

Freie Universität Berlin  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

**Proteomanalyse unterschiedlicher Mausmodelle der  
Parkinsonschen Erkrankung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Madeleine Diedrich

aus Leipzig

September 2008

Diese Arbeit wurde im Dezember 2004 am Institut für Humangenetik der Charité  
Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Professor Dr. Dr. J. Klose  
begonnen

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. J. Klose
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Knaus

Disputation am 19.01.2009

---

## **Literatur, die Teil dieser Arbeit ist:**

Diedrich M, Mao L, Bernreuther C, Zabel C, Nebrich G, Kleene R, Klose J: Proteome analysis of ventral midbrain in MPTP-treated normal and L1-cam transgenic mice, 2008, Proteomics, Mar;8(6):1266-75  
DOI 10.1002/pmic.200700754

**Abkürzungsverzeichnis**

A (mA)	Ampère (Milliampère)
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AD	<i>Alzheimers Disease</i>
Al	Aliquot
Bisacrylamid	N,N'-methylen-bis-acrylamid
BisTris	2-[Bis-(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Centi-
ca.	circa
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
cm	Zentimeter
°C	Grad Celcius
CoA	Coenzym A
Complex I	NADH-ubiquinone oxidoreductase
Complex II	succinate-ubiquinone oxidoreductase
Complex III	ubiquinol-cytochrome c reductase
Complex IV	cytochrome c oxidase
Complex V	ATP synthase
d	<i>day</i> (Tag)
d.h.	dass heisst
DIGE	2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EMBL	<i>European Molecular biology laboratory</i>
ESI	Elektronensprayionisation
et al.	<i>et alterae</i> (und andere)
g	Gramm
h	<i>hour</i> (Stunde)
HD	<i>Huntington's Disease</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

KO	<i>knock out</i>
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	Milli-
M	Molar
MADLI-TOF	Matrix assoziierte Laser Desorption/ Ionisation- <i>time of flight</i>
μ	Mikro-
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MW	molecular weight
n	nano
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD	<i>Parkinson Disease</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrische Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SN	<i>Substantia nigra</i>
sec	Sekunde
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Temed	N,N,N',N'- tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid
Tricine	N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin
Tris-base	tris-(hydroxymethyl)-amoniomethan
Tris-HCL	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Hydrochlorid
Tween 20	Polyoxyethylen (20) sorbitan monolaurate
V (mV)	Volt (milli Volt)
v/v	Volumen per Volumen

w/v                      Gewicht per Volumen  
2D-Electrophorese    zwei-dimensionale Elektrophorese

Ein- und Drei-Buchstaben-Code für die jeweilige Aminosäure

A	Alanin	Ala	M	Methionin	Met
C	Cystein	Cys	N	Asparagin	Asn
D	Asparaginsäure	Asp	P	Prolin	Pro
E	Glutaminsäure	Glu	Q	Glutamin	Glu
F	Phenylalanin	Phe	R	Arginin	Arg
G	Glycin	Gly	S	Serin	Ser
H	Histidin	His	T	Threonin	Thr
I	Isoleucin	Ile	V	Valin	Val
K	Lysin	Lys	W	Tryptophan	Trp
L	Leucin	Leu	Y	Tyrosin	Tyr

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.1.1 Mausmodelle	7
1.1.1.1 Parkin	9
1.1.1.2 <i>Phosphatase and Tensin (PTEN) homolog-induced putative kinase 1 (PINK1)</i>	10
1.1.1.3 MPTP	10
1.2 Proteomanalysen	11
1.3 Zielsetzung	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Geräte und Hilfsmittel	15
2.2 Tiere und Gewebe	15
2.2.1 MPTP- behandelte Mäuse	15
2.2.2 PINK1-KO	16
2.2.3 Parkin-KO	16
2.3 Proteinextraktion	17
2.4 2D-Gel-Elektrophorese	20
2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	21
2.4.2 SDS-PAGE (2. Dimension)	22
2.5 Färbungen	23
2.5.1 Silberfärbung	23
2.5.1.1 Analytische Silberfärbung	24
2.5.1.2 Massenspektrometrikompatible Silberfärbung	24
2.5.2 Färbungen für die Posttranslationalen Modifikationen	25
2.5.2.1 ProQ® Diamond Phosphoprotein Gel Stain	26
2.5.2.2 Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit	26
2.5.2.3 OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	27
2.6 Bildauswertung	27
2.7 Spotidentifizierung	28
2.7.1 Ausstanzen von Proteinspots	28
2.7.2 Massenspektrometrie (MS)	29
2.7.2.1 ESI	29
2.7.2.2 MALDI	30
2.7.2.3 Datenbanken zur Charakterisierung identifizierter Proteine	32
2.8 Western Blotting von Proteinen	33
2.8.1 Entwicklung	33
2.8.2 Darstellung der Signale	33
2.8.3 Wiederholte Verwendung der Membran („Strippen“)	34

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Parkin <i>knock-out</i> Mausmodell	36
3.1.1	Altersabhängigkeit von Proteinunterschieden	37
3.1.2	Vergleich der veränderten Proteine in den Mittelhirn-Proben der zwei Monate und acht Monate alten Parkin-KO Mäuse	41
3.2	PINK1 <i>knock-out</i> Mausmodell	43
3.2.1	Gewebe-spezifität bei der Parkinsonschen Erkrankung	43
3.2.2	Vergleich der veränderten Proteine der drei Gehirnregionen	49
3.2.3	Untersuchung der post-translationalen Modifizierungen in allen drei Gehirnregionen	51
3.3	MPTP- Behandlung mit anschließender Analyse nach einem Tag und nach sieben Tagen nach der Behandlung	55
3.3.1	Behandlung von C57BL/6J Mäusen	55
3.3.2	Behandlung von L1cam Mäusen	61
3.3.3	Vergleich der beiden MPTP behandelten Mauslinien	68
3.3.4	Untersuchung der post-translationalen Modifizierungen in den beiden MPTP behandelten Mauslinien	73
3.4	Vergleich der vier Mausmodelle	75
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
4.1	Genetisch bedingte Mausmodelle	78
4.1.1	Parkin-KO Maus	78
4.1.2	PTEN homolog induced putative kinase 1 (PINK1)-KO Maus	80
4.2	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induziertes Mausmodell	82
4.3	Vergleich der vier Mausmodelle	86
4.4	Globales Netzwerk des Proteoms	87
<b>5</b>	<b>Pilotstudie: Proteomanalyse beim Menschen</b>	<b>91</b>
5.1	Material und Methoden	91
5.2	Ergebnisse und Diskussion	93
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnis der erfolgten Publikationen</b>	
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	<b>i</b>
11.1	Tabelle S1	i
	Parkin 2 Monate	i
	Parkin 8 Monate	iii
	PINK1 Striatum	iv



PINK1 Mittelhirn	vi
PINK1 Kortex	viii
MPTP 1d C57BL/6J	x
MPTP 7d C57BL/6J	xv
MPTP 1d L1cam C57BL/6J	xviii
MPTP 7d L1cam C57BL/6J	xxii
11.2 Tabelle S2	xxxviii