meil välja selgitada alfa-syn`i agregatsioonist tingitud PD täpset patogeneesi.

## SUMMARY

The 2nd most common neurodegenerative disease in the world is Parkinson disorder (PD). Symptoms for this disease are uncontrollable shaking, muscle rigidity, uncontrollability of bodily reflexes and slow movement. In case of Parkinsonism, dopaminergic neurons get destroyed in substantia nigra pars compacta which is manifested in decreasing levels of dopamine in striatum and brain stem, so disabling normal functions of extrapyramidal system. Neurodegeneration coincides with formation of Lewy bodies in dopaminergic neurons which consist mainly of aggregated alpha-syn protein.

New opportunities in biotechnology, *such* as transgenic technology, enable us to produce model organisms which are irreplaceable in research into pathogenesis of diseases. In literature overview, the role of alpha and beta synuclein in PD is thoroughly described, and overview is given about Parkin, Pink-1, DJ-1 and UCHL1 genes. Mutations in these genes also contribute to development of PD disease.

In the experimental phase of the dissertation, alpha-syn Ala30Pro knock-in mice and beta-syn knock-out mice were created, using embryonic stem cells. Then, a behavioral test on balance beam was conducted with homozygotic alpha-syn mice to test for early signs of locomotor deficits, characteristic for PD. Compared to WT mice, the biggest difference occurred on the narrowest (9mm) beam. The mutant mice slipped on beam 3 times as average at the age of 6 months, and 5 times at the age of 10 months. WT mice slipped on beam on average of 1-1.5 times, regardless of their age. This shows clearly early deficit in the locomotor performance of alpha syn mutant mice. Such deficit is thought to be similar to locomotor disabilities caused by the PD disease. It also shows the progressive nature of the disease – mutant mice stumble more often as they grow older.

It has been showed that beta-syn inhibits both *in vitro* and *in vivo* the aggregation of alpha-syn. That is why we intend to create double mutants by crossbreeding of beta-syn knock-out mice with alpha-syn knock-in mice to establish if the lack of beta-syn protein accelerates the progress of PD. Also, we will know from the double mutants if beta-syn is able to inhibit the aggregation of mutant Ala30Pro alpha-syn.

These new transgenic models for PD are unique in the world at the moment and will enable us to establish the exact pathogenesis of PD.

## TÄNUAVALDUSED

Käesoleva magistritöö valmimisele on kaasa aidanud väga paljud toredad inimesed. Eriti suured tänud tahaks öelda juhendajale Sulev Kõksile, OÜ Visgenyx`i töötajatele ja Tartu Ülikooli biomeedikumi füsioloogia instituudi laborirahvale. Suured tänud ka Arengubioloogia labori inimestele, eesotsas Martin Kärnerile.

## Kasutatud kirjandus

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, H. W., Castillo, E. P. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **25**, 239-252.

Betarbet, R., Sherer, B. T., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, V. A., Greenamyre, T. J. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **3**, 1301-1306.

Carter, J. R., Lione, A. L., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, P. G., Dancette, B. S., Morton, J. A. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *The Journal of Neuroscience*, **19** (8), 3248-3257.

Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, C. A., Goodchild, R., Larsen, E. K., Staal, R., Tiev, K., Schmitz, Y., Yuan, A. C., Rocha, M., Jackson-Lewis, V., Hersch, S., Sulzer, D., Przedborski, S., Burke, R., Heu, R. (2002). Resistance of alpha-synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 14524-14529.

Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, S. M. (2002). Alpha-synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* **4**, 160-164.

Gispert, S., Del, D. T., Garrett, L., Chen, A., Bernard, J. D., Hamm-Clement, J. (2003). Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neural dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol Cell Neurosci* **24**, 419-429.

Glaser, B. C., Yamin, G., Uversky, N. V., Fink, L. A. (2005). Methionine oxidation,  $\alpha$ -synuclein and Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1703**, 157-169



Golts, N., Snyder, H., Frasier, M., Theisler, C., Choi, P., Wolozin, B. (2002). Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *The Journal of Biological Chemistry* **277** (18), 16116-16129.

Gomez-Isla, T., Irizarry, C. M., Mariash, A., Cheung, B., Soto, O., Schrupp, S. (2003). Motor dysfunction and gliosis with preserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. *Neurobiol Aging* **24**, 245-248.

Gomez-Santos, C., Ferrer, I., Reiriz, J., Vinals, F., Barrachina, M., Ambrosio, S. (2002). MPP<sup>+</sup> increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res* **935**, 32-39.

Hashimoto, M., Hsu, J. L., Rockenstein, E., Takenouchi, T., Mallory, M., Masliah, E. (2002). Alpha-synuclein protects against oxidative stress via inactivation of the c-Jun N-terminal kinase stress-signaling pathway in neuronal cells. *J Biol Chem* **277**, 11465-11472.

Hoshimoto, M., Bar-on, P., Ho, G., Takenouchi, T., Rockenstein, E., Grews, L., Masliah, E. (2004). B-synuclein regulates Akt activity in neuronal cells. *The Journal of Biological Chemistry* **279** (22), 23622-23629.

Hsu, J. L., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M. (2000). Alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol* **157**, 401-410.

Hurtig, I. H., Trojanowski, Q. J., Galvin, J., Ewbank, D., Schmidt, L. M., Lee, M. V. (2000). Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* **54**, 1916-1921.

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

Jensen, J. P., Alter, J. B., O'Malley, L. K. (2003). Alpha-synuclein protects naive but not dbcAMP-treated dopaminergic cell types from 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity. *J Neurochem* **86**, 196-209.

- Junn, E., Mouradian, M, M. (2002). Human alpha-synuclein over-expressed increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neurosci Lett* **320**, 146-150
- Kahle, J, P., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A. (2000). Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci* **20**, 6365-6373.
- Kalivendi, V, S., Cunningha, S., Kotamraju, S., Joseph, J., Hillard, J, C., Kalyanaraman, B. (2004). Alpha-synuclein up-regulation and aggregation during MPP<sup>+</sup> induced apoptosis in neuroblastoma cells: intermediacy of transferrin receptor iron and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **279**, 15240-15247.
- Kanda, S., Bishop, F, J., Eglitis, A, M., Yang, Y., Mouradian, M, M. (2000). Enhanced vulnerability to oxidative stress by alpha-synuclein mutations and C-terminal truncation. *Neuroscience* **97**, 279-284.
- Kholodilov, G, N., Neyestat, M., Oo, F, T., Lo, E, S., Larsen, E, K., Sulzer, D. (1999). Increased expression of rat synuclein in the substantia nigra pars compacta identified by mRNA differential display in a model of developmental target injury. *J Neurochem* **73**, 2586-2599.
- Kirik, D., Annett, E, L., Burger, C., Muzycka, N., Mandel, J, R., Bjorklund, A. (2003). Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 2884-2889.
- Klein, L, R., King, A, M., Hamby, E, M., Meyer, M, E. (2002). Dopaminergic cell loss induced human A30P alpha-synuclein gene transfer to the rat substantia nigra. *Hum Gene Ther* **13**, 605-612.
- Kowall, W, N., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, F, M., Mckee, C, A., Farrante, J, R. (2000). MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* **11**, 211-213.

Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, M, A., Sirvio, J., Thomas, H, J., Nass, R. (2003). Dopaminergic neural loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* **86**, 165-172.

Lee, J, F., Liu, F., Pristupa, B, Z., Niznik, B, H. (2001). Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* **15**, 916-926.

Lee, J, H., Shin, Y, S., Choi, C., Lee., H, Y., Lee, J, S. (2002). Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells expressed to mitochondrial inhibitors. *J Biol Chem* **277**, 5411-5417.

Lee, K, M., Stirling, W., Xu, Y., Xu, X., Qui, D., Mandir, S, A., Dawson, M, T., Copeland, G, N., Jenkins, A, N., Price, L, D. (2002). Human  $\alpha$ -synuclein-harboring familial Parkinson`s disease-linked Ala53Thr mutation causes neurodegenerative disease with  $\alpha$ -synuclein aggregation in transgenic mice. *PNAS* **99** (13), 8968-8973.

Lehmensiek, V., Tan, M, E., Schwarz, J., Stroch, A. (2002). Expression of human alpha-synuclein enhances dopamine transporter-mediated MPP<sup>+</sup> toxicity in vitro. *Neuroreport* **13**, 1279-1283.

Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M, J., Jonnalagada, S., Chernove, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P, J., Wilkinson, K., Polymeropoulos, M, H. (1998). The ubiquitin pathway in parkinson`s disease. *Nature* **395**, 451-452.

Li, J., Zhu, M., Rajamani, S., Uversky, N, V., Fink, L, A. (2004). Rifampicin inhibits  $\alpha$ -synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chemistry & Biology* vol **11**, 1513-1521.

Lincoln, S., Vaughan, J., Wood, N., Baker, M., Adamson, J., Gwinn-Hardy, K., Lynch, T., Hardy, J., Farrer, M. (1999). Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase gene in familial Parkinson`s disease. *Neuroreport* **10**, 427-429.

Manning-Bog, B. A., McCormack, L. A., Purisai, G. M., Bolin, M. L., Di Monte, A. D. (2003). Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci* **23**, 3095-3099.

Maroteaux, L., Campanelli, T. J., Scheller, H. R. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* **8**, 2804-2815.

Masliah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implication for neurodegenerative disorders. *Science* **287**, 1265-1269.

Norris, H. E., Giason, I. B., Hodanra, R., Xui, S., Trojanowskii, Q. J., Ischiropoulos, H., Leei, Y. M. V. (2005). Reversible inhibition of  $\alpha$ -synuclein fibrillization by dopaminochrome mediated conformational alternations *JBC Papers in Press*, 2005 Manuscript M412621200

Oluwatosin-Chigbu, Y., Robbins, A., Scott, W. C., Arriza, L. J., Reid, D. J., Zysk, R. J. (2003). Parkin suppress wild-type alpha-synuclein-induced toxicity in SHSY-5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* **309**, 679-684.

Osterova-Golts, L., Petrucelli, L., Hardy, J., Lee, M. J., Farer, M., Wolozin, B. (2000). The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *J Neurosci* **20**, 6048-6054.

Park, YJ., Lansbury, T. P. (2003). B-synuclein inhibits formation of  $\alpha$ -synuclein protofibrils: A possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry* **42**, 3696-3700.

Perrin, J. R., Woods, S. W., Clayton, F. D., George, M. J. (2000). Interaction of human alpha-synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J Bio Chem* **275**, 34393-34398.

Recchia, A., Debetto, P., Negro, A., Guidolin, D., Skaper, D.S., Giusti, P. (2004).  $\alpha$ -Synuclein and Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, vol **18**, 617-626.

Saigoh, K., Wang, Y.-L., Suh, J.-G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T., Wada, K. (1999). Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nature Genet*, **23**, 47-51.

Seo, H. J., Rah, C. J., Choi, H. S., Shin, K. J., Min, K., Kim, S. H. (2002). Alphasynuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PL3/Akt kinase pathway. *FASEB J* **16**, 1826-1828.

Shandelman, S., Jonanson, A., Martinat, C., Leete, T., Abliovic, A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperon that inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregate formation.

Sherer, B. T., Betarbet, R., Stout, K. A., Lund, S., Baptista, M., Panov, V. A. (2002) An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci* **22**, 7006-7015.

Shimura, H., Schlossmacher, G. M., Hattori, N., Frosch, P. M., Trockenbacher, A., Schneider, R. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* **293**, 263-269.

Shin, Y., Klucken, J., Patterson, C., Hyman, T. B., McLean, J. P. (2005). The cochaperone CHIP mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteosomal and lysosomal pathways. *JBC Papers in Press*, Published on April 21 2005 as Manuscript M503326200.

Snyder, H., Mensah, K., Hsu, C., Hashimoto, M., Surgucheva, I. G., Festoff, B., Surguchov, A., Masliah, E., Matouschek, A., Wolozin, B. (2005). B-synuclein reduces proteosomal inhibition by alpha-synuclein but not gamma-synuclein. *J Biol Chem* **280** (9), 7562-7569.

Stefanis, L., Larsen, E. K., Rideout, J. H., Sulzer, D., Greene, A. L. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alternations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci* **21**, 9549-9560.

Stefanova, N., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, K. G., Reindl, M. (2001). Glial cell death induced by overexpression of alpha-synuclein. *J Neurosci Res* **65**, 432-438.

Sung, Y. J., Kim, J., Paik, R. S., Park, H. J., Ahn, S. Y., Chung, C. K. (2001). Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem* **276**, 27441-27448.

Zarranz, J. J., Alegre, J., Gomez-Esteban, C. J., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* **55**, 164-173.

Zhou, W., Hurlbert, S. M., Schaack, J., Prasad, N. K., Freed, R. C. (2000). Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells. *Brain Res* **866**, 33-43.

Zhou, W., Schaack, J., Zawada, M. W., Freed, R. C. (2002). Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in primary human mesencephalic culture. *Brain Res* **926**, 42-50.

Zigmond, J. M., Hastings, G. T., Perez, G. R. (2002). Increased dopamine turnover after partial loss of dopaminergic neurons: compensation or toxicity?. *Parkinson Relat Disord* **8**, 389-393.

Tabrizi, J. S., Orth, M., Wilkinson, M. J., Taanman, W. J., Warner, T., Cooper, M. J. (2000). Expression of mutant alpha-synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. *Hum Mol Genet* **9**, 2683-2689.

Thiruchelvam, J. M., Powers, M. J., Cory-Slechta, A. D., Richfield, K. E. (2004). Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice. *Eur J Neurosci* **19**, 845-854.

Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Lwai, A., Yoshimoto, M. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11282-11286.

Valente, M, E., Abou-Steiman, M, P., Caupito, V., Muqit, K, M, M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Turco, D, D., Bentivoglio, R, A., Healy, G, D., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzales-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, P, W., Latchman, S, D., Harvey, J, R., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, W, N. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* vol **304**, 1158-1160.

Webb, L, J., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, N, J., Rubinsztein, C, D. (2003) Alpha-synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* **278**, 25009-25013.

Vila, M., Vukosavic, S., Jackson-Lewis, V., Neystat, M., Jakowee, M., Przedborski, S. (2000). Alpha-synuclein upregulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP. *J Neurochem* **74**, 721-729.

Xu, J., Kao, Y, S., Lee, J, F., Song, W., Jin, W, L., Yanker, A, B. (2002). Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* **8**, 600-6006.

Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R., Lu, B. (2003). Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* vol **37**, 911-924.