

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Proteomveränderungen im ventralen Mittelhirn und Großhirn  
durch Knockout von Exon 3 des Parkin-Gens (PARK2)  
bei der Maus (Stamm 129/Sv)

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Motz  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. J. Klose  
2. Prof. Dr. M. Schülke-Gerstenfeld  
3. Prof. Dr. rer. nat. H. Lehrach

Datum der Promotion: 20. November 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
A.1	Klinik des M. Parkinson .....	1
A.1.1	Syndrom .....	1
A.1.2	Epidemiologie .....	2
A.1.3	Prognose .....	2
A.2	Pathogenese – der neurodegenerative Prozess und seine Ursachen .....	3
A.2.1	Histopathologie .....	3
A.2.2	Pathophysiologie .....	3
A.2.3	Molekularbiologie und Pathobiochemie des idiopathischen M. Parkinson .....	4
A.2.3.1	Mitochondriale Dysfunktion .....	4
A.2.3.2	Oxidativer Stress .....	5
A.2.3.3	Proteolytischer Stress .....	6
A.2.3.4	Neuroinflammation .....	7
A.2.3.5	Exzitotoxizität .....	7
A.2.3.6	Einige Interaktionsvarianten zwischen den involvierten Pathomechanismen .....	8
A.2.4	Genetische Faktoren .....	8
A.2.4.1	Monogenetische Vererbung .....	8
A.2.4.2	Die Rolle genetischer Faktoren beim sporadischen M. Parkinson .....	9
A.3	Tiermodelle des M. Parkinson .....	10
A.3.1	Substanzinduzierte Tiermodelle des M. Parkinson .....	10
A.3.2	Parkinsonmodelle mit genetisch veränderten Tieren .....	11
A.4	Ableitung einer Aufgabenstellung .....	12
A.5	Parkin und M. Parkinson .....	13
A.5.1	Autosomal rezessive juvenile Parkinsonerkrankung .....	14
A.5.2	Parkinbedingter M. Parkinson .....	14
A.5.3	Parkin – Mutationen .....	14
A.5.4	Parkin – das Protein und seine mutmaßliche Funktion .....	15
A.5.5	Parkin-Knockout-Tiermodelle .....	17
<b>B</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
B.1	Probenmaterialien - Versuchstiere und Gewebe .....	19
B.2	Probenaufarbeitung .....	19
B.3	Zweidimensionale Großgel-Elektrophorese .....	21
B.3.1	Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung .....	21
B.3.1.1	Reagenzien und Durchführung .....	22
B.3.2	Zweite Dimension – Großgel-Elektrophorese .....	25
B.3.2.1	Reagenzien und Durchführung .....	25
B.3.3	Silberfärbung .....	27

B.3.3.1	Reagenzien und Durchführung der analytischen Silberfärbung.....	27
B.3.3.2	Reagenzien und Durchführung der präparativen Silberfärbung.....	28
B.4	Bildauswertung.....	28
B.4.1	Visuelle Bildauswertung.....	29
B.4.2	Bildauswertung mit Proteomweaver.....	29
B.5	Statistische Testung.....	31
B.5.1	Kandidatenspot-Ermittlung.....	31
B.5.2	Testung der Kandidatenspot-Volumenänderungen.....	31
B.6	Proteinidentifikation.....	32
B.6.1	Picken.....	32
B.6.2	MS.....	32
B.6.2.1	Prinzip der MALDI TOF Massenspektrometrie.....	33
B.6.2.2	Durchführung der MALDI TOF Massenspektrometrie.....	33
B.6.2.3	Auswertung der Massenspektren der MALDI TOF Massenspektrometrie.....	34
B.6.2.4	Prinzip der ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie.....	35
B.6.2.5	Durchführung der ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie.....	35
B.6.2.6	Auswertung der Massenspektren der ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie.....	36
B.6.3	Datenbank-Recherche zur Charakterisierung identifizierter Proteine.....	36
<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
C.1	2D-Großgel-Analyse.....	38
C.1.1	2D-Großgel-Analyse des ventralen Mittelhirns.....	39
C.1.2	2D-Großgel-Analyse des Großhirns.....	43
C.2	Proteinidentifizierung.....	47
C.3	Ergebnis der Proteomanalyse von ventralem Mittelhirn und Großhirn.....	50
C.4	Identifizierte Proteine – Vorkommen, Eigenschaften und Funktion.....	51
C.4.1	Peroxiredoxin 1 (M1, C1) und 2 (M2) – Eigenschaften, Formen und Funktion.....	52
C.4.2	Lasp-1 (M4).....	52
C.4.3	CytochromC-Oxidase, Untereinheit Vb (M5).....	53
C.4.4	Glyoxalase 1 (C2).....	53
C.4.5	Complexin 2 (C4).....	54
C.4.6	Similar to DKFZp566K1924 Protein (C5).....	54
C.4.7	RIKEN cDNA 1200015A19 (C6).....	54
<b>D</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
D.1	Molekularbiologische Interpretation der Proteomveränderungen bei Parkin-Knockout im Hinblick auf die Pathobiochemie des M. Parkinson.....	55
D.1.1	Mitochondriale Dysfunktion.....	55
D.1.1.1	CytochromC-Oxidase-Untereinheit Vb.....	56
D.1.2	Oxidativer Stress.....	56

D.1.2.1	Peroxiredoxine 1 und 2 .....	57
D.1.2.2	Glyoxalase 1.....	58
D.1.3	Keine Evidenz für proteolytischen Stress und Aggregation.....	59
D.1.4	Keine Evidenz für Neuroinflammation.....	60
D.2	Gestörte Neurotransmission - Differentielle Expression synaptisch lokalisierter Proteine.....	60
D.2.1	Complexin 2 .....	61
D.2.2	Lasp-1.....	62
D.2.3	Serinracemase – Tendenz zur Spotvolumensteigerung (p=0,059).....	64
D.3	Bestätigung der Ergebnisse der Proteomanalyse durch andere Methoden – Störung mitochondrialer, antioxidativer und synaptischer Funktion im vorliegenden Modell.....	65
D.4	Die Parkinfunktion auf zellulärer Ebene – Rückschlüsse aus Proteomanalyse, Pathophysiologie, Biochemie und Histologie des Parkin-Knockouts .....	66
D.4.1	Veränderungen der synaptischen Transmission bei Parkin-Knockout – Synthese der Beobachtungen an verschiedenen Exon-3-Knockout- Modellen.....	66
D.4.2	Wie führt der Parkinverlust zum Phänotyp? .....	68
D.4.2.1	Interaktionen zwischen den vom Knockout beeinflussten Funktionssystemen.....	68
D.4.2.2	Wie führt ein Ubiquitylierungsdefizit zu den beobachteten Veränderungen?.....	69
D.4.2.3	These 1: Führt der Parkinverlust primär zu einer mitochondrialen Funktionsstörung? .....	70
D.4.2.4	These 2: Führt der Parkinverlust primär zu einem antioxidativen Defizit? .....	71
D.4.2.5	These 3: Führt der Parkinverlust primär zu einer synaptischen Funktionsstörung? .....	71
D.4.2.6	Proteasomunabhängige Funktionsregulation durch Monoubiquitylierung.....	72
D.5	Die Genese einzelner klinischer und neuropathologischer Merkmale der Parkinsonerkrankung - Rückschlüsse aus proteasomalen und pathophysiologischen Veränderungen im Modell.....	73
D.5.1	Kognitive Defizite bei M. Parkinson durch Lasp-1 und Complexin 2?.....	73
D.5.2	Dopaminerge Hyperaktivität und Exzitotoxizität aufgrund verstärkter glutamaterger Stimulation, verursacht durch Complexin 2 oder Serinracemase? .....	74
D.5.3	Exzitotoxizität durch Atmungskettendefizit .....	76
D.5.4	Rückschlüsse auf die Genese einzelner Aspekte der parkinbedingten Parkinsonerkrankung.....	76
D.6	Interpretation der Spotveränderungen bzgl. ihrer Lokalisation in ventralem Mittelhirn bzw. Großhirn.....	77

D.7	Berücksichtigung der Einflüsse von Proteinnetzwerken und <i>molecular crowding</i> .....	80
D.8	Evaluation des Modells .....	80
D.8.1	Validität bzgl. der humanen Parkinsonerkrankung .....	80
D.8.2	Vergleich mit anderen Parkin-Knockouts .....	81
D.8.3	Die Relevanz des Modells .....	82
D.9	Evaluation der Methode im Hinblick auf die gewählte Fragestellung.....	84
D.10	Ausblick .....	84
<b>E</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>87</b>
<b>F</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>89</b>
F.1	Literaturverzeichnis.....	89
F.2	Lebenslauf.....	97
F.3	Publikationsliste .....	98
F.4	Danksagung .....	99
F.5	Eidesstattliche Erklärung.....	100
F.6	Tendenzen zur Volumenänderung .....	101
F.6.1	Serinracemase – Tendenz zur Volumensteigerung von Spot F1 ( $5\% \leq \alpha \leq 10\%$ ).....	102

## A Einleitung

Der M. Parkinson ist eine schwere, degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems mit motorischer, vegetativer und psychischer Dysfunktion. Die motorischen Kardinalsymptome wurden 1817 von James Parkinson in seinem Essay über die *Shaking Palsy* (Schüttellähmung, *Paralysis agitans*) erstmals beschrieben und werden als **Parkinson-Syndrom** zusammengefasst: Rigor, Tremor, Hypo- und Bradykinese. Für die neurodegenerative Erkrankung sind die Termini **Morbus Parkinson** bzw. im englischsprachigen Raum *Parkinson's disease* und dessen Akronym *PD* gebräuchlich.

Die Erkrankung ist von hoher epidemiologischer Relevanz und die bisherigen Therapieoptionen sind unbefriedigend. Um zu langfristig wirksamen, kurativen Therapieansätzen zu gelangen, ist ein besseres Verständnis der Pathomechanismen nötig.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zum Verständnis der Pathomechanismen bei M. Parkinson beizutragen. Zu diesem Zweck wird mit den Methoden der Proteomik ein genetisches Modell der Parkinson-Erkrankung untersucht (Parkin-Knockout am Mausstamm 129/Sv). Mittels 2D-Großgelelektrophorese, softwaregestützter Bildauswertung, statistischer Testung und Massenspektrometrie werden Proteomveränderungen in zwei Hirnregionen analysiert.

Der Terminus **Proteom** wurde in den neunziger Jahren geprägt, in Anlehnung an die Wortschöpfung Genom. Entsprechend bezeichnet er die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus. [1] Allerdings stellt das Proteom im Gegensatz zum Genom ein in seiner Zusammensetzung höchst dynamisches System dar. So wird es zum einen durch Genom und Gewebeart, zum anderen aber durch inkonstante Faktoren wie Entwicklungsstadium, äußere Einwirkungen etc. bedingt. Daher muss obige Definition um die Dimension der Zeit erweitert werden: Es handelt sich um die Gesamtheit der Proteine zu einem gegebenen Zeitpunkt.

### A.1 Klinik des M. Parkinson

#### A.1.1 Syndrom

Erst nach Untergang von mehr als 80% der dopaminergen Zellen treten die motorischen Kardinalsymptome **Rigor, Ruhetremor, Brady- und Hypokinese** auf. Entscheidende, die Prognose beeinträchtigende Faktoren sind posturale Instabilität und Gangunsicherheit sowie

Schluckstörung. Bradykinese und die sogenannte Anlaufhemmung bedingen motorische Sprechstörung und Amimie, die zur sozialen Isolation beitragen. [2]

Neben motorischer Symptomatik bestehen **neuropsychiatrische Störungen und vegetative Dysfunktion**. Letztere beinhaltet u.a. orthostatische Hypotension, Harninkontinenz, Obstipation, sexuelle Dysfunktion, Hyperhidrosis und Hypersalivation. Die neuropsychiatrische Symptomatik umfasst Depression (40%), Demenz (30%), Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit, Dyssomnie, Tagesmüdigkeit und Schmerzsymptomatik. [2]

### A.1.2 Epidemiologie

Der M. Parkinson ist die **zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung** nach der Alzheimer-Demenz. [3] Es handelt sich um eine klassische **Erkrankung des höheren Lebensalters**. Die **Prävalenz** wird allgemein mit 200/100.000 angegeben; zwischen dem 65. und 85. Lebensjahr steigt sie exponentiell. [4] So sind mehr als 1% der 65-Jährigen und 10% der über 80-Jährigen betroffen. Daher wird die epidemiologische Relevanz der Erkrankung mit steigender Lebenserwartung der Bevölkerung weiter zunehmen.

Da in der Mehrzahl der Fälle chronischer Parkinsonerkrankung weder eine klare exogene Verursachung festzustellen ist, noch Vererbung gemäß Mendelschen Regeln, geht man derzeit von einer **multifaktoriellen Genese** aus.

Der **primäre, sporadische M. Parkinson mit spätem Krankheitsbeginn** ist der klassische **Erkrankungstyp**; er macht mehr als 90% der Fälle aus [5]. Daneben kommen familiäre und sekundäre Fälle sowie solche mit frühem Krankheitsbeginn vor. Der familiäre M. Parkinson macht 5-10% der Erkrankungen aus. [6]

### A.1.3 Prognose

Zwar sind viele *Symptome* des M. Parkinson therapierbar, jedoch ist die Erkrankung bisher **nicht heilbar**. Ebenso wenig gelingt es bisher, ihr Fortschreiten aufzuhalten. Man geht von einem kontinuierlichen Verlust von ca. 10% der dopaminergen Neuronen *per annum* aus. [2]

Die **lebenslange, symptomatische** pharmakologische Therapie zielt im Wesentlichen auf Ausgleich der Transmitterdysbalance. Nach einigen Jahren verliert die spezifische Therapie ihre Wirksamkeit, und sowohl Erkrankung als auch **Therapiekomplicationen** schränken die Lebensqualität erheblich ein. Es resultiert eine **schwere körperliche, geistige und seelische Behinderung**. Fall *et al.* finden die **Mortalitätsrate** von Parkinsonpatienten in einer



prospektiven Studie ca. 1,5-fach erhöht. Eine wesentliche Rolle spielen hier Sturz und Aspiration im Rahmen der motorischen Dysfunktion. [7]

## A.2 Pathogenese – der neurodegenerative Prozess und seine Ursachen

Die molekularbiologischen Ursachen und Auslöser des sporadischen M. Parkinson sind nicht geklärt. Es scheint sich um eine heterogene Gruppe von Faktoren zu handeln, die einzeln oder in Kombination zur bekannten gemeinsamen Endstrecke führen.

### A.2.1 Histopathologie

Das histopathologische Bild prägen intraneuronale, zytoplasmatische Einschlusskörper und Neuronenverlust.

Die **neuronale Degeneration** erfasst selektiv bestimmte Neuronenpopulationen, jedoch beschränkt sie sich nicht auf den viel zitierten nigralen Zellverlust mit makroskopischer Depigmentierung. Im Gegenteil sind zuerst andere Kerngebiete des Hirnstamms und zuletzt der gesamte Neocortex von pathologischen Veränderungen betroffen. [8]

Die typischen zytoplasmatischen Einschlusskörperchen, sogenannte **Lewykorpuskel** oder *Lewy bodies*, wurden 1912 von Friederich Lewy erstmals beschrieben. Die Bedeutung der proteinhaltigen Inklusionen ist ungeklärt. Neuere molekularbiologische Erkenntnisse lassen vermuten, die Sequestrierung von Proteinen könne gar dem Schutz der Zelle dienen. [8, 9]

### A.2.2 Pathophysiologie

Beim M. Parkinson gehen im zentralen Nervensystem selektiv monoaminerge und cholinerge Nervenzellen zugrunde, u.a. dopaminerge Neuronen der Substantia nigra. [10]

Der motorische Symptomenkomplex wird im Wesentlichen auf die Schädigung der **Substantia nigra** zurückgeführt, in deren **Pars compacta** im Laufe der Erkrankung zunehmend **dopaminerge Neuronen** zugrunde gehen. Über D2-Rezeptoren inhibieren diese physiologischerweise die Erregung von *medium sized spiny neurons*, den gabaergen Projektionsneuronen des Striatums, die die glutamatergen kortikalen Impulse empfangen. Cholinerge striatale Interneurone *fördern* dagegen die Aktivität der *medium sized spiny neurons*. Durch die Dopaminverarmung des Striatums überwiegt die cholinerge, exzitatorische

Komponente der Aktivitätsmodulation, was zu den **extrapyramidal motorischen** Symptomen führt. [10]

Welche pathophysiologischen Mechanismen den vegetativen bzw. neuropsychiatrischen Symptomen zugrunde liegen, ist weitgehend unklar. Es existieren Thesen, wonach die Demenz vorrangig durch die cholinerge Degeneration hervorgerufen wird, Aufmerksamkeitsdefizite durch Mangel an Noradrenalin und Depression durch ein serotonerges Defizit. [10]

### **A.2.3 Molekularbiologie und Pathobiochemie des idiopathischen M. Parkinson**

In der aktuellen Literatur herrscht weitgehende Übereinstimmung über die pathogenetische **Relevanz oxidativen Stresses, mitochondrialer Funktionseinschränkung und proteolytischen Stresses**: Beobachtet werden erhöhte Marker oxidativen Stresses, ein mitochondriales Komplex-I-Defizit und Auffälligkeiten im proteolytischen System. Weniger belegt ist die Bedeutung von Neuroinflammation, Apoptose und glutamaterger Exzitotoxizität. [2, 11] Die besondere Vulnerabilität dopaminergener Neuronen gegen bestimmte Einflüsse, so gegen oxidativen Stress und mitochondriale Störungen, wird als Erklärung für die Selektivität der Zellschädigung bei M. Parkinson angeführt. [12]

Im Folgenden wird deutlich, dass die einzelnen Veränderungen sich gegenseitig bedingen. Es mag *eine* kausale Kette bestehen oder ein *Circulus vitiosus*, am wahrscheinlichsten ist jedoch eine **multifaktorielle Genese**, in der verschiedene Phänomene auf *eine* gemeinsame Endstrecke konvergieren.

#### **A.2.3.1 Mitochondriale Dysfunktion**

**MPTP**, ein selektiver Inhibitor des Komplex I dopaminergener Neuronen (*vide* A.3.1), führt reproduzierbar zu einem akuten Parkinsonsyndrom. [13] Die Komplex-I-Inhibition verursacht gesteigerte Superoxidbildung, setzt das mitochondriale Membranpotential herab und führt so zu oxidativem Stress und Apoptose. [14]

Während MPTP kein verbreitetes Umweltgift darstellt, könnte ein anderer potenter Komplex-I-Inhibitor, das Pestizid **Rotenon**, von epidemiologischer Relevanz sein. In Ratten ruft die Applikation entscheidende Parkinsonkriterien hervor. Auch andere, schwache mitochondriale Inhibitoren sollen selektiv toxisch auf das dopaminerge System wirken, so z.B. Tetrahydroisoquinoline und  $\beta$ -Carboline.

So geht man von einer **besonderen Vulnerabilität dopaminerger Neuronen gegen mitochondriale Störungen** aus. Möglicherweise spielt hier die Inhibition der mitochondrialen Funktion durch Addukte aus Dopamin und GSH eine Rolle. [15] Vermutlich sind Individuen mit *vorbestehender* mitochondrialer Störung besonders vulnerabel gegen weitere Toxine. In der Tat zeigen Patienten mit sporadischem M. Parkinson eine nigrale Komplex-I-Defizienz. [15]

#### A.2.3.2 Oxidativer Stress

Mittlerweile besteht kein Zweifel, dass eine positive Korrelation zwischen Parkinsonerkrankung und erhöhtem oxidativen Stress besteht. Die Frage ist derzeit, durch welche Mechanismen er in den Schädigungsprozess eingreift und an welcher Stelle er in einer etwaigen pathogenetischen Sequenz steht. [15]

Oxidativer Stress führt zur chemischen Veränderung wichtiger Moleküle, u.a. zu vermehrter **Lipidperoxidation, Proteincarbonylierung und DNA-Oxidation**. [15]

Viele Indizien sprechen für **reaktive Stickstoffverbindungen** als Agentien des oxidativen Stresses. Diese **inhibieren Komplex I und IV** sowie die **GSH-Reduktase**. Stickstoffmonoxid (**NO**) kann über Expressionserhöhung bzw. -verminderung von Ferritin- und Transferrinrezeptor den **Eisenstoffwechsel** stören und zu erhöhten intrazellulären Eisenkonzentrationen führen, wie sie in der Substantia nigra von Parkinsonpatienten nachgewiesen werden. Stickoxid (NO) reagiert weiterhin mit Superoxid zu Peroxynitrit, das selbst als Oxidans wirkt, aber auch weiter zu hochreaktiven Hydroxylradikalen ( $\cdot$ HO) zerfällt. Es resultieren DNA- und Proteinnitrierung. Die **Nitrosylierung von Proteinen** beeinflusst deren Funktionsfähigkeit. **DNA-Nitrosylierung** führt durch Einzelstrangbrüche zur Aktivierung der Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP) mit NAD<sup>+</sup>-Depletion und Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der Zelle. [15]

Das Ausmaß oxidativen Stresses wird häufig über die Glutathion-Konzentration oder die Ratio GSH/GSSG abgeschätzt. Diese sind bei M. Parkinson vermindert. Betrachtet man die *incidental Lewy body disease* (ILBD) als präsymptomatisches Stadium, so geht das GSH-Defizit den Veränderungen von Eisenkonzentration und Komplex I voraus. [16] Da Synthese und Reduktion nicht gestört sind, deutet dies auf einen **primären oxidativen Schaden**, der jedoch weder mitochondrial noch durch Eisenüberladung bedingt ist. [15]

Die erwähnten Formen und Folgen oxidativen Stresses treffen nun auf ein besonders prädisponiertes Gewebe: Bereits beim Gesunden ist die **Substantia nigra** in höherem Maße oxidativem Stress ausgesetzt als andere Hirnregionen. Dies wird auf den **hohen Eisengehalt** der Substantia nigra und den **Dopaminstoffwechsel** zurückgeführt. [15]

Beim Dopaminstoffwechsel entstehen reaktionsfreudige Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Superoxidradikal ( $O_2^-$ ). [17] In Anwesenheit von Eisen wird in der Fenton-Reaktion  $H_2O_2$  zum Hydroxylradikal (HO) umgewandelt, das seinerseits hochreaktiv und toxisch ist. [15] Dadurch wird vermehrt Glutathion (GSH), das als Reduktionsmittel für oxidierte Moleküle dient, zu GSSG oxidiert. Wenn sich so das Gleichgewicht *zuungunsten* des reduzierenden Agens verschiebt, ist das Kompensationspotential gegen weiteren oxidativen Stress gemindert.

So mögen Dopaminstoffwechsel und hoher Eisengehalt die *selektive Vulnerabilität* der Substantia nigra gegenüber einigen Toxinen erklären, die die Bildung **freier Radikale** fördern, wie beispielsweise 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) und MPTP. [15]

Tatsächlich führt Injektion von Eisenionen ( $FeCl_3$ ) in die Substantia nigra der Ratte zu einem ähnlichen Bild wie die akute 6-OHDA-Intoxikation [18], und die **Eisenkonzentration** der Substantia nigra ist **bei M. Parkinson** noch über das ohnehin hohe Maß der gesunden Substantia nigra hinaus erhöht. [19] Und in der Tat ist die **GSH-Konzentration** der Substantia von Parkinsonpatienten erniedrigt. [15] *Protektiv* scheinen dagegen Überexpression der humanen Superoxiddismutase (SOD1) sowie Knockout der neuronalen NO-Synthase (nNOS) zu wirken; sie vermitteln im Tiermodell *Resistenz* gegen MPTP-Toxizität. [20]

### A.2.3.3 Proteolytischer Stress

Das *ubiquitin-proteasome system* (UPS) besorgt die Proteolyse mutierter, **geschädigter** und fehlerhaft gefalteter intrazellulärer **Proteine** und reguliert die Konzentration kurzlebiger Proteine, die beispielsweise **Gentranskription und Neurotransmission** beeinflussen. Das 20S- und 26S-Proteasom sind komplexe, polyheteromere, multikatalytische Enzyme mit Proteaseaktivität, wobei letzteres auf das ATP-abhängige Ubiquitylierungssystem angewiesen ist. [21] **Proteolytischer Stress** ist ein Zustand, in dem die Menge abzubauen der Proteine die Proteolysekapazitäten der Zelle übersteigt. Er kann hervorgerufen werden durch übermäßigen Anfall solcher Proteine und/oder inadäquate Funktion des proteasomalen Systems. Proteolytischer Stress führt zu Proteinakkumulation und -aggregation in unlöslichen Einschlüssen. Er stört die zelluläre Homöostase und kann Apoptose induzieren. Gegenspieler dieser Prozesse sind u.a. *heat shock proteins*, kleine Chaperone. [21]

Unter den pathogenetischen Erklärungsansätzen der Parkinsonerkrankung erhielt das Konzept des proteolytischen Stresses breitere Aufmerksamkeit, als mehrere identifizierte **genetische Defekte** in dieser Richtung interpretiert werden konnten:  $\alpha$ -Synuclein-Mutationen führen zu

fehlerhafter Faltung und Aggregation in Lewykorpuskeln. Fehlen von Parkin, einer E3-Ubiquitin-Ligase, beeinträchtigt *in vitro* die Proteolyse einzelner ubiquitylierungspflichtiger Proteine. Durch ein Funktionsdefizit von UCH-L1 wird Ubiquitin nicht in ausreichendem Maße zurückgewonnen. [22]

Auch beim **sporadischen M. Parkinson** wurden strukturelle und funktionelle Defekte im UPS festgestellt: McNaught *et al.* fanden in Substantia-nigra-Homogenaten die verschiedenen proteolytischen Aktivitäten des 20S-Proteasoms um mehr als 40% vermindert sowie verringerte Konzentrationen der  $\alpha$ -Untereinheiten und der Aktivatoren PA28 und PA700. [21]

#### A.2.3.4 Neuroinflammation

Neuroinflammation ist nicht parkinsonspezifisch, sondern tritt bei einer Reihe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems auf, so u.a. bei M. Alzheimer.

Hirnschnitte von Parkinsonpatienten zeigen neben der dopaminergen Pathologie eine auffällige gliale Reaktion mit erhöhten Zytokinkonzentrationen und **erhöhter Expression von** inflammationsassoziierten Genen, so für **COX-2** und **induzierbare NOS (iNOS)**. [5]

COX-2 wird vor allem in Neuronen exprimiert und wirkt proinflammatorisch und zytotoxisch. [5] Hemmung der COX-2 erwies sich in Tiermodellen als protektiv. So verzögert Aspiringabe bei MPTP-intoxikierten Mäusen die Dopamindepletion und COX-2-Knockout bietet einen gewissen Schutz vor MPTP-induziertem Zelltod. [5] Die induzierbare NO-Synthase führt durch Stickoxidproduktion zu den unter A.2.3.2 beschriebenen oxidativen Schäden.

#### A.2.3.5 Exzitotoxizität

Exzitotoxizität ist ein etablierter Auslöser von Neurodegeneration. Eine Relevanz bei M. Parkinson wird aufgrund folgender zwei Mechanismen postuliert:

Zum einen empfangen die dopaminergen Neuronen reichlich glutamaterge Afferenzen aus Cortex und Nucleus subthalamicus, die über sogenannte „**starke Exzitotoxizität**“ zumindest zur *Progression* der Degeneration beitragen könnten. Denn der Nucleus subthalamicus wird durch dopaminergen Zellverlust disinhibiert und Läsionen dieses Kerns schützen vor 6-OHDA-Toxizität. [23]

Zum anderen mag das evidente **mitochondriale Defizit** über ATP-Mangel die physiologische, ATP-abhängige Blockade der NMDA-Rezeptoren durch Magnesium beeinträchtigen. Entsprechend dem Konzept der „**schwachen Exzitotoxizität**“ würden dadurch die NMDA-

Rezeptoren von unverhältnismäßig niedrigen Glutamatkonzentrationen aktiviert. Das dabei massiv ins Zytosol einströmende Kalzium aktiviert wiederum die NO-Synthase und kann so zu den unter A.2.3.2 beschriebenen oxidativen Schäden inklusive weiterer mitochondrialer Hemmung führen.

#### **A.2.3.6 Einige Interaktionsvarianten zwischen den involvierten Pathomechanismen**

**Oxidativer Stress** wirkt sich auf die Funktion des 26S-Proteasoms aus. GSH-Depletion vermindert die ubiquitinabhängige Proteolyse oxidierter und nitrierter Proteine. HNE, ein Produkt der Lipidperoxidation, hemmt die Prozessierung ubiquitylierter Proteine. Möglicherweise stellt die Oxidation von Proteinen ein Hindernis für deren Ubiquitylierung dar. [15] Reaktive Stickstoffverbindungen führen zum einen zu Komplex-I und -IV-Inhibierung und zum anderen über DNA-Einzelstrangbrüche PARP-Aktivierung zur NAD<sup>+</sup>-Depletion.

Eine **Funktionsstörung des 26S-Proteasoms** führt zu oxidativem und nitrativem Stress. So findet man nach Applikation von Lactacystin, einem proteasomalen Inhibitor, erhöhte Konzentrationen von carbonylierten Proteinen, Lipidperoxiden und 3-Nitrotyrosin. [15]

**Mitochondriale Malfunktion** dagegen resultiert in ATP-Mangel und kann so das 26S-Proteasom hemmen; denn PA700-Aktivator und Ubiquitylierungssystem arbeiten ATP-abhängig. Bei Hemmung von Komplex I fällt vermehrt Superoxidradikal an. [15]

### **A.2.4 Genetische Faktoren**

#### **A.2.4.1 Monogenetische Vererbung**

Der familiäre M. Parkinson macht 5-10% der Fälle aus und weist teilweise Mendelsche Vererbungsmuster auf. Bisher wurden zwölf Loci zugewiesen, wobei in sieben Fällen das entsprechende Gen mit krankheitsverursachenden Mutationen identifiziert wurde. Die verschiedenen Loci unterscheiden sich bzgl. assoziiertem Vererbungsmuster, Symptomatik, Progression, Manifestationsalter, Therapieansprechen und Neuropathologie.

**Tabelle 1: Mit der Parkinsonerkrankung assoziierte Gene und Loci**

Gen	Locus	Modus	Assoziation mit sporadischem PD	Protein und Funktion
SNCA	PARK1/4 (4q21)	dom	Promoter-polymorphismen	$\alpha$ -Synuclein: DA-Transmission, synaptische Vesikeldynamik
PRKN	PARK2 (6q25.2-27)	rez	Promoter-polymorphismen	Parkin: Ubiquitin-E3-Ligase
UCHL1	PARK5 (4p14)			UCHL1
PINK1	PARK6 (1p35-36)	rez	unbekannt	PINK1: mitochondriale Kinase
DJ1	PARK7 (1p36)	rez	unbekannt	DJ1: oxidative stress response
LRRK2	PARK8 (12p11.2-q13.1)	dom	G2385R	Dardarin: Proteinkinase
n P-type ATPase gene	PARK9			neuronal P-type ATPase
	PARK3 (2p13)			
	PARK10 (1p)			
	PARK11 (2q36-37)			
	PARK12 (Xq21-25)			

**Legende:** dom = dominant, rez = rezessiv

**Quellen:** OMIM at [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov); Hardy, J., et al., Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol*, 2006. 60(4): p. 389-98; Zimprich, A., et al., Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 2004. 44(4): p. 601-7.

Von **epidemiologischer Relevanz** sind nach bisherigen Erkenntnissen nur Parkin-Mutationen (PARK2, ca. 50% der autosomal rezessiv vererbten Erkrankungen mit frühem Beginn, 18% der isolierten *early-onset* Fälle [24] [*vide* A.2.4.2]), das DJ-1-Gen (PARK7, zweithäufigster Gendefekt in Verbindung mit autosomal rezessivem M. Parkinson [3]) und fraglich LRRK2/Dardarin (PARK8, >10% in bestimmten ethnischen Gruppen [25]).

#### **A.2.4.2 Die Rolle genetischer Faktoren beim sporadischen M. Parkinson**

Epidemiologisch bedeutsamer ist der typische, sporadische M. Parkinson, der mehr als 90% der Erkrankungen ausmacht. [5] Doch auch hier gilt die positive Familienanamnese als Hauptrisikofaktor neben dem Alter. [13] Mittlerweile haben Zwillingsstudien sowie mehrere populationsbezogene Studien eine genetische Komponente auch für den sogenannten sporadischen M. Parkinson nachgewiesen. [26-28] Früher Krankheitsbeginn korreliert mit stärkerer genetischer Belastung, während späte Manifestation eher dem klassischen, idiopathischen Typus entspricht. Daher unterteilt man nach dem Manifestationsalter in *juvenile onset* (<21 Jahre) [29], *early onset* (<45 Jahre) [24] und *late onset* (>50 Jahre) [13].

Erwähnenswert ist eine großangelegte isländische Studie: Sie nutzt die genealogische Datenbank dieser genetisch isolierten Population, um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen 772 Parkinsonpatienten und zwischen den Kontrollen zu untersuchen. Es bestand eine signifikant höhere Verwandtschaftswahrscheinlichkeit unter den Erkrankten, selbst für sporadischen *late-onset* M. Parkinson. Das ermittelte Erkrankungsrisiko war 6,7-fach erhöht für Geschwister von Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung, 3,2-fach für Kinder und 2,7-fach für Neffen und Nichten von Erkrankten. [28]

Man postuliert neben monogenetischer Vererbung daher die Existenz von *susceptibility genes*, die zur Erkrankung prädisponieren. *Linkage analyses* ergaben bei allerdings widersprüchlicher Studienlage folgende Kandidaten: **PARK10** [28] sowie Marker auf den **Chromosomen 2 und X**. [27]

### **A.3 Tiermodelle des M. Parkinson**

Die Parkinsonforschung bedient sich im Wesentlichen chemisch und -seit einigen Jahren- genetisch manipulierter Tiermodelle.

Die Güte eines Modells wird an seiner Ähnlichkeit zum Vorbild gemessen. So wird von desto höherer Relevanz der pathogenetischen Erkenntnisse ausgegangen, je näher die Tierart dem Menschen phylogenetisch steht. Von einem idealen Parkinsonmodell wird gefordert, die entscheidenden Aspekte und Symptome der menschlichen Erkrankung zu rekapitulieren: motorische Kardinalsymptome wie Rigor, Tremor und Hypokinese sowie gebeugte Haltung, histopathologische Kennzeichen wie altersabhängigen, progressiven und selektiven Untergang dopaminergener Neuronen und lewykorpuskelähnliche zytoplasmatische Einschlüsse. [30] Keines der verlässlich reproduzierbaren Parkinsonmodelle wird diesen Forderungen bisher gerecht.

#### **A.3.1 Substanzinduzierte Tiermodelle des M. Parkinson**

Die meisten substanzinduzierten Modelle erzeugen, im Unterschied zur humanen Erkrankung, *akute* Parkinsonsyndrome, so Reserpin, Metamphetamin, 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), Paraquat-Maneb, Rotenon und 3-Nitrotyrosin. Häufig gesunden die Versuchstiere bald nach Absetzen der Behandlung, so bei MPTP. Zu Neurodegeneration führen dagegen **6-OHDA**, Paraquat und 3-Nitrotyrosin. 6-OHDA wirkt spezifisch neurotoxisch auf katecholaminerge Systeme. [31]



**MPTP**, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin, ursprünglich Kontaminante einer Designerdroge, findet breite Verwendung zur experimentellen Auslösung eines Parkinson-Syndroms. [13] Nach systemischer Applikation wird es an aminergen Synapsen durch Monoaminoxidase B in seinen toxischen Metaboliten 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) umgewandelt und von dopaminergen Neuronen selektiv via Dopaminwiederaufnahmeweg aufgenommen. Als Kation akkumuliert es in den Mitochondrien, mit einem mehr als hundertfachen Konzentrationsgradienten. [13] Die spezifische Komplex-I-Inhibition verursacht gesteigerte Superoxidbildung, setzt das mitochondriale Membranpotential herab und führt so zu oxidativem Stress und Apoptose. [14]

Das Pestizid **Rotenon** inhibiert nach systemischer Applikation den mitochondrialen Komplex I im gesamten Hirn. [31] Bei chronischer Exposition von Ratten soll es dennoch zu einer selektiven, progressiven Degeneration des nigrostriatalen Systems kommen, inklusive oxidativer Schädigung und ubiquitin- sowie  $\alpha$ -synucleinpositiver Einschlüsse mit Lewykorpuskel-Morphologie. Auch Hypokinese, Haltungsanomalien und Rigor seien vorhanden. Dieses Modell scheint also einige wichtige Aspekte des M. Parkinson zu rekapitulieren, insbesondere auch die Chronizität. Allerdings mangelt es an reproduzierbarer Dosis-Wirkungs-Beziehung.

### **A.3.2 Parkinsonmodelle mit genetisch veränderten Tieren**

Während das klassische, toxisch-substanzinduzierte Parkinsonmodell eine akute Erkrankung auslöst, imitieren genetisch manipulierte Modelle besser die Chronizität der Erkrankung. Es sind *knock-out*- und transgene Modelle an Drosophila und Mäusen publiziert. Man manipulierte zum einen Gene, die Dopaminstoffwechsel und -transmission beeinflussen oder im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, und erzeugte Tyrosinhydroxylase-, Nurr1- und D2-Rezeptor-Mangel. [30] Zum anderen nutzte man Gene, die mit humanem M. Parkinson und anderen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, wie das  $\alpha$ -Synuclein-Gen, das Parkin-Gen, das UCH-L1-Gen, das Tau-Gen, das Nurr1-Gen. [30, 32]

Die genetisch manipulierten Modelle zeigen im Allgemeinen eine wenig eindrückliche **Klinik**; es kommen Hypoaktivität und lokomotorische Dysfunktion vor. In wenigen Modellen kommt es zu dopaminergem Zellverlust und  $\alpha$ -Synuclein-positiven Einschlüssen. [30, 32]

#### A.4 Ableitung einer Aufgabenstellung

Zwar sind die gegenwärtigen Therapieoptionen zweifellos eine Errungenschaft, gerade im Vergleich mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer und Chorea Huntington; jedoch ist aufgrund von **therapierefraktären Symptomen, sekundärem Therapieversagen und schwerwiegenden Komplikationen** die Prognose unbefriedigend. Langfristiger Erfolg ist nur von Therapien zu erwarten, die die Progression der Erkrankung beeinflussen; daher ist es essentiell, die **Pathogenese** der Parkinsonerkrankung zu klären.

Mit der Parkinsonerkrankung werden vorrangig Veränderungen folgender Bereiche assoziiert: **ubiquitylierendes proteasomales System, oxidativer Stress, mitochondriale Defizienz und Neuroinflammation**. Unklar ist bisher, welche Relevanz die einzelnen Pathomechanismen besitzen.

Die Parkinsonforschung verfolgt die verschiedenen pathogenetischen Fährten mit jeweils spezialisierten Methoden. Zur optimalen Nutzung der stetig zunehmenden Datenmenge ist ihre Vernetzung notwendig: die Revision einzelner Thesen bzgl. ihrer Relevanz sowie ihre **Integration in ein Konzept**.

Eine solche Orientierung kann die **Proteomik** bieten. Methodisch repräsentiert sie den geforderten breiten, vernetzten Ansatz: Das Blickfeld ist nicht auf vorab aufgestellte Hypothesen eingengt, sondern es bietet sich die Chance, unvoreingenommen Tausende von Proteinen eines Organs zu einem bestimmten Zeitpunkt zu überblicken. Damit werden gleichzeitig Teile aller oben genannten Systeme erfasst. So kann zum einen akkumulierendes Wissen integriert werden; zum anderen ist es möglich, neue *targets* für weitere, gezielte Untersuchungen zu liefern.

Die Basis der Proteomanalyse ist die 2D-Gelelektrophorese (2D-GE). Allerdings sind Untersuchungen von **menschlichen Proben** gerade mittels 2D-GE kaum sinnvoll. Aufgrund von Polymorphismen und einer Vielzahl unkontrollierbarer Einflüsse sähe man unzählige Veränderungen in Proteinquantität und elektrophoretischer Mobilität, sodass sehr hohe Fallzahlen nötig wären, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Das wiederum verbietet der hohe Arbeitsaufwand der Methode.

Eine Untersuchung von **Zellkulturen** dagegen ist aus ähnlichen Gründen nicht sinnvoll. Hier betrachtet man stör anfällige Systeme, deren Zustandsbilder kaum reproduzierbar sind, wenn man nicht *eine* Variable beobachtet, sondern einen großen Teil aller Proteine des Systems.

**Tiermodelle** eignen sich dagegen gut zur Proteomanalyse und Untersuchung komplexer Pathomechanismen. Für den M. Parkinson existieren zwei Typen von Tiermodellen. Die substanzinduzierten Parkinsonmodelle sind überwiegend akute Modelle mit meist reversiblen Schäden, und die verwendeten Substanzen scheinen epidemiologisch kaum eine Rolle für die humane Erkrankung zu spielen.

In **genetisch erzeugten** Modellen dagegen wirkt *ein* pathogener Faktor langfristig. Die **Chronizität** entspricht dem typischen M. Parkinson, die monokausale Genese dagegen ist eher untypisch. Was die Symptomatik angeht, erzielten die genetischen Säugetiermodelle bisher kaum überzeugende Ergebnisse. Dennoch sind die genetischen Modelle interessante Studienobjekte: Der kausale Faktor ist beim Menschen **erwiesenermaßen** pathogenetisch relevant, während die Auslösung der menschlichen Erkrankung durch etwaige Umweltgifte nur in Einzelfällen eindeutig belegt ist. Wenn dieser **humanpathogene Faktor** auch kein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium im Versuchstier hervorruft, so mögen die Veränderungen dennoch den **präklinischen Vorgängen** im Menschen ähneln.

Für die vorliegende Arbeit wurden **Parkin-Knockout-Mäuse** der Arbeitsgruppe Jie Shen, Harvard University, Boston, Massachusetts, USA, bezogen. Für diese Wahl sprach zum einen die Tatsache, dass die Parkinmutation unter den bei Versuchsbeginn bekannten Mutationen die größte epidemiologische Bedeutung besaß. Zum anderen erkrankten Patienten mit homozygoter Parkin-Mutation frühzeitig: Dies ließ darauf hoffen, dass die Versuchstiere trotz ihrer kurzen Lebenszeit eine Pathologie entwickeln. Die Untersuchung eines Parkin-Knockouts schien auch insofern besonders lohnend, als die Proteomanalyse die Relevanz mutmaßlicher Parkin-Substrate *in vivo* bestätigen bzw. weitere Substratkandidaten hervorbringen kann: Bei Verlust der E3-Ubiquitinligase-Aktivität von Parkin sollten durch gestörten proteasomalen Abbau *in vivo* relevante Substrate spezifisch akkumulieren.

So bietet ein Parkin-Knockout-Modell die Möglichkeit, sowohl allgemeinen pathogenetischen Mechanismen als auch dieser speziellen Fragestellung nachzugehen, bei der die methodischen Vorteile der 2D-GE besonders zum Tragen kommen. Von einem proteomischen Screening war insbesondere eine richtungweisende Funktion für weitere Untersuchungen zu erwarten.

## **A.5 Parkin und M. Parkinson**

Aufgrund der oben dargelegten Wahl eines Parkin-Knockout-Mausmodells zur Untersuchung pathogenetischer Zusammenhänge bei M. Parkinson durch Proteomanalyse soll im Folgenden

der aktuelle Stand der Forschung zu Parkin und seiner Rolle in der Parkinsonerkrankung rekapituliert werden.

### **A.5.1 Autosomal rezessive juvenile Parkinsonerkrankung**

Die autosomal rezessive juvenile Parkinsonerkrankung (**AR-JP**) ist eine klinische Sonderform des autosomal rezessiv vererbten M. Parkinson. AR-JP-Fälle wurden vorwiegend in Japan beschrieben. Die Erkrankung beginnt sehr früh, zum Teil im Kindesalter (7. Lebensjahr, [33]), spricht gut auf L-Dopa an, schreitet relativ langsam fort und weist einige atypische Symptome auf. Zwar liegt nur eine geringe Zahl an Autopsieberichten vor; die Neurodegeneration scheint sich jedoch auf das nigrostriatale System und den Locus coeruleus zu beschränken [34] und mit Ausnahme eines genetisch komplexen Falls [35] bilden sich keine Lewykorpuskel. [36, 37]

1998 identifizierten Kitada *et al.* das Gen, dessen Defekt dem AR-JP zugrundeliegt: das **Parkin-Gen auf Chromosom 6, PARK2 (6q25.2-q27)**. [38, 39]

### **A.5.2 Parkinbedingter M. Parkinson**

Parkinmutationen bedingen neben AR-JP verschiedene klinische Manifestationsformen mit variablem Manifestationsalter und Phänotyp; letzterer kann dem idiopathischen M. Parkinson ähneln. Darunter sind *early-onset autosomal recessive parkinsonism (EO-AR)* (*vide* A.2.4.1, in ca. 50% d.F. parkinbedingt) und juvenile Erkrankungen (in ca. 75% d.F. parkinbedingt, selbst bei negativer Familienanamnese). [24, 40] Um die gesamte, klinisch heterogene Gruppe zu erfassen, die pathogene Parkinmutationen trägt, spricht man daher vom **parkinbedingten M. Parkinson** (*parkin-related parkinsonism*).

### **A.5.3 Parkin – Mutationen**

Das Parkin-Gen besteht aus zwölf Exons, die 465 Aminosäuren kodieren. Ausgedehnte Introns sorgen dafür, dass das Parkin-Gen mit 1,53 Mb zu den größten menschlichen Genen gehört, während das kodierte Protein Parkin mit 52 kDa nur von durchschnittlicher Größe ist. [39, 41] Das Parkin-Gen ist evolutionär stark konserviert.

Derzeit sind mehr als 50 verschiedene krankheitsauslösende Parkinmutationen bekannt, darunter Exondeletionen, -duplikationen, -triplikationen, *frameshift*-Mutationen, Punktmutationen wie *missense*- sowie *nonsense*-Mutationen und intronische *splice-site*-Mutationen. Bisher ist unklar,

über welchen Mechanismus Parkinmutationen zu nigralem Zelltod führen. Der rezessive Vererbungsmodus und die Vielzahl verschiedener Parkinmutationen legen einen **Funktionsverlust** nahe.

Ungeachtet des rezessiven Vererbungsmodus gibt es auch **heterozygote Erkrankte**. [27] Zum Teil liegen hier sogenannte *compound mutations* vor, Kombinationen von zwei verschiedenen Parkinmutationen, für die der Patient jeweils heterozygot ist.

Hinsichtlich der Bedeutung von Parkinmutationen für den *sporadischen* M. Parkinson ist die Frage interessant, ob die Kombination *eines* mutierten Parkinallels mit einem mutierten *susceptibility allele* (*vide* A.2.4.2) zur Erkrankung führt. Im Kollektiv der Parkinsonpatienten mit Parkinmutationen scheint bei Individuen mit *late-onset*-Erkrankung gehäuft nur *ein* Parkinallel mutiert zu sein. Dies spricht dafür, die heterozygote Parkinmutation selbst als prädisponierenden Faktor für *late-onset* M. Parkinson zu betrachten. [42] Auf der Suche nach einem zugehörigen, weiteren prädisponierenden Allel durchsuchten Pankratz *et al.* das Genom in Familien von Parkinsonpatienten mit nur einer Parkinmutation. Ein Polymorphismus auf Chromosom 10 scheint assoziiert (n=23). [27] Überdies scheinen Polymorphismen im Parkin-Promoter krankheitsrelevant zu sein. [43]

#### **A.5.4 Parkin – das Protein und seine mutmaßliche Funktion**

Parkin zeigt *in vitro* **E3-Ubiquitinligase-Aktivität** [44-46], d.h. es fungiert als Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems und ist somit am zellulären Proteinabbau beteiligt. Das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert den **Turnover intakter zellulärer Proteine sowie die Beseitigung anomaler Proteine**. (*vide* A.2.3.3)

Das Parkin-Gen wird in vielen Geweben exprimiert, unter anderem in Gehirn, Herz und Leber. [47] Shimura *et al.* fanden das Genprodukt Parkin in der Substantia nigra stark angereichert, insbesondere aber in melaninhaltigen, dopaminergen Neuronen, wohingegen Kitada *et al.* eine eher unterdurchschnittliche *mRNA*-Konzentration in Substantia-nigra-Homogenaten gezeigt hatten. [39, 48] Dies spricht für eine **Anreicherung des Proteins in dopaminergen Neuronen** aufgrund verlängerter Halbwertszeit. Parkin soll Bestandteil  $\alpha$ -Synuclein-positiver Inklusionen sein, allerdings liegen auch gegenteilige Befunde vor. [49] Mouatt-Prigent *et al.* finden immunhistochemisch Parkin **vorrangig in neuronalen Perikarya**, zusätzlich auch in einigen glialen Perikarya sowie neuronalen Fortsätzen. Subzellulär zeigen sich in neuronalen Zellkörpern die perinukleäre Region, die Umgebung großer Vesikel, des endoplasmatischen Retikulums und

des Golgiapparats, insbesondere des trans-Golgi-Netzwerks, deutlich parkinpositiv. In neuronalen Fortsätzen ist Parkin **mehr post- als präsynaptisch** lokalisiert. [50] Kubo *et al.* finden Parkin an der zytosolischen Oberfläche synaptischer Vesikel. [51]

Parkin besitzt eine ubiquitinomologe Sequenz am N-Terminus, zwei *RING-finger*-Motive mit *in-between-ring*-Sequenz nahe dem C-Terminus (*RING box*) sowie mehrere Phosphorylierungsstellen. [45, 51] Viele krankheitsauslösende Mutationen liegen in der *RING box*, die *in vitro* für die Bindung E2-Ubiquitin-konjugierender Enzyme im Rahmen der E3-Ubiquitinligase-Aktivität notwendig ist. [44-46] Parkin **ubiquityliert** *in vitro* folgende Substrate: **CDCrel-1** [46], **CDCrel-2** [52], **Pael-R** [53], **Synphilin-1** [54], **glykosyliertes  $\alpha$ -Synuclein** [55], **Synaptotagmin XI** [56], **p38** [57], den Dopamintransporter **DAT** [58], **Cyclin E** [59] und  **$\beta$ -Tubulin** [60]. Überdies **interagiert** Parkin mit **CASK**, ohne es zu ubiquitylieren [61], und mit **BAG5**, das die E3-Ubiquitinligase-Aktivität von Parkin inhibiert. [62] Für die **Relevanz von Parkin für das proteasomale System** spricht die Beobachtung, dass es in Zellkulturen unter proteasomalem Stress vermehrt exprimiert wird. [44]

Während initial keines der *in-vitro*-Substrate ***in vivo*** durch Parkin reguliert zu werden schien, zeigten mittlerweile Ko *et al.* in ihrem Parkin-Knockout-Modell eine Hochregulierung von **p38**. (*vide* A.5.5) Dieses scheint auch bei AR-JP, idiopathischem M. Parkinson und *diffuse Lewy body disease* in erhöhter Konzentration vorzuliegen. Es wurde gezeigt, dass nigrale p38-Überexpression zu dopaminergem Zelltod führt, den wiederum Parkin-Expression verhindert. [63] p38-Proteine werden über MAP-Kinase-Reaktionspfade aktiviert und sind nach Translokation in den Nukleus involviert in Stressantworten und Regulation von Apoptose, Zellzyklusprogression, Wachstum und Differenzierung. [64]

Von besonderem Interesse ist die **Funktion von Parkin an Synapsen**. Kubo *et al.* postulieren, Parkin könne mit synaptischen Vesikelvorläufern vom trans-Golgi-Netzwerk in neuronale Terminalen transportiert werden, wo es auf potentielle Substrate treffe. [51] Diese These wird durch die Ergebnisse von Doss-Pepe *et al.* untermauert, die zeigen, dass Parkin die Bildung von Lysin-63-verbundenen Polyubiquitinketten fördert; diese können Membranproteine zur Endozytose bestimmen. [65] So erhöht nach Jiang *et al.* Parkinüberexpression in Zellkulturen die Dopaminwiederaufnahme, indem Parkin fehlgefalteten Dopamintransporter (**DAT**) ubiquityliert und so die Zellmembranexpression von funktionsfähigem DAT erhöht. [58]

### A.5.5 Parkin-Knockout-Tiermodelle

Zwei **Drosophila-Modelle** zeigten eindrucksvolle Ergebnisse, so eine reduzierte mittlere Lebensdauer der homozygoten Parkin-Knockout-Fliegen, männliche Sterilität und **muskuläre Lokomotionsdefizite**. [66, 67] Letztere waren mit **mitochondrialen Defekten** assoziiert, wobei die mitochondriale Pathologie der myofibrillären Strukturstörung vorausging. [66] Diese Ergebnisse legen eine enge kausale Verknüpfung von Parkin-Knockout und Mitochondriendefekt nahe. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass hier die Störung des Parkin-Promoters und somit des koregulierten Gens PACRG entscheidenden Einfluss hat.

An **Mäusen** sind fünf artifiziell erzeugte Parkin-Knockout-Modelle beschrieben. Itier *et al.* und Goldberg *et al.* erzeugten Exon-3-Deletionen, die zu den häufigsten großen Deletionen im Parkin-Gen gehören. [40, 68] Von Coelln *et al.* entfernten Exon 7. [69] Perez *et al.* und Sato *et al.* publizierten Exon-2-Knockouts. [70, 71] Bei allen Modellen wird von einem Parkin-Funktionsverlust ausgegangen, dennoch unterscheiden sich die Untersuchungsergebnisse erheblich.

In **keinem** der Mausmodelle kam es zu einem **Parkinson-Syndrom** im Sinne von Tremor, Rigor oder Akinese oder anderen offensichtlichen Symptomen wie bei den Drosophilamodellen. In differenzierten Versuchen wurden jedoch verschiedene motorische, kognitive und Verhaltensdefizite festgestellt. Itier *et al.* fanden eine **Reduktion des explorativen Verhaltens** der Knockout-Mäuse sowie Anzeichen für **Defizite im räumlichen Lernen**. [40] Auch Parkinsonpatienten zeigen diese Symptome. [72] Ungeachtet des Fehlens *grober* motorischer Defizite erzielten bei Goldberg *et al.* die Knockout-Mäuse deutlich schlechtere Ergebnisse in **spezifisch nigrostriatalen Funktionstests**. [68] Von Coelln *et al.* führten am Exon-7-Knockout nur grobe motorische bzw. Verhaltenstests durch und fanden, ähnlich den anderen beiden Gruppen, dort keine Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen. [69]

Während ursprünglich in **keinem** der Knockouts **dopaminerge Neurodegeneration** oder zytoplasmatische Einschlüsse beobachtet wurden, zeigte der Exon-7-Knockout einen Verlust katecholaminerger Neurone im Locus coeruleus, ein typischer Befund bei fortgeschrittenem idiopathischem M. Parkinson, der eine geringere Schreckreaktion auf akustische Signale erklärt. [69] Entgegen erster Veröffentlichung zum betreffenden Drosophila-Modell berichten nun auch Whitworth *et al.* von progressiver Degeneration eines Clusters dopaminerger Neuronen. [73]

In den Exon-3-Knockouts bleiben gravierende, sichtbare Zellschäden in Substantia nigra und Locus coeruleus aus. Dagegen wurden **funktionelle Veränderungen** in Substantia nigra und Striatum nachgewiesen. In Projektionsgebieten der Substantia nigra waren die Lokalisationverhältnisse des Dopamin verändert. Dopamin wird aus L-Thyrosin über L-Dopa synthetisiert, vesikulär gespeichert und nach synaptischer Freisetzung über Transporter wieder aufgenommen. Bei Itier *et al.* scheint der Dopaminmetabolismus zugunsten des **intrazytoplasmatischen Abbaus** durch die Monoaminoxidase verschoben. Beim Abbau eines Moleküls Dopamin durch die MAO entstehen zwei Moleküle Wasserstoffperoxid, also eine deutliche oxidative Belastung. Die **Dopaminwiederaufnahme** an den nigralen Terminalen im Striatum war dagegen **vermindert**. [40] Goldberg *et al.* fanden **erhöhte extrazelluläre Dopaminkonzentrationen** im Striatum bei **nicht veränderter Wiederaufnahme**, was auf erhöhte Dopaminfreisetzung schließen lässt. Tatsächlich sind die **striatalen medium sized spiny neurons**, deren Erregung durch Dopamin gehemmt wird, durch ihre kortikalen, glutamatergen Afferenzen **weniger erregbar**.

Sato *et al.* fanden im Exon-2-Knockout die Dopaminmetaboliten unverändert, allerdings Synthese und Freisetzung von Dopamin (PET) vermindert und entsprechend die D<sub>1,2</sub>-Rezeptorbindung erhöht. [71]

Entgegen der Erwartung fand man initial in keinem der Modelle veränderte Konzentrationen der *in vitro* bestimmten **Parkin-Interaktionspartner**. Letzthin berichten jedoch Ko *et al.* über Akkumulation von p38 im Exon-7-Knockout. p38 ist Bestandteil des Multi-tRNA-Synthetase-Komplexes und wirkt toxisch auf Zellkulturen, wobei Parkin den Zelltod verhindert. In Mäusen demonstrieren Ko *et al.* dopaminergen Zellverlust durch Adenovirus-vermittelte p38-Überexpression. p38 ist in *Lewy bodies* nachweisbar. [63]

Sowohl im Mausmodell von Goldberg *et al.* als auch in einem der beiden Drosophilamodelle wurden **verminderte Resistenz gegen oxidativen Stress** und erhöhte Marker für oxidative Schädigung nachgewiesen. [12, 73]

Unabhängig von diesen gezielt hervorgerufenen Knockouts existiert ein **spontaner** Parkin-Knockout, die sogenannte **Quaking mouse** mit Deletion der ersten fünf Parkin-Exons, des gesamten Parkin-Promoters sowie des koregulierten Gens PACRG. Er zeigt u.a. erhöhten Dopaminmetabolismus. [74]



## **B Material und Methoden**

### **B.1 Probenmaterialien - Versuchstiere und Gewebe**

Alle untersuchten Organpräparate wurden von der Arbeitsgruppe Jie Shen, Harvard University, Boston, Massachusetts, USA, bezogen. Sowohl Knockoutmäuse als auch Wildtypkontrollen sind weiblichen Geschlechts und gehören dem Stamm 129/Sv an. Im Alter von 8 Monaten wurden die Versuchstiere präpariert; Großhirn und ventrales Mittelhirn wurden isoliert und bei -80 °C gelagert.

Die Modellmäuse sind homozygot für eine Exon-3-Deletion im Parkin-Gen (PARK2), die von der Arbeitsgruppe Jie Shen andernorts publiziert wurden. [12]

Es wurden 10 Knockout- und 10 Kontrollmäuse untersucht, wobei dieselbe Paarkonstellation zwischen Knockout- und Kontrolltier für alle Organpräparate und in allen Arbeitsschritten beibehalten wurde.

### **B.2 Probenaufarbeitung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Organproben nach der Methode der Gesamtextraktion aufgearbeitet. Grundlage der Gesamtextraktion ist eine von der Arbeitsgruppe Klose andernorts beschriebene Methode. [75, 76] Die Gesamtextraktion dient der Gewinnung eines maximalen Anteils *aller* im Gewebe vorkommenden Proteine. Durch gezielten Einsatz von Chemikalien und physikalischen Prozeduren werden neben hydrophilen, zytosolischen Proteinen auch membranassoziierte Proteine und Kernproteine erfasst. Die Gewinnung membranassoziierter Proteine soll durch Zugabe von 9 M Harnstoff und zwitterionischem Reagenz CHAPS gefördert werden. Durch Ultraschallbehandlung zur Membranzertrümmerung und DNase-Reagenz sollen Kernproteine freigesetzt werden.

Die Mengen der zugegebenen Reagenzien sind direkt proportional zum Gewicht der jeweiligen Probe. Für alle Lösungen wird Reinstwasser, 18,2 mΩ, verwendet, das per Ionenaustauschverfahren von der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q UF Plus (Millipore®, Schwalbach, Deutschland) hergestellt wird. Die Anlage entfernt über ein Ultrafiltrationsmodul auch Eiweiß.

Zunächst wird das tiefgekühlte Probenmaterial mit den entsprechenden Reagenzien pulverisiert. Ein Auftauen der Proben wird erst erlaubt, wenn die Proteasehemmer fein untergemischt sind. Hierfür wird ein Mörser aus Quarzglas (WITA, Berlin, Deutschland) in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. 1,25 Gewichtsanteile an Puffer P2-CHAPS werden auf einen ebenfalls vorgekühlten Spatellöffel pipettiert. Puffer P2, pH 7,1, wird hergestellt aus 0,2 M Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland), 20% Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,1 M Phosphatpuffer, welcher seinerseits aus 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Darmstadt, Deutschland) besteht, pH 7,2. Puffer P2 wird die benötigte Menge CHAPS (Serva, Heidelberg, Deutschland) zugesetzt, sodass die Endprobe 4% CHAPS enthält. Der erstarrte Tropfen Puffer P2-CHAPS wird in den Mörser überführt. Anschließend erfolgt auf gleiche Weise die Zugabe von 0,08 Gewichtsanteilen des ersten Proteasehemmer-Cocktails H4, pH 7,5, bestehend aus einer in 2 ml P2-CHAPS gelösten Complete™ Tablette (Roche, Mannheim, Deutschland). Nun wird das tiefgekühlte Probenmaterial in den Mörser gegeben. Alle Zutaten werden mit Hilfe eines Pistills durch vorsichtiges Stoßen pulverisiert. Das sehr feine Pulver wird nun mit Hilfe eines Spatels in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Sodann werden 0,02 Gewichtsanteile des zweiten Proteasehemmer-Cocktails H1 hinzupipettiert, bestehend aus 1,4  $\mu\text{M}$  Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 1 M Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in Ethanol. Für die Ultraschallbehandlung zur weiteren Homogenisierung der Probe wurde eine dem Probengewicht proportionale Menge Glaskugeln ( $2,5 \pm 0,05$  mm Durchmesser, Worf Glaskugeln GmbH, Deutschland) dem Pulver zugesetzt und dieses unter vorsichtigem Rühren mit einem Platindraht aufgetaut. Das Homogenat wird zwischenzeitlich auf Eiswasser gelagert. Das Ultraschallbad (Sonorex RK31, Bandelin, Berlin, Deutschland) wird bis zur optimalen Höhe mit Eiswasser befüllt. Die Proben werden paarweise behandelt. Das erste Eppendorfgefäß wird bis zur Höhe der Probe in die Mitte des Ultraschallbades eingetaucht. Die Ultraschallbehandlung erfolgt für je 10 s, anschließend wird das Homogenat für je 45 s auf Eiswasser gerührt und danach dort belassen. Bei Erreichen der vollen Minute beginnt die Behandlung der zweiten Probe. Diese Sequenz wurde sechsmal wiederholt. Die Spitze des Eppendorfgefäßes wird nun mit einer Nadel durchstoßen und dieses Gefäß in ein NUNC®-Gefäß gesteckt, so dass durch kurzes Zentrifugieren bei 3500 UPM (Varifuge® 3,0 R, Kendro, Hanau, Deutschland) das Homogenat von den Glaskugeln getrennt werden kann, welche im oberen Gefäß verbleiben. Das Extrakt wird abgewogen und darauf bei 4 °C für 15 min mit einem Rührfloh gerührt. Danach werden 0,025 Gewichtsanteile DNase (Benzonase, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,021 Gewichtsanteile Puffer P-Magnesiumchlorid zupipettiert. Letzterer besteht aus 50 mM Tris Base

(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 50 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 20% Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie Magnesiumchlorid-6-hydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland). Diese Mischung wird wiederum für 15 min bei 4 °C gerührt. Nach dem DNA-Verdau erfolgt zur weiteren Solubilisierung die Zugabe von 0,78 Gewichtsanteilen 6,5 M Harnstoff (Biorad, Hercules, CA, USA) und 0,3 Gewichtsanteilen 2 M Thioharnstoff (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Mit einem Glasrührstäbchen wird 30 min bei RT gerührt, sodass die beiden Substanzen nahezu vollständig im Extrakt gelöst sind. Nun werden 0,1 Gewichtsanteile 70 mM Dithiothreitol (Biorad, Hercules, CA, USA) zugegeben und bis zum vollständigen Lösen aller Substanzen gerührt. In einem letzten Schritt werden 0,1 Gewichtsanteile 2% Ampholinmixtur Servalyte, pH 2-4 (Serva, Heidelberg, Deutschland) zugegeben und das erhaltene Extrakt mit dem Rührfloh gerührt, welcher anschließend mit Hilfe eines Magneten entfernt wird. Ein Aliquot der Proben wurde für die folgenden Elektrophoresen mit Probenverdünnerlösung, bestehend aus Harnstoff (Biorad, Hercules, CA, USA), DTT (Biorad, Hercules, CA, USA) und Servalyte pH 2-4 (Serva, Heidelberg, Deutschland), 1 auf 2 verdünnt. Das Extrakt wird bis zur Elektrophorese wiederum bei -80 °C gelagert.

### **B.3 Zweidimensionale Großgel-Elektrophorese**

Die zweidimensionale Großgel-Elektrophorese (2D-GE) ist eine hochauflösende Variante der Proteinelektrophorese, die bis zu 10 000 Proteinspots separiert. Die erste Elektrophorese trennt die Proteine nach ihrem pI, die zweite nach Molekülgröße auf. So entsteht ein zweidimensionales Muster nach pI (Abszisse) und Molekulargewicht (Ordinate).

In der vorliegenden Arbeit wurde die 2D-GE zu einer **quantitativ vergleichenden Proteomanalyse** herangezogen.

Da die Spotproteine nicht absolut reproduzierbar migrieren, muss stets ein Paar aus Knockout-Probe und Wildtyp-Probe in derselben Elektrophoresekammer laufen. So wird jeweils gegen einen internen Standard verglichen; es resultieren verbundene Stichproben.

#### **B.3.1 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung**

Bei der isoelektrischen Fokussierung wandern Proteine entlang einem pH-Gradienten im elektrischen Feld bis an die Stelle, an der ihre Nettoladung gleich Null ist, ihren isoelektrischen Punkt. Zur Herstellung des pH-Gradienten werden lösliche Ampholine eingesetzt. Ampholine sind heterogene Synthesegemische aus niedermolekularen aliphatischen Oligoamino-

oligocarbonsäuren. Diese vermögen aufgrund ihres zwitterionischen Charakters, Proteine in Lösung zu halten. Durch Anlegen eines elektrischen Felds entsteht der pH-Gradient, indem die Trägerampholytmoleküle sich entsprechend ihrem pI kontinuierlich zwischen Anode und Kathode verteilen, diejenigen mit niedrigerem pI an die anodische, die mit höherem pI an die kathodische Ende des Gels wandern.

### **B.3.1.1 Reagenzien und Durchführung**

Die 1D-Gele werden in Glasröhrchen gegossen, nach dem Polymerisieren mit Probe beladen und nach der Elektrophorese aus dem Glasröhrchen in den Äquilibriumspuffer ausgestoßen. Damit stehen sie der zweiten Dimension zur Verfügung.

Zunächst seien die Materialien und Reagenzien zur Durchführung der isoelektrischen Fokussierung genannt. Es werden Glasröhrchen von 40 cm Länge verwendet (Schott Glas, Mainz, Deutschland). Zur Fertigung analytischer Gele werden Röhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,9 mm benutzt, die das Auftragen von nur 12 µl Probe erlauben; für präparative Gele kommen 1,5 mm-Röhrchen zum Einsatz, auf die 60 µl Probe aufgebracht werden können, so dass die Spots ausreichend Protein für die Massenspektrometrie enthalten.

Die Gellösungen bilden zum einen das Separationsgel und zum anderen das Cappel. Ersteres besteht aus 3,5% (w/v) Acrylamid (Biorad, Hercules, CA, USA), 0,3% (w/v) PDA (Biorad, Hercules, CA, USA), 9 M Harnstoff (Biorad, Hercules, CA, USA), 5% Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,06% TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Biorad, Hercules, CA, USA) sowie 4% Ampholinmischung. Die Ampholinmischung setzt sich ihrerseits aus 1 Teil Ampholyt pH 3,5-10 (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 1 Teil Servalyte pH 2-11 (Serva, Heidelberg, Deutschland), 1 Teil Servalyte pH 6-9 (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 3 Teilen Ampholyte pH 4-6,5 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und 2 Teilen Ampholyte pH 5-8 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) zusammen. Das Cappel besteht aus 12% (w/v) Acrylamid, 0,13% (w/v) PDA, 9 M Harnstoff, 5% (w/v) Glycerin, 0,06% TEMED und 4% der Ampholinmischung.

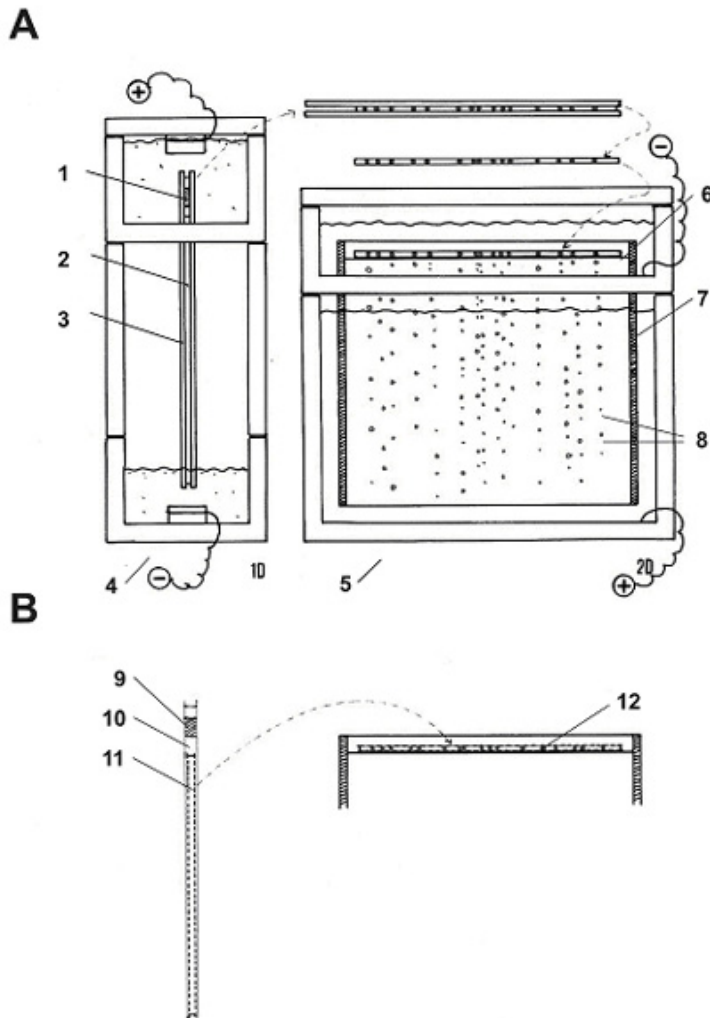
Die Proben werden nach dem Auftragen aufs Gel mit Schutzlösung bedeckt, die das Abdiffundieren der Probe in den Puffer verhindert. Diese wird hergestellt, indem von einer Lösung aus 6 g Harnstoff und 1 g (w/v) Glycerin in 19 ml Reinstwasser, 18,2 mM, 7,6 ml mit 0,4 ml Servalyte pH 2-4 gemischt werden.

Die Elektrophorese benötigt zwei Puffer: oberen Laufpuffer (Anodenpuffer) und unteren Laufpuffer (Kathodenpuffer). Der Anodenpuffer besteht aus 0,742 M Phosphorsäure (Ortho-

Phosphorsäure 85%, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 3 M Harnstoff, gelöst in 500 ml Reinstwasser, 18,2 mΩ. Der Kathodenpuffer setzt sich zusammen aus 0,749 M Ethylendiamin (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland), 5% (w/v) Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 9 M Harnstoff in 500 ml Reinstwasser, 18,2 mΩ. Zur Fokussierung werden nacheinander folgende Spannungen angelegt: 1h bei 100 V, 1 h bei 300 V, 23 h bei 1000 V, 30 min bei 1500 V und 10 min bei 2000 V. Danach werden die Proben in den Äquilibrationpuffer ausgestoßen, der aus 125 mM TRIZMA<sup>®</sup>-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 40% (w/v) Glycerin, 3% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 5% DDT besteht.

Der erste Arbeitsgang ist das Gießen der Gele. Hierfür werden die Glasröhrchen senkrecht in einen Gießständer eingespannt und in die Lumina Nylonziehfäden (Angelschnur, Durchmesser 0,7 mm, Länge 100 mm, Ertner super, Deutschland) eingeschoben. Auf eine Gießschiene wird die zunächst verwandte Separationsgellösung, zuvor mit Ammoniumpersulfat (Biorad, Hercules, CA, USA) auf 0,03% versetzt, gegossen und mit Hilfe der Nylonziehfäden in das Lumen der Glasröhrchen bis zur Markierung hochgesogen. Anschließend wird nach dem gleichen Prinzip das Cappel bis zur nächsten Markierung gezogen, zuletzt noch ein geringer Luftspalt. Die Gele polymerisieren 25 min bei Raumtemperatur, dann können die Enden der Nylonfäden aus den Röhrchen entfernt werden. Beide Röhrchenenden werden mit Parafilm M<sup>®</sup> (Pechiney Plastic Packing, Neenah, WI, USA) verschlossen und die Röhrchen weitere sieben Tage bei Raumtemperatur stehengelassen.

Danach, vollständig auspolymerisiert, können die Gele mit der zu untersuchenden Probe beladen werden. Dazu werden die Gelröhrchen in eine Elektrophoresekammer (WITA, Berlin, Deutschland) mit der Cappelseite nach unten eingespannt (vgl. Abbildung 1). Diese taucht in den Kathodenpuffer im unteren Teil der Elektrophoresekammer.



**Abbildung 1: A: Schematische Darstellung der 1D-Kammer (linkes Bild) und 2D-Kammer (rechtes Bild). 1. Probe; 2. Gel; 3. Glasröhrchen; 4. 1D-Kammer; 5. 2D-Kammer; 6. 1D-Gel; 7. Abstandhalter; 8. zwei 2D-Gele in einer Kammer B: Schematische Darstellung des Auflegens des 1D-Gels auf die zweite Dimension. 9. Probe; 10. Sephadex; 11. 1D-Gel; 12. 1D-Gel aufliegend auf zweiter Dimension.**

Auf das obere Gelende wird nun eine 2 mm dicke Schicht Sephadexlösung aufgetragen (vgl. Abbildung 1), bestehend aus 12,5% Sephadex-G-200 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), 70 mM DDT, 2% Ampholinmix und 9 M Harnstoff. Sephadex verhindert Proteinpräzipitation und -aggregation. Auf diese Schicht werden mit Hilfe einer Hamilton<sup>®</sup>-Spritze (10 µl, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) 8 µl verdünnte Probe (*vide* B.2) bei analytischen Gelen bzw. 40 µl bei präparativen Gelen aufgetragen. (vgl. Abbildung 1) Die Probe wird dann mit einem geringen Volumen Schutzlösung bedeckt. Das restliche freie Lumen des Glasröhrchens wird mit Anodenpuffer aufgefüllt, ebenso der obere Kammertrog, sodass die

Röhrchenöffnungen bedeckt sind. Nun wird die Fokussierung mit dem Anlegen der Spannung nach oben beschriebenem Regime gestartet.

Nach der Elektrophorese wird die Gellänge bestimmt und das Gel mit einem Nylonfaden in den Äquilibriumspuffer ausgestoßen. Mit Hilfe einer Pinzette wird es beim Ausstoßen in zwei Hälften getrennt: die saure, ca. pH 3-6, und die basische, ca. pH 6-10. Die Gelhälften werden dann mit einer Pipette entsprechenden Lumens aufgesaugt und in der Rinne einer Gelschiene abgelegt. Diese 1D-Gele können wiederum bei -80 °C gelagert werden.

### **B.3.2 Zweite Dimension – Großgel-Elektrophorese**

Nachdem die Proteine bereits nach ihrem pI getrennt wurden, dient die zweite Elektrophorese ihrer zusätzlichen Auftrennung nach Molekulargewicht. Hierfür wird das 1D-Gel als horizontale Achse auf das 2D-Gel aufgelegt, quasi die Startlinie für den zweiten Lauf, von der sie in vertikaler Richtung, der zweiten Dimension, abwandern.

Für die Auftrennung nach Molekulargewicht bildet Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS) mit den Proteinen Mizellen, wobei es ihre Eigenladung überdeckt und die Mizellenoberfläche pro Masseneinheit eine konstante Negativladung trägt. In diesem Arbeitsschritt werden Wasserstoffbrückenbindungen aufgespalten, ebenso Disulfidbrücken durch reduzierende Verbindungen wie Dithiothreitol.

#### **B.3.2.1 Reagenzien und Durchführung**

In diesem Arbeitsschritt werden zuerst die 2D-Gele gegossen, dann das 1D-Gel aufgelegt, die enthaltene Probe elektrophoretisch aufgetrennt sowie das Ergebnis fixiert.

Zunächst seien die benötigten Materialien und Reagenzien genannt. Die Acrylamidgele weisen ein Format von 23,2 cm x 30 cm x 0,75 mm bzw. 1,0 mm auf, wobei die analytischen, 0,75 mm dicken Gele der Auswertung der Spotmuster dienen und die präparativen, 1,0 mm dicken Gele der Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie. Die eingesetzte Acrylamidlösung besteht aus: 15% (w/v) Acrylamid (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,2% (w/v) Diacrylamid (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,03% (v/v) TEMED (Biorad, Hercules, CA, USA), 0,1% SDS, 375 mM TRIZMA<sup>®</sup>Base (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und TRIZMA<sup>®</sup>Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) sowie 0,08% Ammoniumpersulfatlösung, direkt vor dem Gießen zugegeben, um die Polymerisation zu beschleunigen. Zum Bedecken und zur Reinigung der Geloberfläche wurde die folgende

Spüllösung benutzt: 375 mM TRIZMA<sup>®</sup>Hydrochlorid und TRIZMA<sup>®</sup>Base sowie 0,1% SDS. Zum Fixieren der 1D-Gele auf dem 2D-Gel wurde eine Agaroselösung verwendet: 0,3% TRIZMA<sup>®</sup>Base, 1,44% Glycin, 0,1% SDS und 1% Agarose (Biorad, Hercules, CA, USA).

Für die Elektrophorese wurde die Elektrophoreseeinheit Desaphor VA 300 (Desaga, Deutschland) eingesetzt. Die Pufferlösung für das untere Pufferreservoir ist folgendermaßen definiert: pH 8,7; 0,3% TRIZMA<sup>®</sup>Base, 1,44% Glyzin (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,1% (w/v) SDS gelöst in deionisiertem Wasser. Der Kathodenpuffer im oberen Puffertrog wird bei gleicher Zusammensetzung allerdings in Reinstwasser, 18,2 mΩ, gelöst und enthält zusätzlich Bromphenolblau zum Markieren der Lauffront. Zugegeben wurde eine Lösung von 50 mg Bromphenolblau in 150 ml Reinstwasser, 18,2 mΩ. Durch Spannungsgeräte (EPS 3500XL, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurde an den Gelen in der Elektrophoreseeinheit eine Anfangsstromstärke von 65 mA über 15 min und danach eine Stromstärke von 85 mA über 5-7 h erzeugt. Dabei wurden die Elektrophoreseeinheiten konstant auf 15 °C gekühlt.

Die Fixierlösung besteht aus 50% (v/v) Ethanol und 10% Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Reinstwasser, 18,2 mΩ.

Die praktische Ausführung beginnt mit der Fertigung der Gießform. Dazu werden an den Längsrändern einer geeigneten Glasplatte Abstandhalter mit Silikonpaste befestigt, sodann eine zweite Glasplatte kongruent aufgelegt. Der jeweilige Abstandhalter bedingt die Dicke des resultierenden Spalts, also die Geldicke. Die einsatzfähige Gießform wird auf einem Gießständer fixiert, welcher ein Zufuhrsystem für Glycerin besitzt. Die Acrylamidlösung wird von oben über eine Füllhilfe eingegossen. Das 60%ige (w/v) Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland) wird über den Gießständer in den unteren Spaltbereich eingebracht. Es hält während der Polymerisation den zukünftigen Auftragsspalt für das 1D-Gel frei. In dieser Position polymerisieren die 2D-Gele 25 min bei Raumtemperatur; anschließend werden sie um 180° auf dem Gießständer gedreht. Nun wird das Glycerin vollständig durch Spüllösung ersetzt. Über Nacht werden die 2D-Gele bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wird das 1D-Gel vorsichtig mit einem Draht auf das 2D-Gel aufgebracht, während die Auftragschiene an die Glasplatte angelegt wird (vgl. Abb. 1). Anschließend wird das 1D-Gel mit der Agaroselösung fixiert, um ein Aufschwimmen zu verhindern. Nun wird der Kathodenpuffertrog mit der 2D-Gelkassette in die Elektrophoreseeinheit eingesetzt (vgl. Abb. 1). Nach dem beschriebenen Stromstärkeregime erfolgt die elektrophoretische Trennung. Danach werden mit Hilfe eines Keils die Glasplatten auseinandergehoben, sodass das 2D-Gel entnommen und in die Fixierlösung eingelegt werden kann, wo es für mindestens zwei Stunden belassen wird.



### **B.3.3 Silberfärbung**

Zur Spottedetektion und Auswertung wurde die analytische Silberfärbung und zur Spotidentifizierung die massenspektrometrikompatible Silberfärbung eingesetzt.

Die analytische Silberfärbung zeichnet sich durch hohe Sensitivität mit einer Nachweisgrenze bei ca. 10 ng aus. Nachteile sind MS-Inkompatibilität aufgrund der Verwendung von Glutaraldehyd und mangelhafte Quantifizierbarkeit von Proteinmengen, da verschiedene Proteine unterschiedlich intensiv angefärbt werden. [75, 77, 78]

Der Silberfärbung liegt eine Komplexbildung zwischen  $\text{Ag}^+$ -Ionen einerseits und Glutamin-, Asparagin- und Cysteinresten der Proteine andererseits zugrunde. Sichtbar werden diese durch reduzierende Agenzien, die metallisches Silber entstehen lassen.

#### **B.3.3.1 Reagenzien und Durchführung der analytischen Silberfärbung**

Nach der Fixierung werden die Gele für zwei Stunden in Inkubationslösung geschüttelt: 30% (v/v) Ethanol, 0,5% (v/v) Glutaraldehyd (Glutaraldehydlösung 25%, Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,5 M (w/v) Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie 0,1% (w/v) Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Nach Ablauf der Inkubation werden die Gele in zwei Durchgängen für jeweils 20 min mit 3,5 l Reinstwasser, 18,2 mΩ, unter Schütteln gewaschen. Im Anschluss erfolgt eine dreißigminütige Inkubation mit Silbernitratlösung: 0,1% (w/v) Silbernitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,01% Formaldehydlösung (Formaldehydlösung 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach Absaugen der Silbernitratlösung werden die Gele wiederum gewaschen: zweimal, kurz, mit je 1 l Reinstwasser, 18,2 mΩ. Sodann werden sie für 1 min mit 2,5% (w/v) Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Nun wird die Entwicklerlösung zugegeben: 2,5% (w/v) Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,01% Formaldehyd (Formaldehydlösung 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Entwicklungszeit wird für jedes Gel so angepasst, dass die mittlere Farbintensität sich an ein Referenzgel angleicht. Der Entwicklungsprozess wird mit der Stopplösung beendet: 0,05 M Titriplex<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,02% (w/v) Thimerosal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Zuletzt werden die Gele für mind. 20 min in deionisiertem Wasser gewaschen. Diese zur Spottedetektion bestimmten Gele werden dann zwecks Archivierung getrocknet. Dazu wird eine in der Gelgröße perforierte Metallplatte mit Blottingpapier ausgelegt, dieses mit Wasser befeuchtet und geglättet. Das in Zellophanfolie (Alba-Einmachhaut, Gehring & Neidweiser GmbH, Bielefeld,

Deutschland) eingeschlagene Gel wird aufgelegt und in einem auf ca. 90 °C vorgeheizten, an eine Vakuumpumpe angeschlossenen Trockenschrank (Memmert-Wärmeschrank UL 60, Karow GmbH, Berlin, Deutschland) in ca. 2 h getrocknet.

### **B.3.3.2 Reagenzien und Durchführung der präparativen Silberfärbung**

Auch hier werden die Gele mind. 2 h in der erwähnten Fixierlösung gehalten. Die Inkubation jedoch unterscheidet sich von der analytischen Silberfärbung und erfolgt in zwei Schritten: zunächst 10 min mit 30% (v/v) Ethanollösung und anschließend 1 min in 0,02% Natriumthiosulfatlösung. Darauf werden die Gele kurz zweimal in je 1 l Reinstwasser, 18,2 mΩ, gewaschen und im Anschluss für 60 min in 0,15% Silbernitratlösung inkubiert. Entscheidend ist hier der Verzicht auf Glutaraldehyd, welches die anschließende Massenspektrometrie behindern würde. Nach Absaugen der Silbernitratlösung werden die Gele wiederum kurz mit 1 l Reinstwasser, 18,2 mΩ, gewaschen. Die übrigen Entwicklungsschritte sind analog zur analytischen Färbung, allerdings unterscheiden sich die Reagenzien. Die Entwicklerlösung enthält 2,5% (w/v) Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,01% Formaldehyd (Formaldehydlösung 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,02% Natriumhydrogenkarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,025% Thimerosal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Die Stopplösung besteht nur aus 0,05 M Titriplex<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zuletzt werden die Gele für mind. 5 min in deionisiertem Wasser gewaschen. Nach der präparativen Silberfärbung werden die Gele nicht getrocknet, sondern in Einschweißfolie versiegelt und bei 4 °C gelagert.

## **B.4 Bildauswertung**

Es wurde jeweils ein analytisches Gelpaar aus Parkin-Knockout und zugehöriger Wildtyp-Kontrolle verglichen, und zwar die einzelnen Spotpaare bezüglich Intensität und Fläche. Als Spotpaar wurden zwei Spots betrachtet, die in den zweidimensionalen Elektrophoresemustern die gleiche Stelle einnehmen. Häufig ähneln sich diese auch in Farbton, Form, Grad der Fokussierung etc., was die Zuordnung stützt. Für jedes Spotpaar stand dann je ein Vergleichsergebnis aus jedem der zehn Gelpaare zur Verfügung; somit gingen zehn Werte je Spotpaar in die anschließende statistische Auswertung ein.

Es wurden sowohl computerisierte, kommerzielle Bildverarbeitungsprogramme als auch die herkömmliche, visuelle Auswertung durchgeführt: Ein sorgfältiges visuelles Screening ging

voraus; die endgültige, statistische Auswertung erfolgte anhand der Daten aus der softwaregestützten Bildauswertung.

Beide Auswertemethoden sind notwendig und ergänzen sich, da einerseits die visuelle Auswertung subjektiven Wahrnehmungsschwankungen und optischen Täuschungen unterworfen ist, und da andererseits die verfügbaren Bildverarbeitungsprogramme noch nicht so ausgereift sind, dass eine vollautomatisierte Auswertung möglich wäre. Die visuelle Auswertung zeigt Schwächen, wenn z.B. in einem Gel der Hintergrund stärker gefärbt oder der Spot weniger fokussiert ist. Überdies kann die visuelle Auswertung Spotvolumina nur auf einem ordinalen Skalenniveau erfassen. Die verfügbare Auswertesoftware wiederum erfordert eine sehr zeitaufwendige Optimierung der Auswerteparameter für jedes Projekt. Überdies ist sie bezüglich der Spotdetektion unzuverlässig, so dass jedes einzelne relevante Spotpaar in jedem Gelpaar hinsichtlich Spoterkennung und -abgrenzung sowie Zuordnung überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden muss. Daher ist es bei mehreren Tausend Spots pro Gel bisher nicht sinnvoll, die gesamte Auswerteprozedur computerisiert durchzuführen.

#### **B.4.1 Visuelle Bildauswertung**

Im visuellen Screening wurden alle Spots eines Gels mit dem entsprechenden Spot des jeweiligen Kontrollgels verglichen. Es wurden quantitative und qualitative Unterschiede wie beispielsweise Intensitäts- und Lageveränderungen bewertet. Dieser Vergleich erfolgte für alle zehn Gelpaare eines untersuchten Gewebes.

Die visuelle Auswertung erfolgte auf einem Leuchtkasten (BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen, Deutschland). Die Bildunterschiede zweier miteinander verglichener Gele wurden als volumengesteigerte, volumengeminderte, vorhandene oder nicht vorhandene Spotunterschiede auf einer über das Parkin-Knockout-Gel gelegten Folie festgehalten. Wiederkehrende Unterschiede wurden in Listen vermerkt und durch statistische Auswertung dieser Daten wurden Kandidatenspots identifiziert.

#### **B.4.2 Bildauswertung mit Proteomweaver**

Der relative Proteingehalt dieser Kandidatenspots wurde dann mittels softwaregestützter Bildauswertung erfasst und in jedem Gelpaar verglichen. Anhand der so erhobenen Daten erfolgte die statistische Auswertung.

Ein „**Spot**“, also ein „Fleck“ im Gel, stellt eine annähernd runde oder ovale Fläche dar, die dunkler gefärbt ist als der Gelhintergrund. Der Schwärzungsgrad gilt als Maß für die Proteindichte an einem Punkt des Gels. Ein Spot ist in seinem Zentrum besonders dunkel gefärbt, während der Schwärzungsgrad am Rand des Spots rapide abnimmt bis zur Angleichung an den Hintergrund. (*vide* Spotabbildungen in C.1) Die Bildauswertungssoftware Proteomweaver teilt das gesamte Gel mit hoher Auflösung in einzelne Bildpunkte auf und ermittelt deren Graustufen. Nach der Spoterkennung (*vide infra*) aus dem Muster von Punkten verschiedener Graustufen sind jedem Spot seine Position im Gel und ein virtuelles Spotvolumen zugeordnet: Jeder Spot wird durch die jeweiligen Schwärzungsgrade zu jedem Bildpunkt seiner Fläche charakterisiert. So kann der Spot als dreidimensionales Struktur vorgestellt werden, indem über der Spotfläche der Schwärzungsgrad als Höhe aufgetragen wird. So entsteht ein **virtuelles Spotvolumen**. Um etwaige Schwankungen der Färbezeiten oder der auf das 1D-Gel aufgetragenen Proteinmenge auszugleichen, wird das Konstrukt Spotvolumen ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtanfärbung des Gels, so dass ein „relatives Volumen“ bzw. eine dimensionslose **Volumenmaßzahl** resultiert, aus der auf den relativen Proteingehalt eines Spots geschlossen wird. **Diese Volumenmaßzahl wird im Folgenden als „Spotvolumen“ bezeichnet.**

Um die softwaregestützte Bildauswertung zu ermöglichen, wurden die analytischen Gele mit Hilfe des Scanners UMAX Mirage DIN A3 (Umax, Willich, Deutschland) mit einer Auflösung von 300 dpi in eine Bilddatei umgesetzt. Zur Auswertung wurde das Bildverarbeitungsprogramm Proteomweaver Softwareversion 2.1 angewandt (Definiens AG, München, Deutschland). Weiterführende Informationen dazu können unter [www.Proteomweaver.com](http://www.Proteomweaver.com) eingesehen werden.

Die Bilddateien wurden in das Bildverarbeitungsprogramm eingespeist und gruppiert sowie paarweise geordnet. Nach der Gruppierung erfolgte mittels Befehlausführung im Menü die **Spotdetektion**. Die Standardparameter Radiuslimit, Intensitätslimit und Kontrastlimit wurden so an die bearbeiteten Gele angepasst, dass eine möglichst Spotanzahl  $x$  detektiert wurde, die ein Optimum zwischen möglichst hoher Sensitivität und dem allgemeinen Intensitäts-Schwankungsniveau des Gelhintergrunds darstellte.

Die Spotdetektion orientiert sich an einem fixen Punkt im Gel, d.h. Gelgröße bzw. –format sind hier die entscheidenden Größen. Somit müssen die zur Verarbeitung freigegebenen Gelareale möglichst kongruent sein. Ein manuelles Nachbearbeiten der Detektion ist möglich und häufig nötig. So können Spots, die falsch oder gar nicht erkannt wurden, mittels vorhandener Editierwerkzeuge korrigiert werden. Im Allgemeinen handelte es sich um Trennung oder

Zusammenfassung von Spotgruppen bzw. vom Programm aufgespaltener Einzelspots. Eine Option, die dieses Nachbearbeiten erleichtert und verlässlicher macht, ist die dreidimensionale Darstellung der Graustufen eines Gelareals.

Um die einzelnen Spotpaare zweier Gele vergleichen zu können, muss ein **Gelmatching** ausgeführt werden. Hier koppelt das Programm die Koordinaten der einzelnen Spots in den verschiedenen Gelen. Danach werden die Zuordnungen für markante Spots eines Gelpaars überprüft. Gegebenenfalls wird die Zuordnung für genügend viele Spotpaare korrigiert, so dass das Programm das Gelmatching anhand dieser manuellen „Matches“ wiederholen kann. Das Programm selbst misst den Erfolg eines Matching daran, wie viele Spots überhaupt zugeordnet werden konnten. Nachdem das Matching ein zufriedenstellendes Niveau erreicht hat, können einer Tabelle numerische Daten über die Kandidatenspots entnommen werden, u.a. die oben erklärte Volumenmaßzahl.

## **B.5 Statistische Testung**

Für alle statistischen Analysen wurde das Statistikprogramm SPSS (SPSS für Windows Version 13, SPSS, Chicago, IL, USA) genutzt. Verglichen wurden dimensionslose Maßzahlen für das Spotvolumen, die eine Annäherung an den jeweiligen, relativen Proteingehalt darstellen. (*vide* B.4.2) Der Stichprobenumfang von 20 setzt sich aus 10 Fällen und 10 Kontrollen zusammen.

### **B.5.1 Kandidatenspot-Ermittlung**

Durch visuelle Auswertung wurden Kandidatenspots ermittelt. Hierfür wurden mittels Wilcoxon-Test Tabellen erstellt, die anzeigen, bei welchen Verteilungen von drei möglichen Ausprägungen (erhöht, unverändert, vermindert) über die zehn Versuchspaare Spotvolumenänderungen signifikant wurden. Da es sich um eine Vorauswertung zur Detektion von Kandidaten handelte, wurde lediglich  $\alpha \leq 10\%$  gefordert.

### **B.5.2 Testung der Kandidatenspot-Volumenänderungen**

Für jedes Versuchstier wurde das durch Proteomweaver ermittelte Spotvolumen (Definition *vide* B.4.2) jedes Kandidatenspots in das Statistik-Programm eingespeist.

Die Spotvolumenunterschiede zwischen Knockout- und Kontrollmäusen wurde mittels **Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben** auf zweiseitige asymptotische Signifikanz

geprüft. Da das Laufverhalten in verschiedenen Elektrophoresen nur bedingt reproduzierbar ist, lief ein Gelpaar immer gemeinsam in derselben Kammer. Es sind entsprechend nur Knockout- und Wildtypgel desselben Paares zu vergleichen. Daher und wegen geringen Stichprobenumfangs wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt.

Um einen Kandidatenspot als **signifikant verändert** zu werten, wurde  $\alpha \leq 5\%$  gefordert.

Als Parameter der Spotvolumenänderung werden die **p-Werte** angegeben, die **Mediane** der relativen Spotvolumina von Knockout und Kontrolle sowie der Median der Quotienten Spotvolumen(Knockout)/ Spotvolumen(Kontrolle). Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ist der Median das robustere Maß und dem arithmetischen Mittel vorzuziehen.

Zur **Visualisierung der Ergebnisse** wurden *box plots* erstellt, deren Whiskers, Boxränder und Boxmittellinie dem Maximum und Minimum, der 25., und 75. Perzentile bzw. der 50. Perzentile der Spotvolumina (Definition *vide* B.4.2) der Knockout- bzw. Wildtypgruppe entsprechen.

## **B.6 Proteinidentifikation**

Theoretischer pI eines Proteins und errechnetes Molekulargewicht können nur als grober Anhalt für die Spotposition im Gel dienen. Eine Identifizierung des jeweils enthaltenen Proteins kann einzig die Massenspektrometrie gewährleisten. Die Identifizierung wurde als sicher angenommen, wenn sie bestimmten Qualitätskriterien entsprach und in zwei unabhängigen Versuchen an zwei verschiedenen Proben erzielt wurde.

### **B.6.1 Picken**

Um Verunreinigungen, insbesondere durch Keratin, zu vermeiden, wurden die präparativen Gele in einer Wanne, von deionisiertem Wasser bedeckt, bearbeitet. Die zu identifizierenden Proteinspots wurden mit einem Handausstechwerkzeug jeweils einem Parkin-Knockout- und einem Wildtyp-Gel entnommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

### **B.6.2 MS**

Das Prinzip der Massenspektrometrie diene zunächst der Massenbestimmung und Strukturaufklärung von flüchtigen Molekülen. Mit Hilfe von Massenanalysatoren erfolgt die Bestimmung des Verhältnisses von Masse und Ladung der zu untersuchenden Probenmoleküle.

Die hier zum Einsatz kommenden Techniken der Massenspektrometrie sind die Elektrosprayionisierungs-Ionenfallen-Massenspektrometrie (ESI-MS) [79, 80] und die Matrix-assistierte-Laser-Desorptions-Ionisations-Time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI-MS) [80, 81].

#### **B.6.2.1 Prinzip der MALDI TOF Massenspektrometrie**

Das MALDI-Prinzip zeichnet sich durch den Einbau von Probenmolekülen in Kristalle einer Matrixsubstanz mit hohem UV-Absorptionsvermögen aus. Mit einem gepulsten Laserstrahl wird das Proben-Matrix-Gemisch gezielt beschossen. Es folgt eine Protonenübertragung von der sauren, UV-absorbierenden Matrixsubstanz auf die Probenmoleküle. Die erzeugten Ionen gehen in die Gasphase des Hochvakuums des Massenanalysators über. Nach der Beschleunigung der Ionen in einem elektrischen Feld durchfliegen diese eine feldfreie Driftstrecke bis zum Detektor. Aufgrund des individuellen Verhältnisses Masse:Ladung der Probenmoleküle (Ionen) entwickeln diese unterschiedliche Geschwindigkeiten und somit Flugzeiten. Diese individuellen Flugzeiten werden mit Hilfe des Massenanalysators bzw. Flugzeitanalysators (TOF; time of flight) bestimmt.

#### **B.6.2.2 Durchführung der MALDI TOF Massenspektrometrie**

Die manuell ausgestanzten Proteinspots wurden durch Waschen, Verdau und Matrixpräparation für die Massenspektrometrie vorbereitet.

Der Waschprozess dient der Entfernung von störenden Chemikalien; dabei wird abwechselndes Quellen und Schrumpfen hervorgerufen. Zunächst wurden die Proteinspots in ZipPlate<sup>®</sup>-Platten (96-well-Platte mit integriertem C18 Material, Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) 15 min bei RT mit 100 µl folgender Lösung versetzt: 5% Acetonitril (ACN, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Der Überstand wurde mit einer Vakuumstation (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA) wieder abgesaugt. Darauf folgte eine zweimalige Behandlung für 15 min bei RT mit 100 µl der folgenden Lösung: 50% ACN und 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, und ein erneutes Absaugen. Zuletzt wurden 200 µl 100%iges ACN bei RT zugegeben und nach 10 min wieder abgesaugt.

Nun schließt sich der enzymatische Verdau an, bei dem die Proteine an spezifischen Stellen geschnitten und so definierte Peptide erzeugt werden. Hierbei wurden die Proben mit 10 µl Trypsinlösung für 30 min bei 37 °C im Brutschrank (Memert, Karow GmbH, Berlin, Deutschland) inkubiert: 20 µg Trypsin-Lyophilisat (Promega, Mannheim, Deutschland) und 50

mM Ammoniumhydrogencarbonat in 2 ml Reinstwasser, 18,2 mΩ. Nach Zugabe von 5 µl einer wässrigen Lösung von 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat wurden die Proben für weitere 2 h 30 min bei 37 °C inkubiert. In mehreren folgenden Schritten wurde das C18-Material der ZipPlate®-Platten äquilibriert und entsalzt, wobei die Peptide ans Säulenmaterial binden: 1) 15 min bei 37 °C im Brutschrank mit 8 µl 100% ACN, 2) 30 min bei RT mit 130 µl einer wässrigen Lösung von 0,2%iger Triflouressigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), 3) 100 µl von 0,2%iger Triflouressigsäure, Absaugen unter Vakuum, 4) Wiederholung Schritt 3. Danach wurden die Peptide vom C18-Material der ZipPlate®-Platten unter Vakuum in eine einfache Microplate-UNIPLATE-Platte (96 well, 250 µl, Bruker, Bremen, Deutschland) eluiert. Das Elutionsmittel, von welchem 15,5 µl zugegeben wurden, setzt sich wie folgt zusammen: 50% ACN und 0,1% TFA.

Hierauf folgt die Matrixpräparation. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Bruker, Bremen, Deutschland) in einer Konzentration von 3,3 g/l, gelöst in 0,1% Triflouressigsäure-Lösung und ACN im Verhältnis 2:1, verwendet. Die Präparation auf dem Probenträger (Target) erfolgt nach dem Standardprinzip „Dried-Droplet“ [82]. Als Target wird das Anchor-Chip-Target (MTP AnchorChip™var/384TF, 800 µl, Bruker, Bremen, Deutschland) verwendet. Es wird eine Mischung aus 1,5 µl eluierter Peptidlösung und 1,5 µl Matrixlösung auf das Anchor-Chip-Target aufgebracht. Nach dem Eintrocknen des Probe-Matrix-Gemisches wird das beladene Anchor-Chip-Target in das MALDI-TOF-Massenspektrometer (BRUKER Reflex IV, Bremen, Deutschland) eingebracht und die Flugzeit der Probenmoleküle detektiert. Die gewonnenen Massenspektren werden in dem Verarbeitungsprogramm FLEXControl 1.1.46 (Bruker, Bremen, Deutschland) aufgezeichnet und wiedergegeben.

### **B.6.2.3 Auswertung der Massenspektren der MALDI TOF Massenspektrometrie**

Anhand dieser Massenspektren werden die Proteine identifiziert. Zunächst werden die gewonnenen Massenspektren unter Anwendung des Verarbeitungsprogrammes XMASS-NT 5.1.5 (Bruker, Bremen, Deutschland) in korrelierende Massenlisten transferiert. Diese Massenlisten dienen dem weiteren Vergleich bzw. Abgleich von experimentellen Daten mit den existierenden theoretischen Daten. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der Suchmaschine Mascot, [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com), und über die zusätzliche Ansteuerung des Programms Biotools (Bruker, Bremen, Deutschland) gearbeitet. Als Quelle vorhandener, theoretischer Daten diente die nicht redundante Proteinsequenzdatenbank NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Die Mascotsuchparameter für die oben bezeichnete Suchmaschine wurden wie folgt angegeben:



Taxonomie: *Mus musculus*; Peptidtoleranz: 150 ppm; variable Modifikation: Oxidation am Methionin und Propionamid am Cystein (Acrylamidaddukte). Die Identifizierung galt als zutreffend bei Erfüllung bestimmter Kriterien (score threshold  $\geq 61$  entsprechend  $p \leq 0,05$ ; Richtwert Sequenzabdeckung  $\geq 30$  %). Ein Protein wurde dann als sicher identifiziert angenommen, wenn die Identifizierung aus zwei verschiedenen Proben (z.B. Parkin-Knockout- und Kontrollprobe) den oben erwähnten Kriterien genügte.

#### **B.6.2.4 Prinzip der ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie**

Bei der Elektrosprayionisation (ESI) erfolgt das Einbringen der Peptidprobe in die Gasphase durch Versprühen der Peptidlösung in feinste Tröpfchen. Als Ionisierungshelfer dienen schwache Säuren; als Sprühhelfer dagegen organische Lösungsmittel. Der ESI-Quelle ist zur Probenauftrennung häufig eine Nano-*high performance liquid chromatography* (HPLC), hier mit einer Flussrate von  $\leq 200$  nl/min, vorgeschaltet.

Die Ionen treten in eine Ionenfalle ein, in der sie in einem elektrischen Feld für variable Zeiten stabile Bahnen beschreiben und dann nach ihrer Masse analysiert werden. Durch nachfolgende Selektierung einer bestimmten Masse des gemessenen Spektrums in der Ionenfalle sowie Zugabe von Kollisionsgas können MS-MS-Analysen durchgeführt werden, wobei die genannten Ionen weiter fragmentiert und die entstehenden Tochter-Ionen wiederum nach ihrer Masse analysiert werden.

#### **B.6.2.5 Durchführung der ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie**

Auch hier wurden die relevanten Proteinspots manuell ausgestanzt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die weiteren Schritte umfassen den einleitenden Waschprozess, enzymatischen Verdau und letztlich die massenspektrometrische Identifizierung.

Der Waschprozess verläuft nach schon erwähntem Prinzip, dem abwechselnden Quellen und Schrumpfen der Proteinspots. Es wurde nacheinander, zweimalig mit 200  $\mu$ l 100%igem ACN bzw. mit 0,79 g Ammoniumhydrogencarbonat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in 100 ml Reinstwasser, 18,2 m $\Omega$ , gewaschen. Es erfolgte jeweils eine Inkubation für 10 min bei 37 °C im Brutschrank und entsprechendes Abnehmen des Überstandes mit einer Pipette. Der Überstand wurde verworfen. Zum Abschluss des Waschprozesses wurden nochmals 200  $\mu$ l 100%iges ACN zugegeben, gefolgt von einer Inkubation von 10 min bei 37 °C und anschließendem Abpipettieren des Überstandes.

Die geschrumpften Proteinspots werden kurz angetrocknet und im nächsten Schritt dem enzymatischen Verdau unterzogen. Zu jedem Proteinspot in den 1,5 ml Eppendorfgläsern wurden 16 µl Trypsinlösung zugegeben. Diese wurde wie folgt hergestellt: Zunächst wurden 20 µg Trypsin (Promega, Mannheim, Deutschland) mit einem Trypsin-Resuspensionspuffer (Promega, Mannheim, Deutschland) resuspendiert; dieser Suspension wurden 50 µl entnommen und mit 1 ml oben erwähnter Ammoniumhydrogencarbonatlösung, 1ml Reinstwasser, 18,2 mM, und 20 µl 100 mM Kalziumchloridlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermischt. Die Spots wurden gut mit der Trypsinlösung bedeckt und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Nach dem enzymatischen Verdau wurden 16 µl der Peptidlösung der verdauten Proteinspots abgenommen, in Gefäße (Glasvial G1 mit Mikroinsert G30, CS-Chromatographie, Langerwehe, Deutschland), die für das Messen mit dem Massenspektrometer optimiert sind, überführt und in das ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer (LCQ DECXP, Thermofinnigan, Dreieich, Deutschland) eingesetzt. Dem ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer ist eine chromatographische Einheit (HPLC mit einer C18 Reversed Phase Säule, LC Packing Nano HPLC System, Dionex, Germering, Deutschland) vorgeschaltet. Die Funktionsüberprüfung des Gerätes wurde nach Bedarf mit einem Standard: 100 fmol Alkoholdehydrogenase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst in Reinstwasser, 18,2 mM, durchgeführt.

#### **B.6.2.6 Auswertung der Massenspektren der ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie**

Zur Identifizierung der Proteine wurden die experimentell erhobenen Daten in die Suchmaschine SEQUEST, [www.fields.scripps.edu/sequest](http://www.fields.scripps.edu/sequest) (Standardparameter), eingespeist. Auch hier wurde gegen die nicht redundante Proteinsequenzdatenbank NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) gesucht. Ein Ergebnis wurde akzeptiert, wenn in mindestens zwei Proben mindestens zwei Peptide sicher identifiziert wurden (individueller *ion score* >41 entsprechend  $p < 0,05$ ).

#### **B.6.3 Datenbank-Recherche zur Charakterisierung identifizierter Proteine**

Die identifizierten Proteine wurden durch die Anwendung weiterer Datenbanken bzgl. Funktion, Vorkommen und weiteren biologischen, biochemischen und physikalischen Eigenschaften analysiert. Es wurden folgende Datenbanken zur Recherche herangezogen: [www.ca.expasy.org](http://www.ca.expasy.org), [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)

und [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk). Insbesondere wurden die *tools* BLAST (auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und Swiss-Prot (auf [www.ca.expasy.org](http://www.ca.expasy.org)) verwendet.

## C Ergebnisse

### C.1 2D-Großgel-Analyse

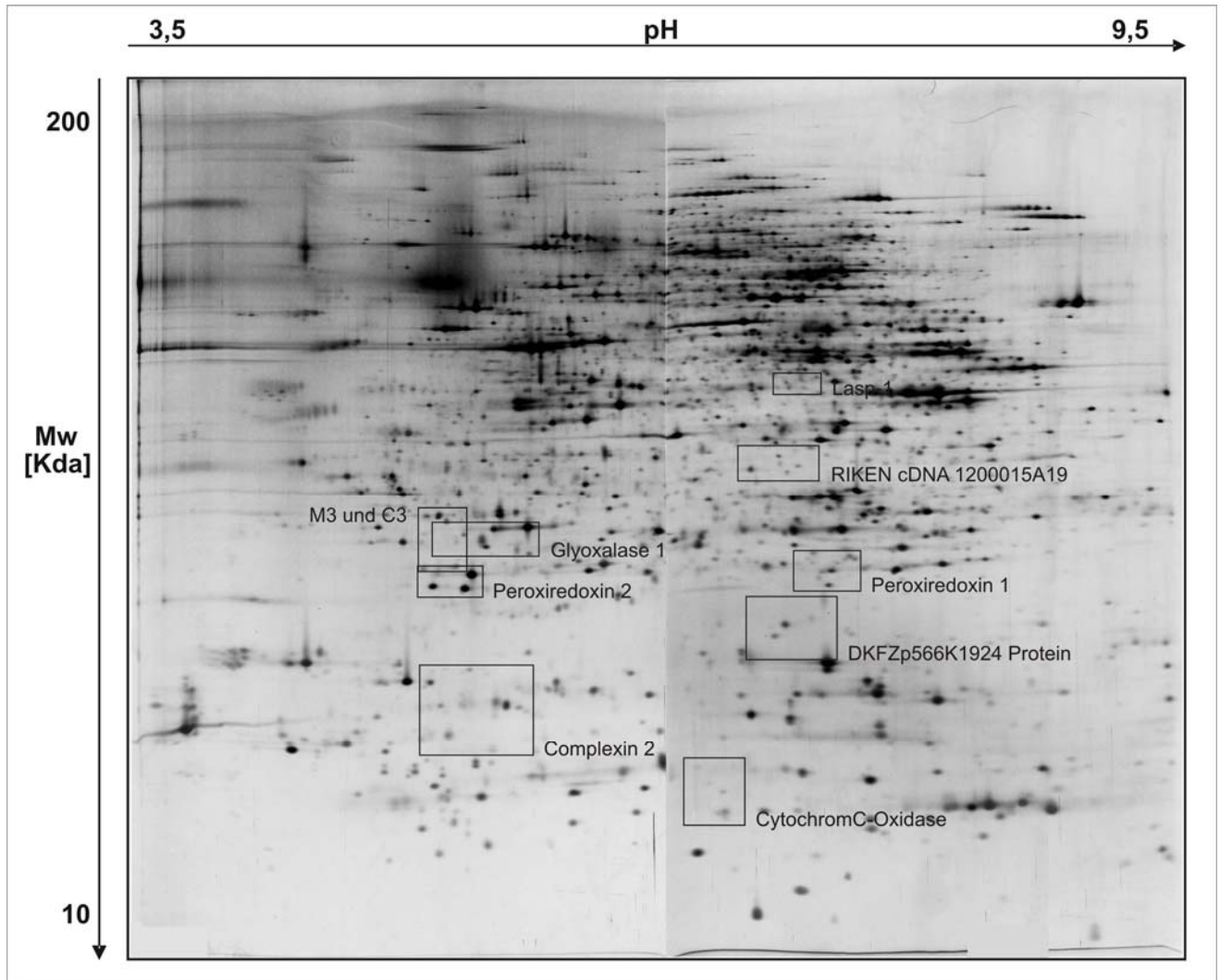


Abbildung 2: 2D-Großgel. Die unter C.1.1 und C.1.2 dargestellten Ausschnitte mit signifikant veränderten Spots sind gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit untersucht ventrales Mittelhirn und Großhirn von **10 Parkin-Knockout- und 10 Kontrollmäusen mit isogenem Hintergrund (129/Sv)** mittels 2D-Großgel-Analyse auf Proteomveränderungen. Aufgrund möglicher Laufunterschiede in der Elektrophorese wird dieselbe Paarkonstellation zwischen Knockout- und Kontrolltier in allen Arbeitsschritten beibehalten. Nach visueller Vorauswertung werden für ca. 100 Kandidatenspots **softwaregestützt** relative Spotvolumina berechnet und die Volumenänderung im Knockout auf statistische Signifikanz geprüft. Aufgrund des Stichprobenumfangs und der Paarbindung wird

hierzu der **Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben** angewandt. Eine Spotvolumenänderung wird als signifikant akzeptiert, wenn  $\alpha \leq 5\%$ . Aus einer Spotvolumenänderung wird auf die Konzentrationsänderung eines Proteins bzw. seiner Isoform geschlossen. (Zur Definition des Begriffs Spotvolumen *vide* B.4.2) Durch massenspektrometrische Analyse werden die enthaltenen Proteine identifiziert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Gelauswertung und statistischen Testung sowie Proteinidentifizierung in Abbildungen und Tabellen dargestellt und erläutert. Im Anschluss werden Charakteristika und allgemeine biologische Bedeutung der identifizierten Proteine umrissen.

### **C.1.1 2D-Großgel-Analyse des ventralen Mittelhirns**

Das ventrale Mesencephalon enthält unter anderem die Substantia nigra. Die Degeneration deren melaninreicher Neuronen stellt den prominentesten histopathologischen Befund bei M. Parkinson dar. Fünf Spots des ventralen Mesencephalon zeigen eine statistisch signifikante Volumenänderung. Sie erhalten Kurzbezeichnungen  $M_x$ , wobei M für Mesencephalon steht und x die laufende Nummer darstellt.

Tabelle 2 gibt die Ergebnisse der 2D-Gelanalyse des Mittelhirns wieder. Für alle signifikant veränderten Spots werden die visuelle und softwaregestützte Auswertung von jeweils zehn Gelpaaren sowie der p-Wert nach statistischer Testung durch Wilcoxon-Test dargestellt. Die mediane Volumenabweichung des Knockouts vom Wildtyp in % soll als Anhaltspunkt für die Proteinkonzentrationsänderung im Spot dienen, wobei hier keine lineare Beziehung vorliegt.

**Tabelle 2: Signifikante Spotvolumenänderungen im ventralen Mesencephalon**

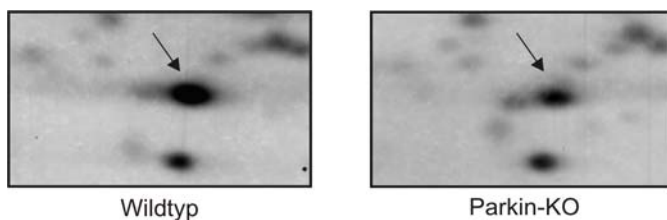
Spot		M1	M2	M3	M4	M5
visuelle Vorauswertung	n (Vol ↓)	8	7	9	8	5
	n (Vol ↑)	1	1	1	1	1
	n (Vol =)	1	2	0	0	2
Auswertung durch Proteomweaver	n (Vol ↓)	8	8	9	7	7
	n (Vol ↑)	2	2	1	2	1
	med. Vol <sub>WT</sub>	0,431	1,154	0,388	0,431	0,329
	med. Vol <sub>KO</sub>	0,291	0,944	0,274	0,291	0,186
	med. Vol <sub>KO</sub> /Vol <sub>WT</sub>	0,865	0,805	0,624	0,810	0,621
	med. ΔVol [%]	-14%	-20%	38%	-19%	-38%
p-Wert	0,037	0,037	0,028	0,028	0,025	

Aufgeführt werden die Anzahl der Volumenminderungen und -steigerungen, die Mediane der durch Proteomweaver ermittelten relativen Spotvolumina in Wildtyp und Knockout sowie deren mediane Quotienten mit der resultierenden medianen Volumenabweichung des Knockouts vom Wildtyp in %.

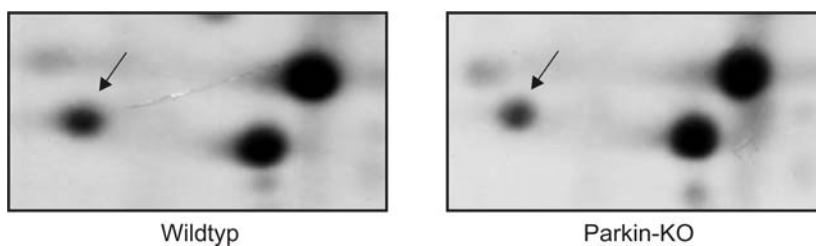
**Legende:** n Anzahl der Gelpaare, Vol ↓ Spotvolumenminderung, Vol ↑ Spotvolumensteigerung, Vol = Spotvolumenkonstanz, med. Vol<sub>WT</sub> Median der relativen Spotvolumina im Wildtyp, med. Vol<sub>KO</sub> Median der relativen Spotvolumina im Knockout, med. Vol<sub>KO</sub>/Vol<sub>WT</sub> Median der Quotienten der relativen Spotvolumina Vol<sub>KO</sub>/Vol<sub>WT</sub>, med. ΔVol [%] Median der prozentualen Änderung des Spotvolumens im Knockout

**Anmerkung:** Wenn die Summe aus n Ausprägungen nicht 10 ergibt, ist der entsprechende Spot in einzelnen Gelpaaren nicht auswertbar (z.B. an der Schnittkante zwischen saurem und basischem Gel; M5 in 2 Gelpaaren nicht vorhanden).

Abbildungen 3-7 zeigen exemplarisch die Spotvolumenänderung in einem Gelpaar.



**Abbildung 3: Spot M1 und C1. Peroxiredoxin 1**



**Abbildung 4: Spot M2. Peroxiredoxin 2**

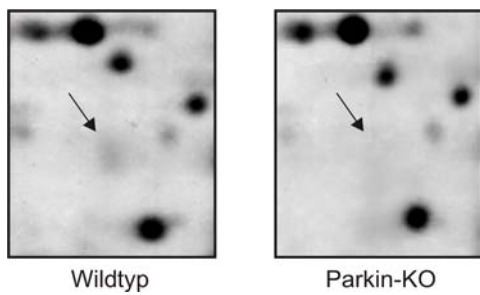


Abbildung 5: Spot M3 und C3

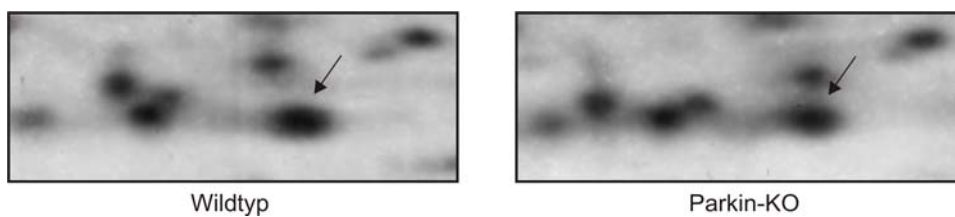


Abbildung 6: Spot M4. Lasp-1

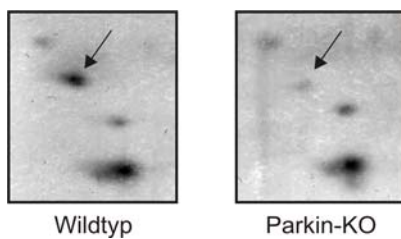


Abbildung 7: Spot M5. CytochromC-Oxidase, Untereinheit Vb

Abbildungen 8-12 visualisieren die Ergebnisse der statistischen Testung in *box plots*.

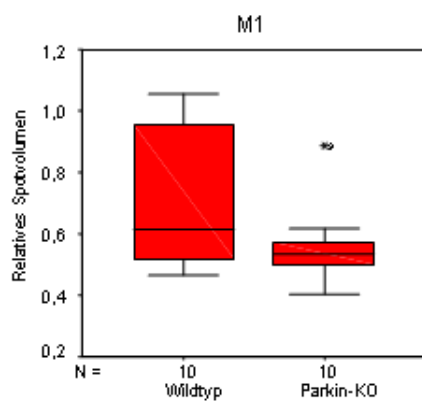


Abbildung 8: *box plot* zu Spot M1. Peroxi-redoxin 1

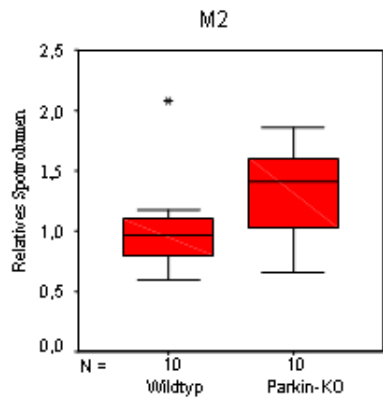


Abbildung 9: *box plot* zu Spot M2. Peroxi-redoxin 2

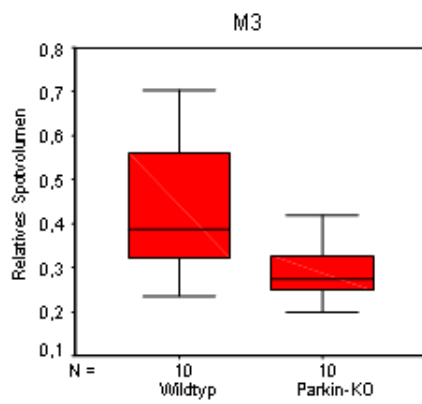


Abbildung 10: *box plot* zu Spot M3

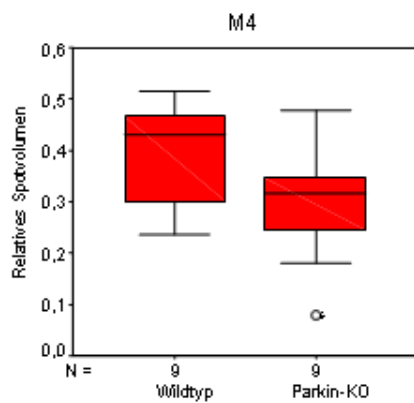


Abbildung 11: *box plot* zu Spot M4. Lasp-1



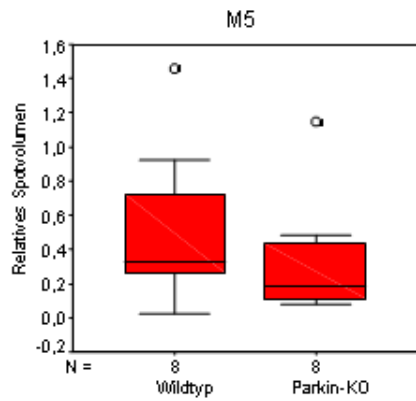


Abbildung 12: *box plot* zu Spot M5. CytochromC-Oxidase, Untereinheit Vb

**Legende:** Whiskers, Boxränder und Boxmittellinie dem Maximum und Minimum, der 25., und 75. Perzentile bzw. der 50. Perzentile der Spotvolumina der Knockout- bzw. Wildtypgruppe entsprechen.

### C.1.2 2D-Großgel-Analyse des Großhirns

Sechs Spots des Großhirns zeigen eine statistisch signifikante Volumenänderung. Es werden Kurznamen  $C_x$  vergeben, wobei C für Cerebrum steht und x durch die laufende Nummer ersetzt wird.

**Tabelle 3: Signifikante Spotvolumenänderungen im Großhirn**

Spot		C1	C2	C2+	C3	C4	C5	C6
visuelle Vorauswertung	n (Vol ↓)	6	9		8	1	5	7
	n (Vol ↑)	1	1		1	7	0	1
	n (Vol =)	2	0		1	2	4	2
Auswertung durch Proteomweaver	n (Vol ↓)	9	9	9	7	2	8	7
	n (Vol ↑)	0	1	1	2	8	1	3
	n (Vol =)	1	0	0	0	0	0	0
	med. Vol <sub>WT</sub>	1,195	2,232	3,296	0,349	0,964	0,778	0,195
	med. Vol <sub>KO</sub>	0,922	1,804	2,823	0,137	1,414	0,648	0,144
	med. Vol <sub>KO</sub> /Vol <sub>WT</sub>	0,829	0,790	0,851	0,545	1,248	0,898	0,791
	med. ΔVol [%]	-17%	-21%	-15%	-46%	+25%	-10%	-21%
p-Wert	0,008	0,047	0,037	0,012	0,037	0,028	0,047	

Aufgeführt werden die Anzahl der Volumenminderungen und -steigerungen, die Mediane der durch Proteomweaver ermittelten relativen Spotvolumina in Wildtyp und Knockout sowie deren mediane Quotienten mit der resultierenden medianen Volumenabweichung des Knockouts vom Wildtyp in %.

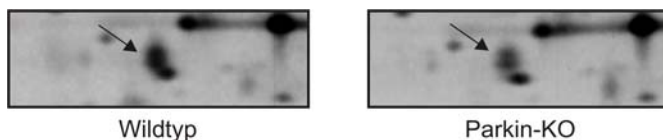
**Legende:** n Anzahl der Gelpaare, Vol ↓ Spotvolumenminderung, Vol ↑ Spotvolumensteigerung, Vol = Spotvolumenkonstanz, med. Vol<sub>WT</sub> Median der relativen Spotvolumina im Wildtyp, med. Vol<sub>KO</sub> Median der relativen Spotvolumina im Knockout, med. Vol<sub>KO</sub>/Vol<sub>WT</sub> Median der Quotienten der relativen Spotvolumina Vol<sub>KO</sub>/Vol<sub>WT</sub>, med. ΔVol [%] Median der prozentualen Änderung des Spotvolumens im Knockout

**Anmerkungen:**

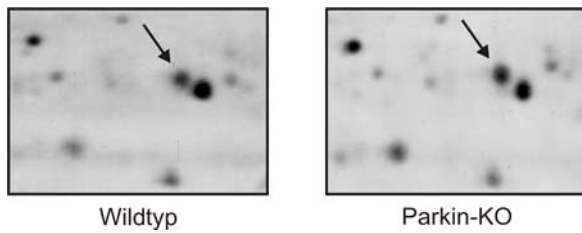
1) Wenn die Summe aus n Ausprägungen nicht 10 ergibt, ist der entsprechende Spot in einzelnen Gelpaaren nicht auswertbar (z.B. an der Schnittkante zwischen saurem und basischem Gel; M5 in 2 Gelpaaren nicht vorhanden).

2) Da Spot C2 sehr nah an seinem starken, visuell volumenkonstanten Nachbarspot liegt, betrachtet *Proteomweaver* diese zwei Spots in einigen Gelen als einen gemeinsamen Spot. Dies macht eine manuelle Spottrennung erforderlich, die die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stört. Daher wurde die Signifikanz der Volumenänderung im ersten Test nach manueller Spottrennung allein für den Zielspot C2 geprüft; im zweiten Test wurden die beiden Spots in allen Gelen als gemeinsamer Spot C2+ definiert und analysiert. In beiden Tests erwies sich die Spotvolumenänderung als statistisch signifikant, so dass von einem sicheren Ergebnis auszugehen ist. C2+ zeigt eine geringere prozentuale Volumenminderung, da der volumenkonstante Nachbarspot enthalten ist.

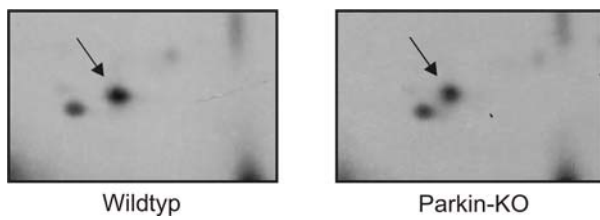
Abbildungen 13-16 zeigen exemplarisch die Spotvolumenänderung in einem Gelpaar. Spots C1 und C3 *vide* C.1.1.



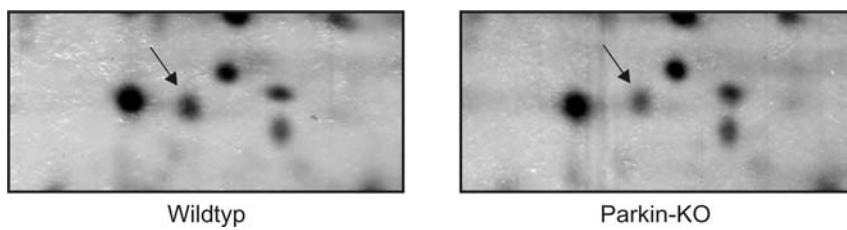
**Abbildung 13: Spot C2. Glyoxalase 1**



**Abbildung 14: Spot C4. Complexin 2**

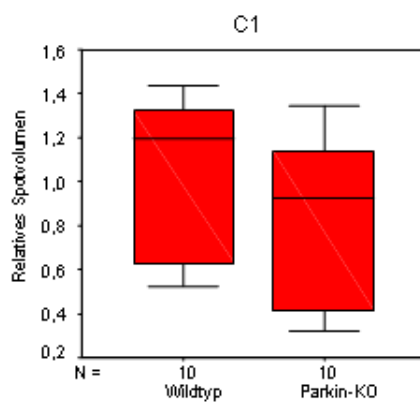


**Abbildung 15: Spot C5. Similar to DKFZp566K1924 Protein**



**Abbildung 16: Spot C6. RIKEN cDNA 1200015A19**

Abbildungen 17-22 visualisieren die Ergebnisse der statistischen Testung in *box plots*.



**Abbildung 17: *box plot* zu Spot C1. Peroxisredoxin 1**

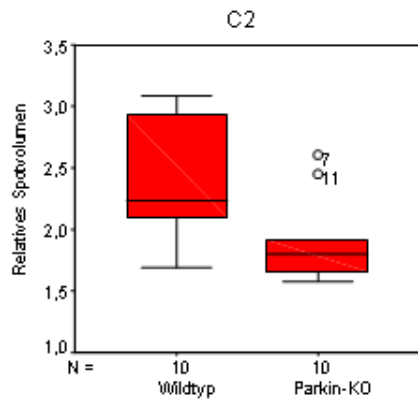


Abbildung 18: *box plot* zu Spot C2. Glyoxalase 1

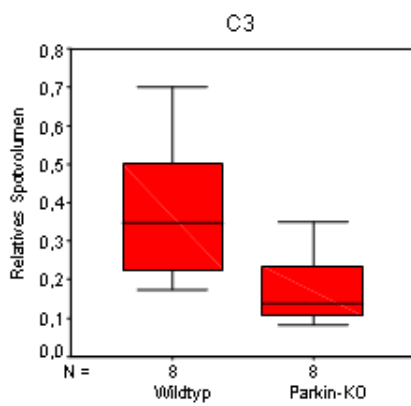


Abbildung 19: *box plot* zu Spot C3

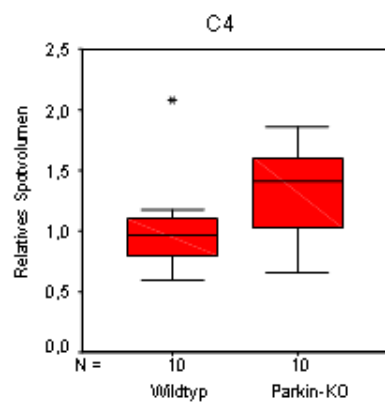


Abbildung 20: *box plot* zu Spot C4. Complexin 2

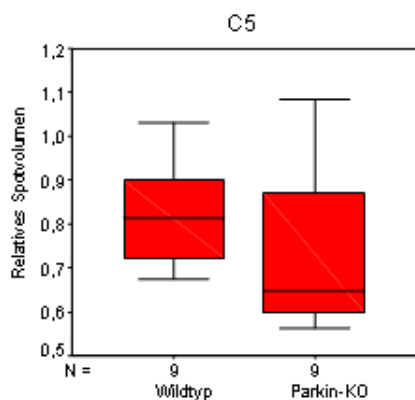


Abbildung 21: *box plot* zu Spot C5. Similar to DKFZp566K1924 Protein

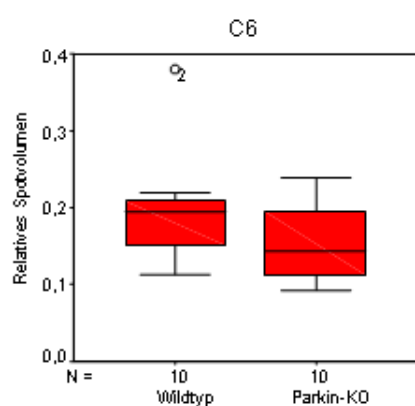


Abbildung 22: *box plot* zu Spot C6. RIKEN cDNA 1200015A19

**Legende:** Whiskers, Boxränder und Boxmittellinie dem Maximum und Minimum, der 25., und 75. Perzentile bzw. der 50. Perzentile der Spotvolumina der Knockout- bzw. Wildtypgruppe entsprechen.

## C.2 Proteinidentifizierung

In den folgenden Tabellen werden die Parameter der sichersten Identifizierung jedes Spots angegeben.

**Tabelle 4: Identifizierungsparameter der signifikant veränderten Spots des ventralen Mittelhirns**

Spot	M1	M2	M4*	M5*
NCBI accession nr.	54035546	51980699	6754508	6753500
Gen	Prdx1	Prdx2	Lasp1	Cox5b
Swiss-Prot-Nr.	P35700	Q61171	Q61792	P19536
MS-Methode	ESI	ESI	ESI	ESI
n (Peptide)	12	5	10	12
score	538	240	409	218
theor. pI	8,26	5,20	6,61	8,69*
theor. MW [kDa]	22	22	30*	14

**Tabelle 5: Identifizierungsparameter der signifikant veränderten Spots des Großhirns**

Spot	C2	C4	C5	C6
NCBI accession nr.	31981282	6753508	38091306	21312776
Gen	Glo1	Cplx2	1500041B	1200015A
Swiss-Prot-Nr.	Q9CPU0	P84086	Q5M8N0	Q9DBS2
MS-Methode	ESI	ESI	MALDI	MALDI
Sequenzabdeckung n (Peptide)	9	6	71%	51%
score	362	252	113	88
theor. pI	5,24	5,06	7,74	6,92
theor. MW [kDa]	21	15	19	30

**Legende:** *ESI* ESI-MS, *vide* B.6.2.4, *MALDI* MALDI TOF MS, *vide* B.6.2.1, *n (Peptide)* Anzahl der übereinstimmenden Peptide, *score*, *theor. pI* theoretischer pI, *theor. MW* theoretisches Molekulargewicht, \* siehe Anmerkung im Text.

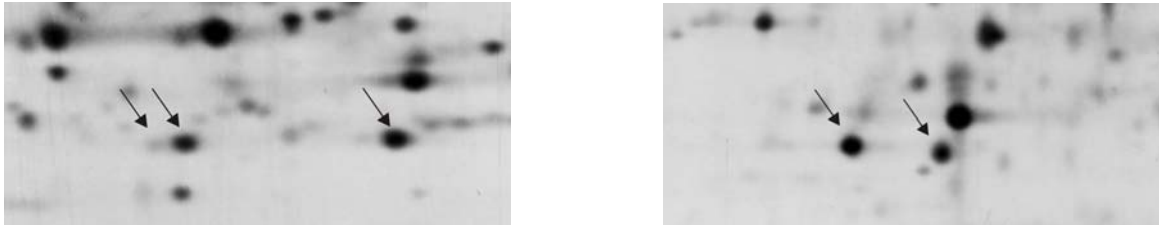
Während in allen anderen Fällen theoretisches Molekulargewicht (MW) und isoeletrischer Punkt (pI) des identifizierten Proteins mit dem elektrophoretischen Migrationsverhalten des Spots im Großgel übereinstimmen, fallen bei M4 und M5 Besonderheiten auf.

Für **Lasp-1** (M4\*) werden ein Molekulargewicht von 30 kDa und ein pI von 6,6 berechnet. [Swiss-Prot, *vide* B.6.3] Migrationsverhalten von M4 korreliert mit dem angegebenen pI, jedoch nicht mit dem errechneten Molekulargewicht; der Spot liegt eher bei 37 kDa. Eine im Rattenhirn nachgewiesene 37-kDa-Isoform [83] dürfte damit auch in der Maus existieren.

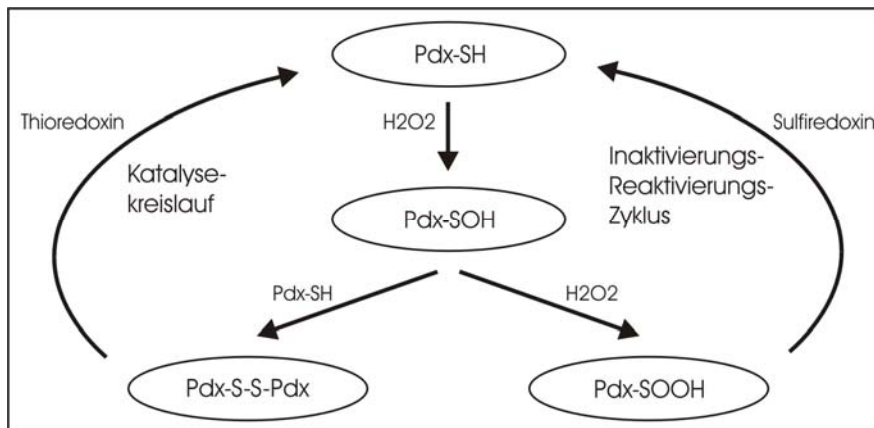
**CytCOx Vb** (M5\*) wird als Precursorprotein (MW 13,8 kDa, pI 8,7) mit mitochondrialem Transitpeptid synthetisiert; für die funktionelle Form werden ein Molekulargewicht von 10,7 kDa und ein pI von 5,7 berechnet. Die Migration des Spots in der zweiten Dimension passt zum Molekulargewicht des Precursorproteins, die in der ersten Dimension korreliert dagegen mit dem pI der funktionellen Form ohne Transitpeptid. Da aus dem Sequenzbereich des Transitpeptids (Aminosäuren 1-30 von 128) keine Peptide identifiziert wurden, bleibt die Zuordnung unklar.

Aufgrund der geringen Proteinmenge in dem sehr schwachen Spot **C3** führte die massenspektrometrische Identifizierung auch per ESI-MS und unter spezieller Anpassung des Procedere nicht zu einem signifikanten Suchergebnis. Spot M3/C3 liegt auf gleicher Höhe mit **C2 (Glyoxalase 1)**, in einen etwas acideren pI-Bereich verschoben. Sein Volumen verhält sich in jedem Paar identisch mit C2. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass es sich hier um eine modifizierte Form von C2 handelt, beispielsweise durch **Oxidation**.

Die **Peroxiredoxine** sind jeweils mit mehreren **Isospots** im 2D-Gel vertreten, von denen nur je ein Spot signifikant volumengemindert ist. Bei unveränderter Konzentration der übrigen Formen dürfte dies zum einen eine verminderte Gesamtkonzentration der Peroxiredoxine bedeuten. Interessant wäre zum anderen, *welcher Isoform* der volumengeminderte Spot entspricht.



**Abbildung 23: Bekannte Peroxiredoxin-1- (linkes Bild) bzw. Peroxiredoxin-2-Isoformen (rechtes Bild)**



**Abbildung 24: Redox-Kreislauf der typischen Peroxiredoxine**

Die 2-cys-Peroxiredoxine werden an funktionellen Cysteinen oxidiert. Die reduzierte und die funktionell oxidierte Form stehen in einem vom zellulären Redoxzustand abhängigen Gleichgewicht. Die reversibel überoxidierte Form kann enzymatisch in die reduzierte Form überführt werden; die irreversibel überoxidierte Form (-SO<sub>3</sub>H, Sulfonsäure) wird abgebaut.

**Legende:** Pdx-SH reduzierte, aktive Form, Pdx-SOH funktionell oxidierte Form (Thiol), Pdx-SO<sub>2</sub>H reversibel überoxidierte Form (Sulfinsäure)

[in Anlehnung an Jin, Y.S., et al., Free radical scavenging and hepatoprotective actions of Quercus aliena acorn extract against CCl<sub>4</sub>-induced liver. Free Radic Res, 2005. 39(12): p. 1351-8.]

Eine Besonderheit der Peroxiredoxine besteht darin, dass nicht Kofaktoren, sondern sie selbst als Reduktionsmittel ihrer Substrate fungieren, wobei sie an funktionellen Cysteinen reversibel

oxidiert werden. [84] Da Anzeichen vermehrten oxidativen Stresses im Modell vorliegen [85], erscheint eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zu stärker oxidierten Formen naheliegend. Leider konnte auch eine gezielte *Mascot*-Suche den Oxidationszustand der einzelnen Spotproteine nicht ermitteln: Peptide mit funktionellem Cystein wurden weder mit noch ohne Berücksichtigung peroxiredoxintypischer, oxidativer Modifikationen erkannt. Auch für Spot M2 wurden keine konkreten oxidativen Veränderungen erkannt. So lässt sich lediglich spekulieren, es handle sich bei den Peroxiredoxin-1-Spots von basisch nach sauer um eine Reihe zunehmend oxidiert Formen, wobei der volumengeminderte Spot einer der beiden mittleren Oxidationsstufen entsprechen dürfte. [86]

### C.3 Ergebnis der Proteomanalyse von ventralem Mittelhirn und Großhirn

Alle beobachteten Veränderungen sind quantitativer Art.

**Elf Spotvolumenänderungen** liegen im Signifikanzbereich von  $\alpha \leq 5\%$ , **sechs** weitere Spots zeigen **Tendenzen** zur Volumenänderung mit  $5\% < \alpha \leq 10\%$  (*vide* F.6). Es wurden deutlich mehr Volumenminderungen als -steigerungen gefunden: Zehn signifikante Volumenminderungen und eine signifikante Volumensteigerung sind zu verzeichnen.

Im **ventralen Mittelhirn** sind fünf Spotvolumina signifikant ( $\alpha \leq 5\%$ ) verändert; es handelt sich ausschließlich um Volumenminderungen. Im **Großhirn** sind sechs Spotvolumina signifikant ( $\alpha \leq 5\%$ ) verändert. Darunter finden sich fünf Volumenminderungen und eine Volumensteigerung.

In Tabelle 6 erscheinen alle signifikanten Ergebnisse ( $\alpha \leq 5\%$ ) mit identifiziertem Protein, geordnet nach Hirnregion und Ausrichtung der Spotvolumenänderung.

**Tabelle 6: Signifikante Spotvolumenänderungen**

Hirnregion	Volumenänderung	Spot	Protein
ventrales Mesencephalon	Volumenminderung	M1	Peroxiredoxin 1
		M2	Peroxiredoxin 2
		M3	nicht identifiziert
		M4	Lasp-1
		M5	CytochromC-Oxidase
Großhirn	Volumenminderung	C1	Peroxiredoxin 1
		C2	Glyoxalase 1
		C3	nicht identifiziert
		C5	Similar to DKFZp566K1924 Protein
		C6	RIKEN cDNA 1200015A19
		Volumensteigerung	C4



Zwei Spots sind in **beiden** untersuchten **Hirnregionen** signifikant verändert. M1 und C1 entsprechen Peroxiredoxin 1; die einander in Position und Aussehen entsprechenden Spots M3 und C3 konnten nicht identifiziert werden.

Tabelle 7 führt Spots auf, die *ausschließlich* in *einer* der beiden Hirnregionen signifikant verändert sind, und zeigt deren Verhalten in der zweiten untersuchten Region: Ratio zwischen Volumensteigerung und Volumenminderung entsprechend der softwaregestützten Auswertung sowie p-Wert für die entsprechende Volumenänderung.

**Tabelle 7: Nur in *einer* Hirnregion volumenveränderte Spots und ihr Verhalten in der zweiten untersuchten Region**

Hirnregion mit signifikanter	Spot	Protein	Verhalten des Spots in der Hirnregion ohne signifikante Änderung			
			Region	Volumen ↓	Volumen ↑	p-Wert
ventrales Mittelhirn	M2 ↓	Peroxiredoxin 2	Großhirn	6 Paare	4 Paare	0,203
	M4 ↓	Lasp-1		5 Paare	4 Paare	0,678
	M5 ↓	CytochromC-Oxidase		4 Paare	3 Paare	0,866
Großhirn	C2 ↓	Glyoxalase 1	ventrales	7 Paare	3 Paare	0,114
	C5 ↓	Similar to DKFZp566K1924 Protein	Mittelhirn	7 Paare	3 Paare	0,169
	C6 ↓	RIKEN cDNA 1200015A19		7 Paare	3 Paare	0,262
	C4 ↑	Complexin 2		3 Paare	7 Paare	0,169

Im Anhang findet sich eine Tabelle mit Proteinen, die lediglich eine *Tendenz* zur Spotvolumenänderung zeigen ( $5\% \leq \alpha \leq 10\%$ ), jedoch als *targets* für weitere Untersuchungen in Frage kommen (vide F.6)

#### C.4 Identifizierte Proteine – Vorkommen, Eigenschaften und Funktion

Tabelle 8 fasst die identifizierten Proteine zu Funktionsgruppen im weiteren Sinne zusammen.

**Tabelle 8: Proteine mit Spotvolumenänderungen und ihre Funktion**

Stichwort zur Funktion	Protein	Spot	Bemerkung
antioxidativ	Peroxiredoxin 1	M1/C1	Reduktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Peroxy-nitrit und Hydroperoxiden
	Peroxiredoxin 2	M2	
	Glyoxalase 1	C2	Verhinderung von advanced glycation end products
mitochondriale Atmungskette	CytochromC-Oxidase, UE Vb	M6	
synaptisch	Lasp-1	M4	F-Aktin-Assoziation
	Complexin 2	C5	synaptische Vesikelexozytose
unklar	similar to DKFZp566K1924	C8	
	RIKEN cDNA 1200015A19	C9	

#### **C.4.1 Peroxiredoxin 1 (M1, C1) und 2 (M2) – Eigenschaften, Formen und Funktion**

Die Peroxiredoxine sind eine Familie ubiquitär vorkommender, antioxidativer Enzyme. Sie reduzieren Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit und organische Hydroperoxide (R-O-OH), wodurch sie allgemein oxidativen Stress vermindern. Indem sie insbesondere die Wasserstoffperoxidkonzentration regulieren, greifen sie überdies ins sogenannte *redox signalling* ein. Über zytokininduzierte zelluläre Signalkaskaden beeinflusst dies Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Sie gehören zu den mengenmäßig bedeutendsten Proteinen und sind vor allem zytosolisch lokalisiert. [84]

Bei Säugetieren sind sechs Peroxiredoxine bekannt, auch Thioredoxinperoxidasen oder Alkyl-Hydroperoxidreduktase-C22-Proteine genannt. Ihre reduzierende Funktion wird jeweils durch ein konserviertes Cystein vermittelt. Man gruppiert sie in die typischen 2-Cystein-, atypische 2-Cystein- und 1-Cystein-Peroxiredoxine, die sich in der Art ihrer Rückführung in den reduzierten Zustand und in ihren Oligomerisationseigenschaften unterscheiden. [84]

Peroxiredoxin 1 und 2 sind typische 2-Cystein-Peroxiredoxine. Peroxiredoxin 1 wird zytosolisch, aber auch nukleusassoziiert nachgewiesen [84] und im Menschen fast ausschließlich glial exprimiert, insbesondere in Astrozyten und ependymalen Zellen. [87] Peroxiredoxin 2 kommt dagegen zytosolisch und membranassoziiert [84] und im menschlichen Hirn fast ausschließlich neuronal vor. [87]

#### **C.4.2 Lasp-1 (M4)**

Lasp-1, auch *LIM and SH3 protein 1* genannt, ist ein F-Aktin-assoziiertes Protein, das in den apikalen Membranen der gastrischen Parietalzellen angereichert ist, nach neueren Erkenntnissen aber auch in Synapsen des ZNS, insbesondere in Klein- und Großhirn, weniger im Hirnstamm.

Spot M4 entspricht am ehesten einer zerebral und hepatisch nachgewiesenen 37-kDa-Isoform des Proteins, die durch posttranslationale Modifizierung oder alternatives Spleißen entstehen dürfte, deren molekulare Charakteristika aber ungeklärt sind. Im Gegensatz zur kleineren 30-kDa-Isoform, die in der Ratte besonders postsynaptisch angereichert ist, kommt die 37-kDa-Isoform in allen synaptischen Fraktionen gleichermaßen vor. [83]

Lasp-1 besitzt eine N-terminale LIM-Domäne, *Nebulin-repeats* und eine C-terminale SH3-Domäne. In gastrischen Parietalzellen ist Lasp-1 an der cAMP-induzierten Aktinreorganisation beteiligt. [88] Seine Funktion in Neuronen ist noch weitgehend ungeklärt, seine Rolle in

Magenzellen sowie Beobachtungen an hippokampalen Zellkulturen lassen jedoch eine Bedeutung für Synaptogenese und Plastizität vermuten. (*vide* D.2.2)

#### **C.4.3 CytochromC-Oxidase, Untereinheit Vb (M5)**

Die CytochromC-Oxidase, auch Komplex IV genannt, ist die letzte der drei Protonenpumpen in der mitochondrialen Atmungskette. Sie akzeptiert Elektronen von CytochromC und reduziert molekularen Sauerstoff zu Wasser. Sie wird u.a. durch Stickoxid und Kohlenmonoxid gehemmt. [89]

Die CytochromC-Oxidase setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, wobei Untereinheit V durch nukleäre DNA kodiert wird. Die nukleär kodierten Untereinheiten treten als gewebespezifische Isoformen auf. [90]

Änderungen von Konzentration oder Aktivität der mitochondrialen Protonenpumpen wurden in verschiedenen, insbesondere neuronalen, Erkrankungen festgestellt.

#### **C.4.4 Glyoxalase 1 (C2)**

Das Glyoxalase-System, bestehend aus Glyoxalase 1 und 2, wandelt kleine, reaktive  $\alpha$ -Carbonylaldehyde in D-Säuren um und verhindert so die Bildung von *advanced glycation end products*, die wiederum an der Entstehung von Alzheimer-Plaques und Tangles sowie an diabetischen Komplikationen beteiligt sein sollen. [91]

Glyoxalase-1-Aktivität ist in allen humanen Geweben nachweisbar. [92]

Substrate der Glyoxalase 1 sind beispielsweise die  $\alpha$ -Carbonylaldehyde Methylglyoxal und Glyoxal. Methylglyoxal entsteht nichtenzymatisch als Nebenprodukt der Glykolyse aus Glycerol-3-phosphat. Es ist hoch reaktiv und bildet Addukte mit Proteinen und Nukleotiden, wodurch DNA-Synthese und Zellproliferation gehemmt werden. [92, 93] Es scheint über Entstehung von ROS in einigen Zelltypen die oxidative Phosphorylierung zu hemmen. [94, 95]

Glyoxalase 1 benötigt GSH als Cofaktor und wird durch S-Nitrosoglutathion (GSNO) gehemmt, während oxidativer Stress im Allgemeinen, z.B. via Wasserstoffperoxid, ihre Aktivität nicht beeinflusst. [96, 97]

#### **C.4.5 Complexin 2 (C4)**

Complexin 2 ist im Hirn weitverbreitet und in, vorrangig exzitatorischen, Synapsen angereichert. Es ist spezifisch an synaptischer Vesikelexozytose beteiligt, nicht jedoch an unspezifischen, ubiquitären Exozytosevorgängen. Mittels synaptischer Vesikelexozytose werden Neurotransmitter schnell und calciumabhängig an der sogenannten aktiven Zone ausgeschüttet, indem Vesikelmembran und Plasmamembran verschmelzen. Vorher notwendige Schritte sind das Andocken der synaptischen Vesikel an die aktive Zone und ihre folgende Reifung, genannt *priming*. Nach der Membranfusion und Transmitterausschüttung werden synaptische Vesikelmembranen und Proteinbestandteile endozytotisch zurückgewonnen und für weitere Transmissionszyklen wiederverwertet. Es existieren verschiedene Hypothesen, welchen dieser Schritte die Complexine beeinflussen; jedoch scheinen sie nach dem Andockschrift einzugreifen. [98]

Die Complexine interagieren mit dem vollständigen SNARE-Komplex, einem zentralen Effektor der synaptischen Vesikelexozytose. (SNARE ist das Akronym aus *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor*.) Dort binden sie an der Furche zwischen Synaptobrevin- und Syntaxinhelices. [99]

#### **C.4.6 Similar to DKFZp566K1924 Protein (C5)**

Das humane, hypothetische DKFZp566K1924-Protein hat eine Sequenz von 164 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von 18,5 kDa und einen errechneten pI von 7,9. Seine Funktion ist unbekannt. Das identifizierte Protein ist ein *ähnliches*, in der Maus beschriebenes Protein von ebenfalls 164 Aminosäuren, zu 96% identisch, folglich designiert *similar to DKFZp566K1924 protein*. [NCBI-Datenbank, *vide* B.6.2.3]

#### **C.4.7 RIKEN cDNA 1200015A19 (C6)**

Das murine RIKEN-cDNA-1200015A19-Protein wurde auf der Grundlage isolierter cDNA als 266-AS-Protein vorhergesagt. [NCBI-Datenbank, *vide* B.6.2.3, Swiss-Prot, *vide* B.6.3] Das humane analoge Protein *hypothetical protein LOC127262* zeigt 91% Sequenzidentität und 95% Ähnlichkeit zum murinen. [BLAST, *vide* B.6.3]

## **D Diskussion**

Wesentliches Merkmal der Parkinsonerkrankung ist der Untergang nigraler dopaminerger Zellen. Dieses Merkmal fehlt im Mausmodell; es kommt allerdings zu funktionellen Veränderungen. (Einführende Bemerkungen zum Mausmodell *vide* A.3.2 und A.5.5.)

Meiner Interpretation der Proteomveränderungen lege ich die These zugrunde, der Krankheitsprozess erreiche in der Maus nicht das *Stadium* der Degeneration -möglicherweise aufgrund kürzerer Lebensdauer-, die vorgefundenen molekularen Veränderungen entsprächen jedoch einem frühen Stadium der Pathogenese und seien relevante Voraussetzung für ein Erkranken. (*vide* D.8)

### **D.1 Molekularbiologische Interpretation der Proteomveränderungen bei Parkinson-Knockout im Hinblick auf die Pathobiochemie des M. Parkinson**

Die Mehrzahl der Spots mit signifikanten Volumenänderungen enthält Proteine mit Bezug zu oxidativem Stress und Energiehaushalt. In den folgenden Kapiteln wird geprüft, inwiefern die gängigen Thesen zur Pathogenese des M. Parkinson (*vide* A.2) durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse gestützt werden.

Zur Übersicht über Spotveränderungen und identifizierte Proteine *vide* C.4.

#### **D.1.1 Mitochondriale Dysfunktion**

Mitochondriale Funktionsstörungen stehen in engem Zusammenhang mit oxidativem Stress; ihr Vorliegen bei M. Parkinson ist vielfach verifiziert.

Prominenter Befund bei sporadischem M. Parkinson ist ein Komplex-I-Defizit. Die 2D-Gelanalyse ergab jedoch keine signifikante Spotveränderung der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I).

Signifikant verändert zeigt sich dagegen der mesencephale Spot M5, der um 38% volumengemindert ist und Untereinheit Vb der CytochromC-Oxidase (Komplex IV) entspricht. (*vide* C.1.1, C.2)

### D.1.1.1 CytochromC-Oxidase-Untereinheit Vb

*In vivo* katalysiert die CytochromC-Oxidase (CytCOx), der mitochondriale Komplex IV, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der oxidativen Phosphorylierung. Daneben wandelt die CytCOx Stickstoffmonoxid in Nitritonen ( $\text{NO}_2^-$ ) um, trägt also zum Abbau einer reaktiven Molekülspezies bei und beeinflusst das *redox signaling*. [100] Auch bei Parkinsonpatienten beobachtet man, abgesehen von der vielzitierten Komplex-I-Aktivität, eine Minderung der Komplex-IV-Aktivität. [101]

Zur Deckung ihres hohen Energiebedarfs besitzt die Substantia nigra eine besonders hohe CytochromC-Oxidase-Konzentration. [102] Im vorliegenden Modell ist die mesencephale Konzentration einer ubiquitären CytCOx-Untereinheit gegenüber den Kontrollen um ca. 38% vermindert. [103] Wenn sich dies proportional auf die CytCOx-Gesamtaktivität auswirkt, dürfte die oxidative Phosphorylierung - aufgrund der geschwindigkeitsbestimmenden Rolle des Enzyms - deutlich langsamer ablaufen. Aus einer Hemmung der Atmungskette **resultieren oxidativer Stress sowie Energiedefizit**, welche die **Integrität und Funktion mesencephaler Zellen** deutlich beeinträchtigen dürften. Zum einen entstehen vermehrt freie Radikale und NO-bedingte Schäden. Zum anderen bedingt ein ATP-Defizit erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und Exzitotoxizität.

### D.1.2 Oxidativer Stress

Ein erhöhtes Maß an oxidativem Stress bei M. Parkinson wurde vielfach nachgewiesen und ist als pathogenetischer Faktor weithin anerkannt. Auch das vorliegende Mausmodell rekapituliert diesen Befund. [85] Zu klären sind jedoch die diesem Befund zugrundeliegenden *Mechanismen*.

Während keine qualitativen Proteinveränderungen oxidativer und nitrativer Art nachgewiesen wurden, finden sich quantitative Veränderungen von Enzymen, die in Entstehung oder Kompensation von oxidativem Stress involviert sind. Es handelt sich ausschließlich um Spotvolumenminderungen: im Mesencephalon Spots M1 (Peroxiredoxin 1) und M2 (Peroxiredoxin 2), im Cerebrum Spots C1 (Peroxiredoxin 1) und C2 (Glyoxalase 1).

Da oxidative Veränderungen bei M. Parkinson hinlänglich diskutiert wurden, soll hier nur in Kürze auf sie eingegangen werden.

### D.1.2.1 Peroxiredoxine 1 und 2

Ein Spot des überwiegend *glialen* Peroxiredoxin 1 ist sowohl im Mesencephalon als auch im Cerebrum um ca. 15% volumengemindert. Ein Spot des vorwiegend *neuronalen* Peroxiredoxin 2 zeigt sich ausschließlich im Mesencephalon signifikant, um 20%, geschwächt. (*vide* C.1.1, C.1.2, C.2)

Die **Peroxiredoxine** sind jeweils mit mehreren **Isospots** im 2D-Gel vertreten, von denen nur je ein Spot signifikant volumengemindert ist. Die molekularen Charakteristika der Isospots sind bisher nicht geklärt; vermutlich handelt es sich um verschiedene, funktionelle und irreversible Oxidationszustände. (*vide* C.2) Da der jeweils basischste Isopot ein konstantes Volumen zeigt, ist von einer konstanten Konzentration der aktiven, reduzierten Form auszugehen. Entsprechend dürfte das reduktive Potential der Peroxiredoxine 1 und 2 zum Zeitpunkt der Untersuchung unverändert sein, so dass die Peroxiredoxin-Spotänderung **eher Folge als Ursache** des durch andere Methoden verifizierten, erhöhten oxidativen Stresses [85] sein dürfte.

Wie führt oxidativer Stress zu den beobachteten Veränderungen?

Die Position des Peroxiredoxin-2-Isospots legt nahe, dass eine der beiden mittleren Oxidationsstufen in verminderter Konzentration vorliegt, also die funktionell oxidierte Thiolform oder die reversibel überoxidierte Sulfinsäureform. (*vide* C.2) Folgende Mechanismen sind denkbar:

Die reversibel überoxidierte **Sulfinsäureform** von Peroxiredoxin 2 wird durch Sulfiredoxin **reduziert**. Wenn dieses Enzym hochreguliert wird, beispielsweise durch oxidativen Stress, dürfte die Konzentration der Sulfinsäureform sinken. [86, 104]

Gleichermaßen könnte eine **beschleunigte weitere Oxidation** zur Sulfonsäure die Konzentration der Sulfinsäureform mindern. [91] Hierfür könnte eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration verantwortlich sein. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist sowohl Substrat als auch überoxidierendes Agens der Peroxiredoxine. Es kann die Peroxiredoxine per Überoxidation hemmen und ihren Abbau beschleunigen. [84] Da die Sulfonsäureform zügig abgebaut wird, muss ihr vermehrtes Anfallen nicht zwangsläufig zu einer Spotvolumensteigerung führen. [91]

Zum Zeitpunkt der Untersuchung würden die Zellen den Abbau *noch* durch vermehrte Synthese kompensieren (SH-Form konstant). Wenn diese jedoch nicht mehr aufrechterhalten werden kann, würde in einem *circulus vitiosus* der Zelluntergang durch oxidative Schäden beschleunigt.

### D.1.2.2 Glyoxalase 1

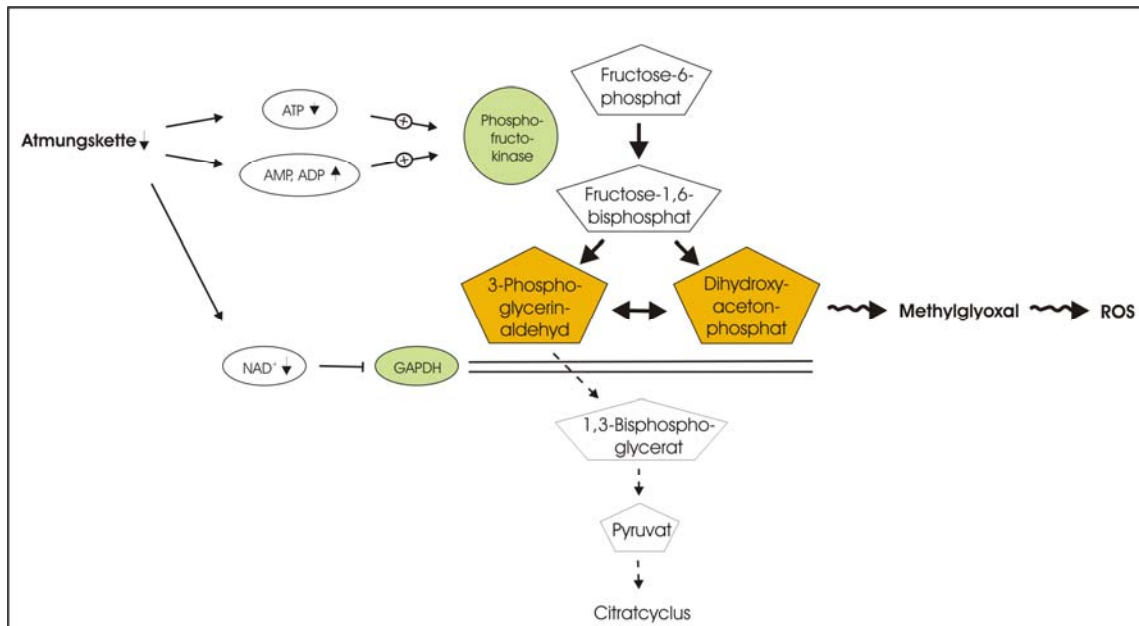
Der Glyoxalase-1-Spot C2 ist im Großhirn um ca. 20% volumengemindert. (*vide* C.1.2, C.2)

Mit Hilfe des Kofaktors GSH wandelt das Glyoxalase-System kleine, reaktive  $\alpha$ -Carbonylaldehyde in D-Säuren um. So wirkt es der Bildung von *advanced glycation end products* (AGEs) entgegen; dies sind u.a. glykierte Proteine, die zur Akkumulation neigen. Tatsächlich finden sich bereits bei inzidenteller Lewy-body-Erkrankung, einem mutmaßlich präklinischen Stadium des M. Parkinson, vermehrt AGEs. [105]

Ein prominentes Substrat der Glyoxalase, **Methylglyoxal**, entsteht als nichtenzymatisches Nebenprodukt der Glykolyse und hemmt *in vitro* wesentliche antioxidative Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase, Glutathion-S-Transferase, aber auch die Glyoxalase 1 selbst; des Weiteren scheint es GSH irreversibel zu oxidieren. [106] (*vide* C.4.4)

Eine mutmaßliche Minderung der Glyoxalaseaktivität führt also zur **Minderung der antioxidativen Kapazität** und könnte die frühe Konzentrationsminderung von GSH bei Parkinsonpatienten bedingen. Überdies dürfte sie der **Proteinakkumulation** Vorschub leisten. Methylglyoxal führt zur **Atmungskettenhemmung**, vermutlich über die Hemmung verschiedener antioxidativer Enzyme mit Entstehung von **ROS**. [23, 106] So könnte eine verminderte Glyoxalaseaktivität zur bekannten Aktivitätsminderung einzelner Protonenpumpen bei M. Parkinson beitragen und in einen *Circulus vitiosus* einmünden, da ein Atmungskettendefizit seinerseits die Methylglyoxalkonzentration steigern dürfte. (*vide* Abb. 25)





**Abbildung 25: Auswirkung eines Atmungskettendefizits auf die Glykolyse mit folgender Akkumulation von Methylglyoxal und Entstehung von ROS**

Unter der verringerten Atmungskettenkapazität der Knockout-Mäuse dürften die Glykolyse angekurbelt und die Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) gehemmt werden, was zu einer Anhäufung der Triosephosphate der Glykolyse führen dürfte. Aus ihnen würde nun vermehrt nichtenzymatisch Methylglyoxal (MG) entstehen, das direkt zu ROS führt und die oxidative Phosphorylierung weiter hemmt. [94, 95]

### D.1.3 Keine Evidenz für proteolytischen Stress und Aggregation

Aufgrund der vorliegenden AR-JP-Autopsieberichte erwartet man bei Parkin-Knockout keine *Aggregation* [35, 107], jedoch eine Proteolysestörung mit Protein-Akkumulation, sofern die *in vitro* nachgewiesene E3-Ubiquitinligase-Aktivität von Parkin *in vivo* relevant ist. E3-Enzyme vermitteln die Substratspezifität des ubiquitylierenden Systems. Die Proteomanalyse des Parkin-Knockout-Mausmodells wurde in der Hoffnung begonnen, *in vivo* relevante Substrate der E3-Ubiquitinligase Parkin zu entdecken.

Ein *spezifisches Proteolysedefizit in vivo* müsste sich auf die Konzentration der *in vitro* ermittelten Parkinsubstrate oder anderer, unbekannter Substrate auswirken. Keines der *in-vitro-Substrate* CDCrel-1 [46], Pael-R [53], Synphilin-1 [54], glykosyliertes  $\alpha$ -synuclein [55], Synaptotagmin XI [56] und DAT [58] wird jedoch in Spots mit signifikant veränderten Volumina nachgewiesen. Für DAT, Pael-Rezeptor, Synaptotagmin und Synphilin ist dies mit ihren molekularen Eigenschaften methodisch begründbar (Lipophilie, Molekulargewicht).

Dagegen dürfte **CDCrel-1** im 2D-Gel vertreten sein, ebenso wie glykosyliertes  $\alpha$ -Synuclein. Letzteres ist bei relativ genau bekannter Spotposition mit einiger Sicherheit unauffällig. Dies bestätigen Immunpräzipitation und Western blot von Goldberg *et al.* Ebenso wenig weisen sie eine Konzentrationsänderung für CDCrel-1 nach. [68]

Als **potentielles Substrat** kommt aufgrund seiner Spotvolumensteigerung Complexin 1 in Frage ( $\alpha \leq 5\%$ ), bei Einbeziehung von Volumenänderungstendenzen auch Complexin 2 und Serinracemase. Hier wären Interaktionen zu prüfen.

Der **auffallend geringe Anteil volumengesteigerter Spots** (1 von 11 Volumenänderungen, *vide* C.3) scheint nicht auf eine Dekompensation des UPS hinzuweisen. Allerdings *kann* gerade das Überwiegen von Volumenminderungen auch als Folge von Proteinakkumulation i.S. des **macromolecular crowding** interpretiert werden. (*vide* D.7)

#### **D.1.4 Keine Evidenz für Neuroinflammation**

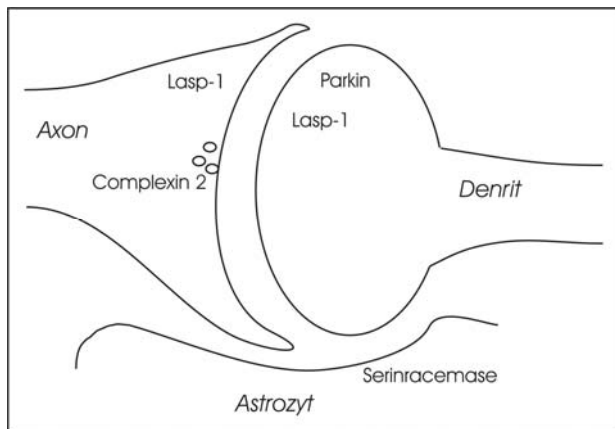
Neben den per 2D-GE nicht nachweisbaren Zytokinen wird in Hirnschnitten verstorbener Parkinsonpatienten vermehrt COX-2- und iNOS-positive Mikroglia nachgewiesen. [108] Weder COX-2 noch NO-Synthase waren unter den signifikant veränderten Spots. Kein Protein mit signifikanter Spotvolumenänderung scheint in engerem Zusammenhang mit Inflammation oder Apoptosekaskaden zu stehen. Dies korreliert mit den histologischen Befunden des untersuchten Mausmodells, die keinen Anhalt für Inflammation oder Neurodegeneration liefern.

#### **D.2 Gestörte Neurotransmission - Differentielle Expression synaptisch lokalisierter Proteine**

Eine Störung der synaptischen Transmission bei M. Parkinson ist offensichtlich; sie wird jedoch vorrangig als Folge des Untergangs von Neuronen betrachtet. Ihr wird wenig Aufmerksamkeit als früher, möglicherweise *upstream* gelegener Veränderung gewidmet. Für eine solche Rolle sprechen jedoch die Befunde im vorliegenden Modell: Störungen von Neurophysiologie und -biochemie in Abwesenheit von Neurodegeneration oder histologisch sichtbaren synaptischen Veränderungen. Da zur *Pathobiochemie* der Synapse bei M. Parkinson bisher wenig bekannt ist, soll auf Spotvolumenänderungen synaptisch lokalisierter Proteine intensiver eingegangen werden.

Zwei signifikant veränderte Spots enthalten synaptisch lokalisierte Proteine. Unter ihnen befindet sich die einzige signifikante Spotvolumensteigerung.

Im Folgenden werden die signifikant veränderten synaptischen Proteine, Complexin 2 und Lasp-1, detaillierter besprochen. Wegen der interessanten Funktion der Serinracemase folgt eine kurze Spekulation über deren mögliche Rolle im Krankheitsmodell. (Tendenz, *vide* F.6)



**Abbildung 26: Lokalisation der identifizierten Proteine in synaptischen Kompartimenten**

### D.2.1 Complexin 2

Das Volumen des Complexin-2-Spots C4 ist um ca. 25% erhöht.

Complexine sind Modulatoren der synaptischen Transmitterfreisetzung. [109] Sie scheinen für motorische und kognitive Funktionen von Bedeutung zu sein. Es handelt sich um synaptisch angereicherte Proteine, die spezifisch an **synaptischer Vesikelexozytose** beteiligt sind, **möglicherweise im Sinne von Vesikelreifung oder endozytotischer Rückgewinnung von Vesikelmembranen und Proteinbestandteilen**. [98] Sie interagieren mit dem vollständigen SNARE-Komplex, einem zentralen Effektor der synaptischen Vesikelexozytose. [99]

**Complexin-2-Knockout-Mäuse** wirken anfangs normal, entwickeln jedoch zunehmend **kognitive** und -möglicherweise sekundäre- motorische Defizite. Die Tiere eignen sich kaum adulte explorative und interaktive Verhaltensweisen an. Interessant ist insbesondere die Progressivität der Defizite, die an neurodegenerative Prozesse erinnert. Insbesondere haben die Mäuse Schwierigkeiten, einmal erlernte Verhaltensweisen zu ändern, im Sinne einer **Rigidität** des Lernprozesses. [110]

Die Autoren weisen auf gewisse Parallelen zu einem Huntington-Mausmodell hin. In der Tat wurde sowohl im Tiermodell als auch bei Huntington-Patienten eine progressive Complexin-2-Depletion nachgewiesen. Darüber hinaus sind Complexinveränderungen bei Schizophrenie, Depression, bipolarer affektiver Störung und Temporallappenepilepsie beschrieben. [110]

Insbesondere die mangelnde Fähigkeit der Complexin-Knockout-Mäuse „umzulernen“ ist ein Phänomen, das auch bei M. Parkinson beobachtet wird. Dies legt einen Zusammenhang zwischen der Complexin-2-Konzentration und einer Plastizität des Lernprozesses nahe. [111]

Wie kommt es zur Hochregulation?

Im Hinblick auf die Häufigkeit von Erkrankungen mit Complexin-Veränderung dürfte diese im Krankheitsprozess eher *downstream* anzusiedeln sein. In Ratten führt oxidativer Stress zum Anstieg der Complexine. [112] Eine Konzentrationserhöhung durch mangelnden proteasomalen Abbau wäre allerdings denkbar. Ebenso könnte eine Störung der Neurotransmission eine **kompensatorische** Complexin-Expressionssteigerung hervorrufen.

Welche Folgen hat die Hochregulation?

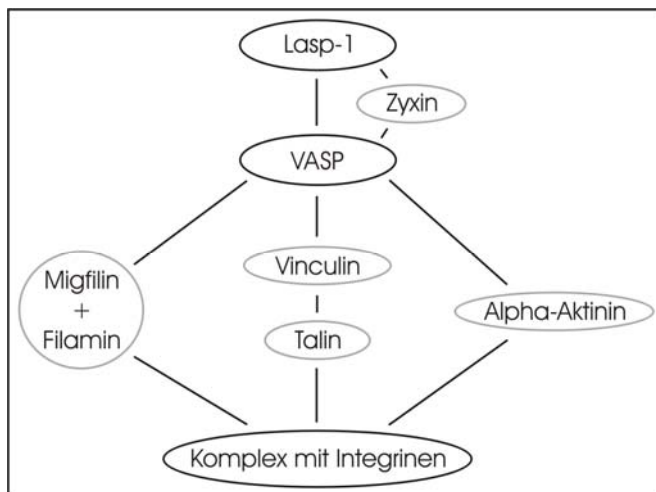
Da Complexin 2 vorrangig an exzitatorischen Synapsen gefunden wird und Glutamat im zentralen Nervensystem der überwiegende exzitatorische Transmitter ist, dürfte sich eine Complexin-2-Veränderung auf die **glutamaterge Transmission** auswirken. Es existieren widerstreitende Thesen, ob die Complexine die Transmitterfreisetzung fördern oder hemmen. [112] Im vorliegenden Modell ist einerseits eine stärkere elektrische Stimulation kortikaler glutamaterger Neurone notwendig, um eine postsynaptische Antwort an kortikostriatalen Synapsen hervorzurufen. [12] Andererseits könnte die erhöhte extrazelluläre Dopaminkonzentration dies bedingen und selbst durch *vermehrte* glutamaterge Stimulation der nigralen dopaminergen Neuronen verursacht sein.

### **D.2.2 Lasp-1**

Der Lasp-1-Spot M4 ist um 19% volumengemindert. Lasp-1, *LIM and SH3 protein 1*, ist ein weit verbreitetes, aktinassoziertes Phosphoprotein, dessen Funktion sich erst abzuzeichnen beginnt. Für Zellmotilität und -differenzierung scheint es von entscheidender Bedeutung zu sein. Weniger untersucht ist bisher seine Rolle im ZNS. Jedoch scheint Lasp-1 für Synaptogenese und synaptische Plastizität von Bedeutung zu sein. Hierfür sprechen folgende Eigenschaften: Es konzentriert sich am Wachstumskonus bzw. an reifen synaptischen Strukturen, es kolokalisiert mit integrinassozierten Proteinkomplexen, es wird cAMP-abhängig phosphoryliert, und Moleküle der extrazellulären Matrix beeinflussen seine intrazelluläre Lokalisation. Seine cAMP- und cGMP-abhängige Phosphorylierung weist auf mögliche Mediator- oder Effektorfunktion in entsprechenden Signalkaskaden hin. [83]

Lasp-1 scheint Teil ausgedehnter **Interaktionsnetzwerke** an Zell-Matrix-Adhäsionszonen zu sein. Über *Nebulin-repeats* interagiert es mit dem Aktin des Zytoskeletts. Aufgrund seiner Proteinstruktur dürfte Lasp-1 die Aktivität seiner Interaktionspartner modulieren (LIM-Domäne) sowie deren „Adressierung“ (*targeting*; SH3- und LIM-Domäne) und die Assoziation von Komplexen (SH3-Domäne) vermitteln. Seine Interaktionspartner Palladin, Zyxin, Krp1, LPP und VASP sind Teil aktinassoziierter **Multiproteinkomplexe**, die an **Adhäsionszonen** die Wirkung von Integrinen vermitteln, regulieren und modulieren. [113]

Integrine wiederum beeinflussen sowohl **Synaptogenese** als auch **synaptische Plastizität**. Sie sind Transmembranproteine, die zum einen über Multiproteinkomplexe das Aktin-Zytoskelett mit Peptiden der extrazellulären Matrix verbinden sowie zum anderen bidirektional Signale über die Zellmembran leiten. So regulieren sie Zelladhäsion, -motilität, -wachstum, -proliferation sowie -überleben. [113]



**Abbildung 27: Potentielle Verbindung zwischen Lasp-1 und Integrinen über gemeinsame Interaktionspartner**

Eine zentrale Position zwischen Lasp-1 und den Integrinen könnte VASP einnehmen. Es interagiert zum einen direkt mit Lasp-1; zum anderen rekrutiert Lasp-1 Zyxin an fokale Adhäsionen, von dem wiederum VASP rekrutiert wird.

Die  $\alpha$ -Aktinin-Integrin-Bindung scheint für die Ausbildung von *stress fibers* und fokalen Adhäsionen notwendig. Die Talin-Integrin-Bindung scheint unentbehrlich für die Zellmigration. Speziell gewährleistet sie die Integrin-Rekrutierung mit Bildung fokaler Adhäsionen und die folgende Aktinakkumulation. Mechanischer Stress führt zur Rekrutierung von Filamin an fokale Adhäsionen und zur F-Aktin-Anreicherung. Die Integrin-Filamin-Bindung beeinflusst die Integrin-Lokalisation sowie Zellmigration und -morphologie. dient Filamin einer Reihe von Signalproteinen als Adaptermolekül. [Liu, S., D.A. Calderwood, and M.H. Ginsberg, *Integrin cytoplasmic domain-binding proteins*. J Cell Sci, 2000. 113 ( Pt 20): p. 3563-71.]

Lasp-1 dürfte also aufgrund seiner Interaktionspartner und deren Integrinassoziation in Synaptogenese und adulte synaptische Plastizität involviert sein. [114] Zudem reichert sich Lasp-1 unter **Fibronectin**-Stimulation an fokalen Adhäsionen an; Fibronectin, ein Molekül der extrazellulären Matrix und klassischer Integrin-Ligand, löst die Bildung adhäsiver Kontakte aus. [115]

Überdies wird eine Form der LTP (*long term potentiation*, ein experimentelles Modell synaptischer Plastizität [116]), die sogenannte chemische LTP mit Bildung neuer synaptischer Kontakte durch **cAMP** induziert: PKA-Aktivierung führt zur Transkriptionsregulierung plastizitätsassoziierter Gene, aber auch zu Lasp-1-Phosphorylierung und -Aktivierung. [83]

Leider sind die Vorgänge an fokalen Adhäsionen und die Mechanismen der Zelllokomotion insgesamt zu wenig verstanden, als dass man konkrete, molekulare Folgen einer Lasp-1-Konzentrationsminderung postulieren könnte. Die These, *dass* ein Parkin-Funktionsverlust zu einer Veränderung der synaptischen Plastizität führt, wird jedoch durch verschiedene Beobachtungen gestützt: Zum einen treten bei **Parkin-Patienten** kognitive Defizite auf; zum anderen demonstrieren Zhu *et al.* an ihrem Exon-3-Knockout Auffälligkeiten in der *Morris water maze*, einem klassischen Test des **räumlichen Lernens**. [116, 117] (*vide* D.5.1) Am **vorliegenden Modell** wurden Lernverhalten und synaptische Plastizität bisher nicht untersucht, jedoch scheint eine synaptische Schwächung zwischen kortikalen Efferenzen und striatalen *medium spiny neurons* zu bestehen. [12] Die Tendenz des Serinracemase-Spots fügt sich ebenfalls passend ein: Die Serinracemaseaktivität dürfte die NMDA-Rezeptoraktivität beeinflussen, die ihrerseits für die LTP von Bedeutung ist.

### **D.2.3 Serinracemase – Tendenz zur Spotvolumensteigerung (p=0,059)**

Spot F1 zeigt im Knockout eine *Tendenz* zur Volumensteigerung um mediane 15%. (*vide* F.6)

Die astrozytär lokalisierte Serinracemase katalysiert die Bildung von D-Serin. Dieses koaktiviert den NMDA-Glutamat-Rezeptor, der mit LTP, Exzitotoxizität und Apoptose in Verbindung gebracht wird. Eine erhöhte D-Serin-Konzentration dürfte nach neueren Erkenntnissen die Wahrscheinlichkeit der NMDA-Rezeptor-Aktivierung durch Glutamat *in vivo* relevant erhöhen. Überdies wird die Desensitivierung vermindert. Auch für die Vermittlung von **Exzitotoxizität** über den NMDA-Rezeptor spielt D-Serin eine entscheidende Rolle. [118, 119]

Die NMDA-Koaktivierung durch D-Serin soll in neurologisch-psychiatrischen Krankheitsprozessen von Bedeutung sein. So wird für **Schizophrenie**, in mancher Hinsicht Gegenstück zum M. Parkinson, eine NMDA-Rezeptor-Hypofunktion vermutet; NMDA-Antagonisten rufen schizophrenieähnliche Symptome bei gesunden Probanden und Exazerbationen bei Schizophrenen hervor. [120] **NMDA-Hyperaktivität** scheint dagegen bei M. Alzheimer und zerebraler Ischämie vorzuliegen; diese haben mit der Parkinsonerkrankung Exzitotoxizität und neuronalen Zelltod gemein.

Eine (fragliche) Spotvolumenerhöhung der Serinracemase könnte durch gestörten proteolytischen Abbau im Sinne des E3-Ubiquitin-Ligase-Funktionsverlusts verursacht sein. Als *primäre* Veränderung könnte sie über Exzitotoxizität zu mitochondrialem und antioxidativem Defizit führen. Andererseits könnte aber auch eine Störung der glutamatergen Transmission eine *reaktive* Expressionssteigerung der Serinracemase induzieren. In der Folge könnte es zu vermehrter glutamaterger Neurotoxizität kommen. (*vide infra*)

### **D.3 Bestätigung der Ergebnisse der Proteomanalyse durch andere Methoden – Störung mitochondrialer, antioxidativer und synaptischer Funktion im vorliegenden Modell**

Die Ergebnisse der vorliegenden Proteomanalyse stehen im Einklang mit den übrigen Untersuchungsergebnissen zum untersuchten Mausmodell.

Goldberg *et al.* stellten eine **leichte nigrostriatale Dysfunktion** fest; die vorliegende Arbeit deckt Proteinveränderungen im synaptischen Bereich auf. (*vide D.2*)

In der Proteomanalyse fielen Veränderungen von Proteinen des **antioxidativen Systems** sowie der **oxidativen Phosphorylierung** auf; Palacino *et al.* konnten daraufhin Veränderungen dieser Systeme bestätigen und weiter differenzieren. So liegen in beiden untersuchten Hirnregionen der 8 Monate alten Mäuse Proteine des antioxidativen Systems in verminderter Konzentration vor. (*vide D.1.2*) Palacino *et al.* fanden eine **verminderte antioxidative Kapazität** im Serum bereits bei 5 Monate alten Tieren; Marker für oxidative Proteinveränderungen und Lipidperoxidation waren dagegen erst in alten Tieren (18 Monate) gegenüber den Kontrollen erhöht. [85]

Im ventralen Mesencephalon des vorliegenden Modells ist eine Untereinheit der CytochromC-Oxidase (Komplex IV) signifikant um 38% volumengemindert (*vide D.1.1*). Eine möglicherweise oxidative Veränderung der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

erreichte kein ausreichendes Signifikanzniveau. Palacino *et al.* weisen jedoch eine **verminderte respiratorische Kapazität** striataler Mitochondrien bzgl. Komplex I-IV nach. [85]

Dagegen ergeben sich mit keiner Methode Hinweise auf **Untergang** monoaminerger Neuronen im vorliegenden Modell. Es werden weder  $\alpha$ -synuclein- oder ubiquitinhaltige Einschlüsse **noch** eine **Akkumulation von *in-vitro*-Parkinsubstraten** nachgewiesen. [68] (*vide* A.5.5)

#### **D.4 Die Parkinfunktion auf zellulärer Ebene – Rückschlüsse aus Proteomanalyse, Pathophysiologie, Biochemie und Histologie des Parkin-Knockouts**

Wie das vorliegende Modell zeigt, beeinflusst Parkin *in vivo* die mitochondriale und antioxidative Funktion sowie die synaptische Transmission, ohne jedoch im vorliegenden Modell zu neuronalem Zelluntergang zu führen.

##### **D.4.1 Veränderungen der synaptischen Transmission bei Parkin-Knockout – Synthese der Beobachtungen an verschiedenen Exon-3-Knockout-Modellen**

Während mitochondriales Defizit und Veränderung des zellulären Redoxstatus sowohl bei M. Parkinson als auch in Parkin-Knockout-Modellen vielfach belegt sind [73, 121], ist das eigentliche Novum der Untersuchungsergebnisse die **Veränderung der Neurotransmission in Abwesenheit von Neurodegeneration**.

Auf bisher unbekannte Weise **beeinflusst Parkin Dopaminhaushalt und glutamaterge Transmission**. Während Neurodegeneration oder morphologische Veränderungen der Synapsen fehlen, zeigt das vorliegende Modell motorische und elektrophysiologische Auffälligkeiten sowie Veränderungen synaptischer Proteine.

Klinisch zeigen die Mäuse eine leichte nigrostriatale Funktionsstörung. [68]

Pathophysiologisch besteht eine Dysfunktion der Neurotransmission mit **erhöhter extrazellulärer Dopaminkonzentration**, offenbar aufgrund vermehrter Freisetzung, und **verminderter Erregbarkeit der striatalen *medium-sized spiny neurons*** durch ihre kortikalen, glutamatergen Afferenzen. [68] Eine Erhöhung der extrazellulären striatalen Dopaminkonzentration entspricht nicht den Erwartungen an ein Parkinsonmodell und dürfte ein spezifisch präklinisches Phänomen darstellen. Sie könnte durch vermehrte Stimulation dopaminerger Neuronen durch ihre glutamatergen Afferenzen bedingt sein und ihrerseits die Erregbarkeit der striatalen Neuronen durch deren glutamaterge Afferenzen aus dem Cortex mindern.



Auch die Ergebnisse der Proteomanalyse weisen auf veränderte synaptische, insbesondere **glutamaterge Transmission und synaptische Plastizität** hin. Signifikante Veränderungen betreffen Proteine, die involviert sind in synaptische Vesikelexozytose (Complexin 2) sowie Neurogenese und, vermutlich, synaptische Plastizität (Lasp-1). *Tendenzen* zur Spotvolumenänderung zeigen Complexin 1 und ein die glutamaterge Transmission am NMDA-Rezeptor modulierendes Enzym (Serinracemase) (*vide* D.2.3)

In ihrem Exon-3-Knockout untersuchen Itier *et al.* die glutamaterge Transmission nicht im Striatum, wie Goldberg *et al.*, sondern im Hippokampus, wo sie gleichsinnige Veränderungen vorfinden. Der Hippokampus beherbergt die klassische Modellregion der **synaptischen Plastizität** mit den assoziierten Vorgängen **Langzeit-Potenzierung, Langzeit-Depression und Depotenzierung**. Diese finden an glutamatergen Synapsen statt und erfordern neben glutamaterger Stimulation auch dopaminergen Input. [10] Der **synaptischen Plastizität** wird eine entscheidende Rolle in Lernprozessen zugesprochen. Tatsächlich zeigen die Mäuse ein auffälliges Lernverhalten, so vermindertes Explorieren des unbekanntes Arms einer *T-maze*. [121] Dies mag zum einen auf **verminderte kognitive Flexibilität** hinweisen oder zum anderen auf **Anomalien des räumlichen Gedächtnisses, der visuospatialen Analyse und der Orientierung** - Befunde, die auch bei **M. Parkinson** erhoben und üblicherweise mit Veränderungen der synaptischen Plastizität in Verbindung gebracht werden. [10, 116]

Die Ergebnisse der Proteomanalyse im vorliegenden Modell fügen sich in diese Befunde ausgezeichnet ein. **Lasp-1** dürfte über integrinassoziierte Proteinnetzwerke die synaptische Plastizität beeinflussen. (*vide* D.2.2) [83] Eine mutmaßliche Erhöhung der astrozytären **Serinracemase**-Konzentration und -Aktivität führt über erhöhte D-Serin-Konzentration zu verstärkter Erregbarkeit des NMDA-Rezeptors. [118, 119] (*vide* D.2.3) **Complexin 2** scheint die glutamaterge Transmitterfreisetzung zu modulieren. [112] (*vide* D.2.1)

Der Einfluss von Complexin 2 auf das Lernverhalten wird in einem Knockout-Modell *in vivo* belegt. So eignen sich die Mäuse kaum adulte explorative und interaktive Verhaltensweisen an und haben insbesondere Schwierigkeiten, einmal erlernte Abläufe zu ändern. [110] Insbesondere die mangelnde Fähigkeit „umzulernen“ wird auch bei **M. Parkinson** beobachtet - wobei im hier untersuchten Modell eine gegensinnige Veränderung der Complexin-2-Konzentration zu beobachten ist. [111] Überdies zeigen sich Parallelen zum Parkin-Knockout von Itier *et al.* mit verminderter spontaner Erkundung des vorher verschlossenen Arms einer *T-maze*. [121]

## D.4.2 Wie führt der Parkinverlust zum Phänotyp?

Einerseits mögen gleichzeitig antioxidative, mitochondriale *und* synaptische Funktion durch fehlende Parkin-vermittelte Ubiquitylierung jeweils relevanter Proteine gestört werden. Andererseits mag eine **kausale Hierarchie** bestehen, da der Defekt jedes der drei Systeme zu Störungen der beiden anderen führen kann. Unter der Hypothese einer kausalen Kette interessiert vor allem, welches der Systeme am weitesten *upstream* betroffen ist. Jedoch ist für keines der Systeme bisher eine *direkte* Verbindung zur Parkinfunktion belegt: die relevante Ubiquitylierung eines zugehörigen Proteins durch Parkin.

### D.4.2.1 Interaktionen zwischen den vom Knockout beeinflussten Funktionssystemen

Im folgenden wird die oben aufgestellte These untermauert, ein *upstream* gelegenes Defizit jedes der drei im Modell veränderten Systeme (antioxidativ, mitochondrial und synaptisch) könne zu Störungen der jeweils anderen Systeme führen.

#### These 1: Primär mitochondriales Defizit

Eine mitochondriale Funktionseinschränkung erhöht das Aufkommen an reaktiven Sauerstoffspezies (**ROS**) und führt zu ATP-Mangel. Ersteres kann zur Erschöpfung der **antioxidativen Kapazität** mit oxidativer Schädigung von DNA, Proteinen und Membranlipiden führen. [14] Sowohl ROS als auch ATP-Mangel stören die **synaptische Funktion**, da sie Exozytosevorgänge hemmen. [122] So kann ROS **synaptische Proteine** oxidativ schädigen; bei ausgeprägtem Atmungsketten-Defizit mit ATP-Depletion kommt es zur Störung der **Kalziumhomöostase**. Diese würde nach dem Konzept der „schwachen Exzitotoxizität“ verschärft durch Verlust der ATP-abhängigen Magnesiumblockade von **NMDA-Rezeptoren**, wodurch schon physiologische Glutamatkonzentrationen zu weiterem, exzitotoxischem Kalziumeinstrom führen. [23]

#### These 2: Primär antioxidatives Defizit

Der Einfluss von oxidativem Stress auf mitochondriale und synaptische Funktion ist gesichert. Unter anderem hemmt er die Komplexe I und IV, kann die synaptische Funktion über *redox signaling* und oxidative Proteinmodifizierung beeinflussen und scheint Complexin 2 zu induzieren (*vide* D.2.1). [23, 112] Entsprechende Mechanismen sind vielfach ausführlich erörtert worden. [122]

#### These 3: Primär synaptische Störung

Manifestation der synaptischen Störung auf Proteomebene sind die Spotvolumenänderungen von Complexin 2 und Lasp-1; Tendenz zur Volumensteigerung zeigen die Spots der glialen Serinracemase (ventrales Mittelhirn,  $p=0,059$ ) und von Complexin 1 (Großhirn,  $p=0,059$ ). Sowohl **Complexin 2** als auch **Serinracemase** könnten die glutamaterge Stimulation dopaminergener Neuronen beeinflussen und so zur beobachteten Erhöhung der extrazellulären Dopaminkonzentration führen.

Bei vermehrter Stimulation der zahlreichen NMDA-Glutamatrezeptoren dopaminergener nigraler Neurone kommt es zu vermehrtem **Kalziumeinstrom**, der, wenn ein kritisches Maß überschritten wird, zu exzitotoxischem Zelltod führen kann. Zytosolisches Kalzium aktiviert verschiedene **ROS-erzeugende Enzyme**, u.a. die Stickoxidsynthase. Entstehendes **Stickoxid** inhibiert wiederum die CytochromC-Oxidase, was die mitochondriale Energieproduktion nach Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren hemmt. [23] Auch die **mitochondriale Kalziumsequestration** führt dort zu oxidativen Schäden und **inhibiert die Atmungskette**. Eine ATP-Depletion führt wiederum zu weiterem Versagen der Kalziumhomöostase. [14]

Neben synaptischen und perisynaptischen Proteomveränderungen wird im Modell eine Störung des **Dopaminhaushalts** beobachtet. Auch diese kann mitochondriale und antioxidative Funktionsstörungen erklären. Beim Dopaminabbau durch die Monoaminoxidase B entstehen Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxylradikale ( $\cdot OH$ ), atomarer Sauerstoff sowie Superoxidradikale ( $O_2^-$ ). In Kombination mit hohen Eisenkonzentrationen prädisponiert daher der Dopaminstoffwechsel an sich die Substantia nigra für **oxidativen Stress**. [17] (*vide* A.2.3.2) Dieser interferiert wiederum mit der Funktion von **Komplex IV** (CytCOx) sowie Komplex I. [23] Bei vermehrter Transmitterfreisetzung dürfte die lokal erhöhte zytoplasmatische Kalziumkonzentration die präsynaptischen Mitochondrien schädigen, die eine geringe Kalziumresistenz besitzen. [123] So könnte es zu präsynaptischer **ATP-Verarmung** und **mitochondrialer Permeabilitätssteigerung** mit Neurodegeneration kommen.

#### **D.4.2.2 Wie führt ein Ubiquitylierungsdefizit zu den beobachteten Veränderungen?**

Parkin zeigt *in vitro* Ubiquitinligase-Funktion. Als übliches Szenario eines relevanten Ubiquitylierungsdefizits wird eine Schädigung der Zelle durch eine mengenmäßig bedeutsame, die Zellhomöostase störende Akkumulation von Protein entworfen. Die vorliegende Proteomanalyse weist fast ausschließlich Spotvolumenminderungen nach. So scheint ein Parkin-Funktionsverlust *in vivo* bzw. in der Maus **nicht zu globalem proteasomalen Stress** zu führen.

Da E3-Ligasen die Substratspezifität des ubiquitylierenden Systems vermitteln, ist bei Funktionsverlust der E3-Ligase Parkin die isolierte Dysregulation einzelner Proteine zu erwarten. In verschiedenen Modellen konnte lange Zeit für keines der *in-vitro*-Substrate eine Akkumulation nachgewiesen werden. Schließlich wiesen Ko *et al.* im Exon-7-Knockout das *in-vitro*-Substrat **p38** in erhöhter Konzentration nach. p38 scheint auch im Gehirn von AR-JP-Patienten (n=4) sowie, möglicherweise, bei sporadischem M. Parkinson und Lewy-Körper-Demenz zu akkumulieren. Somit könnte das proapoptotische Protein p38, dessen Überexpression zu Neuronenverlust führt, ein *in vivo* relevantes Parkinsubstrat sein. [63] Seine Akkumulation könnte eine unspezifisch erhöhte **Vulnerabilität gegen proapoptotische Einflüsse** zur Folge haben. Im vorliegenden Modell liegen jedoch keine Hinweise auf vermehrte Apoptose vor. [12] Generell ist die parkinbedingte Erkrankung durch eher späten, langsam fortschreitenden Zelluntergang gekennzeichnet. Allerdings ist p38 auch in Zellzyklusprogression involviert; im Modell sind die Neuronen morphologisch unauffällig; bei AR-JP imponiert jedoch ein unreifer Aspekt der dopaminergen Neuronen. Überdies spielt p38 eine Rolle für die Kontaktinhibition nicht transformierter Zellen; hier mag ein Zusammenhang mit der Spotänderung von Lasp-1 bestehen.

**E3-Ubiquitin-Ligasen** sollen **kurzlebige synaptische Proteine** regulieren. Somit ist beispielsweise eine primär synaptische Dysfunktion möglich. Die einzige signifikante Spotvolumensteigerung betrifft das synaptische Protein Complexin 2; eine *Tendenz* zur Volumensteigerung zeigt der Spot der glialen Serinracemase (p=0,059; *vide* F.6).

#### **D.4.2.3 These 1: Führt der Parkinverlust primär zu einer mitochondrialen Funktionsstörung?**

Evidenz für einen entscheidenden Einfluss von Parkin auf die mitochondriale Funktion liefern das vorliegende Maus-Modell sowie das Drosophila-Modell von Greene *et al.* (*vide* A.5.5) Insbesondere gingen im Drosophila-Modell sowohl die mitochondrialen als auch die myofibrillären Störungen unter transgener Parkinexpression zurück. [66] Für eine enge Beziehung zwischen Parkin und mitochondrialer Funktion spricht auch die Erhöhung der Parkinexpression in neuronalen Zellen nach MPP<sup>+</sup>-Exposition. [107] Überdies wird berichtet, Parkin sei mit der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) assoziiert, wo es mitochondriale Schwellung und Ruptur nach Toxinexposition verhindere. [124]

Als *Mechanismus* der mitochondrialen Störung durch Parkinverlust kommt die **mangelnde Ubiquitylierung mitochondrialer Proteine** in Frage.

So soll in Parkin-mutanten Drosophila der **periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR)** hochreguliert sein, ein Bestandteil des *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP). [107] Der PBR ist an dessen Öffnung beteiligt und reguliert so das Ausmaß oxidativen Schadens durch mitochondriale Dysfunktion und OMM-Ruptur. [125] Bisher wurde allerdings nicht geklärt, ob der PBR durch Parkin ubiquityliert wird.

Neben proteasomalem Abbau soll Ubiquitylierung auch die **Insertion mitochondrialer Proteine in die äußere Mitochondrienmembran (OMM)** vermitteln. [126] Durch veränderte Proteinausstattung der OMM ist eine Behinderung der Passage z.B. der Protonenpumpen, so auch der CytCOx Vb (*vide* D.1.1.1) in die *innere* Mitochondrienmembran denkbar, woraus das beobachtete Atmungskettendefizit resultieren könnte. Ein möglicherweise beschleunigter Abbau zytosolischer CytCOx könnte dann zur Spotvolumenminderung führen.

Die Spotvolumenminderung der CytCOx Vb sowie die Kapazitätsminderung aller Komplexe der Atmungskette können also Folge ihres gestörten Einbaus in die mitochondriale Membran sein. Dies könnte durch mangelnde Ubiquitylierung bei Parkinverlust bedingt sein, indem andere mitochondriale Proteine akkumulieren oder deren Einbau in die OMM gestört ist.

#### **D.4.2.4 These 2: Führt der Parkinverlust primär zu einem antioxidativen Defizit?**

Während der Parkin-Knockout im vorliegenden Modell die Resistenz gegen oxidativen Stress mindert, supprimiert transgene Parkin-Expression in einem anderen Mausmodell die mit oxidativem Stress einhergehende  $\alpha$ -Synuclein-Toxizität. [127] Es wurde vermutet, Parkin schütze vor oxidativem Stress, indem es **oxidativ geschädigte Proteine abbaue**. Dies wurde auf molekularer Ebene bislang jedoch nicht belegt.

Allerdings zeigen junge Parkin-Knockout-Mäuse bereits vor Auftreten vermehrter oxidativer Schäden an Proteinen und Lipiden eine **verminderte antioxidative Kapazität**. (*vide* D.3) Eine direkte molekularbiologische Verbindung zwischen den beobachteten Spotvolumenminderungen von Peroxiredoxin 1 und 2 sowie Glyoxalase 1 und Parkinverlust ist nicht ersichtlich, während eine **sekundäre Beeinträchtigung** antioxidativer Systeme durch die beobachteten **mitochondrialen und synaptischen** Veränderungen ausreichend plausibel ist. (*vide* D.4.2.1)

#### **D.4.2.5 These 3: Führt der Parkinverlust primär zu einer synaptischen Funktionsstörung?**

Dass der Parkin-Knockout zu einer Störung der synaptischen Transmission führt, wurde auf klinischer, elektrophysiologischer und proteomischer Ebene belegt. Dies mag sekundär durch

antioxidatives oder mitochondriales Defizit bedingt sein; bekannt ist jedoch auch eine **regulatorische Ubiquitylierung kurzlebiger, transmissionsrelevanter Proteine durch E3-Ligasen**. Für eine unmittelbar synaptische Funktion von Parkin sprechen seine Lokalisation und Interaktionen.

Parkin wird an der Oberfläche synaptischer Vesikel beobachtet [51], es kofraktioniert mit der synaptischen Plasmamembran [61], und es ubiquityliert *in vitro* verschiedene präsynaptische Proteine (CDCrel-1, Synphilin-1,  $\alpha$ -Synuclein). Überdies bindet Parkin **CASK**, ein PDZ-Protein, das die Signalübertragung an postsynaptischen Densitäten beeinflussen dürfte. Des Weiteren koinmunpräzipitiert es mit Komponenten des **NMDA-signaling-Komplexes**, der in NMDA-Glutamat-Rezeptor-*trafficking*, *-scaffolding* und *-Signalübertragung* involviert ist (PSD-95, NMDAR NR2B *subunit*, CaMKII, *homer 1a*). [61] Darüber hinaus **schützt** Parkin neuronale Zellkulturen **vor Kainat-induzierter Exzitotoxizität**, was auch den AMPA-Glutamat-Rezeptor ins Spiel bringt. [59]

#### **D.4.2.6 Proteasomunabhängige Funktionsregulation durch Monoubiquitylierung**

Es häufen sich Indizien für eine **proteasomunabhängige, spezifisch synaptische Funktion** von Parkin. So wurde nachgewiesen, dass Parkin **PICK1** monoubiquityliert und seine Funktion reguliert, ohne den Abbau des Proteins zu beeinflussen. PICK1 ist für die Potenzierung von ASIC2a-Strömen (Acid-sensing ion channel) notwendig, die in neuronalen Zellkulturen mit Parkin-Knockout deutlich gesteigert ist. Da AS-Ionenkanäle zu **Exzitotoxizität** beitragen, wird eine Bedeutung der PICK1-Monoubiquitylierung für die Neurodegeneration bei M. Parkinson postuliert. [128]

So könnte Exzitotoxizität durch fehlende PICK1-Monoubiquitylierung die beobachteten Veränderungen von Complexin 2 und Lasp-1 sowie die Änderungstendenz der Serinracemase erklären. Die in der vorliegenden Proteomanalyse auffälligen synaptischen Proteine Complexin 2 und Lasp-1 sowie gegebenenfalls die Serinracemase ( $p=0,059$ ) sind sämtlich in glutamaterge Transmission bzw. synaptische Plastizität involviert. Die genannten *in-vitro*-Ergebnisse lassen vermuten, dass hier eine **reaktive Expressionsänderung aufgrund gestörter NMDA- und AMPA-Glutamat-Rezeptorfunktion** vorliegt, vermutlich durch eine **gestörte Ubiquitylierung synaptischer Parkinsubstrate** bedingt. Diese Ubiquitylierung mag einerseits dem Abbau, andererseits der Funktionsregulierung dienen. [21, 128]

## **D.5 Die Genese einzelner klinischer und neuropathologischer Merkmale der Parkinsonerkrankung - Rückschlüsse aus proteasomalen und pathophysiologischen Veränderungen im Modell**

Das vorliegende Modell demonstriert die Bedeutung von Parkin für **mitochondriale, antioxidative und synaptische Funktion**. In Kapitel D.4.2 werden Thesen über eine pathogenetische Hierarchie dieser Veränderungen aufgestellt. Die Relevanz mitochondrialer Störungen und oxidativen Stresses für die Parkinsonerkrankung ist gemeinhin anerkannt; die Möglichkeit ihres Synergismus wurde verschiedentlich erörtert. [107] (*vide* A.2.3.1-2)

Bemerkenswert ist dagegen der Nachweis neuronaler Funktionsstörungen bei Fehlen jeglicher histopathologischer Auffälligkeit. Veränderungen der Neurotransmission bei M. Parkinson werden im Allgemeinen als Folgeerscheinungen bzw. Kompensationsvorgänge *nach* ausgeprägtem Neuronenuntergang interpretiert. Das alleinige Vorliegen neurophysiologischer und -biochemischer Veränderungen weist auf deren Rolle als frühe, eigenständige Veränderung hin, die dem **Neuronenverlust vorausgeht** und ihn möglicherweise fördert. Im Folgenden sollen solche Befunde näher besprochen werden, die mit Störungen der **synaptischen Funktion** bei M. Parkinson in Zusammenhang zu bringen sind.

### **D.5.1 Kognitive Defizite bei M. Parkinson durch Lasp-1 und Complexin 2?**

Kognitive Defizite bei M. Parkinson betreffen bestimmte Formen des räumlichen Arbeitsgedächtnisses, kognitive Flexibilität und komplexes zielorientiertes Verhalten, d.h. Planung und Ausführung von Handlungsabläufen. [10, 129, 130] Insbesondere zeigen Parkinsonpatienten Schwierigkeiten, sich von früher erlernten auf neue motorische Abläufe umzustellen. Diese Defizite werden als **dysexekutives Syndrom** bezeichnet und auf eine **Störung des dopaminergen Systems** zurückgeführt. (Sie sind abzugrenzen von der Parkinson-assoziierten Demenz, die durch ein kortikales Acetylcholin-Defizit bedingt scheint.) [10, 129]

Itier *et al.* und Zhu *et al.* stellen in ihren Parkin-Exon-3-Knockouts mangelhaftes räumliches Kurzzeitgedächtnis bzw. Lernverhalten fest. [117, 121] Dies stützt die These, das Modell repräsentiere ein „präklinisches“ Stadium der Erkrankung; denn **Störungen des räumlichen Gedächtnisses** treten bei zukünftigen Parkinsonpatienten bereits vor Motorsymptomen auf. [116]

Häufige „präklinische“ Störungen wie die des räumlichen Gedächtnisses, des Geruchssinns und Depression werden auch durch experimentelle Hemmung der adulten Neurogenese

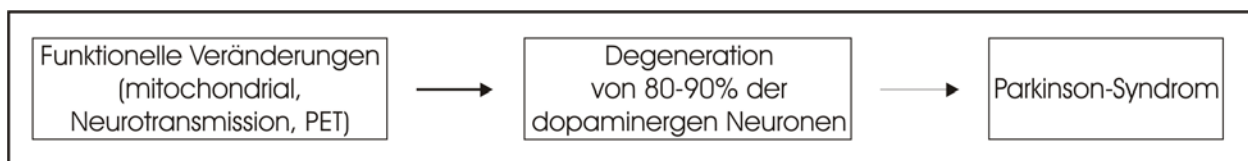
hervorgehoben. [116] Hier lässt sich eine Verbindung zu den Ergebnissen der Proteomanalyse herstellen: Neurogenese und vermutlich auch synaptische Plastizität werden durch Lasp-1 beeinflusst, so dass eine **Lasp-1**-Aktivitätsminderung bei Parkinsonpatienten an der Störung des räumlichen Gedächtnisses beteiligt sein könnte.

Überdies hemmt Lasp-1 in Zellkulturen die Apoptose. [116] So wird diskutiert, ob es Proteine an Adhäsionszonen rekrutiert, die in die Übertragung von *survival signals* involviert sind. (*vide D.2.2*) So könnte eine Aktivitätsminderung Neuronen gegen **Apoptose** induzierende Stimuli sensitivieren. (*vide infra*)

Was mangelnde **kognitive Flexibilität und Schwierigkeiten im Beibehalten neuer motorischer Abläufe** bei M. Parkinson betrifft, so ist das im vorliegenden Modell veränderte **Complexin 2** ein mögliches Agens: Knockout führt u.a. zu Defiziten bei der Aneignung adulter explorativer Verhaltensweisen und der Änderung einmal erlernter Abläufe. [110] Entsprechend zeigt der Exon-3-Knockout von Itier *et al.* vermindertes exploratives Verhalten. [121]

#### **D.5.2 Dopaminerge Hyperaktivität und Exzitotoxizität aufgrund verstärkter glutamaterger Stimulation, verursacht durch Complexin 2 oder Serinracemase?**

Der im Modell erhöhte extrazelluläre Dopamingehalt des Striatums steht im Widerspruch zu typischen Befunden bei sporadischem M. Parkinson. Es ist jedoch möglich, dass hier ein präklinisches Stadium erfasst wird, das sich der Untersuchung in humanen Probanden entzieht, da es nicht nur vor dem Eintreten eines Parkinson-Syndroms, sondern noch **vor dem Beginn der Neurodegeneration** auftritt.



**Abbildung 28: Funktionelle Veränderungen gehen der Erkrankung weit voraus, die erst nach Degeneration von 80-90% der dopaminergen Neuronen manifest wird.**

Solche anfängliche Hyperaktivität könnte die Neuronen durch oxidativen Stress und Atmungskettendefizit schädigen, so dass die schließliche Dekompensation und Degeneration zum bekannten Dopaminmangel führen würde. Eine autogene Schädigung bei erhöhtem Dopaminstoffwechsel wird jedoch üblicherweise mit *kompensatorischer* Hyperaktivität der verbleibenden Neuronen nach erheblicher Degeneration in Verbindung gebracht. Da im vorliegenden Modell kein dopaminerges Neuronenverlust vorliegt, muss eine **nicht**



**kompensatorische Hyperaktivität** abgegrenzt werden, die durch andere Mechanismen hervorgerufen wird.

Die Proteomanalyse lässt vermuten, dass hier Complexin 2 und Serinracemase von Bedeutung sind. Die striatale Dopaminfreisetzung wird physiologisch erhöht, wenn die nigralen dopaminergen Neuronen durch ihre zahlreichen **glutamatergen Afferenzen** aus Cortex und Nucleus subthalamicus verstärkt stimuliert werden. So könnte eine **Complexin-2-Konzentrationserhöhung** zu erhöhter Glutamatfreisetzung führen und eine Konzentrationserhöhung der **Serinracemase** zu NMDA-Rezeptor-Koaktivierung. (*vide* D.2.1, D.2.3)

Als Indiz für eine Beziehung zwischen Complexin-2-Konzentration und dopaminergere Hyperaktivität mag Folgendes gelten: Complexin 2 scheint ins **reversal learning** involviert zu sein [110]; Pergolid, ein D1- und D2-Agonist führt zu dosisabhängigen Defiziten derselben kognitiven Funktion. [129] So sind im vorliegenden Modell sowohl die extrazelluläre Dopaminkonzentration als auch die Konzentration von Complexin 2 erhöht. Möglicherweise besteht also bei *noch* nicht erkrankten Parkinsonpatienten eine passagere, Complexin-2-assoziierte dopaminerge Hyperaktivität.

Die im Modell veränderte glutamaterge Transmission vermittelt einerseits die für Lernprozesse relevanten Vorgänge der synaptischen Plastizität, andererseits aber auch **Exzitotoxizität**.

Letztere wird bei M. Parkinson als pathogenetischer Faktor angesehen. Bei der sogenannten „starken Exzitotoxizität“ kommt es durch übermäßige Aktivierung glutamaterger Rezeptoren zu toxischem Kalziumeinstrom mit den unter D.4.2.1 erläuterten Folgen. Die Relevanz dieses Faktors wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass Läsionen des Nucleus subthalamicus mit glutamaterger Deafferenzierung nigrale Neuronen vor 6-OHDA-Toxizität schützen. [23] Wenn Serinracemase und Complexin 2 die glutamaterge Transmission verstärken, sind dopaminerge Neuronen wegen ihres zusätzlich gesteigerten, ROS erzeugenden Dopaminstoffwechsels besonders vulnerabel. Möglicherweise stellen Serinracemase und Complexin 2 Erfolg versprechende *targets* für die Entwicklung **neuroprotektiver Medikamente** dar, da ein protektiver Effekt für sonstige antiglutamaterge Substanzen bisher nicht belegt werden konnte. [131]

**Synaptische Plastizität** an *kortikostriatalen* glutamatergen Synapsen ist u.a. in **motorisches Lernen** involviert. [129] Sowohl Langzeit-Potenzierung, Langzeit-Depression als auch Depotenzierung werden durch die dopaminerge Transmission beeinflusst. [10] Hier könnten

veränderte Complexin-2- oder Serinracemase-Aktivitäten sowohl über die glutamaterge als auch dopaminerge Transmission eingreifen. (*vide* D.2.1, D.2.3)

### **D.5.3 Exzitotoxizität durch Atmungskettendefizit**

Eine zunehmende Zahl an Untersuchungen deutet darauf hin, dass mitochondriale Störungen eine wichtige Rolle in der Parkinsongenese spielen und speziell mit der Parkinfunktion eng verknüpft sind. Die vorliegenden Ergebnisse rücken insbesondere die Wechselwirkung von mitochondrialer Störung und oxidativem Stress sowie neurologischer Dysfunktion ins Blickfeld.

Palacino *et al.* fanden in striatalen Mitochondrien die Kapazitäten aller vier Atmungskettenkomplexe um 18 bis 25% vermindert. Das **Konzept der „schwachen Exzitotoxizität“** stellt eine konkrete Verbindung zwischen neuronalen Vorgängen und ATP-Mangel bei mitochondrialer Funktionsstörung her. Wenn die ATP-abhängige, physiologische Blockade des NMDA-Rezeptors durch Magnesiumionen ausfällt, aktivieren schon Glutamatmengen den NMDA-Rezeptor, auf die normalerweise nur AMPA/Kainat-Rezeptoren reagieren. NMDA-Rezeptoren lassen aber ungleich mehr Kalzium in die Zelle einströmen, was, zumal in Verbindung mit ROS und vermindertem mitochondrialen Membranpotential, bei Protonenpumpendefizit zu Apoptose führen kann. [23] (*vide* D.4.2.1)

### **D.5.4 Rückschlüsse auf die Genese einzelner Aspekte der parkinbedingten Parkinsonerkrankung**

Parkin-Patienten haben eine nahezu normale Lebenserwartung, ihre Erkrankung schreitet nach frühem Beginn auffallend langsam fort. [132] Bei parkinbedingter Parkinsonerkrankung bleibt der Zelluntergang auf Substantia nigra und Locus coeruleus begrenzt. [37] In PET-Untersuchungen zeigen Parkin-Patienten dagegen trotz milder Behinderung ausgedehntere Funktionsverluste als parkinnegative *early-onset* Patienten. [133] Möglicherweise besitzt also der parkinbedingte M. Parkinson eine **ausgeprägtere dysfunktionelle Komponente** als andere Parkinsonvarianten, bei weniger ausgedehnten, möglicherweise später einsetzenden Zellverlusten. Entsprechend fehlen auch im vorliegenden Modell morphologische Auffälligkeiten.

Für Dysfunktion, nicht absoluten Dopaminmangel sprechen auch die kennzeichnenden **Dystonien**, unter denen Parkin-Patienten bereits zum Manifestationszeitpunkt leiden. [132] Diese werden im Allgemeinen auf lokal oder relativ *erhöhte* Dopaminspiegel, häufig im

Zusammenhang mit Medikamenteneinnahme, zurückgeführt. [24] So korreliert dieses klinische Merkmal auffallend gut mit den **erhöhten extrazellulären Dopaminkonzentrationen** im vorliegenden Mausmodell. Vermutlich stellt dieser Befund daher eine Besonderheit des parkinbedingten M. Parkinson dar.

Falls diese dopaminerge Funktionsstörung durch erhöhte glutamaterge Stimulation ausgelöst wird, wie unter D.5.2 spekuliert, wäre eine antiglutamaterge Therapie Erfolg versprechend. Amantadin dürfte dann einerseits Dystonien lindern und andererseits durch Regulation des Dopaminstoffwechsels hier tatsächlich die Progression der Erkrankung hemmen.

Als weitere Besonderheit imponiert bei **AR-JP** eine Unreife dopaminerger Neuronen. [134] Hier könnte Lasp-1 eine Rolle spielen: Das im Parkin-Knockout veränderte Protein ist in die Neurogenese involviert. Zwar ist die neuronale Morphologie der Knockout-Mäuse unauffällig; jedoch mag Lasp-1 in Mausfeten noch unverändert gewesen sein, während seine Konzentration in der (längeren) Fetalphase des Menschen bereits von der Norm abweicht und die Neurogenese beeinträchtigt wird. Möglicherweise gibt dies den Anstoß zu späteren funktionellen Defiziten, während die unreiferen Neuronen dennoch robuster und anpassungsfähiger sind.

#### **D.6 Interpretation der Spotveränderungen bzgl. ihrer Lokalisation in ventralem Mittelhirn bzw. Großhirn**

Das Präparat „**ventrales Mittelhirn**“ enthält die Substantia nigra. Im Präparat „**Großhirn**“ ist neben dem Cortex u.a. das Striatum mit den nigrostriatalen Synapsen enthalten.

Zwar ist man versucht, die Veränderungen des Proteoms im ventralen Mittelhirn als Äquivalent der dopaminerg-nigralen Funktionsstörung anzusehen. Diese Annahme wäre jedoch unzulässig, da die Substantia nigra nur einen Teil dieses Organpräparats ausmacht, die gesamte **neuronale Population** wiederum nur **1-2% der nigralen Zellen** darstellt und die dopaminergen Zellen wiederum nur einen Teil dieser Population. [15] Da im Probenextrakt die **Proteome aller Zellen des Präparats** enthalten sind, repräsentiert das relative Volumen eines Spots die *durchschnittliche* Konzentration einer Proteinisoform über alle Zellen des Gewebes. Da Parkin ubiquitär exprimiert wird, können Veränderungen **sowohl neuronal als auch glial** bedingt sein. [15]

**Beide Hirnregionen** weisen Spotveränderungen **sowohl synaptischer als auch antioxidativer** Proteine auf. Dagegen treten signifikante Veränderungen wie auch nicht signifikante Tendenzen **mitochondrialer** Proteine ausschließlich im **ventralen Mesencephalon** auf. Sind die

Mitochondrien der Substantia nigra besonders anfällig? Ist eine mitochondriale Schädigung Ausgangspunkt der pathogenen Wirkung des Parkinverlusts mit nigral dopaminerger Dysfunktion? Dafür spricht die selektive Schädigung dopaminerger Neuronen durch verschiedene mitochondriale Toxine mit Auslösung eines Parkinsonsyndroms. [23]

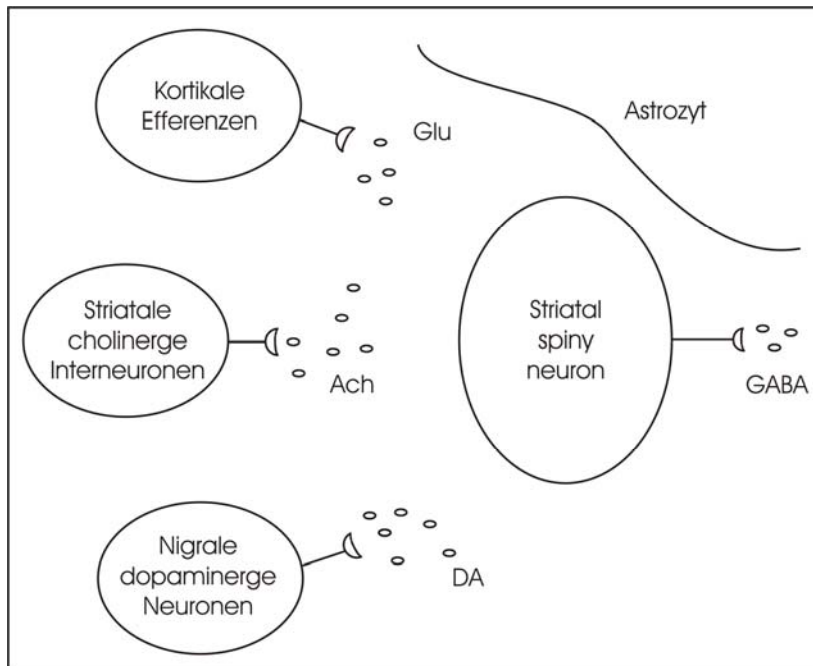
Das neuronale antioxidative Protein Peroxiredoxin 2 zeigt nur im Mesencephalonpräparat eine Spotveränderung. Dies weist auf ausschließlich **im Mesencephalon erhöhten neuronalen oxidativen Stress** hin. Bei Aktivitätsminderung von Peroxiredoxin 2 sind besonders dopaminerge Neuronen gefährdet, da diese durch den Dopaminstoffwechsel in besonderem Maße oxidativem Stress ausgesetzt sind.

Die mesencephale Peroxiredoxin-2-Veränderung mag durch die ebenfalls rein **mesencephale mitochondriale Dysfunktion** bedingt sein. So könnten gestörte Calciumhomöostase und reaktive Sauerstoffspezies den oxidativen Stress im Mesencephalon steigern und nach Erschöpfung von Kompensationsmechanismen zur Verschiebung des neuronalen Redoxzustands führen.

Da **Peroxiredoxin 1 und Complexin 2** sowie fraglich **Glyoxalase 1** in *beiden* Hirnregionen verändert sind, lässt sich, unter der Annahme einer kausalen Kette, postulieren, dass sie in direkterem Zusammenhang mit der Parkinfunktion stehen als andere identifizierte Proteine.

Da bei einer neurologischen Erkrankung die Zuordnung der Befunde zu konkreten neuronalen Netzen interessiert, soll im Folgenden auf die Lokalisation **synaptischer** Proteinveränderungen näher eingegangen werden. Zwar sind die Spotveränderungen aufgrund des geringen Anteils dopaminerger Neuronen im Gewebe nicht als *Ausdruck* der Transmissionseigenschaften dieser Neuronenpopulation zu betrachten. Es wird jedoch erörtert, wie sich die jeweilige Veränderung in einer relevanten Menge aller Neuronen des Präparates als *Voraussetzung* auf die Transmission und den spezifischen Stoffwechsel dopaminerger Neuronen auswirken kann.

Die Spotveränderung von **Complexin 2** (*vide* D.2.1, D.5.2) im Großhirn spricht für eine erhöhte Complexin-2-Konzentration in dortigen glutamatergen Nervenendigungen. Es existieren widerstreitende Thesen, ob die Complexine die synaptische Transmitterfreisetzung fördern oder hemmen. Die untersuchten glutamatergen, kortikostriatalen Synapsen, die in den Stammganglien und damit im Großhirnbereich liegen, zeigen eine verminderte Transmission nach elektrischer Stimulation der Afferenzen. (*vide* D.4.1) Dies kann plausibel auf die im Modell erhöhte extrazelluläre Dopaminkonzentration an glutamatergen kortikostriatalen Synapsen zurückgeführt werden. [12] Ebenso könnte eine parkinbedingte Störung der NMDA-Rezeptor-Aktivität, vermittelt durch Complexin 2, zugrunde liegen. (*vide* D.4.2)



**Abbildung 29: Afferenzen des *medium sized spiny neuron* im Striatum**

**Legende:** *Glu* Glutamat, *ACh* Acetylcholin, *DA* Dopamin

Der **Serinracemase**-Spot zeigt lediglich eine Tendenz zur Änderung, die ausschließlich im Mesencephalonpräparat zu beobachten ist. (*vide* F.6) Durch NMDA-Rezeptor-Koaktivierung im Mesencephalon dürfte sie u.a. die glutamatergen Einflüsse auf nigrale, dopaminerge Neuronen verstärken, was mit der beobachteten vermehrten Dopaminfreisetzung vereinbar ist. Dagegen liegt im Großhirnpräparat keine Änderungstendenz vor, so dass die erhöhte Dopaminfreisetzung nicht durch verstärkte NMDA-Rezeptor-Koaktivierung an striatalen Projektionsneuronen antagonisiert wird und somit die beobachtete Verminderung deren glutamaterg-synaptischer Erregbarkeit plausibel ist.

Der **Lasp-1**-Spot ist nur im Präparat des ventralen Mesencephalon volumengemindert. Die neuronale Funktion des Proteins ist weitgehend unklar; es greift in Zellkulturen in Migrationsverhalten und Apoptosevorgänge ein. [83] (*vide* D.2.2) Im Sinne der Parkinsonpathologie lässt sich spekulieren, mesencephale Zellen wären durch die Lasp-1-Veränderung für apoptotische Stimuli vulnerabler. Da *dopaminerge* Neuronen primär einer höheren oxidativen Belastung ausgesetzt sind, träfen hier zwei Faktoren zusammen, die synergistisch zur Apoptose prädisponieren.

## D.7 Berücksichtigung der Einflüsse von Proteinnetzwerken und *molecular crowding*

Einzelne Proteine erweisen sich in *mehreren* Modellen verschiedener neurodegenerativer und nicht neurodegenerativer Erkrankungen als verändert. [135] Dies macht ihre Position in gemeinsamen Endstrecken, *downstream* von Konvergenzpunkten verschiedener Reaktionskaskaden, wahrscheinlich und führt zum Konzept der **Proteinnetzwerke** – im Gegensatz zur klassischen Betrachtung isolierter Reaktionspfade.

So sind verschiedene Isospots von **Peroxiredoxin 1 und Complexin 2** in mehreren von sieben neuronalen Erkrankungsmodellen der AG Biochemische Humangenetik (Institut für Humangenetik, Charité) volumenverändert, teils gleich-, teils gegensinnig. [135] Bei den Spotvolumenänderungen von Complexin 2 und Peroxiredoxin 1 dürfte es sich daher um *downstream* gelegene Phänomene handeln, um Veränderungen der postulierten gemeinsamen Endstrecken verschiedener Erkrankungen.

Eine weitere aus dem Vergleich verschiedener neuronaler Erkrankungsmodelle hervorgehende Beobachtung erregt Aufmerksamkeit: In **neurodegenerativen** Erkrankungen überwiegen **Spotvolumenminderungen**, während in nicht degenerativen Erkrankungen Volumenerhöhungen und -minderungen etwa in gleicher Häufigkeit auftreten. [135]

Könnte dies mit *molecular crowding* zusammenhängen? Zwar wurden potentiell akkumulierende Parkinsubstrate nicht identifiziert; dies kann jedoch methodische Gründe haben. So handelt es sich bei einigen *in-vitro*-Substraten um lipophile Proteine (Transmembrandomänen), deren Einwandern ins 2D-Gel erheblich erschwert bis unmöglich ist. Wenn man daher dennoch die substantielle Akkumulation eines oder mehrerer Parkinsubstrate postuliert, könnte diese nach der *Theorie verdrängten Volumens* zum Expressionsregulator anderer Proteine werden. [136] Dann wäre ausgerechnet das Übermaß an Volumenminderungen ein **Hinweis auf Proteinakkumulation**.

## D.8 Evaluation des Modells

### D.8.1 Validität bzgl. der humanen Parkinsonerkrankung

Das Modell beruht auf dem Knockout eines Proteins, dessen Funktionsverlust durch Mutation beim Menschen gesichert die Parkinsonerkrankung auslöst.

Trotz dieser Übereinstimmungen muss hinterfragt werden, wie valide die Parkin-Knockout-Modelle bezüglich der humanen Parkinsonerkrankung sind, da sie die wesentlichen Diagnosekriterien der menschlichen Erkrankung nicht erfüllen: **Parkinsonoid, Untergang dopaminerger Neuronen** und  $\alpha$ -synuclein- oder ubiquitinhaltige Einschlüsse. (*vide* A.5.5) Das Fehlen von zytoplasmatischen Einschlusskörpern überrascht nicht, da diese für den parkinbedingten M. Parkinson nicht typisch sind. [35] Die Abwesenheit von Parkinson-Syndrom und dopaminergem Zellverlust bedeutet dagegen eine erhebliche Diskrepanz zwischen Mausmodell und humaner Erkrankung. Dies ist ein generelles Problem bei Modellen altersabhängiger, neurodegenerativer Erkrankungen: Häufig bestehen nur leichte funktionelle Defizite, ohne dass histopathologische Kardinalkriterien rekapituliert würden. Vielfach wird dies auf geringere Lebensdauer der Versuchstiere und Schutz vor Umweltstressoren zurückgeführt. Überdies besitzen Mäuse höhere GSH-Konzentrationen als Primaten, was zur höheren Resistenz der Tiere gegen oxidativen Stress, einen wesentlichen pathogenetischen Faktor, beitragen und die Auswirkungen des Knockouts mindern kann. [15]

Dennoch kommt es im vorliegenden Exon-3-Knockout zu Auffälligkeiten in sensitiven Tests des nigrostriatalen Systems sowie zu gestörter striataler Neurotransmission, so dass von einer Erkrankung der Mäuse ausgegangen werden kann; es dürfte sich allerdings um ein **präklinisches Stadium** handeln, während die Versuchstiere das Stadium der Neurodegeneration nicht erreichen (*vide* D.8.3).

### **D.8.2 Vergleich mit anderen Parkin-Knockouts**

Auch in anderen Modellen bestätigen sich **verminderte Resistenz gegen oxidativen Stress** [73, 121, 137], eine Störung der **mitochondrialen Funktion** [137], aber auch eine Minderung von Körpergröße bzw. -gewicht bei Parkin-Knockout. [67, 121]

Körpergewicht und -temperatur, muskuläre Ausdauer, exploratives Verhalten, Aktivität, oxidativer Stress, Vulnerabilität gegenüber dopaminergen Toxinen und mitochondriale Transkription sind jedoch auch vom Mausstamm abhängig, und alle bisherigen Parkin-Knockout-Untersuchungen wurden an Tieren mit inhomogenem genetischen Hintergrund durchgeführt (B6 und 129S). [70] Die vorliegende Proteomanalyse zeichnet sich dagegen durch **Verwendung von Mäusen mit isogenem Hintergrund** aus (129S Inzucht) und schließt somit stammbedingte Unterschiede als Quelle systematischer Fehler i.S. des *confounding* aus. So belegt sie die Beeinflussung des **synaptischen, mitochondrialen und antioxidativen Systems durch Parkin-Exon-3-Knockout** auch bei isogenem Hintergrund.

Nach Beginn der Arbeit wurden auch an anderen Parkin-Knockout-Modellen Proteomanalysen durchgeführt und veröffentlicht. So fanden Periquet *et al.* Proteinveränderungen, die zellulären Energiehaushalt, Proteinabbau, Reaktion auf oxidativen Stress und synaptische Funktion betreffen. [138]

Mittlerweile wurden auch in anderen Modellen Verhaltensauffälligkeiten nachgewiesen. Hervorzuheben ist die Untersuchung alter Exon-3-Knockout-Mäuse durch Rodríguez-Navarro *et al.*, die parkinsonähnliche Veränderungen von Gang und Haltung zeigen. Dies stützt die Interpretation der leichten nigrostriatalen Dysfunktion als Vorstadium der Erkrankung. [139]

### **D.8.3 Die Relevanz des Modells**

Mit dem Parkinfunktionsverlust basiert das Modell auf einer im Menschen relevanten Parkinsonursache. Somit ist von einer Relevanz der Ergebnisse zumindest bezüglich der Pathomechanismen der **parkinbedingten Parkinsonerkrankung** auszugehen.

Darüber hinaus lassen einige Argumente vermuten, dass das Modell auch für die **sporadische Parkinsonerkrankung** von Relevanz ist.

So teilt das Modell zwei wesentliche Charakteristika mit der sporadischen Parkinsonerkrankung: **mitochondriales Defizit** und ein **erhöhtes Maß an oxidativen Veränderungen** mit verminderten antioxidativen Ressourcen.

Des Weiteren stellt in Familien mit Parkinmutationen die **Mutation eines einzigen Parkinallels** einen **Risikofaktor** für *late-onset*-Parkinson dar; auch asymptotische Heterozygote zeigen in der PET eine nigrostriatale Dysfunktion. [42, 140] Somit *könnten* heterozygote Parkinmutationen in der Gesamtbevölkerung als Risikofaktor fungieren; eine Assoziation mit der sporadischen Parkinsonerkrankung scheint, abgesehen von juvenilen Fällen, allerdings nicht vorzuliegen. [141-143] Möglicherweise ist ein Polymorphismus des Parkinpromoters mit idiopathischem M. Parkinson assoziiert. [43]

Insbesondere mag ein **Parkin-Funktionsverlust von epidemiologischer Relevanz** sein: Parkin wird durch **ROS** inaktiviert und neigt dann zur Aggregation. So löst Stickoxid über Radikalbildung eine Cysteininaktivierung an der RING1-Domäne aus [144]; verschiedene Toxine, die oxidativen Stress erzeugen, so Rotenon, MPP<sup>+</sup>, 6-Hydroxydopamin, Paraquat, Stickoxid und Eisen, verändern die Löslichkeit von Parkin und führen zur Aggregation des Proteins [145]. Tatsächlich wird S-nitrosyliertes Parkin in Hirnproben von Patienten mit



sporadischer Parkinsonerkrankung sowie von MPTP- und Rotenon-behandelten Tieren detektiert, während es in Kontrollen nahezu abwesend ist. [144]

Möglicherweise sind daher auch Aspekte der im Modell festgestellten **Transmissionsstörung** auf die sporadische Erkrankung übertragbar. So sollen die Complexine durch oxidativen Stress induziert werden. [112] Das hier veränderte **Complexin 2** führt vermutlich zu Störungen der glutamatergen Transmission und kann so zu Exzitotoxizität und über gestörte synaptische Plastizität zu typischen kognitiven Defiziten bei M. Parkinson beitragen.

Überdies kann es bei dopaminergem Hyperaktivität zum Parkin-Funktionsverlust kommen: **Dopamin** modifiziert Parkin kovalent, mindert seine Löslichkeit und schaltet seine E3-Ubiquitinligaseaktivität aus. [146]

Die **mitochondrialen Veränderungen** sind bei sporadischer Parkinsonerkrankung weniger ausgeprägt als im Parkin-Knockout-Modell. Dennoch kann es in Verbindung mit anderen Prädispositionsfaktoren wie  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenasemangel zu relevantem ATP-Mangel kommen, und damit zu oben diskutierten Wechselwirkungen mit der synaptischen Funktion, insbesondere im Hinblick auf exzitotoxisch und mitochondrial vermittelte Apoptose. [23] (*vide* D.4.2.1 und A.2.3.5)

Die gering ausgeprägte klinische und neuropathologische Symptomatik mag primär als Unzulänglichkeit des Modells erscheinen. Bei vorhandenen Auffälligkeiten in sensitiven Tests des nigrostriatalen Systems sowie gestörter striataler Neurotransmission kann dennoch von einer Erkrankung der Mäuse ausgegangen werden; es dürfte sich allerdings um ein **präklinisches Stadium** handeln, während die Versuchstiere das Stadium der Neurodegeneration nicht erreichen (*vide* D.8.1). Dafür spricht auch die Untersuchung alter Parkin-Exon-3-Knockout-Mäuse (24 Monate) von Rodríguez-Navarro, die u.a. veränderte Haltung und Gangbild sowie offenbar einen Verlust dopaminergem Neuronen aufweisen. [139] Somit dürfte das Modell Aufschluss über die **frühe Pathogenese** der Parkinsonerkrankung geben. Die Wahrscheinlichkeit, entscheidende, **upstream** gelegene Veränderungen zu entdecken, ist damit weit höher als bei Untersuchung manifest Erkrankter, bei denen vielfältige Kompensationsvorgänge das Bild beherrschen. Die Kenntnis früher Veränderungen kann einen kurativen therapeutischen Ansatz ermöglichen bzw. den Versuch, das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten.

Sobald man eine kurative oder präventive Option findet, hätte auch eine Untersuchung von Mutationsträgern auf präklinische Symptome im Sinne der **Früherkennung** möglicherweise

eine therapeutische Konsequenz. Zu diesem Zweck kann geprüft werden, ob die im Modell beobachteten Veränderungen der Neurotransmission auch im Menschen das präklinische Stadium, insbesondere bei parkinbedingter Erkrankung, kennzeichnen.

### **D.9 Evaluation der Methode im Hinblick auf die gewählte Fragestellung**

Die 2D-Großgelelektrophorese ist eine gute Screeningmethode für quantitative und qualitative Proteinveränderungen. Bei mehreren Tausend zu vergleichenden Spots ist ihr großer Vorteil die enorme Menge an dargestellten Proteinen, während selektivere Proteintests nur konkrete Vermutungen und bereits bekannte Kandidaten prüfen können. So kann die 2D-GE in Verbindung mit der Massenspektrometrie *targets* für weitere Untersuchungen liefern.

Allerdings entzieht sich ein Teil des Proteoms nach wie vor der 2D-GE-Analyse: Sehr niedrig konzentrierte Proteine können massenspektrometrisch kaum identifiziert werden; stark hydrophobe Proteine, so einige *in-vitro*-Parkinsonsubstrate, wandern nicht ins 2D-Gel ein. Sehr gut analysierbar sind dagegen **abundante, hydrophile Proteine**.

Zu beachten ist die Einschränkung, dass bei der Silberfärbung das errechnete **Spotvolumen nicht proportional zum Proteingehalt** steigt. Im Farbsättigungsbereich, also bei besonders abundanten Proteinen, treten damit Quantifizierungsprobleme auf. Dieses Problem sollen neue, kommerzielle Methoden mit Fluoreszenzfarbstoffen beheben.

Ein Handicap der 2D-GE-Analyse ist eine **geringe Power** der Tests. Aufgrund des hohen Arbeitsaufwands der Großgelelektrophorese können nur kleine Fallzahlen bearbeitet werden, so dass die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art  $\beta$ , d.h. falsch negative Ergebnisse, relativ hoch ist. So erreicht beispielsweise die Spotvolumenminderung des mitochondrialen Komplex I, dessen Aktivität bei M. Parkinson und im vorliegenden Modell vermindert ist, keine statistische Signifikanz. Deshalb werden im Anhang Spotvolumenänderungstendenzen aufgeführt.

### **D.10 Ausblick**

Da das jeweilige 2D-Gel eine Momentaufnahme darstellt, sind zur Klärung chronologischer und kausaler Zusammenhänge weitere Untersuchungen notwendig. Von Interesse im vorliegenden Mausmodell ist beispielsweise, ob die Veränderungen synaptischer Proteine denen antioxidativer und mitochondrialer Proteine vorausgehen oder umgekehrt. Aufklärung darüber verspricht die laufende **Untersuchung jüngerer Knockout-Mäuse**. Zur Differenzierung zwischen ubiquitärer

Parkinwirkung und spezifisch neuronaler und glialer Funktion des Proteins werden **weitere Organe** untersucht, so beispielsweise die Leber.

Weiterhin interessieren potentielle *in-vivo*-Parkinsubstrate. So könnte man prüfen, ob das im Modell signifikant volumengesteigerte Protein Complexin 2 mit Parkin interagiert und ubiquityliert wird; als *targets* für diesbezügliche Untersuchungen bieten sich auch die nicht signifikant volumengesteigerten Proteine Serinracemase, Complexin 1 und die  $\beta$ 1-Untereinheit des GTP-bindenden Proteins an. Aussichtsreicher scheint allerdings die Testung weiterer *in-vitro*-Parkinsubstrate auf Konzentrationsänderungen mittels *Western blot*, so DAT, Pael-R und insbesondere p38, das in einem anderen Knockout akkumuliert. [63]



## E Zusammenfassung

Die Parkinsonerkrankung ist eine epidemiologisch bedeutsame Erkrankung des höheren Lebensalters, bei der es zur fortschreitenden Degeneration monoaminerger und cholinergischer Neurone des zentralen Nervensystems kommt. Parkin-Funktionsverlust verursacht 50% der Fälle mit autosomal rezessiver Vererbung. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Parkinson-Mausmodell mit Parkin-Exon-3-Knockout im Stamm 129/Sv untersucht. Es wurden zehn Knockout- mit zehn Wildtypmäusen desselben Stamms verglichen. Mittels zweidimensionaler Großgel-Elektrophorese, Silberfärbung, softwaregestützter Bildverarbeitung (Proteomweaver), statistischer Auswertung (Wilcoxon-Test) und Massenspektrometrie wurden ventrales Mittelhirn (M) und Großhirn (C) auf Proteomveränderungen untersucht.

Die Proteomanalyse zweier Hirnregionen des vorliegenden Parkin-Knockouts ergab zum einen Spotvolumenminderungen von Proteinen des antioxidativen Systems und der mitochondrialen Atmungskette (Peroxiredoxin 1, C und M,  $p=0,008$  bzw.  $0,037$ ; Peroxiredoxin 2, M,  $p=0,037$ ; Glyoxalase 1, C,  $p=0,047$ ; CytochromC-Oxidase-Untereinheit Vb, M,  $p=0,025$ ). Zum anderen fanden sich Spotvolumenänderungen synaptisch bzw. perisynaptisch lokalisierter Proteine: eine Spotvolumenminderung von Lasp-1 (M,  $p=0,028$ ) und eine Spotvolumensteigerung von Complexin 2 (C,  $p=0,037$ ).

Die erstgenannten Ergebnisse bestätigen prominente Pathomechanismen des M. Parkinson: Veränderungen des antioxidativen Systems und der mitochondrialen Atmungskette.

Mit den letztgenannten Ergebnissen dagegen rückt die vorliegende Untersuchung einen pathogenetischen Aspekt ins Blickfeld, der bisher kaum Beachtung findet: *frühe* Veränderungen der synaptischen Funktion. Synaptische Veränderungen werden bisher als *späte, kompensatorische* Vorgänge bei manifestem M. Parkinson mit fortgeschrittenem Neuronenverlust thematisiert. Da die Knockout-Mäuse jedoch nur eine dezente Klinik und keinerlei histopathologische Auffälligkeiten zeigen, stellen die beobachteten synaptischen Proteinveränderungen offenbar *frühe, funktionelle* Veränderungen dar, die möglicherweise ursächlich am späteren Neuronenverlust beteiligt sind.

Die Ergebnisse weisen der glutamatergen Exzitotoxizität eine bedeutendere pathogenetische Rolle zu als bisher angenommen. So stehen Complexin 2 und Lasp-1 in Zusammenhang mit glutamaterger Transmission und synaptischer Plastizität, ebenso die Serinracemase (Tendenz, M,  $p=0,059$ ). Da bereits *vor* einem signifikanten Neuronenverlust die glutamaterge Transmission

verändert ist, spielt die glutamaterge Exzitotoxizität möglicherweise nicht nur eine verstärkende, sondern eine auslösende Rolle für den dopaminergen Zelluntergang.

Mit einer veränderten glutamatergen Transmission sind auch andere Untersuchungsergebnisse am Mausmodell erklärbar. So beobachten Goldberg *et al.* eine Erhöhung der striatalen extrazellulären Dopaminkonzentration. Diese kann durch eine vermehrte glutamaterge Stimulation nigraler dopaminergener Neurone hervorgerufen werden, die ihrerseits durch eine Konzentrationserhöhung von Complexin 2 und Serinracemase bedingt sein könnte.

Die beobachtete Erhöhung der striatalen extrazellulären Dopaminkonzentration, die im Gegensatz zum Dopaminmangel bei manifester, idiopathischer Parkinsonerkrankung steht, stellt möglicherweise eine Besonderheit des parkinbedingten M. Parkinson dar. Sie ist mit den bei Parkin-Patienten prominenten Dyskinesien vereinbar, die vermutlich durch einen Dopaminüberschuss bedingt sind. Auch die oben genannten *funktionellen* synaptischen Veränderungen könnten von besonderer Relevanz für die parkinbedingte Erkrankung sein: In PET-Untersuchungen zeigt sich eine ausgedehnte Dysfunktion bei eher umschriebenem Neuronenverlust und nur langsam progredienter Klinik.

Neben Erkenntnissen zur Pathogenese der Parkinsonerkrankung liefert die Proteomanalyse auch Hinweise auf die Funktion des Proteins Parkin. Parkin zeigt *in vitro* Ubiquitinligase-Aktivität; jedoch wies die Proteomanalyse keine *in-vivo*-Konzentrationsänderungen der *in-vitro*-Substrate nach. Sie lässt allerdings auf die mittelbare Proteinfunktion schließen. So werden zum einen antioxidative und mitochondriale Funktion durch Parkin beeinflusst, zum anderen die synaptische Funktion - mit Auswirkungen auf glutamaterge und dopaminerge Transmission sowie Motorik und Lernverhalten der Maus. Das in einem anderen Parkin-Knockout akkumulierende *in-vitro*-Substrat p38 mag seinen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung via Lasp-1 entfalten.

In methodischer Hinsicht widerlegt die vorgelegte Arbeit die Behauptung, Parkin-Knockout-Effekte stellten im Wesentlichen *confounding*-Effekte durch Mausstammunterschiede dar; denn sie weist Veränderungen an Tieren mit homogenem genetischen Hintergrund nach.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung dürften auch für den idiopathischen M. Parkinson (IPD) relevant sein. Erstens rekapituliert das Modell prominente Merkmale des IPD: Veränderungen des antioxidativen und mitochondrialen Systems. Zweitens wird Wildtyp-Parkin durch oxidative Modifikation in seiner Funktion beeinflusst, so dass der bei IPD frühzeitig erhöhte oxidative Stress über einen Parkin-Funktionsverlust zu ähnlichen Defiziten wie der Parkin-Knockout führen kann.

## F Anhang

### F.1 Literaturverzeichnis

1. Wilkins, M.R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, et al., *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996. **13**: p. 19-50.
2. Rascol, O., P. Payoux, F. Ory, et al., *Limitations of current Parkinson's disease therapy*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S3-12; discussion S12-5.
3. Vila, M. and S. Przedborski, *Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S58-62.
4. Lang, A.E. and A.M. Lozano, *Parkinson's disease. Second of two parts*. N Engl J Med, 1998. **339**(16): p. 1130-43.
5. Hunot, S. and E.C. Hirsch, *Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S49-58; discussion S58-60.
6. Takahashi, R. and Y. Imai, *Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease*. J Neurol, 2003. **250 Suppl 3**: p. III25-9.
7. Fall, P.A., A. Saleh, M. Fredrickson, et al., *Survival time, mortality, and cause of death in elderly patients with Parkinson's disease: a 9-year follow-up*. Mov Disord, 2003. **18**(11): p. 1312-6.
8. Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
9. Chung, K.K., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *New insights into Parkinson's disease*. J Neurol, 2003. **250 Suppl 3**: p. III15-24.
10. Calabresi, P., B. Picconi, L. Parnetti, et al., *A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance*. Lancet Neurol, 2006. **5**(11): p. 974-83.
11. Olanow, C.W., A.H. Schapira, and Y. Agid, *Neuroprotection for Parkinson's disease: prospects and promises*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S1-2.
12. Goldberg, M.S., S. M. Fleming, J. J. Palacino, et al., *Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43628-35.
13. Warner, T.T. and A.H. Schapira, *Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S16-23; discussion S23-5.
14. Rego, A.C. and C.R. Oliveira, *Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases*. Neurochem Res, 2003. **28**(10): p. 1563-74.
15. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S26-36; discussion S36-8.
16. Gibb, W.R. and A.J. Lees, *The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1988. **51**(6): p. 745-52.
17. Perry, T.L., D.V. Godin, and S. Hansen, *Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency?* Neurosci Lett, 1982. **33**(3): p. 305-10.
18. Ben-Shachar, D. and M.B. Youdim, *Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats*. J Neurochem, 1991. **57**(6): p. 2133-5.

19. Riederer, P., E. Sofic, W. D. Rausch, et al., *Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains*. J Neurochem, 1989. **52**(2): p. 515-20.
20. Dawson, T.M., *New animal models for Parkinson's disease*. Cell, 2000. **101**(2): p. 115-8.
21. McNaught, K.S., R. Belizaire, O. Isacson, et al., *Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease*. Exp Neurol, 2003. **179**(1): p. 38-46.
22. von Bohlen und Halbach, O., A. Schober, and K. Krieglstein, *Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease*. Prog Neurobiol, 2004. **73**(3): p. 151-77.
23. Olanow, C.W. and W.G. Tatton, *Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 123-44.
24. Lücking, C.B., A. Durr, V. Bonifati, et al., *Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group*. N Engl J Med, 2000. **342**(21): p. 1560-7.
25. Hardy, J., H. Cai, M. R. Cookson, et al., *Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism*. Ann Neurol, 2006. **60**(4): p. 389-98.
26. Marder, K., G. Levy, E. D. Louis, et al., *Familial aggregation of early- and late-onset Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **54**(4): p. 507-13.
27. Pankratz, N., W. C. Nichols, S. K. Uniacke, et al., *Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2599-608.
28. Sveinbjornsdottir, S., A. A. Hicks, T. Jonsson, et al., *Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland*. N Engl J Med, 2000. **343**(24): p. 1765-70.
29. Schrag, A., Y. Ben-Shlomo, R. Brown, et al., *Young-onset Parkinson's disease revisited--clinical features, natural history, and mortality*. Mov Disord, 1998. **13**(6): p. 885-94.
30. Kitamura, Y., S. Shimohama, A. Akaike et al., *The parkinsonian models: invertebrates to mammals*. Jpn J Pharmacol, 2000. **84**(3): p. 237-43.
31. Betarbet, R., T.B. Sherer, and J.T. Greenamyre, *Animal models of Parkinson's disease*. Bioessays, 2002. **24**(4): p. 308-18.
32. Zetterstrom, R.H., L. Solomin, L. Jansson, et al., *Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice*. Science, 1997. **276**(5310): p. 248-50.
33. Takei, K., T. Yamamoto, Y. Asano, et al., *[A case of autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) with onset at the age of 6 years]*. Rinsho Shinkeigaku, 2000. **40**(6): p. 596-9.
34. Hayashi, S., K. Wakabayashi, A. Ishikawa, et al., *An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene*. Mov Disord, 2000. **15**(5): p. 884-8.
35. Farrer, M., P. Chan, R. Chen, et al., *Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations*. Ann Neurol, 2001. **50**(3): p. 293-300.
36. Takahashi, H., E. Ohama, S. Suzuki, et al., *Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family*. Neurology, 1994. **44**(3 Pt 1): p. 437-41.
37. Mori, H., T. Kondo, M. Yokochi, et al., *Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q*. Neurology, 1998. **51**(3): p. 890-2.
38. Matsumine, H., M. Saito, S. Shimoda-Matsubayashi, et al., *Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(3): p. 588-96.
39. Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.



40. Itier, J.M., P. Ibanez, M. A. Mena, et al., *Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(18): p. 2277-91.
41. von Coelln, R., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Parkin-associated Parkinson's disease*. Cell Tissue Res, 2004. **318**(1): p. 175-84.
42. Foroud, T., S. K. Uniacke, L. Liu, et al., *Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease*. Neurology, 2003. **60**(5): p. 796-801.
43. West, A.B., D. Maraganore, J. Crook, et al., *Functional association of the parkin gene promoter with idiopathic Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(22): p. 2787-92.
44. Imai, Y., M. Soda, and R. Takahashi, *Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35661-4.
45. Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, et al., *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 302-5.
46. Zhang, Y., J. Gao, K. K. Chung, et al., *Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13354-9.
47. Kitada, T., S. Asakawa, S. Minoshima, et al., *Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene*. Mamm Genome, 2000. **11**(6): p. 417-21.
48. Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, et al., *Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients*. Ann Neurol, 1999. **45**(5): p. 668-72.
49. Pawlyk, A.C., B. I. Giasson, D. M. Sampathu, et al., *Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48120-8.
50. Mouatt-Prigent, A., M. P. Muriel, W. J. Gu, et al., *Ultrastructural localization of parkin in the rat brainstem, thalamus and basal ganglia*. J Neural Transm, 2004. **111**(10-11): p. 1209-18.
51. Kubo, S.I., T. Kitami, S. Noda, et al., *Parkin is associated with cellular vesicles*. J Neurochem, 2001. **78**(1): p. 42-54.
52. Choi, P., H. Snyder, L. Petrucelli, et al., *SEPT5\_v2 is a parkin-binding protein*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. **117**(2): p. 179-89.
53. Imai, Y., M. Soda, H. Inoue, et al., *An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin*. Cell, 2001. **105**(7): p. 891-902.
54. Chung, K.K., Y. Zhang, K. L. Lim, et al., *Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1144-50.
55. Shimura, H., M. G. Schlossmacher, N. Hattori, et al., *Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease*. Science, 2001. **293**(5528): p. 263-9.
56. Huynh, D.P., D. R. Scoles, D. Nguyen, et al., *The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2587-97.
57. Corti, O., C. Hampe, H. Koutnikova, et al., *The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(12): p. 1427-37.

58. Jiang, H., Q. Jiang, and J. Feng, *Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54380-6.
59. Staropoli, J.F., C. McDermott, C. Martinat, et al., *Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity*. Neuron, 2003. **37**(5): p. 735-49.
60. Ren, Y., J. Zhao, and J. Feng, *Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation*. J Neurosci, 2003. **23**(8): p. 3316-24.
61. Fallon, L., F. Moreau, B. G. Croft, et al., *Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 486-91.
62. Kalia, S.K., S. Lee, P. D. Smith, et al., *BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration*. Neuron, 2004. **44**(6): p. 931-45.
63. Ko, H.S., R. von Coelln, S. R. Sriram, et al., *Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death*. J Neurosci, 2005. **25**(35): p. 7968-78.
64. Dhillon, A.S., S. Hagan, O. Rath et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3279-90.
65. Doss-Pepe, E.W., L. Chen, and K. Madura, *Alpha-synuclein and parkin contribute to the assembly of ubiquitin lysine 63-linked multiubiquitin chains*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 16619-24.
66. Greene, J.C., A. J. Whitworth, I. Kuo, et al., *Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4078-83.
67. Pesah, Y., T. Pham, H. Burgess, et al., *Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress*. Development, 2004. **131**(9): p. 2183-94.
68. Goldberg, M.S., S. M. Fleming, J. J. Palacino, et al., *Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons*. J Biol Chem, 2003.
69. Von Coelln, R., B. Thomas, J. M. Savitt, et al., *Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10744-9.
70. Perez, F.A. and R.D. Palmiter, *Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 2174-9.
71. Sato, S., T. Chiba, S. Nishiyama, et al., *Decline of striatal dopamine release in parkin-deficient mice shown by ex vivo autoradiography*. J Neurosci Res, 2006. **84**(6): p. 1350-7.
72. Menza, M., *The personality associated with Parkinson's disease*. Curr Psychiatry Rep, 2000. **2**(5): p. 421-6.
73. Whitworth, A.J., D. A. Theodore, J. C. Greene, et al., *Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(22): p. 8024-9.
74. Lockhart, P.J., C.A. O'Farrell, and M.J. Farrer, *It's a double knock-out! The quaking mouse is a spontaneous deletion of parkin and parkin co-regulated gene (PACRG)*. Mov Disord, 2004. **19**(1): p. 101-4.
75. Klose, J., *Large-gel 2-D electrophoresis*. Methods Mol Biol, 1999. **112**: p. 147-72.
76. Klose, J., *Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis*. Methods Mol Biol, 1999. **112**: p. 67-85.

77. Nebrich, G., M. Herrmann, D. Sagi, et al., *High MS-compatibility of silver nitrate-stained protein spots from 2-DE gels using ZipPlates and AnchorChips for successful protein identification*. Electrophoresis, 2007. **28**(10): p. 1607-14.
78. Jungblut, P.R. and R. Seifert, *Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells*. J Biochem Biophys Methods, 1990. **21**(1): p. 47-58.
79. Fenn, J.B., M. Mann, C. K. Meng, et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
80. Lin, D., D.L. Tabb, and J.R. Yates, 3rd, *Large-scale protein identification using mass spectrometry*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1646**(1-2): p. 1-10.
81. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization*. Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 280-95.
82. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
83. Phillips, G.R., T. R. Anderson, L. Florens, et al., *Actin-binding proteins in a postsynaptic preparation: Lasp-1 is a component of central nervous system synapses and dendritic spines*. J Neurosci Res, 2004. **78**(1): p. 38-48.
84. Wood, Z.A., E. Schroder, J. Robin Harris et al., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 32-40.
85. Palacino, J.J., D. Sagi, M. S. Goldberg, et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18614-22.
86. Chevallet, M., E. Wagner, S. Luche, et al., *Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37146-53.
87. Sarafian, T.A., M. A. Verity, H. V. Vinters, et al., *Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types*. J Neurosci Res, 1999. **56**(2): p. 206-12.
88. Chew, C.S., X. Chen, J. A. Parente, et al., *Lasp-1 binds to non-muscle F-actin in vitro and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly in vivo*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4787-99.
89. Cooper, C.E. and C. Giulivi, *Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(6): p. C1993-2003.
90. Kadenbach, B., S. Arnold, I. Lee, et al., *The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1655**(1-3): p. 400-8.
91. Münch, G., B. Kuhla, H. J. Luth, et al., *Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1397-9.
92. Thornalley, P.J., *Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1343-8.
93. Mitsumoto, A., K. R. Kim, G. Oshima, et al., *Inhibitory effects of S-nitrosoglutathione on cell proliferation and DNA synthesis: possible role of glyoxalase I inactivation*. Chem Biol Interact, 2001. **137**(2): p. 105-21.
94. Kikuchi, S., K. Shinpo, F. Moriwaka, et al., *Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-deoxyglucosone on cultured cortical neurons: synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases*. J Neurosci Res, 1999. **57**(2): p. 280-9.

95. Biswas, S., M. Ray, S. Misra, et al., *Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukaemic leucocytes by methylglyoxal*. *Biochem J*, 1997. **323 ( Pt 2)**: p. 343-8.
96. Mitsumoto, A., K. R. Kim, G. Oshima, et al., *Nitric oxide inactivates glyoxalase I in cooperation with glutathione*. *J Biochem (Tokyo)*, 2000. **128(4)**: p. 647-54.
97. Mitsumoto, A., K. R. Kim, G. Oshima, et al., *Glyoxalase I is a novel nitric-oxide-responsive protein*. *Biochem J*, 1999. **344 Pt 3**: p. 837-44.
98. Li, L. and L.S. Chin, *The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60(5)**: p. 942-60.
99. Chen, X., D. R. Tomchick, E. Kovrigin, et al., *Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex*. *Neuron*, 2002. **33(3)**: p. 397-409.
100. Pearce, L.L., A. J. Kanai, L. A. Birder, et al., *The catabolic fate of nitric oxide: the nitric oxide oxidase and peroxynitrite reductase activities of cytochrome oxidase*. *J Biol Chem*, 2002. **277(16)**: p. 13556-62.
101. Benecke, R., P. Strumper, and H. Weiss, *Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndromes*. *Brain*, 1993. **116 ( Pt 6)**: p. 1451-63.
102. Taskinalp, O., R. G. Aktas, B. Cigali et al., *Immunohistochemical demonstration of cytochrome oxidase in different parts of the central nervous system: a comparative experimental study*. *Anat Histol Embryol*, 2000. **29(6)**: p. 345-9.
103. Grossman, L.I., R.S. Seelan, and S.A. Jaradat, *Transcriptional regulation of mammalian cytochrome c oxidase genes*. *Electrophoresis*, 1998. **19(8-9)**: p. 1254-9.
104. Jeong, W., S. J. Park, T. S. Chang, et al., *Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin*. *J Biol Chem*, 2006. **281(20)**: p. 14400-7.
105. Munch, G., H. J. Luth, A. Wong, et al., *Crosslinking of alpha-synuclein by advanced glycation endproducts--an early pathophysiological step in Lewy body formation?* *J Chem Neuroanat*, 2000. **20(3-4)**: p. 253-7.
106. Choudhary, D., D. Chandra, and R.K. Kale, *Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage*. *Toxicol Lett*, 1997. **93(2-3)**: p. 141-52.
107. Abou-Sleiman, P.M., M.M. Muqit, and N.W. Wood, *Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7(3)**: p. 207-19.
108. Knott, C., G. Stern, and G.P. Wilkin, *Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2*. *Mol Cell Neurosci*, 2000. **16(6)**: p. 724-39.
109. Powell, C.M., *Gene targeting of presynaptic proteins in synaptic plasticity and memory: across the great divide*. *Neurobiol Learn Mem*, 2006. **85(1)**: p. 2-15.
110. Glynn, D., R.A. Bortnick, and A.J. Morton, *Complexin II is essential for normal neurological function in mice*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12(19)**: p. 2431-48.
111. Viallet, F. and T. Witjas, *[Neuroplasticity and Parkinson disease]*. *Rev Neurol (Paris)*, 2002. **158 Spec no 1**: p. S42-8.
112. Yi, J.H., R. Hoover, T. K. McIntosh et al., *Early, transient increase in complexin I and complexin II in the cerebral cortex following traumatic brain injury is attenuated by N-acetylcysteine*. *J Neurotrauma*, 2006. **23(1)**: p. 86-96.
113. Milner, R. and I.L. Campbell, *The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS*. *J Neurosci Res*, 2002. **69(3)**: p. 286-91.

114. Fukazawa, Y., Y. Saitoh, F. Ozawa, et al., *Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo*. *Neuron*, 2003. **38**(3): p. 447-60.
115. Lin, Y.H., Z. Y. Park, D. Lin, et al., *Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1*. *J Cell Biol*, 2004. **165**(3): p. 421-32.
116. Borta, A. and G.U. Hoglinger, *Dopamine and adult neurogenesis*. *J Neurochem*, 2007. **100**(3): p. 587-95.
117. Zhu, H., M. Lee, S. Agatsuma, et al., *Pleiotropic impact of constitutive fosB inactivation on nicotine-induced behavioral alterations and stress-related traits in mice*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(7): p. 820-36.
118. Miller, R.F., *D-Serine as a glial modulator of nerve cells*. *Glia*, 2004. **47**(3): p. 275-83.
119. Oliet, S.H. and J.P. Mothet, *Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function*. *Glia*, 2006. **54**(7): p. 726-37.
120. Goff, D.C. and J.T. Coyle, *The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia*. *Am J Psychiatry*, 2001. **158**(9): p. 1367-77.
121. Bonifati, V., P. Rizzu, M. J. van Baren, et al., *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism*. *Science*, 2003. **299**(5604): p. 256-9.
122. Keating, D.J., *Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases*. *J Neurochem*, 2007.
123. Brown, M.R., P.G. Sullivan, and J.W. Geddes, *Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca<sup>2+</sup> overload than nonsynaptic mitochondria*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(17): p. 11658-68.
124. Darios, F., O. Corti, C. B. Lucking, et al., *Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(5): p. 517-26.
125. Casellas, P., S. Galiegue, and A.S. Basile, *Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function*. *Neurochem Int*, 2002. **40**(6): p. 475-86.
126. Zhaung, Z.P. and R. McCauley, *Ubiquitin is involved in the in vitro insertion of monoamine oxidase B into mitochondrial outer membranes*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(25): p. 14594-6.
127. Lo Bianco, C., B. L. Schneider, M. Bauer, et al., *Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(50): p. 17510-5.
128. Joch, M., A. R. Ase, C. X. Chen, et al., *Parkin-mediated monoubiquitination of the PDZ protein PICK1 regulates the activity of acid-sensing ion channels*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(8): p. 3105-18.
129. Robbins, T.W., *Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals*. *Exp Brain Res*, 2000. **133**(1): p. 130-8.
130. Mehta, M.A., B. J. Sahakian, P. J. McKenna et al., *Systemic sulpiride in young adult volunteers simulates the profile of cognitive deficits in Parkinson's disease*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1999. **146**(2): p. 162-74.
131. Beal, M.F., *Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **991**: p. 120-31.
132. Lohmann, E., M. Periquet, V. Bonifati, et al., *How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype?* *Ann Neurol*, 2003. **54**(2): p. 176-85.
133. Scherfler, C., N. L. Khan, N. Pavese, et al., *Striatal and cortical pre- and postsynaptic dopaminergic dysfunction in sporadic parkin-linked parkinsonism*. *Brain*, 2004. **127**(Pt 6): p. 1332-42.

134. Kitada, T., S. Asakawa, H. Matsumine, et al., *Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism*. Neurogenetics, 2000. **2**(4): p. 207-18.
135. Zabel, C., D. Sagi, A. M. Kaindl, et al., *Comparative proteomics in neurodegenerative and non-neurodegenerative diseases suggest nodal point proteins in regulatory networking*. J Proteome Res, 2006. **5**(8): p. 1948-58.
136. Minton, A.P., *Implications of macromolecular crowding for protein assembly*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(1): p. 34-9.
137. Greene, J.C., A. J. Whitworth, L. A. Andrews, et al., *Genetic and genomic studies of Drosophila parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(6): p. 799-811.
138. Periquet, M., O. Corti, S. Jacquier, et al., *Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function*. J Neurochem, 2005. **95**(5): p. 1259-76.
139. Rodriguez-Navarro, J.A., M. J. Casarejos, J. Menendez, et al., *Mortality, oxidative stress and tau accumulation during ageing in parkin null mice*. J Neurochem, 2007. **103**(1): p. 98-114.
140. Khan, N.L., D. J. Brooks, N. Pavese, et al., *Progression of nigrostriatal dysfunction in a parkin kindred: an [18F]dopa PET and clinical study*. Brain, 2002. **125**(Pt 10): p. 2248-56.
141. Oliveira, S.A., W. K. Scott, M. A. Nance, et al., *Association study of Parkin gene polymorphisms with idiopathic Parkinson disease*. Arch Neurol, 2003. **60**(7): p. 975-80.
142. Klein, C., K. Hedrich, C. Wellenbrock, et al., *Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **54**(3): p. 415-6; author reply 416-7.
143. Lincoln, S.J., D. M. Maraganore, T. G. Lesnick, et al., *Parkin variants in North American Parkinson's disease: cases and controls*. Mov Disord, 2003. **18**(11): p. 1306-11.
144. Chung, K.K., B. Thomas, X. Li, et al., *S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function*. Science, 2004. **304**(5675): p. 1328-31.
145. Wang, C., H. S. Ko, B. Thomas, et al., *Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(24): p. 3885-97.
146. LaVoie, M.J., B. L. Ostaszewski, A. Weihofen, et al., *Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1214-21.
147. Hashimoto, A., T. Nishikawa, T. Oka, et al., *Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde*. J Chromatogr, 1992. **582**(1-2): p. 41-8.
148. Wolosker, H., R. Panizzutti, and J. De Miranda, *Neurobiology through the looking-glass: D-serine as a new glial-derived transmitter*. Neurochem Int, 2002. **41**(5): p. 327-32.
149. Schell, M.J., M.E. Molliver, and S.H. Snyder, *D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3948-52.
150. Foltyn, V.N., I. Bendikov, J. De Miranda, et al., *Serine Racemase Modulates Intracellular D-Serine Levels through an {alpha},{beta}-Elimination Activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 1754-63.

## **F.2 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Berlin, den 20. November 2009

Claudia Motz

### **F.3 Publikationsliste**

Palacino, J.J., Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J.  
Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice.  
J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18614-22.



#### **F.4 Danksagung**

Ich danke Prof. Dr. Dr. Joachim Klose für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Vergabe eines für eine medizinische Doktorarbeit geeigneten Themas. Prof. Klose und Dr. Dijana Sagi bin ich für die fachliche Betreuung, für ihr Vertrauen und ihre Anregungen verbunden.

Allen gegenwärtigen und früheren Mitarbeitern der AG Klose, die durch fachliche Diskussionen, praktische Unterstützung im Labor und eine kreative Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt ebenfalls mein Dank – ganz besonders Marion Herrmann, Grit Nebrich, Andrea Koppelstätter, Bettina Esch, Dr. Jadranka Tadic und Dr. Patrick Giavalisco.

Tania Schink vom Institut für Medizinische Biometrie der Charité danke ich für ihre wertvolle Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ich danke Evelin Eichler für das zügige Korrekturlesen.

Der studentischen Forschungsförderung der Charité möchte ich meinen Dank für das zweijährige Stipendium aussprechen, das es mir ermöglichte, mich auf die Forschungsarbeit zu fokussieren – ebenso Prof. Klose für die Initiierung dieser Förderung.

Ich hoffe, meine Freunde in Zukunft für die Geduld zu entschädigen, die sie aufbrachten, wenn ich phasenweise „untergetaucht“ war.

## **F.5 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Claudia Motz, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Proteomveränderungen im ventralen Mittelhirn und Großhirn durch Knockout von Exon 3 des Parkin-Gens (PARK2) bei der Maus (Stamm 129/Sv)“ selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 20. November 2009

Claudia Motz

## F.6 Tendenzen zur Volumenänderung

Aufgrund der enormen Anzahl an Proteinen, die gleichzeitig semiquantitativ dargestellt werden, eignet sich die 2D-Großgelelektrophorese hervorragend für Screeninguntersuchungen. Um die Information über mögliche Targets für weiterführende Untersuchungen nicht zu verlieren, werden hier **Spotveränderungstendenzen** mit  $5\% \leq \alpha \leq 10\%$  aufgeführt. Im Sinne der Sensitivität soll hier der Fehler 2. Art  $\beta$  gering gehalten werden, indem für den Fehler 1. Art 10% akzeptiert werden.

Sechs Spots zeigen Tendenzen zur Volumenänderung mit  $5\% < \alpha \leq 10\%$ . Von ihnen enthalten vier Spots synaptische Proteine. Zwei Spots tendieren zur Volumenminderung und vier Spots zur Volumensteigerung. Im **ventralen Mittelhirn** werden drei Tendenzen zur Spotvolumenänderung beobachtet, davon eine zur Volumenminderung und zwei zur Volumensteigerung. Im **Großhirn** zeigen drei Spots eine Tendenz zur Volumenänderung, einer zur Volumenminderung und zwei zur Volumensteigerung.

**Tabelle 9: Tendenzen zur Spotvolumenänderung.**

Hirnregion	Tendenz	Spot	Protein
ventrales Mesencephalon	Volumenminderung	F3	hnRNP-A1
	Volumensteigerung	F1 F2	Serinracemase alpha1-Globin
Großhirn	Volumenminderung	F5	Vesicle Protein Sorting 29
	Volumensteigerung	F6 F4	G-Protein beta-Untereinheit Complexin 1

**Tabelle 10: Statistik.**

Spot		F1	F2	F3	F4	F5	F6
visuelle Vorauswertung	n (Vol ↓)	0	0	7	1	7	2
	n (Vol ↑)	7	9	1	7	0	8
	n (Vol =)	3	1	2	2	3	0
Auswertung durch Proteomweaver	n (Vol ↓)	2	2	8	2	8	2
	n (Vol ↑)	8	7	2	8	2	8
	n (Vol =)	0	1	0	0	0	0
	med. Vol <sub>WT</sub>	0,322	0,999	0,183	0,869	0,499	1,740
med. Vol <sub>KO</sub>	0,392	1,058	0,168	0,975	0,466	2,694	
med. Vol <sub>KO</sub> /Vol <sub>WT</sub>	1,153	1,197	0,957	1,104	0,927	1,555	
med. ΔVol [%]	+15%	+20%	-4%	+10%	-7%	+56%	
p-Wert		0,059	0,066	0,059	0,059	0,093	0,074

**Tabelle 11: Proteinidentifizierung.**

Spot gi Protein	F1 7305521 Serin- racemase	F2 28175802 alpha1- Globin	F3 6754220 heterogenous nuclear ribo-	F4 2137111 Comple- xin 1	F5 9790285 vesicle protein	F6 6680045 G-Protein UE beta
MS-Methode	ESI	MALDI	MALDI	MALDI	ESI	ESI
Sequenzabdeckung [%]	26	97	64	71	37	17
n (Peptide)	7	17	22	11	9	6
Score	262	180	194	108	345	336
theor. pI	5,7	8,0	9,3	4,9	6,3	5,6
theor. MW [kDa]	36,3	15,1	34,2	15,1	20,5	37,4

**Anmerkungen:**

1) Obwohl Spot F2 mit  $\alpha \leq 10\%$  als Tendenz angesehen wird, ist seine Volumenänderung als sehr unsicher einzuschätzen. Im Gel ist sichtbar, dass die Hirnteile bei der Präparation insgesamt wenig und insbesondere unterschiedlich stark mit Kochsalzlösung perfundiert wurden, so dass von Versuchstier zu Versuchstier die Spot-Volumina der Globine insgesamt stark schwanken. Weiterhin ist unerklärlich, warum die Konzentration einer Kette des Blutfarbstoffs sich in den untersuchten Hirnregionen unterscheiden sollte: Die Spotvolumenänderung erreicht in der Substantia nigra einen p-Wert von 6,6%, im Großhirn dagegen nur 87,8%.

2) Spot F3 entspricht aufgrund von MW und pI sowie konkreter Peptidsequenzen der längeren Spleißform des Proteins. [Swiss-Prot, *vide* B.6.3]

3) Spot F6 dürfte ein Gemisch aus G-Protein- $\beta 1$ - und - $\beta 2$ -Untereinheit enthalten. Beide haben ein Molekulargewicht von ca. 37 kDa und einen theoretischen pI von 5,6 und erzielen ähnliche Scores (336 und 330, 6 Peptide). Je ein identifiziertes Peptid kommt ausschließlich in einer Untereinheit vor (Aminosäureaustausch). Die Quantifizierung des Spotvolumens F6 durch Proteomweaver muss überdies als unsicher eingeschätzt werden, da der Spot den Sättigungsbereich der Silberfärbung erreicht, was die Aussagekraft der optischen Quantifizierung deutlich verringert.

**F.6.1 Serinracemase – Tendenz zur Volumensteigerung von Spot F1 ( $5\% \leq \alpha \leq 10\%$ )**

Aufgrund der interessanten Funktion der Serinracemase im Zusammenhang mit der Parkinsonerkrankung soll deren Spotvolumenänderungstendenz hier detailliert berichtet werden.

Die Serinracemase wandelt L-Serin in D-Serin um. Während man lange Zeit glaubte, D-Aminosäuren spielten in Säugetieren keine Rolle, entdeckten Hashimoto *et al.* Anfang der neunziger Jahre, dass ein Viertel des Serins im Rattenhirn als D-Serin vorliegt. [147] Ende der 90er Jahre fanden Wolosker *et al.* die Quelle dieses unerwarteten D-Enantiomer-Vorkommens

im Säugerhirn: Sie isolierten die Serinracemase der Ratte und wenig später die humane Form. [119, 148]

D-Serin wirkt koagonistisch an der sogenannten Glycin-Bindungsstelle des Glutamat-Rezeptors vom NMDA-Typ, die besetzt sein muss, wenn Glutamat den NMDA-Rezeptor aktivieren soll. Verglichen mit Glycin entfaltet D-Serin eine ebenso starke bis vierfache Wirkung. [119, 148]

D-Serin wird von der Serinracemase in Astrozyten gebildet, die die Synapsen des zentralen Nervensystems umhüllen, das dortige Ionenmilieu kontrollieren und die neuronale Aktivität modulieren. [148] Bei non-NMDA-Glutamat-Rezeptor-Stimulation setzen diese Gliazellen D-Serin frei. [149] Die Verteilung der Serinracemase im Hirn korreliert mit der von D-Serin und NMDA-Rezeptoren, mit hohen Konzentrationen u.a. im Cortex cerebri und Striatum. [119] Der Abbau von D-Serin wird zum einen durch die D-Aminosäure-Oxidase (DAO) gewährleistet; allerdings scheint auch die Serinracemase selbst durch  $\alpha,\beta$ -Dehydratationsaktivität D-Serin zu deaktivieren. [150]

Es wird vermutet, die Serinracemase spiele über ihr Produkt D-Serin und die Beeinflussung der NMDA-Rezeptor-Funktion eine Rolle bei Schizophrenie, Schlaganfall und Alzheimererkrankung. (*vide* D.2.3)