

1. Einleitung

1.1. Neurodegenerative Erkrankungen

In den letzten Jahrhunderten hat sich, auf Grund verschiedener Faktoren, die Lebenserwartung der Menschen verlängert. Das durchschnittliche Alter erhöht sich um ca. fünf bis sechs Stunden pro Tag [1]. So haben die Frauen im 14. Jahrhundert ein durchschnittliches Alter von 29,8 Jahren erreicht und die Männer 28,4 Jahre. Zum heutigen Zeitpunkt werden in den westlichen Ländern die Männer durchschnittlich 75,9 Jahre und die Frauen 81,7 Jahre alt werden. Die Faktoren, die diese Verlängerung der Lebensspanne unterstützen, sind zum Beispiel eine bessere Hygiene, gesündere Ernährung und bessere medizinische Versorgung, wobei die Erforschung von Heilmitteln auch eine große Rolle einnimmt. Im Allgemeinen kann man sagen, dass die Gesellschaft älter wird, und es zu einem „*global aging*“ (Überalterung) kommt. Die Veränderung der Lebenserwartung hat aber auch andere Probleme aufgedeckt. Im Alter kommt es vermehrt zu somatischen Mutationen. Von denen auch zum Beispiel wichtige Proteine des Energiemetabolismus betroffen sein können. Des Weiteren haben Zellen einen „programmierten“ Zelltod (Apoptose). Zum Beispiel verändern reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), die sich bei Zellstoffwechselwegen ansammeln, Proteine, Lipide (Zellmembran) und DNS. Dadurch kann die Apoptose der Zelle im post-mitotischem Gewebe ausgelöst werden. Die Apoptose von verschiedenen Zellen tritt vereinzelt im jungen Alter und im zunehmenden Alter vermehrt auf. Im Gehirn kann es ebenfalls im Laufe des Lebens zu einem Zelluntergang kommen, der dann zur Altersdemenz führt. Zusammenfassend kann man sagen, je älter die Menschen werden, desto häufiger kommt es zu neurodegenerativen Erkrankungen.

Unter neurodegenerative Erkrankungen fasst man eine Vielzahl von unterschiedlichen Erkrankungen des Gehirns zusammen, bei denen es zu einem Untergang von Nervenzellen unterschiedlicher Gehirnregionen kommt. Diese Erkrankungen können in jungen (zwischen 20 und 40 Jahren) wie auch in älteren (ab der 60sten Dekade) Jahren auftreten. Die am häufigsten auftretenden Erkrankungen sind: *Alzheimers Disease (AD)*, *Huntington's Disease (HD)* und *Parkinson Disease (PD)*. Daneben gibt es noch weitere Erkrankungen, die in dieser Arbeit nicht näher beschrieben werden.

Die *Alzheimers Disease* wurde von dem Psychiater Alois Alzheimer 1901 beschrieben. Bei den betroffenen Patienten kommt es zu einem Gedächtnisverlust. Eine Hypothese zur Entstehung der Krankheit sind die so genannten Plaques, die durch Verklumpen von zum Beispiel beta-Amyloid entstehen, sowie faserige Proteinablagerungen innerhalb der Nervenzellen, die hauptsächlich aus tau-Proteinen bestehen.

Die *Huntington's Disease* (HD, Chorea Huntington) wird durch eine genetisch dominante Mutation (Wiederholung der CAG-Basenpaare an dem *Huntingtin*-Protein) verursacht. Der Ausbruchzeitpunkt wird durch die Häufigkeit der Wiederholung von Glutamin bestimmt und geht mit Verlust von GABAerger Neurone insbesondere im *Nucleus caudatus* einher. Meist beginnt die Krankheit zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr [2]. Die Krankheit zeichnet sich immer durch eine Zunahme der *Bradykinese* der willkürlichen und unwillkürlichen Motorik aus. Eine Demenz lässt sich bei allen Patienten spätestens 15 Jahren nach Ausbruch der Erkrankung nachweisen.

Eine weitere neurodegenerative Erkrankung ist die *Parkinson Disease* (PD, Parkinson Syndrom), von der ca. 1% der Menschen über 65 Jahren [3, 4] und 4% der über 80 Jahre [5, 6] alten Menschen betroffen sind. Die Inzidenz ist weltweit gleich und die Prävalenz steigt mit der Lebenserwartung in den jeweiligen Ländern [3]. Erstmals wurde sie im Jahre 1817 von dem Londoner Arzt und Apotheker James Parkinson (1755-1824) in seinem Bericht „*Essay on the Shaking Palsy*“ („Über die Schüttellähmung“) beschrieben. Der Nervenarzt Professor Jean Marie Charcot war 1884 der erste, der den Namen Morbus Parkinson benutzte. PD beginnt meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen und zeichnet sich durch ein Schütteln der Hände aus. In Deutschland sind derzeit etwa 300.000 bis 400.000 Menschen betroffen, was ca. 2,5% der über 60jährigen Bevölkerung entspricht. Die Symptome werden dadurch verursacht, dass eine bestimmte Art von Nervenzellen (die dopaminergen Neuronen) im Gehirn, die Fähigkeit verliert, genug Dopamin zu synthetisieren. Dieses Dopamin (Neurotransmitter) wird für koordinierte Bewegungen und Muskelentspannung gebraucht. Ein weiterer neuropathologischer Befund der Erkrankung zeigt den Verlust von Neuromelanin, welches in den dopaminergen Zellen der *Substantia Nigra* (SN) vorkommt.

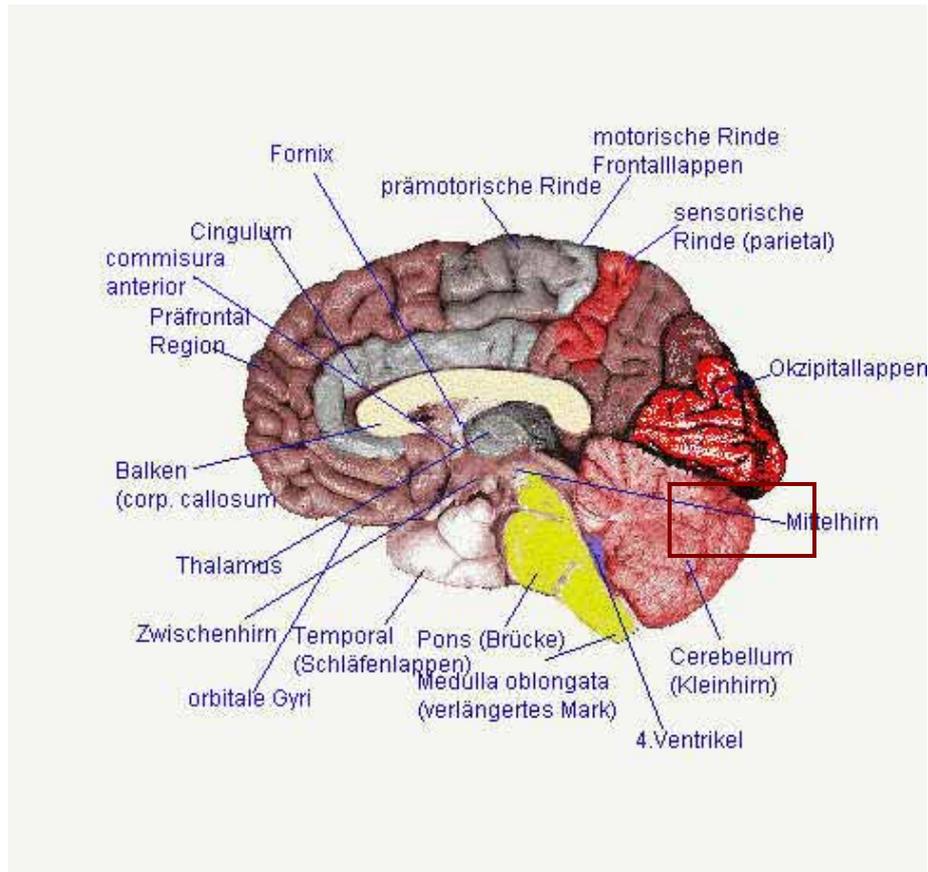


Abbildung 1-1: Dieses Bild zeigt ein Schema des Gehirns. Das Mittelhirn, in dessen Bereich die *Substantia nigra* liegt, wurde rot umrandet.

Das Gehirn ist für die Verarbeitung, Speicherung, Weiterverarbeitung und das Abrufen von Informationen zuständig. Aufgrund dieser Leistungsfähigkeit ist der Aufbau des Gehirns sehr komplex. Zwischen dem Kleinhirn und der Wirbelsäule befinden sich im Bereich des Mittelhirns die Basalganglien. In diesem Bereich liegt ein dünnes Band aus pigmentierten Neuronen, die *Substantia Nigra* (SN, Figur 1-1 und 1-2), deren Degeneration mit dem Ausbruch der PD zusammenhängt. In der SN sind ca. 400.000 Nervenzellen vorhanden, welche stark eisenhaltig sind und Melanin enthalten. Im Alter von 18 Jahren sind sie vollständig depigmentiert. (Die dunkle Färbung gab der Region ihren Namen.)

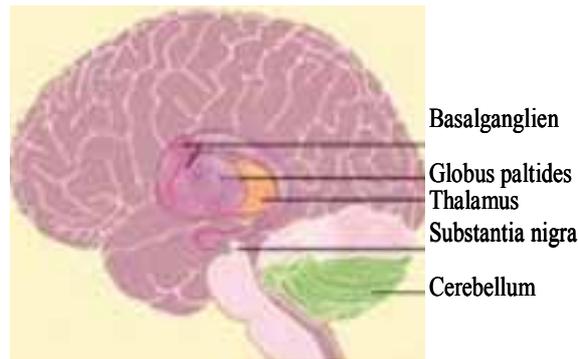


Abbildung 1-2: Dieses Schema zeigt die Lage der *Substantia nigra* im Gehirn.

Die PD kommt zum Ausbruch, wenn bereits ca. 80% der dopaminergen Neuronen abgestorben sind (Figur 1-3), und es zu einer starken Reduktion von Neurotransmitter (Dopamin, Figur 1-4) kommt. Bei einem gesunden Menschen, sterben jährlich ca. 2400 Neuronen in der SN ab, dies würde aber erst ab einem Alter von 100 Jahren Symptome hervorrufen. Bei Patienten, die unter dem idiopathischen PD leiden, sterben mehr als 2400 Nervenzellen pro Jahr ab, und es kommt zu einem frühzeitigen Ausbruch. Dabei ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt, warum mehr Zellen sterben.

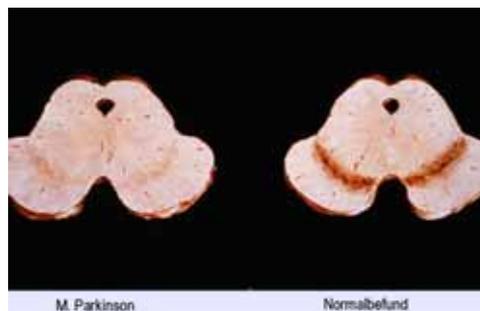


Abbildung 1-3: Dieses Bild zeigt ein Gehirnschnitt eines gesunden Menschen (rechtes Bild) und eines Parkinson-Patienten (linkes Bild). Dabei ist zu erkennen, dass die SN (dunklere Materie) im linken Bild stark reduziert ist.

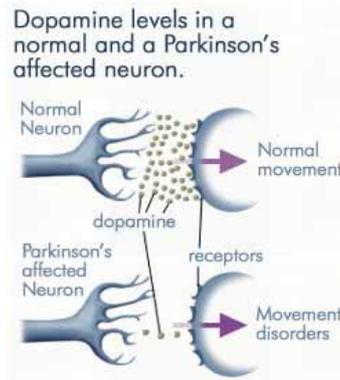


Abbildung 1-4: Dieses Schema verdeutlicht die Abnahme an Dopamin bei einem Parkinson-Patienten.

In der Abbildung 1-3 wurden zwei Gehirnschnitte dargestellt, um einen Vergleich der Areale wiederzugeben. Dabei ist zu bemerken, dass in dem linken Bild die Substantia nigra sehr stark reduziert ist und man aus diesem Grund auf einen Parkinson-Patienten schließen muss. In der Figur 1-4 ist eine schematische Zeichnung eines dopaminergen Neurons gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass in einem gesunden Gehirn viel mehr Dopamin zur Verfügung steht, als in einem Parkinson betroffenen Gehirn.

Die Symptome der PD beginnen meist mit einem gelegentlichen Tremor an einem Finger, der nach der Zeit auf den ganzen Arm übergeht, der Tremor kann auch am Kopf, an den Lippen, an der Zunge und an den Füßen auftreten. Er ist rhythmisch und läuft in vier bis fünf Zyklen pro Sekunde ab. Die Bewegung der Patienten wird mit der Zeit langsamer (*Bradykinese*) und sie entwickeln eine nach vorn übergebeugte Körperhaltung (Figur 1-5). Das Gehen ist erschwert und sie bewegen sich nur noch sehr langsam (schlurfend) vorwärts.



Abbildung 1-5: Typische Körperhaltung eines PD-Patienten (Zeichnung von William Richard Gowers, 1886).

Durch die langsamen Bewegungen der Muskeln kommt es zur *Rigidity* (Bewegungsarmut), die zuerst die Beine und den Nacken der Patienten betrifft. Eine Bewegungsarmut der Gesichtsmuskeln führt zu dem maskenähnlichen und starren Erscheinungsbild, was auch zu Sprachschwierigkeiten führen kann. Einen weiteren Hinweis liefert die Handschrift, die sich auch im Laufe der Erkrankung verändert und immer kleiner wird. Im Allgemeinen kann man sagen, dass jede Bewegung viel länger dauert und nach einigen Jahren versteifen oder erstarren die Muskeln in der Weise, dass es zu einer Muskellähmung kommt und das Leben der PD-Patienten sehr stark beeinflusst wird. Des Weiteren kann der Geruchssinn verschwinden, das Sehvermögen sich verschlechtern, ein verändertes Hitzeempfinden und ein Brennen in den Beinen auftreten.

Tabelle 1-1: Darstellung der bekannten Gene bzw. Proteine der PD, mit ihrer Lage, der Vererbung und der vermuteten Funktion.

Genname	Proteinname	Chromosom	Vererbung	vermutliche Funktion
				Presynaptisches Protein,
Park1	α -Synuclein	4q21	AD	Lewy Body
Park2	Parkin	6q25.2-27	AR	Ubiquitin E3 Ligase
Park3	Parkinson Disease 3	2p13	AD	n.b.
Park4	Parkinson Disease 4	4p14	AD	n.b.
	ubiquitin carboxyl-terminal			Ubiquitin C-terminal
Park5	esterase L1 (UCHL1)	4p14	AD	hydrolase
	PTEN homolog-induced			
Park6	Putative kinase 1 (PINK1)	1p35-36	AR	Mitochondrial kinase
Park7	DJ-1	1p36	AR	Chaperon, Antioxidant
	leucine-rich repeat kinase			
Park8	2 (LRRK2)	12p11.2	AD	Mixed lineage kinase
Park9	ATP13A2	1p36	AR	n.b.
Park10	Parkinson Disease 10	1p32	AD	n.b.
Park11	Parkinson Disease 11	2q36-37	AD	n.b.
Park12	Parkinson Disease 12	Xq21-q25	n.b.	n.b.
				Mitochondrial serine
Park13	HTRA2	2p12	n.b.	protease

AD autosomal dominant, AR autosomal rezessiv, n.b. nicht bekannt

Bei einigen Patienten tritt vor den ersten Tremor-Symptomen eine Depression auf, die oft nicht als Frühstadium erkannt wird. Bei 30% der Patienten tritt im weiteren Verlauf der PD eine Demenz auf.

Durch verschiedene molekularbiologische Untersuchungen an jungen betroffenen Menschen (ab dem 30. Lebensjahr) wurden viele verschiedene Mutationen gefunden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt kennt man bereits 13 verschiedene Gene [3, 4, 7-11], die durch verschiedene Mutationen die PD hervorrufen (s. Tab. 1-1).

Alle gefundenen Mutationen zusammen erklären aber nur ca. 5% der PD. Die anderen Fälle sind der idiopathischen PD zuzuordnen. Hier sind die genetischen Ursachen komplexer und schließen Umweltfaktoren mit ein. Die molekularen Auslöser der Krankheit sind weitgehend unbekannt. Untersuchungen dieser Veränderungen auf Proteinebene werden einen wichtigen Hinweis über die biochemischen Mechanismen der Erkrankung liefern können.

1.1.1 Mausmodelle

Die Aufklärung der Funktion von Proteinen und ihre Bedeutung für den Organismus ist das Ziel der Proteomforschung. Daraus leiten sich im Weiteren nicht nur die Mechanismen bei Wachstum und Entwicklung ab, sondern auch die Ursachen von Krankheiten (wie Erbkrankheiten, Entstehung von Tumoren, neurodegenerative Erkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen etc.) können aufgedeckt und Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten gefunden werden.

Durch die Nutzung verschiedener Techniken kommt es zu einem raschen Zuwachs von Aminosäure-Sequenzen, die in Datenbanken wie EMBL [12] oder NCBI abgelegt werden. Ein Meilenstein der biomedizinischen Forschung ist die Sequenzierung des menschlichen Genoms. Im Februar 2001 wurde eine Rohfassung der menschlichen DNS-Sequenz veröffentlicht [13, 14].

Das mittlerweile ebenfalls komplett durchsequenzierte Maus-Genom weist zu dem menschlichen Genom eine Homologie von bis zu 95% (Alberts et al.) auf. Deshalb gilt die Maus als eines der wichtigsten Tiermodelle in der medizinischen Grundlagen-

forschung. Außerdem sind viele molekulare Mechanismen, die bei der Entstehung und Ausbildung von Erkrankungen eine Rolle spielen, auf den Menschen übertragbar, was wiederum eines der Hauptgründe für die totale Sequenzierung des Mouse- und Rat Genoms, neben der Sequenzierung des menschlichen Genoms (Human Genome Project), war.

Neben der Sequenzinformation kommt bei der funktionellen Analyse von Genen und Erkrankungen den so genannten *knock-out* Mäusen eine besondere Bedeutung zu. Bei diesen Mäusen können gezielt einzelne Gene oder auch regulatorische Bereiche des Genoms in ihrer Funktion ausgeschaltet werden, wodurch wichtige Einblicke in die sehr komplexen Grundlagen der Ausbildung von Krankheiten gewonnen werden können. Durch Gentransfer kann die Überexpression von Genen untersucht werden. Während heute Mausmodelle häufig benutzt werden, um die mRNA Expression der Gene zu studieren, geht die Entwicklung mehr und mehr in Richtung Proteomanalyse. Nur die Aufklärung der Proteinfunktion führt zum Verständnis der Pathogenese einer Krankheit. Bei der Untersuchung der Grundlagen und Ursachen der neurodegenerativen Erkrankungen bzw. Behandlungsmöglichkeiten der Morbus Parkinson werden eine Reihe von Mausmodellen genutzt, wie zum Beispiel *PINK1-knock-out*, *Parkin-knock-out*, Überexpression von α -Synuclein oder induzierte Mausmodelle durch z.B. MPTP. Die Aufklärung genetisch bedingter Ursachen von Morbus Parkinson wird durch die etablierten Mausmodelle mit distinkten Krankheitsbildern ermöglicht [15, 16]. Dabei weist jedes dieser Modelle unterschiedliche Phänotypen auf. In dieser Arbeit wird auf zwei genetisch bedingte Mausmodelle und ein medikamentös induziertes Modell genauer eingegangen.

In Abbildung 1-6 sieht man eine kleine Übersicht über die möglichen Stoffwechselwege, die man bis zum jetzigen Zeitpunkt gefunden hat. Doch ob nun wirklich nur ein Stoffwechselweg oder mehrere Einfluss auf den Beginn und Ausbruch der Erkrankung haben, ist bis heute noch nicht geklärt.

So zum Beispiel geht man bei *PINK1*, *DJ-1* und *MPTP* von einer Störung der Mitochondrien aus, hingegen kommt es bei *Parkin* und *UCHL1* durch ein falsches bzw.

fehlendes Abbauen von Proteinen zu einer Akkumulation bestimmter Proteine und anschließend zur Apoptose der betroffenen Zellen [17].

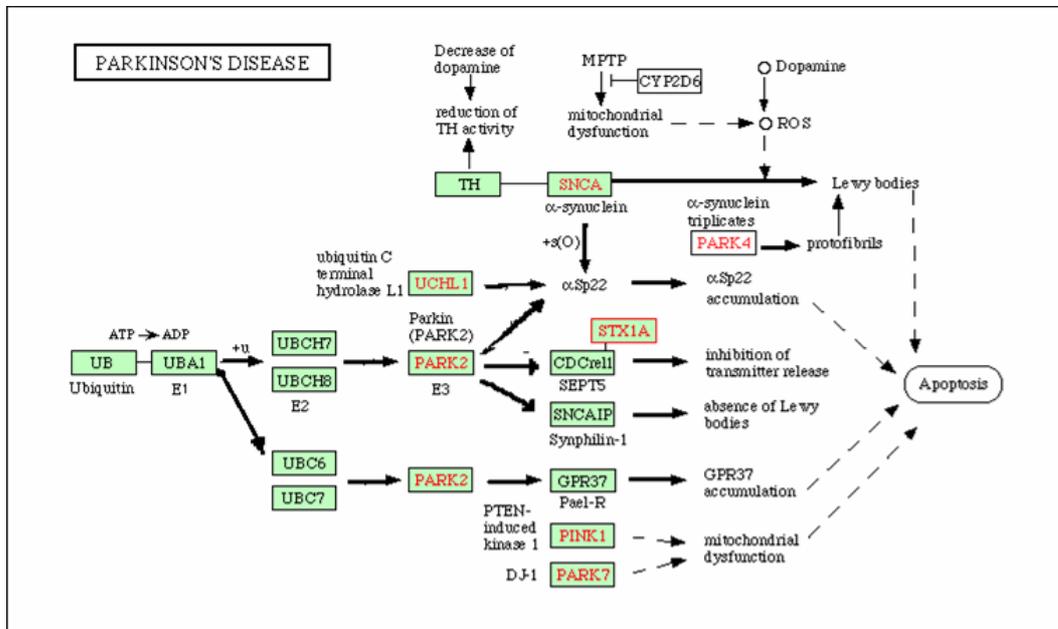


Abbildung 1-6: Dieses Schema gibt einen kurzen Einblick über die möglichen Stoffwechselwege, durch die PD hervorgerufen werden kann (Quelle: Kegg-Pathway-Datenbank).

1.1.1.1 Parkin

Parkin besteht aus 465 Aminosäuren und hat eine N-terminale *ubiquitin like domain*. Sie besitzt eine Ubiquitin E3 Ligase Funktion zum Markieren von Proteinen für den Ubiquitin Proteasom Stoffwechselweg und somit für den Proteinabbau. Der Verlust der E3 Ligase Aktivität durch Mutationen führt zur autosomal rezessiv vererbten zeitigen (early-onset) PD [18-21]. Der Gen-*knock-out* von Parkin in Mäusen [22] und Fruchtfliegen [23] zeigt einen Anstieg von Oxidativem Stress und eine Fehlfunktion der Mitochondrien. Parkin schützt vor dem Anschwellen der Mitochondrien, der Freisetzung von Cytochrom C und der Aktivierung der Kaspasen, was durch Parkin Mutation und Proteasom Inhibition wieder aufgehoben wird. Katecholaminergische Neuronen von Parkin *knock-out* Mäusen zeigten keine Neurodegeneration bei Neurotoxinen [24, 25] und *Mesencephalic* dopaminerge Neuronen von den Mäusen zeigten eine Resistenz gegenüber steigenden Glutathion Level [26].

1.1.1.2 *Phosphatase and Tensin (PTEN) homolog-induced putative kinase 1 (PINK1)*

Eine Mutation in dem PINK1 Gen führt zu der zeitigen (*early-onset*) familiären PD [3, 27]. Das Gen kodiert ein 581 Aminosäure großes Protein, das eine N-terminale Mitochondrien Lokalisation Sequenz [3] und eine Serin/Threonin Kinase Domäne besitzt. Die genaue Funktion des Proteins und seine Substrate sind bis jetzt noch nicht bekannt. *In vivo* Untersuchungen, z.B. Inaktivierung durch siRNA oder krankheitsrelevante Mutationen im PINK1-Gen von Fruchtfliegen, führen zu Muskel- und Dopamin-Degeneration als eine Konsequenz von mitochondrialer Fehlfunktion. Dieser Degeneration wurde mit Hilfe einer Überexpression der Ubiquitin E3 Ligase Parkin entgegengewirkt. Das zeigt, dass beide, Parkin und PINK1, wichtig für die Regulation der Mitochondrien und das Überleben der Fruchtfliegen sind [28-30].

Valente *et al.* vermuten anhand einer Zellstudie einen Schutzeffekt gegenüber mitochondrial induzierten Stress [27]. Zhou *et al.* haben mit Hilfe der siRNA die Expression des PINK1-Gens in einem Mausmodell herunterreguliert. Dabei konnte keine dopaminerge Neurodegeneration in den Mäusen festgestellt werden [31].

1.1.1.3 MPTP

Die Wirkung von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) auf die Nervenzellen wurde zuerst zufällig bei drogenabhängigen Menschen beobachtet. MPTP ist ein Nebenprodukt bei der Synthese von Heroin und wird in das Ion MPP^+ umgewandelt. Dieses Ion wird über die Blut-Hirnschranke durch die Astrozyten in das Gehirn des Menschen gebracht. Im Gehirn wird es in die dopaminergen Nervenzellen über den Dopaminrezeptor transportiert und hemmt dort spezifisch den Komplex I der Atmungskette in den Mitochondrien [32] und führt somit zum oxidativen Stress. Da dann keine effiziente Energiegewinnung mehr möglich ist, kommt es zum Absterben der Nervenzellen. Es treten dann parkinson-ähnliche Symptome auf, wie zum Beispiel das Zittern der Extremitäten. Im Gegensatz dazu war kein Fehlen von Gedächtnisverlust zu bemerken [33].

Für die Erforschung von PD wurden verschiedene Mausmodelle (z.B. C57BL/6J, Swiss-Webster Maus, α -Synuclein transgene Mäuse und DJ-1 KO Mäuse) mit MPTP behandelt [34-39]. Jeder Mausstamm reagiert unterschiedlich auf das Toxin MPTP. So sind z.B. α -Synuclein transgene Mäuse der DJ-1 KO Mäuse sehr anfällig für das Neurotoxin [40].

In der vorliegenden Studie wurde der Mäuseinzuchtstamm C57BL/6J und L1cam überexprimierende Mäuse mit MPTP behandelt und untersucht.

L1 ist ein homophiles Zelladhesionmolekül. Das L1 Zelladhesionmolekül (L1cam) erhöht das Überleben von Neuronen und das Wachstum von dopaminergen Neuronen *in vitro* [41]. Wenn es durch Interaktion mit einem anderen L1 Molekül einer Nachbarzelle in Berührung kommt, verursacht es einen Signal- Transduktions- Mechanismus, der in Neurogenese und Überleben der Zellen resultiert [42]. Störungen in der Expression von L1 führt zu einem falschen Lernen und einer Störung des Gedächtnisses der transgenen Mäuse [43]. Die transgene Überexpression von L1 in Astrozyten unter der Kontrolle des Maus *Gloal Fibrillary acidic protein* (GFAP) Promotors steigert die homophile Interaktion mit benachbarten L1-exprimierenden Neuronen. Dies verbessert das Lernen und das Gedächtnis [44]. Bei der Maus zeigte sich das Phänomen, dass es bei MPTP-Behandlung eine akute Phase (einen Tag nach der Behandlung) und eine Erholungsphase (sieben Tage nach der Behandlung) [34] gibt.

1.2 Proteomanalysen

Die Gesamtheit aller durch das Genom exprimierter Proteine (einschließlich ihrer Isoformen durch alternative Splicing und post-translationalen Modifikationen) stellt das Proteom dar. Je nach Entwicklungsstadium, Umwelteinfluss oder Krankheitszuständen ändert sich das Proteom in der Zelle quantitativ und strukturell.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Proteine nicht nur in einzelnen Stoffwechselwegen miteinander interagieren, sondern Proteom-weite Netzwerke bilden. Das erklärt, warum Überexpression oder *knock-out* eines Gens zu einer Vielzahl von Proteinveränderungen führt, insbesondere zu quantitativen Veränderungen [22, 45]. Das bringt die Schwierigkeit mit sich zu erkennen, welche Proteine direkt mit dem

induzierten Krankheitsprozess in Verbindung stehen und welche eher eine periphere Rolle spielen. Zur Untersuchung der primären und sekundären Effekte kann man zum einen die Untersuchung einzelner und zum anderen das Vergleichen von verschiedenen Tier-Modellen, die abweichende Aspekte von der gleichen Krankheit/Pathologie darstellen, heranziehen. Mausmodelle sind homozygot und weisen keine Polymorphismen, wie man sie bei den Menschen findet, auf. Zur Untersuchung der primären und sekundären Effekte von Erkrankungen muss man einer globalen Fragestellung nachgehen und die Gesamtheit aller Proteine untersuchen. Dazu bedient man sich der Proteomanalyse, welche zurzeit immer mehr an Anwendung gewinnt.

Für die Proteomanalyse stehen heute verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Hauptmethode ist die 2D-Gelelektrophorese zur Auftrennung gesamter Zellextrakte. Daneben gibt es das 16-BAC-System, speziell für membrangebundenen Proteine [46] oder die *Blue Native* SDS-PAGE zur Auftrennung von Komplexen und mitochondrialen Proteine [47]. Zur Untersuchung der Proteinfunktion bzw. Interaktion gibt es das Hefe-Zwei-Hybrid-System [48]. Zur weiteren Analyse der aufgetrennten Proteine dient die Massenspektrometrie.

Für die 2D-Elektrophorese (2-DE) gibt es zwei verschiedene Ansätze. Zum einen die *IPG-Strips*, bei denen der pH-Gradient bereits im Gel ausgebildet ist, und zum anderen die *Carrier Ampholyte*, bei denen sich der pH-Gradient während des Gellaufes bildet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine in unserem Labor entwickelte 2-D Großgel-Elektrophorese verwendet, die sich durch eine besonders hohe Auflösung komplexer Proteingemische auszeichnet [49].

Nach der 2-DE kann man die Proteinspots aus dem 2-D Gel ausstechen und nach einem Protease Verdau mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) identifizieren. Es gibt die Elektrospray-Ionisation (ESI) und die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI). Bei der ESI werden die Ionen mittels eines Lösungsmittels, das an einer Stromquelle verdampft und Elektronen an die Peptide abgibt, gewonnen. Bei der MALDI werden die Peptide in eine Matrix eingebettet. Diese Matrix wird mit einem Laser angeregt und gibt Elektronen an die Peptide ab. Dadurch werden die Peptide ionisiert.

Da die Untersuchung des kompletten Proteoms mit Hilfe der MS eine sehr zeitaufwendige und datenreiche Analyse ist, muss man die Probe Vorfraktionieren. Dies erreicht man durch verschiedene Methoden: z.B. eine Gewebetrennung, eine Dichtegradientenzentrifugation zur Auftrennung des Zellgemisches in einzelne Fraktionen, eine Analyse mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese oder eine Auftrennung des Proteingemisches über eine HPLC- Anlage. In dieser Arbeit findet eine Kombination aus einer Vorfraktionierung der Proben mit Hilfe der Gewebetrennung mit anschließender 2-D-Gelanalyse und die Analyse der Proteinspots mit der Massenspektrometrie (MS) statt.

1.3 Zielsetzung

In der hier vorliegenden Arbeit sollen Proteom-weite Analysen der Gehirnproteine an verschiedenen Mausmodellen der Parkinson Krankheit durchgeführt werden. Dabei soll bei dem Parkin *knock-out* Modell ein früher und ein späterer Zeitpunkt untersucht und verglichen werden, um auf Proteinebene die Stadienspezifität im Krankheitsverlauf zu untersuchen. Bei dem PINK1 *knock-out* Modell werden die Proteine verschiedener Gehirnregionen verglichen, um eine Gewebsspezifität in der Störung des Proteoms zu erkennen. Bei dem MPTP-Mausmodell werden zwei verschiedene Zeitpunkte hinsichtlich der akuten Phase und der Erholungsphase nach der Behandlung der Maus untersucht. Der interessante Aspekt bei dieser Analyse ist die Untersuchung der Proteine der Erholungsphase im Vergleich zu der akuten Phase. Zusätzlich wird auch ein transgenes Mausmodell hinzugezogen (L1cam überexprimierende C57BL/6J), um den in der Literatur postulierten Schutzeffekt von L1cam gegen MPTP zu untersuchen [41, 44].

Im Anschluss sollen alle vier Mausmodelle verglichen werden um primäre und sekundäre Effekte, die dem Krankheitsprozess zugrunde liegen, aufzudecken und mögliche Netzwerkstrukturen im Proteom zu finden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Solange nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Folgende Chemikalien sind von anderen Firmen bestellt worden.

Ammoniumpersulfat	(Biorad, Hercules, CA, USA)
Acrylamid	(für IEF; Biorad, Hercules, CA, USA)
Bromphenolblau	(Biorad, Hercules, CA, USA)
Complete [®]	(Roche, Mannheim, Deutschland)
Natriumchlorid	(Fluka, Taufkirchen, Deutschland)
DTT	(Biorad, Hercules, CA, USA)
Harnstoff	(Biorad, Hercules, CA, USA)
Pharmalyte-Ampholine pH 3,5- 10,0	(Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Pharmalyte-Ampholine pH 4,0- 6,5	(Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Pharmalyte-Ampholine pH 5,0- 8,0	(Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Piperazine-Diacrylamid	(PDA; Biorad, Hercules, CA, USA)
SDS	(für Gellösungen, Biorad, Hercules, CA, USA)
Sephadex-G-200 Superfine	(Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)
TEMED	(Biorad, Hercules, CA, USA)
DIGE-Labeling	(Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland)
Trypsin	(Promega, Madison, USA)

2.1.2 Geräte & Hilfsmittel

1D-Glasröhrchen	(Schott Glas, Mainz, Deutschland)
2D-Glasplatten	(verschiedene Quellen, u.a. Desaga, Wiesloch, Deutschland)
Durchlichtscanner ScanMaker 9800XL	(Microtek, Willich, Deutschland)

Fluoreszenz Scanner Typhon 9400	(GE healthcare, Freiburg, Deutschland)
Elektrophoresekammer 1D	(Wita, Berlin, Deutschland)
Elektrophoresekammer 2D, Desaphor VA300	(Desaga, Wiesloch, Deutschland)
Feinanalysenwaage Research R 300 S	(Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Glaskugeln: Ø 2,5±0,05 mm und Ø 1,5-1,7mm	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Manueller Gelpicker	(Rosemann und Sohn, Stahnsdorf, Deutschland)
Elektrischer Gelpicker	(Genetix, New Milton, Hampshire, UK)
Nylonschnur	(herkömmliche Angelschnur; verschiedene Hersteller)
Nylonpistill	(Wita GmbH, Berlin, Deutschland)
Quarzglasmörser	(Wita GmbH, Berlin, Deutschland)
Spannungsgeräte Consort E833 und E815	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Ultraschallbad Sonorex RK 102 P	(Bandelin electronic, Berlin, Deutschland)
Zentrifuge Varifuge 3.0R	(Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland)

2.2 Tiere und Gewebe

In der hier beschriebenen Arbeit wurden Mäuse (*Mus musculus*) des Stammes C57BL/6J (MPTP behandelt) und 129/Sv (PINK1-KO und Parkin-KO) untersucht. Die Versuche erfolgten gemäß dem bestehenden Tierschutzgesetz.

2.2.1 MPTP- behandelte Mäuse

Für diese Behandlung wurden vier Monate alte männliche *Mus musculus* des Stammes C57BL/6J (Wildtyp) und männliche C57BL/6J Mäuse die das L1 Zelladhensionsmolekül (L1cam) überexprimieren mit 15 mg MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin) pro kg Körpergewicht viermal im Abstand von zwei Stunden behandelt. Die Kontrollgruppe wurde in den gleichen Abständen mit Kochsalzlösung behandelt. Nach dieser Prozedur wurde eine Gruppe von Tieren bereits nach einem Tag (akute Phase) und eine andere Gruppe nach sieben Tagen (Erholungsphase) getötet. Die Probengewinnung wird bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben [50, 51].

Zur Entnahme des Gehirns öffnet man mit einer Präparierschere den Schädelknochen *sagittal* vom Spinalkanal ausgehend. Der Knochen wird beidseitig vorsichtig mit einer

Pinzette weg gebrochen, so dass das Gehirn freiliegt. Mit einem leicht gebogenen Spatel hebt man das Gehirn vorsichtig mitsamt der *Bulbi olfactorii* und einem Stück Rückenmark (bis zum Rhombenzephalon) heraus und spült das Organ mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung. Mit einer Pinzette werden vorsichtig die Blutgefäße entfernt und das Gehirn danach in eine Maus-Gehirn-Matrix (World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) eingespannt und mit zwei transversalen Schnitten in kleine Teile geschnitten. Drei Gehirnregionen (Mittelhirn, Striatum und Kortex) wurden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren und in ein Cryoröhrchen überführt. Bis zur Verarbeitung blieben die Gewebestücke bei -80°C im Gefrierschrank. Die Behandlung der Mäuse, die Generierung der L1cam transgenen Maus [52] und die Präparation der Gewebeproben wurde von unserem Kooperationspartner Dr. Ralf Kleene (Universität Hamburg) vorgenommen.

2.2.2 PINK1-KO

Zur Generierung der PINK1 (Park 6, PTEN induced putative kinase 1) *knock out* (KO) Maus wurde der Stamm 129/Sv genutzt. Die Mausgenerierung und die Probengewinnung wurde durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Jie Shen (*Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital and Department of Endocrinology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School*) durchgeführt. Bei den Mäusen handelt es sich um weibliche Tiere, die bei der Tötung vier Monate alt waren. Die Präparation des Gehirns erfolgte wie bereits in 2.2.1 beschreiben, wobei die Gewinnung der einzelnen Gehirnregionen auf eine andere Weise durchgeführt wurde. Das Gehirn wurde in die beiden Hemisphären geteilt. Danach wurde jeweils das Mittelhirn, Striatum und Kortex freipräpariert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Probenaufarbeitung (Punkt 2.3) werden die Proben bei -80°C gelagert.

2.2.3 Parkin-KO

Parkin ist auch als das Park2 Gen bekannt. Bei diesen Mäusen handelt es sich um weibliche Tiere vom Stamm 129/Sv. Die Versuchstiere waren bei der Tötung zwei und

acht Monate alt. Wir haben von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Jie Shen aus dem *Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital and Department of Endocrinology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School* das Mittelhirn, den Kortex und die Leber erhalten. Diese Proben wurden bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert und dann gemäß Punkt 2.3 aufgearbeitet. In dieser Arbeit werden nur die Ergebnisse des Mittelhirns präsentiert. Die Proben vom Kortex und der Leber wurden von Claudia Motz (medizinischer Doktorand der AG Prof. Dr. Dr. J. Klose) bearbeitet und werden in ihrer Dissertation ausführlich beschrieben.

2.3 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgt mit Hilfe verschiedener mechanischer und chemisch-enzymatischer Schritte. In der Literatur wurde diese Methode bereits ausführlich von Klose [49, 50, 53] beschrieben. In dieser Arbeit kommt die Gesamtproteinextraktion zum Einsatz. Bei dieser Methode bekommt man einen einzelnen Extrakt mit allen Proteinen des Ausgangsmaterials. Die Extraktion erfolgt für jedes Individuum einzeln. Bei der Gesamtextraktion ist der Probenverlust sehr gering, da man die meisten Schritte in ein und demselben Probengefäß durchführen kann. In Tabelle 2.1 kann man die Schritte mit den zur Berechnung notwendigen Faktoren und einzusetzenden Substanzmengen in Abhängigkeit vom Probengewicht einsehen.

Als erstes wird die Probe im stickstoffgekühlten Quarzglasmörser mit Puffer P (50mM TrisBase, 50mM KCl, 20% Glycerin [w/w] und 0,11M CHAPS, pH 7,5), den Proteinaseinhibitoren Hemmer 5 (H5, eine Tablette Complete® in 2ml Puffer P ohne CHAPS gelöst) und Hemmer 1 (H1, 0,14mM Pepstatin A und 0,1M Phenylmethylsulfonylfluorid in Ethanol) mit einem Nylonpistill zu einem feinen Pulver homogenisiert. Danach wird das fein vorgemörserte Material in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Hilfe eines gebogenen Spatels überführt und einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Dazu wird der Probe eine definierte Anzahl an Glaskugeln (Berechnung siehe Tabelle 2.1) zugegeben und mit einem dünnen Metalldraht unter ständigem Rühren aufgetaut. Die Behandlung erfolgt im Schallzentrum eines mit Eiswasser gefüllten Ultraschallbades für 6 x 20 Sekunden. Unmittelbar nach jeder einzelnen Schallbehandlung wird die Probe auf Eis gestellt und

mit dem Metalldraht gerührt, um einen raschen Wärmeaustausch zu gewährleisten. Nach der Ultraschallbehandlung trennt man die Glaskugeln von der Probe mit einem kurzen Zentrifugationsschritt. Dabei wird die Probe (Extrakt EX) in ein 2 ml Cryoröhrchen mit Schraubdeckel relativ verlustfrei überführt. Danach kann die Probe bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert oder weiter aufgearbeitet werden. Der Extrakt wird unter Zugabe von Puffer P-MgCl₂ (240mM MgCl₂ x 6 H₂O gelöst in Puffer P ohne CHAPS) und Benzonase (die jeweiligen Mengen sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen) 30 Minuten bei 4°C gerührt. Der Extrakt EX1 wird gewogen, ein für die Proteinbestimmung zurückzustellendes Aliquot Al-P abgenommen und der Extrakt EX1a erneut gewogen. Nun werden Harnstoff (Endkonzentration 6,5M in der Probe) und Thioharnstoff (Endkonzentration 2M in der Probe) unter 30minütigem Rühren bei Raumtemperatur der Probe zugegeben. Danach wird eine Probe für die Silberfärbung als Al-S abgenommen und die Probe erneut gewogen (Al-D, Aliquot für die Fluoreszenzfärbung, DIGE). Anschließend werden zur Vorbereitung für die isoelektrische Fokussierung DTT und Servalyte 2-4 (Mengenangabe ist der Tabelle 2.2 zu entnehmen) in die Probe mittels eines Glasstäbchens gerührt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 2-2: Übersicht der Arbeitsschritte zur Gesamtextraktion aus Gehirngewebe.

Schritt & Material	Menge (Berechnung)	Beispiel
Homogenisierung		
Probenmenge PM	PM	100 mg
Ultraschall		
Herstellung Puffer P	900µl P + 65mg CHAPS + 38µl H ₂ O	
Puffer P	PM x 1,6	160 µl
	$\Sigma_1 = \text{PM} + \text{P}$	260 mg
Proteinaseinhibitor H5	$\Sigma_1 \times 0,08$	20,8 µl
Proteinaseinhibitor H1	$\Sigma_1 \times 0,02$	5,2 µl
	$\Sigma_2 = \Sigma_1 + \text{H5} + \text{H1}$	286 mg
Kugelzahl	$\Sigma_2 \times 0,034$	≈ 10
Wiederholungen à 20 sec	6	

Extrakt EX wiegen		286 mg
Rühren (30 Minuten bei 4°C)		
Puffer P-MgCl ₂	EX x 0,021	6,006 µl
Benzonase	EX x 0,025	7,15 µl
Extrakt EX wiegen		299,156 mg
Aliquot Al-P	5µl	5 µl
Extrakt EX1a wiegen		294 mg
Rühren (30 Minuten bei RT)		
Harnstoff (6,5M)	EX1a x 0,78	229,32 mg
Thioharnstoff (2M)	EX1a x 0,3	88,2 mg
Aliquot AL-S	100µl	100 µl
Extrakt AL-D wiegen		511,52 µl
Vorbereitung für 1D		
DTT (700mM Lösung)	Al-S x 0,1	10 µl
Servalyte 2-4	Al-S x 0,1	10 µl

2.4 2D-Gel-Elektrophorese

Die zweidimensionale Gel-Elektrophorese (2D-Gel-Elektrophorese, 2-DE) basiert auf der elektrophoretischen Trennung der Proteine nach zwei unterschiedlichen Kriterien in zwei aufeinander folgenden Schritten. Der erste Schritt, die isoelektrische Fokussierung, ist die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) in einem sich während der Elektrophorese ausbildenden pH-Gradienten. Im zweiten Schritt werden die Proteine in einer klassischen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem molekularen Gewicht (Masse) aufgetrennt.

Die später als Probenpaare miteinander zu vergleichenden Proben und Kontrollen werden grundsätzlich im selben Elektrophoreselauf verarbeitet, um Abweichungen aufgrund möglicher experimentell bedingter Schwankungen so gering wie möglich zu halten. In der 1. Dimension können bis zu 4 Probenpaare gleichzeitig in demselben Lauf aufgetrennt werden. In der 2 Dimension werden pro Kammer zwei Gele (jeweils die sauren Seiten und die basischen Seiten gemeinsam) laufen gelassen.

Bei den DIGE Experimenten besteht die Möglichkeit die Lauf-zu-Lauf-Unterschiede noch mehr zu minimiert. Dabei können zwei verschiedene Proben und ein Mix aus allen in dem Versuch vorkommenden Proben mit drei Fluoreszenzfarbstoffen markiert, anschließend gemischt und in einem Gel zusammen laufen gelassen werden. Aufgrund der verschiedenen Farbstoffe (Cy2, Cy3 und Cy5) kann das Gel mit drei verschiedenen Wellenlängen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scanners eingescannt werden. Anschließend generiert ein Computerprogramm aus drei einzelnen Gelbildern ein Proteinmuster, bei dem alle drei Einzelproben übereinander gelegt, aber auch einzeln angeschaut werden können. Dadurch können zwei verschiedene Proben besser miteinander verglichen werden und die experimentellen Schwankungen werden minimiert. Der Cy2-Farbstoff wird für den Mix benutzt und dient später bei der Auswertung als Standard.

In dieser Arbeit wurde der Cy2-Farbstoff nicht verwendet, da bei der 2. Dimension eine so große Auflösung erzielt wird, dass schon die Größenunterschiede der Fluoreszenzfarbstoffe aufgetrennt wurden. Diese Unterschiede waren bei dem Cy2-Farbstoff am Größten, so dass in dieser Arbeit ein anderer experimenteller Ansatz verfolgt wird. Hier wird die Probe (Kontrolle oder Parkinsonmodell) mit Cy3 und der Mix aus allen in dem Versuch laufenden Proben mit Cy5 gelabelt. Bei der Auswertung diente uns dann Cy5 als Standard um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Die Auswertung wird in Punkt 2.6 beschrieben.

2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) der Proteine bedient sich *Carrier Ampholyten*, welche in die Gellösung eingearbeitet sind. Der pH-Gradient bildet sich während der Elektrophorese allmählich aus. Die Separationslösung besteht aus 3,5% (w/v) Acrylamid, 0,3% (w/v) Piperazine-Diacrylamid, 9M Harnstoff, 0,06% (v/v) TEMED und 2% (v/v) Ampholinmischung (siehe Tabelle 2.2).

Um ein Auslaufen der Proteine am kathodischen Ende zu verhindern, wird dort an das Separationsgel ein festeres Capgel angegossen. Die Gelzusammensetzung unterscheidet sich nur in der Acrylamid- und Diacrylamidkonzentration (12% [w/v] Acrylamid und

0,13% [w/v] Piperazine-Diacrylamid). Die Polymerisierung wird durch Zugabe von 0,02% (w/v) Ammoniumpersulfat zu einem Aliquot Separations- bzw. Capgel initiiert. Die für die IEF verwendeten Elektrophoresepuffer bestehen aus 4,25% (v/v) Phosphorsäure und 3M Harnstoff (Anodenpuffer) bzw. 5% (v/v) Ethylendiamin, 9M Harnstoff und 5% (w/v) Glycerin (Kathodenpuffer). Alle Lösungen für die 1.Dimension werden mit Millipore-Wasser ($18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) hergestellt und entgast. Ausführliche Angaben zur Herstellung der Lösungen und zum Gießen der 1D-Gele können an anderer Stelle eingesehen werden [54].

Tabelle 2-3: Übersicht über die Ampholinmischung im Separationsgel der IEF.

Ampholine	pH-Bereich	Teile
Pharmalyte- Ampholine	3.5-10.0	1
Pharmalyte- Ampholine	4.0-6.5	3
Pharmalyte- Ampholine	5.0-8.0	2
Servalyt®	2.0-11.0	1
Servalyt®	6.0-9.0	1

Die Trennstrecke der IEF-Gele beträgt 40cm, der Durchmesser der analytischen Gele beträgt 0,9mm (das Probenvolumen kann hier maximal 12 μ l betragen) und das der präparativen- und DIGE-Gele beträgt 1,5mm. Hier können bis zu 60 μ l Probe aufgetragen werden. Zwischen Gel und Probe wird eine dünne Schicht Sephadexlösung aufgetragen (in Wasser gequollenes in 25% Glycerin gerührtes Sephadex, versetzt mit 9M Harnstoff, 70mM DTT, und 2% (v/v) der für die Gellösung verwendeten Ampholinmischung s. Tabelle 2.2). Auf die Probe wird eine Schicht Schutzlösung (5M Harnstoff, 5% [w/v] Glycerin und 5% Serphalyte 2-4) gegeben, um die Proteine vor dem sauren Milieu des Anodenpuffers zu schützen und ein Ausfallen ihrer zu verhindern. Die Spannungsabfolge ist bei beiden Geldurchmessern identisch und als Programm in einem Spannungsgerät abgespeichert:

1h	100V
1h	300V
23h	1000V
30min	1500V
10min	2000V

Die Gele werden unmittelbar nach Beendigung der Fokussierung mit einem an der Spitze passend zum Röhrcheninnendurchmesser verdickten Nylonfaden (handelsübliche Angelschnur) von 0,8mm bzw. 1,4mm Durchmesser aus den Glaskapillaren in eine Equilibrierungslösung ausgestoßen. Dabei werden die Gele in zwei gleich lange Hälften geteilt, da die 2. Dimension lediglich eine Breite von 23cm aufweist. Die Equilibrierungslösung besteht aus 125mM TrisHCl, pH auf 6,8 eingestellt, 40% (w/v) Glycerin, 65mM DTT und 3% (w/v) SDS. Die IEF-Gele werden direkt auf Trägerschienen mit etwas Flüssigkeit gebracht. Die überschüssige Lösung wird sofort abgenommen und die Gele bei -80°C auf den Trägerschienen eingefroren und bis zum 2. Dimensions-Lauf gelagert.

2.4.2 SDS-PAGE (2. Dimension)

Die Gellösungen für die SDS-PAGE enthält 15% (w/v) Acrylamid 4x und 0,2% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid 2x, gepuffert in Laemmli-Puffer [55] (je 375mM TrisBase und TrisHCl, 0,03% [v/v] TEMED, 0,1% [w/v] SDS). Zur Polymerisierung werden 0,08% (w/v) Ammoniumpersulfat zugegeben. Die Gele werden in speziellen Kassetten zwischen Glasplatten der Maße 25 x 30cm gegossen, die Trennfläche beträgt ca. 23 x 28cm. Für die analytischen Gele werden Abstandshalter von 0,75mm und für die präparativen und DIGE Gele werden Abstandshalter von 1mm verwendet. Nähere Angaben zur Lösungsherstellung und der Durchführung finden sich bei Klose [54].

Der Elektrophoresepuffer wird ebenfalls gemäß Laemmlis Vorgaben [55] hergestellt: 25mM TrisBase, 192mM Glycerin und 0,1% SDS. Für Gellösung und Kathodenpuffer wird immer Millipore-Wasser verwendet, für den Anodenpuffer reicht vollionisiertes Wasser aus. Dem Kathodenpuffer wird außerdem etwas Bromphenolblau zugegeben. Zudem wird etwas Kathodenpuffer mit 1% (w/v) Agarose versetzt und die aufgelegten IEF-Gele damit überschichtet, um ein Lösen des Gels während der Elektrophorese zu verhindern.

Einer Einlaufphase von 15 min bei 65mA (87mA bei 1mm dicken Gelen) folgt die Trennphase bei 85mA (113mA bei 1mm dicken Gelen) für ca. 5-7 Stunden. Der Elektrophoresepuffer muss während der gesamten Zeit auf 15°C gekühlt werden, um

den pH des Puffers konstant zu halten. Der Lauf gilt als beendet, wenn die durch das Bromphenolblau angefärbte Lauffront ca. 2cm vom anodischen Gelende entfernt ist. Die Gele werden nach Abbruch in die Fixierlösung (s. Punkt 2.5.1.1) gebettet (analytische und präparative Gele) oder gleich mit dem Fluoreszenz-Scanner eingescannt.

2.5 Färbungen

Für die Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine in einer Gelmatrix existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Färbemethoden. In dieser Arbeit kamen je nach Frage und Aufgabenstellung verschiedene Methoden zur Anwendung.

2.5.1 Silberfärbung

Für die analytischen Gele wird eine sehr sensitive, jedoch für massenspektrometrische (MS) Untersuchungen untaugliche Silberfärbung verwendet. Sie folgt mit einigen Modifikationen durch Jungblut [56] den Vorgaben Heukeshovens [57]. Eine weitere Abwandlung dieser analytischen Silberfärbung durch Nebrich *et al.* 2007 [58] ermöglicht die anschließende MS- Analyse der interessanten Spots und kommt bei präparativen Gelen zum Einsatz. Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion mit den Aminosäuren Glutamat, Aspartat und Cystein Komplexe und wird mit Hilfe von Formaldehyd zu Ag reduziert.

2.5.1.1 Analytische Silberfärbung

Unmittelbar nach der SDS-PAGE beginnt die Färbung mit einem Fixierschritt. Mindestens zwei Stunden (meist über Nacht) werden die Gele in einer Lösung aus 10% (v/v) Essigsäure und 50% Ethanol in Millipore-Wasser geschüttelt. Pro Gel beträgt das benötigte Lösungsvolumen 1 Liter, angesetzt werden die Lösungen immer mit Millipore-Wasser für ein Probenpaar (2 Liter). Alle Schritte werden in Kunststoffwannen auf Horizontalschüttlern durchgeführt.

Nach der Fixierung erfolgt eine Inkubation von zwei Stunden in 4,1% (w/v) Natriumacetat, 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat, 30% (v/v) Ethanol und 0,2% Glutardialdehyd. Nach zweimaliger Spülung der Gele für jeweils 20 Minuten in Millipore-Wasser werden sie in einer Silberlösung (0,1% Silbernitrat und 0,01% [v/v] Formaldehyd) 30 Minuten sanft geschüttelt. Ein kurzer Waschschriff mit Millipore-Wasser und eine einminütige Spülung mit 2,5%iger (w/v) Natriumcarbonatlösung leiten die Entwicklung ein. In einer 2,5%igen Natriumcarbonatlösung mit 0,01% (v/v) Formaldehyd werden die Gele einzeln inkubiert bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht ist. Die Reaktion wird mit 0,05M Titriplex und 0,02% (w/v) Thimerosal gestoppt. Nach 20 Minuten in dieser Lösung werden die Gele in vollionisiertes Wasser überführt und anschließend getrocknet. Dies wurde bereits ausführlich bei Klose [54] beschrieben. Zu Dokumentationszwecken und für die Auswertung wird jedes Gel auf einem Durchlichtscanner eingescannt.

2.5.1.2 Massenspektrometriekompatible Silberfärbung

Im Wesentlichen lehnt sich diese Silberfärbung [58] an die bereits beschriebene analytische Silberfärbung an, jedoch wird auf das Glutardialdehyd verzichtet. Dieses Dialdehyd hat die Eigenschaft, Proteine über deren Aldehydgruppen miteinander zu vernetzen, was eine Extraktion der Proteine aus der Gelmatrix erschwert und auch aus MS-Aspekten ungünstig ist. Durch den Verzicht auf den Sensibilisierungsschritt mit Glutardialdehyd entfallen auch die zeitaufwendigen Waschschriffe mit Millipore-Wasser. Es wird nur ein 10minütiger Waschschriff in 30% (v/v) Ethanol durchgeführt. Danach erfolgt ein einminütiger Inkubationsschritt in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat und zwei einminütige Wässerungsschriffe mit Millipore-Wasser. Darauf werden die Gele für eine Stunde in 0,15% (w/v) Silbernitratlösung geschüttelt. Die Entwicklung der Gele erfolgt nach demselben Schema wie bei der analytischen Silberfärbung, jedoch mit abgewandelter Entwicklerlösung (2,5% [w/v] Natriumcarbonat, 0,02 % [w/v] Natriumhydrogencarbonat, 0,015 % [v/v] Formaldehyd und 0,025% [w/v] Thimerosal) und reiner EDTA-Lösung (0,05M Titriplex ohne Formaldehyd) zur Abstopfung der Entwicklung. Nach mindestens 20minütigem Abstoppen der Reaktion werden die Gele in Millipore-Wasser gewässert und zur Dokumentation eingescannt. Danach werden die

Gele eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Ein rasches Ausstanzen der zu identifizierenden Proteinspots ist empfehlenswert, da eine Diffusion der Proteine im Gel nicht ausgeschlossen werden kann.

2.5.2 Färbungen für die Posttranslationalen Modifikationen

Bei den Proteinen kommt es nach ihrer Translation zu biochemischen Veränderungen, um z.B. das Protein zu aktivieren oder inaktivieren. Diese Reaktionen werden als Posttranslationale Modifikationen (PTM) bezeichnet. Dies geschieht aber nicht bei allen Proteinen zur gleichen Zeit, so dass man in einer Zelle immer verschiedene Isoformen von ein und demselben Protein finden kann. Die PTMs können nicht alle mit der Silberfärbung angefärbt werden, so dass man sich anderer Verfahren bedienen muss. In dieser Arbeit wurden für die jeweiligen Proben neue Färbemethoden etabliert und ausgewertet. Es wurden folgende PTMs untersucht: die Phosphorylierung (zum Beispiel für Aktivierung/Inaktivierung von Proteinen), die Glykosylierung (zum Beispiel für die Affinitätsänderung bei der Ligandenbindung) und die Oxidierung (zum Beispiel Veränderung der enzymatischen Aktivität von Proteinen oder der Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren).

2.5.2.1 ProQ® Diamond Phosphoprotein Gel Stain

Die Phosphorylierung der Proteine erfolgt an Serin, Threonin oder Tyrosin. Dadurch werden manche Proteine in einem Stoffwechselweg zum Beispiel aktiviert und können wieder andere Proteine in ihrer Wirkungsweise inhibieren oder aktivieren. Die phosphorylierten Proteine regulieren somit bestimmte zelluläre Prozesse. Die Phosphorylierung in einer Zelle ist immer ein reversibler Schritt, so dass es schwer ist, den Zustand in allen Zellen von einem Gewebe mit dem eines anderen Gewebes zu vergleichen. Den Proben muss bei der Aufarbeitung ein Mix aus Phosphatase-Hemmern beigemischt werden. Dieser Schritt erfolgte vor der Ultraschall-Behandlung. Bei der Färbung, die mit Hilfe des *ProQ® Diamond Phosphoprotein Gel Stain* von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt wird, handelt es sich um eine Fluoreszenzfärbung. Dabei wird das Gel nach dem Elektrophoreselauf in den Fixierer

(50% Methanol, 10% Essigsäure) über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wird das Gel gut gespült (2mal mit Millipore-Wasser), um alle Reste des Fixierers zu entfernen. Das Gel wird nun für 1h und 30min in die Färbelösung (*Pro-Q® Diamond stain*) im Dunkeln geschüttelt. Danach wird das Gel mit einer Entfärbelösung (20% Acetonitril, 50mM Natriumacetat in Millipore-Wasser mit pH 4) auf dem Schüttler entfärbt. Die Gele werden vor dem Einscannen mit dem Fluoreszenzscanner in Millipore-Wasser gewässert. Das Einscannen erfolgt bei einer Wellenlänge von 532nm.

2.5.2.2 Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit

Die Rolle der Glykosylierung von Proteinen im Zellstoffwechsel war lange Zeit nicht bekannt. Doch heute weiß man, dass glykosylierte Proteine vor proteolytischen Abbau geschützt sind, bei glykosylierten Rezeptoren die Affinität zu deren Liganden (und umgekehrt) beeinflusst ist, die Glykosylierung mancher Proteine als Signal für den intrazellulären Transport dient und das sie auch die Verteilung bestimmter Zellen (zum Beispiel Lymphozyten) im Organismus beeinflusst. Die Zucker können N-glykosidisch an Asparagin durch Asn-X-Thr/Ser Sequenzmotiv oder O-glykosidisch über Serine oder Threonin an die Proteine geknüpft werden.

Bei der Glykosylierungsfärbung handelt es sich ebenfalls um eine Fluoreszenzfärbung. Sie wird mit dem *Pro-Q® Emerald 488 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit* von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Das Gel wird über Nacht in der Fixierlösung (50% Methanol, 5% Essigsäure in Millipore-Wasser) fixiert. Am nächsten Tag werden die Gele in einer Waschlösung (3% Essigsäure) für 30 Minuten geschüttelt. Danach werden die Gele in die Pro-Q® Emerald 488 Lösung (gelöst in Dimethylformamid, DMF und *Staining Puffer* vom Kit) über Nacht im Dunkeln inkubiert. Die Gele werden wieder in der Waschlösung dreimal für je 30min gewaschen. Danach kann man die Gele mit Hilfe des Fluoreszenzscanners bei 470nm einscannen.

2.5.2.3 OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit

Oxidative Modifikationen verändern die Seitenketten von Methionin, Histidin und Tyrosin und bilden Cystein-Disulfidbrücken. Die reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS)

spielen eine wichtige Rolle in Alterungsprozessen, Apoptosis, Krebs, Herzkreislauf-Erkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig über die Bedeutung von oxidativen Modifikationen von einzelnen Proteinen und die Pathophysiologie von freien Radikalen im Stoffwechsel bekannt. In der Literatur ist bekannt, dass Parkin einen Einfluss auf die ROS hat [22].

Diese Methode dient der Messung der oxidativen Modifikationen. Das Gel wird nach dem Elektrophoreselauf geblottet. Danach wird die Membran in Blocking Puffer (1% BSA in PBS pH 7,2 mit 0,05% Tween-20) für eine Stunde geschüttelt. Dann wird die Membran mit dem ersten Antikörper (aus dem Kit) für ca. eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend mit PBS-T (PBS pH 7,2 mit 0,05% Tween-20) gewaschen und für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper bei RT inkubiert. Die Membran wird wiederholt gewaschen und dann wie ein normaler Western Blot entwickelt (Chemolumineszenz, s. Punkt 2.8).

2.6 Bildauswertung

Die Gelauswertung der DIGE-Gele erfolgte mit dem Computerprogramm Delta2D (Decodon, Greifswald, Deutschland).

Zur Auswertung der Spotmuster werden immer die Cy5 Proteinmuster im Programm gematcht. Dabei wird ein Proteinmuster als Mastergel bezeichnet. Auf diesem Muster sollen sich die meisten Proteinspots befinden und es soll am Besten aufgetrennt sein. Alle anderen Proteinmuster werden nun nur mit diesem Mastergel gematcht. Das bedeutet, dass die gleichen Proteinspots mit Hilfe von Vektoren (Verzerrung) zur Deckung gebracht werden. Nachdem alle Gele abgeglichen wurden, wurde ein Fusionsgel von allen Cy3-Proteinmustern bei maximaler Intensität erzeugt. Auf diesem Fusionsgel erfolgte die Spoterkennung mit ganz genau definierten Parametern, um eine Vergleichbarkeit innerhalb der verschiedenen Mausstämmen der PD und der neurodegenerativen Erkrankungen (aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. J. Klose) zu gewährleisten. Diese Spoterkennung wurde visuell noch einmal überprüft und danach einer statistischen Auswertung unterzogen. Dabei wurde ein Student-T-Test verwendet. Alle statistisch signifikanten Spots mit einer Expressionsänderung über 20% wurden einer weiteren visuellen Überprüfung unterzogen. Die danach übrig gebliebenen

Proteinspots wurden ausgestochen und massenspektrometrisch weiter untersucht. Bei diesem Verfahren kommen hauptsächlich die quantitativen (größer/kleiner, intensiver/lichter oder auch vorhanden/fehlen) Unterschiede in Betracht. Die qualitativen (Positionsverschiebungen durch Polymorphismen) bleiben bei dieser Methode weitaus unbeachtet. Dazu würde man sich der visuellen Auswertung der analytisch silbergefärbten Gele durch den Leuchtkasten bedienen. Dabei werden vorzugsweise die beiden Gele, die in einer Elektrophoresekammer zusammen gelaufen sind, gegeneinander verglichen.

2.7 Spotidentifizierung

2.7.1 Ausstanzen von Proteinspots

Die als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert bewerteten Proteinspots werden für eine massenspektrometrische Analyse aus MS-kompatibel gefärbten Gelen ausgestanzt. Das zu bearbeitende Gel wird unter Wasser gelagert. Das Ausstanzen der Proteinspots erfolgt unter einer *Cleanbench*, die die Luft im Innenraum nach vorn wegpustet. Die *Cleanbench*, alle Geräte einschließlich der Handschuhe und die Außenseite der eingeschweißten Gele werden erst mit 0,1% (w/v) SDS Lösung gewaschen, dann mit Millipore-Wasser und anschließend mit reinem Ethanol (zur schnelleren Trocknung) abgespült. Mit heruntergedrückten Kolben des Ausstanzers wird die Gerätspitze auf den intensivsten Bereich des auszustanzenden Proteinspots gesetzt. Langsames Heben des Kolbens saugt das ausgeschnittene Gelstück zusammen mit etwas Flüssigkeit in den Spotausstanzer. Das Material kann in ein Eppendorfgefäß oder das *Well* einer Mikrotiterplatte überführt werden. Die Proben werden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Für das Ausstanzen von vielen Proteinspots innerhalb eines Gels wurde ein automatischer Gelpicker verwendet, der nach dem ähnlichen Prinzip wie der manuelle Ausstanzer arbeitet.

2.7.2. Massenspektrometrie (MS)

Alle nach dem Ausstanzen der Spots notwendigen Arbeiten bis hin zur Datenbanksuche/ Identifizierung wurden in der AG Klose, Humangenetik Charité von

Frau Dipl.-Ing. (FH) Grit Nebrich (Reflex IV- MALDI-TOF/TOF), Frau Silke Becker und Frau Andrea Koppelstätter (beide Nano-HPLC mit LTQ-ESI-Iontrap) durchgeführt. Die Massenspektrometrie ist eine Technik zur Bestimmung der Molekülmassen freier Ionen in einem Hochvakuum. In dieser Arbeit kamen die Elektrospray-Ionisation (ESI) [59] und die Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) [60] zur Anwendung.

2.7.2.1 ESI

Bei dieser Methode werden die Peptide durch Versprühen der Proteinlösung in feinste Tröpfchen (mit Hilfe von einer Hochspannung) in die Gasphase gebracht. Als Ionisierungshelfer dienen schwache Säuren und als Sprühhelfer organische Lösungsmittel.

Die ausgestanzten Proteinspots werden einem Waschprozess, enzymatischen Verdau und der MS Identifizierung unterzogen. Der Waschprozess verläuft abwechselnd mit Quellen und Schrumpfen der Proteinspots. Nach dem Umsetzen der Proteinspots in Multichem Platten (96 Well Format, Whatman, England)) werden die Proben nacheinander, zweimalig mit 200µl an 100µl Acetonitril (ACN) bzw. mit 0,79g Ammoniumhydrogencarbonat (in Millipore-Wasser) gewaschen. Es erfolgt eine jeweilige Inkubation für 10min bei 37°C im Brutschrank und ein Abnehmen des Überstandes mit einer Pipette. Der Waschprozess schließt mit der erneuten Zugabe von 200µl 100% ACN (10 min bei 37°C im Brutschrank) und Abnahme des Überstandes ab. Die so geschrumpften Spots werden kurz getrocknet und nun enzymatisch verdaut. Zu jedem Proteinspot werden 20µl Trypsinlösung zugegeben (20µg Trypsin-Lyophilisat gelöst in 2ml 50mM Ammoniumbicarbonat-Puffer). Die Spots werden für 3h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach dem Verdau werden 19µl der Peptidlösung in ein Gefäß (Glasvial G1 mit Mikroeinsetzung G30, CS-Chromatographie, Langerwehe, Deutschland), die für das Messen mit dem Massenspektrometer optimiert sind, überführt und im ESI Massenspektrometer (LCQ DECXP, Thermofinnigan, Dreieich, Deutschland) eingesetzt. Dem ESI Massenspektrometer ist eine chromatographische Einheit (HPLC mit einer C18

Reversed Phase Säule, LC Packing Nano HPLC System, Dionex, Germering, Deutschland) vorgeschaltet. Das Gerät beinhaltet ein Quadrupol, zum Vorselektieren der Ionen, und eine Ionenfalle als Massenanalysator. Zum Eichen des Gerätes wurde eine 100fmol Alkoholdehydrogenase-Lösung genutzt.

Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe der Suchmaschine SEQUEST (www.fields.scripps.edu/sequest) gegen die theoretischen Daten abgeglichen. Für den Abgleich der theoretischen Daten diente die nicht redundante Proteinsequenzdatenbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Folgende Parameter dienten als Kriterien: Taxonomie: *Mus musculus*; Peptidtoleranz: 150ppm; variable Modifikationen: Oxidation am Methionin und Propionamid am Cystein (Acrylamidprodukte).

2.7.2.2 MALDI

Bei dieser Technik werden die Probenmoleküle in Kristalle einer Matrixsubstanz mit hohem UV-Absorptionsvermögen eingebaut. Das Proben-Matrix-Gemisch wird dann mit einem gepulsten Laserstrahl gezielt beschossen. Durch eine Protonenübertragung von der sauren UV-absorbierenden Matrixsubstanz auf die Probenmoleküle werden diese positiv aufgeladen und liegen dann als Ionen in der Gasphase des Hochvakuums des Massenanalysators vor. Nach der Beschleunigung der Ionen in einem elektrischen Feld durchfliegen diese eine feldfreie Driftstrecke bis zum Detektor. Aufgrund des individuellen Masse/Ladungsverhältnisses der Ionen entwickeln diese unterschiedliche Geschwindigkeiten und somit auch unterschiedliche Flugzeiten. Diese, vom Ionen abhängigen Flugzeiten, werden mit Hilfe des Massenanalysators bzw. Flugzeitanalysators (TOF, *Time of flight*) bestimmt.

In dieser Arbeit wurden die manuell ausgestanzten Proteinspots gewaschen, enzymatisch verdaut, in eine Matrix eingebettet und danach analysiert und ausgewertet. Der Waschprozess dient der Entfernung von störenden Chemikalien und erfolgt durch physikalisch abwechselnde Schritte: Quellen und Schrumpfen. Dazu werden die Proteinspots in ZipPlate® Platten (96 Well Platte mit integriertem C18 Material) umgesetzt und zunächst mit 100µl einer Lösung aus 25mM Ammoniumhydrogencarbonat (ABC-Puffer) mit 5% Acetonitril (ACN) für 15 min bei

RT geschrumpft. Der Überstand wird mit einer Vakuumstation (Millipore®, Bedford, USA) abgesaugt. Danach erfolgt eine zweite Behandlung für 15 min bei RT mit 100µl ABC-Puffer mit 50% ACN mit anschließendem Absaugen. Der letzte Schritt ist eine Zugabe von 200µl 100% ACN für 10 min bei RT mit darauf folgendem Absaugen des Überstandes.

Nun erfolgt der enzymatische Verdau, bei dem die Proteine an den für das Enzym (Trypsin) spezifischen Schnittstellen in kleinere Fragmente (Peptide) geschnitten wird. Dazu wird 10µl an Trypsinlösung (20µg Trypsin-Lyophilisat, 50mM Ammoniumhydrogencarbonat in 2 ml Millipore-Wasser) auf den Spot gegeben und für 30min bei 37°C in Brutschrank inkubiert. Dann werden 5µl 50mM Ammoniumhydrogencarbonat zugegeben und die Lösung für 2h 30min bei 37°C weiter inkubiert. In mehreren Schritten wird das C18-Material der ZipPlate® Platten äquillibriert und die Proben durch die Bindung an das C18-Material entsalzt und aufkonzentriert.

1. 8µl 100 ACN für 15 min bei 37°C im Brutschrank
2. 130µl 0,2% Triflouressigsäure (TFA) für 30min bei RT
3. 100µl 0,2 % TFA bei RT
4. mit Vakuum absaugen
5. Schritt 3 wiederholen

Nach dem Durchlauf werden die Peptide mit 15,5µl Lösung (50% ACN mit 0,1% TFA) vom C18-Material der ZipPlate® Platten unter Vakuum in eine Microplate UNIPLATE Platte (96 Well, 250µl) eluiert.

Als Matrix wird 2,5-Dihydroxy-benzoessäure in einer Konzentration von 3,3g/l gelöst in 0,1% TFA-Lösung und ACN im Verhältnis von 2:1 verwendet. Die Präparation erfolgt nach dem „Dried-Droplet“ Prinzip direkt auf dem Probenträger (Target). Als Target dient das *Anchor-Chip-Target* (MTP AnchorChip™var/384TF, 800µl, Bruker, Bremen, Deutschland)[58]. Es wird eine Mischung aus 1,5µl Matrixlösung und 1,5µl eluierter Peptidlösung auf das *Anchor-Chip-Target* pipetiert und eingetrocknet. Danach wird das Target in das MALDI-TOF-Massenspektrometer (Bruker Reflex IV, Bremen, Deutschland) eingeschleust und die Flugzeit der Peptide detektiert. Die aufgenommenen

Massenspektren werden mit Hilfe der Software FLEXControl 1.1.46 (Bruker, Bremen, Deutschland) aufgezeichnet und wiedergegeben. Danach werden die Spektren mit der Software XMASS-NT 5.1.5 in korrelierende Massenlisten transferiert und mit existierenden theoretischen Datenbanken abgeglichen. Dazu dient eine Suchmaschine Mascot (www.matrixscience.com), die in der nicht redundanten Proteinsequenzdatenbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) unsere Massenliste vergleicht. Als Analyseparameter wurden eingegeben: Taxonomie: *Mus musculus*; Peptidtoleranz: 150ppm; variable Modifikationen: Oxidation am Methionin und Propionamid am Cystein (Acrylamidprodukte). Die Identifizierung galt als zutreffend, wenn der Scorewert 40 bei $p \leq 0,05$ (Maus) [61] und die Sequenzabdeckung $\geq 30\%$ war.

2.7.2.3 Datenbanken zur Charakterisierung identifizierter Proteine

Die durch MS identifizierten Proteine wurden mit Hilfe von weiteren Datenbanken in Vorkommen, Funktion und weitere Besonderheiten charakterisiert. Folgende Datenbanken kamen zum Einsatz: www.expasy.org ; www.ebi.ac.uk/ensemble und www.ncbi.pubmed.org.

2.8 Western Blotting von Proteinen

Mit dieser Methode werden die aufgetrennten Proteine (vgl. 2.4) elektrophoretisch auf eine proteinbindende Nylonmembran gebracht. Nach dem Elektrophoreselauf wird das Gel luftblasenfrei auf drei Lagen 3mm dicken Whatman-Filterpapier, welche in Kathodenpuffer (ϵ -Aminocaprinsäure 0,040M, Tris Base 0,025M, Methanol 20% pH 9,4) gewässert wurden, auf die Kathode gelegt. Auf das Gel wird eine passgenaue Nylonmembran (PVDF-Membran), die zuvor in Membranpuffer (Tris Base 0,025M, Methanol 20% pH 10,4) getränkt wurde, gelegt. Darauf kommen eine Lage in Membranpuffer und zwei Lagen in Anodenpuffer (Tris Base 0,3M, Methanol 20% pH 10,4) getränkte 3mm Whatman-Filterpapiere. Nun erfolgt das Blotting mit Hilfe von Strom, wobei sich die zu verwendende Stromstärke wie folgt berechnet: Gelbreite (cm) x Gellänge (cm) x $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$. Nach zwei Stunden ist die Prozedur abgeschlossen und das Gel wird in Blockpuffer (Tris Base 10mM, NaCl 150mM, Tween-20 0,01%,

Milchpulver 5% pH 8,0) über Nacht geschüttelt. Dabei werden die Proteine an die Membran fixiert und freie Stellen geblockt. Die Blotting-Effizienz wurde durch eine wiederholte Färbung des Gels mit MS-Silberfärbung (vgl. 2.5.1.2) überprüft.

2.8.1 Entwicklung

Die zu entwickelnde Membran wurde in eine Schale gelegt und dreimal für je fünf Minuten mit Waschpuffer (Tris Base 20mM, NaCl 9% [w/v] und Tween 1% [w/v]) gewaschen. Dann wurde der Primäantikörper für zwei Stunden auf die Membran gegeben. Danach wurde die Membran wieder dreimal für je fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit dem Sekundäantikörper inkubiert. Nun wurde die Membran einmal fünf Minuten, einmal 15 Minuten und dann für fünf Minuten in Waschpuffer gespült.

2.8.2 Darstellung der Signale

Die Entwicklung der Membran erfolgt mit Hilfe des Chemolumineszenz Kits *ECL-Staining*. Die Emission von Licht bei der Chemolumineszenz ist eine Folge des Überganges eines Elektrons aus einem angeregten Zustand in einen energetisch tiefer liegenden Zustand, bzw. den Grundzustand. Anders als bei der Fluoreszenz oder Phosphoreszenz wird bei der Chemolumineszenz dieser angeregte Zustand durch eine chemische Reaktion erreicht. Bei den meisten Chemolumineszenz-Reaktionen entsteht zunächst ein instabiles Intermediat mit einer Peroxid-Brücke, dessen energiereiches Zerfallsprodukt einen *Charge-Transfer-Komplex* mit einem Farbstoffmolekül eingeht und Energie an dieses abgibt. Das angeregte Farbstoffmolekül sendet dann ein Lichtquant aus.

Bei dem ECL-Kit wird die *working solution* erst kurz vor der Entwicklung frisch angesetzt und dann die Membran damit beträufelt. Die Membran wird für eine Minute im Dunkeln inkubiert und anschließend entwickelt. Die Membran wurde in eine Expositionskassette mit aufgelegtem Kodak-Film exponiert. Der Film wird anschließend in einem Entwickler, bis die Spots sichtbar werden, geschüttelt. Dann wird

der Film gewaschen und gleich in einen Fixierer gelegt. Nun kann man den Film trocknen und auswerten.

2.8.3 Wiederholte Verwendung der Membran („Strippen“)

Die Membran kann für aufeinander folgende Hybridisierungen mit verschiedenen Antikörpern verwendet werden. Der zuvor verwendete Primärantikörper wurde vor der neuen Hybridisierung durch Waschen der Membran in *Stripping*-Lösung von (Pierce, Rockford, USA) bei RT für 15 Minuten entfernt. Zur Überprüfung der vollständigen Entfernung, wird die Membran nach Punkt 2.8.2 entwickelt und das Ergebnis ausgewertet.

3 Ergebnisse

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Parkinsonschen Erkrankung untersucht. An dem Parkin-Mausmodell wurde eine Altersstudie durchgeführt. Dabei lag das Augenmerk auf der Untersuchung der Unterschiede der Veränderungen des Proteoms in den verschiedenen Stadien der Erkrankung.

Bei dem PINK1-Mausmodell wurden verschiedene Gehirnregionen untersucht. Dabei sollte festgestellt werden, ob es in den verschiedenen Gehirnbereichen unterschiedliche Reaktionen auf die PINK1 Mutation gibt, da sich die Parkinsonsche Erkrankung am meisten in der *substantia nigra pars compacta* auswirkt.

Die dritte Untersuchung diente ebenfalls einer Zeitstudie, aber mit dem Unterschied, dass sich hinter der induzierten Erkrankung ein bestimmter Krankheitsverlauf verbirgt. Bei den Mäusen kommt es nach sieben Tagen nach einer MPTP-Behandlung zu einer Erholungsphase, welche auf Proteinebene untersucht werden sollte.

Des Weiteren wurden an allen Mausmodellen post-translationale Modifikationen mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht und alle Versuche untereinander verglichen, um eine mögliche Gemeinsamkeit im Krankheitsprozess zu finden.

In Tabelle 3-4 sind alle Mausmodelle, die in dieser Arbeit untersucht wurden aufgelistet. Des Weiteren sind in der Tabelle der Mausstamm, die Gehirnregion, das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt der Analyse und die Anzahl der biologischen Wiederholungen (*Replikate*) angegeben.

Bei der Analyse der unterschiedlich exprimierten Proteinspots galten folgende Kriterien: als signifikant wurden die Proteinspots mit einem p-Wert (vom Student's T-Test) von kleiner als 0,05 bezeichnet und in die nachfolgenden Analysen sind die Proteinspots bei einem Expressionsunterschied von 1.2 ($\pm 20\%$) eingegangen.

Tabelle 3-4: In dieser Tabelle sind die verschiedenen Mausmodelle, der Mausstamm, die Gehirnregion, das Alter und die Anzahl der biologischen Replikate dargestellt.

Mausmodell	Mausstamm	Gehirnregion	Alter	Anzahl der biologischen Replikate
Parkin	129/Sv	Mittelhirn	2 Monate	7
Parkin	129/Sv	Mittelhirn	8 Monate	7
PNIK1	129/Sv	Mittelhirn	4 Monate	6
PINK1	129/Sv	Striatum	4 Monate	6
PINK1	129/Sv	Kortex	4 Monate	6
MPTP B6 1d nach Behandlung	C57BL/6J	Mittelhirn	3 Monate	6
MPTP B6 7d nach Behandlung	C57BL/6J	Mittelhirn	3 Monate	6
MPTP L1cam 1d nach Behandlung	C57BL/6J	Mittelhirn	3 Monate	6
MPTP L1cam 7d nach Behandlung	C57BL/6J	Mittelhirn	3 Monate	6

3.1 Parkin *knock-out* Mausmodell

In dieser Studie wurden Mäuse des 129/Sv- Stammes mit einem Parkin *knock-out* (KO) untersucht. Dieses Protein entspricht dem PARK2-Gen, und hat die Funktion einer Ubiquitin E3-Ligase. Bei der Untersuchung wurden 7 Maus-Paare miteinander verglichen. Die Mäuse waren zwei und acht Monate alt, und die Gehirnregionen wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben präpariert und nach Kapitel 2.3 aufgearbeitet. Das Proteingemisch des Mittelhirns wurde mit der DIGE-Technik angefärbt und mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Proteinmuster mit Hilfe der Delta2D-Software analysiert. Als Kontrollen dienten Wildtyp 129/SV-Mäuse.

3.1.1 Altersabhängigkeit von Proteinunterschieden

In der Tabelle 3-5 sind die Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, die Anzahl der identifizierten Proteinspots und die Menge der unterschiedlichen Proteine dargestellt. Es wurde immer der *knock-out* (KO) mit dem Wildtyp (WT) verglichen. In der zweiten Spalte steht in Klammern die Anzahl zu den hoch- bzw. herunterregulierten Spots. Die zwei Monate und acht Monate alten Mäuse haben ungefähr die gleiche Menge an veränderten Proteinspots bei dem Vergleich KO zu WT ergeben.

Bei den zwei Monate alten Mäusen konnten bei drei Proteinen (Vdac1, Got2 und Atp6v1f) jeweils eine Isoform gefunden werden. Eine Liste mit allen Proteinennamen und Identifizierungsmerkmalen für beide Zeitpunkte ist der Tabelle S1 zu entnehmen.

Tabelle 3-5: Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, identifizierten Proteinspots und der unterschiedlichen Proteine der beiden Zeitstadien der Parkin-KO Maus.

Zeitstadium	Anzahl der unterschiedlichen Proteinspots (Vergleich KO zu WT)	Anzahl der identifizierten Proteinspots	Anzahl der unterschiedlichen Proteine
2 Monate	36 (15↑, 21↓)	32	22
8 Monate	33 (7↑, 26↓)	28	10

Nun wurden die identifizierten Proteine einer Datenanalyse unterzogen und nach ihren Eigenschaften und Merkmalen in verschiedene Gruppen eingeteilt (s. Abbildung 3-7) Es wurden fünf Gruppen, hinsichtlich Funktion (Zellwachstum bzw. Zellstabilität, Energiegewinnung und Proteinabbau), Lage (Mitochondrium) und post-translationale Modifizierung (Phosphoprotein) gebildet. Bei dieser Einteilung kann es vorkommen, dass ein und dasselbe Protein in verschiedene Kategorien passt.

Bei den Proben der zwei Monate alten Mäuse sind die meisten Proteine Phosphoproteine oder dienen der Energiegewinnung. Vier Proteine sind mitochondriale Proteine und drei dienen dem Proteinabbau. Die wenigsten, nur ein Protein, sind für das Zellwachstum zuständig.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der zwei Monate und acht Monate alten Mäuse ist zu erkennen, dass weniger Proteine der acht Monate alten Mäuse Phosphorylierungsstellen aufweisen (drei Proteine) und ebenfalls weniger Proteine (zwei) für den Proteinabbau zuständig sind. Bei beiden Zeitstufen ist jeweils ein Protein für Zellwachstum bzw. Stabilität zuständig. Ebenfalls ist bei den acht Monate alten Mäusen nur ein Protein in den Mitochondrien zu finden.

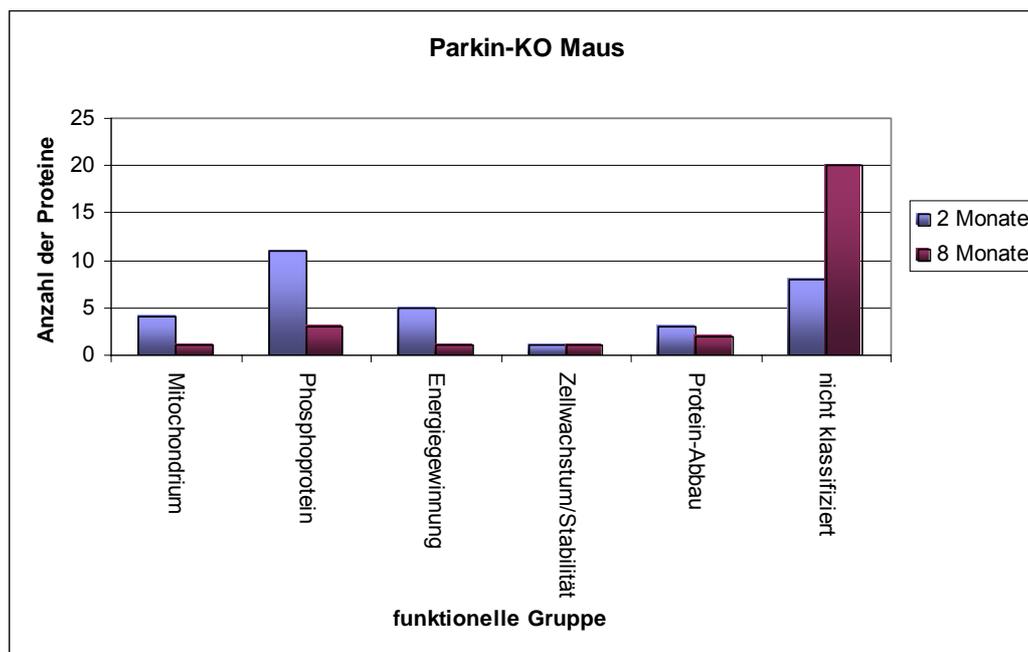


Abbildung 3-7: Dieses Diagramm zeigt die zahlenmäßige Verteilung der identifizierten Proteine von den Mittelhirn-Proben der 2 Monate (blau) und 8 Monate (rot) alten Parkin-KO Maus, die nach unterschiedlichen Kriterien sortiert wurden sind.

Bei der GoTree- Analyse mit Hilfe einer Internetsuche konnte eine genauere Einteilung der unterschiedlich regulierten Proteinspots in verschiedenen Stoffwechselwege erfolgen. In Tabelle 3-6 sind die Daten für die herunterregulierten Proteine der zwei Monate alten Mäuse dargestellt. Bei den hochregulierten Proteinen ergab sich keine signifikante Zuordnung.

Tabelle 3-6: In dieser Tabelle sind die Daten der Internetrecherche der Kegg-Pathways der herunterregulierten Proteine der Mittelhirn-Proben der 2 Monate alten Parkin-KO Maus dargestellt.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Glycolysis / Gluconeogenesis	4	O=4;E=0.0195;R=205.1282;P=3.42e-9
Carbon unit transition	3	O=3;E=0.0079;R=379.7468;P=5.81e-8
Citrate cycle (TCA cycle)	2	O=2;E=0.0094;R=212.766;P=3.92e-5

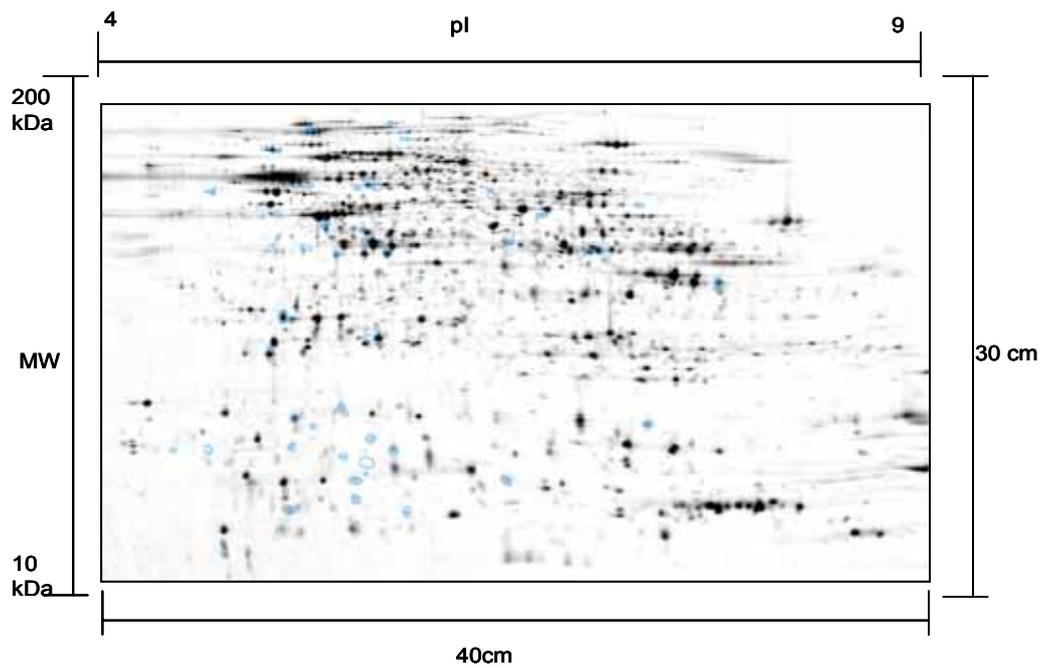
Es ist zu Erkennen, dass die meisten herunterregulierten Proteine in Stoffwechselforgängen zur Energiegewinnung (z.B. Glykolyse oder Zitronensäure-Zyklus) zu finden sind. Bei den Proben der acht Monate alten Mäuse konnten nur einzelne Proteine zugeteilt werden. Dies ist in Tabelle 3-7 dargestellt.

Tabelle 3-7: Einteilung der verändert reguliert gefundenen Proteine der Mittelhirn-Proben der acht Monate alten Parkin-KO Maus.

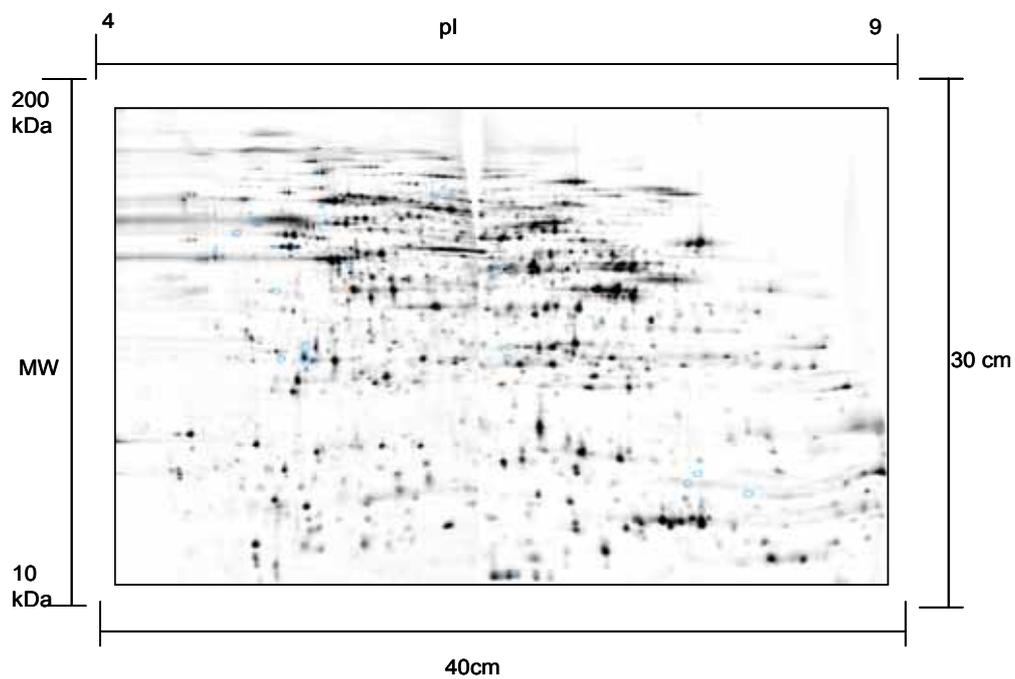
KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Parkinson's disease	1	O=1;E=0;R=NA;P=2.40e-4
Oxidative phosphorylation	1	O=1;E=0.0264;R=37.8788;P=2.64e-2
Pyruvate metabolism	1	O=1;E=0.0099;R=101.0101;P=1.00e-2
Cell Communication	1	O=1;E=0.0255;R=39.2157;P=2.54e-2
Neurodegenerative Disorders	1	O=1;E=0.0077;R=129.8701;P=7.90e-3

Bei dieser Analyse wurde ein Gen der Parkinsonschen Erkrankung zugeteilt und ein anderes der neurodegenerativen Erkrankungen. Ein weiteres Gen konnte der Energiegewinnung (oxidative Phosphorylierung) zugeordnet werden.

In Abbildung 3-8 sind die beiden Proteinmuster der zu untersuchenden Zeitpunkte mit allen signifikanten Proteinspots (blau eingekreist) dargestellt. Dabei kann man erkennen, dass bei den zwei Monate alten Mäusen nur geringfügig mehr Proteinunterschiede zu finden waren.



Parkin-KO -2 Monate
Mittelhirn



Parkin-KO – 8 Monate
Mittelhirn

Abbildung 3-8: In dieser Abbildung sind die Gelbilder der Mittelhirn-Proben der 2 Monate (oben) und 8 Monate (unten) alten Parkin-KO Maus abgebildet. Die signifikanten Proteinspots sind blau umrandet.

3.1.2 Vergleich der veränderten Proteine in den Mittelhirn-Proben der zwei Monate und acht Monate alten Parkin-KO Mäuse

In der Abbildung 3-9 ist das Diagramm mit der Anzahl der Proteinunterschiede beider Zeitpunkte dargestellt. Dabei stellt der blaue Balken die Spotanzahl dar, die in dem Parkin *knock-out* herunterreguliert waren und der rote Balken zeigt die Anzahl der Proteinspots an, die im Parkin *knock-out* hoch reguliert waren im Vergleich zu den Kontrollen. Diesem Diagramm kann man graphisch entnehmen, dass in den Mittelhirn-Proben der acht Monate alten Parkin-KO Maus die Anzahl der herunterregulierten Proteine zugenommen und die Anzahl der hochregulierten Proteinen abgenommen hat. Die Gesamtzahl an veränderten Proteinspots ist in den acht Monate alten Mäusen aber nach unten gegangen.

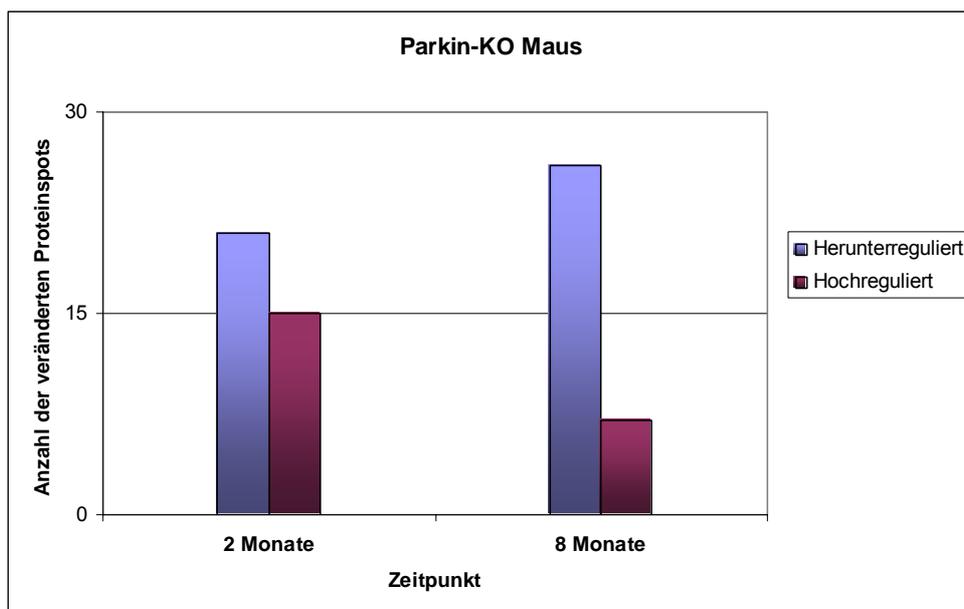


Abbildung 3-9: Dieses Diagramm zeigt die mengenmäßige Verteilung der hoch- und herunterregulierten Proteine in den Mittelhirn-Proben von Parkin-KO Mäusen nach 2 Monaten (links) und 8 Monaten (rechts). In den 8 Monate alten Parkin-KO-Mäusen ist die Anzahl der herunterregulierten Proteinspots (blauer Balken) gestiegen und die Anzahl der hochregulierten Proteinspots gesunken.

In der Abbildung 3-10 ist der GoTree, der mit Hilfe einer Internetrecherche erstellt wurde, dargestellt. Damit wird verdeutlicht, in welchem Zellkompartiment sich die Proteine befinden. Es wurden alle herunterregulierten Proteine der zwei Monate alten

und acht Monate alten Parkin-KO Mäuse in die Analysen eingegeben. Die hochregulierten Proteine konnten nicht signifikant zugeordnet werden.

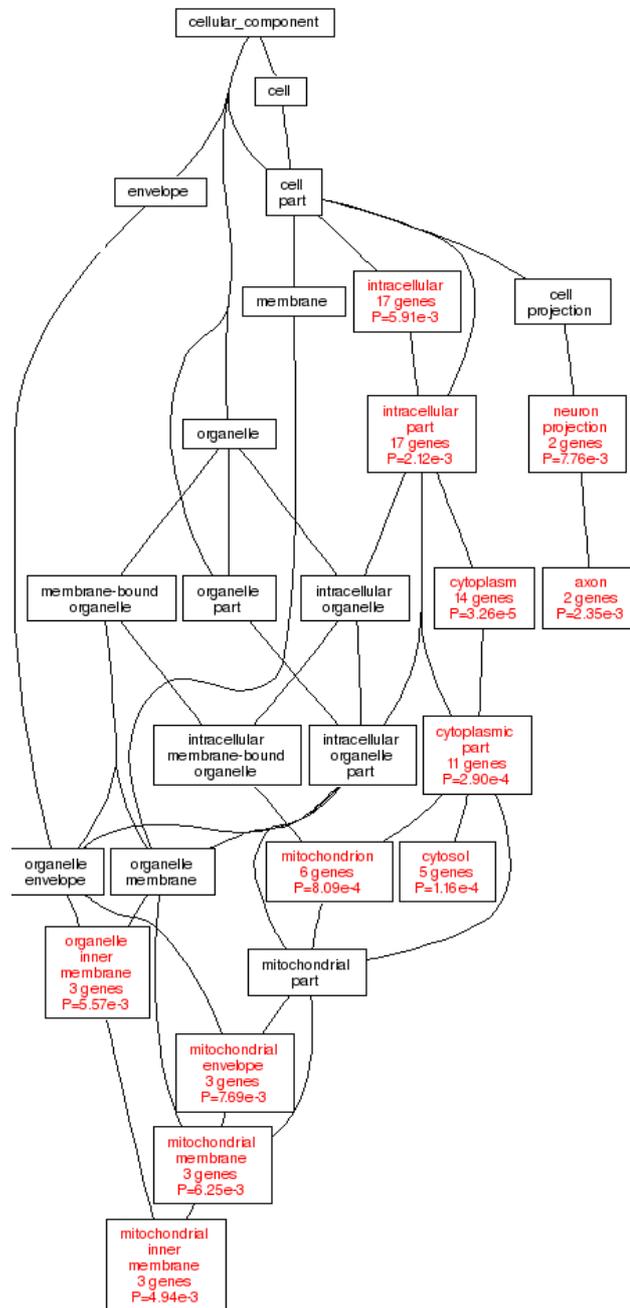


Abbildung 3-10: Darstellung der GOTree- Analysen aus dem Internet der Parkin-KO Mäuse. Verteilung der unterschiedlich exprimierten Proteine in den 2 Monate und 8 Monate alten Parkin-KO Mäusen in die verschiedenen Zellorganellen.

Bei dieser Analyse der unterschiedlich exprimierten Proteine fällt auf, dass die meisten Proteine in den Mitochondrien gefunden werden und somit mit dem Energiestoffwechsel in Verbindung stehen. Bei dem Vergleich der beiden Zeitpunkte ergaben sich keine gemeinsamen Proteine (s. Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Angabe der Anzahl der gleichen varianten Proteine bei dem Vergleich der beiden Zeitstadien.

Vergleich	Anzahl der gleichen Proteine	Genname
Parkin 2 Monate vs. Parkin 8 Monate	0	

3.2 PINK1 *knock-out* Mausmodell

Bei dieser Untersuchung wurden Mäuse mit einem PINK1-*knock-out* mit 129/Sv Hintergrund untersucht. PINK1 ist das Genprodukt des Park6-Gens und ist eine Serin-Threonin-Kinase. Es wurden sechs Maus-Pärchen miteinander verglichen, wobei die Wildtyp 129/Sv Maus als Kontrolle diente. Die Probengewinnung und Aufarbeitung wurde nach Kapitel 2.3 durchgeführt. Zum Anfärben der Proteinspots wurde die DIGE-Technik genutzt und die Auswertung erfolgte ebenfalls, aus Gründen der Vergleichbarkeit, über Delta2D. In dieser Studie wurden drei verschiedene Gehirnregionen untersucht, um die gewebsspezifischen Änderungen festzustellen. Es wurde das Striatum (betroffene Region), das Mittelhirn (angrenzende Region) und der Kortex (pathologisch nicht an PD beteiligt) untersucht.

3.2.1 Gewebe-spezifität bei der Parkinsonschen Erkrankung

In der Tabelle 3-9 sind die Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, die Anzahl der identifizierten Proteinspots und die Anzahl der unterschiedlichen Proteine dargestellt. Es wurde immer der *knock-out* (KO) mit dem Wildtyp (WT) verglichen. In der zweiten Spalte steht in Klammern die Anzahl zu den hoch- bzw. herunterregulierten Spots. Dabei ist zu erkennen, dass im Striatum fast neunmal so viele Proteinspots hochreguliert sind wie im Mittelhirn und 1,5 mal so viele herunterreguliert. Im

Vergleich zum Kortex sind im Striatum 11-mal so viele Proteinspots herunterreguliert und 1,3 fach Proteinspots hochreguliert. Im Allgemeinen ist die Gesamtzahl der varianten Proteinspots im Striatum dreimal so hoch wie im Mittelhirn und doppelt so hoch wie im Kortex.

Bei der Analyse der identifizierten Proteine des Mittelhirns konnten bei drei Proteinen verschiedene Isoformen gefunden werden (Gapdh, Got-2 und Vdac1).

Bei den Kortex Proben wurden ebenfalls drei Proteine (Pgk1, Got1 und Dpysl1) mit jeweils zwei Isoformen gefunden. Die gesamte Identifizierungsliste von allen drei Gehirnregionen (Striatum, Mittelhirn und Kortex) ist in Tabelle S1 dargestellt.

Tabelle 3-9: Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, identifizierten Proteinspots und der unterschiedlichen Proteine der drei Gehirnregionen der PINK1-KO Maus.

Gehirnregion	Anzahl der unterschiedlichen Proteinspots (Vergleich KO zu WT)	Anzahl der identifizierten Proteinspots	Anzahl der unterschiedlichen Proteine
Striatum	173 (95↑, 78↓)	100	20
Mittelhirn	62 (11↑, 51↓)	57	37
Kortex	82 (75↑, 7↓)	70	28

Die identifizierten Proteine wurden einer weiterführenden Analyse über die Datenbanken unterzogen. Die Proteine wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften in die fünf gleichen funktionellen Gruppen wie bei der Parkin-Analyse (Mitochondrium, Phosphoprotein, Energiegewinnung, Zellwachstum bzw. Zellstabilität und Proteinabbau) eingeteilt.

In dem Diagramm 3-11 kann man erkennen, dass im Striatum die meisten Proteine Phosphorylierungsstellen aufweisen. Weiterhin dienen sechs Proteine der Energiegewinnung und fünf weitere Proteine befinden sich in den Mitochondrien. Lediglich ein Protein ist für den Abbau der Proteine zuständig.

Beim Mittelhirn ist zu erkennen, dass die meisten Proteine phosphoryliert werden können. Bei der Einteilung der Proteine nach ihrer Funktion zeigt sich ein Maximum bei der Energiegewinnung. 11 Proteine wurden als mitochondriale Proteine identifiziert. Bei den Kortex-Proben ist zu erkennen, dass die meisten veränderten Proteine Phosphoproteinen sind. Danach findet man eine circa gleiche Verteilung der Proteine die in den Mitochondrien (13 Proteine) liegen und die der Energiegewinnung (11 Proteine) dienen. Die wenigsten Proteine dienen dem Proteinabbau (1 Protein).

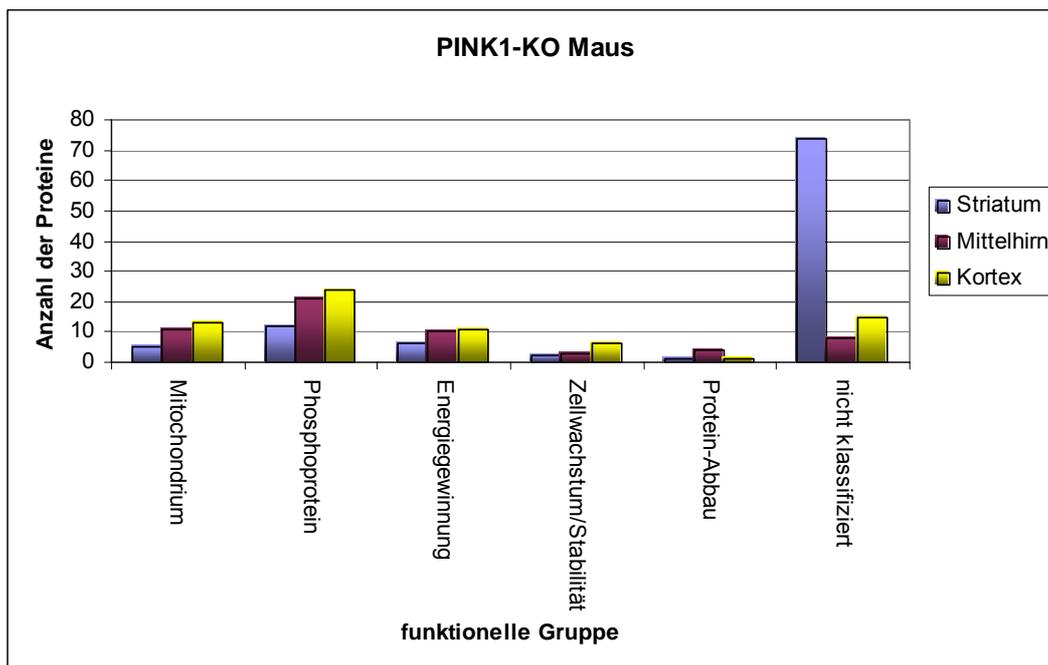


Abbildung 3-11: Dieses Diagramm zeigt die zahlenmäßige Verteilung der identifizierten Proteine vom Striatum (blau), Mittelhirn (rot) und Kortex (gelb) der PINK1-KO Maus, die nach unterschiedlichen Kriterien sortiert wurden sind.

Anschließend wurde eine GoTree Analyse bei allen drei Gehirnregionen durchgeführt. Dabei konnten die hochregulierten Proteine des Striatums in folgende (s. Tabelle 3-10) Stoffwechselwege eingeteilt werden.

Bei dieser Proteineinteilung fällt auf, dass sich die meisten Proteine in den energieliefernden Stoffwechselwegen finden lassen. Daraus lässt sich schließen, dass der Energiehaushalt erhöht ist. Auch von den identifizierten Proteinen des Mittelhirns wurde eine GoTree Analyse durchgeführt. Die Einteilung in die verschiedenen

Stoffwechselwege erfolgte ebenfalls über die Signifikanz. In Tabelle 3-11 sind die Daten der herunterregulierten Proteine dargestellt. Die hochregulierten Proteine konnten keinem eindeutigen Stoffwechselweg zugeordnet werden.

Tabelle 3-10: Einteilung der hochregulierten Proteine des Striatums der PINK1-KO Maus in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Carbon unit transition	3	O=3;E=0.01;R=300;P= <u>1.24e-7</u>
Reductive carboxylate cycle	3	O=3;E=0.005;R=600;P= <u>1.33e-8</u>
Propanoate metabolism	3	O=3;E=0.0132;R=227.2727;P= <u>2.93e-7</u>
Citrate cycle (TCA cycle)	3	O=3;E=0.0119;R=252.1008;P= <u>2.09e-7</u>
Glycolysis / Gluconeogenesis	3	O=3;E=0.0247;R=121.4575;P= <u>1.97e-6</u>

Tabelle 3-11: Einteilung der herunterregulierten Proteine des Mittelhirns in die verschiedenen Stoffwechselwege.

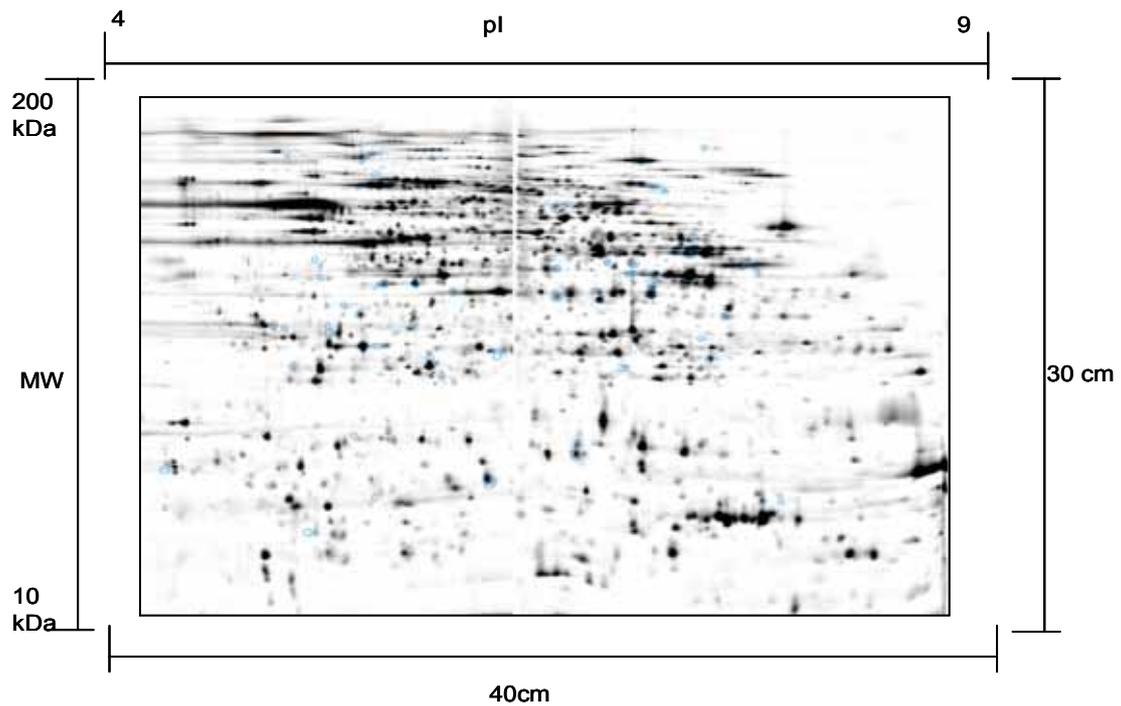
KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Glycolysis / Gluconeogenesis	6	O=6;E=0.0337;R=178.0415;P= <u>1.56e-12</u>
Carbon unit transition	3	O=3;E=0.0137;R=218.9781;P= <u>4.93e-7</u>
Pyruvate metabolism	3	O=3;E=0.0256;R=117.1875;P= <u>2.82e-6</u>

Auch bei diesen Proteinen sieht man, dass die meisten Proteine für Energieprozesse genutzt werden. Da diese Proteine herunterreguliert waren im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, kann man sagen, dass der Energiehaushalt erniedrigt ist.

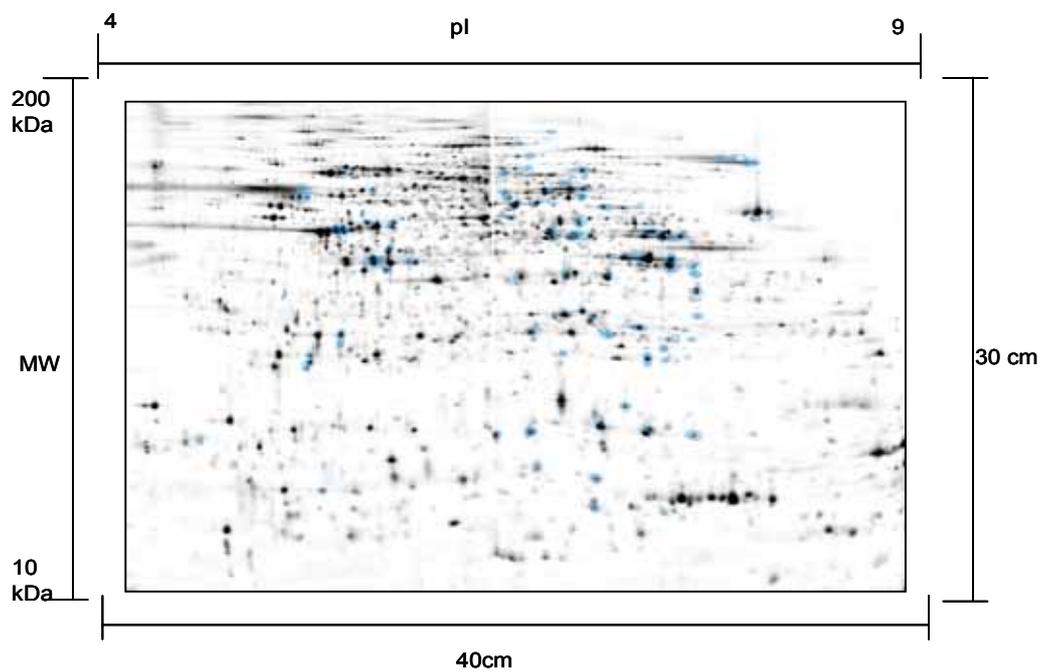
Die identifizierten Proteine des Kortex wurden ebenfalls einer Datenbank-Analyse unterzogen, um eine Einteilung in die Stoffwechselwege vorzunehmen. In der Tabelle 3-12 und 3-13 sind die Daten dargestellt.

Tabelle 3-12: Einteilung der hochregulierten Proteine des Kortex von PINK1-KO Mäusen in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Glycolysis / Gluconeogenesis	7	O=7;E=0.0324;R=216.0494;P= <u>1.95e-15</u>
Carbon unit transition	5	O=5;E=0.0132;R=378.7879;P= <u>1.34e-12</u>



PINK1-KO - Mittelhirn



PINK1-KO - Kortex

Abbildung 3-12: In dieser Abbildung sind die Gelbilder von PINK1-KO Mäusen vom Striatum (unten S.47), Mittelhirn (oben S.48) und Kortex (unten S.48) abgebildet. Die signifikanten Proteinspots sind blau umrandet.

3.2.2 Vergleich der veränderten Proteine der drei Gehirnregionen

Die Abbildung 3-13 zeigt die Anzahl der veränderten Proteinspots in den verschiedenen Gehirnarealen.

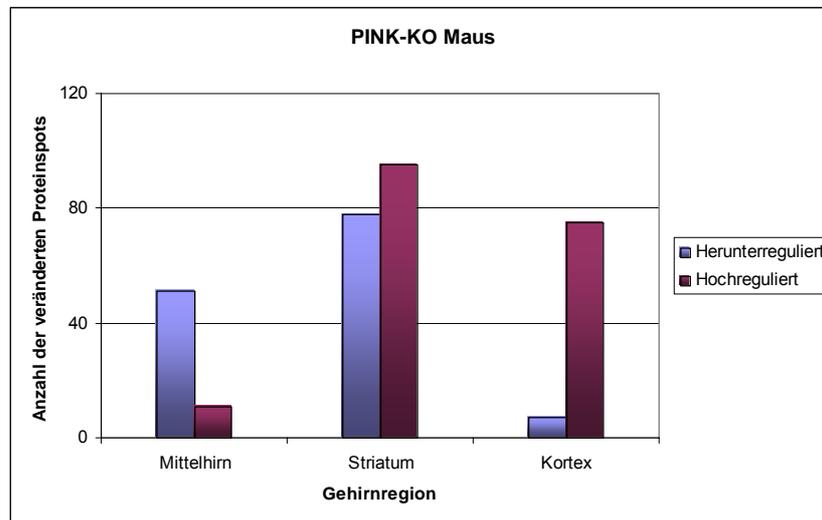


Abbildung 3-13: Dieses Diagramm zeigt die mengenmäßige Verteilung der hoch- und herunterregulierten Proteine in den Proben von PINK1-KO Mäusen des Mittelhirns (links), Striatum (mittig) und Kortex (rechts).

Alle identifizierten Proteine der einzelnen Gehirnregionen wurden miteinander verglichen. Der Überlapp ist in Tabelle 3-14 angegeben. Der meiste Überlapp wurde zwischen Striatum und Kortex gefunden. Zwischen allen drei Gehirnregionen konnte kein gemeinsames Protein gefunden werden.

Tabelle 3-14: Angabe der Anzahl der gleichen varianten Proteine bei dem Vergleich der Gehirnregionen.

Vergleich	Anzahl der gleichen Proteine	Genname
Striatum vs. Mittelhirn	2	Uchl1/ Ckmt1 Actg1/ Gss/ Ldhb/ Taldo1/
Striatum vs. Kortex	5	Tpi1
Mittelhirn vs. Kortex	3	Aldoa/ Gapdh/ Vdac1
Striatum vs. Mittelhirn vs. Kortex	0	

In den Abbildungen 3-14 und 3-15 sind die GOTrees der identifizierten Proteine dargestellt. Dabei wurden alle Proteine der drei Gehirnregionen (Mittelhirn, Striatum und Kortex) sortiert nach herunter- und hochreguliert zusammengefasst und in die Datenbank-Suche eingegeben. Die hochregulierten Proteine lassen sich vermehrt den Mitochondrien und dem Aktin- Filament zuordnen, wo hingegen die herunterregulierten Proteine der drei Gehirnregionen nur den Mitochondrien zuzuordnen sind.

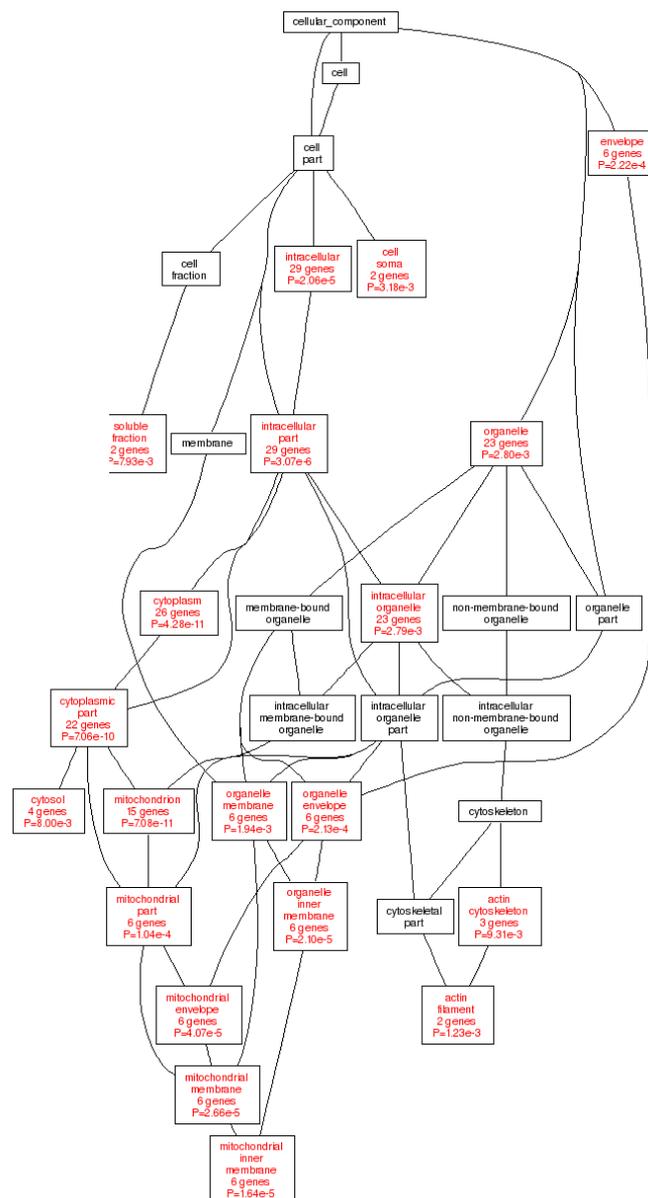


Abbildung 3-14: Darstellung der Einteilung der hoch regulierte Proteine von PINK1-KO Mäusen der drei Gehirnregionen in die Zellkompartimente.

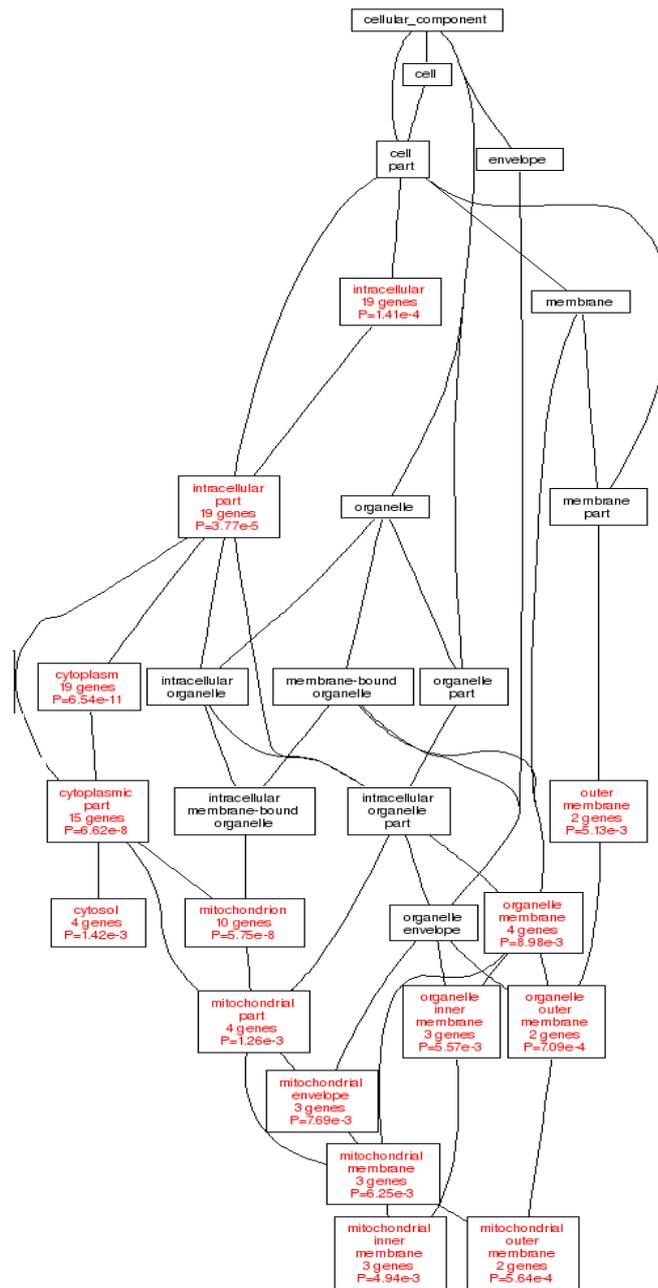


Abbildung 3-15: Graphische Darstellung der Einteilung der herunterregulierten Proteine von PINK1-KO Mäusen der drei Gehirnregionen in die Zellkompartimente.

3.2.3 Untersuchungen der post-translationalen Modifizierungen in allen drei Gehirnregionen

Eine große und wichtige Rolle spielen die post-translationalen Modifikationen (PTM). Zum Beispiel aktivieren oder deaktivieren sie Proteine und beeinflussen dadurch den

Stoffwechsel der Zellen. Diese PTMs können auch in Erkrankungen eine bedeutende Rolle haben und einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Medikamenten haben. In dieser Arbeit wurden verschiedene Färbemethoden zur Entdeckung von veränderten PTMs an das bereits etablierte 2D-Gelsystem angepasst. Die jeweiligen Färbungen wurden in allen drei Gehirnarealen durchgeführt und untereinander verglichen. Die Abbildung 3-16 zeigt die Glyco-Färbung (s. Kapitel 2.5.2.2) der drei Gehirnregionen.

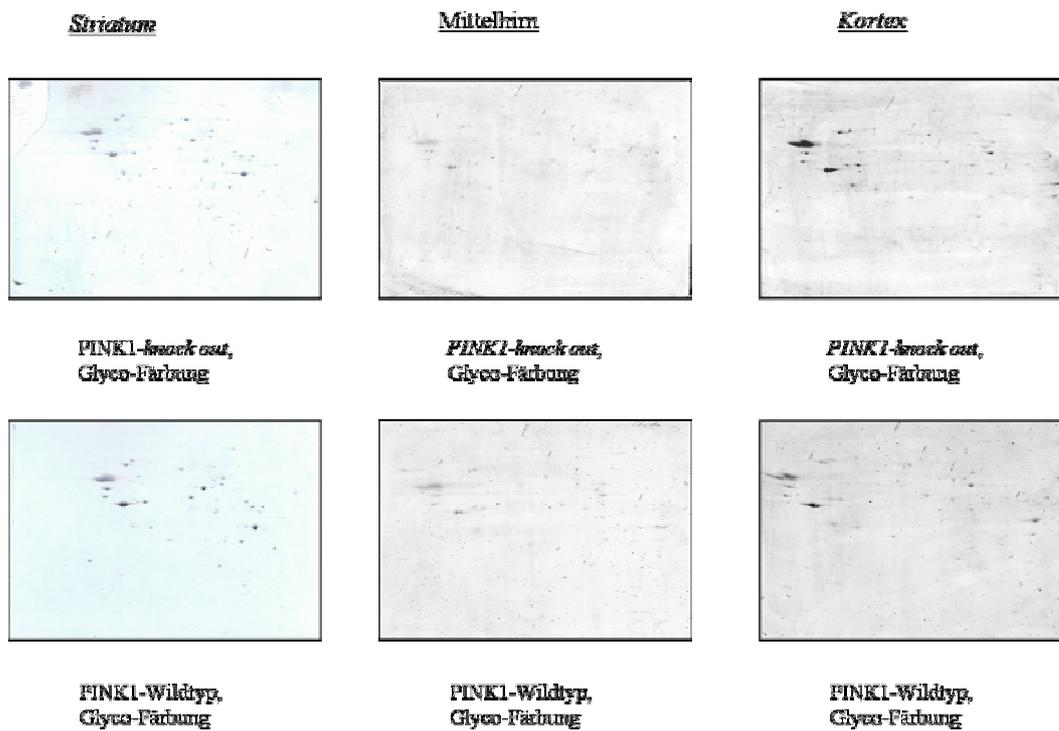


Abbildung 3-16: Diese Gelbilder zeigen die Glyco-Färbung von PINK1 Striatum (links), Mittelhirn (Mitte) und Kortex (rechts). Durch diese Färbemethode werden nur glykosylierten Proteinspots angezeigt.

Als erstes wurde ein Vergleich zwischen Wildtyp und PINK1-KO Maus durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Danach wurden die einzelnen Areale untereinander verglichen. Aber auch bei dieser Analyse wurden keine Differenzen gefunden. Aus diesem Grund lässt sich feststellen, dass es keine Unterschiede bei den glykosylierten Proteinen, die wir im Gel anfärben können, gibt.

Eine wichtige PTM ist die Phosphorylierungen. Sie ist zum Aktivieren oder Deaktivieren von Proteinen in bestimmten Stoffwechselwegen unabdingbar. Da es sich

bei dem PINK1-Protein um eine Serin-Threonin-Kinase handelt, vermutet man, wie bei jeder Kinase, eine Veränderung des Phosphorylierungsprofils. In der Abbildung 3-17 sind die Gelbilder mit der Phospho-Färbung der drei Regionen abgebildet.

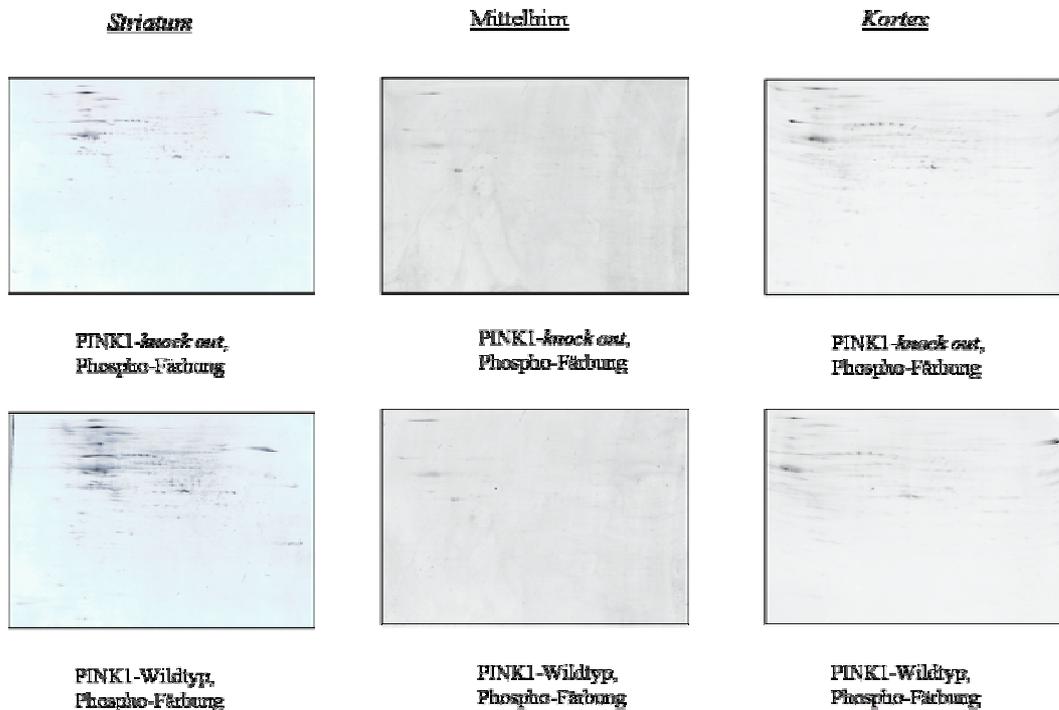


Abbildung 3-17: Diese Gelbilder zeigen die Phospho-Färbung vom PINK1 Striatum (links), Mittelhirn (Mitte) und Kortex (rechts). Mit Hilfe dieser Färbung werden Proteine mit einer post-translationalen Phosphorylierung angefärbt.

Auch hier wurde erst der Vergleich der Wildtyp Mäuse mit den PINK1-KO Mäusen durchgeführt. Danach wurden die Gehirnregionen untereinander verglichen. Bei beiden Analysen konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Die Phosphorylierungen sind temporäre Ereignisse, die sich in Millisekundenbereichen abspielen. Die Abspaltung der Phosphat-Gruppe können wir trotz verschiedener Phosphatase-Hemmer nicht unterdrücken.

Eine weitere Untersuchung war die Oxidation der Proteine. Bei verschiedenen Erkrankungen, wie auch bei der PD, geht man von einem oxidativen Stress aus. Die Mitochondrien sind in ihrer Funktion gestört und bilden sehr viele ROS (reaktive Sauerstoffspezies). Auch in den Analysen, die bereits in der Arbeit beschrieben wurden, konnte eine Störung der Mitochondrien gefunden werden. Aus diesem Grund soll nun

das Oxidationsniveau der Proteine untersucht werden. In der Abbildung 3-18 sind die Oxyblots der drei Gehirnregionen dargestellt.

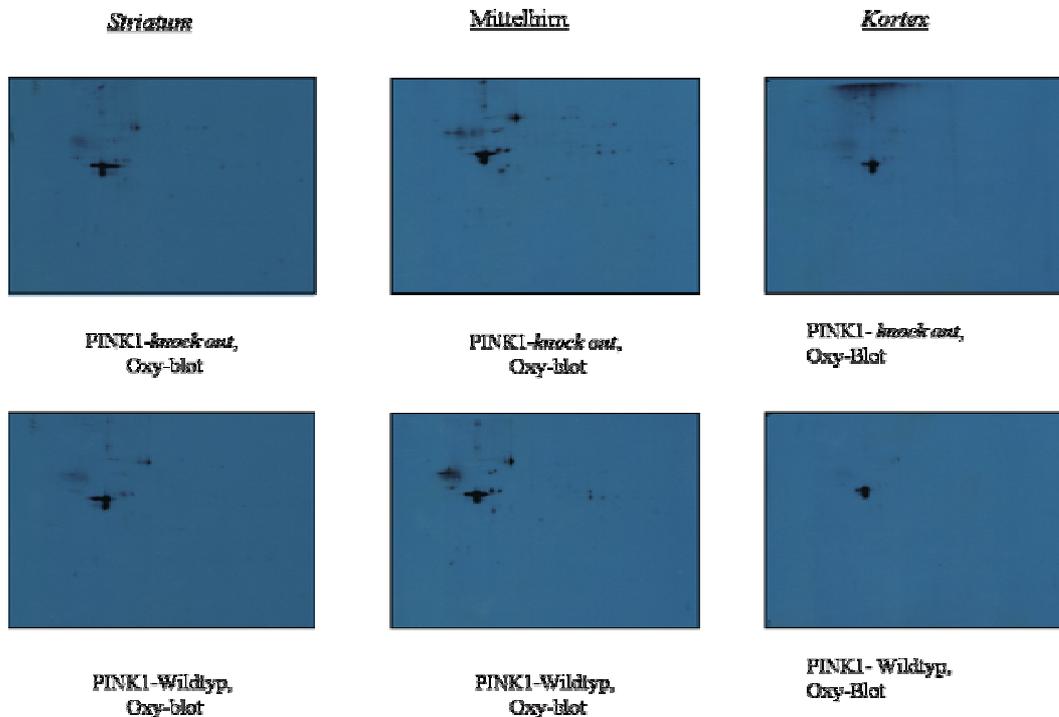


Abbildung 3-18: Diese Abbildung zeigt den Oxyblot von PINK1 Striatum (links), Mittelhirn (mittig) und Kortex (rechts). Dabei werden alle oxidierten Proteine sichtbar.

Bei der Analyse dieser Gelbilder konnte man keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und PINK1-KO Maus finden. Aber im Vergleich der drei Gehirnregionen ist der Kortex auffällig geworden. In diesem Gehirnareal konnten nur zwei Proteinspots im sauren Bereich gefunden werden. Die andern Proteinspots, die in den beiden anderen Bereichen gefunden wurden, konnten nicht nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass im Kortex weitaus weniger oxidativer Stress durch die Mitochondrien verursacht wird, als im Striatum und im Mittelhirn.

3.3 MPTP- Behandlung mit anschließender Analyse nach einem Tag und nach sieben Tagen nach der Behandlung

Für diese Untersuchung wurden jeweils sechs Pärchen der beiden verschiedenen Mäuse (C57BL/6J und C57BL/6J mit überexprimierten L1cam (Zelladhensionsmolekül)) untersucht. Die Mäuse wurden viermal im Abstand von jeweils zwei Stunden mit einer geringen Konzentration an MPTP (15mg pro kg Körpergewicht) behandelt (s. Kapitel 2.2.1). Danach wurden zwei Zeitpunkte für die Analysen mit Hilfe der Literatur [34] bestimmt. Die Zeitpunkte richten sich nach dem Krankheitsverlauf. So diente der erste Tag nach der Behandlung als akute Phase und sieben Tage nach der Behandlung als Erholungsphase. Als Kontrollen dienten jeweils dieselben Mäuse, die mit einer physiologischen Kochsalzlösung behandelt wurden, damit sie dem gleichen Stress der Behandlung ausgesetzt wurden und das Ergebnis nicht verfälscht wird.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie bereits an anderer Stelle (Kapitel 2.3) erwähnt und die Proben wurden mit Hilfe der DIGE- Technik analysiert. Zur Auswertung wurde die Software Delta2D genutzt.

3.3.1 Behandlung von C57BL/6J Mäusen

In der Tabelle 3-15 sind die Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, die Anzahl der identifizierten Proteinspots und die Menge der unterschiedlichen Proteine dargestellt. Es wurde immer der *knock-out* (KO) mit dem Wildtyp (WT) verglichen. In der zweiten Spalte steht in Klammern die Anzahl zu den hoch- bzw. herunterregulierten Spots. Bei dem Vergleich der beiden Zeitpunkte fällt auf, dass sich nach sieben Tagen der Behandlung weniger Unterschiede finden ließen, als nach einem Tag. In den B6 Mäusen lässt sich auch in den Proteinunterschieden eine Erholungsphase nach sieben Tagen nach der Behandlung erkennen. Die Liste mit allen Proteinamen ist in Tabelle S1 zusammengefasst. In der Abbildung 3-19 sind die Proteinunterschiede noch einmal graphisch dargestellt.

Tabelle 3-15: Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, identifizierten Proteinspots und der unterschiedlichen Proteine der beiden Zeitpunkte der mit MPTP behandelten C57BL/6J Mäuse.

Zeitpunkt	Anzahl der unterschiedlichen Proteinspots (Vergleich KO zu WT)	Anzahl der identifizierten Proteinspots	Anzahl der unterschiedlichen Proteine
B6 1d nach Behandlung	153 (66↑, 87↓)	102	36
B6 7d nach Behandlung	99 (45↑, 54↓)	48	30

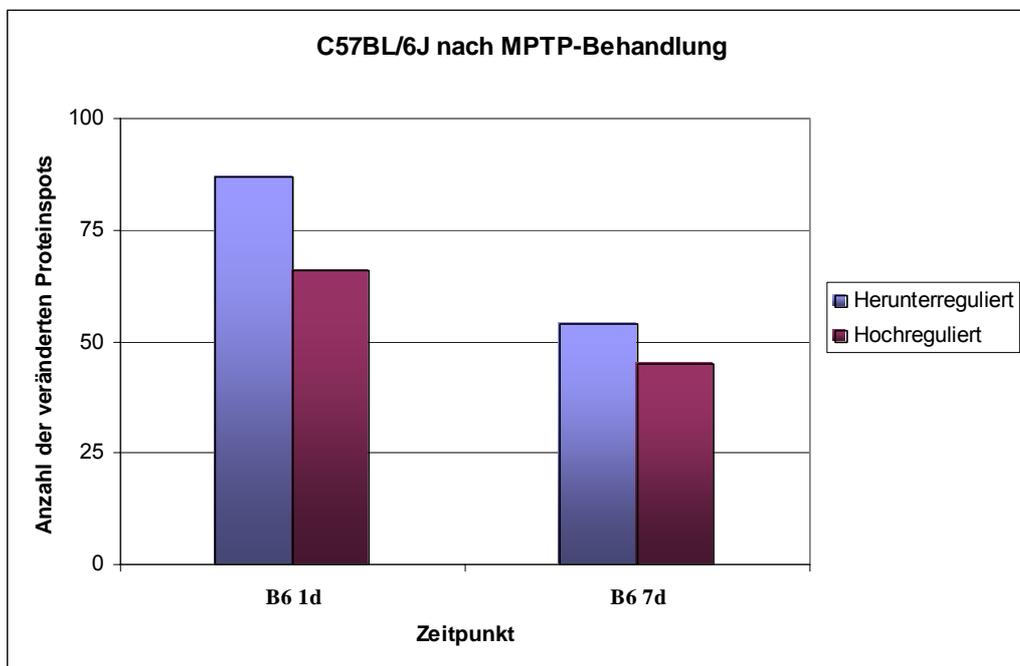


Abbildung 3-19: Dieses Diagramm zeigt die mengenmäßige Verteilung der hoch- und herunterregulierten Proteine in den Proben von C57BL/6J Mäusen einem Tag nach der Behandlung (links) und sieben Tagen nach der Behandlung (rechts).

Die identifizierten Proteine der beiden Zeitpunkte wurden einer Internet-Recherche unterzogen, um eine Einteilung in die Stoffwechselwege vorzunehmen. In den Tabellen 3-16 bis 3-19 sind die Daten der C57BL/6J Mäuse dargestellt.

Bei den Proben einen Tag nach der Behandlung fällt auf, dass mehrere herunterregulierte Proteine (5 Proteine) der oxidative Phosphorylierung angehören und

etwas mehr an hochregulierten Proteinen (7 Proteine) zu den *Gap junctions* gehören. Beim Aktin-Cytoskelett kommt es zu einer Ausbalancierung. Es sind 6 Proteine hochreguliert und 4 Proteine herunterreguliert. 2 Proteine lassen sich der Parkinsonschen Erkrankung zuordnen und sind hochreguliert in den behandelten C57BL/6J Mäusen gefunden wurden.

Tabelle 3-16: Einteilung der hochregulierten Proteine der MPTP-behandelten C57BL/6J Mäuse einen Tag nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Gap junction	7	O=7;E=0.1211;R=57.8035;P=6.58e-11
Regulation of actin cytoskeleton	6	O=6;E=0.2798;R=21.4439;P=4.58e-7
Pentose phosphate pathway	3	O=3;E=0.0346;R=86.7052;P=8.10e-6
Leukocyte transendothelial migration	3	O=3;E=0.1601;R=18.7383;P=6.09e-4
Cell Communication	3	O=3;E=0.1529;R=19.6207;P=5.35e-4
Carbon unit transition	3	O=3;E=0.0317;R=94.6372;P=6.38e-6
Focal adhesion	3	O=3;E=0.2653;R=11.308;P=2.52e-3
Parkinson's disease	2	O=2;E=0.0202;R=99.0099;P=2.42e-4

Tabelle 3-17: Einteilung der herunterregulierten Proteine der MPTP-behandelten C57BL/6J Mäuse einen Tag nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Oxidative phosphorylation	5	O=5;E=0.0846;R=59.1017;P=2.24e-8
Regulation of actin cytoskeleton	4	O=4;E=0.1492;R=26.8097;P=1.49e-5
Focal adhesion	3	O=3;E=0.1415;R=21.2014;P=3.84e-4
Leukocyte transendothelial migration	3	O=3;E=0.0854;R=35.1288;P=8.66e-5

In den Proben sieben Tage nach der MPTP-Behandlung ist die Einteilung der Proteine verändert. Die hochregulierten Proteine lassen sich nicht mehr in einen Hauptstoffwechselweg einteilen, sie dienen der Synthese verschiedener Aminosäuren, und dem Pyruvat Metabolismus.

Die herunterregulierten Proteine werden auch der Glykolyse zugeschrieben und die oxidative Phosphorylierung ist im Gegensatz zu den Proben einen Tag nach der Behandlung, herunterreguliert.

Tabelle 3-18: Einteilung der hochregulierten Proteine der MPTP-behandelten C57BL/6J Mäuse sieben Tage nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Alanine and aspartate metabolism	3	O=3;E=0.0144;R=208.3333;P=5.13e-7
Pyruvate metabolism	3	O=3;E=0.0197;R=152.2843;P=1.24e-6

Tabelle 3-19: Einteilung der herunterregulierten Proteine der MPTP-behandelten C57BL/6J Mäuse sieben Tage nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Glycolysis / Gluconeogenesis	3	O=3;E=0.0286;R=104.8951;P=3.13e-6
Carbon unit transition	2	O=2;E=0.0116;R=172.4138;P=6.13e-5
Oxidative phosphorylation	2	O=2;E=0.0582;R=34.3643;P=1.55e-3

Die identifizierten Proteine wurden ebenfalls einer Kegg-Analyse mit Hilfe des Internets unterzogen. Die Abbildungen 3-20 und 3-21 zeigen die Verteilung der Proteine in die Zellkompartimente der C57BL/6J Mäuse. In die Analyse wurden die Proteine der beiden Zeitpunkt getrennt nach hoch- und runterregulierten Proteinen eingegeben.

Auch bei dieser Analyse zeigt sich, dass die meisten Proteine in den Mitochondrien verankert sind. Die hochregulierten Proteine befinden sich auch in dem Tubulin-Komplex.

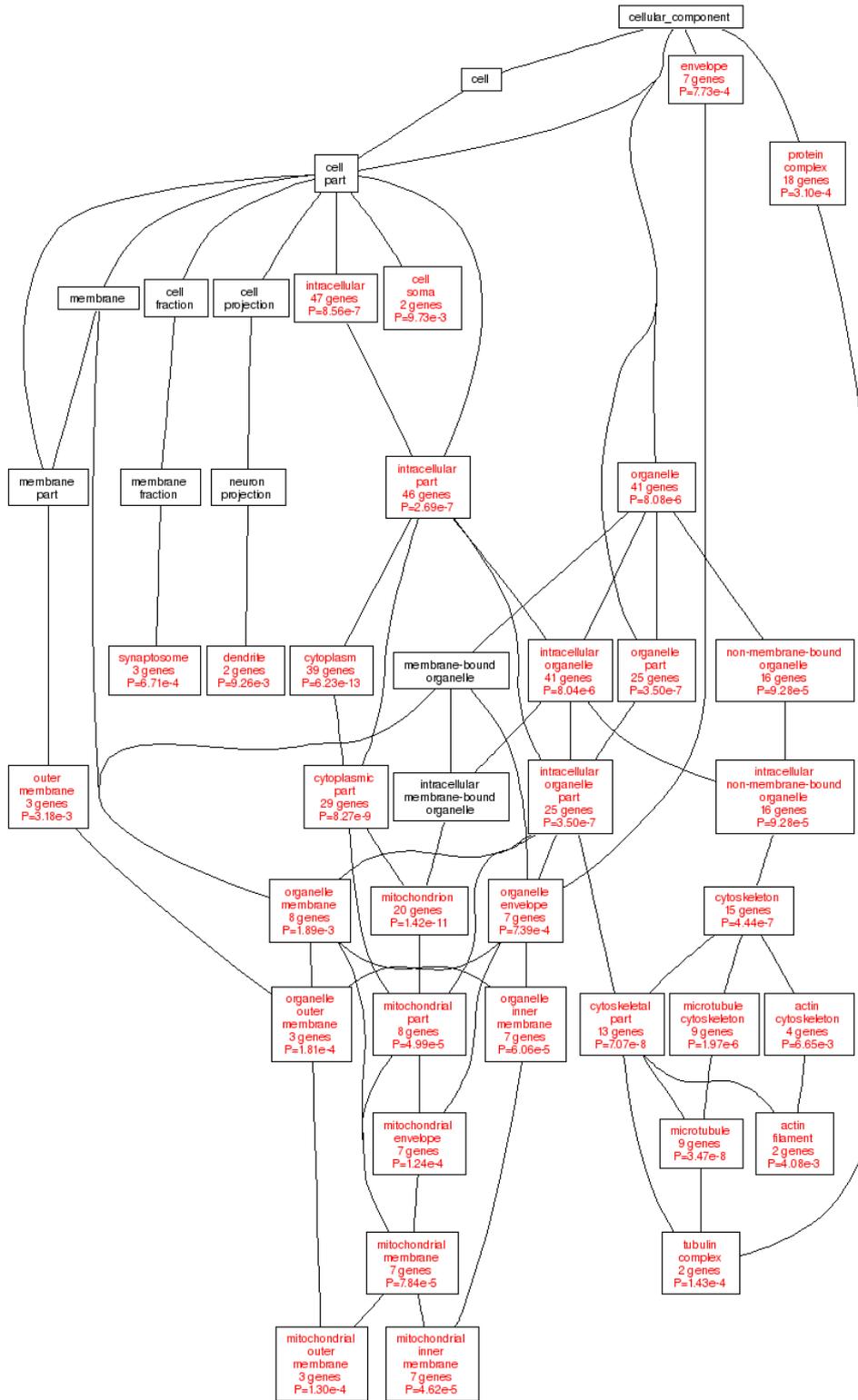


Abbildung 3-20: Darstellung der Einteilung der hochregulierten Proteine von MPTP-behandelten C57BL/6J Mäusen der beiden Zeitpunkte in die Zellkompartimente.

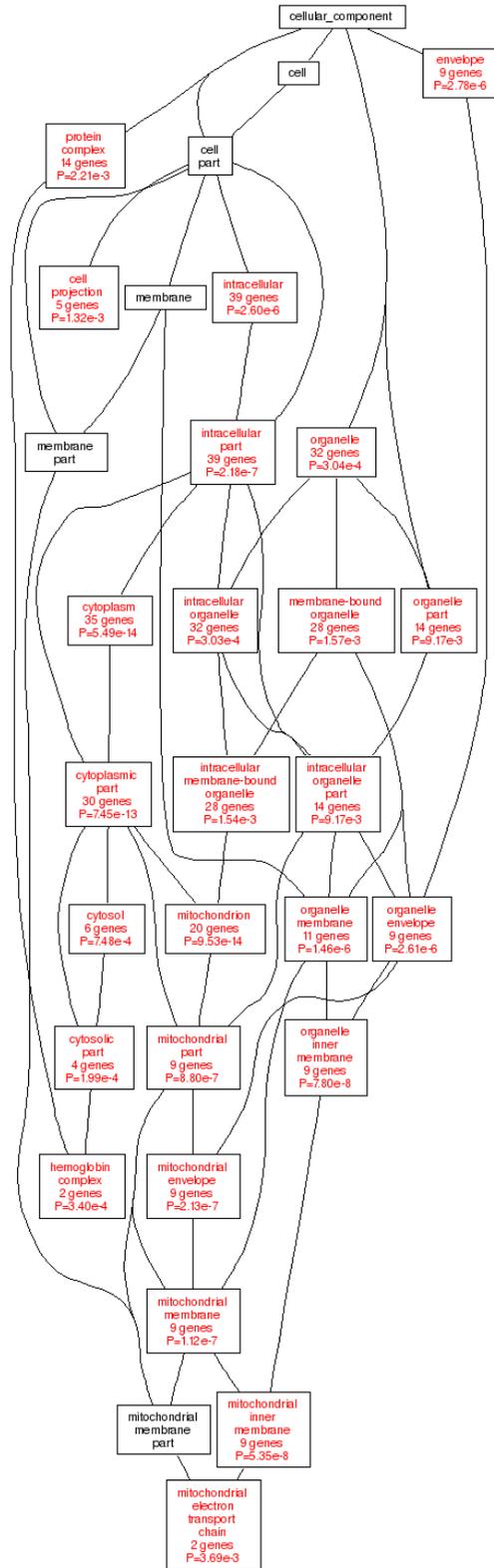


Abbildung 3-21: Darstellung der Einteilung der runterregulierte Proteine von MPTP-behandelten C57BL/6J Mäusen der beiden Zeitpunkte in die Zellkompartimente.

3.3.2 Behandlung von L1cam Mäusen

Bei diesen Mäusen handelt es sich um C57BL/6J Mäuse, bei denen das L1-Zelladhensionsmolekül überexprimiert wurde. Die transgenen Mäuse wurden ebenfalls mit MPTP behandelt und die Reaktion nach einem Tag nach der Behandlung und nach sieben Tagen nach der Behandlung angeschaut. Die Aufarbeitung der Proben und die Auswertung mit der Software Delta2D wurden bereits an anderer Stelle beschrieben (M. Diedrich *et al.* 2008).

In der Tabelle 3-20 sind die Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, die Anzahl der identifizierten Proteinspots und die Menge der unterschiedlichen Proteine dargestellt. Es wurde immer der *knock-out* (KO) mit dem Wildtyp (WT) verglichen. In der zweiten Spalte steht in Klammern die Anzahl zu den hoch- bzw. herunterregulierten Spots. Bei dem Vergleich der beiden Zeitpunkte fällt auf, dass sich nach sieben Tagen der Behandlung viel mehr Unterschiede finden lassen, als nach einem Tag. In den transgenen Mäusen lässt sich in Hinblick auf die Anzahl der Proteinunterschieden keine Erholungsphase nach sieben Tagen nach der Behandlung erkennen. Die Liste mit allen Proteinnamen ist in Tabelle S1 zusammengefasst. In der Abbildung 3-22 sind die Proteinunterschiede noch einmal graphisch dargestellt.

Tabelle 3-20: Angaben über die Anzahl der veränderten Proteinspots, identifizierten Proteinspots und der unterschiedlichen Proteine der beiden Zeitpunkte der mit MPTP behandelten L1cam überexprimierenden C57BL/6J Mäuse.

Zeitpunkt	Anzahl der unterschiedlichen Proteinspots (Vergleich KO zu WT)	Anzahl der identifizierten Proteinspots	Anzahl der unterschiedlichen Proteine
L1cam 1d nach			
Behandlung	443 (127↑, 316↓)	114	46
L1cam 7d nach			
Behandlung	665 (277↑, 388↓)	195	72

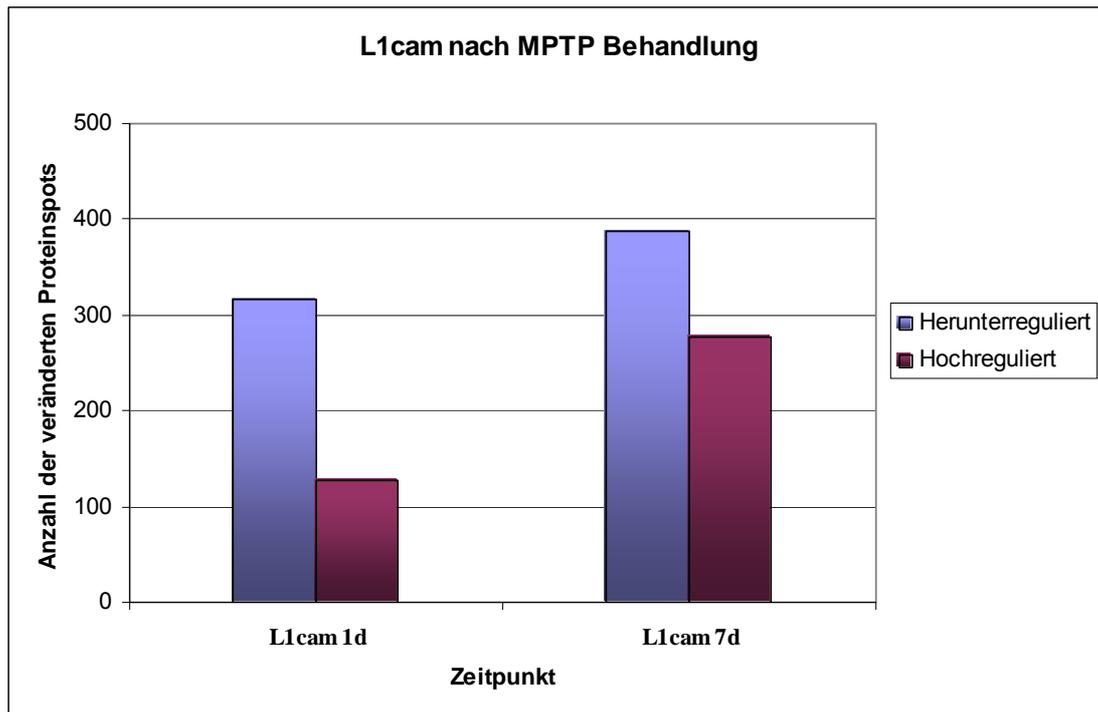


Abbildung 3-22: Dieses Diagramm zeigt die mengenmäßige Verteilung der hoch- und herunterregulierten Proteine in den Proben von L1cam überexprimierenden C57BL/6J Mäusen nach einem Tag nach der Behandlung (links) und sieben Tagen nach der Behandlung (rechts).

Die identifizierten Proteine der beiden Zeitpunkte der transgenen Maus wurden einer Internet-Recherche unterzogen, um eine Einteilung in die Stoffwechselwege vorzunehmen. In den Tabellen 3-21 bis 3-24 sind die Daten der L1cam überexprimierenden C57BL/6J Mäuse dargestellt.

Tabelle 3-21: Einteilung der hochregulierten Proteine der MPTP-behandelten transgenen C57BL/6J Mäuse einen Tag nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Glycolysis / Gluconeogenesis	3	O=3;E=0.026;R=115.3846;P=2.32e-6
Citrate cycle (TCA cycle)	3	O=3;E=0.0125;R=240;P=2.45e-7
Pentose phosphate pathway	2	O=2;E=0.0115;R=173.913;P=6.02e-5
Oxidative phosphorylation	2	O=2;E=0.0529;R=37.8072;P=1.28e-3

Tabelle 3-22: Einteilung der herunterregulierten Proteine der MPTP-behandelten transgenen C57BL/6J Mäuse einen Tag nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Oxidative phosphorylation	7	O=7;E=0.0925;R=75.6757;P=7.26e-12
Prion disease	3	O=3;E=0.0093;R=322.5806;P=1.97e-7
Neurodegenerative Disorders	2	O=2;E=0.0269;R=74.3494;P=3.79e-4

In den Proben einen Tag nach der MPTP- Behandlung der transgenen Mäuse ist die Glykolyse und der Zitronensäurezyklus hochreguliert und die oxidative Phosphorylierung herunterreguliert. 2 Proteine konnten den neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben werden und sind in den Proben der transgenen Maus herunterreguliert.

Tabelle 3-23: Einteilung der hochregulierten Proteine der MPTP-behandelten transgenen C57BL/6J Mäuse sieben Tage nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Glycolysis / Gluconeogenesis	11	O=11;E=0.1415;R=77.7385;P=2.07e-18
Citrate cycle (TCA cycle)	11	O=11;E=0.0681;R=161.5272;P=1.77e-22
Arginine and proline metabolism	8	O=8;E=0.1362;R=58.7372;P=1.17e-12
Carbon unit transition	7	O=7;E=0.0576;R=121.5278;P=1.15e-13
Butanoate metabolism	7	O=7;E=0.1153;R=60.7112;P=2.46e-11
Pyruvate metabolism	6	O=6;E=0.1074;R=55.8659;P=1.17e-9
Alanine and aspartate metabolism	6	O=6;E=0.0786;R=76.3359;P=1.59e-10
Oxidative phosphorylation	5	O=5;E=0.2882;R=17.3491;P=1.11e-5
Glutamate metabolism	5	O=5;E=0.0812;R=61.5764;P=1.81e-8
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5	O=5;E=0.0367;R=136.2398;P=2.21e-10
Valine, leucine and isoleucine degradation	4	O=4;E=0.1153;R=34.6921;P=5.58e-6
Insulin signaling pathway	4	O=4;E=0.3458;R=11.5674;P=4.16e-4

Regulation of actin cytoskeleton	4	O=4;E=0.5082;R=7.8709;P=1.74e-3
Reductive carboxylate cycle (CO ₂ fixation)	4	O=4;E=0.0288;R=138.8889;P=1.45e-8
Urea cycle and metabolism of amino groups	4	O=4;E=0.0629;R=63.593;P=4.55e-7
Pentose phosphate pathway	4	O=4;E=0.0629;R=63.593;P=4.55e-7
Tryptophan metabolism	4	O=4;E=0.1808;R=22.1239;P=3.38e-5
Lysine degradation	4	O=4;E=0.1205;R=33.195;P=6.68e-6
Propanoate metabolism	4	O=4;E=0.076;R=52.6316;P=1.01e-6
Fatty acid metabolism	3	O=3;E=0.0996;R=30.1205;P=1.38e-4
Fructose and mannose metabolism	3	O=3;E=0.1258;R=23.8474;P=2.78e-4
Leukocyte transendothelial migration	3	O=3;E=0.2908;R=10.3164;P=3.16e-3
Tight junction	3	O=3;E=0.2908;R=10.3164;P=3.16e-3
Adherens junction	3	O=3;E=0.1912;R=15.6904;P=9.52e-4
Cell Communication	3	O=3;E=0.2777;R=10.803;P=2.77e-3
beta-Alanine metabolism	3	O=3;E=0.0576;R=52.0833;P=2.60e-5
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	3	O=3;E=0.0262;R=114.5038;P=2.07e-6
Phenylalanine metabolism	3	O=3;E=0.0707;R=42.4328;P=4.89e-5
Cysteine metabolism	3	O=3;E=0.0524;R=57.2519;P=1.93e-5
Neurodegenerative Disorders	2	O=2;E=0.0838;R=23.8663;P=3.20e-3

Tabelle 3-24: Einteilung der herunterregulierten Proteine der MPTP-behandelten transgenen C57BL/6J Mäuse sieben Tage nach der Behandlung in die verschiedenen Stoffwechselwege.

KEGG pathway	Protein-Anzahl	p-Wert
Oxidative phosphorylation	9	O=9;E=0.2485;R=36.2173;P=8.01e-12
Regulation of actin cytoskeleton	5	O=5;E=0.4383;R=11.4077;P=9.16e-5
Neurodegenerative Disorders	4	O=4;E=0.0723;R=55.325;P=1.35e-6

Focal adhesion	4	O=4;E=0.4157;R=9.6223;P=8.89e-4
Proteasome	4	O=4;E=0.0655;R=61.0687;P=9.42e-7
Citrate cycle (TCA cycle)	2	O=2;E=0.0587;R=34.0716;P=1.83e-3
Glycolysis / Gluconeogenesis	2	O=2;E=0.122;R=16.3934;P=7.15e-3
Prion disease	2	O=2;E=0.0249;R=80.3213;P=3.86e-4

Bei den Proben sieben Tage nach der Behandlung der transgenen Mäuse bleibt die Einteilung fast gleich, es steigt nur die Anzahl der Proteine. So findet man bei den hochregulierten Proteinen nun jeweils 11 Proteine, die in der Glykolyse und im Zitronensäurezyklus eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu den MPTP-behandelten C57BL/6J Mäusen findet man 2 Proteine der neurodegenerativen Erkrankungen bei den hochregulierten Proteinen. Bei den herunterregulierten Proteinen sind 9 Proteine der oxidativen Phosphorylierung zuzuschreiben und 5 Proteine dienen dem Aktin-Cytoskelett. Vier Proteine wurden in die Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen eingeteilt.

Mit den identifizierten Proteinen wurde eine Kegg-Datenbankanalyse durchgeführt und die Proteine in die Zellkompartimente eingeteilt. In den Abbildungen 3-23 und 3-24 sind die Ergebnisse dargestellt.

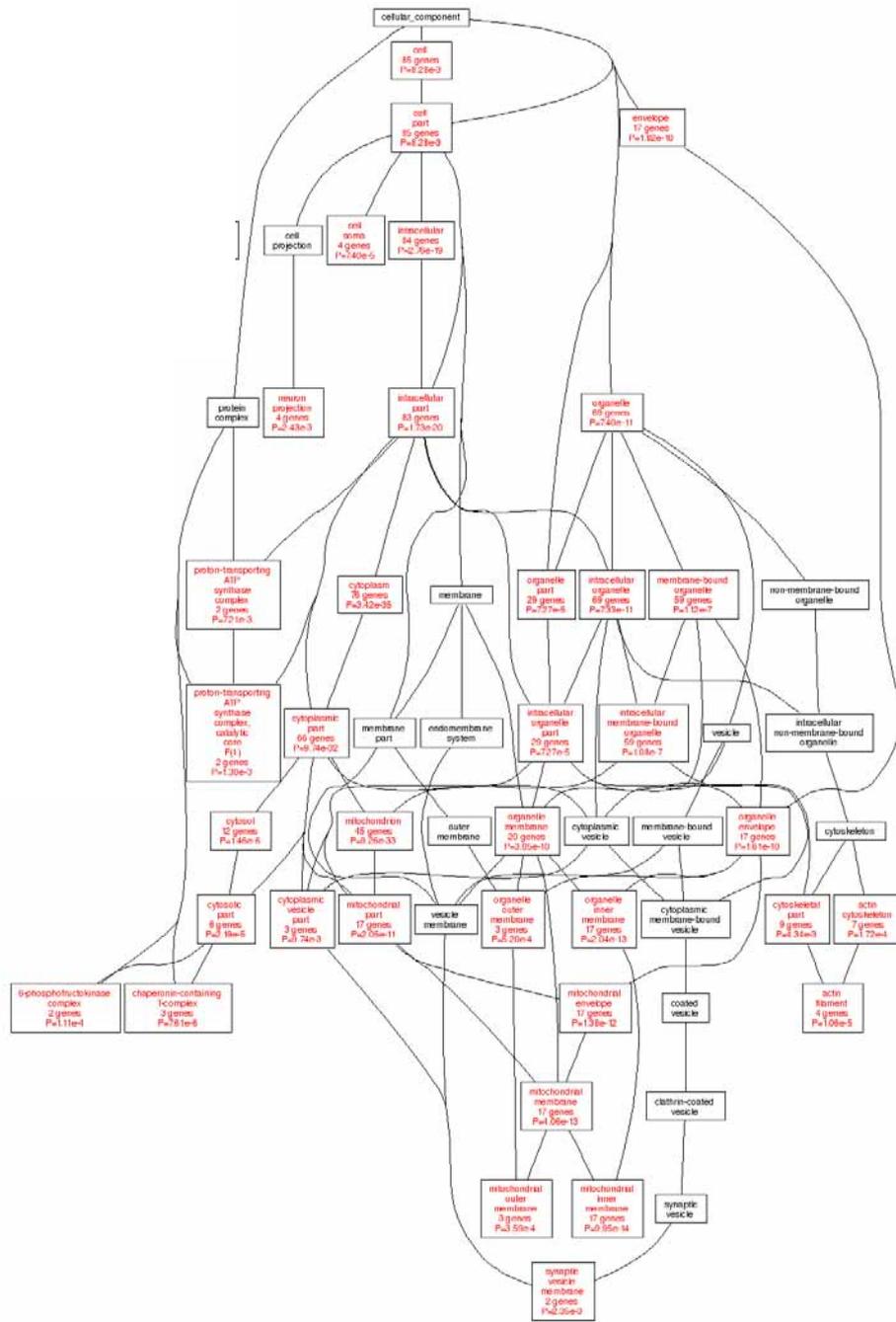


Abbildung 3-23: Darstellung der Einteilung der hochregulierten Proteine von MPTP-behandelten transgenen C57BL/6J Mäusen der beiden Zeitpunkte in die Zellkompartimente.

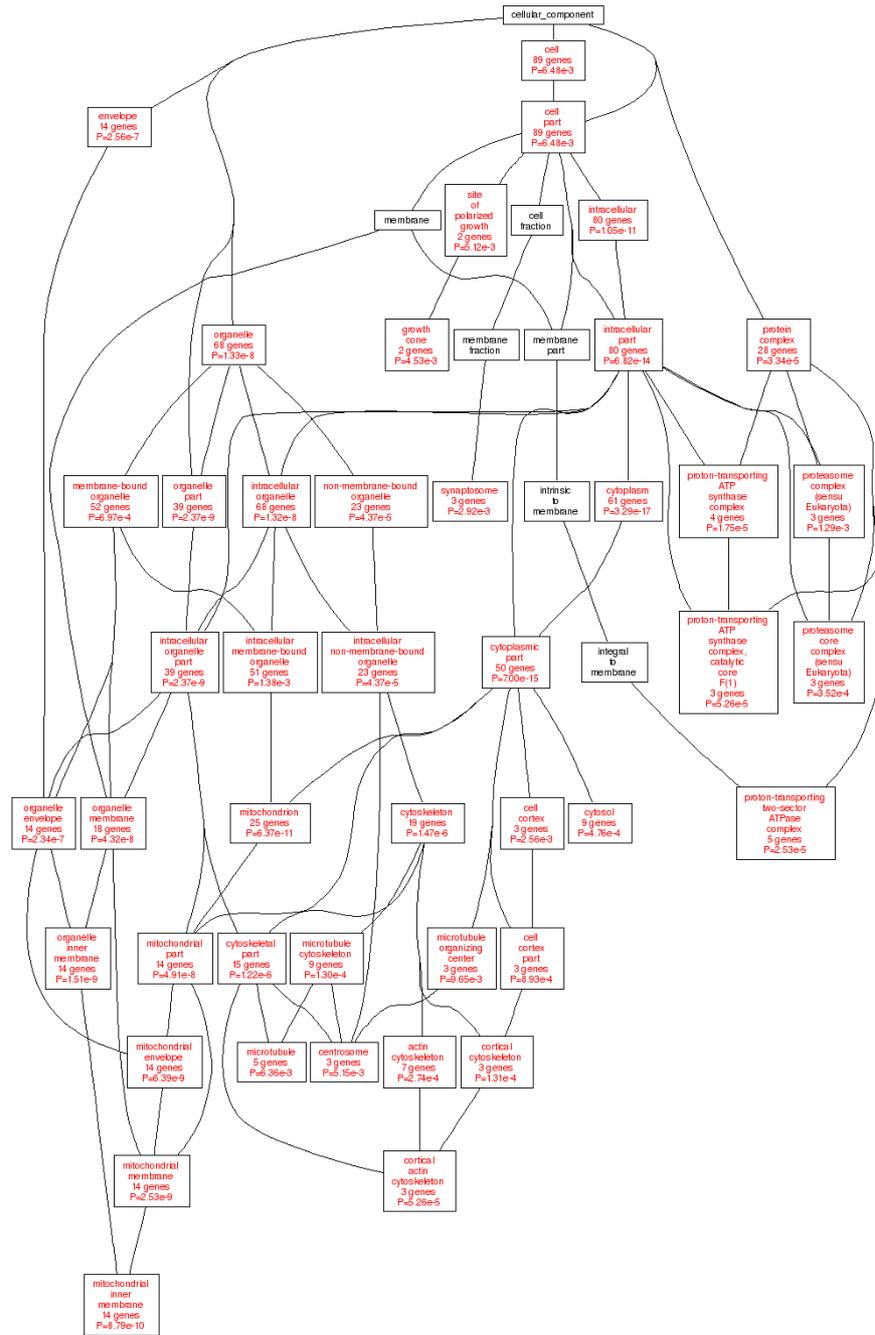


Abbildung 3-24: Darstellung der Einteilung der runterregulierten Proteine von MPTP-behandelten transgenen C57BL/6J Mäusen der beiden Zeitpunkte in die Zellkompartimente.

Die Einteilung der Proteine in die Zellkompartimente ist bei den transgenen Mäusen nicht ganz so einfach. Aber die meisten Proteine lassen sich auch hier in den Mitochondrien finden. Des Weiteren sind einige Proteine auch für das Aktin-Cytoskelett zuständig.

Alle identifizierten Proteine der verschiedenen Zeitpunkte und verschiedenen Mäuse wurden einer Datenbank-Analyse unterzogen und wieder in die fünf funktionellen Gruppen eingeteilt. Die Abbildung 3-25 zeigt die beiden Diagramme von den C57BL/6J Mäusen (oben) und den L1cam überexprimierenden C57BL/6J Mäusen (unten).

In diesen beiden Diagrammen kann man das ähnliche Phänomen beobachten, wie bei den anderen Mausmodellen zuvor. Die größte Gruppe der Proteine kann phosphoryliert werden, liegt in den Mitochondrien und dient außerdem dem Energiestoffwechsel. In den C57BL/6J Mäusen nimmt die Anzahl der Proteine jedoch in allen fünf Gruppen nach sieben Tagen der Behandlung ab, hingegen stieg bei den transgenen Mäusen die Anzahl überall an.

3.3.3 Vergleich der beiden MPTP behandelten Mauslinien

In den Abbildungen 3-26 und 3-27 sind alle vier Proteinmuster der unterschiedlichen Behandlungszeitpunkte und der verschiedenen Mauslinien mit den signifikanten Proteinspots (blau umrandet) dargestellt. Dabei kann man entnehmen, dass bei den L1cam überexprimierenden Mäusen weitaus mehr Proteinspots als unterschiedlich reguliert gefunden wurden, als in den C57BL/6J-Mäusen, die als Wildtyp-Stamm bekannt sind.

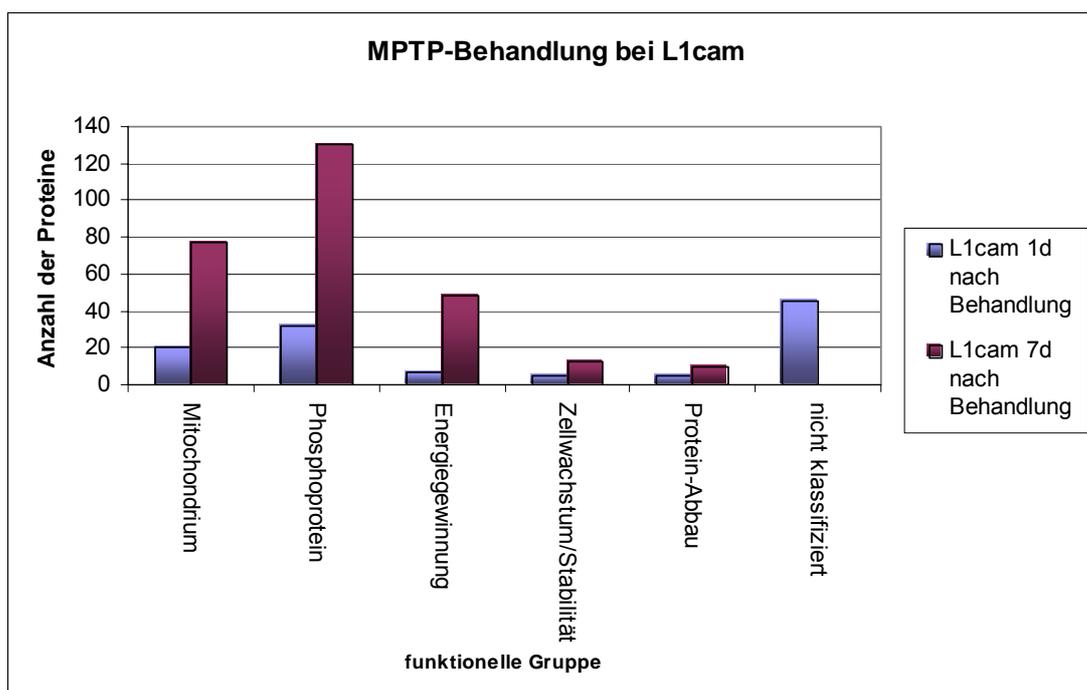
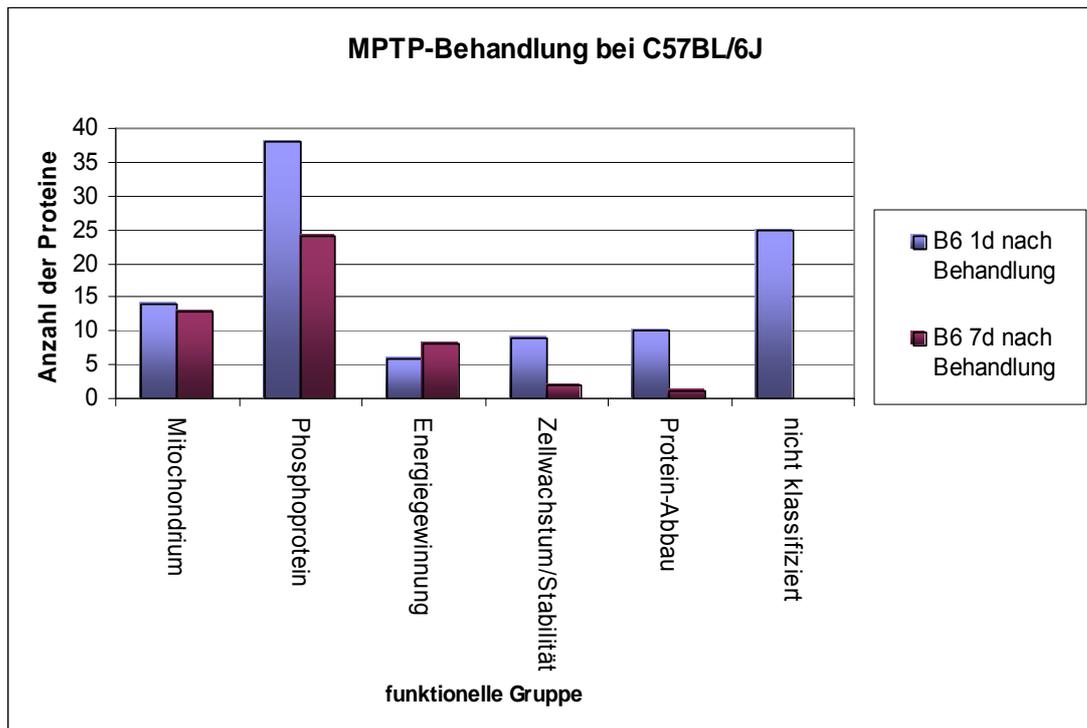


Abbildung 3-25: Dieses Diagramm zeigt die zahlenmäßige Verteilung der identifizierten Proteine in die funktionellen Gruppen von MPTP-behandelten Mäuse. Im oberen Diagramm sind die Ergebnisse der C57BL/6J und im unteren sind die Ergebnisse der transgenen Mäuse dargestellt.

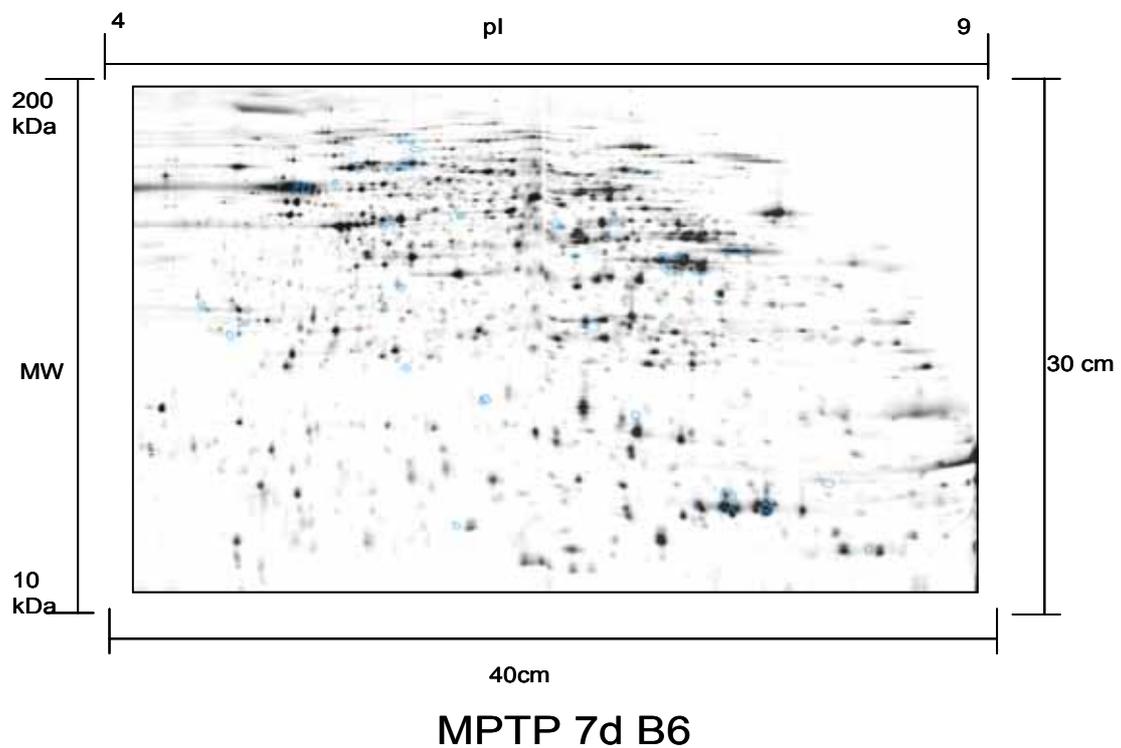
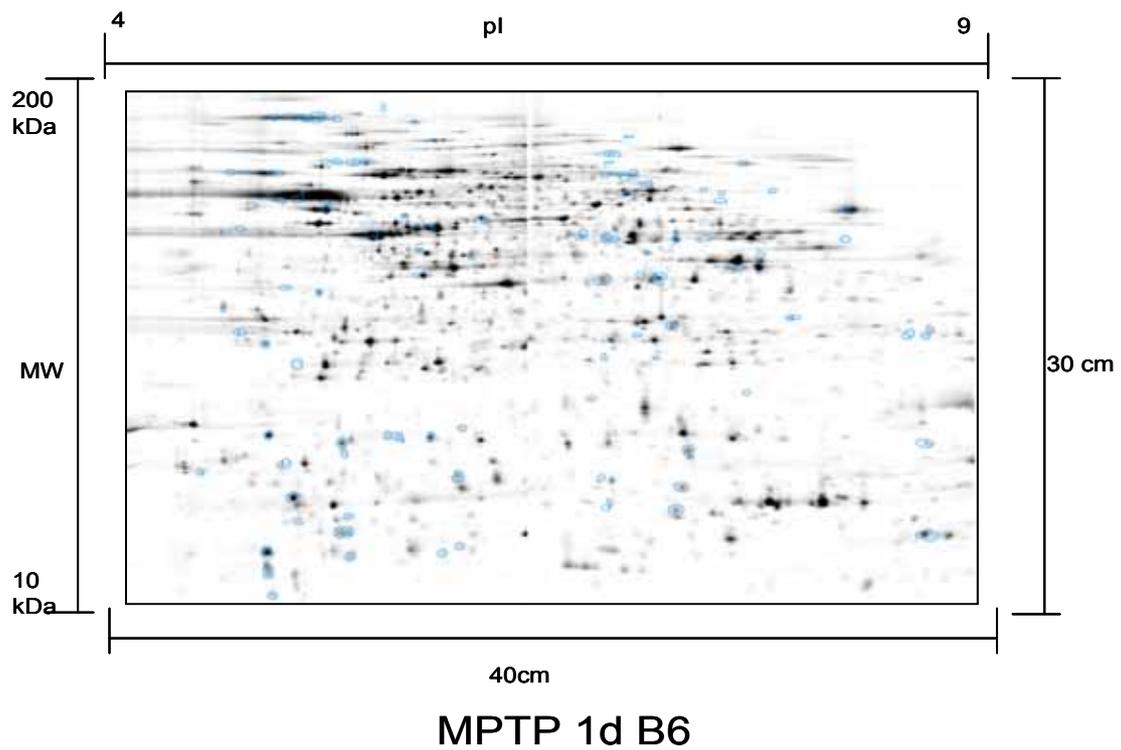


Abbildung 3-26: In dieser Abbildung sind die Gelbilder von MPTP behandelten Mittelhirn-Proben der C57BL/6J Mäuse dargestellt. Oben ist das Muster der Proben einen Tag nach der Behandlung und unten ist das Muster sieben Tage nach der Behandlung abgebildet. Die signifikanten Spots sind blau umrandet.

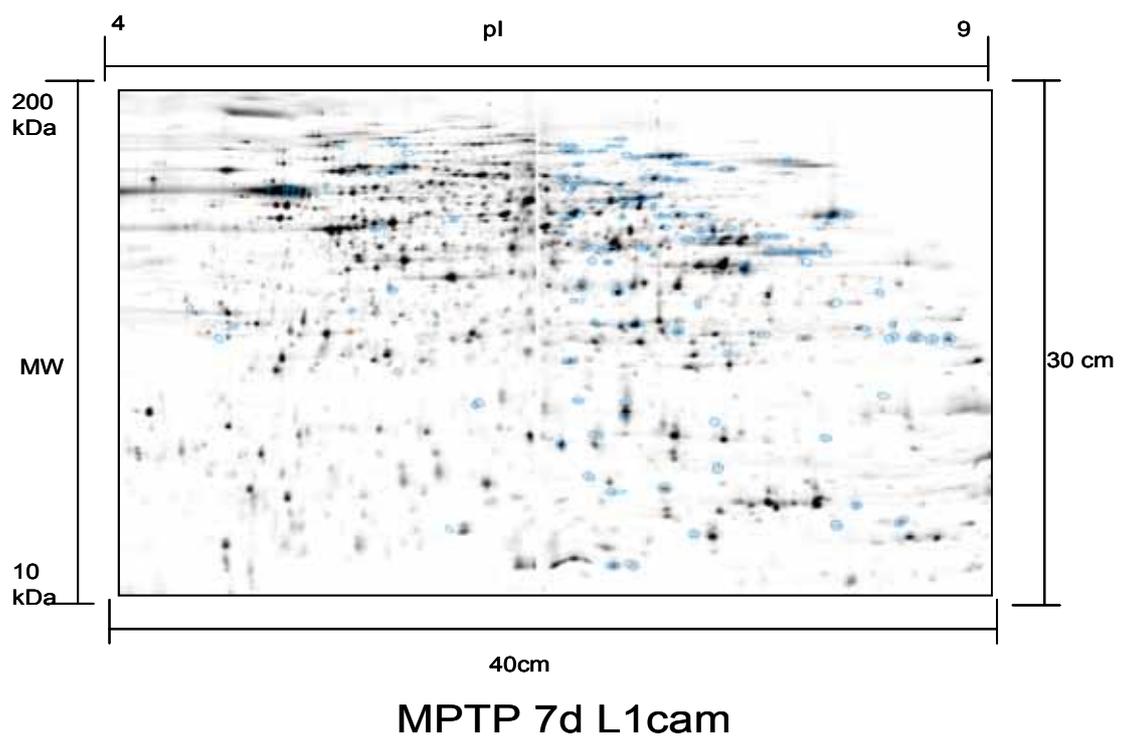
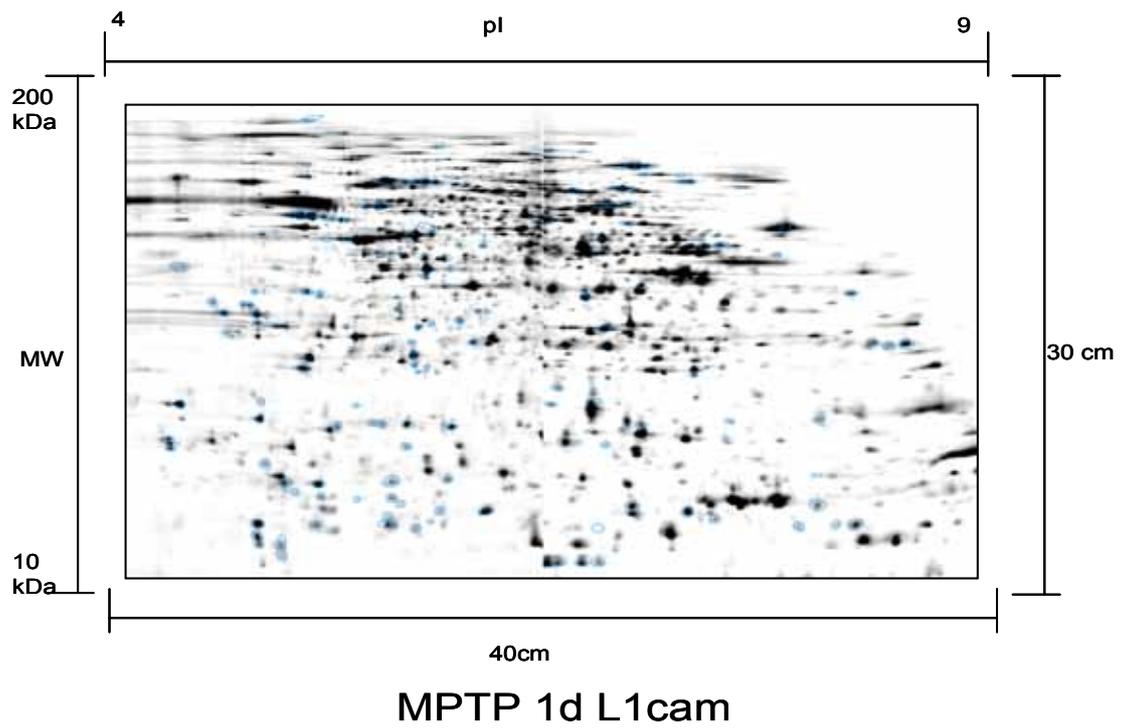


Abbildung 3-27: In dieser Abbildung sind die Gelbilder von MPTP behandelten Mittelhirn-Proben der L1cam überexprimierenden C57BL/6J Mäuse dargestellt. Oben ist das Muster der Proben einen Tag nach der Behandlung und unten ist das Muster sieben Tage nach der Behandlung abgebildet. Die signifikanten Spots sind blau umrandet.

Alle identifizierten Proteine der einzelnen Zeitpunkte und Mausstämme wurden miteinander verglichen. Der meiste Überlapp wurde gefunden, wenn man die beiden Zeitstadien zusammengenommen hat und nur die beiden Mausmodell verglichen hat. Wenn man aber alle vier Gruppen (B16 einen Tag und sieben Tage, L1cam einen Tag und sieben Tage) gegeneinander vergleicht, findet man nur eine Übereinstimmung. Dabei handelt es sich um den *Voltage-dependent anion channel 1* (Vdac1). Die Gruppen und die Anzahl der übereinstimmenden Proteine mit ihren Gennamen sind der Tabelle 3-25 zu entnehmen.

Tabelle 3-25: Angabe der Anzahl der gleichen varianten Proteine bei dem Vergleich der MPTP behandelten Mauslinien.

Vergleich	Anzahl der gleichen Proteine	Gennamen
B6 1d vs. B6 7d	5	Ckb/ Got1/ Mdh2/ Tuba1c/ Vdac1
B6 1d vs. L1cam 1d	10	Arpc51/ Atp5b/ Eef1a1/ Hadha/ Ndufa5/ Snca/ Stxbp1/ Tkt/ Tppp/ Vdac1
B6 1d vs. L1cam 7d	31	Actb/ Aldoa/ Aldoc/ Arpc51/ Atp5b/ Ckb/ Cplx1/ Cplx2/ Eef1a1/ Got1/ Hadha/ Hspa4/ Hspa41/ Idh3b/ Mdh2/ Ndrgl/ Nfl/ Oxct1/ P4hb/ Pdxk/ Pfn1/ Sh3gl1/ Snca/ Snrpf/ Stmn1/ Stxbp1/ Tkt/ Tppp/ Tubb5/ Vdac1/ Vdac2/
B6 7d vs. L1cam 1d	5	Dpysl5/ Hnrpk/ Ndufc2/ Nme2/ Vdac1
B6 7d vs. L1cam 7d	13	Aspa/ Ckb/ Dpysl2/ Dpysl5/ Efh2/ Fhl/ Gapdh/ Got1/ Got2/ Hnrpk/ Mdh2/ Vdac1/ Vdac3/

L1cam 1d vs. L1cam 7d	32	Abat/ Aco2/ Alb/ Atp5a1/ Atp5b/ Atp5h/ Atp6v1e1/ Atp6v1f/ Cox5a/ Dld/ Dpysl5/ Eef1a1/ Hadha/ Hnrpk/ Hspa5/ Hspd1/ Nme1/ Ogdh/ Pfkml/ Pgam1/ Pkm2/ Snca/ Sncb/ Snd1/ Stxbp1/ Syn1/ Tkt/ Tmod2/ Tppp/ Tpx/ Uqcrc2/ Vdac1
<hr/>		
B6 1d vs. B6 7d vs. L1cam 1d	1	Vdac1
<hr/>		
B6 1d vs. B6 7d vs. L1cam 7d	3	Got1/ Mdh2/ Vdac1
<hr/>		
B6 1d vs. L1cam 1d vs. L1cam 7d	9	Arpc51/ Atp5b/ Eef1a1/ Hadha/ Snca/ Stxbp1/ Tkt/ Tppp/ Vdac1/
<hr/>		
B6 7d vs. L1cam 1d vs. L1cam 7d	3	Dpysl5/ Hnrpk/ Vdac1
<hr/>		
B6 1d vs. B6 7d vs. L1cam 1d vs. L1cam 7d	1	Vdac1
<hr/>		
B6 gesamt vs. L1cam gesamt	42	Actb/ Aldoa/ Aldoc/ Arpc51/ Aspa/ Atp5a1/ Atp5b/ Ckb/ Cplx1/ Cplx2/ Dpysl2/ Dpysl5/ Eef1a1/ Efhd2/ Fhl/ Gapdh/ Got1/ Got2/ Hadha/ Hspa4/ Hspa41/ Idh3b/ Mdh2/ Ndrgr1/ Ndufa5/ Ndufc2/ Nfl/ Nme2/ Oxct1/ P4hb/ Pdxk/ Pfn1/ Sh3gl1/ Snca/ Snrpf/ Stmn1/ Stxbp1/ Tppp/ Tubb5/ Vdac1/ Vdac2/ Vdac3

3.3.4 Untersuchung der post-translationalen Modifizierungen in den beiden MPTP behandelten Mauslinien

Zur Untersuchung der post-translationalen Modifizierungen bei den Proben wurden wieder die verschiedenen Färbemethoden genutzt. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Glycosylierungsmuster, Phosphorylierungsmuster und bei den

oxidierten Proteinen festgestellt werden. Es wurden jeweils die Proben mit den kontroll-behandelten Proben verglichen und dann die beiden Zeitpunkte miteinander. Danach wurden die Mäusestämme miteinander verglichen. Als Beispiel sind hier die Gelbilder der C57BL/6J Maus dargestellt (Abb. 3-28 und 3-29).

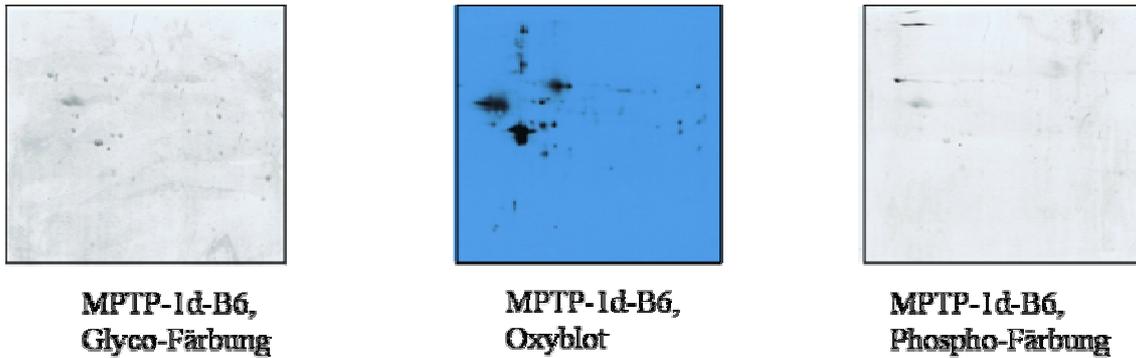


Abbildung 3-28: Diese Abbildung zeigt die drei Gelbilder mit den unterschiedlichen post-translationalen Modifizierungen. Dabei ist rechts die Glyco-Färbung, in der Mitte der Oxyblot und rechts die Phospho-Färbung der C57BL/6J Mäuse einen Tag nach der Behandlung zu sehen.

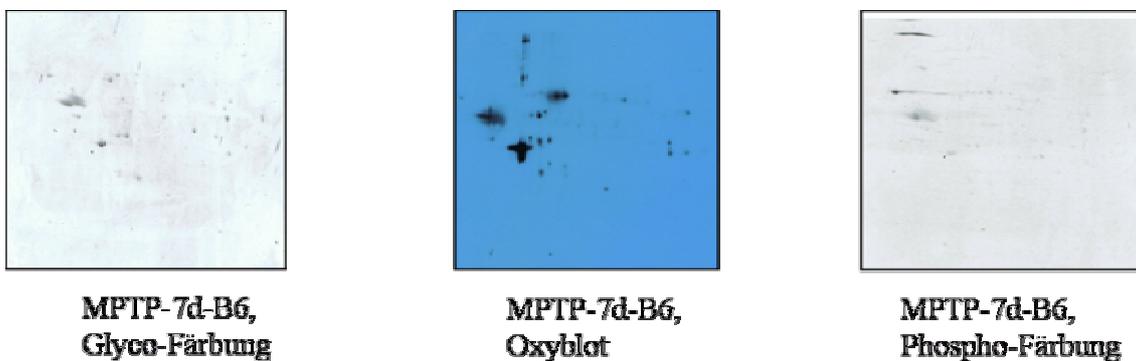


Abbildung 3-29: Diese Abbildung zeigt die drei Gelbilder mit den unterschiedlichen post-translationalen Modifizierungen. Dabei ist rechts die Glyco-Färbung, in der Mitte der Oxyblot und rechts die Phospho-Färbung der C57BL/6J Mäuse sieben Tage nach der Behandlung zu sehen.

3.4 Vergleich der vier Mausmodelle

Für den Vergleich der Mausmodelle untereinander wurden bei den jeweiligen Modellen die Unterprojekte zusammengefasst, so dass wir vier Modelle haben, Parkin-KO, PINK1-KO, C57BL/6J MPTP und L1cam MPTP. Zwischen allen vier Mausmodellen

gibt es 5 übereinstimmende Proteine. Dies sind *Aldolase 3, c Isoform* (Aldoc), *EF hand domain containing 2* (Efhd2), *Glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial* (Got2), *Profilin 1* (Pfn1) und *Voltage-dependent anion channel 1* (Vdac1). Die anderen Angegeben sind der Tabelle 3-26 zu entnehmen.

Tabelle 3-26: Angabe der Anzahl der gleichen varianten Proteine bei dem Vergleich der unterschiedlichen Mausmodelle.

Vergleich	Anzahl der gleichen Proteine	Genname
Parkin vs. PINK1	12	Actg1/ Aldoc/ Efhd2/ Got2/ Hspa8/ Nme1/ Pfn1/ Pgk1/ Ppia/ Tpi1/ Uchl1/ Vdac1
Parkin vs. C57BL/6J MPTP	7	Aldoc/ Efhd2/ Got2/ Ndufs1/ Pfn1/ Snca/ Vdac1
Parkin vs. L1cam MPTP	17	Aco2/ Actg1/ Aldoc/ Atp6v1f/ Dld/ Efhd2/ Gap43/ Got2/ Nme1/ Pfn1/ Pgam1/ Pgk1/ Ppia/ Sh3gl2/ Snca/ Uchl1/ Vdac1
PINK1 vs. C57BL/6J MPTP	20	Actb/ Aldoa/ Aldoc/ Auh/ Ckb/ Echs1/ Efhd2/ Gapdh/ Gdi2/ Got1/ Got2/ Mdh2/ Nefm/ Pdhb/ Pfn1/ Sh3gl1/ Tkt/ Tuba1c/ Vdac1/ Vdac3
PINK1 vs. L1cam MPTP	28	Abat/ Actb/ Actg1/ Aldoa/ Aldoc/ Ckb/ Ckmt1/ Cs/ Eno1/ Eno2/ Gapdh/ Got1/ Got2/ Idh2/ Ldhb/ Mdh2/ Nme1/ Pfn1/ Pgk1/ Ppia/ Prdx1/ Sh3gl1/ Slc25a12/ Syn2/ Tkt/ Uchl1/ Vdac1/ Vdac3

C57BL/6J vs. L1cam	42	Actb/ Aldoa/ Aldoc/ Arpc51/ Aspa/ Atp5a1/ Atp5b/ Ckb/ Cplx1/ Cplx2/ Dpysl2/ Dpysl5/ Eef1a1/ Efhd2/ Fhl/ Gapdh/ Got1/ Got2/ Hadha/ Hspa4/ Hspa41/ Idh3b/ Mdh2/ Ndr1/ Ndufa5/ Ndufc2/ Nfl/ Nme2/ Oxct1/ P4hb/ Pdxk/ Pfn1/ Sh3gl1/ Snca/ Snrpf/ Stmn1/ Stxbp1/ Tppp/ Tubb5/ Vdac1/ Vdac2/ Vdac3
Parkin vs. PINK1 vs. C57BL/6J MPTP	5	Aldoc/ Efhd2/ Got2/ Pfn1/ Vdac1
Parkin vs. PINK1 vs. L1cam MPTP	10	Actg1/ Aldoc/ Efhd2/ Got2/ Nme1/ Pfn1/ Pgk1/ Ppia/ Uchl1/ Vdac1
Parkin vs. C57BL/6J MPTP vs. L1cam MPTP	6	Aldoc/ Efhd2/ Got2/ Pfn1/ Snca/ Vdac1
PINK1 vs. C57BL/6J MPTP vs. L1cam MPTP	14	Actb/ Aldoa/ Aldoc/ Ckb/ Efhd2/ Gapdh/ Got1/ Got2/ Mdh2/ Pfn1/ Sh3gl1/ Tkt/ Vdac1/ Vdac3
Parkin vs. PINK1 vs. C57BL/6J MPTP vs. L1cam MPTP	5	Aldoc/ Efhd2/ Got2/ Pfn1/ Vdac1

In der Abbildung 3-30 ist ein Venn-Diagramm abgebildet, das die Anzahl der übereinstimmenden Proteine noch einmal in Zahlen wiedergibt. Zwischen den einzelnen Mausmodellen fällt auf, dass es nicht so viele Übereinstimmungen in den veränderten Proteinen gibt.

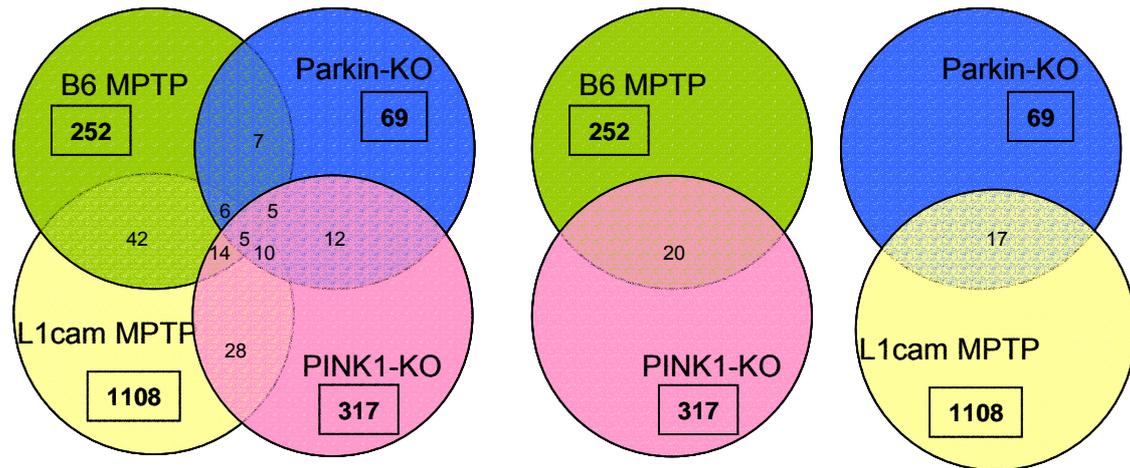


Abbildung 3-30: Venn-Diagramm zur Darstellung der übereinstimmenden Proteine.

Die fünf Proteine, die in allen vier Mausmodellen übereinstimmen, wurden einer Datenbank-Analyse unterzogen und in die gleichen funktionellen Gruppen eingeteilt, wie in den Analysen zuvor. Drei Proteine findet man in den Mitochondrien, eins ist für die Energiegewinnung (Aldoc) und eins für die Zellstabilität (Pfn1) verantwortlich. Kein Protein ist für den Protein-Abbau zuständig.

In der Tabelle S2 sind Proteine aufgelistet, die in der Literatur bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben wurden, und auch in der hier vorliegenden Arbeit in den verschiedenen Mausmodellen als verändert gefunden wurden. Daraus ergibt sich, dass einige Proteine (z.B.: *Dihydrolipoamide dehydrogenase*, *Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit*, *Enolase gamma*, *Dihydropyrimidinase-related protein 2*, *Ubiquitin carboxyterminal hydrolase L1* und *Glutamin synthetase*) an verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind.

In Tabelle 3-27 sind die Proteineinteilungen in die funktionellen Gruppen der einzelnen Mausmodelle noch einmal verdeutlicht. Dabei ist zu sehen, dass die meisten Proteine phosphoryliert werden können, der Energiegewinnung dienen und in den Mitochondrien zu finden sind.

Tabelle 3-27: Einteilung der Proteine der vier Mausmodelle in die funktionellen Gruppen.

Stoffwechselweg	Parkin-KO	PINK1-KO	B6 MPTP	L1cam MPTP
Mitochondrium	5	29	27	97
Phosphoprotein	14	57	62	162
Energiegewinnung	6	27	14	55
Zellwachstum/Stabilität	2	11	11	18
Protein-Abbau	5	6	11	15
Nicht klassifiziert	28	97	25	45

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Mausmodelle der Parkinsonschen Erkrankung untersucht. Dabei handelt es sich um zwei genetisch bedingte Modelle (Parkin-KO und PINK1-KO) und zwei medikamenten-induzierte Modelle (MPTP-Behandlung bei B6 und L1cam transgene Maus). Es wurde die in unserem Labor entwickelte 2D-Großgel-Elektrophorese verwendet, die sich durch besonders hohe Auflösung und Reproduzierbarkeit auszeichnet. Die Identifizierung der Proteinspots aus 2D-Gelen erfolgte mit Hilfe der Massenspektrometrie [49, 54, 62, 63].

4.1. Genetisch bedingte Mausmodelle

4.1.1. Parkin-KO Maus

Die Mutation im Parkin Gen beim Menschen am Chromosom 6q25.2-27 führt zu PD [3] und kann autosomal vererbt werden. Beim Parkin *knock-out* Mausmodell wurde das Parkin Protein (PARK2-Gen, Ubiquitin E3 Ligase) mutiert, damit es nicht mehr funktionsfähig ist. Die Mäuse haben im Hinblick auf den *knock-out* keine parkinsonähnlichen Symptome.

Bei der Untersuchung des Parkin-Maus Modells fiel auf, dass bei den zwei Monate alten Mäusen ungefähr die gleiche Anzahl an unterschiedlichen Proteinspots (36) zu finden war, wie bei den acht Monate alten Mäusen (33 veränderte Proteinspots).

In den zwei Monate alten Mäusen sind folgende Proteine der Glykolyse und Glukoneogenese herunterreguliert: *Phosphoglycerat kinase 1* (Pgc1), *Triosephosphat isomerase 1* (Tp1) und *Dihydrolipoamid dehydrogenase* (Dld). Diese Proteine konnten in den acht Monate alten Mäusen nicht gefunden werden. Aus diesem Grund kann man bei den jungen Mäusen von einer gestörten Energielieferung ausgehen, welche in den acht Monate alten Mäusen wieder ausgeglichen ist. In den älteren Mäusen hingegen konnte das Uchl1 (*ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*) Protein und das Ube2l3 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3 isoform 1, Ubch7*) Protein identifiziert werden. Beide Proteine sind bereits mit PD in Verbindung gebracht worden [13, 64, 65]. Dev *et*

al. [13] beschreiben eine Interaktion von UBCH7, UBCH8 und Parkin, um die subzelluläre Lokalisation und Funktion von Parkin zu regulieren. In den Parkin-KO Mäusen sind keine auffälligen Symptome der Parkinsonschen Erkrankung zu erkennen, aber mit Hilfe der Proteomanalyse kann bereits in den acht Monate alten Mäusen eine veränderte Expression von Proteinen nachgewiesen werden, die im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen.

Terziogu *et al.* [40] sprechen von wenigen Bewegungsstörungen im Parkin-KO Mausmodell und von einer geringen Dopamin Pathologie. Diesen Effekt können wir auf Proteinebene bestätigen. Es gibt keinen nennenswerten Unterschied zwischen den beiden Zeitstadien auf der Ebene der Anzahl der Proteinunterschiede.

Parkin ist als Ubiquitin E3 Ligase zur Markierung der Proteine für den Proteinabbau zuständig [3, 18, 21, 22]. Ist dies gestört, kommt es zu einer Akkumulation von verschiedenen Proteinen, in einigen Fällen kommt es auch zur Bildung von *Lewy bodies* [3].

In der Literatur wurde bereits Parkin-KO Mäuse mit Hilfe der 2DE und Massenspektrometrie untersucht. Palacino *et al.* [22] haben 129/Sv Parkin-KO Mäuse mit Hilfe von silbergefärbten 2D-Gelen ausgewertet und einige Proteine der oxidativen Phosphorylierung (*NADH-ubiquinone oxidoreductase 24-kDa und 30-kDa subunit*) und einige Proteine (*Peroxiredoxin 1, 2 und 6*), die eine Rolle beim oxidativen Stress haben, identifiziert. Insgesamt wurden 15 Proteine im ventralen Mittelhirn als verändert gefunden. In einem Vergleich mit den hier beschriebenen Proteinen konnte keine Übereinstimmung bei den Parkin-KO Mäusen gefunden werden, trotzdem gibt es eine Übereinstimmung des betroffenen Zellkompartiments. In beiden Studien sind die Mitochondrien betroffen. Periquet *et al.* [45] haben eine Studie ebenfalls an 129/Sv KO Mäusen durchgeführt, aber die Proben mit Hilfe der DIGE-Technik angefärbt. Sie haben den Kortex und das Striatum von 2 Monate alten und 12 Monate alten Mäusen untersucht. Die Anzahl der Veränderungen im Striatum der zwei Monate alten Mäuse stimmt mit den in der hier vorliegenden Arbeit gefundenen ungefähr überein. Bei einem Vergleich aller Proteine der Parkin-KO Maus aus der hier vorliegenden Arbeit mit den Proteinen von Periquet *et al.* [45] konnten 6 Übereinstimmungen gefunden werden.

Dabei handelt es sich um drei Proteine des Energiemetabolismus (nur in unseren zwei Monate alten Mäusen), zwei Proteine des Proteinabbaus (nur in unseren 8 Monate alten Mäusen) und dem *Voltage-dependent anion channel 1* (in den zwei Monate alten Mäusen). Bei dem Vergleich Periquet *et al.* [45] mit Palacino *et al.* [22] konnten nur zwei Proteine in beiden Analysen gefunden werden (*Pyruvat dehydrogenase E1 α 1* und *Glyoxalase 1*).

Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Daten und die der anderen Arbeitsgruppen auf eine mitochondriale Fehlfunktion und einen gestörten Energiemetabolismus hindeuten.

4.1.2. PTEN homolog induced putative kinase 1 (PINK1)-KO Maus

Bei dem PINK1-Protein (Park6) handelt es sich um eine mitochondriale Serin-Threonin-Kinase [3]. Bei Mutationsanalysen von PD erkrankten Menschen [66, 67] wurde eine Mutation am Chromosom 1p35-36 festgestellt, welche autosomal rezessiv vererbt wird.

Bei der PD kommt es zu einem Verlust von dopaminergen Neuronen in der *substantia nigra pars compacta*, einem Teil des Striatums. Bei der hier vorliegenden Arbeit wurden im Striatum dreimal so viele Protein-Veränderungen gefunden wie im Mittelhirn und doppelt so viele wie im Kortex. Dies korreliert sehr gut mit der Pathologie der Erkrankung.

Im Kortex gab es mehr veränderte Proteine als im Mittelhirn. Obwohl bei der PD nur im Striatum die dopaminergen Neuronen absterben, finden wir auch im Kortex der PINK-KO Maus Veränderungen. Durch die Degeneration der dopaminergen Neuronen wird die Regulierung der Motorfunktion des Gehirns abgeschwächt. In einem gesunden Gehirn reguliert das Dopamin über die Basalganglien des *Caudatus nucleus*, des Thalamus und des Motorkortex die Bewegungen des Menschen. Beim PD fehlt das Dopamin, um die Bewegung zu regulieren. Es kommt zu einer Überfunktion des Motorkortex und dadurch zum Tremor. Das könnte der Grund dafür sein, dass wir im

Kortex mehr veränderte Proteine finden als im Mittelhirn, aber trotzdem weniger als im Striatum.

Im Kortex konnten weitaus weniger oxidierte Proteinspots detektiert werden, als im Mittelhirn und im Striatum. Das Ergebnis belegt, dass im Kortex weitaus weniger oxidativer Stress für die Zellen besteht, als im Mittelhirn und im Striatum. Lee *et al.* [52] und Kim *et al.* [68] schreiben, dass die Überexpression von *Peroxiredoxin 1 und 2* zur Entfernung von H_2O_2 führt, und somit Thyroidzellen vor Apoptose geschützt sind. *Peroxiredoxin 1* war in den Kortex Proben der KO Mäuse hochreguliert. Dies spricht für einen Schutz vor oxidativem Stress.

Im Striatum und Mittelhirn kommt es zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien. Das führt zu einem Zelltod der dopaminergen Nervenzellen. Durch eine vermehrte Zellatmung mit Hilfe der Mitochondrien kommt es zur erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was als oxidativer Stress bezeichnet wird. Das spielt eine wesentliche Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und beim Alterungsprozess [69, 70]. Die ROS verändern die DNA und damit auch die Proteine oder direkt die Proteine. Eine gesunde Zelle setzt sich mit Hilfe von Antioxidantien oder Superoxid-dismutase, *Glutathion-peroxidase* und *Katalase* zur Wehr. Wenn dies nicht mehr ausreichend ist, kann die Zelle zu stark geschädigt werden und es kommt zum Zelltod.

Im Striatum kann man die hochregulierten identifizierten Proteine mit Hilfe der Funktions-Analyse (Gene Ontology Tree Machine, <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>) z.B. dem Zitronensäurezyklus und der Glykolyse/ Glukoneogenese zuordnen. Diese Stoffwechselwege dienen dem Energiehaushalt. So konnte *Aldolase a*, *Triosephosphat Isomerase 1* und *Lactat Dehydrogenase A* der Glykolyse zugeordnet werden und *Malat dehydrogenase 2*, *Isocitrat Dehydrogenase 1* und *Succinat Coenzym A Ligase* dem Zitronensäurezyklus. Bei der ATP-Produktion kommt es als Nebenprodukt zur Bildung von ROS durch die Mitochondrien. Da in unserem Mausmodell die Proteine der Glykolyse in der Expression erhöht sind, zeigt sich eine vermehrte Arbeit der Mitochondrien. Das spricht für ein höheres Aufkommen an ROS. Wenn die Zellen auch einen gesteigerten Schutzmechanismus gegen ROS aufweisen (*Superoxid-Dismutase*,

Katalase, Glutathion-peroxidase) spricht dass für eine ausgeglichene Bilanz. In unserer Analyse waren diese Proteine unverändert. Es zeigte sich somit kein gesteigerter Schutzmechanismus zum Abbau der ROS. Aus diesem Grund herrscht kein Gleichgewicht zwischen ROS-Bildung und Schutz vor ROS und es kommt durch den gesteigerten Energiegewinn zu vermehrter ROS-Bildung und dadurch zum oxidativen Stress für die Zellen.

Zusammenfassend kann man bei dem PINK1-KO Mausmodell die meisten veränderten Proteine im Striatum finden und somit die Pathologie der Erkrankung bestätigen. Des Weiteren lassen sich die verändert gefundenen Proteine vermehrt den Mitochondrien zuteilen. Dies spricht für eine Fehlfunktion der Mitochondrien, was zum Zelluntergang führt.

4.2 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- induziertes Mausmodell

Mit Hilfe einer Untersuchung an MPTP induzierten PD-Modellen sollte die pathologische Reaktion von MPTP auf Proteinebene und der Effekt von L1cam untersucht werden. In einer zellbasierten Studie konnte ein positiver Effekt von L1cam überexprimierenden Zellen auf die MPTP Behandlung festgestellt werden [41, 42].

Die Behandlung mit MPTP führt zu einer Reduktion der Bewegungsaktivität in Mäusen [35, 37, 71] in der akuten Phase (1 Tag nach der Behandlung), welche sich nach vier Tagen wieder normalisiert. Dieses Phänomen wurde dem Potential der Regeneration des nigrostriatalen dopaminergen Systems [34] zugeschrieben. Um diesen Prozess der Regeneration zu untersuchen, haben wir Proben aus der akuten Phase (einen Tag nach der Behandlung) und Proben der Erholungsphase (sieben Tage nach der Behandlung) analysiert. Dies ermöglicht einen Quervergleich zwischen den beiden Zeitpunkten bzw. Stadien. Die Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Diedrich *et al.* 2008 [52]).

Bei den Wildtyp C57BL/6J Mäusen wurde in den Proben sieben Tage nach der Behandlung weniger Proteine gefunden, die hoch oder herunterreguliert waren als in der akuten Phase. Dies zeigt eine Erholung in den Mäusen, was mit der bereits

beschriebenen Regeneration des nigrostriatalen dopaminergen Systems in der Erholungsphase [34] konform ist. Im Gegensatz dazu waren bei den transgenen Mäusen die varianten Proteinspots einen Tag nach der Behandlung in den behandelten Mäusen 3-mal so hoch wie in den behandelten Wildtyp-Mäusen, und nach sieben Tagen der Behandlung siebenmal höher im Vergleich zum Wildtyp. Die Anzahl der varianten Spots war demnach nicht nur höher im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, sondern stieg auch über die Zeit an. Dies zeigt einen höheren toxischen Effekt von MPTP in den transgenen Mäusen als in den Wildtyp-Mäusen. Die transgenen Mäuse zeigen keine Tendenz für eine Erholungsphase nach sieben Tagen nach der Behandlung. Die verändert gefundenen Proteine wurden in die fünf verschiedenen Kategorien eingeteilt, um bei den behandelten transgenen Mäusen einen möglichen Schutz vor der toxischen Wirkung von MPTP zu finden.

Mitochondriale Fehlfunktion:

In der behandelten Wildtyp-Maus wie auch in der behandelten transgenen Maus waren viele mitochondriale Proteine in der akuten Phase herunterreguliert. Das bestätigt die vorhergehenden Beobachtungen aus der Literatur, dass MPTP mitochondriale Proteine beeinflusst [15, 72]. In den L1cam transgenen Mäusen wurden jedoch viel mehr herunterregulierte mitochondriale Proteine nach der MPTP- Behandlung gefunden als in den behandelten Wildtyp-Mäusen. Viele der veränderten Proteine in den transgenen Mäusen sind in der oxidativen Phosphorylierung involviert. So sind zum Beispiel Atp5a1, Atp6v1e1, Atp5b und Atp6v1f Teile des Komplex V der Atmungskette und Cox5a ist ein Teil von Komplex IV. Diese fünf Proteine, die down-stream von Komplex I (dem eigentlichen Ziel von MPTP) liegen, sind in ihrer Expression erniedrigt. Diese Beobachtung zeigt eine erniedrigte ATP-Gewinnung durch die Atmung in den transgenen Mäusen.

Glykolyse:

In den mit MPTP behandelten Wildtyp-Mäusen sind einige Proteine der Glykolyse in beiden Zeitpunkten verändert, wie Pkm2 und Pfkf, welche hochreguliert nach der Behandlung waren. Diese Beobachtung wurde auch von Ryu *et al.* [73, 74] gemacht, der vorher beschrieben hat, dass Proteine wie G6PD, PFK-C, PKM2 und LDHA in

einem Parkinson Modell, dass mit 6-OHDA induziert wurde, hochreguliert waren. Die Autoren vermuteten, dass die Hochregulation der Glykolyse- Gene die erniedrigte ATP-Produktion, welche durch die mitochondriale Fehlfunktion in der PD zustande kommt, kompensiert.

Die Zellenergie, welche in ATP gespeichert wird, ist für alle zellulären Prozesse wichtig. Dies beinhaltet unter anderem die Regulation des Zellvolumens, den anabolischen Metabolismus, Proteinabbau so wie die Apoptose. In den transgenen Mäusen sind viel mehr Proteine der Glykolyse in der Erholungsphase hochreguliert als in den Wildtyp-Mäusen. Unsere Beobachtung zeigt eine große Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung in den transgenen Mäusen und keine effiziente Kompensation der erniedrigten ATP Produktion mit Hilfe der Glykolyse (34 ATP im vs. 2 ATP) in den L1cam transgenen Mäusen nach der MPTP- Behandlung.

Cytoskelett:

Während der akuten Phase sind in den Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen einige Proteine, die in das Cytoskelett involviert sind, in ihrer Expression herunterreguliert. In den Wildtyp-Mäusen zeigte ein Protein (Capzb) ein höheres Expressionslevel in den behandelten Mäusen. Im Gegensatz dazu waren verschiedene Proteine in den L1cam transgenen Mäusen herunterreguliert, wie zum Beispiel Tubulin, welches in der Mikrotubuli-vermittelten Zellbewegung [73] beteiligt ist. Eine herunterregulierte Expression von Tubulin wurde auch in der Substantia nigra von PD-Menschen (post mortem) [75, 76] oder in dopaminergen Zellen nach oxidativen Stress [77] beschrieben. Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten zeigen, dass einige Tubulin-Proteine (Tuba2, Tuba4a und Tuba1a) in der akuten Phase von Wildtyp-Mäusen herunterreguliert waren. Während der Erholungsphase der Wildtyp-Mäuse waren Tuba1c und Tuba1a hochreguliert. Dieses Phänomen deutet auf eine Wiederherstellung der durch MPTP betroffenen Regionen in den Wildtyp-Mäusen, was in den L1cam transgenen Mäusen nicht beobachtet werden kann.

Ubiquitin Pathway:

In allen mit MPTP behandelten Mäusen sind die Proteine des *Ubiquitin- Pathways* herunterreguliert. Einige PD verursachende Proteine sind in den *Ubiquitin- Proteasom*

Pathway involviert. So zum Beispiel Parkin und Uchl1 (*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1*), die, wenn sie mutiert sind, familiäre PD hervorrufen [22, 78]. In dieser Arbeit konnte gefunden werden, dass α -Synuclein, das mit Uchl1 interagiert, in der akuten Phase der Wildtyp-Mäuse und in beiden Zeitpunkten in den L1cam transgenen Mäusen herunterreguliert ist. Bei α -Synuclein ist bekannt, dass es an der Bildung von *Lewy bodies* in der PD involviert ist [18]. Tanaka *et al.* [79] haben herausgefunden, dass die Expression von mutierten α -Synuclein zu neuronalen Zelltod durch mitochondriale Fehlfunktion führt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden noch keine *Lewy body* in MPTP induzierten PD Modellen gefunden. Die Herunterregulation von α -Synuclein lässt eine Störung des *Ubiquitin-Proteasom Pathways* in PD in beiden MPTP behandelten Mausmodellen vermuten.

Neurogenese:

In beiden Zeitpunkten der C57BL/6J Mäuse waren einige Proteine (z.B. Stmn1 und Dypsl2), die in der Neurogenese eine Rolle spielen, herunterreguliert. Das lässt auf fehlendes Neuritenwachstum in beiden Phasen schließen. Die L1cam transgenen Mäuse zeigten ein anderes Verhalten: In der akuten Phase war Ulip2 in den MPTP behandelten Mäusen hochreguliert und Stmn1 herunterreguliert. Diese Proteine sind auch beide in die Neurogenese involviert. Während der Erholungsphase waren drei Proteine (Stmn1, Ina und Gap43) der Neurogenese herunterreguliert und Dypsl2 war in der Expression hochreguliert. Stathmin (Stmn) wird für die Tubulin Polymerisation und Mikrotubuli Anordnung, welche für die Mitose wichtig ist, benötigt [80]. Wenn das Mikrotubuli Wachstum erniedrigt ist, kann der mitotische Spindelapparat nicht ausgebildet werden und die Zelle fällt in ein Art Wachstums-Stillstand [80]. In der hier vorliegenden Studie war *Stathmin* in der akuten Phase und in der Erholungsphase von L1cam transgenen Mäusen, die mit MPTP behandelt wurden, herunterreguliert. Diese Entdeckung lässt auf eine niedrige Mitose-Rate schließen, und zeigt somit eine langsamere Zellregeneration in den L1cam Mäusen.

Zusammenfassend kann man bei dieser Analyse sagen, dass Wildtyp-Mäuse gegenüber der Behandlung mit MPTP besser geschützt sind, als die L1cam Mäuse. Dies zeigt sich in der Anzahl der veränderten Proteine, welche in den behandelten transgenen Mäusen

siebenmal höher war, als in den Wildtyp-Mäusen und nach sieben Tagen nach der Behandlung angestiegen ist. Damit zeigte sich keine Erholungsphase in den transgenen Mäusen. Die veränderten Proteine der Oxidativen Phosphorylierung waren in den transgenen Mäusen in ihrer Expression erniedrigt und die Proteine der Glykolyse waren erhöht. Die Oxidative Phosphorylierung ist effizienter in der Energiegewinnung als die Glykolyse. Dies zeigt, dass die transgenen Mäuse im Gegensatz zu Befunden in einem Zellsystem [41, 42] die Toxizität von MPTP nicht ausgleichen können.

4.3 Vergleich der vier Mausmodelle

Beim Vergleich der identifizierten Proteine der verschiedenen Mausmodelle konnten fünf Proteine in allen vier Mausmodellen gefunden werden. *Aldolase 3* ist ein zentrales Enzym der Glykolyse, *Profilin 1* ist an der Ausbildung des Cytoskeletts beteiligt. Zwei weitere Proteine werden mit den Mitochondrien in Verbindung gebracht. Das sind *Glutamate oxaloacetate transaminase 2* (Got2) und *Voltage-dependent Anion Channel 1* (Vdac1). Das Protein *EF Hand Domain Containing 2* (Efhd2) liegt als phosphorylierten Isoform vor. *Aldolase 3* und Vdac1 wurden bereits in der Literatur [45, 81] mit PD in Verbindung gebracht.

Als wichtigste Gemeinsamkeit konnte in drei Mausmodellen (Parkin-KO, PINK1-KO und L1cam MPTP) das Uchl1 Protein identifiziert werden. Dieses Protein ist bereits in einen Stoffwechselweg der PD einbezogen (Abb. 1-6). Dort zeigt sich eine Verbindung zwischen α -Synuclein, Parkin und Uchl1 über den *Ubiquitin-Proteasom-Pathway*. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Verknüpfung von Uchl1 mit PINK1 und MPTP-Behandlung nachgewiesen. Da MPTP auf die Mitochondrien toxisch wirkt und PINK1 über das Mitochondrien-Lokalisationssignal auch eine Verbindung zu den Mitochondrien hat, deutet es daraufhin, dass Uchl1 nach dieser Analyse auch einen Einfluss auf die Mitochondrien hat. Damit hat dieses Protein eine wichtige Rolle in der Entstehung von PD eingenommen und sollte weiter untersucht werden.

Als große Gemeinsamkeit unter allen vier Mausmodellen fällt auf, dass sich die meisten veränderten Proteine in den Mitochondrien befinden und dort für den Energiemetabolismus zuständig sind. In neuerer Literatur wird vermutet, dass PD

hauptsächlich eine Erkrankung der Mitochondrien ist und somit mit mitochondrialer Fehlfunktion [64, 82] einhergeht. Unsere Studien bestätigen, dass die Fehlfunktion der Mitochondrien der primäre Effekt der Parkinsonschen Erkrankung ist. Die sekundären Effekte sind das Absterben der Neuronen und die darauf folgenden motorischen Bewegungsstörungen.

Einige Proteine konnten mit Hilfe der Literatur auch anderen neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben werden. Einerseits könnte eine überlappende Pathologie der Grund sein, aber andererseits könnten solche Proteine auch Knotenpunktproteine im Netzwerk der Protein-Protein-Interaktion darstellen. Über diese Proteine könnten mehrere Stoffwechselwege laufen, die aber zu verschiedenen Krankheiten führen.

4.4 Globales Netzwerk des Proteoms

In der hier vorliegenden Arbeit wurden in dem Parkin-KO Modell insgesamt 69 und in dem PINK1-KO Modell 317 veränderte Proteine (einschließlich Isoformen) gefunden. Bei der MPTP-Behandlung wurden in den Wildtyp-Mäusen 252 und in den transgenen Mäusen 1108 veränderte Proteine gefunden. In der Analyse von Periquet *et al.* [45] wurden 159 Proteine in einem Parkin-KO Modell gefunden.

In unserer Arbeitsgruppe werden noch andere Mausmodelle für neurodegenerative Erkrankungen untersucht. Das betrifft die Alzheimer Erkrankung mit vier Modellen (APP /PS1 transgen, APP23 transgen, APP transgen und PS1/2 conditional KO) und Huntington mit zwei Modellen (51 CAG und 200 CAG *Repeats*). Bei den Analysen der Alzheimer Erkrankung konnten bis jetzt 450 veränderte Proteine gefunden werden und bei Huntington wurden bis jetzt 319 veränderte Proteine gefunden. Das zeigt, dass die Mutation (KO oder Transgen) eines einzigen Gens zur quantitativen Variation von Hunderten von Proteinen führen kann. Es ist jedoch äußerst unwahrscheinlich, dass die etwa 300 varianten Proteine im Fall unseres PINK1-KO-Mausmodells alle einem spezifischen Stoffwechselweg angehören, der zur Parkinson Erkrankung führt. Man könnte vermuten, dass viele dieser varianten Proteine eine Backgroundvariabilität anzeigt, die möglicherweise methodische Ursachen hat. Jedoch wird dies durch z.B. die Daten der MPTP-Analyse von der hier vorliegenden Arbeit widerlegt. In den

Abbildungen 3-19 (Seite 56) und 3-22 (Seite 62) sind die Anzahl der veränderten Proteine der MPTP-behandelten Wildtyp-Mäuse und der behandelten transgenen Mäusen aufgezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der Unterschiede sehr gut den Verlauf der induzierten Parkinsonschen Erkrankung widerspiegeln. In den Wildtyp-Mäusen kommt es nach sieben Tagen zu einer Erholungsphase. Dementsprechend war die Anzahl der geänderten Proteine an Tag sieben deutlich gesunken, etwa auf die Hälfte der varianten Proteine von Tag eins (akute Phase). Auch die Differenz zwischen hoch- und herunterregulierten Proteinen, ein weiteres Kriterium für den Krankheitszustand, war an Tag sieben wieder ausgeglichen. Bei den behandelten transgenen Mäusen hingegen, die neben der induzierten Krankheit noch ein Protein (L1cam) überexprimieren, lag die Anzahl der veränderten Proteine um ein Vielfaches höher als in den Wildtyp-Mäusen und war selbst in der Erholungsphase noch drastisch angestiegen. Zudem war das Gleichgewicht zwischen auf- und abregulierten Proteinen extrem gestört. Dies deutet darauf hin, dass die gefundenen Proteinunterschiede keine Backgroundeffekte waren, sondern intrinsisch den Krankheitsverlauf reflektieren.

Hier stellt sich die Frage, warum es in Folge einer Mutation nicht nur zu krankheitsspezifischen Proteinveränderungen kommt, sondern gleichzeitig zu einer Proteom-weiten Variabilität der Proteine. Ergebnisse aus der Zellphysiologie und der theoretischen Biologie legen nahe, dass man zwischen zwei verschiedenen Arten von Proteinnetzwerken unterscheiden muss (Abb. 4-31). Wir nennen sie hier „Protein-Netzwerk“ und „Proteom-Netzwerk“.

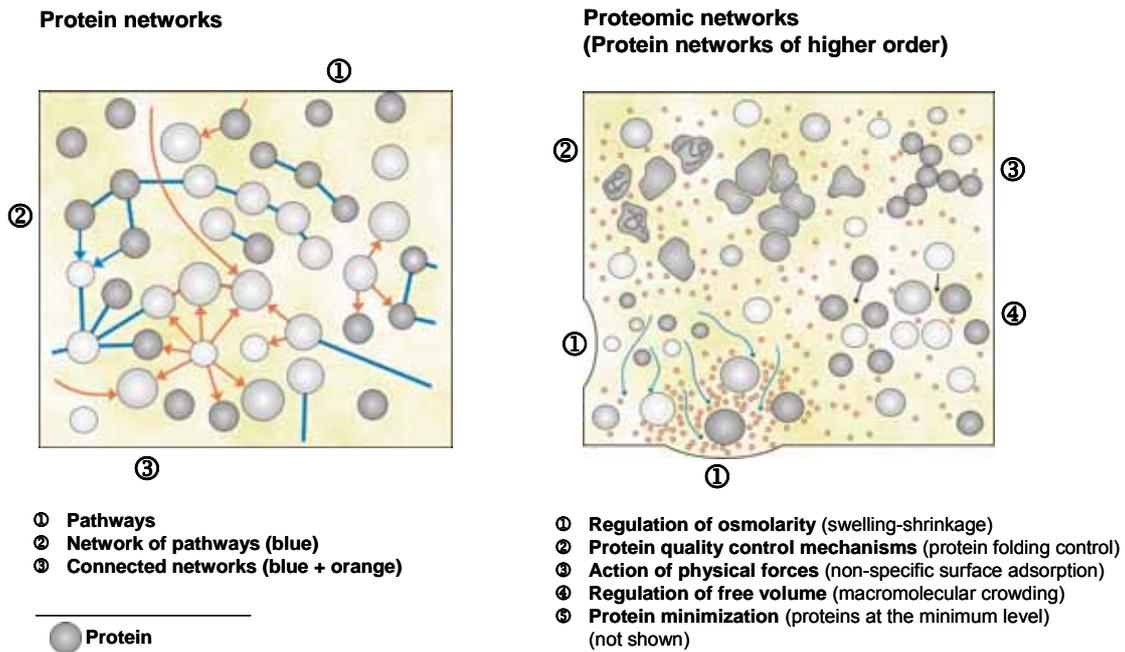


Abbildung 4-31: Darstellung der zwei verschiedenen Arten von Protein-Netzwerken.

Aus proteomischer Sicht besteht eine Zelle aus einem hoch strukturierten multidimensionalen Protein-Protein-Interaktions Netzwerk. Diese Interaktionen bestehen aus metabolischen Pathways, Verknüpfungen dieser Pathways, bis hin zur Bildung von Subnetzen. Andererseits gibt es noch ein übergeordnetes Netzwerk der Proteine, das auf Proteom-weiten Regulationsmechanismen beruht.

Ein Mechanismus des Proteom-Netzwerkes, der Einfluss auf Proteinänderungen nimmt, ist die Regulation über die Osmolarität. Durch eine Anreicherung von Osmolyten (darunter Aminosäuren, Nukleotide, Salze und Zucker) an einer Stelle einer Zelle wird dort die Synthese der Proteine gefördert [83, 84]. Dies betrifft dann nicht nur ein Protein, sondern alle, die in näherer Umgebung liegen. Als Konsequenz der Ansammlung von Osmolyten an einer Stelle kommt es zu einer Verminderung von Osmolyten an einer anderen Stelle in der Zelle, da die Zelle das osmolytische Gleichgewicht über Membranpumpen nicht so schnell wieder herstellen kann. An den Stellen mit einer niedrigen Konzentration an Osmolyten wird dann die Synthese von Proteinen gehemmt.

Ein weiterer Mechanismus des Proteom-Netzwerkes ist die Kontrolle der Proteinkonformation. Bates et al. 2006 beschreiben, dass wenn ein Protein ständig fehlgefaltet wird, wie z.B. bei der Huntington Krankheit das Huntingtin, dann reichern sich die Chaperone der Zelle zur Korrektur der Fehlfaltung im Bereich dieses Proteins an. Dadurch kann die normale Korrektur der Konformation der neu gebildeten Proteine nicht in ausreichendem Maße erfolgen [85]. Dadurch kommt es zu einer Anhäufung und Aggregation von fehlgefalteten Proteinen, was wiederum die Pathways dieser und anderer Proteine beeinflusst und so zur Pathogenese der Krankheit beiträgt.

So ist unsere Annahme, dass das Proteom ständig damit beschäftigt ist, das regulatorische Netzwerk im Proteom auszubalancieren, und dass die vielen veränderten Proteine, die wir bei genetischer Erkrankung beobachten, nicht der Erkrankung direkt zu zuschreiben sind, sondern ein Nebeneffekt der globalen Netzwerk-Schwankungen sind. Das erklärt auch, warum die Anzahl von Proteinänderungen, ebenso wie das Ausmaß im Ungleichgewicht zwischen hoch- und herunterregulierten Proteinen, mit dem Krankheitszustand korreliert. Es erklärt ferner, warum häufig die gleichen Proteine bei verschiedenen Krankheiten variieren.

Die weitreichende Abhängigkeit der Proteine und der Zelle voneinander hinsichtlich ihrer relativen Konzentration wurde mit der „Theory of protein minimization“ erklärt [86]. Im Laufe der Höherentwicklung der Organismen in der Evolution traten in der Zelle mehr und mehr unterschiedliche Proteine auf, die Zellgröße nahm jedoch nicht in entsprechender Weise zu. Demzufolge musste das Volumen eines jeden Proteins ständig reduziert werden. Um den damit verbundenen Funktionsverlust auszugleichen, wurde die funktionelle Vernetzung der Proteine immer stärker und dabei höher entwickelt. Bei den heutigen Organismen rangiert demzufolge jedes Protein der Zelle auf seinem Minimallevel, einem Niveau, das mit der Funktion des Proteins gerade noch gut verträglich ist. Wenn demnach ein Protein stark überexprimiert wird, müssen andere Proteine runterreguliert werden, weil nicht genug Raum in der Zelle ist. Gelingt dieses ausbalancieren nicht, kommt es zum „*macromolecular crowding*“ [87] mit der Folge von z.B. Proteinaggregation und Plauebildung. *Macromolecular crowding* führt auch zur Einschränkung der freien Beweglichkeit anderer Proteine. Verdichtung von Molekülen erzeugt Räume („*excluded Volume*“), die von anderen Proteinen nicht mehr

erreicht werden können. Durch das Ausbleiben von Proteininteraktionen kommt es weiterhin zu Störungen in der relativen Konzentration der Proteine.

Aus dem Vergleich verschiedener Maus-Modelle der PD haben wir neue Einblicke in das der Krankheit zugrunde liegende Netzwerk der Proteininteraktionen gewonnen. Auf der einen Seite haben wir gefunden, dass die Mitochondrien und ihre Proteine als primärer Effekt der Erkrankung betroffen sind, und dass dies wahrscheinlich zu sekundären Effekten wie dem der Apoptose der Neuronen führt. Eine zweite Beobachtung war, dass die Anzahl der Proteinänderungen und die Anzahl der hoch- und herunterregulierten Proteine mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert und Ausdruck proteom-weiter Störungen der Regulation sind.

5. Pilotstudie: Proteomanalyse beim Menschen

Es wäre von großem Interesse Proteomanalysen, wie sie hier an Mausmodellen für die PD durchgeführt wurden, an Menschen mit PD nachzuvollziehen. Gewebeproben vom Menschen könnten über Gewebebanken erhalten werden. Ein grundlegender Vorteil der Verwendung von Mäusen ist jedoch die Homozygotie. Da Mausmodelle in der Regel auf einen Inzuchtstamm zurückgekreuzt werden, treten für einzelne Gene bzw. Proteine keine Polymorphismen auf. Polymorphismen stören die Untersuchung der Proteinexpression einer Krankheit, da bei Proteinvarianten nicht unterschieden werden kann, ob sie auf Polymorphismen oder krankhaften Veränderungen beruhen. Dieses Problem erschwert Untersuchungen am Menschen. Hier unterscheidet sich jedes Individuum vom anderen durch eine große Zahl von Polymorphismen. Da mir Gewebeproben (Gehirn und Herz) vom gesunden Menschen zur Verfügung standen, habe ich noch eine Untersuchung zu der Frage angeschlossen, wie groß die Variabilität der Proteine zwischen Individuen des Menschen ist, und zwar bei gleichem Analyseverfahren, wie es hier bei der Maus verwendet wurde. Eine weitere Frage ist, in wieweit funktionell begründete Proteinveränderungen, z.B. geschlechtsspezifische Unterschiede, von der Maus auf den Menschen übertragbar sind.

5.1. Material und Methoden

In dieser Studie standen mir Gewebeproben von Herz und Gehirn von gesunden Menschen zur Verfügung. Die Herzproben erhielt ich von Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin und die Gehirnproben von Prof. Dr. S. Pääbo aus dem Max Planck Institut für evolutionäre Anthropologie in Leipzig. Diese Proben habe ich hinsichtlich Alter und Geschlecht in drei verschiedene Gruppen eingeteilt (männlich jung, männlich alt und weiblich alt). Diese Einteilung erfolgte, um die Heterogenität der Proben zu minimieren und geeignete Vergleiche durchführen zu können. Die Proben, die zur Verfügung standen, sind in Tabelle 5-28 und 5-29 aufgelistet.

Tabelle 5-28: Gehirnproben.

Alter in Jahren	Geschlecht	Alter in Jahren	Geschlecht	Alter in Jahren	Geschlecht
39	männlich	74	männlich	79	weiblich
30	männlich	83	männlich	78	weiblich
38	männlich	89	männlich	72	weiblich
35	männlich	75	männlich	81	weiblich
31	männlich	80	männlich	81	weiblich
36	männlich	79	männlich	89	weiblich

Tabelle 5-29: Herzproben.

Alter in Jahren	Geschlecht	Alter in Jahren	Geschlecht	Alter in Jahren	Geschlecht
18	männlich	55	männlich	53	weiblich
20	männlich	59	männlich	53	weiblich
25	männlich	64	männlich	55	weiblich
25	männlich	61	männlich	57	weiblich
18	männlich	63	männlich	52	weiblich
		64	männlich	51	weiblich

Die Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte wie angegeben hier unter Kapitel 2.3 und wie von mir publiziert [51]. Die Auftrennung der Proteinproben wurde in Kapitel 2.4 beschrieben. Die Darstellung der Proteinmuster in 2-DE Gelen erfolgte durch eine analytischen Silberfärbung (2.5.1.1).

Der Nachweis varianter Proteine erfolgte durch visuellen Vergleich der Proteinmuster. Diese Methode der Auswertung musste hier bei der Pilotstudie benutzt werden, da es keine Image-Analysesoftware gibt, die Polymorphismen in Form elektrophoretischer Positionsverschiebungen erkennt. Für die Analyse der Polymorphismen wurden die individuellen Proteinmuster nach dem Prinzip jedes gegen jedes verglichen. Der Vergleich der Proteinmuster erfolgte an einem Ausschnitt von etwa 500 Proteinspots. Es wurden die gefundenen Unterschiede eines jeden Paares addiert und durch die

Anzahl der gesamten Paare (bei Herz waren 10 Paarungen und bei Gehirn waren 15 Paarungen möglich) dividiert.

5.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Analyse der Polymorphismen erfolgte für Herz und Gehirn an den Proben männlich-jung. Bei dieser Analyse konnten für das Herz 41, für das Gehirn 32 Proteinvarianten gefunden werden. Von diesen Werten wurden 10% abgezogen, um methodischen Varianten Rechnung zu tragen. In einem Vergleich von Proteinmustern einer Serie von normalen Individuen einer Mausinzuchtlinie zeigen sich etwa 10% variante Proteinspots, obwohl zwischen diesen Individuen keine Polymorphismen bestehen. Diese Unterschiede sind methodischer Art, schließen aber trotz standardisierter Tierhaltung auch umweltbedingte Faktoren mit ein. Übertragen auf den Menschen sind 10% sicher eine Unterschätzung, weil der Umwelteinfluss beim Menschen eine größere Rolle spielt. Nach Korrektur ergeben sich im Durchschnitt für das Herz 37 unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen zwei Individuen, für das Gehirn 29 (Tab. 5-30).

Tabelle 5-30: Anzahl der Proteinpolymorphismen von Herz- und Gehirn beim Menschen.

Analyse	Herz	Gehirn
Mittelwert der Anzahl von Varianten zwischen 2 Individuen pro 500 Proteine	41	32
methodische Variabilität (10%)	4	3
Mittelwert der Polymorphismen zwischen 2 Individuen	37 (7,4%)	29 (5,8%)

Um die Übertragbarkeit von biologischen Aussagen von der Maus auf den Menschen zu testen, wurde der Geschlechtsunterschied in der Expression von Proteinen des Herzens zwischen Maus und Mensch untersucht. Die Untersuchungen an der Maus wurden von Jadranka Tadic (Doktorarbeit 2004, Graduiertenkolleg GK 754) durchgeführt. Die Überprüfung der Ergebnisse am Menschen habe ich im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Bei den Herzproben der Maus wurden zehn verschiedene Proteine mit geschlechtsspezifischer Expression gefunden. Die Proteine wurden an Proteinmustern des Menschen mit Western-Blot-Analysen überprüft. Nur fünf dieser Proteine (*Carbonic anhydrase 2*, *Rho GDI 1*, α 1-*Antitrypsin*, *Desmin* und *Peroxiredoxin 2*) konnten auch in den Proteinmustern der Menschen nachgewiesen werden [51]. Zwei Proteine (*Carbonic anhydrase 2* und *Rho GDI 1*) zeigten beim Menschen die gleichen Expressionsmuster (herunterreguliert in Männern) wie bei der Maus. Hingegen wurde bei den anderen drei Proteinen eine entgegengesetzte Expression gefunden. *Desmin* und *Peroxiredoxin 2* waren bei Männern hochreguliert, α 1-*Antitrypsin* war bei Männern herunterreguliert.

In den Vergleichen der männlich-jungen Proben untereinander zeigte sich bei Herz und Gehirn eine ganze Anzahl varianter Proteine. Bei den Herz-Proben ergaben sich 7,4% bei den Gehirnproben 5,8% Polymorphismen von Individuum zu Individuum. Die Herz-Proben weisen etwas mehr Polymorphismen als die Gehirn-Proben auf. Dies korreliert mit der Literatur von Khaitovich P *et al.* 2006. Diese Autoren zeigten, dass sich im Gehirn weniger Unterschiede in der Genexpression finden ließen, als in anderen Organen. Unter Polymorphismen versteht man drei Arten von genetischer Variabilität, Einzelnukleotidpolymorphismus (SNPs), Insertions-/Deletionspolymorphismus und Multiplikationen. Sie können zu Veränderungen im Expressionsgrad der Proteine, zur Änderung von Enzymaktivitäten und zu Unterschieden von äußeren Phänotypen führen und spielen eine größere Rolle als krankheitsassoziierte *Modifier*.

In der Literatur [88] wurde eine genomische Varianz von Mensch zu Mensch von 0,2-0,5% beschrieben. In der Pilotstudie zeigten unsere Proteinmuster vom Menschen eine durchschnittliche Variabilität von 6,6%. Diese relativ hohe Variabilität von Proteinpolymorphismen zeigt die Schwierigkeit, beim Menschen zwischen Polymorphismus und krankheitsrelevanten Proteinveränderungen zu unterscheiden. Die Pilotstudie zeigt ferner durch einen Geschlechtervergleich, dass trotz der hohen Homologie zwischen Maus und Mensch auf der DNA-Ebene, zwischen verschiedenen Arten (Maus und Mensch) große Unterschiede in der funktionellen Bedeutung der Proteine bestehen kann.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Proteomanalysen an verschiedenen Mausmodellen für die Parkinsonsche Erkrankung durchgeführt, um primäre und sekundäre Störungen im Proteom des Gehirns zu entdecken. Dabei wurden zwei *knock-out* Modelle und zwei chemisch-induzierte Modelle genutzt. Jedes Maus-Modell wurde individuell analysiert. Anschließend wurden die Befunde verglichen.

In dem Parkin-KO Modell konnte gezeigt werden, dass trotz des Fehlens eines pathologischen Befundes in den älteren Mäusen (acht Monate alt) zwei Proteine der Parkinson Erkrankung gefunden wurden. Damit wurde gezeigt, dass es vor dem Neuronenverlust zu einer erniedrigten Expression von krankheitsrelevanten Proteinen kommt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Parkin-KO, Uchl1 und Ube2l3 (Ubc7) aufdeckt werden. Des Weiteren konnten variante Proteine der zwei und acht Monate alten Mäuse den Mitochondrien zugeordnet werden.

In dem PINK1-KO Modell wurden drei verschiedene Gehirnregionen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die meisten Unterschiede im Expressionsmuster der Proteine im *Striatum* auftreten. Das korreliert mit dem pathologischen Befund eines Neuronenverlustes besonders in dieser Gehirnregion. Des Weiteren konnten viele variante Proteine ebenfalls den Mitochondrien zugeordnet werden.

Bei dem MPTP induzierten PD-Modell konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp-Mäuse besser vor MPTP geschützt sind, als eine transgene Maus, der durch Überexpression eines Proteins (L1cam) in der Literatur ein Schutzmechanismus vor MPTP zugesprochen wurde. Die transgenen Mäuse können die Toxizität von MPTP auch sieben Tage nach der Behandlung nicht ausgleichen, obwohl dieser Zeitpunkt als Erholungsphase bekannt ist. Generell zeigte die Untersuchung an dem MPTP-behandelten Mäusen sehr deutlich, dass die Gesamtvariabilität im Proteom der Zelle und die Balance zwischen auf- und abregulierten Proteinen den zeitlichen Verlauf der Krankheit in ihrem Schweregrad widerspiegelt. Des Weiteren konnten auch bei dieser Analyse viele variante Proteine den Mitochondrien zugeordnet werden.

Die Arbeit zeigt ferner, dass unter den Bedingungen einer Krankheit Veränderungen im Proteom der Zelle auf zwei Ebenen ablaufen, die man im Prinzip als primär und sekundär bezeichnen kann. Zum einen treten Proteinveränderungen auf, die man krankheitsspezifischen Stoffwechselwegen zuordnen kann, andererseits treten Proteomweite Veränderungen auf, die man als Ausdruck der Störung des regulatorischen Gleichgewichts im Proteom der Zelle erklären kann.

Abstract:

In this work we performed Proteomanalyses on various mouse models of Parkinson's disease to discover primary and secondary interferences in the proteome of the brain. For this purpose, we analysed two knock-out models and two chemical-induced PD models. Each mouse model was analysed individually and the findings were compared to each other.

In the Parkin-KO model two PD-related proteins have been found in the older mice (eight months old) although there were no pathological findings. This shows that disease-related proteins were already reduced in their expression before degeneration of neurons occurs. A relationship between Parkin-KO, Uchl1 and Ube2l3 (Ubc7) could be observed. Furthermore, a part of variant proteins of the two and eight months old mice could be assigned to the mitochondria.

Three different brain regions were analysed in the PINK1-KO model. The highest variation in expression patterns of proteins were found in the *striatum*. This correlates with the pathological findings of loss of neurons particularly in this brain region. Again, many variant proteins could also be assigned to the mitochondria.

The analysis of the MPTP-induced PD models showed that the wild-type mice were better protected against MPTP insult than the transgenic mouse, which over-expresses the L1cam protein. A protective mechanism of L1cam against MPTP-treatment was reported in the literature. Even seven days after the treatment, the transgenic mice could not compensate the toxicity of MPTP, although this time is known as recovery phase for MPTP treatment. In general, the investigation of the MPTP-treated mice showed very clearly that the total variability in the proteome of the cell and the balance between up and down-regulated proteins reflects the course of the disease and its severity. Once more, many variant proteins could be assigned to the mitochondria.

The work also suggests that under the condition of the disease changes in the proteome of the cell may occur at two levels, which we call primare and secundar level. In one respect, protein changes may be involved into disease-specific metabolic pathways. On

the other hand, many proteins reflect proteom-wide changes apparently as a consequence of the failure of the regulatory balance in the proteome of the cell.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Kirkwood, T. B., A systematic look at an old problem. *Nature* 2008, 451, 644-647.
- [2] Zabel, C. and Klose, J., Influence of Huntington's disease on the human and mouse proteome. *Int Rev Neurobiol* 2004, 61, 241-283.
- [3] Belin, A. C. and Westerlund, M., Parkinson's disease: a genetic perspective. *Febs J* 2008, 275, 1377-1383.
- [4] Farrer, M. J., Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet* 2006, 7, 306-318.
- [5] de Lau, L. M. and Breteler, M. M., Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006, 5, 525-535.
- [6] Schapira, A. H., Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008, 7, 97-109.
- [7] Bonifati, V., Genetics of Parkinson's disease. *Minerva Med* 2005, 96, 175-186.
- [8] Dauer, W. and Przedborski, S., Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003, 39, 889-909.
- [9] Fleming, S. M., Fernagut, P. O. and Chesselet, M. F., Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2005, 2, 495-503.
- [10] Gasser, T., Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 2005, 18, 363-369.
- [11] Gasser, T., Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007, 22 Suppl 17, S343-350.
- [12] Benson, D. A., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J. and Ouellette, B. F., GenBank. *Nucleic Acids Res* 1998, 26, 1-7.
- [13] Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409, 860-921.
- [14] Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., *et al.*, The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291, 1304-1351.
- [15] Dawson, T. M. and Dawson, V. L., Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003, 302, 819-822.
- [16] Bossy-Wetzell, E., Schwarzenbacher, R. and Lipton, S. A., Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 2004, 10 Suppl, S2-9.

- [17] Cookson, M. R., The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 2005, 74, 29-52.
- [18] Dawson, T. M., Parkin and defective ubiquitination in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2006, 209-213.
- [19] Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., *et al.*, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998, 392, 605-608.
- [20] Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., *et al.*, Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000, 25, 302-305.
- [21] Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., *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, 13354-13359.
- [22] Palacino, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., *et al.*, Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004, 279, 18614-18622.
- [23] Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., *et al.*, Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 2004, 131, 2183-2194.
- [24] Perez, F. A., Curtis, W. R. and Palmiter, R. D., Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity. *BMC Neurosci* 2005, 6, 71.
- [25] Thomas, B., von Coelln, R., Mandir, A. S., Trinkaus, D. B., *et al.*, MPTP and DSP-4 susceptibility of substantia nigra and locus coeruleus catecholaminergic neurons in mice is independent of parkin activity. *Neurobiol Dis* 2007, 26, 312-322.
- [26] Solano, R. M., Menendez, J., Casarejos, M. J., Rodriguez-Navarro, J. A., *et al.*, Midbrain neuronal cultures from parkin mutant mice are resistant to nitric oxide-induced toxicity. *Neuropharmacology* 2006, 51, 327-340.
- [27] Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., *et al.*, Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004, 304, 1158-1160.
- [28] Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., *et al.*, Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006, 441, 1162-1166.

- [29] Park, J., Lee, S. B., Lee, S., Kim, Y., *et al.*, Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006, 441, 1157-1161.
- [30] Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., *et al.*, Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 10793-10798.
- [31] Zhou, H., Falkenburger, B. H., Schulz, J. B., Tieu, K., *et al.*, Silencing of the Pink1 gene expression by conditional RNAi does not induce dopaminergic neuron death in mice. *Int J Biol Sci* 2007, 3, 242-250.
- [32] Singer, T. P. and Ramsay, R. R., Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett* 1990, 274, 1-8.
- [33] Smeyne, R. J. and Jackson-Lewis, V., The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005, 134, 57-66.
- [34] Mitumoto, Y., Watanabe, A., Mori, A. and Koga, N., Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248, 660-663.
- [35] Mori, A., Ohashi, S., Nakai, M., Moriizumi, T. and Mitumoto, Y., Neural mechanisms underlying motor dysfunction as detected by the tail suspension test in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Neurosci Res* 2005, 51, 265-274.
- [36] Schober, A., Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 2004, 318, 215-224.
- [37] Sedelis, M., Hofele, K., Auburger, G. W., Morgan, S., *et al.*, MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. *Behav Genet* 2000, 30, 171-182.
- [38] Heikkila, R. E., Differential neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in Swiss-Webster mice from different sources. *Eur J Pharmacol* 1985, 117, 131-133.
- [39] Heikkila, R. E., Hess, A. and Duvoisin, R. C., Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984, 224, 1451-1453.
- [40] Terzioglu, M. and Galter, D., Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. *Febs J* 2008, 275, 1384-1391.
- [41] Hulley, P., Schachner, M. and Lubbert, H., L1 neural cell adhesion molecule is a survival factor for fetal dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 1998, 53, 129-134.

- [42] Loers, G., Chen, S., Grumet, M. and Schachner, M., Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis. *J Neurochem* 2005, 92, 1463-1476.
- [43] Law, J. W., Lee, A. Y., Sun, M., Nikonenko, A. G., *et al.*, Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci* 2003, 23, 10419-10432.
- [44] Wolfer, D. P., Mohajeri, H. M., Lipp, H. P. and Schachner, M., Increased flexibility and selectivity in spatial learning of transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *Eur J Neurosci* 1998, 10, 708-717.
- [45] Periquet, M., Corti, O., Jacquier, S. and Brice, A., Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function. *J Neurochem* 2005, 95, 1259-1276.
- [46] Hartinger, J., Stenius, K., Hogemann, D. and Jahn, R., 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal Biochem* 1996, 240, 126-133.
- [47] Schagger, H. and von Jagow, G., Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 1991, 199, 223-231.
- [48] Lentze, N. and Auerbach, D., The yeast two-hybrid system and its role in drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 2008, 12, 505-515.
- [49] Klose, J. and Kobalz, U., Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995, 16, 1034-1059.
- [50] Klose, J., Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1999, 112, 67-85.
- [51] Diedrich, M., Tadic, J., Mao, L., Wacker, M. A., *et al.*, Heart protein expression related to age and sex in mice and humans. *Int J Mol Med* 2007, 20, 865-874.
- [52] Diedrich, M., Mao, L., Bernreuther, C., Zabel, C., *et al.*, Proteome analysis of ventral midbrain in MPTP-treated normal and L1cam transgenic mice. *Proteomics* 2008, 8, 1266-1275.

- [53] Klose, J. and Putz, B., Analysis of two-dimensional protein patterns from mouse embryos with different trisomies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80, 3753-3757.
- [54] Klose, J., Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1999, 112, 147-172.
- [55] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- [56] Scheler, C., Lamer, S., Pan, Z., Li, X. P., *et al.*, Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis* 1998, 19, 918-927.
- [57] Heukeshoven, J. and Dernick, R., Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988, 9, 28-32.
- [58] Nebrich, G., Herrmann, M., Sagi, D., Klose, J. and Giavalisco, P., High MS-compatibility of silver nitrate-stained protein spots from 2-DE gels using ZipPlates and AnchorChips for successful protein identification. *Electrophoresis* 2007, 28, 1607-1614.
- [59] Schuchardt, S. and Sickmann, A., Protein identification using mass spectrometry: a method overview. *Exs* 2007, 97, 141-170.
- [60] Mueller, D. R., Voshol, H., Waldt, A., Wiedmann, B. and Van Oostrum, J., LC-MALDI MS and MS/MS--an efficient tool in proteome analysis. *Subcell Biochem* 2007, 43, 355-380.
- [61] Pappin, D. J., Hojrup, P. and Bleasby, A. J., Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993, 3, 327-332.
- [62] Fountoulakis, M., Application of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass Spectrom Rev* 2004, 23, 231-258.
- [63] Kim, S. I., Voshol, H., van Oostrum, J., Hastings, T. G., *et al.*, Neuroproteomics: expression profiling of the brain's proteomes in health and disease. *Neurochem Res* 2004, 29, 1317-1331.
- [64] Harvey, B. K., Wang, Y. and Hoffer, B. J., Transgenic rodent models of Parkinson's disease. *Acta Neurochir Suppl* 2008, 101, 89-92.
- [65] Healy, D. G., Abou-Sleiman, P. M. and Wood, N. W., Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res* 2004, 318, 189-194.

- [66] Valente, E. M., Bentivoglio, A. R., Dixon, P. H., Ferraris, A., *et al.*, Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 2001, 68, 895-900.
- [67] Valente, E. M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., *et al.*, PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004, 56, 336-341.
- [68] Kim, H., Lee, T. H., Park, E. S., Suh, J. M., *et al.*, Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem* 2000, 275, 18266-18270.
- [69] Kang, D. and Hamasaki, N., Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr Med Chem* 2005, 12, 429-441.
- [70] Zablocka, A. and Janusz, M., [The two faces of reactive oxygen species]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2008, 62, 118-124.
- [71] Mitumoto, Y., Mori, A., Ohashi, S., Nakai, M. and Moriizumi, T., Differential effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the olfactory bulb and the striatum in mice. *Neurosci Res* 2005, 51, 111-115.
- [72] Beal, M. F., Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001, 2, 325-334.
- [73] Kim, J. M., Lee, K. H., Jeon, Y. J., Oh, J. H., *et al.*, Identification of Genes Related to Parkinson's Disease Using Expressed Sequence Tags. *DNA Res* 2007.
- [74] Ryu, E. J., Angelastro, J. M. and Greene, L. A., Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2005, 18, 54-74.
- [75] Grunblatt, E., Mandel, S., Jacob-Hirsch, J., Zeligson, S., *et al.*, Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J Neural Transm* 2004, 111, 1543-1573.
- [76] Noureddine, M. A., Li, Y. J., van der Walt, J. M., Walters, R., *et al.*, Genomic convergence to identify candidate genes for Parkinson disease: SAGE analysis of the substantia nigra. *Mov Disord* 2005, 20, 1299-1309.

- [77] Yoo, M. S., Chun, H. S., Son, J. J., DeGiorgio, L. A., *et al.*, Oxidative stress regulated genes in nigral dopaminergic neuronal cells: correlation with the known pathology in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2003, 110, 76-84.
- [78] Mizuno, Y., Hattori, N., Yoshino, H., Hatano, Y., *et al.*, Progress in familial Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 2006, 191-204.
- [79] Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., *et al.*, Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 2001, 10, 919-926.
- [80] Rubin, C. I. and Atweh, G. F., The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 2004, 93, 242-250.
- [81] Scholz, B., Svensson, M., Alm, H., Skold, K., *et al.*, Striatal proteomic analysis suggests that first L-dopa dose equates to chronic exposure. *PLoS ONE* 2008, 3, e1589.
- [82] Gautier, C. A., Kitada, T. and Shen, J., Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008.
- [83] Haussinger, D., The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996, 313 (Pt 3), 697-710.
- [84] Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., *et al.*, Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 1998, 78, 247-306.
- [85] Bates, G. P., BIOMEDICINE: One Misfolded Protein Allows Others to Sneak By. *Science* 2006, 311, 1385-1386.
- [86] Brown, G. C., Total cell protein concentration as an evolutionary constraint on the metabolic control distribution in cells. *J Theor Biol* 1991, 153, 195-203.
- [87] Minton, A. P., The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem* 2001, 276, 10577-10580.
- [88] Korbel, J. O., Urban, A. E., Affourtit, J. P., Godwin, B., *et al.*, Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* 2007, 318, 420-426.