

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
NEUROMELANIN-ASSOZIIERTER PROTEINE
AUS NEUROMELANIN-GRANULA DES
MENSCHLICHEN GEHIRNS
MITTELS
SUBZELLULÄRER PROTEOMANALYSE**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG**

vorgelegt von
Florian Tribl
aus
Wien, Österreich

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

Bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis Dezember 2004 am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg, in der Abteilung Klinische Neurochemie, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, und am Medizinischen-Proteom-Center, Ruhr-Universität Bochum, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. P. Riederer, Prof. Dr. G. Bringmann, Prof. Dr. M. Gerlach, Frau Jun.-Prof. Dr. K. Marcus und Herrn Prof. H.E. Meyer danke ich für die hervorragende Unterstützung dieser Arbeit, die freundliche Atmosphäre und die exzellenten Arbeitsbedingungen

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Chemie der Melanine	1
1.1.1	Klassifizierung der Melanine	1
1.2	Melanine der Haut als „Modell“-Melanin für Neuromelanin	2
1.2.1	Der chemische Bildungsmechanismus von Melanin nach Raper und Mason	2
1.2.2	Die Bildung von Phäomelanin nach Nicolaus und Prota	3
1.3	Strukturvorschläge zu Melaninen	4
1.4	Neuromelanin – Chemische Zusammensetzung und Strukturvorschläge	8
1.5	Die Biologie von Neuromelanin	11
1.5.1	Vorkommen und Morphologie von Neuromelanin-Granula	11
1.5.2	Neuromelanin – mehr als „nur“ ein Abfallprodukt	13
1.5.3	Die Rolle von Neuromelanin bei der Parkinson-Krankheit	13
	EXKURS – DIE PARKINSON-KRANKHEIT	14
1.6	Kontroverse um die Bildung von Neuromelanin	16
1.6.1	Argumente für eine enzymatische Biosynthese	16
1.6.2	Die Entstehung von Hautmelanin in Melanosomen	19
1.6.3	Die enzymatische Maschinerie zur Melaninbiogenese der Haut	20
1.6.4	Mögliche Enzyme zur Bildung von Neuromelanin	20
1.7	Subzelluläre Proteomanalyse („subcellular proteomics“)	22
1.7.1	Methoden der Proteomanalyse	24
1.7.2	Isolierung intrazellulärer Kompartimente mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung	25
1.7.3	Massenspektrometrie von Proteinen	25
2	HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	28

3	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	Geräte und Material	30
3.2	Enzyme und Antikörper	33
3.3	Dopamin-Polymerisierung	36
3.3.1	Quantifizierung von künstlich hergestelltem Dopaminmelanin	36
3.3.2	Polymerisierungsansätze von Dopamin	37
3.4	Modifizierung von Proteinen durch Dopamin	41
3.4.1	Herstellung von Dopamin-BSA	41
3.4.2	Inkubation von Substantia-nigra-Homogenat mit Dopamin	41
3.4.3	Nitroblau-Tetrazoliumsalz/Formazan-Assay zur Detektion von Chinoproteinen	41
3.5	Modifizierung von Peptiden durch Dopamin	43
3.5.1	Analytische RP-HPLC zur Reinheitsüberprüfung von synthetischen Peptiden	44
3.5.2	Peptidreinigung und Isolierung mittels präparativer RP-HPLC	45
3.5.3	Peptid-Derivatisierung mit Dopamin	46
3.5.4	Peptid-Analyse mittels Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie	47
3.6	Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten	48
3.7	Isolierung von Neuromelanin-Granula mittels subzellulärer Fraktionierung	52
3.8	Transmissionselektronenmikroskopie	54
3.9	Immuno-Transmissionselektronenmikroskopie	55
3.10	Gelelektrophorese	57
3.10.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
3.10.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	57
3.11	Western Blot	67
3.12	Lectinblot und Detektion mannosylierter Proteine	66
3.13	Massenspektrometrie	68
3.13.1	Probenvorbereitung	68
3.13.1.2	Proteolytische Spaltung von Proteinen	69
3.13.1.3	Deglycosylierung von Proteinen	70
3.13.2	Nano-HPLC-Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie	71
3.13.3	Interpretation der Massenspektren	73

4	RESULTATE	75
	Arbeitsverlauf	75
4.1	Untersuchungen zur autoxidativen Bildung von Neuromelanin	76
4.1.1	Quantitative Bestimmung von synthetischem Dopaminmelanin	76
4.1.2	Polymerisierungsansätze	77
4.1.3	Der Einfluss von Metallionen auf die Bildung von Dopaminmelanin	77
4.1.4	Der Einfluss von Fenton-ähnlichen Bedingungen auf die Bildung von Dopaminmelanin	79
4.1.5	Der Einfluss von Modellproteinen auf die Bildung von Dopaminmelanin	80
4.2	Untersuchungen zur Modifizierung von Proteinen durch Dopamin	81
4.2.1	Inkubation von BSA mit Dopamin	81
4.2.2	Inkubation von Proteinextrakten der Substantia nigra mit Dopamin	83
4.2.3	Dopamin-modifizierte Peptide	86
4.3	Immunhistochemische Untersuchungen zum „Tyrosinase-Konzept“	90
4.4	Suche nach Tyrosinase-homologen Sequenzen – Bioinformatik	92
4.4.1	BLAST-Suche nach „expressed sequence tags“ von TYRL	96
4.4.2	Homologievergleich von TYR- und TYRL-ESTs	97
4.5	Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen zum „Tyrosinase-Konzept“	100
4.6	Subzelluläre Proteom-Analyse – ein Lösungsansatz zur Analyse Neuromelanin-assoziiertes Proteins	107
4.7	Qualitätskontrolle	110
4.7.1	Qualitätskontrolle mittels Transmissionselektronenmikroskopie	110
4.7.2	Qualitätskontrolle mit Hilfe von Western Blots	113
4.8	Massenspektrometrische Untersuchung der Proteine von Neuromelanin-Granula	115
4.8.1	Isolierung und elektrophoretische Trennung der Proteine	115
4.8.2	Massenspektrometrische Untersuchung – Auswertung der Spektren	115
4.8.3	Lokalisierungsüberprüfung mit Western Blot und Lectinblot	126
4.8.4	L-Ferritin ist in Neuromelanin-Granula lokalisiert	129

5	DISKUSSION	132
5.1	Untersuchungen zur autoxidativen Bildung von Neuromelanin	132
5.2	Untersuchungen zum „Tyrosinase-Konzept“	133
5.3	Subzelluläre Fraktionierung von Neuromelanin-Granula	136
5.4	Proteinanalysen und Massenspektrometrie	139
5.4.1	Modifizierung von Proteinen mittels Dopamin	141
5.4.2	Identifizierte Proteine von Neuromelanin-Granula – Biochemische Diskussion	142
5.5	Neuromelanin-Granula – ein weiterer Vertreter der Lysosomen-verwandten Organellen	148
5.6	Ausblick	152
	ZUSAMMENFASSUNG	154
	SUMMARY	160
	LITERATURVERZEICHNIS	166
	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	182
	ANHANG	184

Abkürzungen

aCSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AEC	Aminoethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
ASB-14	Amidosulfobetain
B16	Murine Melanom-Zelllinie B16
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Bovines Serum-Albumin
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulfonat
1-D	eindimensional
2-D	zweidimensional
DA	Dopamin
DAM	Dopaminmelanin
DAT	Dopamin-Transporter
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DHICA	5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
FCS	Fötale Kälber-Serum (fetal calf serum)
FT-ICR	Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron
GNA	<i>Galanthus-nivalis</i> -Agglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase, horseradish peroxidase
I.D.	Innendurchmesser
LAMP	Lysosome-associated membrane protein
LIMP	Lysosome integrated membrane protein
M	mol/L
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MeCN	Acetonitril
MM	Molmasse
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsazl
NM	Neuromelanin
PBS	Phosphate-buffered saline
PDA	Piperazin-Diacrylamid
pI	Isoelektrischer Punkt
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	„reversed phase high performance liquid chromatography“

rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SN	Substantia nigra pars compacta
TBS(-T)	Tris-buffered saline (Tween 20)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of Flight
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
TYR	Genomische DNA-Sequenz für Tyrosinase
TYRL	Genomische DNA-Sequenz für „Tyrosinase-like“
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VMAT2	Vesikulärer Monoamintransporter
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

1 EINLEITUNG

Bei der anatomischen und neuropathologischen Untersuchung eines menschlichen Gehirns zeigt sich in Arealen des Hirnstamms eine selbst für das freie Auge sichtbare, auffallend dunkle Färbung. Diese Hirnareale tragen die Bezeichnung „Substantia nigra“ – Schwarzer Kern, bzw. „Locus coeruleus“ – Blauer Kern. Ursache für die Färbung dieser Gehirnregionen und namensgebend ist das braun bis bläulich-schwarze Pigment Neuromelanin. Nicht in erster Linie die Pigmentierung der Substantia nigra an sich, sondern vor allem der pathologische Befund einer abgeblassten Substantia nigra bei der Parkinson-Krankheit (Charcot, 1869; Hassler, 1938) erklären das Interesse an Neuromelanin. Nach Hinweisen auf eine mögliche Beteiligung dieses Pigments an der Pathogenese der Krankheit (Youdim et al., 1994; Mann und Yates, 1983; Marsden, 1983) ist Neuromelanin vermehrt in den Mittelpunkt klinisch orientierter Forschung gerückt.

1.1 Die Chemie der Melanine

Die Bezeichnung Melanin (griech. μέλας, schwarz) wurde erstmals von dem schwedischen Chemiker Jöns Jacob Berzelius (1779-1848) geprägt und beschreibt seither eine im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitete Klasse endogener Pigmente, die für die Farbgebung von Haut, Fell, Federn und Augen vieler Tiere verantwortlich ist.

Melanine gelten als amorphe, kaum lösliche, anscheinend hochpolymere Pigmente. Diese physikalischen Eigenschaften sind Grund dafür, dass Melanine als eine der letzten Gruppe biologischer Makromoleküle gelten, deren Struktur bis heute nicht restlos geklärt ist und deren physiologische Funktion oft nur ansatzweise verstanden ist. Im Fall von Neuromelanin ist selbst die Bildung in den catecholaminergen Neuronen unklar und wird heute kontrovers diskutiert (Sulzer et al., 2000; Fedorow et al., 2005a).

1.1.1 Klassifizierung der Melanine

Auf der Basis der jeweiligen Ausgangssubstanz kann man Melanine in vier Gruppen einteilen:

Eumelanine werden aus L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin) gebildet und sind vor allem für die schwarz-braune Farbgebung von Haut und Haaren verantwortlich. Ein prominentes Beispiel ist die Tinte von Cephalopoden („Sepia-Melanin“), die sich

größtenteils aus Eumelanin zusammensetzt. Des Weiteren tragen Eumelanine durch Lichtstreuung (Tyndall-Effekt) auch zu einer grünen oder blauen Farbgebung bei.

Phäomelanine, die 5-S-Cysteinyl-dopa-Polymere darstellen, sind für die gelblich bis rote oder rotbraune Färbung von Haaren und Federn verantwortlich.

Allomelanine werden aus stickstofffreien Vorstufen wie Pyrocatechol- und 1,8-Dihydroxynaphthalin-Vorstufen gebildet. Allomelanine sind schwarz-braune Farbstoffe, die vor allem von Pflanzen, Pilzen und Bakterien gebildet werden. Auch unter der Bezeichnung „Huminsäure“ geläufig wird die charakteristische Färbung des Erdbodens Allomelaninen zugeschrieben.

Neuromelanin stellt die vierte Gruppe in dieser Klassifizierung dar. Neuromelanin ist ein Pigment, das hauptsächlich in catecholaminergen Neuronen der Gehirne von Primaten zu finden ist. Als Ausgangssubstanzen werden zurzeit Dopamin (Substantia nigra pars compacta) bzw. Noradrenalin (Locus coeruleus) genannt.

1.2 Melanine der Haut als „Modell“-Melanin für Neuromelanin

Die Melanine der Haut (Eu- und Phäomelanin) sind aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und Zugänglichkeit die am besten untersuchten Vertreter dieser Pigmentgruppe. Des Weiteren sind die Synthesewege von Melaninen der Haut wegen des großen Interesses an den Ursachen unterschiedlichster Pigmentierungsphänotypen am besten untersucht worden. Obwohl inzwischen nicht alle Untersuchungsergebnisse von Melaninen der Haut direkt auf Neuromelanin übertragen werden können, eignet sich die Betrachtung von Melaninen der Haut, um eine generelle Einführung in den derzeitigen Wissensstand über Melanine zu geben, ehe Neuromelanin näher beschrieben wird.

1.2.1 Der chemische Bildungsmechanismus von Melanin nach Raper und Mason

Grundlegende Arbeiten zum Verständnis des Syntheseweges von (Eu-)Melanin wurden von Raper begonnen (Raper, 1927, 1928), wonach L-Tyrosin durch Einwirken von Tyrosinase und Anwesenheit von Luftsauerstoff zu einem unlöslichen, schwarz gefärbten Pigment polymerisiert. Es wurde vorgeschlagen, dass L-Tyrosin über L-DOPA zu Dopachinon und nach spontanem Ringschluss zu Dopachrom oxidiert wird (Abb. 1). Als Folgeprodukte charakterisierte Raper (Raper, 1927) 5,6-Dihydroxyindol (DHI) und die in geringerer Ausbeute entstehende Verbindung 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DIHCA). Aus Mangel an weiteren isolierbaren Folgeprodukten schloss Raper aus diesen

Ergebnissen, dass Melanine hauptsächlich durch Oxidation von DHI und weniger aus der 2-Carbonsäure gebildet werden. Weiterführende Studien von Mason (Mason, 1948, 1967) mit synthetisiertem DHI und DHICA ergaben vergleichbare Ergebnisse, weshalb Melanin als ein „Homopolymer“ bestehend aus 5,6-Dihydroxyindol-Einheiten vorgeschlagen wurde.

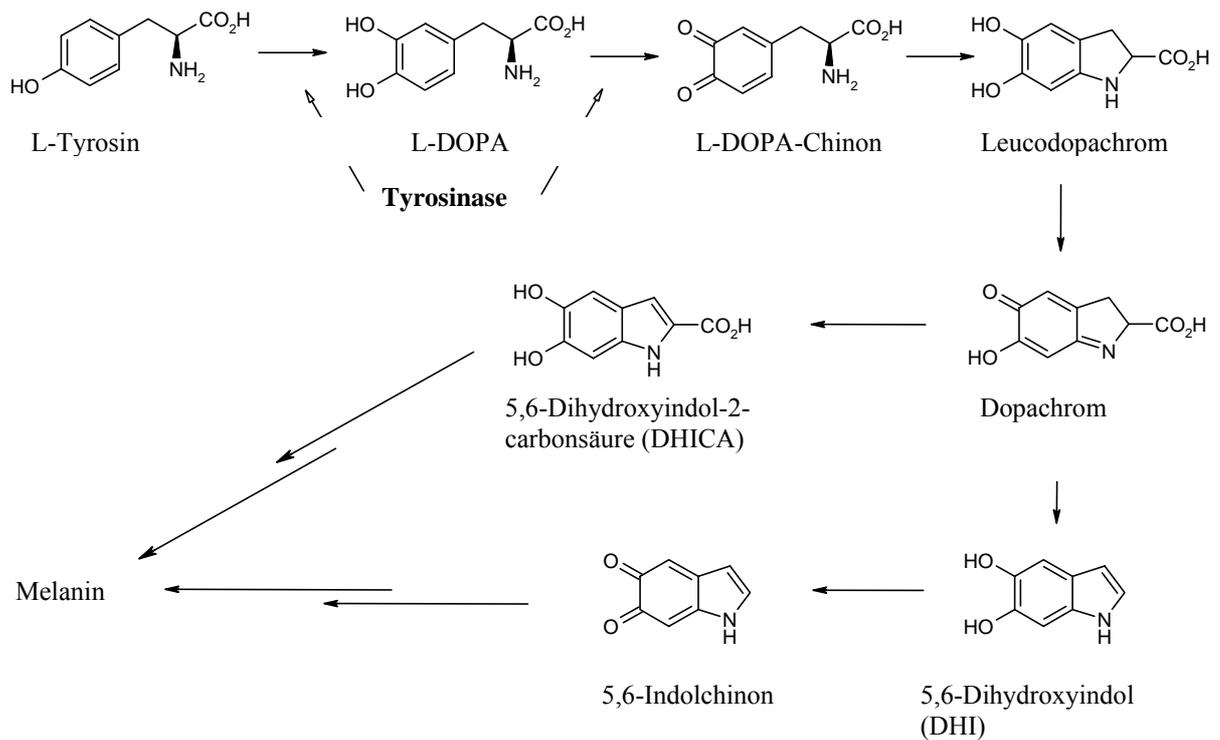


Abbildung 1: Der chemische Bildungsmechanismus von Melanin nach Raper und Mason.

Dieses gänzlich aus *In-vitro*-Versuchen abgeleitete „Tyrosin-Tyrosinase“-Konzept von Raper und Mason stellte sich jedoch für die Erklärung der Melanogenese *in vivo* als unzulänglich heraus, da lediglich die Bildung eines schwarz gefärbten, unlöslichen Eumelanins gezeigt werden konnte, die Farbpalette der Melanine *in vivo* jedoch von schwarz-bläulich über rot-braun bis gelblich reicht.

1.2.2 Die Bildung von Phäomelanin nach Nicolaus und Prota

Zwar mag die in der Natur vorkommende gelblich bis rot-braune Pigmentierung auf einen weiteren Syntheseweg schließen lassen, die Löslichkeit jenes Phäomelanins in

alkalischen Lösungsmitteln war jedoch ein Indiz für offensichtliche Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung dieser beiden Pigmentgruppen.

Boldt und Hermstedt (Boldt und Hermstedt, 1967) konnten in Pigment-Extrakten aus roten Haaren neben Stickstoff die Anwesenheit von Schwefel nachweisen. Prota zeigte schließlich durch Inkubation von Tyrosin und Tyrosinase bei Anwesenheit von Cystein und Luftsauerstoff die Bildung eines bräunlichen, alkali-löslichen Pigments und konnte mit dieser Entdeckung erheblich zum Verständnis der Entstehung von Phäomelanin beitragen (Prota und Nicolaus, 1967; Prota, 1992, 2000).

1.3 Strukturvorschläge von Melaninen

Die chemische Zusammensetzung sowie die Struktur und die absolute Konformation von Melaninen sind trotz jahrzehntelanger, intensiver Bemühungen bis heute nur ansatzweise geklärt. Aufgrund der hohen Unlöslichkeit von Melaninen sind konventionelle spektroskopische oder massenspektrometrische Verfahren auch heute kaum erfolgreich einsetzbar. Seit jeher versucht man daher über zwei alternative Wege Informationen über die Zusammensetzung und die Struktur von Melaninen zu erhalten: auf den Arbeiten von Raper und Mason sowie von Nicolaus und Prota aufbauend stellte man einerseits mimetische *In-vitro*-Versuche zur Untersuchung der auftretenden Zwischenprodukte an, andererseits erfolgte die Analyse der Abbauprodukte von natürlichen und synthetischen Melaninen nach Einwirken starker Oxidationsmittel (Nicolaus und Piatelli, 1962; Piatelli et al., 1962; Mason, 1967; Swan, 1974; Ito, 1986; Novellino et al., 2000).

Beide Strategien führten zu einer unübersichtlichen Fülle an widersprüchlichen Daten. Die großen Unterschiede in der Wahl der Ausgangssubstanzen, der Reaktionsbedingungen und sonstiger manipulativer Schritte erklären die kontroverse Vielfalt an vorgeschlagenen Strukturen und erschweren den Vergleich der Ergebnisse. Problematisch ist außerdem, dass Analysedaten, die in erster Linie von synthetischen Modell-Melaninen stammen, lange Zeit kritiklos auch für natürliche Melanine postuliert wurden. Andererseits erwiesen sich viele Strukturrückschlüsse ausgehend von chemischen Abbauprodukten natürlicher Melanine aus den folgenden Gründen als zweifelhaft: erstens herrschte die Ansicht vor, Melanine hätten unabhängig von ihrer Entstehung (synthetisch oder biologisch) oder unabhängig von ihrem natürlichen Vorkommen (Haar, Feder, Iris, Gehirn, etc.) vergleichbare Strukturen (Novellino et al., 2000). Zweitens erkennt man erst allmählich, dass Melanine keine inerten Materialien

sind und daher ihre nativen Strukturen bei diversen Aufschlussverfahren, z.B. durch Kochen in Mineralsäuren, Schaden nehmen (Novellino et al., 2000).

Trotz aller Kontroversen haben sich zwei Modelle etabliert, über die man momentan die Struktur von Melaninen beschreibt: einerseits betrachtet man Melanine als langkettige Polymere unterschiedlicher Molmasse (Polymer-Modell), andererseits wird Melanin als Graphit-ähnlich geschichtetes Material beschrieben (Schicht-Modell).

Das Polymer-Modell

Basierend auf biomimetischen Daten dürften Melanine aus heterogenen Polymeren unbekannter Molmassen aufgebaut sein. Basierend auf den Untersuchungen von Raper und Mason wurden je nach Ausgangssubstanz *in vitro* unterschiedliche Melaninvorstufen charakterisiert:

Für synthetisches Eumelanin wurden in der Gruppe um Prota einige Indol-Oligomere analysiert, wobei Indol-Reste an den Positionen 2, 4 und 7 kovalent verbunden werden (Abb. 2).

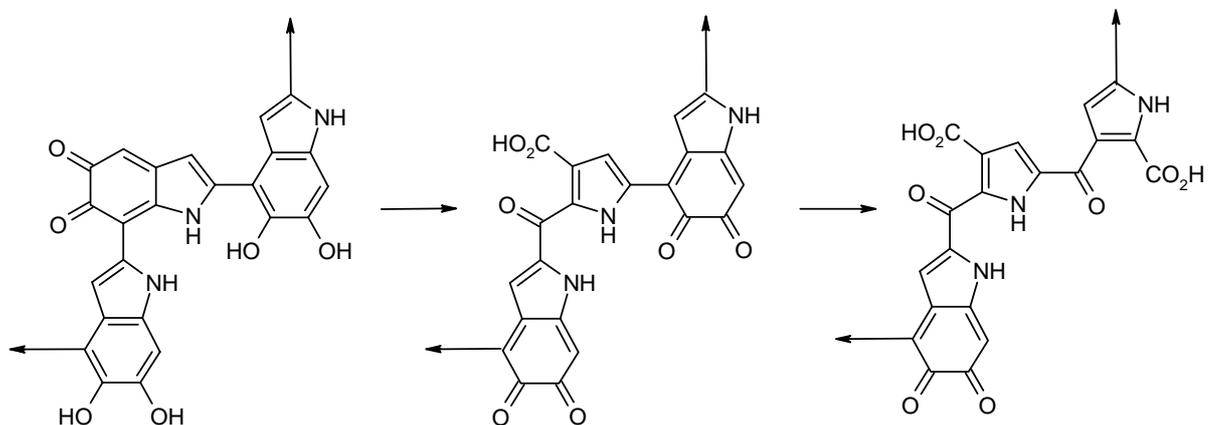


Abbildung 2: 2',4'-Verknüpfung von Melanin nach Prota.

Ein Bericht, wonach massenspektrometrische Untersuchungen mit Eumelanin aus Kuh-Iriden (Novellino et al., 2000) bzw. aus der Tinte von *Sepia officinalis* teilweise gelungen sind (Pezzella et al., 1997), könnte ein Hinweis auf die polymere Struktur zumindest dieses Melanin-Typs sein.

Über die Struktur von Phäomelanin kann angenommen werden, dass die Synthese unter Beteiligung von 5-S-Cysteinyl-DOPA abläuft. Diese Substanz ist auch in lebenden Organismen nachweisbar (Fornstedt et al., 1986; Fornstedt und Carlsson, 1989). Ein Folgeprodukt, das nach der 1,4-Benzothiazin-Zwischenstufe auftreten könnte, wurde in geringer Ausbeute *in vitro* nachgewiesen, da diese Verbindung säureinstabil ist (Napolitano et al., 1996b; Napolitano et al., 2000).

In vitro generierte Oligomere sind bislang nicht *in vivo* nachgewiesen worden. Des Weiteren ergeben neuere Daten ein weit komplexeres Bild von Melaninen, als mit biomimetischen Versuchen zur Zeit erarbeitet werden kann (Double et al., 2000; Dzierzega-Leczna et al., 2004). Trotz der Bemühungen, den vom DHI-Modell generierten Daten Allgemeingültigkeit zu verleihen (Prota, 2000), scheint es verfrüht zu sein, diese Befunde auf die Situation in einem lebenden Organismus zu übertragen.

Das Schicht-Modell

Andere Untersuchungen von synthetischen Melaninen basieren auf Röntgenbeugung, der Atomkraftfeldmikroskopie (AFM, atomic force microscopy) und der Rasterelektronenmikroskopie (REM), aus denen man das Schicht-Modell für Melanine ableitete (Cheng et al., 1994a; Cheng et al., 1994b; Gallas et al., 2000). Dabei geht man von planaren Untereinheiten aus, die sich aus fünf bis acht miteinander kovalent verbundenen Indol-Einheiten zusammensetzen. Etwa vier solche „Ebenen“ sind durch π - π -Wechselwirkungen („ π -stacking“) in einem ungefähren Abstand von 3,45Å graphit-ähnlich übereinander gestapelt und stellen eine verzogene, „parakristalline“ Einheit mit der Dimension von $\sim(15\text{Å})^3$ dar, aus denen letztendlich Eumelanin gebildet wird.

Dieses Modell basiert auf Strukturdaten, die nach Röntgenbeugung an Eumelaninen errechnet wurden (Cheng et al., 1994a; Cheng et al., 1994b). Dabei vergleicht man errechnete mit gemessenen Beugungsmustern. Die Übereinstimmung von berechneten Kurven mit der gemessenen Kurve ist zwar ein notwendiges, jedoch kein hinreichendes Kriterium für die Richtigkeit eines etwaigen Strukturmodells, weshalb man trotz sehr guter Übereinstimmung die Existenz anderer Strukturen mit ebenso guter Übereinstimmung nicht ausschließen kann. Dieser Fall tritt bereits bei jenen Berechnungen ein, die lediglich auf der Basis von Indol-Einheiten beruhen (Cheng et al., 1994a; Cheng et al., 1994b), wobei im Sinne der Vereinfachung zusätzliche Strukturelemente nicht berücksichtigt worden sind.

Nach diesem Schicht-Modell sollen Melanine aus sehr kleinen oligomeren Molekülen aufgebaut sein, die sich zu filamentartigen Strukturen anlagern (Zeise et al., 1992; Bridelli, 1998; Clancy und Simon, 2001; Littrell et al., 2003). Die tatsächliche chemische Struktur jener fünf bis acht miteinander kovalent verbundenen Indoleinheiten ist jedoch nach wie vor nicht restlos aufgeklärt (Zajac et al., 1994). Einerseits ist die exakte Verknüpfung der monomeren Moleküleinheiten zu einem planaren Protomolekül nicht bekannt, andererseits ist nicht restlos geklärt, welche der möglichen Protomoleküleinheiten tatsächlich am Aufbau von Melaninen beteiligt sind.

Unklar ist, ob auch natürliche Melanine aus kleinen oligomeren „Protomolekülschichten“ oder aus Oligopolymeren bestehen. Einerseits wurden an natürlichem *Sepia officinalis* (Eu-)melanin über MALDI-TOF-MS Oligopolymere festgestellt (Pezzella et al., 1997), die allerdings strukturelle Veränderungen aufwiesen, wie sie nach Einwirken von H_2O_2 bekannt sind (Prota, 1992). Andererseits lassen die Ergebnisse von Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Atomkraftfeldmikroskopie (AFM) Schichten aus quervernetzten „Protomolekülen“ vermuten (Clancy und Simon, 2001). Eine Gültigkeit beider Modelle für die Struktur von Melanin könnte sich durch Einwirken von H_2O_2 auf Melanine ergeben: Geschichtetes Melanin dürfte dabei strukturell verändert werden, was eine Desaggregation der Protomolekülschichten zur Folge hat (Littrell et al., 2003). 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure-Oligopolymere erfahren durch H_2O_2 einen teilweisen Abbau der 5,6-Dihydroxyindol-Einheiten zu Pyrrolcarbonsäuren (Napolitano et al., 1995; Napolitano et al., 1996a). Möglicherweise könnten hoch quervernetzte „Protomolekülschichten“ nach Einwirken von H_2O_2 in Oligopolymere umgewandelt werden. Unklar ist, inwieweit derartige Veränderungen *in vivo* stattfinden oder Artefakte durch die Präparation der Melanine darstellen. Inwiefern diese Strukturmodelle auch für Neuromelanin relevant sind, ist zurzeit nicht klar.

1.4 Neuromelanin – Chemische Zusammensetzung und Strukturvorschläge

Obwohl sich in den letzten Jahren einige Arbeitsgruppen sehr intensiv der Strukturaufklärung von humanem Neuromelanin gewidmet haben, ist die tatsächliche Struktur auch dieses Biopolymers nach wie vor unbekannt. Als eine Ausgangssubstanz zur Bildung von Neuromelanin wird seit langem Dopamin genannt (Vander Wende und Spoerlein, 1963). Die Frage, ob dabei tatsächlich ein Melanin gebildet wird, konnte jedoch nicht eindeutig beantwortet werden.

Melanin, ein stabiles Radikal

Die derzeit verlässlichste Zuordnungsmöglichkeit von Pigmenten zur Gruppe der Melanine scheint über ESR-Spektroskopie (ESR, Elektronen-Spin-Resonanz) zu gelingen (Enochs et al., 1993b, 1993a). Die dabei gemessenen ungepaarten Elektronen dürften aus dem Komproportionierungsgleichgewicht zwischen chinoiden (Q) und hydrochinoiden (QH₂) Strukturelementen ($Q + QH_2 \rightleftharpoons 2QH^\cdot$) herrühren (Sarna und Swartz, 1978). Die Identifizierung von Melaninen anhand eines ESR-Spektrums funktioniert allerdings eher nach dem „ja/nein-Prinzip“, jedoch lassen ESR-spektroskopische Untersuchungen keine detaillierten Rückschlüsse auf die tatsächliche Gesamtstruktur von Melaninen zu.

Anders als unspezifische histochemische Methoden, basierend auf der Reduktion von AgNO₃ durch Melanin (Lillie, 1957a, 1957b), konnte mittels ESR-Spektroskopie gezeigt werden, dass Neuromelanin tatsächlich ein Melanin ist, wenn auch ein untypischer Vertreter dieser Biopolymere. Von großer Wichtigkeit ist der Befund, dass Neuromelanin nicht mit den bekannteren Melaninen aus peripheren Zellgruppen oder gar den synthetisch hergestellten Modell-Melaninen vergleichbar ist.

Des Weiteren ermöglicht die ESR-Spektroskopie eine Unterscheidung von Eumelaninen und den Schwefel-haltigen Phäomelaninen. Das Spektrum von Neuromelanin zeigt Abweichungen von einem reinen Eumelanin-Spektrum und hätte mit Vorbehalten eher Charakteristika eines Phäomelanin-Spektrums. Trotzdem konnten für Neuromelanin weder mittels ESR-Spektroskopie noch mittels Pyrolyse-GC-MS Anzeichen für heterocyclische 1,4-Benzothiazin-Untereinheiten entdeckt werden (Enochs et al., 1993a; Dzierzega-Leczna et al., 2004).

Ist Neuromelanin ein Schwefel-haltiges Melanin?

Die Frage, ob Neuromelanin Schwefel enthält, ist bis heute ein kontroverses Thema. Nach Behandlung von Neuromelanin mit HI oder mit KMnO_4 wurde auf 5-S-Cysteinyl-dopamin als eine weitere mögliche Vorstufe geschlossen (Carstam et al., 1991). Fornstedt und Carlsson konnten (Fornstedt et al., 1986; Fornstedt und Carlsson, 1989) 5-S-Cysteinyl-dopamin unter anderem auch in der Substantia nigra verschiedener Vertebraten lokalisieren, weshalb eine Inkorporation von 5-S-Cysteinyl-dopamin in Neuromelanin plausibel erschien. Auch die Elementaranalyse von humanem Neuromelanin ergab einen Schwefelgehalt von 2.3 %. Neuromelanin wurde in Folge als ein Mischpolymer aus Eu- und Phäomelanin vorgeschlagen (Odh et al., 1994), allerdings erhielt man unter Verwendung der selben Analyse-methode keine Hinweise auf den Einbau von 5-S-Cysteinyl-dopamin (Wakamatsu et al., 1991).

Erst kürzlich wurden bei einer umfassenden Analyse von Neuromelanin über Pyrolyse-GC-MS niedermolekulare Schwefelverbindungen gemessen (Dzierzega-Leczna et al., 2004). Verglichen mit synthetischem 5-S-Cysteinyl-dopamin-Melanin, das Benzothiazin-Derivate aufwies, fand man in humanem Neuromelanin keine derartigen schwefelhaltigen, heterocyclischen Verbindungen. Inwieweit Schwefel tatsächlich in Strukturelemente von Neuromelanin inkorporiert wird oder von Proteinen herrührt, die entweder mit dem Neuromelanin-Gerüst assoziiert sind oder daran kovalent gebunden sind, ist bislang unklar.

Neuromelanin als Eisen-bindender Naturstoff

Nicht zuletzt der hohe Gehalt von Fe^{3+} in Substantia-nigra-Gewebe (Earle, 1968; Riederer et al., 1985; Dexter et al., 1987; Riederer et al., 1989), sondern auch die Bindung von Eisen an synthetisches Dopaminmelanin haben Spekulationen über eine direkte Bindung von Eisen an Neuromelanin genährt (Ben-Shachar et al., 1991). Vor allem aber bestätigten charakteristische ESR-Signale für Fe^{3+} in Neuromelanin-Proben die Bindung von Fe^{3+} an das Neuromelanin-Gerüst (Enochs et al., 1993a; Enochs et al., 1994). Der Eisengehalt von isoliertem humanem Neuromelanin wurde je nach Untersuchungsmethode mit 2.8 ± 1.4 % (w/w) (Mössbauerspektroskopie), 1.5 % (w/w) (AES, Atomemissionsspektroskopie) bzw. mit 0.92 % (w/w) (Röntgenfluoreszenzspektroskopie) beziffert (Zecca und Swartz, 1993; Aime et al., 1994; Gerlach et al., 1995; Bolzoni et al., 2002).

Anspruchsvolle Methoden wurden angewandt, um die Beschaffenheit der Eisenbindenden Reste oder Domänen von Neuromelanin aufzuklären und so neue Erkenntnisse über die Struktur von Neuromelanin gewinnen zu können. Vergleichende Untersuchung an synthetischem Melanin und isoliertem humanem Neuromelanin mittels XAFS-Messungen ("X-ray absorption fine-structure spectroscopy") (Kropf et al., 1998) ergaben, dass dreiwertiges Eisen in beiden Melanin-Typen von zwei chinoiden Liganden quadratisch planar komplexiert und zu einem „verzogenen“ Oktaeder hydratisiert ist.

⁵⁷Fe-Mössbauer-Spektroskopie (Gerlach et al., 1995; Galazka-Friedman et al., 1996; Friedman et al., 1996; Double et al., 2000), eine in der Aufklärung vieler eisenhaltiger Systeme bewährte Methode, gab neben der Anwesenheit von paramagnetischem high-spin-Fe³⁺ auch Hinweise auf superparamagnetisches Material, das Ähnlichkeiten mit den Eisenoxyhydroxy-Partikeln in Ferritin oder Hämosiderin aufweist. Diese superparamagnetischen Eisenpartikel wurden in nativem Neuromelanin auch mittels magnetischer Suszeptibilitätsmessungen nachgewiesen (Bolzoni et al., 2002). Anders als im Dopaminmelanin-Modell, in dem hauptsächlich einzelne Eisenionen gebunden sind, ist Eisen in Neuromelanin vorwiegend in einem dreidimensionalen Netzwerk organisiert.

Neuere Untersuchungen – Weitere Strukturmerkmale von Neuromelanin

Untersuchungen von isoliertem nativem Neuromelanin durch verschiedenste Techniken ergaben ein komplexeres Bild von Neuromelanin, das von den ursprünglichen Befunden eines reinen Dopamin- oder Cysteinyl-dopamin-Polymers abweicht (Enochs et al., 1993a; Double et al., 2000). Man musste erkennen, dass viele Kontroversen um die Struktur von Neuromelanin auf der Unvereinbarkeit von synthetischen Melaninen mit nativem Neuromelanin beruhen. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass Neuromelanin aus catecholaminergen Neuronen mit Melaninen der Haut nicht vergleichbar ist.

Umfassende spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchungen ergaben Hinweise auf langkettige Alkylverbindungen, die mit großer Wahrscheinlichkeit kovalent an das Neuromelanin-Gerüst gebunden sind (Zecca et al., 1992; Aime et al., 1994; Aime et al., 1996). Bereits die Summenformel (C_{24.3}H_{34.2}N_{2.7}O_{10.7}S_{1.0}) zeigt ein für Melanine ungewöhnlich hohes H/C-Verhältnis (Zecca et al., 1992). Allerdings konnte lange Zeit nur Cholesterol (5 % Anteil) eindeutig identifiziert werden. Neuere Studien bestätigten Hinweise auf langkettige Alkylketten, die in Form von C₁₄-C₁₈-Fettsäuren an Neuromelanin gebunden sein dürften. Außerdem konnten große Mengen des Dolichol-ähnlichen Limonens identifiziert werden (Dzierzega-Leczna et al., 2004). Aufgrund der

Abwesenheit von ^{31}P -Signalen in ^{31}P -NMR-Spektren wurden Phospholipide als Matrixkomponenten ausgeschlossen (Aime et al., 1996). Über Festkörper- ^{13}C -NMR wurden charakteristische Signale für Polysaccharide gemessen.

Neuere Daten ergaben erstmals Hinweise auf eine Proteinkomponente, die möglicherweise ein zusätzliches, für natives Neuromelanin charakteristisches Strukturmerkmal darstellen könnte (Aime et al., 2000). Trotz der Behandlung von isoliertem humanem Neuromelanin mit Proteasen, Detergentien und organischen Lösungsmitteln waren wiederholt Aminosäuren nachweisbar (Double et al., 2000; Zecca et al., 2000). Die Isolierung und Charakterisierung davon abgeleiteter Proteine konnte bislang aber nicht realisiert werden, da diese Proteine durch Einlagerung in das Neuromelanin-Gerüst schwer zugänglich sind oder kovalent daran gebunden sein dürften.

Aus den gesammelten Daten dieser Untersuchung wurde für die Struktur von Neuromelanin ein Gerüst aus Indolringen vorgeschlagen, an dem möglicherweise auch uncyclisierte 5-S-Cysteinyl-dopamin-Reste, unterschiedliche langkettige Fettsäuren und Isoprenyl-Verbindungen beteiligt sind (Zecca et al., 1992; Dzierzega-Lecznar et al., 2004). Von diesen Verbindungen konnte bislang Dolichol identifiziert werden (Fedorow et al., 2005b).

1.5 Die Biologie von Neuromelanin

1.5.1 Vorkommen und Morphologie von Neuromelanin-Granula

Interessanterweise ist das Auftreten von Neuromelanin hauptsächlich auf das menschliche Gehirn und auf das der Primaten beschränkt (Abb. 3). Nagetiere, und somit die gängigsten Labortiere, haben kein Neuromelanin. Bei den Primaten ist sogar folgender phylogenetischer Zusammenhang zu verzeichnen: das Ausmaß der Pigmentierung des Hirnstammes nimmt zu, je größer evolutionär gesehen die Verwandtschaft der Spezies zum Menschen ist. Beim Menschen erreicht die Pigmentierung der Substantia nigra ein Maximum (Marsden, 1961a). Allerdings ist selbst bei Primaten das Vorkommen von Neuromelanin lediglich auf wenige Gehirnregionen beschränkt, von denen die Substantia nigra und der Locus coeruleus deutlich

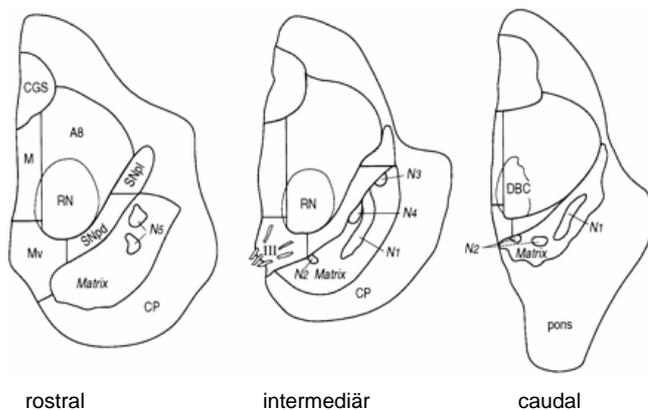
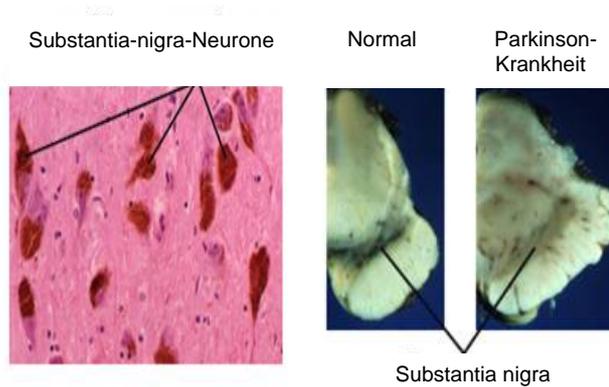


Abbildung 3: Überblick über Subkompartimente des Mittelhirns. CGS = Zentrale graue Substanz; M = Mediale Gruppe; Mv = Medioventrale Gruppe; A8 = dopaminerge Gruppe A8; SNpd = Substantia nigra pars dorsalis; SNpl = Substantia nigra pars lateralis; N = Nigrosom; RN = Roter Kern; DBC = Decussatio brachium conjunctivum (ein Kleinhirnstiel, Verbindung zum Cerebellum); CP = cerebrales Pedunculus; III = Dritter cranialer Nervenstrang (Damier et al., 1999).

hervorzuheben sind; alle anderen Dopamin-produzierenden (Nerven-)Zellen weisen keine Pigmentierung auf, so zum Beispiel auch die Nebennierenrinde. Neugeborene haben eine gänzlich unpigmentierte Substantia nigra. Die Bildung von Neuromelanin im menschlichen Kinderhirn setzt erst ab dem dritten bis fünften Lebensjahr ein (Fenichel und Bazelon, 1968).

Mithilfe elektronenmikroskopischer Studien über die Morphologie der Substantia-nigra-Neurone an humanen und an Makaken-Hirnen lokalisiert man das Pigment in membranumgebenen granulären Kompartimenten im neuronalen Zellkörper (Duffy und Tennyson, 1965; Moses et al., 1966; Hirosawa, 1968; Schwyn et al., 1970). Man erkennt Bereiche hoher Elektronendichte, die als das eisenhaltige Pigment Neuromelanin angesehen werden. Demnach ist das Pigment in einen Bereich mittlerer Elektronendichte eingelagert, der als eine hauptsächlich aus Proteinen zusammengesetzte Matrix beschrieben wird. An der Peripherie der Granula befinden sich vakuolenartige Bereiche niedriger Elektronendichte, die vermutlich Lipide enthalten. Ob nun diese Neuromelanin-

Granula tatsächlich von einer Membran umhüllt sind, ist nicht restlos geklärt. Die Studie am Makaken-Gehirn zeigt deutlich eine Membran im Sinne einer Lipiddoppelschicht, die das Kompartiment komplett umgibt (Hirosawa, 1968). Auch Aufnahmen von humanem Gehirn belegen diese Membran (Moses et al., 1966). Ursachen dafür, dass bei den meisten Aufnahmen allerdings keine Membran erkennbar ist, könnten an den höheren *Post-mortem*-Zeiten liegen oder daran, dass eine Perfusion von humanem Gewebe aus ethischen Gründen ausgeschlossen ist und daher ultrastrukturelle Qualitätsverluste in Kauf zu nehmen sind.

Diese elektronenmikroskopischen Studien gaben zwar Einblick in die Morphologie der Neuromelanin-Granula, konnten jedoch bis heute keine Vorläufer-Organelle beschreiben. Theorien über die Entstehung von Neuromelanin-Granula sind vielfältig und umfassen die Umwandlung des Alterspigments Lipofuszin in Neuromelanin (Barden, 1969), die Inaktivierung von Lysosomen, die Beteiligung von Autophagosomen zur Aufnahme des autoxidativ gebildeten Melanins (Zecca et al., 2001a), sowie eine Beteiligung von Mitochondrien (Schwyn et al., 1970).

1.5.2 Neuromelanin – mehr als „nur“ ein Abfallprodukt

Ebenso wenig wie sich die Genese der Granula aus den elektronenmikroskopischen Studien erschließt, können daraus fundierte Aussagen über die zelluläre Rolle des Pigments abgeleitet werden. Neuromelanin wird daher als ein „Abfallprodukt“ des Dopaminstoffwechsels angesehen (Mann et al., 1977; Graham, 1979; Bogerts, 1981). Da allerdings nicht alle dopaminergen Neurone des humanen Gehirns pigmentiert sind (Bogerts, 1981; Kastner et al., 1992), liegt der Grund dafür wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Genexpression in pigmentierten und unpigmentierten dopaminergen Neuronen und regt die Frage an, welche physiologische Bedeutung das Pigment Neuromelanin für diese Art von Neuronen hat.

1.5.3 Die Rolle von Neuromelanin bei der Parkinson-Krankheit

Nach derzeitigem Verständnis ist Neuromelanin in den Neuronen der Substantia nigra das einzige Speicher-System für große Mengen an Eisen, da Ferritin oder ähnliche Eisen-hältige Proteine in diesen Neuronen nicht nachgewiesen werden konnten (Zecca et al., 2001b; Zecca et al., 2004b) und daher als Eisenspeicher glialer Strukturen angesehen werden. Bei der Parkinson-Krankheit beobachtet man allerdings einen signifikanten Anstieg des Eisengehalts in der Substantia nigra (Riederer et al., 1985; Sofic et al.,

1991), die Neuromelanin-Granula wurden als Ort der selektiven Akkumulation von Fe^{3+} identifiziert (Riederer et al., 1992; Jellinger et al., 1992; Sofic et al., 1991; Good et al., 1992).

EXKURS – DIE PARKINSON-KRANKHEIT

Die Parkinson-Krankheit ist neben der Alzheimer-Krankheit die häufigste neurologische Erkrankung älterer Menschen. Betroffen sind ca. 1 % der 60-Jährigen und bereits 3 % der 80-Jährigen, wobei insgesamt etwa 0.3 % der Gesamtbevölkerung an der Parkinson-Krankheit leiden.

Die bahnbrechenden Arbeiten von Ehringer und Hornykiewicz (Ehringer und Hornykiewicz, 1960; Bernheimer et al., 1973) sowie von Bernheimer (Bernheimer et al., 1973) haben maßgeblich zu unserem heutigen Verständnis der Parkinson-Krankheit beigetragen. Die Parkinson-Krankheit (Idiopathisches Parkinson-Syndrom, IPS) ist eine chronisch fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, deren Pathologie zu Beginn vermutlich periphere Systeme, wie das olfaktorische und das autonome Nervensystem (Del Tredici et al., 2002; Gurevich und Korczyn, 2005; Ahlskog, 2005), beeinträchtigt und über den Hirnstamm in das Gehirn hochsteigt (Braak et al., 2003; Przuntek et al., 2004). Dabei wird die Parkinson-Krankheit erstmals in Form schwerer Bewegungssymptome (Rigor, Tremor, Akinese) klinisch manifest. Diese Bewegungsstörungen korrelieren mit dem Absterben der Dopamin-produzierenden, melanierten Neurone der Substantia nigra pars compacta, das zu einer kritischen Verminderung der Dopamin-Konzentration im Putamen und im Nucleus Caudatus führt.

Während diese pathologischen Veränderungen im Zuge der Parkinson-Krankheit bereits gut charakterisiert wurden, sind die tatsächlichen Mechanismen, die letztendlich zu diesem selektiven Absterben der Neuromelanin-haltigen Neurone führen, unklar. Unverstanden ist, dass dabei vor allem jene Nervenzellen zu Grunde gehen, die das braun-schwarze Pigment Neuromelanin enthalten, wohingegen die nicht pigmentierten, dopaminergen Neurone wesentlich weniger betroffen sind (Hirsch et al., 1988). Obwohl immer mehr Veränderungen in Gen- und regulatorischen Se-

quenzen mit „Parkinsonismus“ assoziiert werden können, weichen die Symptome und das frühzeitige Auftreten jener „familiären“ Fälle beträchtlich von der wesentlich häufiger auftretenden „sporadischen“ Form der Parkinson-Krankheit ab, so dass der tatsächliche genetische Einfluss beim IPS nach wie vor schwer abzuschätzen ist (Gasser, 2001; Huang et al., 2004). Die Ursachen für „sporadische“, „idiopathische“ Fälle werden daher in einem komplexen Netzwerk aus genetischen und umweltbedingten Faktoren gesucht, deren Interaktionen zu einer Fülle von pathobiochemischen Phänomenen bei der Parkinson-Krankheit führen. Diese umfassen z.B. einen defekten oder fehlerhaften Protein-Abbau durch das Proteasom, die Aggregation von Proteinen wie α -Synuclein unter Bildung von Lewy-Körpern, die Schädigung der mitochondrialen Atmungskette und vermehrte Bildung von freien Radikalen, einen massiv gestörten Eisenstoffwechsel, eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase, eine gesteigerte Bildung von toxischem NO, Exzitotoxizität, Apoptose, inflammatorische Reaktionen und eine Verminderung des neurotrophen Supports (Hoehn und Yahr, 1967; Youdim et al., 1989; Fahn und Cohen, 1992; Gerlach et al., 1996; Jenner und Olanow, 1996; Youdim und Riederer, 1997; Bringmann et al., 2002; Jellinger, 2002; Berg und Riederer, 2004; Zecca et al., 2004a; Grunblatt et al., 2004).

Es ist bis heute unklar, ob Neuromelanin aufgrund der hohen Affinität zu Fe^{3+} sowie zu anderen toxischen Schwermetallen und zu (organisch-)chemischen Toxinen eine neuroprotektive Rolle spielt, oder ob es gerade aus diesem Grund zur Neurodegeneration beiträgt. Aufgrund der Anreicherung von redoxaktiven Schwermetallen im Neuromelanin-Gerüst ist eine schädigende Wirkung durch entstehende freie Radikale (ROS, reaktive Sauerstoff-Spezies) nicht auszuschließen (Berg et al., 2001; Enochs et al., 1993a). Man nimmt an, Neuromelanin hätte zunächst eine protektive Wirkung für diese Neurone, würde aber nach einer noch nicht näher charakterisierten Veränderung des Neuromelanin-Gerüsts eine schädigende Wirkung ausüben (Youdim et al., 1994; Double et al., 2002). Inzwischen gibt es Hinweise auf Veränderungen des Neuromelanin-Gerüsts von Parkinson-Patienten, die diese Meinung unterstützen (Bolzoni et al., 2002).

1.6 Kontroverse um die Bildung von Neuromelanin:

Autoxidation oder enzymatische Biosynthese?

Bis heute ist unklar, wie Neuromelanin im Gehirn entsteht. Nach der derzeit vorherrschenden Meinung geht man von einer autoxidativen Polymerisierung von überschüssigem Dopamin zu einem zellulären Abfallprodukt aus (Barden, 1969; Mann und Yates, 1974; Rodgers und Curzon, 1975; Sulzer et al., 2000; Liang et al., 2004). Viele dieser *In-vitro*-Daten schlagen eine nicht-enzymatische Bildung eines Neuromelanin-ähnlichen Polymers aus Dopamin vor, das entweder spontan (Rodgers und Curzon, 1975; Graham, 1979; Rabey und Hefti, 1990) oder unter Einfluss von Metallionen gebildet wird (Graham et al., 1978; Linert und Jameson, 2000).

Als entscheidend für die Entstehung von Neuromelanin wird dabei die cytosolische Konzentration von Dopamin angesehen (Sulzer et al., 2000). Diese sei in jenen Neuronen dann besonders hoch, wenn Dopamin nicht in ausreichendem Maße in die synaptischen Vesikel aufgenommen wird. Die Aufnahme von Dopamin in die synaptischen Vesikel wird über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) bewerkstelligt. Pigmentierte Neurone der Substantia nigra pars compacta hätten folglich VMAT2 in niedrigerer Menge exprimiert als vergleichsweise weniger stark pigmentierte Neurone (Liang et al., 2004).

Die Pigmentierung der humanen Substantia nigra wird demnach indirekt über die Mengenverhältnisse und Aktivitäten sämtlicher Dopamintransporter kontrolliert, über die sich die jeweilige cytosolische Dopaminkonzentration ergibt. Überschüssiges cytosolisches Dopamin wird durch Autoxidation zu einem unlöslichen Pigment unschädlich gemacht (Zecca et al., 2003).

1.6.1 Argumente für eine enzymatische Biosynthese

Obwohl die derzeit favorisierte Meinung einen autoxidativen Polymerisierungsprozess für Neuromelanin vorschlägt, konnten zahlreiche Arbeitsgruppen Hinweise auf eine enzymatische Biosynthese von Neuromelanin vorlegen (Marsden, 1961b, 1961c; Okun et al., 1971; Patel et al., 1971; Miranda et al., 1984). Die Tatsache, dass bislang kein Protein eindeutig in einen kausalen Zusammenhang mit der Entstehung von Neuromelanin gebracht werden konnte und auch Tyrosinase – das Schlüsselenzym in der Melanogenese der Haut – in der Substantia nigra nicht eindeutig nachweisbar ist (Ikemoto et al., 1998),

verlieh der Annahme einer rein zufälligen Bildung von Neuromelanin weiterhin Auftrieb. Dennoch können mit diesem Konzept folgende Beobachtungen nicht erklärt werden:

- I. Gehirne von Nagetieren weisen kein Neuromelanin auf. Neuromelanin tritt in erster Linie in den Gehirnen von Primaten – und dabei in höchster Ausprägung im Gehirn des Menschen – auf, was als ein phylogenetischer Zusammenhang gewertet wird (Marsden, 1961a; Usunoff et al., 2002).
- II. Zahlreiche Gruppen catecholaminerger Neurone zeigen teils große Variationen im Gehalt von Neuromelanin. Dabei reichen die unterschiedlichen Phänotypen von Neuronen mit hohem Pigmentierungsgrad über Neuronen mit mittelmäßiger Pigmentierung zu jenen dopaminergen Neuronen, die kein Neuromelanin enthalten (Kastner et al., 1992).
- III. Anders als Lipofuszin ist Neuromelanin kein Alterspigment, da es im Kinderhirn bereits nach dem dritten bis fünften Lebensjahr gebildet wird (Fenichel und Bazelon, 1968; Usunoff et al., 2002). Allerdings nimmt die Konzentration im Verlauf des Alterungsprozesses zu (Zecca et al., 2002).
- IV. Parkinson-Patienten zeigen selbst nach lange andauernder therapeutischer Behandlung mit der Dopamin-Vorstufe L-DOPA (Levodopa[®]) in den unterschiedlich mit Neuromelanin beladenen Nervenzellen keinen erhöhten intrazellulären Neuromelanin-Gehalt (Kastner et al., 1992).
- V. Wie ESR-, IR-, NMR-Spektren und Pyrolyse-GC-MS-Daten zeigen, ist das *in vitro* generierte Polymerisationsprodukt einer Dopamin-Autoxidation weder mit isoliertem humanem Neuromelanin, noch mit Melaninen der Haut vergleichbar (Enochs et al., 1993; Double et al., 2000; Dzierzega-Leczna et al., 2004).
- VI. Bolzoni et al. lieferten erstmals substantielle Daten, die eine signifikante Veränderung der Struktur von Neuromelanin im Falle der Parkinson-Krankheit nahe legen. Dabei kommt es zu beträchtlichen Veränderungen hinsichtlich der Eisenpartikel, deren abweichendes magnetisches Verhalten messbar ist (Bolzoni et al., 2002).
- VII. Zur Therapie der Parkinson-Krankheit transplantierte fötale, d.h. nicht pigmentierte, dopaminerge Zellen sind bereits wenige Monate nach deren Transplantation pigmentiert (Hagell und Brundin, 2001; Check, 2002). Dies geht

aus der *post mortalen* Obduktion dieser Gehirne hervor und könnte Hinweis auf eine regulierte Induktion der Pigmentierung sein.

- VIII. Mehrere Gruppen betonen das Vorhandensein noch nicht charakterisierter Neuromelanin-assoziiierter Proteine (Aime et al., 2000; Double et al., 2000; Zecca et al., 2000). In Analogie zu der Beobachtung, dass Melanin-synthetisierende Enzyme in das wachsende Polymer-Gerüst eingelagert oder daran kovalent gebunden werden (Zeise, 1995), kann auch für Neuromelanin-assoziierte Proteine eine bedeutende physiologische Rolle für die Neuronen-selektive Synthese von Neuromelanin in Erwägung gezogen werden.
- IX. Bei der Beobachtung der zeitlichen Entwicklung von Neuromelanin-Granula erscheinen diese im Alter von drei Jahren als hellbraune Organellen, die erst in den weiteren Jahren eine Verdunkelung aufweisen. Dieses Detail könnte ein weiteres Indiz für eine kontrollierte Biosynthese von Neuromelanin in den vom Cytosol abgegrenzten Kompartimenten sein (Fenichel und Bazelon, 1968).
- X. In vielen Catecholamin-speichernden Kompartimenten (bovine chromaffine Granula) oder catecholaminergen Zellen (PC12-Zellen) mit cytosolischen Catecholamin-Konzentrationen im Bereich von 50-500 μM (Mosharov et al., 2003) findet keine Melanisierung statt.
- XI. Beim Rett-Syndrom, einer schweren Entwicklungsstörung, ist der zelluläre Gehalt von Neuromelanin verringert, obwohl die pigmentierten Neurone nicht degenerieren (Jellinger, 2003).

Um zu einer Vorstellung einer etwaigen enzymatischen Biosynthese von Neuromelanin zu gelangen, ist es angebracht, das System der Melanosomen, jener Organellen, in denen die Pigmentierung der Haut und der Retina unter enzymatischer Kontrolle abläuft, im Überblick zu betrachten.

1.6.2 Die Entstehung von Hautmelanin in Melanosomen

Melanosome sind morphologisch und funktionell gesehen einzigartige Zellorganellen in den Melanozyten. In diesen Organellen findet die Synthese und Speicherung von Melanin statt. Auf morphologischer Ebene lassen sich vier Reifungsstadien von Melanosomen abgrenzen (Seiji et al., 1961; Seiji et al., 1963; Hearing, 2005) (Abb. 4):

Phase I: „Prämelanosom“, morphologisch schwer abgrenzbare sphärische Vakuole mit Verwandtschaft zu Lysosomen.

Phase II: „Prämelanosom“, ellipsenförmige Organelle mit charakteristischer longitudinal gestreifter Struktur zwischen den beiden Polen ohne Melaninablagerung (Berson et al., 2003; Yasumoto et al., 2004).

Phase III: Organellen mit beginnender Pigmentablagerung entlang der gestreiften Strukturen.

Phase IV: Organellen, die vollständig von Melanin ausgefüllt sind.

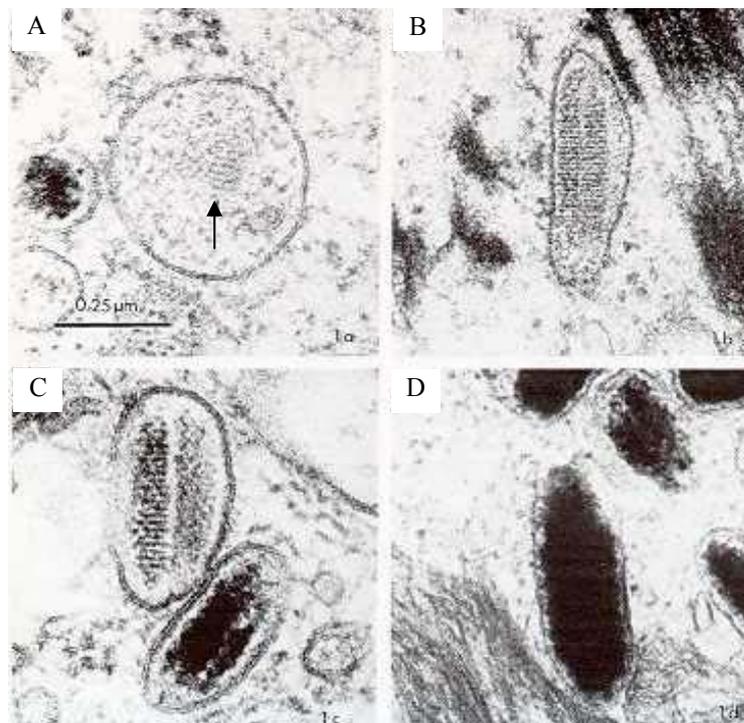


Abbildung 4: Reifungsstadien von Melanosomen. (A) Phase-I-Prämelanosom in charakteristischer sphärischer Form. Teilweise treten bereits filamentartige Strukturen auf (Pfeil). (B) Das Phase-II-Prämelanosom, eine ellipsenförmige Organelle, enthält bereits Filamente. (C) In Phase III ist die Matrix des Melanosoms bereits teilweise melanisiert. (D) In Phase IV ist die Organelle vollständig von Melanin ausgefüllt (www.euronet.nl/users/hnl/matrix.jpg).

1.6.3 Die enzymatische Maschinerie zur Melanin-Biogenese der Haut

Genetische Untersuchungen zur Entstehung der zahlreichen Phänotypen in der Farbe des Felles von Labormäusen konnten eine Vielzahl an Genen und nicht kodierenden Sequenzen ausfindig gemacht werden, die einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung des jeweiligen Farbphänotyps haben. So kennt man derzeit etwa 127 Genprodukte, die als Teil eines hochkomplexen Regulationsnetzwerks an der Pigmentierung von Haut und Haar beteiligt sind (Bennett und Lamoreux, 2003). Während viele dieser Faktoren eher eine untergeordnete Rolle spielen dürften, gibt es ein Enzym, das beim Prozess der Pigmentierung von ausschlaggebender Bedeutung ist: erst nach korrekter Expression von Tyrosinase kann Melanogenese in der Haut stattfinden.

Tyrosinase (EC 1.14.18.1 und EC 1.10.3.1) ist eine Monooxygenase mit breitem Substratspektrum, die zwei verschiedene Reaktionen katalysiert: die *ortho*-Hydroxylierung eines Monophenols (Hydroxylase-Aktivität) und die Umwandlung eines *ortho*-Diphenols in das korrespondierende *ortho*-Chinon (Cooksey et al., 1997). Für die Melanogenese katalysiert dieses Enzym die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-DOPA, aber auch die Oxidation von L-DOPA zu L-DOPAchrom. Mutationen, aber auch Störungen in der Prozessierung von Tyrosinase, können zu ausbleibender oder nur sehr schwach ausgeprägter Pigmentierung führen [Okulokutaner Albinismus Typ 1 & 2 (OCA-1 & -2)] (Tomita et al., 1989; Giebel et al., 1991; Oetting und King, 1999).

1.6.4 Mögliche Enzyme zur Bildung von Neuromelanin

Die Beteiligung von **Tyrosinase** (Monophenol-Monooxygenase, EC 1.14.18.1) wird seit langer Zeit auch für die Biosynthese von Neuromelanin diskutiert. In Arbeiten an transgenen Mäusen, die hinter dem Promotor für Tyrosinase ein Reportergen tragen, wurde eine Genaktivität in der Substantia nigra beschrieben (Tief et al., 1998). Bald darauf wurde auch von der Expression der Tyrosinase-mRNA in der humanen Substantia nigra berichtet (Xu et al., 1997). Bislang konnte jedoch Tyrosinase mit immunhistochemischen Methoden nicht eindeutig detektiert werden (Ikemoto et al., 1998). Ob Tyrosinase oder verwandte Proteine bei der Bildung von Neuromelanin eine Rolle spielen, wird zu klären sein.

Tyrosin-Hydroxylase (TH, Tyrosin-3-monooxygenase, EC 1.14.16.2) selbst, das Schlüsselenzym in der Biosynthese der Neurotransmitter Dopamin und Noradrenalin,

würde eine mit Tyrosinase vergleichbare L-DOPA-Oxidase-Aktivität besitzen und könnte so an der Biosynthese von Neuromelanin beteiligt sein (Haavik, 1997).

Prostaglandin-H-Synthase (EC 1.14.99.1) wird unter anderem im Gehirn exprimiert und metabolisiert dort Arachidonsäure. Dieses Enzym enthält Aktivitäten sowohl für Cyclooxygenase als auch für Peroxidase. Co-Faktoren für diese Peroxidase-Aktivität weisen Phenol- oder Catechol-Einheiten auf. Catecholamine wurden daher als endogene Co-Faktoren vorgeschlagen (Sih et al., 1970) und sollten bei der Umsetzung von Arachidonsäure oxidiert werden. Diese Oxidation von Dopamin durch Prostaglandin-H-Synthase konnte *in vitro* gezeigt werden (Hastings, 1995; Mattammal et al., 1995).

Des Weiteren wird das Protein **“macrophage migration inhibitory factor”** (MIF, EC 5.3.2.1) für die Neuromelaninsynthese vorgeschlagen, da es eine Phenylpyruvat-Tautomeraseaktivität besitzt (Rosengren et al., 1997) und dadurch auch die Oxidation von Catecholaminen bewerkstelligen kann (Matsunaga et al., 1999).

Für **Xanthinoxidase** (EC 1.1.3.22) (Foppoli et al., 1997) und sämtliche Peroxidasen, wie **Lactoperoxidase** (EC 1.11.1.7), **Myeloperoxidase** (EC 1.11.1.7) und **mikrosomale Vitamin D3 25-Hydroxylase** (Segura-Aguilar, 1996), ein Protein der mitochondrialen **Cytochrom P450-Familie** (EC 1.14.), die *in vitro* Dopamin oxidieren können, wurden eine Beteiligung in der Biosynthese von Neuromelanin vorgeschlagen.

Diese Vorschläge für Neuromelanin-bildende Enzyme basieren meist auf immunhistochemischen Daten und daraus abgeleiteten Hypothesen oder beruhen auf biochemischen *In-vitro*-Tests ohne Möglichkeit auf funktionelle Überprüfung *in vivo*.

Der Umstand, dass derzeit kein geeignetes Testsystem oder ein Modellorganismus verfügbar ist, an dem die Biogenese von Neuromelanin studiert werden kann, erschwert die Suche nach melanogenen Enzymen. Labortiere wie Ratte und Maus haben keine pigmentierte Substantia nigra (Marsden, 1961a). Auch sind Neurone in Primärkultur kaum für diese Zwecke verwendbar, da sie als post-mitotische Zellen nicht vermehrbar sind.

Aufgrund dieser schwierigen Situation ist ein völlig anderer methodischer Analyseansatz notwendig. Als solcher wird im Zuge dieser Arbeit die subzelluläre Proteomanalyse vorgeschlagen, die eine umfassende Analyse der Neuromelanin-assoziierten Proteine zum Ziel hat.

1.7 Subzelluläre Proteomanalyse („subcellular proteomics“)

Der Begriff „Proteom“ wurde erstmals 1994 durch Marc Wilkins in Anlehnung an den Begriff „Genom“ geprägt. Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine eines biologischen Systems, z.B. eines Organismus, eines Organs, einer Zelle, oder einer Zell-Organelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen (Lottspeich, 1999). Während das Genom, d.h. das „Erbgut“ eines Organismus, als vorwiegend statisch gilt, ist die Zusammensetzung eines Proteoms dynamisch und unterliegt dem Einfluss äußerer und innerer Faktoren.

Diese dynamischen Veränderungen lassen sich nicht nur durch An- oder Abwesenheit eines Proteins auf quantitativer Ebene beschreiben, sondern beinhalten auch Veränderungen an der Polypeptidkette (Abb. 5). Durch posttranslationale kovalente Modifizierung eines Proteins an den Aminosäureseitenketten, beispielsweise durch Phosphorylierung, Glycosylierung, Acetylierung, etc., entstehen Isoformen eines Proteins. Es sind bereits über 300 natürlich vorkommende Modifikationen beschrieben, die an jeder proteinogenen Aminosäure stattfinden können. Aus dieser Vielfalt einer strukturellen Veränderung und einer dadurch meist veränderten Funktion eines Proteins resultiert die Komplexität eines Proteoms, die weit über der Komplexität des korrespondierenden Genoms liegt.

Im Mittelpunkt der Proteomanalyse (Abb. 5) steht die Identifizierung und Quantifizierung möglichst aller Proteine eines definierten Zustandes. Die erhaltenen Daten können für weiterführende Studien, wie etwa Funktionsanalysen oder zur Definition subzellulärer Systeme, herangezogen werden. Im speziellen Fall einer subzellulären Proteomanalyse steht eine separate Untersuchung einzelner, aus dem Zellverband isolierter zellulärer Organellen im Vordergrund. Organellen sind meist durch Membranen räumlich abgegrenzte Kompartimente einer eukaryotischen Zelle, die auf den Ablauf bestimmter zellulärer Prozesse spezialisiert sind (Abb. 6). Erst durch diese Kompartimentierung können chemische Bedingungen geschaffen werden, die (1) von jenen des Cytosols verschieden sind, und (2) den Ablauf bestimmter chemischer Reaktionen an bestimmten Orten ermöglichen oder verhindern. Organellen sind meist morphologisch, vor allem aber in biochemischer Hinsicht unterscheidbar. Die Untersuchung der Proteine, die eine bestimmte Organelle ausmachen, kann wichtige Einblicke in die enzymatische Ausstattung ermöglichen und so Aufschluss über darin

ablaufende chemische Reaktionen geben. Das Wissen über die Proteinzusammensetzung ermöglicht oftmals auch Rückschlüsse über die Entstehung der jeweiligen Organelle.

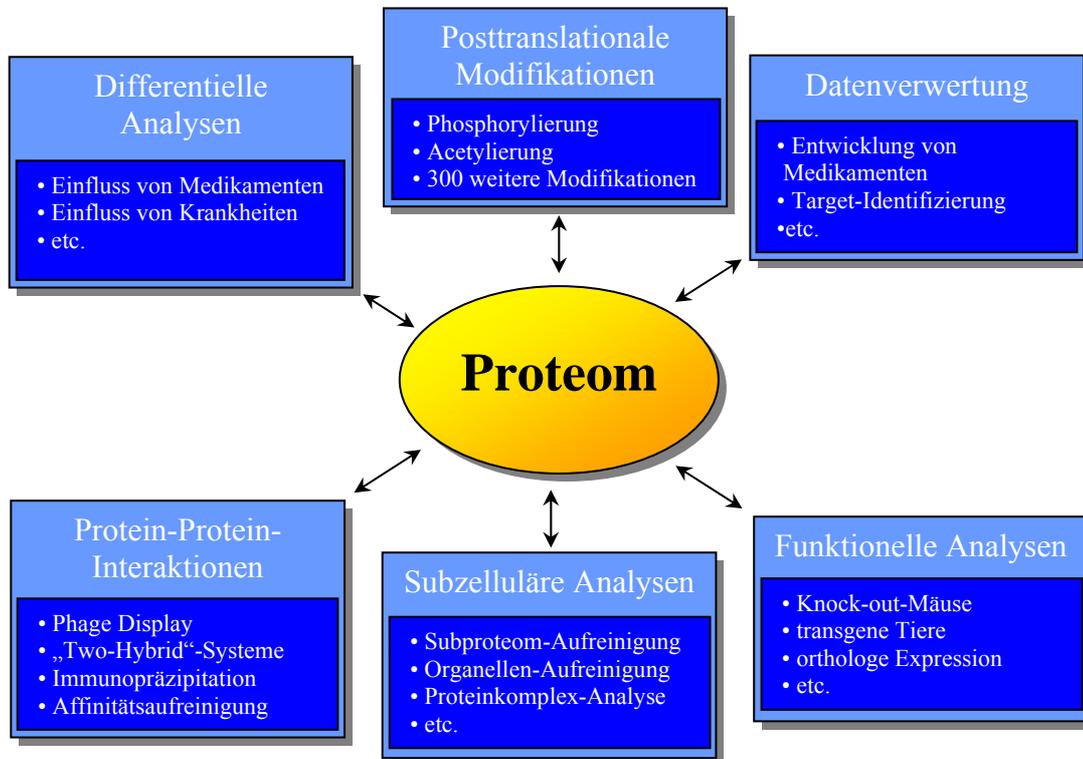


Abbildung 5: Proteomanalyse. Ein Proteom kann nach verschiedenen Gesichtspunkten analysiert werden. Die Charakterisierung posttranslatiionaler Modifikationen ist häufig Teil einer differentiellen Untersuchung. Des Weiteren können sich Protein-Interaktionsstudien oder funktionelle Studien zu einem besseren Verständnis der physiologischen Rolle der identifizierten Proteine anschließen. Durch die Kombination jener Analyseansätze können außerdem die Einflüsse von Pharmaka auf ein Proteom untersucht werden oder die Entwicklung neuer Wirkstoffe unterstützt werden.

Aufgrund des hohen Spezialisierungsgrades von Organellen haben Störungen von darin ablaufenden Prozessen oft fatale Folgen, die zu schweren Krankheiten führen können. An dieser Stelle seien z.B. die mit lysosomalen Speicherkrankheiten einhergehenden neurologischen Funktionseinbußen erwähnt, die aus Störungen des lysosomalen Katabolismus von Makromolekülen resultieren (Vellodi, 2005).

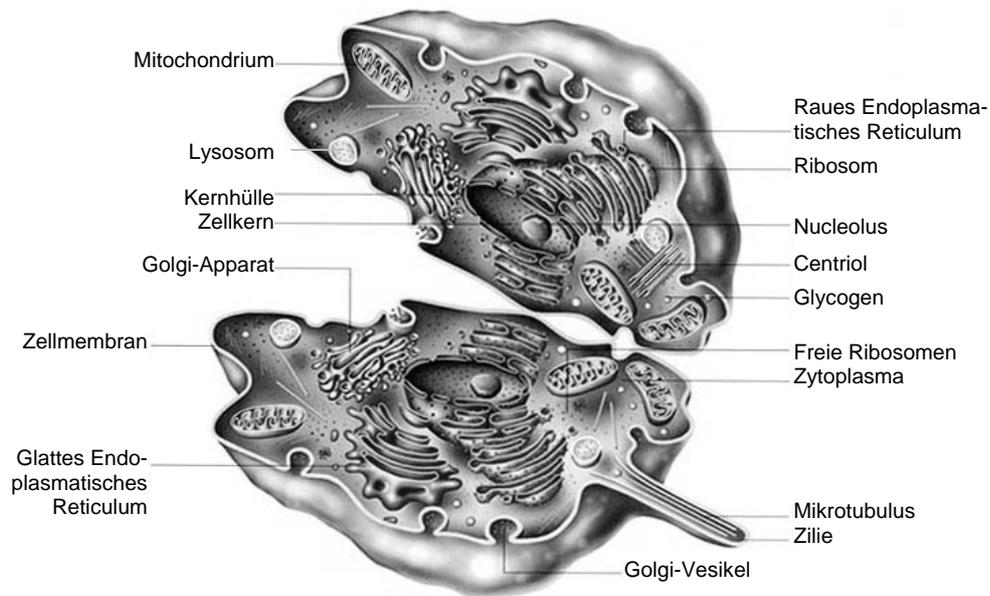


Abbildung 6: Organellen einer Säugetierzelle.

Unter diesem Gesichtspunkt ermöglicht die differentielle Proteomanalyse die Identifizierung krankheitsspezifischer Proteine oder Protein-Isoformen. Dabei macht man sich den Umstand zu Nutze, dass selbst kleine Veränderungen eines Systemparameters zu großen Unterschieden im Expressionsmuster von Proteinen führen.

1.7.1 Methoden der Proteomanalyse

Eine Analyse eines subzellulären Proteoms setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Vorerst muss die Zielorganelle in ausreichender Reinheit isoliert werden. Da selbst das Proteom einer Organelle ein sehr komplexes, heterogenes Proteingemisch darstellen kann, sollte eine weitere Auftrennung der Proteine in möglichst hoher Auflösung erreicht werden. Dabei kommen häufig elektrophoretische und chromatographische Trennmethode zum Einsatz. Im Anschluss daran erfolgt die Identifizierung der einzelnen Proteine. Häufigste Verwendung findet dabei zurzeit die Massenspektrometrie, aber auch die *N*-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau), die Aminosäure-Analyse und die Detektion mit immunologischen Methoden.

1.7.2 Isolierung intrazellulärer Kompartimente mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung

Die Analyse der Protein-Zusammensetzung eines intrazellulären Kompartiments oder einer Organelle setzt die Möglichkeit voraus, eine Zielstruktur möglichst sauber aus einem Gewebe oder einer Zelle präparieren zu können. Die „subzelluläre Fraktionierung“ spielt dabei als Methodenkomplex zur Isolierung und Aufreinigung individueller Kompartimente eine zentrale Rolle.

Prinzipiell basiert die subzelluläre Fraktionierung auf der Verwendung von Zentrifugation zur Trennung, z.B. nach dem spezifischen Gewicht, von zuvor homogenisiertem oder aufgeschlossenem biologischem Material (Melchior und Ziegler, 1956; Whittaker, 1965). Abhängig von der Beschaffenheit der Zielorganelle und dem weiteren Verwendungszweck gelingt eine Isolierung in der erforderlichen Reinheit oftmals nur durch mehrfache Fraktionierung und schrittweise Anreicherung des jeweiligen Kompartiments oder in Kombination mit weiteren Trennmethode, z.B. mit der immunologischen Präzipitation (Mura et al., 2002) oder der trägerfreien Elektrophorese (FFE, free flow electrophoresis) (Weber und Bocek, 1998; Kushimoto et al., 2001).

Entsprechend der weiterführenden Untersuchungen von intrazellulären Kompartimenten muß eine entsprechende Qualitätskontrolle der Reinheit und/oder der morphologische Integrität der Isolate erfolgen (Dreger, 2003). Speziell für den Fall einer anschließenden Proteinanalyse von Organellen mit sensitiven massenspektrometrischen Methoden sind unspezifische Protein-Verunreinigungen hinsichtlich der Plausibilitätsüberprüfung der Ergebnisse möglichst gering zu halten.

1.7.3 Massenspektrometrie von Proteinen

Bei Proteomanalysen wird häufig die Massenspektrometrie (MS) zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen herangezogen. Prinzipiell besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Dabei werden die Analyten nach ihrer Ionisierung in die Gasphase überführt, im Massenanalysator nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) getrennt und meist über einen Elektronenvervielfacher detektiert.

Die in der Proteomforschung am häufigsten verwendeten Ionisierungsstrategien sind die Elektrospray-Ionisation (ESI) (Fenn et al., 1989) und der MALDI-Prozess (MALDI,

Matrix-unterstützte Laser-Desorption/-Ionisation) (Karas und Hillenkamp, 1988). Die Elektrospray-Ionisation erlaubt eine Ionisierung der Analyten in Lösung, wodurch die Möglichkeit einer direkten Kopplung an eine Flüssigkeitschromatographie-Säule besteht (LC-MS) (Linscheid, 1990). Bei der MALDI-MS werden die Analyten mit einer Matrix auf einem Probenträger co-kristallisiert, durch UV-Laser-Beschuss ionisiert und in die Gasphase überführt.

Der Massenanalysator bestimmt maßgeblich die Empfindlichkeit, die Auflösung und die Massengenauigkeit des Messsystems. Zurzeit finden Ionenfallen- und TOF-Geräte (TOF, time of flight), aber auch Triple-Quadrupol- und FT-ICR-Instrumente (FT-ICR, Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron) als Analysatoren in der Proteomforschung Verwendung. Dabei wird der MALDI-Prozess häufig mit TOF-Analysatoren gekoppelt, während die ESI meist mit Triple-Quadrupol- oder Ionenfallen-Analysatoren kombiniert wird.

Die ESI-MS erlaubt eine schnelle Akquisition von Massenspektren und ist darüber hinaus meist zur Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) in der Lage. Mit derartigen Geräten können aus einem komplexen Ionen-Gemisch einzelne Ionen mit bestimmten m/z -Verhältnis selektioniert werden und durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID, collision induced dissociation) fragmentiert werden. Dieser Prozess wird vor allem zur Analyse von Peptidionen herangezogen, da anhand der Massenbestimmung der resultierenden Peptidfragmentionen auf die Aminosäuresequenz des ursprünglichen Mutterions geschlossen werden kann (Roepstorff und Fohlman, 1984; Biemann, 1990). Die aufgezeichneten Fragmentationenspektren (MS/MS-Spektren) zeigen Massenpeaks, deren Massendifferenz im Idealfall einer spezifischen Aminosäure zuordenbar ist.

Mittels Kopplung von ESI-MS mit HPLC können sehr komplexe Proben aufgetrennt und automatisch analysiert werden. Dabei können innerhalb einer chromatographischen Trennung mehrere hundert bis einige tausend Spektren aufgenommen werden. Die Auswertung der Peptid-Spektren erfolgt durch Suche gegen Sequenz-Datenbanken, wobei die Korrelation von detektierten mit theoretischen Massen über spezielle Suchalgorithmen erleichtert wird (Eng et al., 1994; Perkins et al., 1999; Zang et al., 2000).

Mit massenspektrometrischen Methoden kann inzwischen ein komplexes Protein- oder Peptidgemisch in einer Analysezeit von wenigen Stunden gemessen werden. Durch die Möglichkeit der kollisionsinduzierten Dissoziation erhält man wertvolle Sequenz-

Informationen, über die ein Protein in den meisten Fällen eindeutig identifiziert werden kann. Außerdem gelingt über die Massenspektrometrie die Identifizierung etwaiger posttranslationaler Modifikationen, über die spezielle Isoformen eines Proteins charakterisierbar sind (Aebersold und Goodlett, 2001).

2 HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG

2.1 Hypothese

Aus dieser einleitenden Beschreibung der Problematik um das neuronale Pigment Neuromelanin wird die Hypothese abgeleitet, dass die Biosynthese von Neuromelanin über Enzyme oder spezifische Proteine kontrolliert wird und in speziellen subzellulären Kompartimenten stattfindet.

2.2 Zielsetzung

Die hohe klinische Relevanz der vermuteten Beteiligung von Neuromelanin an den Pathomechanismen der Parkinson-Krankheit machen tiefere Einblicke in die physiologische Rolle dieses Pigments wünschenswert. Da zurzeit keine adäquaten Testsysteme zur Verfügung stehen, sind funktionelle Studien zur Entstehung von Neuromelanin in den dopaminergen Neuronen der humanen Substantia nigra nicht durchführbar. Biomimetische Studien zur Bildung von Melaninen im Allgemeinen haben in der Vergangenheit ihre Inkompatibilität dahingehend gezeigt, dass synthetische Melanine keineswegs mit der hochkomplexen Struktur nativer Melanine vergleichbar sind. Dennoch wird derzeit eine autoxidative Polymerisation von Dopamin als Bildungsmechanismus für Neuromelanin akzeptiert.

Im Gegensatz dazu sprechen inzwischen viele Argumente für eine enzymatische Kontrolle der Melanogenese des menschlichen Hirnstamms, z.B. das phylogenetische Auftreten von Neuromelanin-haltigen Kompartimenten in höheren Säugetieren, aber auch die Tatsache, dass nicht alle dopaminerge Zellpopulationen des entsprechenden Organismus dieses Pigment ausbilden.

Bisherige Versuche waren größtenteils auf immunhistochemische Analysen von Proteinen beschränkt, deren Beteiligung an der Pigmentbiosynthese vermutet wurde. Einen alternativen globaleren Analyseansatz dazu stellt die Analyse jener Proteine dar, die an Neuromelanin gebunden sind. Durch Kenntnis dieser Proteine könnten Fortschritte in der Frage nach der Herkunft dieses Pigments erzielt werden, aber auch die physiologische Rolle von Neuromelanin beschrieben werden.

Ziel dieser Arbeit war es,

1. die Proteinmatrix der Neuromelanin-Granula zu isolieren und zu charakterisieren,
2. die subzelluläre Organelle und das Kompartiment zu charakterisieren, in dem die Bildungsreaktion abläuft,
3. gegebenenfalls die Enzyme, die die Bildung von Neuromelanin möglicherweise regulieren, zu identifizieren.

Die Durchführung dieser Ziele inkludierte die Isolierung der Neuromelanin-Granula aus humanem Substantia-nigra-Gewebe mittels „subzellulärer Fraktionierung“. Die Proteine dieses Kompartiments sollten isoliert und mittels gelelektrophoretischer Trennmethoden aufgetrennt werden, um dann mittels Massenspektrometrie detektiert und identifiziert werden zu können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte und Material

Massenspektrometrie

ESI-Massenspektrometer	LCQ™ Classic, Thermo Electron, San Jose, USA
Probennehmer für HPLC	Famos™, LC Packings Dionex, Idstein, Deutschland
HPLC-Ladepumpe und Schaltventile	Switchos™, LC Packings Dionex, Idstein, Deutschland
HPLC-Vorsäulen	nano-Precolumn™, 0.3 mm I.D. × 1 mm, C18 PepMap™, 3 µm Partikelgröße, LC Packings Dionex, Idstein, Deutschland
HPLC-Vorsäulenhalter	µ-Precolumn™ holder, LC Packings Dionex, Idstein, Deutschland
nano-HPLC-Pumpe und UV-Detektor	Ultimate™, LC Packings Dionex, Idstein, Deutschland
nano-HPLC-Trennsäulen	75 µm I.D. × 15 cm, C18 PepMap™, 3 µm Partikelgröße, LC Packings Dionex, Idstein, Deutschland
Nanospray-Nadeln für ESI-MS	Pico Tip™ 100, FS360-20-10-D, New Objective Inc., Cambridge, USA
Nanospray-Quelle für ESI-MS	LTQ-ADP, New Objective Inc., Cambridge, USA
FT-ICR-Massenspektrometer	APEX-II, Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
Elektrospray-Ionenquelle	Apollo™ II ion funnel ESI source, Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland

ZipTip™-Spitzen OMIX TIP C18 MB, 10 µL, Varian, Darmstadt, Deutschland

Chromatographische Trennsysteme

Qualitative HPLC

Steuerungseinheit LC-Net/ADC, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland

Probeaufnahme-system AS-2055 Plus Intelligent Sampler, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland

Entgasungseinheit DG-80-54 Quarterny 4-line Degasser, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland

Gradientenmischer LG-2080-04 Quarterny Gradient Unit, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland

HPLC-Pumpe PU-1580, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland

Detektor MD-2010 Plus, Multiwavelength Detector, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland

Trennsäule Symmetry™, C18, 4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 µm Partikelgröße, Waters, Eschborn, Deutschland

Präparative HPLC

Pumpe und Steuerungseinheit Waters™ 600 Controller, Waters, Eschborn, Deutschland

Detektor Waters™ 996 Photodiode Array Detector, Waters, Eschborn, Deutschland

Trennsäule SymmetryPrep™, C18, 19 mm I.D. × 300 mm, 7 µm Partikelgröße, Waters, Eschborn, Deutschland

Zentrifugen

Tischzentrifuge	Haereus Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Hettich-Zentrifuge	Rotanta 96 RS, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Gelelektrophorese

1-D-PAGE	Novex™ XCELL II™ Mini Cell, Novex, San Diego, USA
Netzanschlussgerät	Consort™ Electrophoresis Power Supply E431, Consort, Turnhout, Belgien
Western-Blot-Einheit	Novex™ XCELL II™ Blot Module, Novex, San Diego, USA
Nitrocellulose-Membranen	Nitrocellulose-Membranen, 0.45 µm Porengröße, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PVDF-Membranen	PVDF-Membranen, 0.45 µm Porengröße, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
2-D-PAGE	Tube Gel Electrophoresis Unit, C.B.S. Scientific Co., Del Mar, USA
Netzanschlussgerät	Pharmacia LKB ECPS 3000/150 Power Supply, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Geldokumentationssystem	BioRad Chemi Doc, BioRad, München, Deutschland

Sonstige Geräte

Transmissionselektronenmikroskop	LEO 912 AB, LEO Elektronenmikroskopie, Oberkochen, Deutschland
UV-Spektrophotometer	CARY-50-Conc-UV-vis-Spektrophotometer, Varian, Darmstadt, Deutschland

Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotationsplattform	KS501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

3.2 Enzyme und Antikörper

Trypsin	„sequencing grade modified trypsin“, Promega, Madison, USA
Chymotrypsin	„sequencing grade chymotrypsin“, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protease K	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
PNGase F	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
BSA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Lysozym	Lysozym aus Hühnereiweiss, Fluka, Buchs, Schweiz

Primäre Antikörper

Anti „cis-Golgi matrix protein“ (GM130)	Maus-anti-Mensch IgG1, monoklonal, Klon 35, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti „induced myeloid leukemia cell differentiation protein“ (Mcl-1)	Maus-anti-Mensch IgG1, monoklonal, Klon 22, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti „early endosomal antigen 1“ (EEA1)	Maus-anti-Mensch IgG1, monoklonal, Klon 14, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Anti „integrin alpha-2“ (VLA-2 α)	Maus-anti-Mensch IgG2a, monoklonal, Klon 2, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti „nucleoporin p62“ (np62)	Maus-anti-Mensch IgG2b, monoklonal, Klon 53, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti „lysosomal associated membrane glycoprotein 1“ (LAMP-1)	Maus-anti-Mensch IgG2b, monoklonal, Klon 25, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti „clathrin heavy chain“	Maus-anti-Mensch IgG1, monoklonal, Klon 23, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti „78 kDa glucose-regulated protein“ (BiP/grp78)	Maus-anti-Mensch IgG2a, monoklonal, Klon 40, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti-Dynamin	Maus-anti-Mensch IgG2a, monoklonal, Klon sc-17807, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-Calnexin	Hund-anti-Hase, polyklonal, C-terminal 575-593, Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Anti-Cathepsin B (Ab-1)	Maus-anti-Mensch IgG2a, monoklonal, Klon CA10, Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Biotinyliertes <i>Galanthus-nivalis</i> -Agglutinin (GNA)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Anti-Tyrosinase (T311)	Maus-anti-Mensch IgG2a, monoklonal, Klon T311, MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Anti-Tyrosinase (MAT-1)	Maus-anti-Mensch IgG1, monoklonal, Klon AHT-C2-H31, POLA R&D Laboratories,

	Yokohama, Japan
Anti-Tyrosinase (C-19)	Ziege-anti-Mensch, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-Tyrosinase (H-109)	Hase-anti-Mensch, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-L-Ferritin (C-20)	Ziege-anti-Mensch, polyklonal, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Sekundäre Antikörper	
HRP-gekoppeltes Streptavidin (HRP, „horseradish peroxidase“, Meerrettich- Peroxidase)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Anti-Ziege-HRP	Maus-anti-Ziege, monoklonal, Klon GT-34, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Anti-Ziege-HRP	Esel-anti-Ziege, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-Hase-HRP (#7074)	Ziege-anti-Hase, Cell Signalling, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-Maus-HRP (#7076)	Ziege-anti-Maus, Cell Signalling, Frankfurt am Main, Deutschland
Anti-Maus-HRP	Ziege-anti-Maus, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti-Ziege, 10 nm Gold-Konjugat	Hase-anti-Ziege, polyklonal, Biotrend, Köln, Deutschland

3.3 Dopamin-Polymerisierung

3.3.1 Quantifizierung von künstlich hergestelltem Dopaminmelanin

Zur Herstellung von künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit („artificial cerebrospinal fluid“, aCSF) werden die Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und durch einen 200 µm Partikelfilter mit einer Ausschlussgrenze von 200 µm steril filtriert.

aCSF (pH 7.3)

Lösung A

296 mM NaCl

6 mM KCl

2.8 mM CaCl₂·2H₂O

1.6 mM MgCl₂·6H₂O

Lösung B

1.6 mM Na₂HPO₄·7H₂O

0.39 mM NaH₂PO₄·H₂O

- 1) 2.23 mg synthetisches Dopaminmelanin (DAM) werden eingewogen und 1 mL aCSF zugegeben.
- 2) DAM ist ein kaum löslicher Feststoff. Aus diesem Grund wird die DAM-aCSF-Mischung zur Bildung einer homogenen Suspension für 10 Minuten im Ultraschallbad beschallt.
- 3) Zur Erstellung einer Eichgerade werden aus der DAM-Suspension aliquote Volumina entnommen (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50 µL).
- 4) Anschließend werden jeweils 1 mL 1 M NaOH und 0.3 % (v/v) H₂O₂ zugegeben und das Gemisch 10 Minuten lang bei 60°C am Heizblock inkubiert. Dabei löst sich künstliches DAM vollständig auf.
- 5) Die Absorption dieser Proben wird abschließend bei 400 nm gemessen.

Herstellung von Dopaminmelanin

- 1) 10 mL der Kupfersulfat-Lösung und 100 mL der Dopamin-Lösung werden gemischt und mit PBS auf ein finales Volumen von 1 L gebracht.
Der resultierende Reaktionsansatz (1 mM Dopamin·HCl, 100 µM CuSO₄·5H₂O) wird mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt und zwei Wochen lang bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Der Kontakt der Proben mit Luftsauerstoff

wird gewährleistet, indem der Schraubverschluss der Probengefäße nicht festgezogen wird.

- 2) Das nach 2 Wochen entstandene schwarze Präzipitat wird nach Zentrifugation bei $2500 \times g$ bei Raumtemperatur 15 Minuten lang und darauf folgendem Abheben des Überstandes isoliert.
- 3) Das Dopaminmelanin wird viermal mit Milli-Q-Wasser gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift wie oben zentrifugiert wird.
- 4) Das Produkt wird anschließend gefriergetrocknet.

Kupfersulfat-Lösung

10 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Milli-Q-Wasser

Dopamin-Lösung

10 mM Dopamin·HCl

PBS

3.3.2 Polymerisierungsansätze von Dopamin

Die Polymerisierung von Dopamin erfolgt unter simulierten physiologischen Bedingungen in aCSF, pH 7.3, in einem Brutkasten bei 37°C . Die Proben werden zum Schutz vor Licht mit Aluminiumfolie umgeben. Um den Kontakt der Proben mit Luftsauerstoff zu gewährleisten, wird der Schraubverschluss der Probengefäße nicht festgezogen.

Polymerisierung von Dopamin unter Einfluss von Metallionen

4.5 mL aCSF werden in einem 15-mL-Probenröhrchen vorgelegt. Jeweils 400 μL der Metallionen-Lösungen werden in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben und die Lösung abschließend mit aCSF auf ein Endvolumen von 5 mL gebracht.

aCSF (siehe Kapitel 3.3.1)

Dopamin-Lösung (50x)

50 mM Dopamin

Milli-Q-Wasser

Eisen-III-Lösung12.5 μM FeCl_3

Milli-Q-Wasser

Kupfer-II-Lösung12.5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Milli-Q-Wasser

Eisen-II-Lösung12.5 μM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Milli-Q-Wasser

Zink-II-Lösung12.5 μM ZnCl_2

Milli-Q-Wasser

Mangan-II-Lösung12.5 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Milli-Q-Wasser

Von diesen Lösungen ausgehend werden Verdünnungen hergestellt, so dass diese Metallionen in den Polymerisierungsansätzen in finalen Konzentrationen von 1 pM, 0.1 nM, 10 nM und 1 μM vorliegen.

Polymerisierung von Dopamin unter Fenton-ähnlichen Bedingungen

4.5 mL aCSF werden in einem 15-mL-Probenröhrchen vorgelegt. Die verschiedenen Probenansätze werden nach der unten angeführten Tabelle erstellt, indem je 100 μL der jeweiligen Zusätze zugegeben werden. Abschließend werden 100 μL einer 50 mM Dopamin-Lösung zugegeben und mit aCSF auf ein Endvolumen von 5 mL aufgefüllt.

Dopamin-Lösung (50x)

50 mM Dopamin

Milli-Q-Wasser

Eisen-II-Lösung12.5 μM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Milli-Q-Wasser

Wasserstoffperoxid-Lösung10 mM H_2O_2

Milli-Q-Wasser

Zusammensetzungen der Proben zur Polymerisierung von Dopamin unter Fenton-ähnlichen Bedingungen:

Dopamin	Fe²⁺	H₂O₂
1 mM	0.1 nM	0.01 nM
1 mM	0.1 nM	0.1 nM
1 mM	0.1 nM	1 nM
1 mM	0.1 nM	10 nM
1 mM	10 nM	0.1 nM
1 mM	10 nM	1 nM
1 mM	10 nM	10 nM
1 mM	10 nM	100 nM
1 mM	-	0.1 nM
1 mM	-	1 nM
1 mM	-	10 nM
1 mM	-	100 nM

Polymerisierung von Dopamin unter Einfluss von Modellproteinen

4.5 mL aCSF werden in einem 15-mL-Probenröhrchen vorgelegt. Die verschiedenen Probenansätze werden nach der unten angeführten Tabelle hergestellt, indem je 100 µL der jeweiligen Zusätze zugegeben werden. Abschließend werden 100 µL einer 50 mM Dopamin-Lösung zugegeben und mit aCSF auf ein Endvolumen von 5 mL gebracht.

Dopamin-Lösung (50x)

50 mM Dopamin

Milli-Q-Wasser

Bovines Serum-Albumin (66 kDa)

500 µM (0.156 g/5 mL) BSA

Milli-Q-Wasser

Lysozym (14.6 kDa)

500 µM (0.0365 g/5 mL) Lysozym

Milli-Q-Wasser

Fe-III-Lösung (50x)

50 mM FeCl₃

Milli-Q-Wasser

EDTA-Lösung (50x)

250 µM Ethylendiamintetraessigsäure

Milli-Q-Wasser

Zusammensetzung der Proben zur Polymerisierung von Dopamin unter dem Einfluss von Modellproteinen:

Dopamin	Fe³⁺	BSA	Lysozym	EDTA
1 mM	10 nM	-	-	-
1 mM	10 nM	200 nM	-	-
1 mM	10 nM	1 µM	-	-
1 mM	10 nM	5 µM	-	-
1 mM	10 nM	-	-	-
1 mM	10 nM	-	200 nM	-
1 mM	10 nM	-	1 µM	-
1 mM	10 nM	-	5 µM	-
1 mM	-	-	-	-
1 mM	-	200 nM	-	-
1 mM	-	1 µM	-	-
1 mM	-	5 µM	-	-
1 mM	-	-	-	-
1 mM	-	-	200 nM	-
1 mM	-	-	1 µM	-
1 mM	-	-	5 µM	-
1 mM	-	-	-	5 µM EDTA
1 mM	-	200 nM	-	5 µM EDTA
1 mM	-	1 µM	-	5 µM EDTA
1 mM	-	5 µM	-	5 µM EDTA
1 mM	-	-	-	5 µM EDTA
1 mM	-	-	200 nM	5 µM EDTA
1 mM	-	-	1 µM	5 µM EDTA
1 mM	-	-	5 µM	5 µM EDTA
1 mM	10 nM	1 µM	1 µM	-
1 mM	-	1 µM	1 µM	5 µM EDTA

3.4 Modifizierung von Proteinen durch Dopamin

3.4.1 Herstellung von Dopamin-BSA

Eine 50 μM Lösung von bovinem Serum-Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Deutschland) wird in PBS (pH 7.4) hergestellt, welcher Dopamin-HCl (Sigma-Aldrich, Deutschland) bis zu einer finalen Konzentration von 1 mM zugegeben wird. Diese Protein-Dopamin-Lösung reagiert über Nacht bei 4°C, wobei eine braune Lösung entsteht. In dieser Lösung bilden sich bei 4°C über mehrere Monate keine Präzipitate.

3.4.2 Inkubation von Substantia-nigra-Homogenat mit Dopamin

5 μL Substantia-nigra-Homogenat werden mit verschiedenen Kombinationen von Zusätzen, wie Dopamin, Eisen-II-chlorid und Wasserstoffperoxid (jeweils 1 μL der entsprechenden Lösung) versehen und mit PBS auf ein finales Volumen von 10 μL gebracht. Diese Mischungen werden am Thermomixer bei 37°C 15, 30 und 60 Minuten oder 16 Stunden lang inkubiert. Parallelansätze werden nach 60 Minuten mit 2.5 Einheiten Protease K/Ansatz versehen. Die Proteolyse mittels Protease K (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) erfolgt 30 Minuten lang bei 37°C.

Dopamin-Lösung

10 mM Dopamin-HCl

Milli-Q-Wasser

Wasserstoffperoxid-Lösung

10 mM H_2O_2

Milli-Q-Wasser

Eisen-II-Lösung

1 mM FeCl_2

Milli-Q-Wasser

Proteinase-K-Lösung

20 Einheiten/20 μL

Milli-Q-Wasser

3.4.3 Nitroblau-Tetrazoliumsals/Formazan-Assay zur Detektion von Chinoproteinen

Dopamin-BSA wird wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben durch 1-D-SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (siehe Kapitel 3.1.1). Die Detektion von Chinoproteinen erfolgt mittels „redox-cycling“ durch Inkubation der geblotteten Membran in NBT-Lösung (NBT, Nitroblau-Tetrazoliumsals) bei Dunkelheit für 2 Stunden (Paz et al., 1991). Dabei präzipitiert rot bis violette Formazan an der Stelle seiner Entstehung.

Zur Sichtbarmachung aller Proteine wird die Membran anschließend in Ponceau-Rot (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) bei Raumtemperatur 1-2 Minuten lang inkubiert. Die überschüssige Farbe wird mit destilliertem Wasser abgewaschen.

NBT-Lösung

0.24 mM Nitroblau-Tetrazoliumsalz

2 M Kalium-Glycinat, pH 10

Probenvorbereitung für die 1-D-SDS-PAGE

Das Abstoppen der Reaktionen in den Inkubationslösungen (10 μ L) erfolgt durch Zugabe von 10 μ L des SDS-haltigen Probenpuffers („sample buffer“, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und sofortigen Schockfrierens in flüssigem Stickstoff. Diese Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Fortführung der Experimente werden die tiefgefrorenen Proben auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 μ L einer Reduktionslösung („reducing agent“, Invitrogen) werden die Proben 10 Minuten lang am Heizblock auf 95°C erhitzt, wobei die Denaturierung der Proteine und die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgen.

Probenansatz:

10 μ L Probenpuffer

10 μ L Inkubationsansätze

1 μ L Reduktionslösung

21 μ L Endvolumen

21 μ L der Probenansätze werden auf industriell gefertigte Polyacrylamidgele (Tris/Glycin-SDS-Gel, 10-20 %-Gradient, Dicke: 1 mm; Novex-Invitrogen) geladen. Die Proteine werden bei 200 V und bei 70 mA 75 Minuten lang elektrophoretisch nach ihrer Molmasse getrennt. Anschließend werden die Proteine auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Detektion etwaiger Chinoproteine erfolgt mit Hilfe des NBT/Formazan-Assays (Kapitel 3.4.3).

3.5 Modifizierung von Peptiden durch Dopamin

Folgende synthetische Modellpeptide wurden von Prof. Palm (Würzburg) zur Verfügung gestellt:

	Peptid #	Sequenz	AS-Reste	term. Acetyl.
--	117	a*-F-D-E-E-D-E-E-I	10	--
--	96-6-10	D-S-T-I-Y-A-S-Y-Y-E	10	✓
1 Cys	91-4	D-D-D-I-Q-R-F-R-E-E-F-E-R-I-C	15	✓
1 Cys	96-2	D-S-T-I-Y-A-S-Y-Y-E-C-G-G-H-G-L-S-T-G-G-Y-G-Y-D-S	25	✓
1 Cys	96-6-15	A-A-D-S-T-I-Y-A-S-Y-Y-E-C-G-H	15	✓
1 Lys	105-8	S-G-S-G-K-P-Y-R-P-W-G-T-E-I-G-A-F	17	?
2 Lys	109-1	T-E-S-P-F-K-N-T-E-I-S-F-K-L-G-Q-E-F-E-T-T-A-D-N-R	26	?
4 Lys	109-7	Y-G-G-K-A-A-L-A-K-A-A-L-A-K-A-A-L-A-K	19	✓
1 Lys	113-9	S-I-E-L-E-S-P-F-I-L-L-A-D-K	14	?
3 Lys, 1 Cys	83-6	A-S-P-D-L-S-K-L-Y-K-N-C-P-K	14	?
1 Lys, 2 Cys	102-2	G-W-N-R-G-C-F-G-L-K-L-D-R-I-G-S-M-S-G-L-G-C	22	?
1 Lys, 2 Cys	109-9-2	C-R-M-S-S-A-V-Y-S-A-D-E-S-L-S-A-H-K	18	?

*) a = β -Alanin

3.5.1 Analytische RP-HPLC zur Reinheitsüberprüfung von synthetischen Peptiden

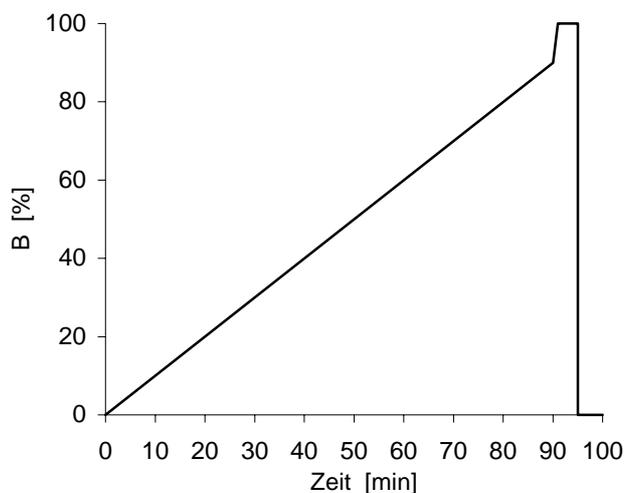
Als Vorbereitung zur Reinigung der synthetischen Peptide werden diese mittels RP-HPLC chromatographisch getrennt (Abb. 7). Auf diese Weise kann die tatsächliche Reinheit der Roh-Syntheseprodukte und die Elutionszeiten der Hauptpeaks ermittelt werden.

Die Peptide werden mit Hilfe eines HPLC-System von Jasco (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) getrennt. Das chromatographische Trennsystem wird anhand der LC-Net/ADC-Einheit (Jasco) gesteuert. Die Proben werden von einem Probeaufnahmesystem (AS-2055 Plus Intelligent Sampler) automatisch auf die Trennsäule geladen (Symmetry™, C₁₈ „reversed-phase“-Säule, 4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 µm Partikel, Waters). Das Laufmittelsystem, bestehend aus Laufmittel A und Laufmittel B, wird entgast (DG-2080-54 Quaternary 4-line Degasser), zu einem Laufmittel-Gradienten gemischt (LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit) und bei einem Fluss von 1 mL/min durch das System gepumpt (PU-1580). Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Photodioden-Array-Detektors (MD-2010 Plus, Multiwavelength Detector).

Laufmittel A: 0.1 % (v/v) TFA/Milli-Q-Wasser

Laufmittel B: 0.098 % (v/v) TFA/MeCN

Laufmittel-Gradient bei einem Fluss von 1 mL/min:



Zeit [min]	B [%]
0	0
90	90
91	100
95	100
95	0
100	0

Abbildung 7: Laufmittel-Gradient zur Reinheitsüberprüfung von synthetischen Peptiden.

Probenvorbereitung:

- 1) 0.5 mg des ungereinigten Peptides werden in ein Probengefäß eingewogen und in 50 µL 0.1 % (v/v) TFA gelöst.
- 2) Die Probengefäße werden im Probentisch platziert.
- 3) 20 µL Probe werden zur Analyse entnommen und injiziert.

3.5.2 Peptidreinigung und Isolierung mittels präparativer RP-HPLC

Trotz geringfügiger Abweichungen in den Retentionszeiten, bedingt durch den Wechsel von der analytischen auf die präparative Säule, lassen die zuvor ermittelten Retentionszeiten dennoch eine exakte Isolierung des jeweiligen Zielpeptids zu.

Mittels manueller Injektion wird das ungereinigte Peptid auf die Säule geladen (SymmetryPrep™, C₁₈ „reversed-phase“-Säule, 19 mm I.D. × 300 mm, 7 µm Partikel, Waters). Das chromatographische System wird von einer Steuerungseinheit kontrolliert, die mittels integrierter Pumpe (Waters™ 600 Controller) die Ausbildung des jeweiligen Laufmittelgradienten reguliert. Das Laufmittelsystem setzt sich aus Laufmittel A und Laufmittel B zusammen, die kontinuierlich mit Helium gespült werden. Als Detektor dient ein Photodioden-Array-Detektor (Waters™ 996 Photodiode Array Detector), der die Absorption bei 214 und 280 nm aufzeichnet.

Laufmittel A: 0.1 % (v/v) TFA/Milli-Q-Wasser

Laufmittel B: 0.098 % (v/v) TFA/MeCN

Lyophilisieren der Proben

Der MeCN-Anteil wird mittels Rotationsverdampfung am Rotavapor bei einer maximalen Temperatur von 40°C entfernt. Die nun wässrigen Proben werden in flüssigem Stickstoff gefroren und das Wasser mittels Sublimation über Nacht entfernt.

3.5.3 Peptid-Derivatisierung mit Dopamin

Die Derivatisierung der Peptide mit Dopamin erfolgt nach dem unten angeführten Schema. Nach Zugabe der jeweiligen Zusätze werden die Proben auf dem Thermomixer bei 37°C und 1150 rpm inkubiert. Nach 15, 30 und 60 Minuten werden aliquote Volumina von 25 µl entnommen. Die Reaktion wird durch schnelles Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff gestoppt.

Proben-ansätze	Finale Konzentration	#1	#2	#3	Kontrolle
Peptid	5 µM in PBS	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
„Fenton-Reagenz“	1 mM (1:1)	50 µL	50 µL	--	--
Dopamin	200 mM (1:5)	20 µL	--	20 µL	--
1 × PBS		25 µL	45 µL	75 µL	95 µL
Endvolumen		100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Wasserstoffperoxid-Lösung

100 mM H₂O₂

Milli-Q-Wasser

100mM Eisen-II-Lösung

0.0154 g FeCl₂·4H₂O

Milli-Q-Wasser

Dopamin-Lösung (5x)

1 M Dopamin-HCl

Milli-Q-Wasser

„Fenton-Reagenz“ in PBS (2x)

2 mM H₂O₂

200 µM FeCl₂·4H₂O

Milli-Q-Wasser

3.5.4 Peptid-Analyse mittels Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie

Die Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) gilt als Methode zur hochauflösenden Massenbestimmung von Biopolymeren (Marshall et al., 1998). Das FT-ICR-Massenspektrometer (APEX-II, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) ist mit einem Magneten ausgestattet, der ein Magnetfeld von 7.4 Tesla generiert. Das Gerät ist außerdem mit einer Elektrospray-Ionenquelle (Apollo™ II, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) ausgestattet, deren Kapillaraustrittsspannung auf 100 V gesetzt wird. Als Spray- und Trockengas wird Stickstoff verwendet, dessen Temperatur 130°C beträgt. Die Proben werden mit MeOH/H₂O/Essigsäure [49.5/49.5/1 (v/v)] auf eine Konzentration von etwa 0.1 µg/ml verdünnt und mit einer Flussrate von 2 µl/min appliziert. Die Steuerung des Systems sowie die Auswertung der Daten erfolgt anhand der Xmass-Software (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Zur Datenerfassung werden 64 Messungen zu je 0.5 Sekunden akkumuliert. Die Auflösung beträgt dabei etwa 25000. Detektiert wird in einem Messbereich von 200 bis 2000 m/z. Der Druck in der Messzelle beträgt etwa 8×10^{-11} mbar.

Probenvorbereitung – Entsalzung mittels ZipTip™-Spitzen

Die gründliche Entsalzung der Peptidproben ist für die anschließende massenspektrometrische Untersuchung essentiell, da vor allem Natriumionen beim Ionisierungsprozess mittels Elektrospray störend wirken. Die in PBS gelösten Proben werden durch Zugabe von 10 % (v/v) TFA zu einem finalen Gehalt von 1 % (v/v) angesäuert. Zur Entsalzung werden 10-µL-ZipTip™-Spitzen verwendet (OMIX TIP C18 MB, 10 µL, Varian). Diese Spitzen sind im Inneren mit einer C₁₈-Matrix ausgekleidet und erlauben, analog zur RP-HPLC, die Adsorption der Peptide bei niedrigem Anteil organischen Lösungsmittels, sowie die Elution der Peptide bei hohem Anteil organischen Lösungsmittels. Die Entsalzung der Peptide erfolgt nach den folgenden Arbeitsvorschriften:

Entsalzungsvorschrift für ESI-MS

Arbeitsschritt	Lösungsmittel	Volumina
Befeuchten	MeCN/Wasser, 50/50	1 × mit 10 µL
Äquilibrieren	0.1 % (v/v) TFA	3 ×
Adsorbieren der Probe	Proben-Lösung (PBS)	10 ×
Waschen	0.1 % (v/v) TFA	5 ×
Eluieren	Methanol/Wasser/Essigsäure (49.5/49.5/1)	3 × mit je 10 µL

Entsalzungsvorschrift für MALDI-MS

Arbeitsschritt	Lösungsmittel	Volumina
Befeuchten	MeCN/Wasser, 50/50	1 × mit 10 µL
Äquilibrieren	1 % (v/v) TFA	3 ×
Adsorbieren der Probe	Proben-Lösung (PBS)	10 ×
Waschen	0.1 % (v/v) TFA	5 ×
Eluieren	MeCN/0.1 % (v/v) TFA (70/30)	3 × mit je 10 µL

3.6 Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten

- 1) 4- μ m-Schnitte von in Paraffin eingebettetem Gewebe werden am Mikrotom angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen.
- 2) Die Gewebeschnitte werden in weiterer Folge durch folgende Inkubationssequenz entparaffiniert:

Inkubationszeit [min]	Lösungsmittel
10	30 % (v/v) Xylol
10	30 % (v/v) Xylol
5	100 % EtOH
5	96 % (v/v) EtOH
5	70 % (v/v) EtOH
5	Milli-Q-Wasser

- 3) Die Gewebeschnitte werden 10 Minuten lang auf einer Heizplatte getrocknet. Anschließend wird das Gewebe großzügig mit dem „Fettstift“ (PapPen™) umrandet. Durch diese künstliche Lipid-Barriere wird um das Gewebe ein Bereich geschaffen, der für die weiteren Schritte ein Zerfließen der Inkubationslösungen auf dem gesamten Objektträger verhindern soll und so einen optimalen Kontakt der Inkubationslösungen mit dem Gewebe gewährleistet.
- 4) Zur Wiederherstellung möglicherweise durch die Fixierung und Paraffinbehandlung des Gewebes zerstörter Antigenizitäten („antigen retrieval“) werden die Gewebeschnitte nun in Glasküvetten, die mit Citrat-Puffer gefüllt sind, transferiert und durch Mikrowellenbestrahlung bei 600 W 5 Minuten lang behandelt. Dabei soll ein Überkochen der Pufferlösung vermieden werden. In keinem der Arbeitsschritte nach dieser Mikrowellenbehandlung sollen die Gewebeschnitte austrocknen.
- 5) Die Gewebeschnitte werden zum Abkühlen 10 Minuten lang in TBS und anschließend in Milli-Q-Wasser überführt.
- 6) Zur Inaktivierung endogener Peroxidase-Aktivitäten werden die Schnitte 15 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Peroxidase-Blocklösung inkubiert und anschließend kurz mit TBS gespült.

- 7) Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen werden die Gewebeschnitte 20 Minuten lang mit gebrauchsfertigem Ziegen Serum überschichtet („proteinblock“ HK112-9K, Biogenex, Hamburg, Deutschland).
- 8) Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wird das Ziegen Serum (ohne weiteren Spülens) abgekippt. Die Schnitte werden nun mit 100-200 µL der jeweiligen Antikörperverdünnung überschichtet. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C in einer Kammer mit erhöhter Luftfeuchtigkeit, um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern. Dafür werden feuchte Papiertücher in das Aufbewahrungsgefäß der Schnitte gelegt.
- 9) Folgende Arbeitsvorschrift wird für die Inkubation mit den sekundären Antikörpern eingehalten:

Inkubationszeit [min]	Lösungsmittel
2 × 5	TBS
25	„Link-Antikörper“ [†] in TBS
2 × 5	TBS
25	„Labelling-Antikörper“ ^{††} in TBS
2 × 5	TBS

(^{†,††} MultiLink-Kit-Konzentrat, LP000-UL, Biogenex, Hamburg, Deutschland)

- 10) Pro Schnitt werden der Größe des Gewebeareals entsprechend etwa 100-200 µL AEC-Färbelösung verwendet. Die Farbentwicklung ist nach 2 Minuten abgeschlossen.
- 11) Die Schnitte werden nun in TBS und Milli-Q-Wasser gespült.
- 12) Die Sichtbarmachung der Zellkerne erfolgt durch Inkubation in Hämalaun 1 Minute lang. Die blaue Farbe entwickelt sich unter fließendem Leitungswasser (5 Minuten).
- 13) Die Schnitte werden nochmals in Milli-Q-Wasser gespült und abschließend mit einem Deckglas eingedeckt. Da AEC in EtOH löslich ist, wird unter Verwendung von wässrigem Aquatex™ eingedeckt.

10 mM Citrat-Puffer, pH 6.0Lösung A

100 mM Citronensäure-Monohydrat

Lösung B

100 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

9.5 mL Lösung A und 41.5 mL Lösung B werden gemischt und mit Milli-Q-Wasser auf ein Endvolumen von 1 L gebracht.

TBS

20 mM Tris/HCl, pH 7.5

137 mM NaCl

Peroxidase-Blocklösung0.7 % (v/v) H₂O₂AEC-Färbelösung

(MultiLink-Kit-Konzentrat, LP000-UL, Biogenex)

(Ansatz für 30 Schnitte)

1 mL 5x Substratpuffer

4 mL Milli-Q-Wasser

2 Tropfen AEC-Lösung (AEC, Aminoethylcarbazol)

3.7 Isolierung von Neuromelanin-Granula mittels subzellulärer Fraktionierung

Substantia-nigra-Gewebe

Substantia-nigra-pars-compacta-Gewebe wurde von der österreichisch-deutschen Hirnbank, Würzburg, zur Verfügung gestellt. Das Arbeiten mit humanem *Post-mortem*-Gewebe wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg genehmigt. Das Substantia-nigra-Gewebe wurde innerhalb von 36 Stunden *post mortem* aus Gehirnen von Verstorbenen ohne neurologische oder neurodegenerative Erkrankungen auf einer Kühlplatte bei -15°C seziiert.

Gewebedesaggregation und Zellfraktionierung

- 1) 1 g Substantia-nigra-Gewebe wird in „Separationspuffer“ auf Eis aufgetaut.
- 2) Auf einer Kühlplatte (4°C) wird das Gewebestückchen anschließend durch ein Siebgewebe in eine Petrischale gepresst. Auf diese Weise wird das Gewebe auf besonders schonende Weise zu einer Zellsuspension desaggregiert.
- 3) Nach dem unten angeführten Schema wird ein vier-stufiger Saccharose-Stufengradient (Schichten von 0.5 M, 1.0 M, 1.2 M, 1.6 M Saccharose) hergestellt.
- 4) Diese Zellsuspension wird über den Saccharosegradienten geschichtet und 15 Minuten lang bei $2000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert.

„Separationspuffer“

10 mM Hepes, pH 6.0
 10 % (w/v) Glucose
 1 % (w/v) Ficoll
 100 mM KCl

„Isolierungspuffer“

10 mM Hepes, pH 7.4
 1 mM EDTA
 10 % (w/v) Saccharose
 100 mM KCl
 1 % (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail

„Waschpuffer“

10 mM Hepes, pH 7.4
 250 mM NaCl
 0.01 % (v/v) Triton-X-100

<u>Saccharose-Stammlösung</u>	<u>Hepes/KCl-Stammlösung</u>
2 M Saccharose	100 mM Hepes, pH 7.4
	100 mM KCl

Schema zur Erstellung eines vier-stufigen Saccharose-Gradienten:

Saccharose-Gradient	0.5 M	1.0 M	1.2 M	1.6 M
Hepes/KCl-Stammlsg.	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Saccharose-Stammlsg.	12.5 mL	25 mL	30 mL	40 mL
H₂O	32.5 mL	20 mL	15 mL	5 mL
Endvolumen	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

Zellaufschluss und subzelluläre Fraktionierung

- 1) Nach der Zentrifugation durch den Saccharose-Gradienten wird der Überstand abgehoben, das braune Zellpellet zweimal mit eiskaltem „Isolierungspuffer“ gewaschen und in 750 µL „Isolierungspuffer“ resuspendiert.
- 2) Der Zellaufschluss erfolgt durch 10-maliges Aufziehen der melanisierten Zellkörper durch die Nadel einer Spritze (I.D. = 450 µm), wobei die Bildung von Luftblasen möglichst vermieden wird.
- 3) Das so generierte Zellhomogenat wird über ein Percoll-Kissen [80 % (v/v)] geschichtet und 10 Minuten lang bei 4000 × g und 4°C zentrifugiert.
- 4) Das braun gefärbte Pellet wird einmal mit „Isolierungspuffer“ und zweimal mit „Waschpuffer“ gewaschen, um unspezifisch assoziierte Proteine weitgehend zu entfernen. Zur weiteren Aufbewahrung werden die Isolate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur morphologischen Qualitätskontrolle der isolierten Neuromelanin-Granula wird die elektronenmikroskopische Evaluierung herangezogen.

- 1) Die Isolate werden über Nacht in 2 % (v/v) Glutaraldehyd, 0.1 M PBS, pH 7.4 bei 4°C fixiert. Ein weiterer Fixierungsschritt erfolgt durch Inkubation in 1 ml 2 % (w/v) OsO₄, 1.5 % (v/v) Glutaraldehyd, 0.1 M PBS, pH 7.4 eine Stunde lang in Dunkelheit.
- 2) Um eine möglichst vollständige Entfernung der Fixierlösungen zu erreichen, werden die Proben einmal kurz mit Milli-Q-Wasser gewaschen und anschließend dreimal jeweils 15 Minuten lang mit Milli-Q-Wasser versehen.
- 3) Die anschließende Dehydrierung der Proben erfolgt durch Zugabe von wässrigen Ethanol-Lösungen mit ansteigendem Ethanol-Gehalt:

Inkubationszeit [min]	EtOH-Gehalt [%]
10	30
10	50
10	70
10	80
10	90
10	96
10	100 ^[a]
10	100 ^[a]

[a] 100 % (v/v) EtOH wurde über Cu₂SO₄ getrocknet.

- 4) Zur Einbettung der Proben in Epon werden diese zweimal für 15 Minuten in Propylenoxid, über Nacht in einem Gemisch von Propylenoxid und Epon (1:1) inkubiert und anschließend zweimal jeweils 2 Stunden lang mit Epon überschichtet. Das vollständige Polymerisieren des Epon-Harzes erfolgt über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 55-65°C.
- 5) Für die Transmissionselektronenmikroskopie werden von diesen Präparaten Schnitte angefertigt, die abschließend mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert werden.

3.9 Immuno-Transmissionselektronenmikroskopie

- 1) Die Isolate werden als Immersion über Nacht in 0.1 M PBS, pH 7.4, 2 % (v/v) Paraformaldehyd, 0.1 % Glutaraldehyd bei 4°C fixiert.
- 2) Anschließend werden die Proben einmal kurz mit Milli-Q-Wasser gewaschen und dreimal jeweils 15 Minuten lang mit Milli-Q-Wasser gespült.
- 3) Die Proben werden, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, mit Ethanol-Lösungen entwässert.
- 4) Zur Einbettung der Proben wird das Harz LR White™ verwendet. Die Proben werden insgesamt dreimal mit frischem Harz versehen: der erste Wechsel des Harzes erfolgt nach 1 Stunde, danach werden die Proben mit frischem LR White™ überschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert und abschließend mit frischem LR White™ in Gelatine-Kapseln überführt.
- 5) Zur vollständigen Polymerisierung und Härtung des Harzes werden die Präparate 2-3 Tage bei 4°C mit UV-Licht bestrahlt. Von den ausgehärteten Proben werden Schnitte hergestellt und auf Metallnetzchen überführt.

Auf die Einbettung der Proben folgen die Schritte zur Inkubation mit dem primären und einem Gold-konjugiertem sekundären Antikörper:

„Inkubationspuffer“

10 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.4
 150 mM NaCl
 0.1 % (w/v) BSA
 20 mM NaN₃

„Inaktivierungslösung“

50 mM PBS, pH 7.4
 50 mM Glycin

„Blocklösung“

50 mM PBS, pH 7.4
 5 % (w/v) BSA
 0.1 % (w/v) CWFS-Gelatine
 5 % (w/v) Normal-Serum (aus Hase)

- 6) Da die Proben in den oben genannten Schritten mit Paraformaldehyd und Glutaraldehyd fixiert worden sind, werden etwaige noch reaktive Aldehydgruppen

in der Glycin-haltigen „Inaktivierungslösung“ 15 Minuten lang derivatisiert und inaktiviert.

- 7) Die Proben werden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in der „Blocklösung“ 30 Minuten lang inkubiert und anschließend dreimal jeweils 5 Minuten lang mit dem „Inkubationspuffer“ gewaschen.
- 8) Die Inkubation mit dem primären Antikörper [1:800 (v/v), 20 µL] erfolgt über Nacht bei 4°C.
- 9) Anschließend werden die Proben mittels Auflage der Netzchen auf Tropfen von „Inkubationspuffer“ insgesamt sechsmal jeweils 10 Minuten lang gewaschen.
- 10) Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper [Hase-anti-Ziege IgG, 1:40 (v/v) in „Inkubationspuffer“, 10 nm Goldpartikel] erfolgt für einen Zeitraum von 2 Stunden.
- 11) Das anschließende Waschen der Proben erfolgt sechsmal jeweils 5 Minuten lang mittels Auflage der Netzchen auf Tropfen von „Inkubationspuffer“.
- 12) Des Weiteren werden die Proben dreimal 5 Minuten lang mit 0.1 M PBS, pH 7.4 gewaschen, und die Antikörper-Antigen-Komplexe mit 0.1 M PBS, 2 % Glutaraldehyd (v/v), pH 7.4 quervernetzt. Abschließend werden die Proben dreimal 2 Minuten lang mit Milli-Q-Wasser gewaschen und kontrastiert.

3.10 Gelelektrophorese

3.10.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen in einer Dimension werden verschiedene kommerziell erhältliche Gel-/Puffer-Systeme (Invitrogen) verwendet: klassische Tris/Glycin-Gele, Tricin-Gele („Schägger-Gel“) (Schägger und von Jagow, 1987), die im niedermolekularen Bereich eine besonders gute Trennung ermöglichen, oder Bis-Tris-Gele, die sich gut zur massenspektrometrischen Analyse von Peptiden nach tryptischem Verdau im Gel eignen. Als Molmassen-Marker werden die Produkte „Mark-12“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und die „Protein Ladder 10-200 kDa“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

3.10.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen (2-D) Gelelektrophorese werden Proteine zuerst mittels isoelektrischen Fokussierens (IEF) nach ihrer Ladung (pI-Wert) getrennt, bevor die Proteine in der zweiten Dimension mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Molmasse (MM) getrennt werden (Abb. 8) (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Auf diese Weise ist eine höhere Auflösung und bessere Trennung komplexer Proteinmischungen möglich. Diese Methode eignet sich aber auch bestens für eine detaillierte Darstellung der Heterogenität eines Proteintyps.

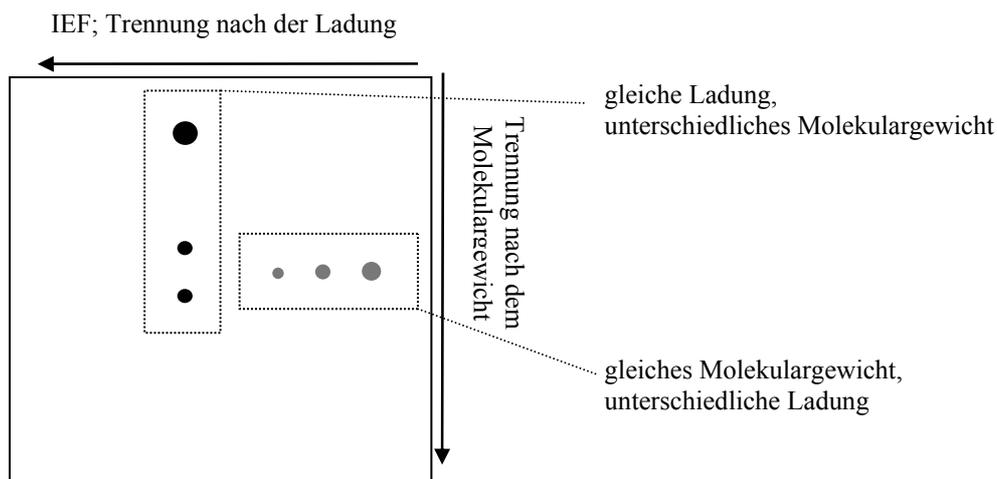


Abbildung 8: Trennprinzip der 2-D-Gelelektrophorese. Die 2-D-Gelelektrophorese ermöglicht mittels zweier aufeinander folgender Trennprinzipien eine höhere Auflösung komplexer Proteinmischungen. Bei der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine nach ihrer Ladung (pI-Wert) in einem pH-Gradienten getrennt. Anschließend erfolgt vertikal dazu die Trennung nach der Molmasse (MM). Auf diese Weise können Proteinisoformen (graue Population), die sich z.B. in posttranslationalen Modifikationen unterscheiden, getrennt werden.

Isoelektrisches Fokussieren - verwendete Stammlösungen

- 1) 5 g des Ionenaustauschers Amberlite (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) werden mit 50 mL Milli-Q-Wasser gewaschen, mit Hilfe eines Faltenfilters filtriert und anschließend mehrmals mit Milli-Q-Wasser gespült.
- 2) Gewaschenes Amberlite wird der Acrylamid/PDA-Lösung (PDA, Piperazin-Diacrylamid) zugegeben [4 % (w/v)] und 1 Stunde lang gerührt.
- 3) Anschließend wird der Ionenaustauscher zügig mit Hilfe eines Whatman-Filters filtriert, um Verschiebungen des pH-Werts zu verhindern.

Zusammensetzung des Trenngels

9 M Harnstoff

5.1 % (w/v) Glycerin

3.59 %/0.31 % (w/v) Acrylamid/PDA-Lösung (entionisiert)

0.06 % (v/v) TEMED

4.1 % Ampholin (Ampholin-Stammlösung)

Milli-Q-Wasser

Glycerin-Lösung

28.6 % (w/v) Glycerin

Milli-Q-Wasser

Acrylamid/PDA-Lösung für das Trenngel

17.5 % (w/v) Acrylamid

1.5 % (w/v) Piperazin-Diacrylamid (PDA)

Milli-Q-Wasser

- 1) Harnstoff wird mit der vorbereiteten Glycerin-Lösung und der entionisierten Acrylamid/PDA-Lösung eingewogen, mit wenig Milli-Q-Wasser vermischt und bei 30°C gelöst.
- 2) Anschließend erfolgt die Zugabe von TEMED und der Ampholin-Stammlösung.
- 3) Der Trenngel-Ansatz wird mit Hilfe eines Whatman-Glasfaserfilters filtriert und in 2 mL Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

Acrylamid/PDA-Lösung für das „Cap“-Gel

60.0 % w/v Acrylamid

0.65 % w/v PDA

Milli-Q-Wasser

- 1) 5 g des Ionenaustauschers Amberlite (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) werden mit 50 mL Milli-Q-Wasser gewaschen, mit Hilfe eines Faltenfilters filtriert und dabei mehrmals mit Milli-Q-Wasser gespült.
- 2) Gewaschenes Amberlite wird der Acrylamid/PDA-Lösung zugegeben [6 % (w/v)] und 1 Stunde lang gerührt.
- 3) Anschließend wird der Ionenaustauscher zügig mit Hilfe eines Whatman-Filters filtriert.

Zusammensetzung des „Cap“-Gels

9 M Harnstoff

5.13 % (w/v) Glycerin

12.3 %/0.13 % (w/v) Acrylamid/PDA-Lösung (entionisiert)

0.06 % (v/v) TEMED

4.1 % Ampholin (Ampholin-Stammlösung)

Milli-Q-Wasser

Zusammensetzung der Ampholin-Stammlösung:

Ampholin	pH-Bereich	Menge [% (v/v)]
„Pharmalyt 3.5-10.0“	3.5-10.0	12.5
„Pharmalyt 4.0-6.5“	4.0-6.5	37.5
„Pharmalyt 5.0-8.0“	5.0-8.0	25.0
„Servalyt 2.0-11.0“	2.0-11.0	12.5
„Servalyt 6.0-9.0“	6.0-9.0	12.5

- 1) Harnstoff wird mit der vorbereiteten Glycerin-Lösung und der entionisierten Acrylamid/PDA-Lösung eingewogen, mit wenig Milli-Q-Wasser vermischt und bei 30°C gelöst.
- 2) Danach erfolgt die Zugabe von TEMED und der Ampholin-Stammlösung.
- 3) Der Trenngel-Ansatz wird mit Hilfe eines Whatman-Glasfaserfilters filtriert, in 750 µL Aliquots aufgeteilt und bei –80°C gelagert.

APS-Lösung

(zur isoelektrischen Fokussierung)
 1.2 % (w/v) Ammoniumpersulfat
 Milli-Q-Wasser

DTT-Stammlösung

21.6 % (w/v) DL-Dithiothreitol
 Milli-Q-Wasser

Harnstoff/Glycerin-Lösung

(für die IEF-Schutzlösung)
 5 M Harnstoff
 5.3 % (w/v) Glycerin
 Milli-Q-Wasser

IEF-Schutzlösung

30 %/5 % (w/v) Harnstoff/Glycerin-
 Lösung
 5 % (v/v) „Servalyt 2.0-4.0“

- 1) Zur Herstellung der Harnstoff/Glycerin-Lösung werden Harnstoff, Glycerin und Milli-Q-Wasser eingewogen. Harnstoff wird bei maximal 30°C gelöst.
- 2) Zur Herstellung der IEF-Schutzlösung wird „Servalyt 2.0-4.0“ bis zu einer finalen Menge von 5 % (v/v) der Harnstoff/Glycerin-Lösung zugegeben.
- 3) Die resultierende IEF-Schutzlösung wird in aliquote Mengen zu 100 µL geteilt und bei –80 °C gelagert.

Tris-Puffer

1 M Tris-Base
 mit Phosphorsäure auf pH 6.8

„Inkubationslösung“

125 mM Tris-Puffer (pH 6.8)
 40 % (w/v) Glycerin
 65 mM DTT
 3 % (w/v) SDS

- 1) Die „Inkubationslösung“ in aliquoten Mengen zu 7 mL Aliquots bei –20°C lagern.

Anodenlösung

0.02 N NaOH

Kathodenlösung

0.085 % H₃PO₄

Reinigung der Glasröhrchen

Vor Gebrauch werden die Glasröhrchen nach folgender Arbeitsvorschrift gereinigt:

- 1) 6 % (v/v) Deconex (Borer Chemie AG, Zuchwil, Schweiz) wird auf 60-80°C erwärmt und die Glasröhrchen darin 30 Minuten lang gelagert.
- 2) Anschließend werden die Glasröhrchen mit Leitungswasser gespült.
- 3) Danach werden die Glasröhrchen 30 Minuten lang in 0.1 M HCl (95°C) gelegt.
- 4) Abschließend werden die Glasröhrchen mit Milli-Q-Wasser gespült. Zur vollständigen Entfernung von Flüssigkeitsresten werden die Röhrchen mit Druckluft getrocknet.

Gießen der IEF-Röhrchengele

- 1) Die Lösungen für das Trenngel und das „Cap“-Gel werden bei maximal 30°C aufgetaut, die APS-Lösung bei RT.
- 2) Die PE-Fäden (PE, Polyethylen) werden durch die Glasröhrchen gezogen. Dabei wird das untere Ende eines PE-Fadens vorsichtig geschmolzen und rasch in das Röhrchen gezogen (Abb. 9), um dieses innen gut abzudichten.
- 3) Zu 2 mL Trenngellösung werden 51 µL APS-Lösung pipettiert und gut gemischt.
- 4) Die Glasröhrchen werden in die fertig gemischte Trenngellösung getaucht, dann werden die PE-Fäden bis zur ersten Markierung hochgezogen.
- 5) Zu 750 µL „Cap“-Gellösung werden 15 µL pipettiert und gut gemischt.
- 6) Die Glasröhrchen werden nun in die „Cap“-Gellösung getaucht, und die PE-Fäden werden bis zur zweiten Markierung hochgezogen.
- 7) Die Glasröhrchen werden von anhaftender Gellösung getrocknet und die PE-Fäden bis zur dritten Markierung hochgezogen.
- 8) Die Gele werden 25 Minuten lang zur Polymerisierung senkrecht ruhen gelassen, ehe die Fäden vollständig herausgezogen werden.

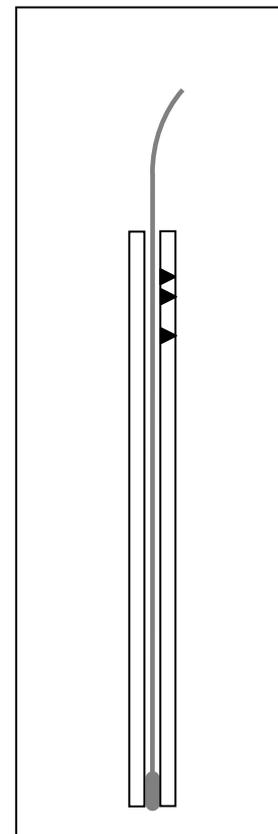


Abbildung 9: Gießen der IEF-Röhrchen.

- 9) Abschließend werden die Röhrchengele in ein feuchtes Tuch eingeschlagen und in einer Kunststoffolie verstaut, worin sie innerhalb von 3-4 Tage vollständig polymerisieren.

Vorbereitung der Laufkammer und Probenapplikation

- 1) Die Elektrodenlösungen werden vor ihrer Verwendung an der Wasserstrahlpumpe unter Rühren etwa 30 Minuten lang entgast.
- 2) Inzwischen werden die Röhrchengele in die Gummikonusse der IEF-Apparatur (C.B.S. Scientific, Del Mar, CA, USA) geschoben, so dass das „Cap“-Gel nach unten weist.
- 3) Die Kathodenlösung wird in die untere Kammer der Apparatur gefüllt, Luftblasen werden von der Röhrchenöffnung entfernt.
- 4) Die Proben werden aufgetaut und mit Harnstoff, DTT und „Servalylt 2.0-4.0“ vermengt.
- 5) Mit einer Pasteur-Pipette wird die Probe luftblasenfrei auf das Gel geschichtet.
- 6) Die Probe wird etwa 1-2 mm hoch mit der IEF-Schutzlösung überschichtet.
- 7) Zuletzt wird die IEF-Schutzlösung mit der Anodenlösung überschichtet.
- 8) Abschließend befüllt man die obere Kammer der Apparatur mit der Anodenlösung auf, so dass diese die Gele etwa 1 cm bedeckt.

Für die IEF wurde folgender Spannungsgradient angewandt:

Spannung [V]	Zeit [min]
100	75
200	75
400	75
600	75
800	10
1000	10

Abbruch des IEF-Laufs

- 1) Die „Inkubationslösung“ wird aufgetaut. Parafilm™ wird in ausreichend große Stücke geschnitten und V-förmig der Länge nach gefaltet, so dass ein Röhrchengel in voller Länge in der Rinne Platz finden kann.
- 2) Die Glasröhrchen werden aus der Apparatur genommen und kurz abgetrocknet.
- 3) Nun die werden Gele mittels vorsichtig auf die vorbereiteten Parafilm™-Stücke gepresst. Die Gele sollten dabei weder Schlaufen bilden noch gedehnt werden. Um die Orientierung des Röhrchengels zu markieren, wird am sauren Ende des Gels eine Ecke des Parafilms™ abgeschnitten.
- 4) Mit Vorsicht werden verbleibende Flüssigkeitsreste vom Gel getupft.
- 5) Die Gele werden 10 Minuten lang in der „Inkubationslösung“ gelassen. Die Proteine werden auf diese Weise mit SDS beladen und so für die SDS-PAGE vorbereitet.
- 6) Danach wird die „Inkubationslösung“ abgekippt, Reste davon vorsichtig abgetupft.
- 7) Die Gele können ab diesem Zeitpunkt einige Wochen lang bei -80°C gelagert oder sofort auf SDS-Gele übertragen werden.

SDS-PAGE zur 2-D-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE zur 2-D-Gelelektrophorese erfolgt wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben. Die Röhrchengele werden luftblasenfrei auf das SDS-Gel überführt und mit Agarose-Lösung überschichtet.

Agarose-Lösung

- 1 % (w/w) „low-melting“-Agarose
- 1 × Laufpuffer (Invitrogen)
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Gelfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau G-250

Die Gele werden nach der Methode von Neuhoff mit Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBB G-250) gefärbt. Im Gegensatz zu der herkömmlichen Färbemethode mit CBB R-250 in essigsauerm Methanol ist diese Färbemethode wesentlich empfindlicher. Der Farbstoff CBB G-250 liegt als Kolloid vor und löst sich aus diesem heraus, sobald er auf Proteine trifft. Auf diese Weise dringt der Farbstoff nicht in das Gel ein, die Nachweisgrenze liegt bei etwa 10 ng Protein/Bande.

Die Gele werden nach der unten angeführten Arbeitsvorschrift gefärbt:

Arbeitsschritt	Zeit	Lösungen
Fixierung	1 Stunde	50 % (v/v) Methanol 2 % (v/v) Phosphorsäure
Waschen	3 × 5 Minuten	Milli-Q-Wasser
Äquilibrierung	30 Minuten	34 % (v/v) Methanol 2 % (v/v) Phosphorsäure 17 % (v/v) Ammonium-sulfat
Färbung	über Nacht	34 % (v/v) Methanol 2 % (v/v) Phosphorsäure 17 % (v/v) Ammonium-sulfat 0.066 % (w/v) CBB G-250
Entfärbung	3 Stunden	Milli-Q-Wasser

3.11 Western Blot

- 1) Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden diese elektrophoretisch bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke von 70 mA auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, die zuvor mit Blot-Puffer benetzt worden ist. Der Transfer erfolgt bei Raumtemperatur und wird nach 70 Minuten abgebrochen.
- 2) Die Nitrocellulose-Membran wird kurz in Milli-Q-Wasser geschwenkt und anschließend zur Sichtbarmachung der Proteine in eine Ponceau-Rot-Lösung gelegt.
- 3) Die gefärbte Membran wird zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in die „Block-Lösung“ gelegt und bei 48 rpm geschüttelt.
- 4) Die geblockte Membran wird anschließend dreimal 10 Minuten lang mit LSBW gewaschen.
- 5) Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt ohne Schütteln über Nacht in „Block-Lösung“ bei 4°C.
- 6) Die Membran wird anschließend dreimal bei Raumtemperatur 10 Minuten lang mit LSBW gewaschen.
- 7) Die Inkubation mit dem HRP-markierten, sekundären Antikörper erfolgt unter Schütteln bei 48 rpm für eine Stunde in „Block-Lösung“ bei Raumtemperatur.
- 8) Die Membran wird anschließend dreimal bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit LSBW gewaschen.
- 9) Die Sichtbarmachung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgt mittels Chemilumineszenz. Als „ECL-Detektionsreagenz“ wird eine 1:1-Peroxidase-Substratmischung aus 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (BCIP-NBT) nach den Empfehlungen des Herstellers gemischt. Man inkubiert die Membran 5 Minuten lang mit 3-4 mL „ECL-Detektionsreagenz“, ehe die Bindungsereignisse mit Hilfe des Geldokumentationssystems sichtbar gemacht werden.

„Low Salt Washing Buffer (LSWB)“

10 mM Tris/HCl, pH 7.5

150 mM NaCl

Block-Lösung

LSWB

5 % Magermilchpulver (w/v)

0.5 % (v/v) Tween-20

3.12 Lectinblot und Detektion mannosylierter Proteine

Lectine sind Pflanzen-Proteine, die sich durch spezifische Bindung an Glycosylreste von Proteinen auszeichnen und daher zur Detektion von Glycoproteinen dienen können. Das in Schneeglöckchen vorkommende *Galanthus-nivalis*-Agglutinin (GNA) ist ein Lectin mit hoher Spezifität für α -verknüpfte Mannose, das im Gegensatz zu vielen anderen Lectinen keine zusätzliche Affinität für Glucose aufweist (Shibuya et al., 1988).

- 1) Nach Auftrennung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Kapitel 2.8.1) werden diese elektrophoretisch bei 150 V und 70 mA auf eine PVDF-Membran (PVDF, Polyvinylidendifluorid) transferiert, die zuvor mit MeOH hydrophilisiert worden ist. Der Transfer erfolgt bei Raumtemperatur und wird nach 70 Minuten abgebrochen.
- 2) Die PVDF-Membran wird kurz in Milli-Q-Wasser geschwenkt und anschließend zur Sichtbarmachung der Proteine in eine Ponceau-Rot-Lösung gelegt.
- 3) Die gefärbte Membran wird zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 1 Stunde lang bei Raumtemperatur in TBST bei 48 rpm inkubiert.
- 4) Die geblockte Membran wird anschließend dreimal 10 Minuten lang mit TBS gewaschen.
- 5) Die Inkubation mit biotinyliertem GNA in TBST erfolgt ohne Schütteln über Nacht bei 4°C.
- 6) Die Membran wird anschließend dreimal bei Raumtemperatur 10 Minuten lang mit TBS gewaschen.
- 7) Die Inkubation mit HRP-markiertem Streptavidin in TBST erfolgt unter Schütteln bei 48 rpm 1 Stunde lang bei Raumtemperatur.
- 8) Die Membran wird anschließend dreimal bei Raumtemperatur 10 Minuten lang mit TBS gewaschen.
- 9) Die Sichtbarmachung von gebundenem Lectin erfolgt mittels Chemilumineszenz. Als „ECL-Detektionsreagenz“ wird eine 1:1-Peroxidase-Substratmischung aus 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (BCIP-NBT) nach den Empfehlungen des Herstellers gemischt. Die Membran wird mit 3-4 mL „ECL-Detektionsreagenz“ 5 Minuten lang inkubiert, ehe die Bindungsereignisse mit Hilfe des Geldokumentationssystems sichtbar gemacht werden.

TBS

20 mM Tris/HCl, pH 7.5
137 mM NaCl

TBST

20 mM Tris/HCl, pH 7.5
137 mM NaCl
0.1 % Tween-20

3.13 Massenspektrometrie

3.13.1 Probenvorbereitung

Entfärben der Gelstückchen

Lösung A: 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat in Milli-Q-Wasser

Lösung B: Lösung A : Acetonitril (MeCN) = 1:1 (v/v)

Die ausgeschnittenen Gelstückchen werden jeweils in gemuffelte Quarzröhrchen transferiert. Es erfolgt die Zugabe von 20 µL Lösung A, um die Lösung nach Inkubation von 10 Minuten abzuheben und zu verwerfen. Anschließend werden 20 µL Lösung B zugegeben. Dabei erfolgt die Extraktion des Protein-assoziierten Farbstoffs CBB G-250, wobei MeCN zusätzlich ein Herausdrücken von Lösung B durch Schrumpfung des Gelstückchens bewirkt. Nach 10 Minuten wird Lösung B abgehoben und verworfen. Diese Waschsequenz wird mindestens zweimal wiederholt, bevor das vollständig entfärbte Gelstückchen in der Vakuumzentrifuge dehydratisiert wird. Sofern nicht an dieser Stelle der Verdau im Gel eingeleitet wird, werden die Gelstückchen bei -80°C gelagert.

Probenvorbereitung zur Analyse Neuromelanin-assoziiertes Proteine

Die Proben werden nach Extraktion der Proteine zweimal mit je 40 µL Waschpuffer gewaschen. Die Proben werden dabei 10 Minuten lang auf 95°C erhitzt und dreimal 10 Sekunden lang im Ultraschallbad (Eisbad) homogenisiert. Durch zunehmend chaotrope Bedingungen bei den Waschschrritten in der Harnstoff-SDS-Lösung und in 4 M Harnstoff ohne Zusatz des Protease-Inhibitor-Cocktails (PIC) werden etwaige adherierende Proteine entfernt. Harnstoff, Reste des Detergens SDS und der Protease-Inhibitoren werden durch dreimaliges Waschen in Milli-Q-Wasser entfernt, ehe die Proben in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert werden.

Harnstoff-SDS-Lösung

4 M Harnstoff

6 % (w/v) SDS

0.01 % (v/v) PIC

Harnstoff-Lösung

4 M Harnstoff

Waschpuffer

- 10 mM Hepes, pH 7.4
- 250 mM NaCl
- 0.01 % (v/v) Triton-X-100
- 8 % (w/v) SDS
- 0.01 % (v/v) PIC

3.13.1.1 Proteolytische Spaltung von Proteinen**Spaltung im Gel durch Trypsin**

Etwa 2-4 μL einer Trypsin-Lösung (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in Verdau-Puffer, „sequencing grade modified trypsin“, Promega, Madison, USA) werden direkt auf das geschrumpfte und getrocknete Gelstückchen getropft. Durch Quellung nimmt das Gel die Protease und die Pufferlösung auf. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C unter Schütteln.

Verdau-Puffer

- 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7.8

Spaltung im Gel durch Chymotrypsin

1 μL einer Chymotrypsin-Lösung (25 $\mu\text{g}/600 \mu\text{L}$ in Verdau-Puffer, „sequencing grade chymotrypsin“, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) werden direkt auf das geschrumpfte und getrocknete Gelstückchen getropft. Durch Quellung nimmt das Gel die Protease und die Pufferlösung auf. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C unter Schütteln.

Verdau-Puffer

- 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7.8

Proteolytische Spaltung Neuromelanin-assoziiertes Proteine durch Chymotrypsin

Etwa 3 mg Neuromelanin werden in Quarzröhrchen transferiert, mit 5 μL Verdau-Lösung versehen und im Ultraschallbad 10 Sekunden lang suspendiert. Die Proben werden mit jeweils 15 μL Chymotrypsin-Lösung überschichtet und über Nacht bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das MeCN in der Vakuumzentrifuge mittels Zentrifugation über einen Zeitraum von 10 Minuten entfernt. Der Peptid-haltige Überstand wird abgenommen und in einen Glaseinsatz der HPLC-Probenröhrchen überführt. Das Neuromelanin-Pellet wird mit 10 μL einer 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Auch dieser Überstand wird in das HPLC-Probenröhrchen überführt. Abschließend werden die vereinigten Überstände durch Zugabe von etwa 5 μL 5 % (v/v) Ameisensäure angesäuert.

Verdau-Lösung

10 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Chymotrypsin-Lösung, 5 $\mu\text{g}/15 \mu\text{L}$

10 mM Ammoniumhydrogencarbonat

20 % (v/v) MeCN

3.13.1.2 Deglycosylierung von Proteinen

Deglycosylierung im Gel durch Peptid-N-Glycosidase F

Die mit kolloidalem CBB G-250 gefärbten Gelstückchen werden wechselweise in Wasser und in 50 % (v/v) MeCN je 10 Minuten lang bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach vollständiger Entfärbung werden die Gelstückchen in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Größe des Gelstückchens entsprechend werden 1-5 μL Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F, 0.5 U/ μL ; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) zugegeben. Sobald das Gelstückchen vollständig rehydratisiert ist, wird mit 12 μL Wasser überschichtet und der Verdau bei 37°C über einen Zeitraum von 12-16 Stunden unter Schütteln durchgeführt. Anschließend wird das Gelstückchen zweimal mit 12 μL Lösung A je 1 Minute lang im Ultraschallbad behandelt, durch Zugabe von 30 μL Lösung B dehydratisiert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Lösung A: 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat in Milli-Q-Wasser, pH 7.8

Lösung B: Lösung A : MeCN = 1:1 (v/v)

Deglycosylierung Neuromelanin-assoziiierter Proteine durch Peptid-N-Glycosidase F

Etwa 3 mg Neuromelanin werden in ein Quarzröhrche transferiert und mit 15 μL einer Lösung von Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F) versehen. Die Deglycosylierung erfolgt über Nacht bei 37 °C.

PNGase-F-Lösung

10 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8.6

1.3 % (v/v) Triton-X-100

PNGase F, 1 U/15 μL

Peptid-Extraktion nach Verdau im Gel

Die Gelstückchen werden mit 10 μL 5 % (v/v) Ameisensäure versehen. Die Extraktion der enzymatisch generierten Peptide wird mittels Beschallung im Ultraschallbad über einen Zeitraum von 10 Minuten beschleunigt. Danach überführt man den Peptidextrakt in ein Glasgefäß, extrahiert die Peptide wie zuvor ein weiteres Mal aus dem Gelstückchen und vereinigt beide Peptidextrakte.

3.13.2 Nano-HPLC-Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie

Die nach proteolytischer Spaltung extrahierten Peptide werden mittels nano-HPLC getrennt, die direkt mit einem ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer (LCM™ Classic, Thermo Finnigan, San Jose, USA) gekoppelt ist.

Die Proben werden mittels eines automatischen Probeaufgabesystems (Famos™, LC Packings, Dionex, Idstein, Deutschland) und einer Ladepumpe (Switchos™, LC Packings, Dionex) auf eine C₁₈-Vorsäule geladen (PepMap™, 0.3 mm I.D. \times 5 mm, LC Packings, Dionex). Dadurch werden die Peptide aufkonzentriert und 10 Minuten lang bei einem Fluss von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit 0,1 % Ameisensäure gewaschen. Anschließend wird die Probe über die Ladepumpe auf eine RP-C₁₈-Säule (RP, „reversed phase“) überführt (C18 PepMap™, 75 μm I.D. \times 250 mm, LC Packings, Dionex). Die HPLC-Pumpe (Ultimate™, LC Packings, Dionex) wird mit einem Fluss von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ betrieben, der durch einen Vorsäulen-Split (T-Stück mit Reduzierkapillare) auf 150 nL/min verringert wird. Zur Trennung der Peptide wird ein Gradientensystem aus den folgenden Lösungsmittelkomponenten verwendet (Abb. 10):

Lösungsmittel A: 0.5 % (v/v) Ameisensäure (FA, formic acid)

Lösungsmittel B: 0.5 % (v/v) FA/84 % (v/v) MeCN

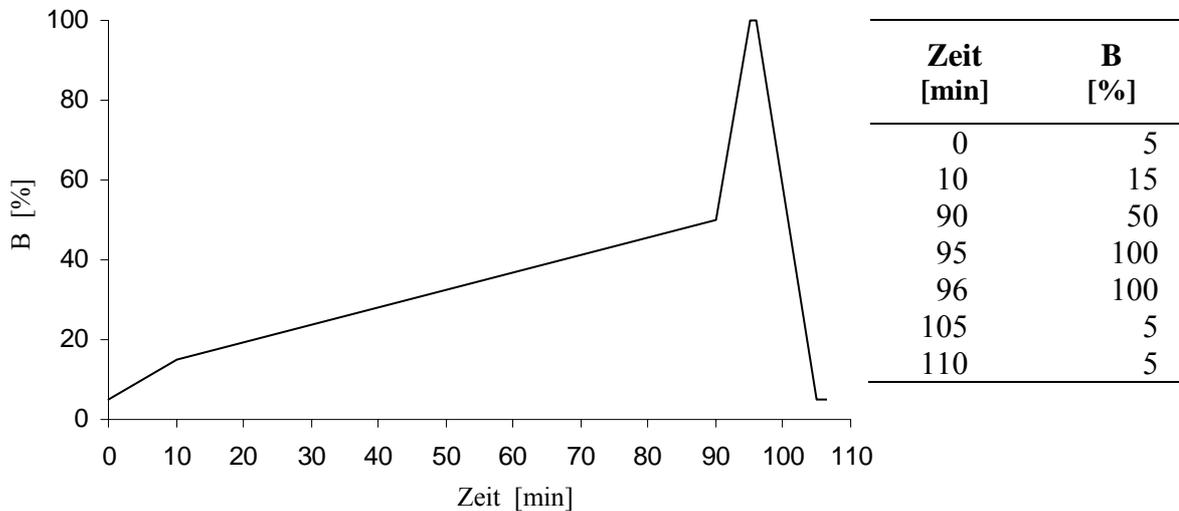


Abbildung 10: Nano-HPLC-Gradient. Die Trennung der Peptide mittels nano-HPLC-MS/MS erfolgt mit Hilfe eines Gradienten über einen Zeitraum von 110 Minuten.

Die getrennten Peptide werden über eine beheizte Transfer-Kapillare (250°C) in das Massenspektrometer überführt. Als Nadel wird eine metallbedampfte Glaskapillare (Pico View™ 100, New Objective Incorporated, Cambridge, USA) verwendet, die in eine nano-ESI-Quelle (ESI, Elektrospray-Ionisation) eingespannt ist. Die Sprayspannung beträgt 2.3 kV, die Temperatur der Kapillare 250°C, die Kapillarenspannung 45 V und die Linsenoffsetspannung 30 V. Als Detektor dient ein Sekundärelektronenvervielfacher, an den eine Spannung von –950 V angelegt ist.

Alle Messungen werden im zentrierten Modus („centroid mode“) durchgeführt, wobei eine Messsequenz aus der Aufzeichnung eines gesamten MS-Spektrums (Full-MS) besteht und wird von drei MS/MS-Spektren der intensivsten Ionen gefolgt (Intensität mindestens 3×10^5). Des Weiteren wird die Funktion „dynamic exclusion“ genutzt, wodurch die bereits fragmentierte Ionen für die folgenden drei Minuten nicht mehr für eine Fragmentierung selektiert werden.

3.13.3 Interpretation der Massenspektren

Analyse der Peptidmassen mittels SEQUEST™

Mit Hilfe des SEQUEST™-Suchalgorithmus (Eng et al., 1994; Yates et al., 1995) wird eine automatische Interpretation der gemessenen MS/MS-Spektren ermöglicht. Die MS/MS-Rohdaten werden dazu in solche Daten umgewandelt, die für diesen Algorithmus verwendbar sind. Dabei werden alle Peptidmassen eines LC-Laufs im Bereich von $m/z = 500$ bis $m/z = 5000$, die einen Total-Ionenstrom (TIC, „total ion current“) von mindestens 3×10^5 überschreiten, herangezogen. Diese Daten werden mit den bekannten Einträgen der humanen Teildatenbank der NCBI-Datenbank verglichen. Die Selektionskriterien sind dabei so gewählt, dass nur strikt tryptisch generierte Peptide mit einer Massengenauigkeit der Durchschnittsmassen („average masses“) von ± 1.0 Da in Betracht gezogen werden. Diese Messgenauigkeit gilt sowohl für die Elternionen als auch für die durch Fragmentierung in der Ionenfalle generierten Fragmentionen. Maximal zwei von Trypsin übergangene Schnittstellen werden toleriert. Als eine potentielle Aminosäure-Modifikation wird oxidiertes Methionin ($M + 16$ Da) angenommen. Die Gewichtungsfaktoren für die bei ESI-Fragmentierungsprozessen dominierenden *b*- und *y*-Ionen werden mit 1.0 festgelegt.

Das Ergebnis der Datenbank-Suche ist eine Auflistung von Proteinen, wobei das erstgelistete Protein am besten mit den gemessenen Daten übereinstimmt. Zur Beurteilung der Signifikanz eines positiven Treffers sollte der Absolutwert des Kreuzkorrelationswertes C_n mindestens 1×10^4 und der ΔC_n -Wert mindestens 0.1 betragen. Trotzdem werden die relevanten Spektren zur Überprüfung der SEQUEST™-Daten einer zusätzlichen „manuellen“ Inspektion unterzogen.

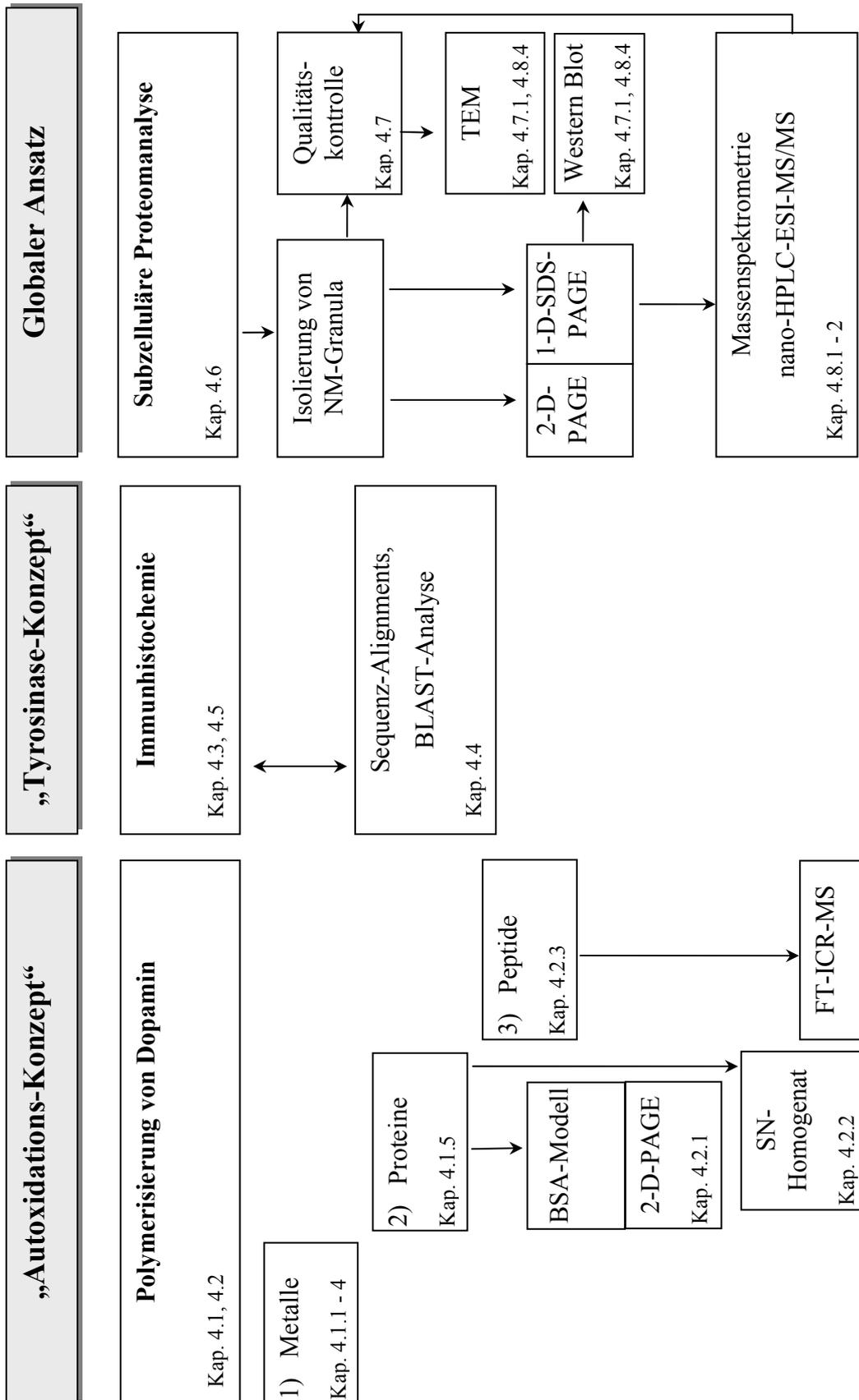
Analyse der Peptidmassen mittels „ProteinProspector“

Zur verlässlicheren Beurteilung eines Spektrums wird unter Zuhilfenahme der Software „ProteinProspector“ (Version 4.0.5., <http://prospector.ucsf.edu>) eine Liste aller theoretischen Massen erstellt, die für ein gegebenes Peptid bei Elektrospray-Ionisation und kollisionsinduzierter Dissoziation (CID, „collision induced dissociation“) in einer Ionenfalle auftreten könnten. Diese Massen werden anschließend mit den tatsächlich gemessenen Werten verglichen. Auf diese Weise können weitere Peaks eines Spektrums

erklärt werden, die beispielsweise aus Mehrfachladung eines Fragments, nach Abspaltung von H₂O oder NH₃ resultieren oder interne Fragmente darstellen.

4 RESULTATE

Arbeitsverlauf



4.1 Untersuchungen zur autoxidativen Bildung von Neuromelanin

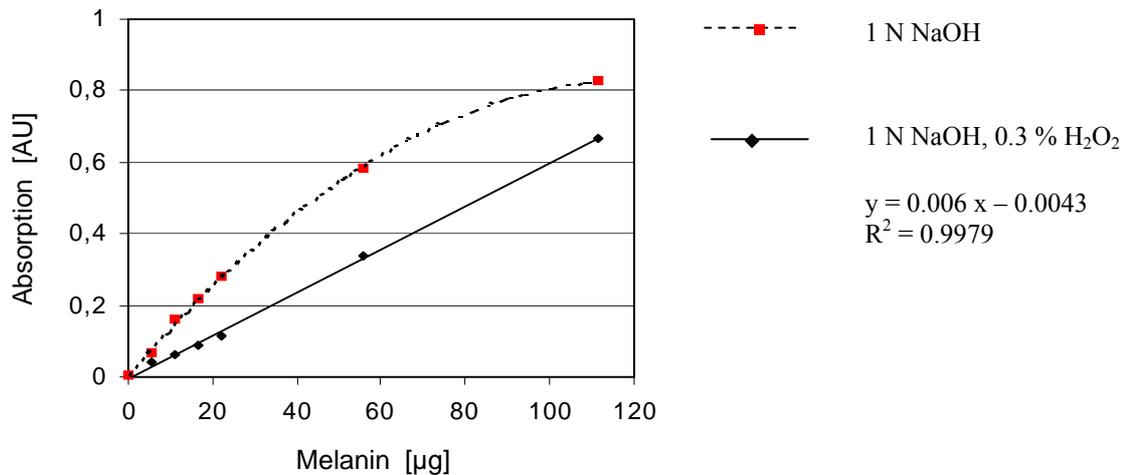
Die Bildung von Neuromelanin erklärt man derzeit als eine autoxidative Polymerisierung von Dopamin. Im Mittelpunkt dieser Annahme steht, im Gegensatz zu einer etwaigen enzymatischen Katalyse, die Beteiligung von redoxaktiven Metallen. Eine bedeutende Rolle in der Bildung von Neuromelanin sollen dabei Eisen und Kupfer spielen.

Zu Beginn der Arbeit wurde der Einfluss von redoxaktiven Metallen und ausgesuchten Modellproteinen auf die Bildung von synthetischem Dopaminmelanin (DAM) unter annähernd physiologischen Bedingungen in einer künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, „artificial cerebrospinal fluid“) untersucht. Zur quantitativen Messung des entstandenen DAMs wurde ein photometrischer Assay adaptiert (Zecca et al., 2001).

4.1.1 Quantitative Bestimmung von synthetischem Dopaminmelanin

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde das synthetische DAM wie in „Material und Methoden“ beschrieben hergestellt. Die Standard-Lösungen mit ansteigenden Mengen an DAM konnten nicht durch direkte Einwaage des grobkörnigen, schwarzen Pulvers hergestellt werden, sondern erforderten eine gründliche Suspendierung von DAM durch Behandlung im Ultraschallbad. Aus dieser Suspension konnten aliquote Volumina entnommen werden.

Das Lösen von DAM basiert auf einer in der Literatur beschriebenen Arbeitsvorschrift, das ein Lösen von Melanin in 1 M NaOH bei 80°C vorschlägt (Zecca et al., 2001). Dieses Verfahren erwies sich wegen der dazu erforderlichen Zeit von etwa 3 Stunden als nicht praktikabel, außerdem konnte dabei DAM nicht vollständig gelöst werden. Durch Herabsetzen der Temperatur auf 60°C hielten sich die dabei zusätzlich entstehenden Volumensverluste aufgrund raschen Verdampfens des Lösungsmittels in Schranken. Allerdings löste sich das für die Erstellung der Eichkurve eingesetzte DAM erst durch Zugabe von 0.3 % (v/v) H₂O₂ bei einer Temperatur von 60°C in einer akzeptablen Zeit von 10 Minuten (Abb. 11).



Melanin [µg]	Absorption [AU]	
	1N NaOH, 3 % H ₂ O ₂	1N NaOH
0.0	0.003	0.003
5.575	0.0418	0.0702
11.15	0.0599	0.1634
16.725	0.0879	0.2184
22.3	0.1123	0.2826
55.57	0.3402	0.585
111.5	0.6667	0.8274
167.25	1.2734	0.8755

Abbildung 11: Quantifizierung von Dopaminmelanin. Eichkurve von Dopaminmelanin, in 1N NaOH, 3 % H₂O₂ und in 1 N NaOH bei 60°C gelöst. Die Messung erfolgt bei 400 nm nach 10 Minuten.

4.1.2 Polymerisierungsansätze

Die Polymerisierung von 1 mM Dopamin erfolgte in künstlicher CSF bei 37°C unter Lichtschutz, wobei der Kontakt zu Luftsauerstoff gewährleistet war. Es wurde die Bildung von DAM (1) unter Einfluss von verschiedenen Metallionen untersucht sowie die Konzentrationsabhängigkeit der DAM-Bildung von diesen Zusätzen. Außerdem wurde (2) eine Polymerisierung unter Fenton-ähnlichen Bedingungen gemessen, sowie der (3) Einfluss von Modellproteinen auf die Bildung von DAM.

4.1.3 Der Einfluss von Metallionen auf die Bildung von Dopaminmelanin

Metallionen, wie Fe³⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ und Mn²⁺ wurden auf ihre Fähigkeit getestet, aus Dopamin Dopaminmelanin zu bilden. Fe³⁺ und Fe²⁺ wurden aufgrund ihrer hohen Verfügbarkeit in der Substantia nigra pars compacta herangezogen. Vor allem Fe³⁺ und

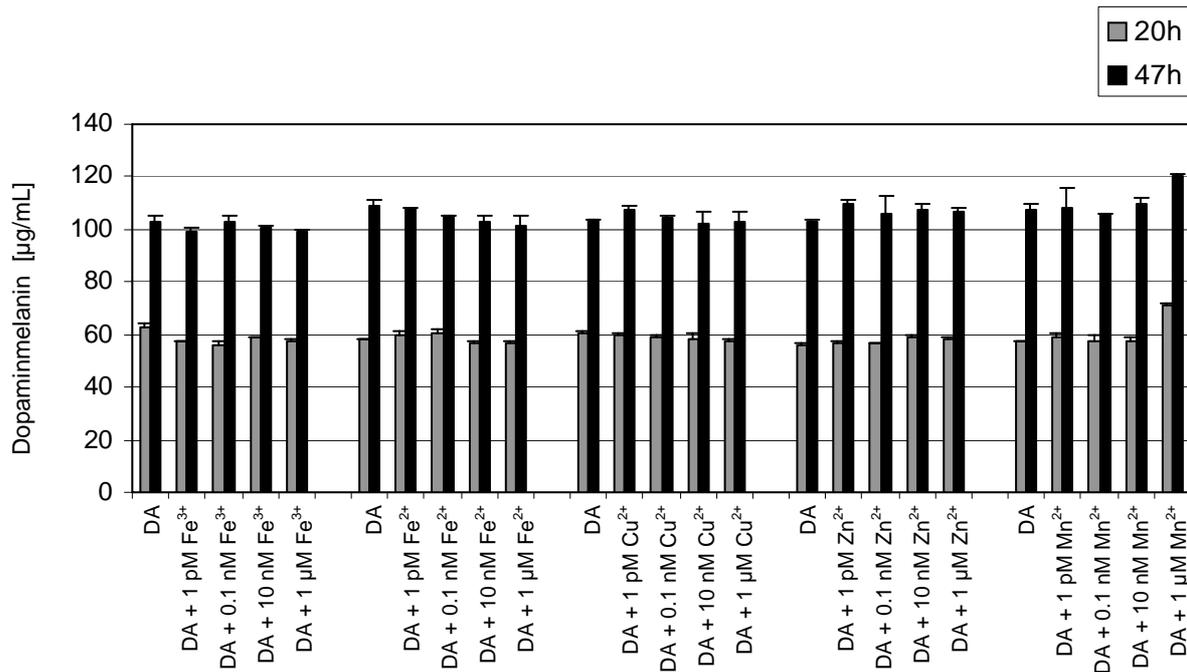


Abbildung 12: Einfluss von redoxaktiven Metallen auf die Bildung von Dopaminmelanin. 1 mM Dopamin werden bei 37°C unter annähernd physiologischen Bedingungen bei pH 7.2 mit oder ohne redoxaktiven Metallen inkubiert. Nach 20 und 47 Stunden wird das entstandene Dopaminmelanin quantifiziert. Verglichen mit jenen Proben ohne Metallzusatz kann trotz ansteigender Metallkonzentrationen keine gesteigerte Bildung von Dopaminmelanin verzeichnet werden.

Cu²⁺ werden seit langem als entscheidende Faktoren in der Bildung von Neuromelanin angesehen. Zn²⁺ und Mn²⁺ sind Metalle, die anscheinend an Neuromelanin gebunden sind und möglicherweise eine Polymerisierung von Dopamin fördern könnten.

Die quantitative Bestimmung des entstandenen Präzipitats erfolgte nach 20 oder nach 47 Stunden. Diese Messungen zeigten sowohl bei Abwesenheit redoxaktiver Metalle als auch bei Anwesenheit dieser Metalle vergleichbare Mengen an gebildetem DAM (Abb. 12). Selbst die Zugabe der Metalle in einem sehr weiten Konzentrationsbereich von 1 pM bis zu 1 µM führte zu keiner erhöhten Bildung von DAM.

Aus diesen Messungen ging hervor, dass die untersuchten Metalle unter nachempfundenen physiologischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Melaninbildung hatten (Abb. 12).

4.1.4 Der Einfluss von Fenton-ähnlichen Bedingungen auf die Bildung von Dopaminmelanin

Die Bildung von DAM wurde des Weiteren unter oxidativen, Fenton-ähnlichen Bedingungen untersucht. Die Umsetzung von 1 mM Dopamin erfolgte bei zwei verschiedenen Fe^{2+} -Konzentrationen mit H_2O_2 in einem Konzentrationsbereich von 0.01 nM bis zu 10 nM. Dennoch zeigte sich über einen Zeitraum von 9 Tagen keine unterschiedliche Entwicklung von DAM (Abb. 13).

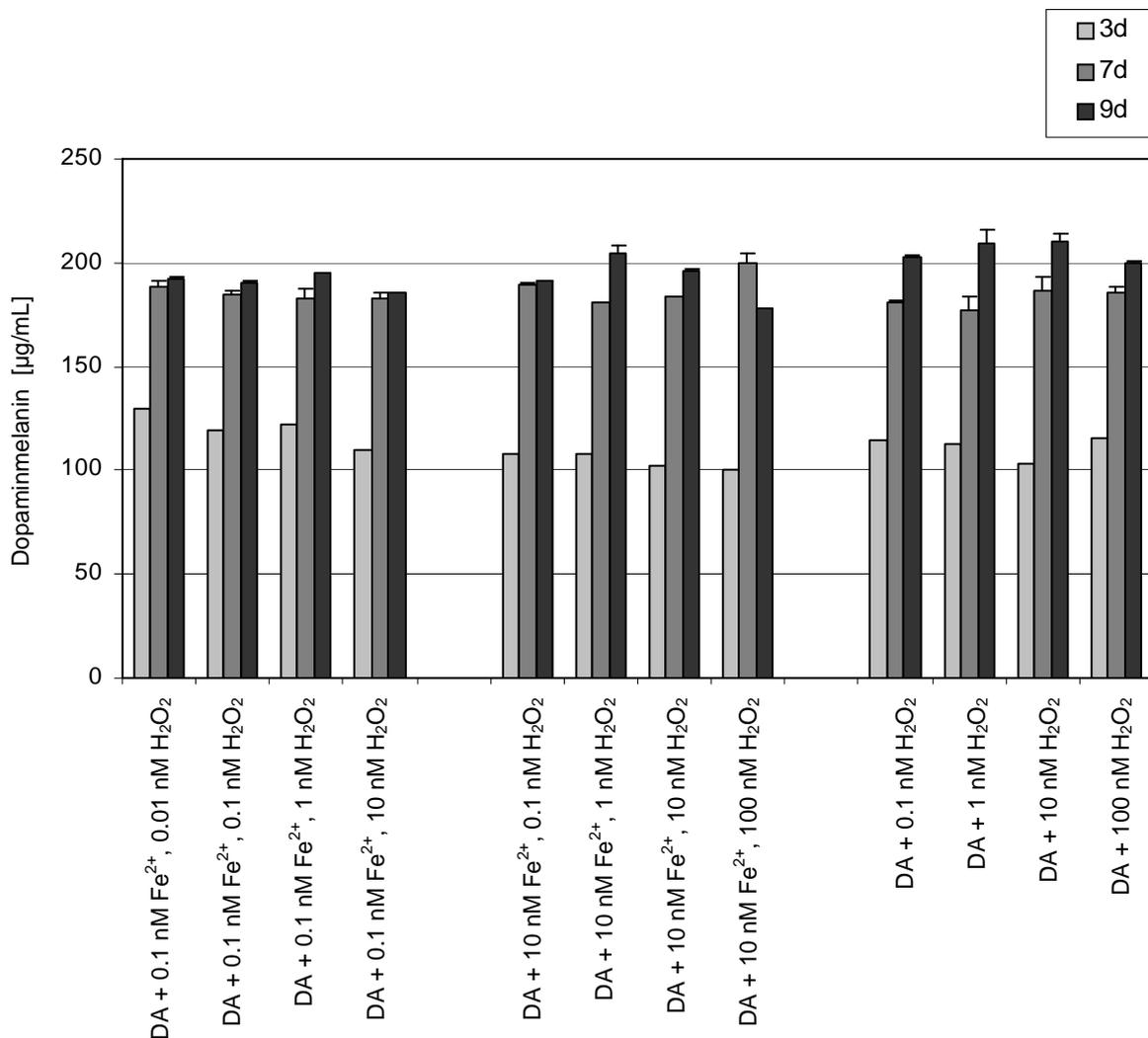


Abbildung 13: Der Einfluss von Fenton-ähnlichen Bedingungen auf die Bildung von Dopaminmelanin. 1 mM Dopamin wird bei 37°C unter annähernd physiologischen Bedingungen bei pH 7.2 mit oder ohne redoxaktiven Metallen inkubiert. Nach 20 und 47 Stunden wird das entstandene Dopaminmelanin quantifiziert. Verglichen mit jenen Proben ohne Metallzusatz, kann auch trotz ansteigender Metall-Konzentrationen keine vermehrte Bildung von Dopaminmelanin verzeichnet werden.

4.1.5 Der Einfluss von Modellproteinen auf die Bildung von Dopaminmelanin

Dopamin liegt in biologischen Systemen nicht nur in Speichervesikeln, sondern auch im Cytoplasma vor, so dass Proteine die Polymerisierung von Dopamin entweder fördern oder verhindern könnten.

Als gut verfügbare Modellproteine wurden bovines Serum-Albumin (BSA) und Lysozym verwendet. Beide Proteine sind unter physiologischen Bedingungen bei pH 7.2 gut löslich, jedoch weist BSA (pI ~ 4.8-5.5) dabei eine negative und Lysozym (pI ~ 11) eine positive Nettoladung auf.

Für niedrige Konzentrationen an BSA und Lysozym konnte kein Einfluss auf die Bildung von DAM festgestellt werden. Allerdings bildete sich bei einer 5 µM Konzentration von BSA kein Präzipitat, sondern eine braun gefärbte Lösung (Abb. 14).

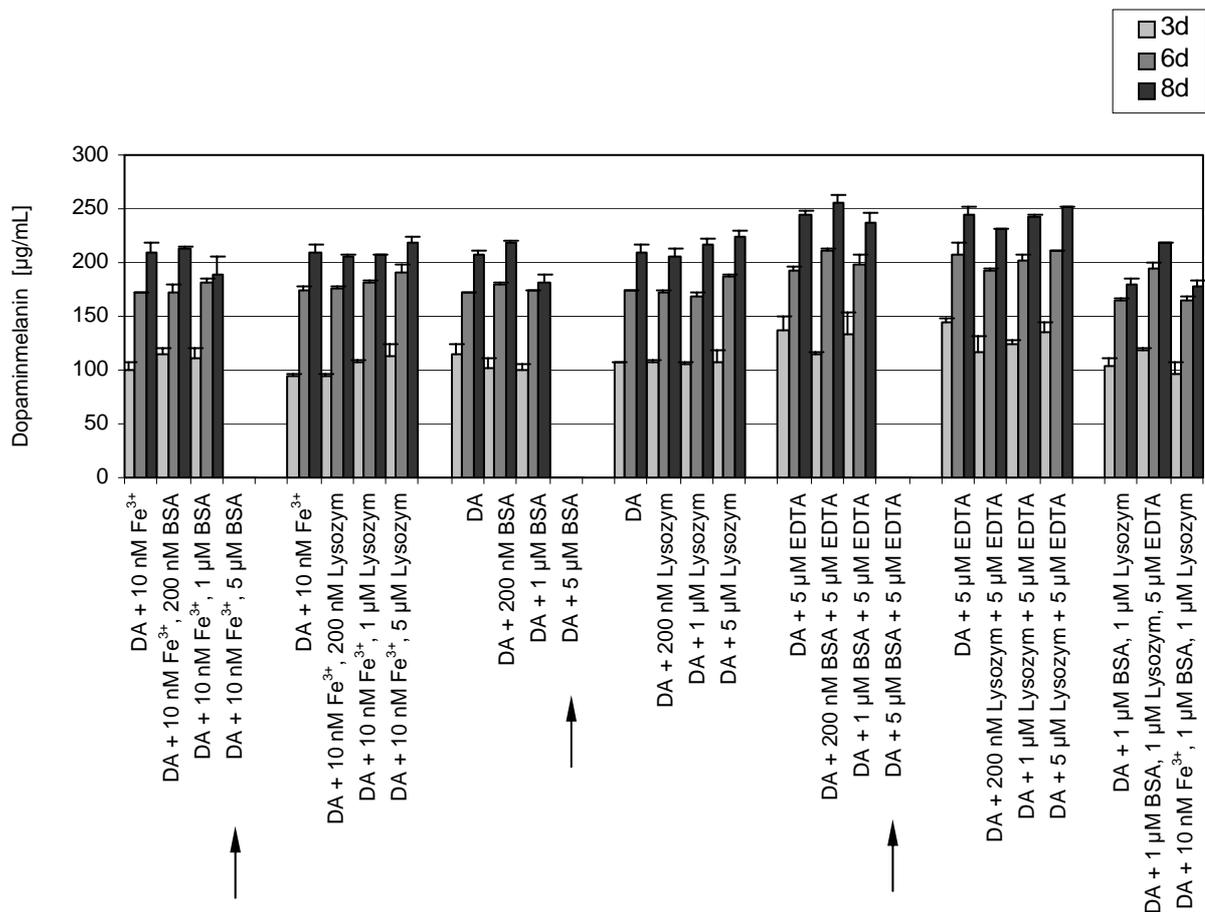


Abbildung 14: Einfluss von Modellproteinen auf die Bildung von Dopaminmelanin. 1 mM Dopamin wird bei 37°C unter annähernd physiologischen Bedingungen bei pH 7.2 mit BSA oder mit Lysozym inkubiert. BSA in einer Konzentration von 5 µM verhindert dabei vollständig die Bildung eines Präzipitates. Vielmehr bildet sich eine braun gefärbte Lösung.

4.2 Untersuchungen zur Modifizierung von Proteinen durch Dopamin

4.2.1 Inkubation von Dopamin und BSA

Die vorhergehenden Untersuchungen zum Einfluss von Proteinen auf die Bildung von Dopaminmelanin hatten ergeben, dass dabei nicht immer ein präzipitierbares Dopaminmelanin gebildet wird. Weiterführende Analysen dienten zur Klärung der Frage, ob Dopamin in diesem Fall Proteine kovalent modifiziert. Diese umfassten eine Proteintrennung mittels ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese, sowie den Transfer der getrennten Proteinspezies auf Nitrocellulose-Membranen. Zur Sichtbarmachung der Proteine in Polyacrylamidgelen wurden diese mittels Coomassie-Brilliant-Blau (CBB) G-250 gefärbt (Abb. 15; A, B). Auf Nitrocellulose-Membranen transferierte Proteine wurden einerseits mittels Ponceau-Rot gefärbt (Abb. 15; E, F), andererseits erfolgte die Anwendung des NBT/Formazan-Assays zur Sichtbarmachung etwaiger *ortho*-Chinongruppen (Abb. 15; C, D).

Unmodifiziertes BSA wurde mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D-PAGE) getrennt und durch CBB G-250 sichtbar gemacht. Im Massenbereich zwischen 55 und 65 kDa waren etwa vier bis fünf Proteinspots mit leicht unterschiedlichen pI-Werten erkennbar (Abb. 15; A). Auf der Nitrocellulose-Membran wurden mittels NBT/Formazan-Assays keine *ortho*-Chinongruppen detektiert (Abb. 15; C). Dass jedoch BSA auf die Membran transferiert worden war, zeigte die Proteinfärbung mit Ponceau-Rot (Abb. 15; E).

5 μ M BSA, das mit 1 mM Dopamin inkubiert worden war, zeigte dagegen nach Trennung mittels 2-D-PAGE und Färbung mit CBB G-250 ein anderes Trennungsmuster (Abb. 15; B) als unmodifiziertes BSA (Abb. 15; A): im Massenbereich zwischen 55 und 65 kDa waren etwa fünf Proteinspots erkennbar, die ein wenig zu höheren – basischeren – pI-Werten verschoben sind (Abb. 15; B). Diese Verschiebung war Hinweis auf eine kovalente Veränderung an BSA, die zu einer Veränderung der Nettoladung des Proteins und so zu einem veränderten pI-Wert geführt hatte. Auffallend waren zusätzliche Färbungen im höhermolekularen Bereich des Gels, die sich ohne Abgrenzung diskreter Proteinspots über einen breiten pI-Bereich erstreckten und mit hoher Wahrscheinlichkeit aus quervernetztem Protein resultierten. Die Bildung von Formazan (Abb. 15; D) war Hinweis auf eine kovalente Modifizierung von BSA durch Dopamin.

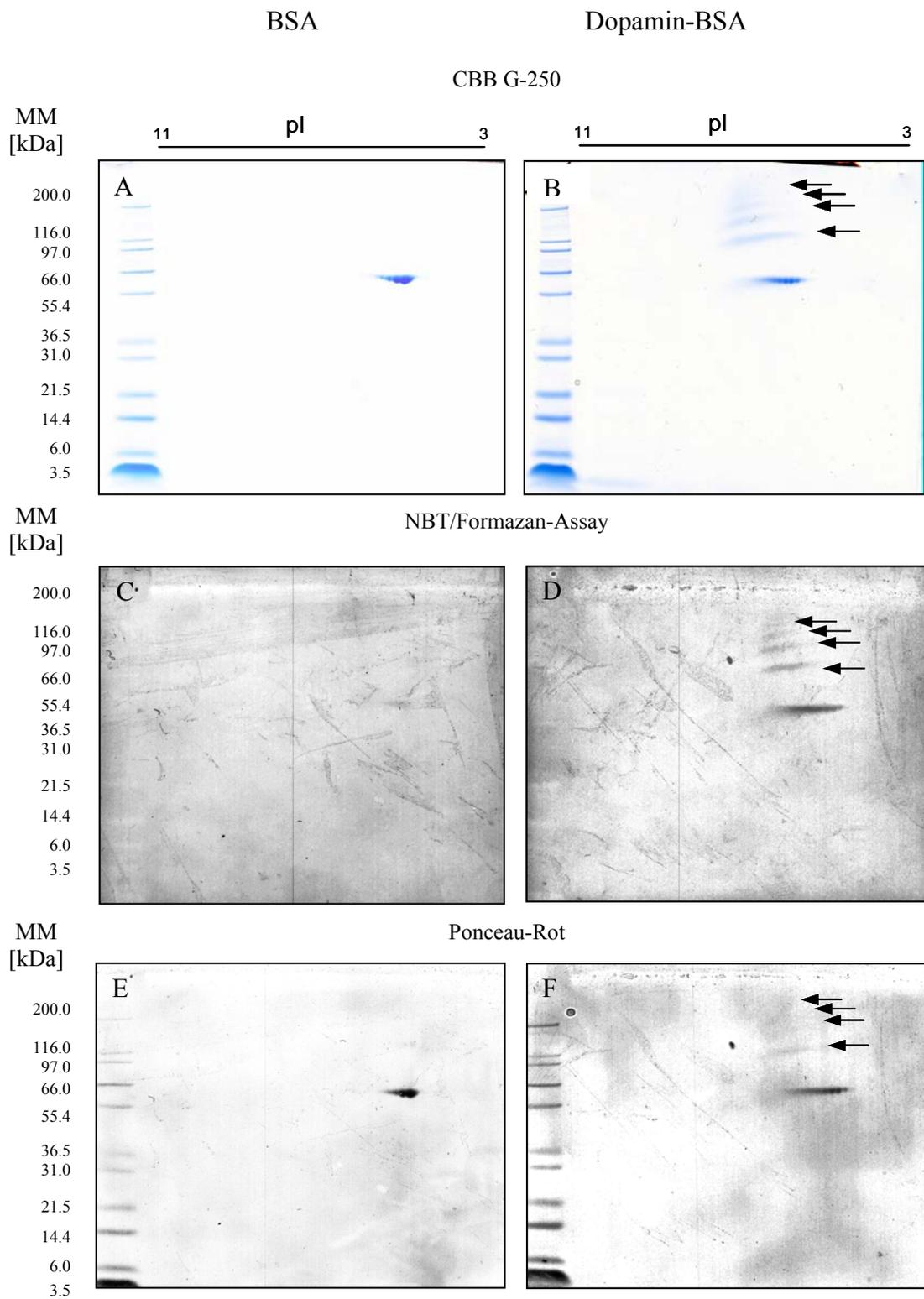


Abbildung 15: Untersuchungen zur Modifizierung von BSA durch Dopamin. Unmodifiziertes BSA (A, C, D) und modifiziertes BSA (B, D, F) wurden mittels 2-D-Gelelektrophorese getrennt. Anhand des NBT/Formazan-Assays werden *ortho*-chinoide Strukturelemente bei modifiziertem BSA (D) nachgewiesen. Die Färbung mit Ponceu-Rot dient als Positivkontrolle und bestätigt die Anwesenheit der Proteine (E, F).

4.2.2 Inkubation von Proteinextrakten der Substantia nigra mit Dopamin

Die Untersuchungen zur Modifizierung von Proteinen durch Dopamin wurden unter Anwendung des NBT/Formazan-Assays auf Substantia-nigra-Homogenat ausgeweitet. Dabei konnte in diesem Gewebe keine endogene Modifizierung von Proteinen durch Dopamin festgestellt werden (Abb. 16, A, Spur 1; Abb. 16, E, Spur 1).

Nach Zugabe von Dopamin waren Modifizierungen an Proteinen bereits nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten erkennbar (Abb. 16, A, Spuren 2-4). Bereits die Inkubation des Homogenates mit Dopamin ohne weitere Zusätze führte zu einer Modifizierung von Proteinen (Abb. 16, A, Spur 2). Allerdings erfolgte dies in geringerem Ausmaß und unter Einbeziehung weniger Proteine (siehe unterer Trennbereich des Gels), als nach Zusatz von Fe^{2+} (Abb. 16, A, Spur 3) oder unter Fenton-ähnlichen Bedingungen (Abb. 16, A, Spur 4).

Nach 30 Minuten (Abb. 16, A, Spuren 6-8) war außer einer Intensivierung der Färbung von Chinoproteinen keine weitere Veränderung des Modifizierungsmusters erkennbar. Auch an der Darstellung von Total-Protein nach Ponceau-Rot-Färbung (Abb. 16, B) war keine Veränderung der Proteinverteilung zu erkennen. Auch die Inkubation von Proteinen der Substantia nigra ohne Dopamin, jedoch unter Fenton-ähnlichen Bedingungen, führte über diesen Zeitraum von 30 Minuten zu keinen erkennbaren Veränderungen der Proben (Abb. 16, A, B, Spuren 5, 9).

Nach 60 Minuten war eine deutliche Intensivierung der Formazanfärbung zu erkennen (Abb. 16, C, Spuren 1-3). Trotzdem blieb eine Modifizierung von Proteinen durch Dopamin im unteren Trennbereich des Gels aus (Abb. 16, C, Spur 1).

Nach proteolytischem Verdau dieser Proben mit Protease K konnten anhand des NBT/Formazan-Assays keine *ortho*-Chinongruppen mehr nachgewiesen werden (Abb. 16, C, D, Spuren 5-8). Daraus ließ sich ableiten, dass die detektierten *ortho*-Chinongruppen tatsächlich an Proteine gebunden waren und nicht von Dopamin-Oligomeren herrührten.

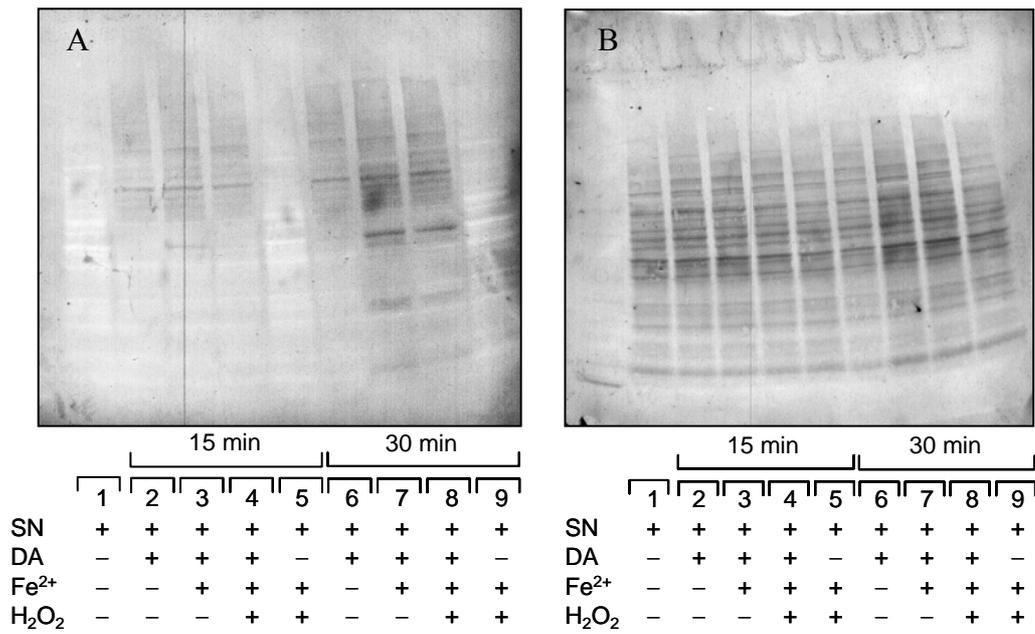


Abbildung 16: Detektion von Chinoproteinen nach Inkubation von Substantia-nigra-Homogenat mit Dopamin nach Zusatz von Fe²⁺ und H₂O₂ über einen Zeitraum von 15 und 30 Minuten. (A) Unter Anwendung des NBT/Formazan-Assays sind keine endogen durch Dopamin modifizierte Proteine erkennbar (Spuren 1,5,9). Bereits 15 Minuten nach Zugabe von Dopamin ist eine Modifizierung von Proteinen sichtbar, wobei Dopamin alleine weniger Proteine modifiziert (Spuren 2, 6) als bei zusätzlicher Anwesenheit von Fe²⁺ (Spuren 3, 7) oder unter Fenton-ähnlichen Bedingungen (Spuren 4, 8). (B) Färbung aller Proteine mit Ponceau-Rot (Abkürzungen: SN, Substantia-nigra-Homogenat; DA, Dopamin).

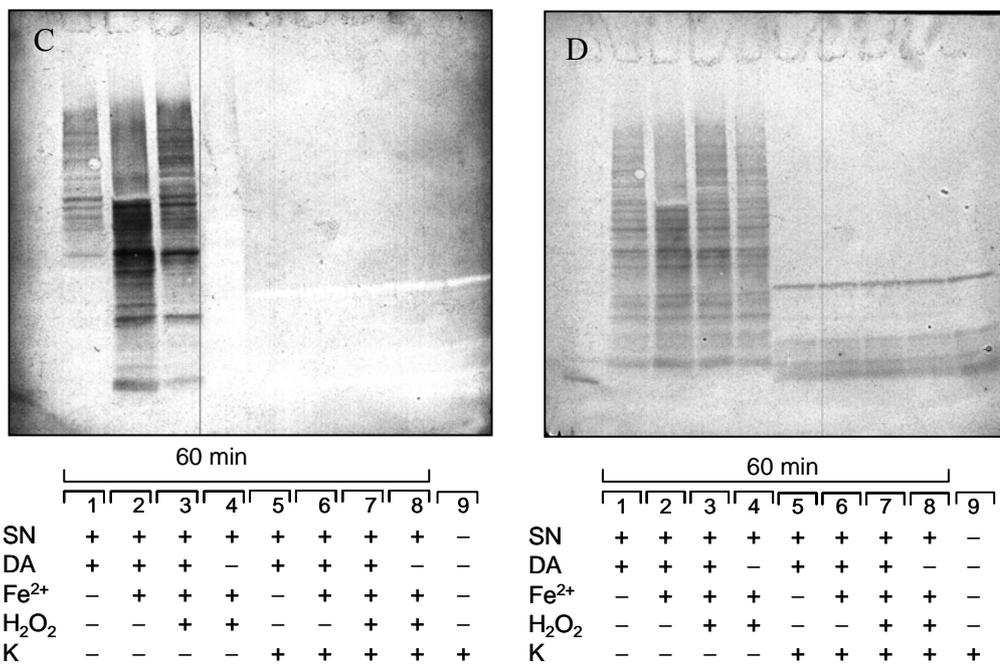


Abbildung 16: Detektion von Chinoproteinen nach Inkubation über einen Zeitraum von 60 Minuten. (C) Verglichen mit der Modifizierung durch Dopamin ohne weitere Zusätze (Spur 1) und unter Fenton-ähnlichen Bedingungen (Spur 3), erfolgt die stärkste Modifizierung bei Anwesenheit von Fe²⁺ (Spur 2). Nach Verdau mit Protease K ist keine Färbung sichtbar. (D) Färbung aller Proteine mit Ponceau-Rot (Spuren 1-4). Nach vollständiger Proteolyse (Spuren 5-8) sind Banden von Proteinase K erkennbar (Positivkontrolle, Spur 9) (Abkürzungen: SN, Substantia-nigra-Homogenat; DA, Dopamin; K, Proteinase K).

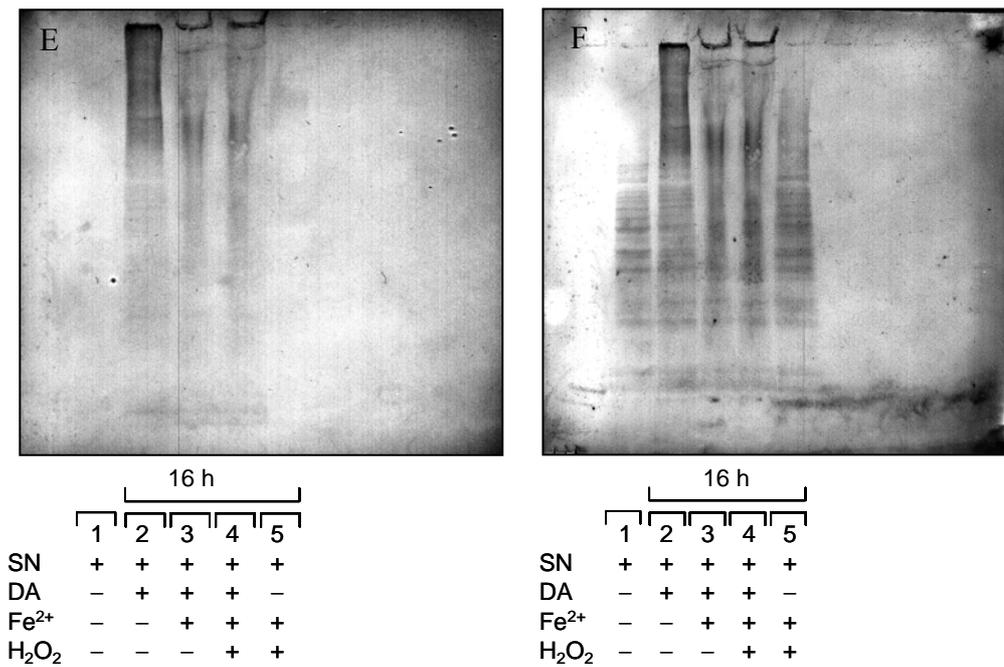


Abbildung 16: Proteinveränderungen nach Inkubation über einen Zeitraum von 16 Stunden. (E,F) Hochmolekulare Aggregate aus quervernetzten Proteinen sind sichtbar, die nicht oder nur schwer in die Gelmatrix eindringen (Spuren 2-4). Dies hat ein generelles Verschwinden von Protein-Banden im unteren Trennbereich zur Folge (Abkürzungen: SN, Substantia-nigra-Homogenat; DA, Dopamin).

Die Bandenmuster in den Spuren 5-8 (Abb. 16, D) korrespondierten mit den Banden reiner Proteinase K (28 kDa), die als Kontrolle in Spur 9 (Abb. 16, D) aufgetragen ist. Dabei zeigten sich eine Bande auf der Höhe von etwa 30 kDa und mehrere Fragmente im Bereich niedrigen Molekulargewichts, die auf partielle Autoproteolyse von Proteinase K hinwiesen.

Nach Inkubation von 16 Stunden war in den Reaktionsgefäßen eine deutliche Aggregatbildung in Form schwarzer Präzipitate zu erkennen. Diese Situation spiegelte sich nach gelelektrophoretischer Trennung dieser Proben wider (Abb. 16, E, F, Spuren 2-4). Die Quervernetzung modifizierter Proteine führte zur Ausbildung von Aggregaten, die über den oberen, höhermolekularen Trennbereich verteilt waren und zu einem Verschwinden diskreter Proteinbanden führten (Abb. 16, F, Spuren 2-4). Manche dieser Aggregate erreichten eine Größe, die ein Einwandern in die Gelmatrix vollständig verhinderte.

4.2.3 Dopamin-modifizierte Peptide

Die vorhergehenden Untersuchungen deuteten auf eine kovalente Modifizierung von Proteinen durch Dopamin hin. Anders als bei bekannten Modifizierungen, beispielsweise durch Phosphat- oder Acetyl-Reste, ist die zu erwartende Masse von kovalent gebundenem Dopamin unbekannt. Da Proteingemische, aber auch einzelne Modellproteine, beispielsweise BSA, zur Aufklärung dieser Modifizierung eine zu komplexe Ausgangsbasis darstellen, wurden definierte Peptidsequenzen als Untersuchungsmaterial herangezogen. Die Fourier-Transformation-Ionen-Cyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) zeichnet sich durch besonders hohe Massenauflösung aus und ist daher die Methode der Wahl, um die exakte Masse einer derartigen Modifizierung bestimmen zu können.

Geeignete Modellpeptide wurden von Prof. Palm zur Verfügung gestellt. Eine für diese massenspektrometrischen Untersuchungen erforderliche Reinheit der Peptide wurde mittels HPLC erlangt: mit qualitativer RP-HPLC wurden zuerst Chromatogramme der Modellpeptide erstellt, um so die Retentionszeiten des jeweils höchsten Peaks – des Zielpeptids – zu ermitteln (Tab. 1, Abb. 17). Auf diesen Daten basierend wurden die Peaks anschließend mit präparativer RP-HPLC isoliert, lyophilisiert und derivatisiert.

Tabelle 1: Modellpeptide zur Untersuchung der Modifizierung durch Dopamin.

Peptid	Sequenz	Amino- säuren	MM [Da]	RP-HPLC	
				t _R (qual.) [min]	t _R (präp.) [min]
#96-2	AcDSTIYASYECCGG- HGLSTGGYGYDS	25	2607.07	29.81	33.2
#91-4	AcDDDIQRFREEFERIC	14	2067.072	37.68	41.1

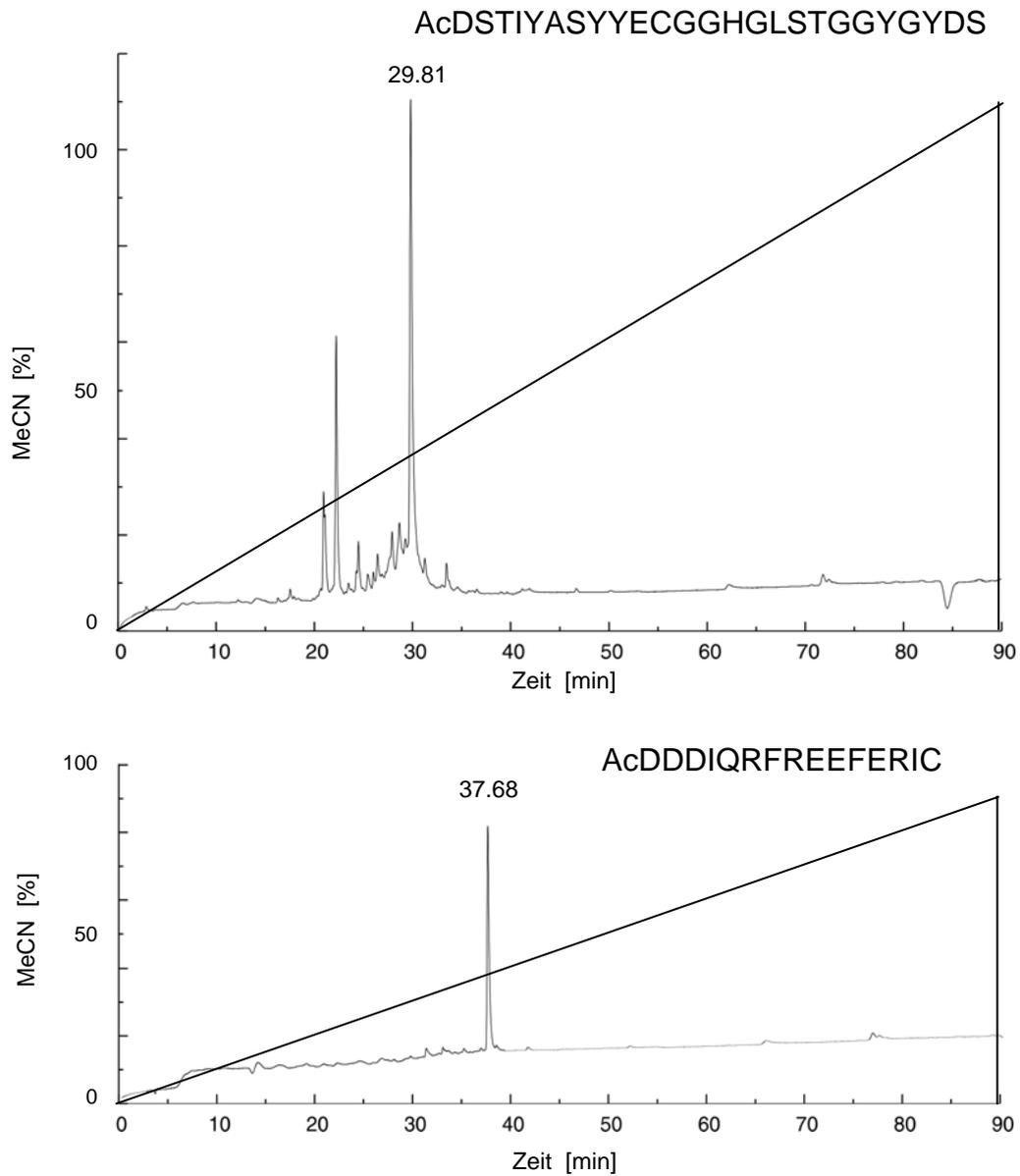
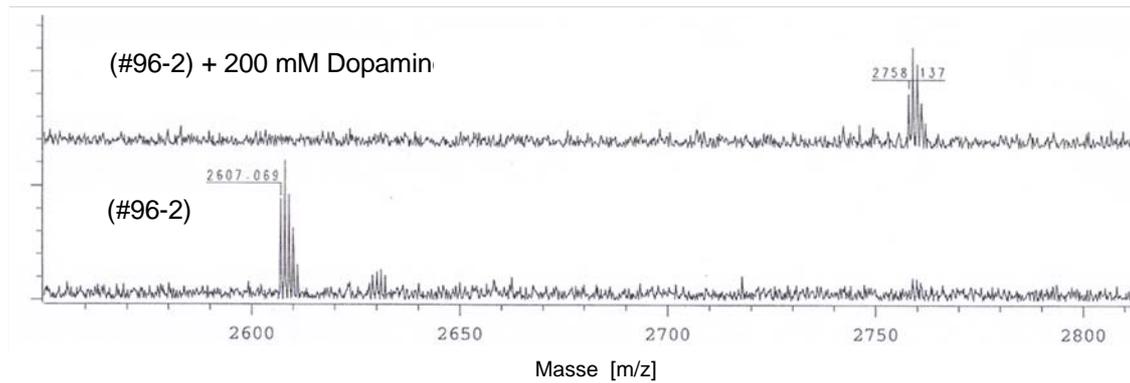
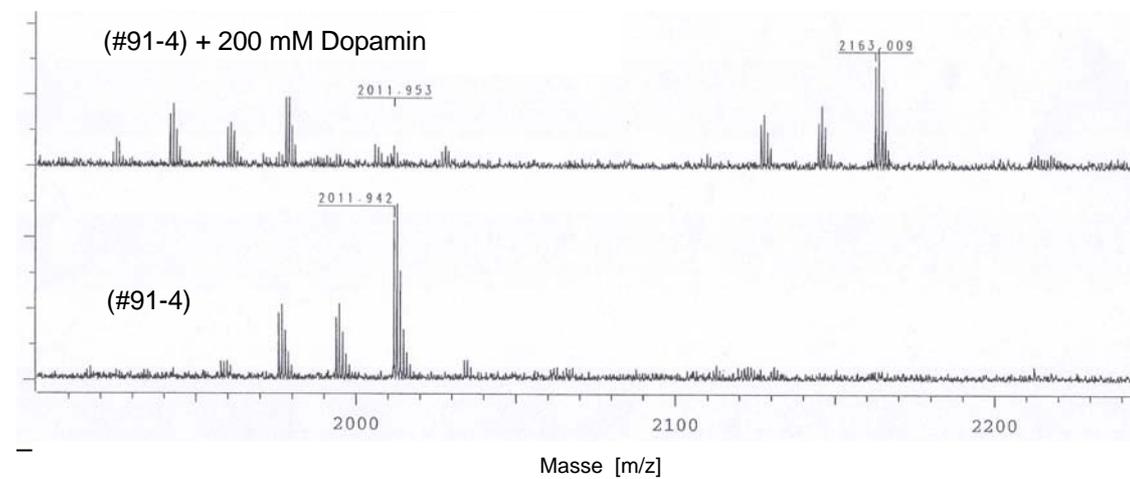


Abbildung 17: *Chromatogramme der ungereinigten Modellpeptide.* Zur späteren Entfernung von Syntheseartefakten und zur Isolierung der Zielperptide werden mit Hilfe der analytischen RP-HPLC die Retentionszeiten der höchsten Peaks ermittelt.

A



B



C

Peptid	$m_{\text{theor.}}$ [Da]	$m_{\text{exp.}}$ [Da]	$m_{\text{modif.}}$ [Da]	$\Delta m = (m_{\text{modif.}} - m_{\text{exp.}})$ [Da]
#96-2	2606.96	2607.069	2758.137	151.068
#91-4	2012.20	2011.942	2163.009	151.067

Abbildung 18: FT-ICR-Messungen von modifizierten Peptiden. (A, B) Die Massen der unmodifizierten Kontroll-Peptide sowie der mit 200 mM Dopamin inkubierten Peptide werden mit hochauflösender FT-ICR-MS bestimmt. Die mit Dopamin inkubierten Proben weisen eine Verschiebung zu höherer Masse auf. (C) Die theoretisch ermittelten durchschnittlichen Peptidmassen korrespondieren gut mit den experimentell gemessenen monoisotopischen Massen. Anhand der monoisotopischen Peaks von dopaminylierten Peptiden und unmodifizierten Kontrollen wird eine Massendifferenz von 151 Da errechnet.

Die mit FT-ICR-MS ermittelten monoisotopischen Massen der *N*-terminal acetylierten Peptide (Abb. 18, C; $m_{\text{exp.}}$) stimmten gut mit den theoretischen Massen (Abb. 18, C; $m_{\text{theor.}}$) überein (Tab. 1). Aufgrund dieser guten Übereinstimmung konnte speziell für das Peptid #96-2 von einer erfolgreichen Isolierung des vollständig entschützten Peptids ausgegangen werden, aber auch das Peptid #91-4 lag in hinreichend guter Sauberkeit vor, so dass eine eindeutige Massenbestimmung möglich war.

Die mit Dopamin inkubierten Peptide sind deutlich zu höheren Massen verschoben. Die Differenz der monoisotopischen Peaks von modifiziertem und unmodifiziertem Peptid ergab in beiden Fällen eine Massendifferenz von 151 Da (Abb. 18, C; Δm).

4.3 Immunhistochemische Untersuchungen zum „Tyrosinase-Konzept“

Tyrosinase ist das Schlüssel-Enzym in der biologischen Bildungskaskade von Melaninen bei Säugetieren. Aufgrund der katalytischen Aktivität von Tyrosinase entstehen im Allgemeinen die Melanine der Peripherie, wie der Haut, der Iris und den Meningen. Ob Tyrosinase auch an der Bildung von Neuromelanin und somit für die Pigmentierung des Hirnstamms verantwortlich ist, wird bis heute kontrovers diskutiert.

Alte indirekte Beobachtungen, wonach eine Tyrosinase-ähnliche Enzymaktivität die Oxidation und Polymerisation von Dopamin in den pigmentierten Neuronen der Substantia nigra bewerkstelligen (Marsden, 1961a, 1961b; Miranda et al., 1984), wurden in jüngerer Zeit durch molekularbiologische Techniken spezifiziert (Xu et al., 1997; Tief et al., 1998). Demnach sollte das Protein Tyrosinase in der Substantia nigra exprimiert werden (Tief et al., 1996), konnte allerdings in der bislang einzigen durchgeführten immunhistochemischen Studie nicht detektiert werden (Ikemoto et al., 1998). Außerdem existiert ein Einzelbefund, wonach Menschen mit okulokutanem Albinismus Typ 1, die aufgrund fehlerhafter Tyrosinase kein Pigment in der Peripherie bilden, dennoch einen pigmentierten Hirnstamm haben (Foley und Baxter, 1958).

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, durchgeführt. Ein menschliches melanisiertes Melanom wurde als Positivkontrolle verwendet. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers (Klon T311), der zur pathologischen Diagnose von Melanomen herangezogen wird, konnte die Expression von Tyrosinase durch rötliche Färbung der melanisierten Zellen gezeigt werden (Abb. 19; A). Um eine etwaige Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers mit anderen Proteinen auch trotz Blockierens unspezifischer Bindungsstellen auszuschließen, wurde als Negativkontrolle ausschließlich mit dem sekundärem Antikörper inkubiert. Diese Kontrollschnitte zeigen keine Rotfärbung der Zellen (Abb. 19; B).

Anhand dieses Versuchsaufbaus konnte gezeigt werden, dass Tyrosinase aufgrund fehlender Rotfärbung nicht in der humanen Substantia nigra pars compacta exprimiert wird (Abb. 19; C, D). Da der Antikörper in der Tumordiagnostik verwendet wird, kann von einer Spezifität für Tyrosinase ausgegangen werden. Allerdings ist nicht bekannt, welches Epitop oder welche Bereiche an diesem Protein erkannt werden.

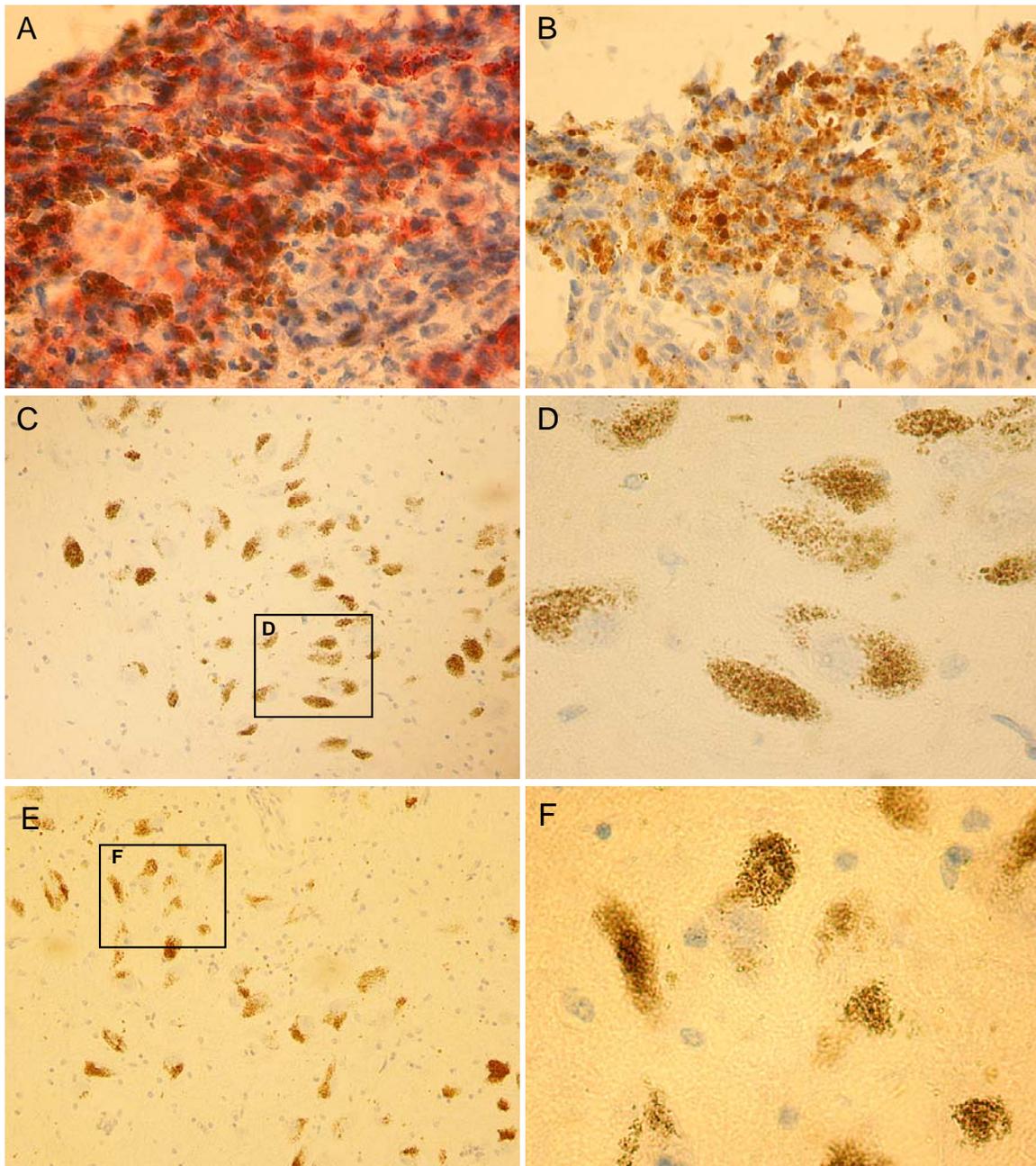


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung eines Melanoms und der Substantia nigra mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (Klon T311). (A) Pigmentiertes Melanomgewebe nach Inkubation mit Anti-Tyrosinase-Antikörper zeigt eine deutliche Färbung für Tyrosinase (rotes Reaktionsprodukt) (100-fache Vergrößerung). (B) Pigmentiertes Melanomgewebe ohne Zugabe des Erstantikörpers (Anti-Tyrosinase), jedoch nach Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Zweitantikörper. Es ist keine unspezifische Färbung erkennbar, die dem Zweitantikörper zuschreibbar wäre (100-fache Vergrößerung). (C) Die pigmentierte Substantia nigra zeigt keine erkennbare Färbung der Neuronen und Gliazellen (50-fache Vergrößerung). (D) Analog zu (C), in 200-facher Vergrößerung. (E) Substantia-nigra-Gewebe nach Inkubation ohne Anti-Tyrosinase-Antikörper (50-fache Vergrößerung). (F) Analog zu (E), in 200-facher Vergrößerung.

4.4 Suche nach Tyrosinase-homologen Sequenzen – Bioinformatik

Zusätzlich zu dem für Tyrosinase kodierenden Gen (TYR; 11q14-q21) existiert ebenfalls auf Chromosom 11 des menschlichen Genoms eine weitere Nucleotid-Sequenz, die mit großer Wahrscheinlichkeit durch teilweise Sequenzverdoppelung aus dem Gen TYR hervorgegangen ist (Abb. 20). Diese Sequenz trägt die Bezeichnung TYRL („tyrosinase-like“; 11p11.2-cen), umfasst allerdings nur die Exone 4 und 5 sowie die flankierenden nichtkodierenden Sequenzen von TYR.

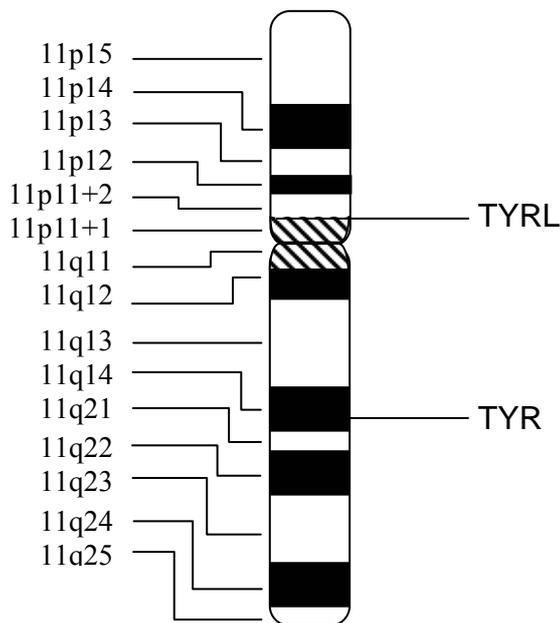


Abbildung 20: Lokalisierung der Sequenzen TYR und TYRL auf Chromosom 11. Das Tyrosinase kodierende Gen TYR befindet sich auf dem langen (q) Arm von Chromosom 11 in der Region q14-q21. Die teilweise Verdoppelung von TYR führte zu der in hohem Maße homologen Sequenz TYRL („tyrosinase-like“) am kurzen Arm in der Region p11.

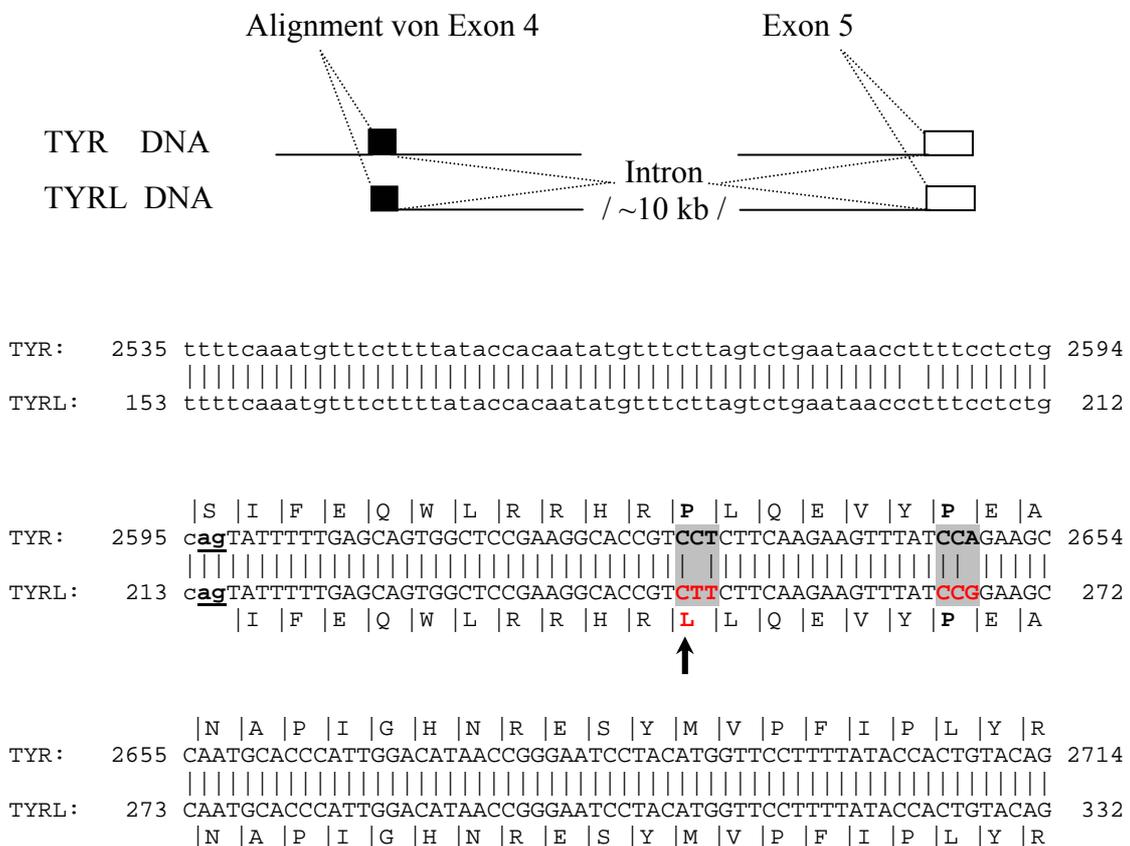
Die Gegenüberstellung der Nucleotid-Sequenzen von TYR (AH003020; Homo sapiens Tyrosinase, gi: 340034) und TYRL (NG_001529; Homo sapiens tyrosinase-like, gi: 24046438) (Tab. 2) mit Hilfe des heuristischen Algorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) zeigt die über weite Bereiche hohe Homologie beider Sequenzen im Bereich der Exone 4 und 5 (Abb. 21).

Die Sequenz TYRL wird allerdings in der Literatur und in Sequenz-Datenbanken (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) als Pseudogen geführt. Pseudogene sind definitionsgemäß Nucleotid-Sequenzen, die im Aufbau einem Gen ähnlich sind, jedoch nicht exprimiert werden können.

Tabelle 2: Daten zu den Nucleotid-Sequenzen von TYR und TYRL.

Gen	Bezeichnung	Position	Datenbank-Eintrag	Länge [bp]	Sequenz-Typ
TYR	Homo-sapiens-Tyrosinase (Okulokutaner Albinismus IA)	11q14-q21	AH003020 (gi: 340034)	3722	DNA
				1-1629 (Exon 1)	
				1630-2088 (Exon 2)	
				2089-2483 (Exon 3)	
				2484-2855 (Exon 4)	
2856-3722 (Exon 5)					
TYRL	Homo-sapiens- "tyrosinase-like"	11p11.2	NG_001529.1 (gi: 24046438)	11369	DNA

Alignment von Exon 4



```

      |N |G |D |F |F |I |S |S |K |D |L |G |Y |D |Y |S |Y |L |Q |D
TYR:  2715 AATGGTGATTCTTTATTTTCATCCAAAGATCTGGGCTATGACTATAGCTATCTACAAGA 2774
      ||| |
TYRL:  333 AACGGTGATTCTTTATTTTCATCCAAAGATCTGGGCTATGACTATAGCTATCTACAAGA 392
      |N |G |D |F |F |I |S |S |K |D |L |G |Y |D |Y |S |Y |L |Q |D

```

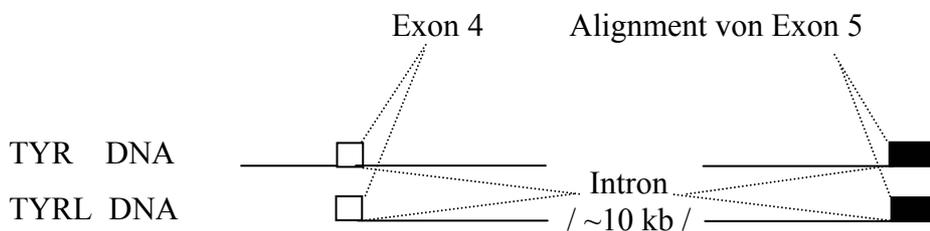
```

      |S |D
TYR:  2775 TTCAGgtaaagtttacttttctttcagaggaattgctgaatctagtg 2859
      ||| |
TYRL:  393 TTCAGgtaaagtttacttttctttccgaggaaatgctgaatctagtg 477
      |S |D

```

.. / ~10 kb / ..

Alignment von Exon 5



```

TYR:  2979 aaggatgaagatgatggtaacaatggtggtaacaataaaaacaatgggatgtccttttat 3038
      ||| |
TYRL: 10592 aaggatgaagatgatggtaacaatggtggtaacaataaaaacaatgggatgtccttttat 10651

```

```

      (D)|P |D |S |F |Q |D |Y |I |K |S |Y |L |E |Q |A |S |R |I
TYR:  3039 ttcagACCCAGACTCTTTTCAAGACTACATTAAGTCCTATTTGGAACAAAGCGAGTCGGAT 3098
      ||| |
TYRL: 10652 ttcagACCCAGACTCTTTTCAAGACTACATTAAGTCCTATTTGGAACAAAGCAAGTCGGAT 10711
      (D)|P |D |S |F |Q |D |Y |I |K |S |Y |L |E |Q |A |S |R |I

```

```

      |W |S |W |L |L |G |A |A |M |V |G |A |V |L |T |A |L |L |A |G
TYR:  3099 CTGGTCATGGCTCCTTGGGGCGGCGATGGTAGGGGCCGTCTCACTGCCCTGCTGGCAGG 3158
      ||| |
TYRL: 10712 CTGGTCATGGCTCCTTGGGGCGGCCATGGTAGGGGCCGTCTCACTGCCCTGCTGGCAGG 10771
      |W |S |W |L |L |G |A |A |M |V |G |A |V |L |T |A |L |L |A |G

```

```

      |L |V |S |L |L |C |R |H |K |R |K |Q |L |P |E |E |K |Q |P |L
TYR:  3159 GCTTGTGAGCTTGCTGTGTCGTCACAAGAGAAAGCAGCTTCCTGAAGAAAAGCAGCCACT 3218
      ||| |
TYRL: 10772 GCTTGTGAGCTTGCTGTGTCGTCACAAGAGAAAGCAGCTTCCTGAAGAAAAGCAGCCACT 10831
      |L |V |S |L |L |C |R |H |K |R |K |Q |L |P |E |E |K |Q |P |L

```

```

      |L |M |E |K |E |D |Y |H |S |L |Y |Q |S |H |L |STOP
TYR:  3219 CCTCATGGAGAAAGAGGATTACCACAGCTTGTATCAGAGCCATTTATAAaaggcttaggc 3278
      ||| |
TYRL: 10832 CCTCATGGAGAAAGAGGATTACCACAGCTTGTATCAGAGCCATTTATAAaaggcttaggc 10891
      |L |M |E |K |E |D |Y |H |S |L |Y |Q |S |H |L |STOP

```

```

TYR: 3279 aatagagtagggccaaaaagcctgacctcactctaactcaaagtaatgtccagggtccca 3338
          |||
TYRL: 10892 aatagagtagggccaaaaagcctgacctcactctaactcaaagtaatgtccagggtccca 10951

TYR: 3339 gagaatatctgctggatattttctgtaaagaccatttgcaaaattgtaacctaatacaaa 3398
          |||
TYRL: 10952 gagaatatctgctgatattttctgtaaagaccatttgcaaaattgtaacctaatacaaa 11011

TYR: 3399 gtagccttcttccaactcaggtagaacacacacctgtctttgtcttgctgttttcactca 3458
          |||
TYRL: 11012 gtatagccttcttccaactcaggtagaacggcacacctgtctttgtcttgctgttttcactca 11071

TYR: 3459 gcccttttaacattttcccctaagcccatatgtctaaggaaaggatgctattttgtaatg 3518
          |||
TYRL: 11072 gcccttttaacattttcccctaagcccatatgtctaaggaaaggacgctattttgtaatg 11131

TYR: 3519 aggaactgttattgtatgtgaattaaagtgctctt 3555
          |||
TYRL: 11132 aggaactgttactgtatgtgaattaaagtgctctt 11168

```

Abbildung 21: Alignment der Exone 4 und 5 des Gens TYR mit der Sequenz TYRL. In der Gegenüberstellung von TYR (AH003020) und TYRL (NG_001529.1) mit dem heuristischen Algorithmus BLAST wird die große Ähnlichkeit der Sequenzen erkennbar. Die nicht-kodierenden Teile der Sequenzen sind als Kleinbuchstaben, die kodierenden als Großbuchstaben angegeben. Tri-Nucleotide (Codons), die einen durchgehenden Leserahmen ergeben, sind jeweils ober- und unterhalb der Nucleotid-Sequenzen als korrespondierende Aminosäuren im Einbuchstabencode wiedergegeben. Die Intron-Exon-Grenzen in TYRL sind formal betrachtet intakt (AG/GT-Regel; unterstrichen). Vertikale Linien in der mittleren Zeile zwischen den beiden Nucleotid-Sequenzen zeigen jeweils identische Nucleotide an, ein Fehlen solcher Linien eine Sequenzabweichung (fett, graue Kästchen). Derartige Abweichungen in den kodierenden Bereichen (Großbuchstaben) führten durchwegs zu stillen Mutationen in TYRL, d.h. nur mit einer einzigen Ausnahme zu einem Basenaustausch in Exon 4 (Pfeil), der eine Veränderung auf Proteinebene durch einen Aminosäureaustausch (Prolin → Leucin) zur Folge haben würde.

Scheinbar basiert dieser Befund auf der Tatsache, dass Wissenschaftler mit Spezialisierung auf die okulokutane Pigmentierung keine Expression dieser Sequenz in pigmentiertem Hautgewebe feststellen konnten (Takeda et al., 1991). In einer einzigen Arbeit wird jedoch eine Expression und Funktion von TYRL in anderen Gewebetypen als der Haut für möglich gehalten (Giebel et al., 1991a).

Die Sequenzanalyse bestätigt (1) das formale Vorhandensein von intakten Spleiss-Sequenzen zum gezielten Herausschneiden der Introns und dem Zusammenfügen der Protein-kodierenden Exons. Nucleotidabweichungen von der Muttersequenz TYR betragen laut Literatur (2) in den nichtkodierenden Bereichen 2.6 %, jedoch nur 0.7 % in den kodierenden Bereichen der verbleibenden beiden Exons. Diese Diskrepanz könnte

Hinweis auf einen noch andauernden Selektionsdruck auf diese Sequenz und folglich eine stattfindende Expression von TYRL sein. Vor allem sind jedoch diese Mutationen (3) bis auf eine Ausnahme „still“ und bewirken somit keine Veränderung der Aminosäuresequenz. Der erwähnte Basenaustausch, der zu einer tatsächlichen Aminosäuresubstitution führte, ist (4) auch für das Mutterprotein Tyrosinase bekannt und hatte dort zwar eine dramatische Verminderung der Aktivität des Enzyms, jedoch keine vollständige Inaktivierung des Enzyms zur Folge. Diese Veränderung wurde unter OCA IB (okulokutaner Albinismus Typ IB, „yellow“, TYR, Pro-406-Leu) eingeordnet (Giebel et al., 1991b). Der korrespondierende Phänotyp zeichnet sich durch eine komplett fehlende okulokutane Pigmentierung zum Zeitpunkt der Geburt aus, wobei sich erst im Laufe der Kindheit eine gelb-rote Pigmentierung (Phäomelanin) entwickelt (Tripathi et al., 1992). Die Sequenzverdoppelung fand (5) vor etwa 24 Millionen Jahren statt und stellt somit ein jüngeres Ereignis der Primatenevolution dar. Tatsächlich findet sich diese Sequenzverdoppelung z.B. nicht im Genom der Maus (Barton et al., 1988).

4.4.1 BLAST-Suche nach „expressed sequence tags“ von TYRL

Mit der Sequenz von TYRL (NG_001529; „homo sapiens tyrosinase-like“, gi: 24046438) (Tab. 2) wurde mittels BLAST unter Verwendung der EST-human-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) nach homologen „expressed sequence tags“ (ESTs) gesucht (EST, „expressed sequence tag“). ESTs sind partiell sequenzierte cDNA-Sequenzen, die auf der Basis von mRNAs, die man aus bestimmten Gewebe- oder Zelltypen isoliert hat, *in vitro* synthetisiert worden sind. Daher können ESTs in vielen Fällen Auskunft darüber geben, ob ein bestimmtes Gen *in vivo* exprimiert wird.

Unter den 289 von BLAST vorgeschlagenen Sequenzen befanden sich hauptsächlich Tyrosinase-Sequenzen (TYR). Überraschenderweise konnten anhand der bekannten Mutationen jedoch drei Datenbankeinträge identifiziert werden, die tatsächlich mit der Sequenz TYRL übereinstimmen (Tab. 3).

Tabelle 3: Exprimierte TYRL-Sequenzen. Nach Durchsuchen der EST-human-Datenbank mit der Sequenz TYRL (NG_001529.1) wurden drei Sequenzen identifiziert, die eine hohe Homologie zu TYRL zeigen. Ein kleiner E-Wert (expectation-cut-off-Wert) ist gleichbedeutend mit hoher Signifikanz.

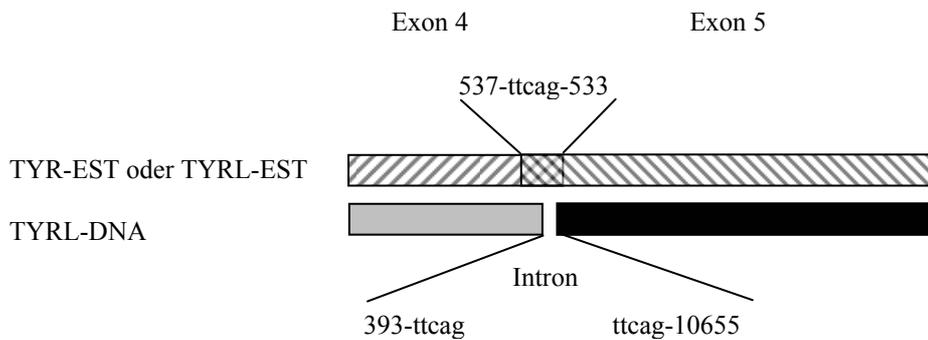
TYRL-ESTs	Sequenz (GenBank file acc. #)	Gewebe, cDNA-Bank	Übereinstimmung [bp]	Lücken [bp]	Score, [E-Wert]
EST (1)	gi: 7458229 (AW665590.1)	fötale Lunge, Hoden, Lymph-Knoten (B-Zellen) (gepoolt)	Exon 4: 54/57 (94 %)	0	91.7 bits (46), [9 ⁻¹⁵]
			Exon 5: 532/532 (100 %)	0	1055 bits (532), [0.0]
<i>Homo sapiens, Soares_NFL_T_GBC_SI</i>					
EST (2)	gi: 3797932 (AI218117.1)	fötale Lunge, Hoden, Lymph-Knoten (BZellen) (gepoolt)	Exon 4: 145/149 (97 %)	4/149 (2 %)	232 bits (117), [4 ⁻⁵⁷]
			Exon 5: 392/392 (100 %)	0	777 bits (392), [0.0]
<i>Homo sapiens, Soares_NFL_T_GBC_SI</i>					
EST (3)	gi: 3770763 (AI208821.1)	Hoden	Exon 4: 473/487 (97 %)	6/487 (1 %)	821 bits (414), [0.0]
<i>Homo sapiens, Soares_testis_NHT</i>					

4.4.2 Homologievergleich von TYR- und TYRL-ESTs

Die Übereinstimmung von Sequenz 1 [Tabelle 3, EST (1)] mit der Sequenz TYRL wurde mit Hilfe eines Alignments bestätigt (Abb. 22). Diese Daten sind Hinweis darauf, dass TYRL tatsächlich als mRNA exprimiert werden kann. Somit muss auch ein intakter Promotor vor TYRL geschaltet sein. Wie anhand der ttacg-Nucleotid-Abfolgen aus den Alignments der genomischen TYRL-DNA-Sequenz (TYRL) mit den cDNAs (ESTs) für Tyrosinase [TYR (EST), bp 177-181] und für TYRL [EST (1), bp 537-533] ersichtlich ist, wird auch TYRL nach der Transkription in RNA durch Entfernung des Introns korrekt prozessiert. Die Exon-Intron-Grenzen sind somit intakt und folgen der Konsensus-Sequenz eukaryotischer Gene für Spleiss-Donor und -Akzeptor (AG/GT-Regel). Bei der Prozessierung der RNA wird ein „Phase-2“-Intron herausgeschnitten, das zwischen dem zweiten und dritten Nucleotid eines Codons eingefügt ist, so dass sich erst durch die Verknüpfung der beiden Exons ein sinnvoller und durchgehender Leserahmen für eine etwaige Protein-Translation eröffnet.

Folgende Sequenzen wurden für den Homologievergleich herangezogen:

TYR [EST]: (NCBI) gi:13705028
 TYRL DNA: (NCBI) gi: 24046438
 TYRL [EST (1)]: (NCBI) gi: 7458229



TYRL-DNA-Exon 4

```

TYR (EST)  2  tttttgagcagtggctccgaaggcaccgtccctcttcaagaagtttatccagatgccaatg 61
            |||
TYRL       218 tttttgagcagtggctccgaaggcaccgtcctcttcaagaagtttatccggaagccaatg 277

TYR (EST)  62  caccattggacataaccgggaatcctacatggttccttttataaccactgtacagaaatg 121
            |||
TYRL       278 caccattggacataaccgggaatcctacatggttccttttataaccactgtacagaaacg 337

TYR (EST) 122  gtgatttctttatttcatccaagatctgggctatgactatagctatctacaagatttcag 181
            |||
TYRL       338 gtgatttctttatttcatccaagatctgggctatgactatagctatctacaagatttcag 397
            |||
EST (1)    589  atttctctatttcatccaagatctgggntatgactatagctatccaacaagatttcag 533
    
```

TYRL-DNA-Exon 5

```

TYR (EST) 177  ttcagaccagactcctttcaagactacattaagtcctatttgaacaagcgagtcggat 236
            |||
TYRL     10651 ttcagaccagactcctttcaagactacattaagtcctatttgaacaagcgaagtcggat 10710
            |||
EST (1)   537  ttcagaccagactcctttcaagactacattaagtcctatttgaacaagcgaagtcggat 478

TYR (EST) 237  ctggatcatggctccttggggcgccgatggttagggccgctcctcactgccctgctggcagg 296
            |||
TYRL     10711 ctggatcatggctccttggggcgccgatggttagggccgctcctcactgccctgctggcagg 10770
            |||
EST (1)   477  ctggatcatggctccttggggcgccgatggttagggccgctcctcactgccctgctggcagg 418
    
```


Da nun anhand identifizierbarer ESTs gezeigt werden konnte, dass TYRL prinzipiell exprimiert werden kann, wurde der konkreten Frage nachgegangen, ob in der Substantia nigra pars compacta ein von dieser Sequenz abgeleitetes Protein exprimiert wird. Diese weiterführenden Untersuchungen wurden auf immunhistochemischer Ebene durchgeführt.

4.5 Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen zum „Tyrosinase-Konzept“

Die immunhistochemische Untersuchung an humanem Substantia-nigra-Gewebe mit dem monoklonalen Antikörper MAT-1 wurde nach dem bereits oben beschriebenen Versuchsaufbau wiederholt (Kapitel 3.3). Dieser einzige monoklonale Antikörper, der für immunhistochemische Untersuchungen geeignet ist, erkennt ein Epitop bestehend aus der Aminosäuresequenz EDYH am C-terminalen Ende von Tyrosinase (Takimoto et al., 1995). Sofern TYRL für ein Protein kodieren würde, sollte dieses Epitop auch an diesem Protein vorhanden sein (Abb. 22, Alignment von Exon 5).

Der Antikörper ergab an der zuvor getesteten Positivkontrolle (Abb. 23; A) wider Erwarten keine Färbung für Tyrosinase. Dies wurde damit erklärt, dass diese Zellen aufgrund ihrer Entartung zu Tumorzellen möglicherweise kein vollständiges Protein synthetisieren würden. Allerdings wurde auf den Gewebeschnitten der Substantia nigra pars compacta und des Locus coeruleus eine Rotfärbung beobachtet (Abb. 24-26). Die Auswertung der Schnitte zeigte eine Färbung der Neurone, wohingegen Gliazellen keine Färbung zeigten. Innerhalb der Neurone ist die Färbung an granuläre Strukturen assoziiert. Bei kritischer Betrachtung der Schnitte wurde jedoch eine deutliche Unspezifität der Bindung des Antikörpers festgestellt (Abb. 27). Die Untersuchung zur Expression eines TYRL-korrespondierenden Proteins unter Anwendung immunhistochemischer Detektionsmethoden ergab somit keine zufriedenstellenden, eindeutigen Ergebnisse.

Als alternative Methode wurde daher die immunologische Detektion etwaiger Proteine, die sich von den genomischen Sequenzen TYR oder TYRL ableiten, mittels Western Blots vorgenommen. Dafür wurde analog zu den immunhistochemischen Untersuchungen ein gegen den C-Terminus gerichteter polyklonaler Antikörper verwendet, der zusätzlich zu humaner Tyrosinase auch Tyrosinase der Maus detektieren

kann. Dies war insofern ein entscheidender Vorteil, da somit die murine Melanom-Zelllinie B16 als eine besonders leicht zugängliche Positivkontrolle für eine exprimierte Säugetier-Tyrosinase herangezogen werden konnte.

Im Vergleich von humanem Substantia-nigra-Homogenat mit murinem B16-Homogenat konnte in der Positivkontrolle (B16) eine Einzelbande für Tyrosinase sichtbar gemacht werden, allerdings wurde keine Proteinbande im Substantia-nigra-Homogenat detektiert (Abb. 28). Somit kann abschließend davon ausgegangen werden, dass weder in humaner Substantia nigra pars compacta noch im Locus coeruleus ein von TYRL abgeleitetes Protein exprimiert ist.

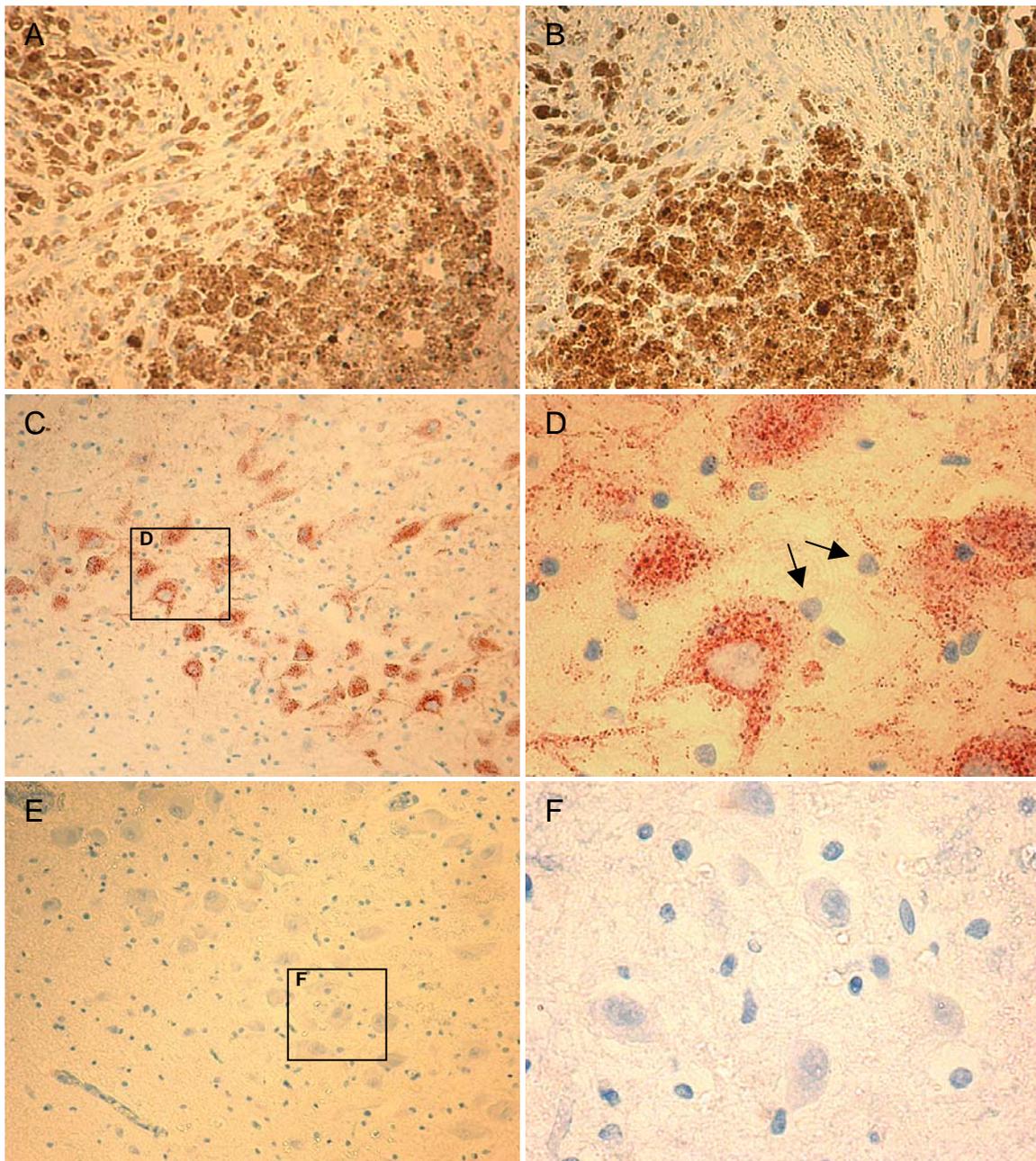


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung der Substantia nigra eines Kindes mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1). (A) Pigmentiertes Melanomgewebe nach Inkubation mit Anti-Tyrosinase-Antikörper. Es ist keine Färbung für Tyrosinase erkennbar (100-fache Vergrößerung). (B) Pigmentiertes Melanomgewebe ohne Zugabe des Erstantikörpers (Anti-Tyrosinase), jedoch nach Inkubation des Peroxidase-markierten Zweitantikörpers. Es ist keine unspezifische Färbung erkennbar, die dem Zweitantikörper zuschreibbar wäre (100-fache Vergrößerung). (C) Eine noch unpigmentierte Substantia nigra eines Kindes zeigt eine deutlich erkennbare Färbung in den Neuronen, wobei die Glia nicht gefärbt ist (50-fache Vergrößerung). (D) In den Neuronen sind granulären Strukturen angefärbt, wobei der Zellkern ungefärbt ist. In Gliazellen ist keine Färbung zu erkennen (Pfeile) (200-fache Vergrößerung). (E) Substantia-nigra-Gewebe nach Inkubation ohne Anti-Tyrosinase-Antikörper (50-fache Vergrößerung). (F) Analog zu (E), in 200-facher Vergrößerung.

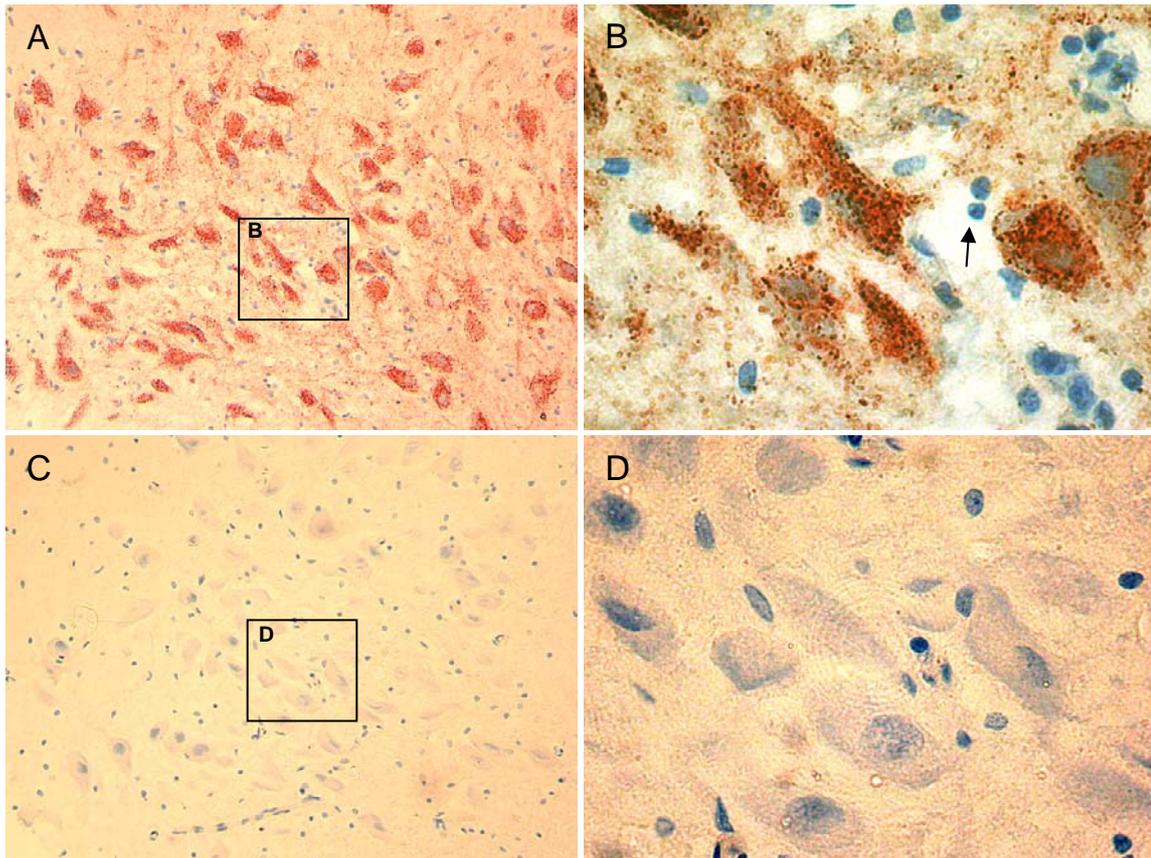


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung des Locus coeruleus eines Kindes mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1). (A) Ein noch unpigmentierter Locus coeruleus eines Kindes zeigt eine deutlich erkennbare Färbung in den Neuronen, wobei die Gliazellen keine Färbung zeigen (50-fache Vergrößerung). (B) In den Neuronen sind granulären Strukturen angefärbt, der Zellkern ist ungefärbt. In Gliazellen ist keine Färbung zu erkennen (Pfeil) (200-fache Vergrößerung). (C) Locus-coeruleus-Gewebe nach Inkubation ohne Anti-Tyrosinase-Antikörper (Vergrößerung 50-fach). (D) Analog zu (E), in 200-facher Vergrößerung.

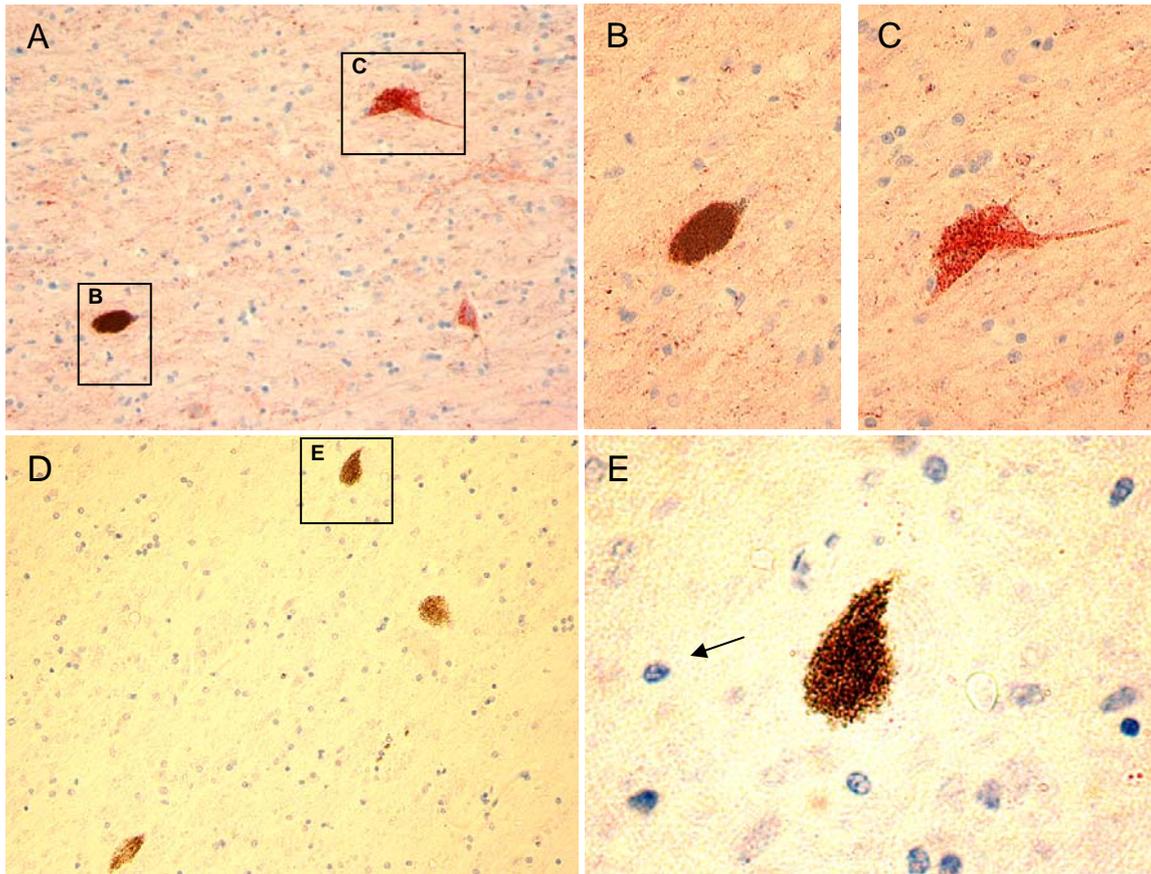


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung der Substantia nigra eines Erwachsenen mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1). (A) Eine pigmentierte Substantia nigra eines Erwachsenen zeigt eine deutlich erkennbare Färbung in den Neuronen, wobei die Gliazellen ungefärbt sind (50-fache Vergrößerung). (B) In stark pigmentierten Neuronen ist die Rotfärbung nur schwer erkennbar. Unklar ist, ob sich das rote Reaktionsprodukt in unmittelbarer Nähe zu den dunklen Neuromelanin-Granula befindet. In Gliazellen ist keine Färbung zu erkennen (Pfeil) (200-fache Vergrößerung). (C) In einem weniger stark pigmentierten Neuron sind eine starke cytosolische Rotfärbung und rotgefärbte granuläre Strukturen sichtbar (200-fache Vergrößerung). (D) Substantia-nigra-Gewebe nach Inkubation ohne Anti-Tyrosinase-Antikörper. Es ist keine unspezifische Färbung durch den Zweitantikörper erkennbar (50-fache Vergrößerung). (E) Analog zu (D), in 200-facher Vergrößerung.

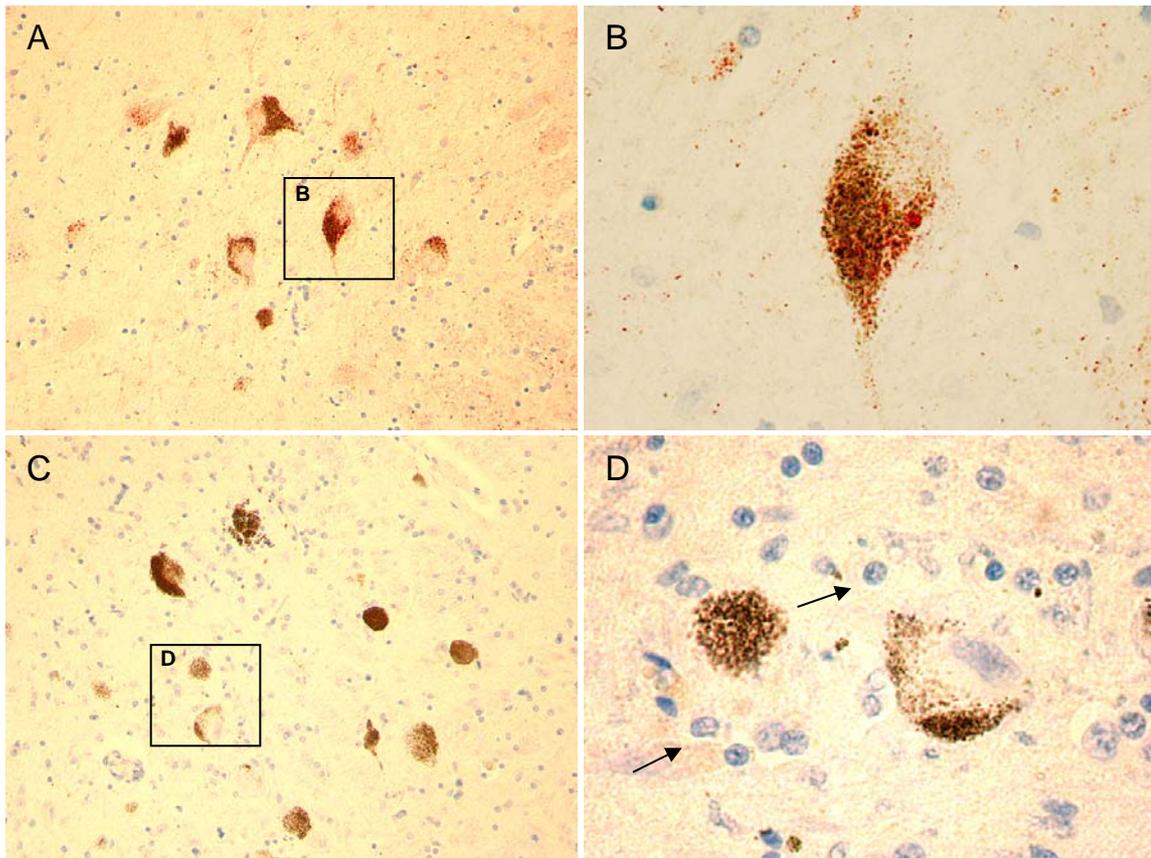


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung des Locus coeruleus eines Erwachsenen mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1). (A) Der Locus coeruleus eines Erwachsenen zeigt eine erkennbare Färbung in den teilweise stark pigmentierten Neuronen, wobei die Gliazellen ungefärbt sind (50-fache Vergrößerung). (B) In stark pigmentierten Neuronen ist die Rotfärbung nur schwer erkennbar. Unklar ist, ob sich das rote Reaktionsprodukt in unmittelbarer Nähe zu den dunklen Neuromelanin-Granula befindet. In Gliazellen ist keine Färbung zu sehen (Pfeile) (200-fache Vergrößerung). (C) Locus-coeruleus-Gewebe nach Inkubation ohne Anti-Tyrosinase-Antikörper. Es ist keine unspezifische Färbung durch den Zweitantikörper erkennbar. (50-fache Vergrößerung). (D) Analog zu (C), in 200-facher Vergrößerung.

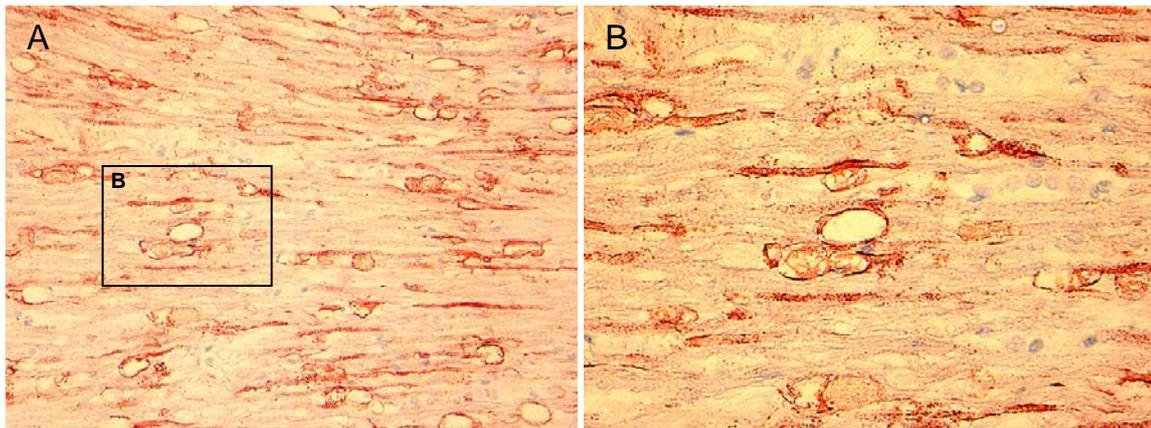


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung des Locus coeruleus eines Erwachsenen mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1). (A) Der Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1) färbt schwer zuordenbare Strukturen um Blutgefäße an, so dass eher von einer unspezifischen Bindung des Antikörpers an mehrere Proteine auszugehen ist (50-fache Vergrößerung). (B) Vergrößerter Ausschnitt aus (A) (100-fache Vergrößerung).

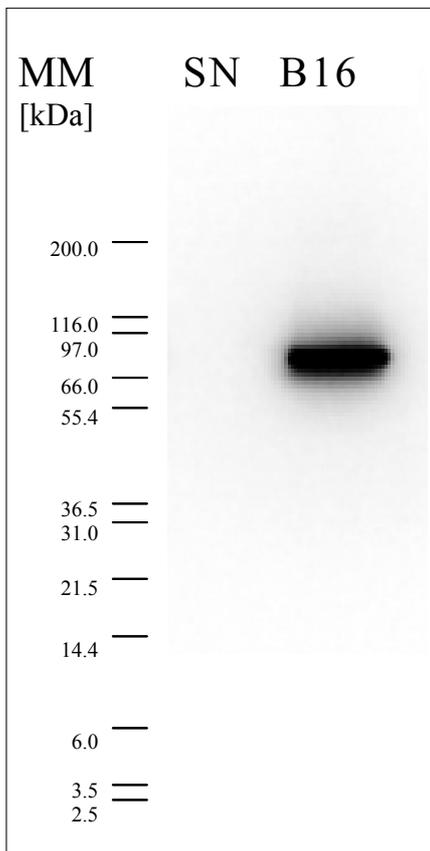


Abbildung 28: Untersuchung der Expression von Tyrosinase mittels Western Blots. Mit der Western-Blot-Analyse wurde die Expression von Tyrosinase in der B16-Maus-Melanom-Zelllinie und humanem Substantia-nigra-Gewebe untersucht. Der Anti-Tyrosinase-Antikörper (H109) detektiert sowohl humane, als auch murine Tyrosinase. Tyrosinase ist als Einzelbande in der Positiv-Kontrolle (B16) erkennbar, jedoch wird kein derartiges Protein in Substantia-nigra-Gewebe (SN) exprimiert.

4.6 Subzelluläre Proteom-Analyse – ein Lösungsansatz zur Analyse Neuromelanin-assoziiierter Proteine

Mit den üblichen Arbeitsvorschriften zur Isolierung von humanem Neuromelanin konnten daran assoziierte Proteine bislang nicht identifiziert werden. Gründe dafür sind in erster Linie die destruktiven Bedingungen, wie der Einsatz von verschiedenen organischen Lösungsmitteln, Detergentien und Proteasen.

Als Lösungsstrategie für dieses Problem wurde eine besonders schonende Isolierung der Neuromelanin-Granula in möglichst kompletter Form mittels „subzellulärer Fraktionierung“ angestrebt.

Arbeitsvorschrift 1 – Isolierung von Neuromelanin-Granula in einem Schritt

Tief gefrorenes Gewebe von Substantia nigra pars compacta wurde in 4°C kaltem Puffer bei Anwesenheit von 0.01 % (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail aufgetaut und nach Potter-Elvehjem mit Hilfe eines rotierenden Pistills homogenisiert. Das Homogenat wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet und bei $5000 \times g$ zentrifugiert. Das dunkelbraun gefärbte Neuromelanin-Pellet war mit Zellkernen verunreinigt, die auch nach weiteren Zentrifugationsschritten durch ein Saccharosekissen nicht abgereichert werden konnten.

Diese Strategie einer möglichst einfachen Homogenisierung und Isolierung der Zielorganelle in nur einem Schritt musste verworfen werden, da bereits mit freiem Auge Verunreinigungen erkennbar waren.

Arbeitsvorschrift 2 – Optimierung durch sequentielle Anreicherung

Das Substantia-nigra-pars-compacta-Gewebe wurde, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, in „Separationspuffer“ aufgetaut und durch ein Siebgewebe in eine Petrischale gepresst. Die Petrischale wurde dabei auf einer Kühlplatte konstant auf 4°C gekühlt. Auf diese schonende Weise wurde das Gewebe in Zellen und neuronale Zellkörper disaggregiert. Diese Einzelzellsuspension wurde auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet (0.5 M-, 1.0 M-, 1.2 M-, 1.6 M-Saccharoseschichten) und mittels Zentrifugation 15 Minuten lang bei $4000 \times g$ und 4°C fraktioniert (Abb. 29).

- Transmissionselektronenmikroskopie
- Gelelektrophorese und Western Blot
- Massenspektrometrie (nano-HPLC-ESI-MS/MS)

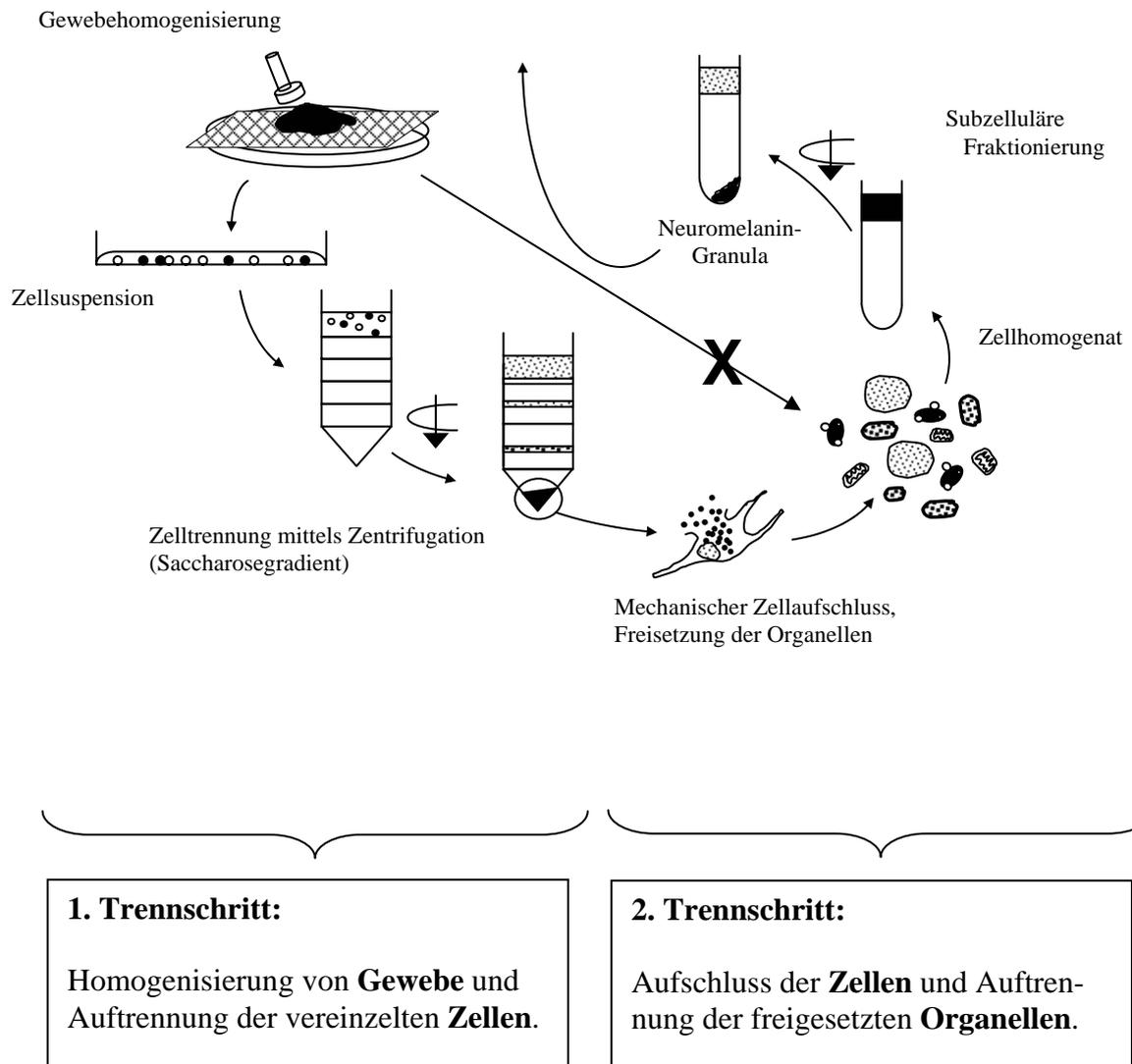


Abbildung 29: Schema zur Isolierung von Neuromelanin-Granula aus Substantia-nigra-Gewebe. Die Isolierungsstrategie sieht zwei aufeinander folgende Trennschritte vor, wobei die Komplexität der Probe bei jedem Schritt verringert wird. Der erste Trennschritt umfasst die Homogenisierung von Substantia-nigra-pars-compacta-Gewebe zu einer Zellsuspension, die mittels Zentrifugation durch einen Saccharosegradienten fraktioniert wird. Bei diesem Schritt werden pigmentierte neuronale Zellkörper als Pellet gewonnen. In einem zweiten Trennschritt erfolgt die Isolierung der Pigmentgranula nach Zellaufschluss und Zentrifugation durch ein Percoll-Kissen. Eine direkte Isolierung dieser Zielorganellen aus dem Gewebe ist aufgrund der Komplexität der Probe nicht zweckmäßig.

Unter Verwendung solch eines Saccharosegradienten gelang es, die weniger dichten Bestandteile des Gewebes von den pigmentierten Neuronen zu trennen. Die dunkelbraunen Zellkörper pigmentierter Neurone wurden isoliert (Abb. 30), mit

„Isolierungspuffer“ gewaschen und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Ausnutzung mechanischer Scherkräfte bei 10-maligem Durchpressen der Suspension durch eine Spritze mit dünner Nadel (I.D. = 450 μm). Das nun entstandene Zellhomogenat wurde über ein 80 % (v/v) Percoll-Kissen geschichtet und 10 Minuten lang bei $4000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das dunkle Pellet wurde einmal mit „Isolierungspuffer“ und einmal mit „Waschpuffer“ [0.01 % (v/v) Triton-X-100] gewaschen, um unspezifisch adsorbierte Proteine zu entfernen.

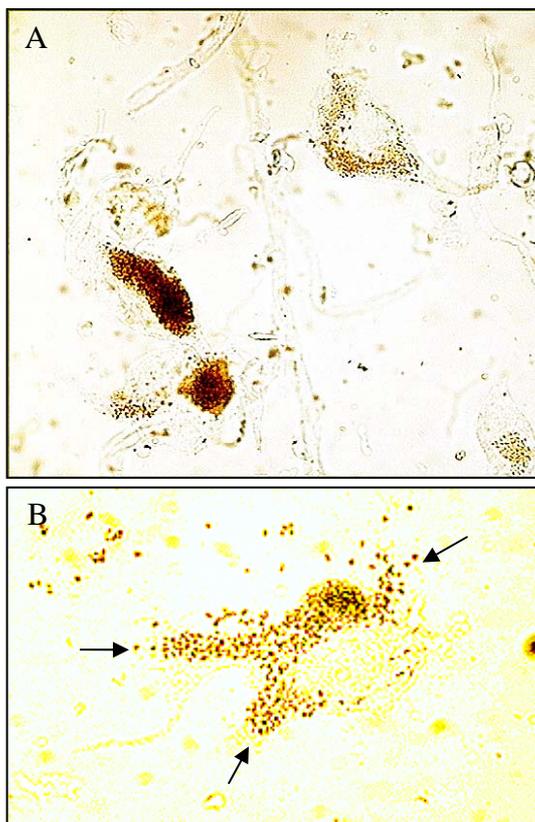


Abbildung 30: Isolierung melanisierter Zellkörper und Zellaufschluss. (A) Nach Zentrifugation durch den Saccharosegradienten können pigmentierte neuronale Zellkörper isoliert werden. (B) Nach mechanischem Aufschluss dieser Zellen werden Neuromelanin-Granula freigesetzt (Pfeile).

In Hinblick auf eine Identifizierung der Proteine der Neuromelanin-Granula mit sensitiven massenspektrometrischen Methoden wurde die Isolierung nun dahingehend optimiert, dass sie mit einer schrittweisen Reduktion der Probenkomplexität einhergeht. Auf diese Weise sollen etwaige Proteinkontaminationen aus nicht pigmentierten Zellen, beispielsweise aus Gliazellen, weitgehend unterbunden werden und dadurch die Plausibilität der massenspektrometrischen Daten erhöht werden.

Durch Verwendung von Percoll als einem zu Saccharose alternativem Dichtemedium konnte für den zweiten Zentrifugationsschritt eine bessere Aufreinigung der Neuromelanin-Granula erzielt werden. Percoll ist eine Suspension aus Polyvinylpyrrolidon-beschichteten kolloidalen Silica-Partikeln. Percoll hat eine bedeutend geringere Osmolarität als eine entsprechende Saccharose-Lösung, wodurch eine bessere Trennung von Organellen und Vesikel gelingt. Des Weiteren zeichnet sich Percoll durch eine mit Wasser vergleichbare Viskosität aus, so dass bereits bei einer Zentrifugalbeschleunigung von wenigen $1000 \times g$ eine optimale Trennung erfolgt. Eine Trennung von Organellen kann somit auch ohne Verwendung von Ultrazentrifugen erfolgen.

4.7 Qualitätskontrolle

Zur Beurteilung der Qualität der subzellulären Fraktionierung wurden die isolierten Neuromelanin-Granula sowohl mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie morphologisch untersucht, aber auch mittels Western Blots auf molekularer Ebene analysiert.

4.7.1 Qualitätskontrolle mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde angewandt, um dadurch auf morphologischer Ebene die Effizienz der Isolierung von Neuromelanin-Granula zu beurteilen. Unter Verwendung dieser Technik kann einerseits die Integrität von subzellulären Fraktionen überprüft werden (Huber et al., 2003), jedoch kann darüber hinaus die Sauberkeit einer Organellenpräparation anhand der An- oder Abwesenheit zellulärer Kompartimente und anderer kontaminierender Strukturen optisch abgeschätzt werden. Eine einfache Möglichkeit zur Abschätzung der Isolierungseffizienz besteht durch den direkten Vergleich der optischen Erscheinung sowohl der Probe vor der Isolierung als auch der Fraktion der isolierten Zielorganellen.

Abbildung 31 (A, B) zeigt ein Zellhomogenat vor der Zentrifugation durch das Percoll-Kissen. Zusätzlich zu dunkel gefärbten Neuromelanin-Granula sind zahlreiche vesikuläre Zellbestandteile und subzelluläre Kompartimente erkennbar, wohingegen die Fraktion mit den isolierten Neuromelanin-Granula (Abb. 31; C, D) zumindest auf elektronenmikroskopischer Ebene frei von kontaminierenden Organellen ist.

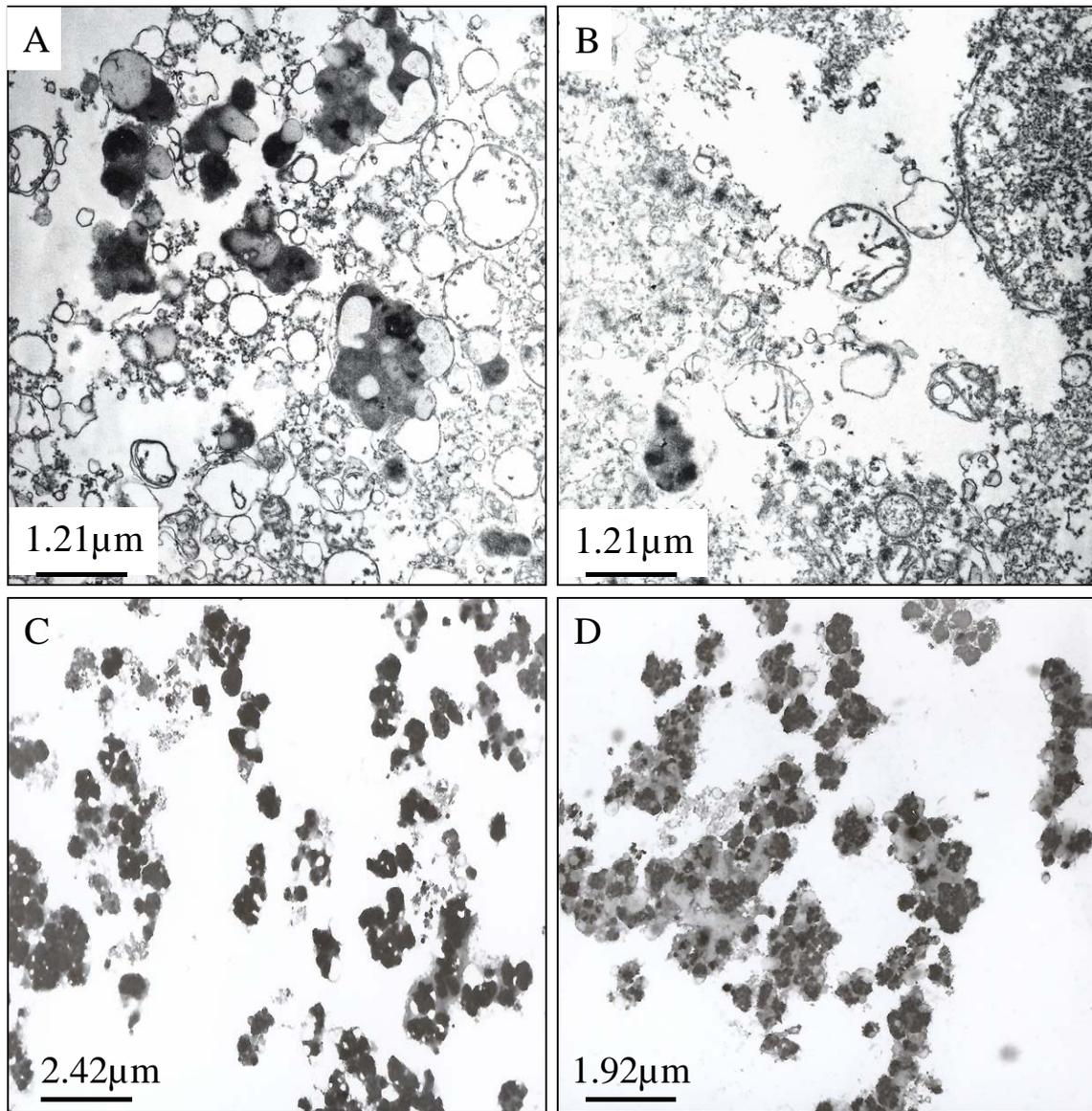


Abbildung 31: Qualitätskontrolle von isolierten Neuromelanin-Granula auf morphologischer Ebene. Zur Validierung der Isolierungseffizienz dient der Vergleich der Zellhomogenate mit den daraus isolierten Neuromelanin-Granula mittels Transmissionselektronenmikroskopie. (A, B) Zellhomogenate enthalten vereinzelt Neuromelanin-Granula im Verbund mit vesikulären subzellulären Kompartimenten. (C, D) Dagegen sind Neuromelanin-Granula nach der Isolierung angereichert. Auf transmissionselektronenmikroskopischer Ebene ist keine Verunreinigung durch Organellen erkennbar.

Das Erscheinungsbild der Neuromelanin-Granula nach der Isolierung korrespondiert sehr gut mit der Morphologie jener Kompartimente im Gewebe (Hirosawa, 1968; Moses et al., 1966). Morphologische Merkmale, wie etwa die Bereiche unterschiedlicher Elektronendichte, aber auch die zerklüftete Form der Granula sind gut sichtbar. Hervorzuheben ist, dass selbst die vakuolenartigen Lipidstrukturen nach der Isolierung erhalten bleiben. Erstaunlicherweise stellen diese Lipidstrukturen einen beträchtlichen

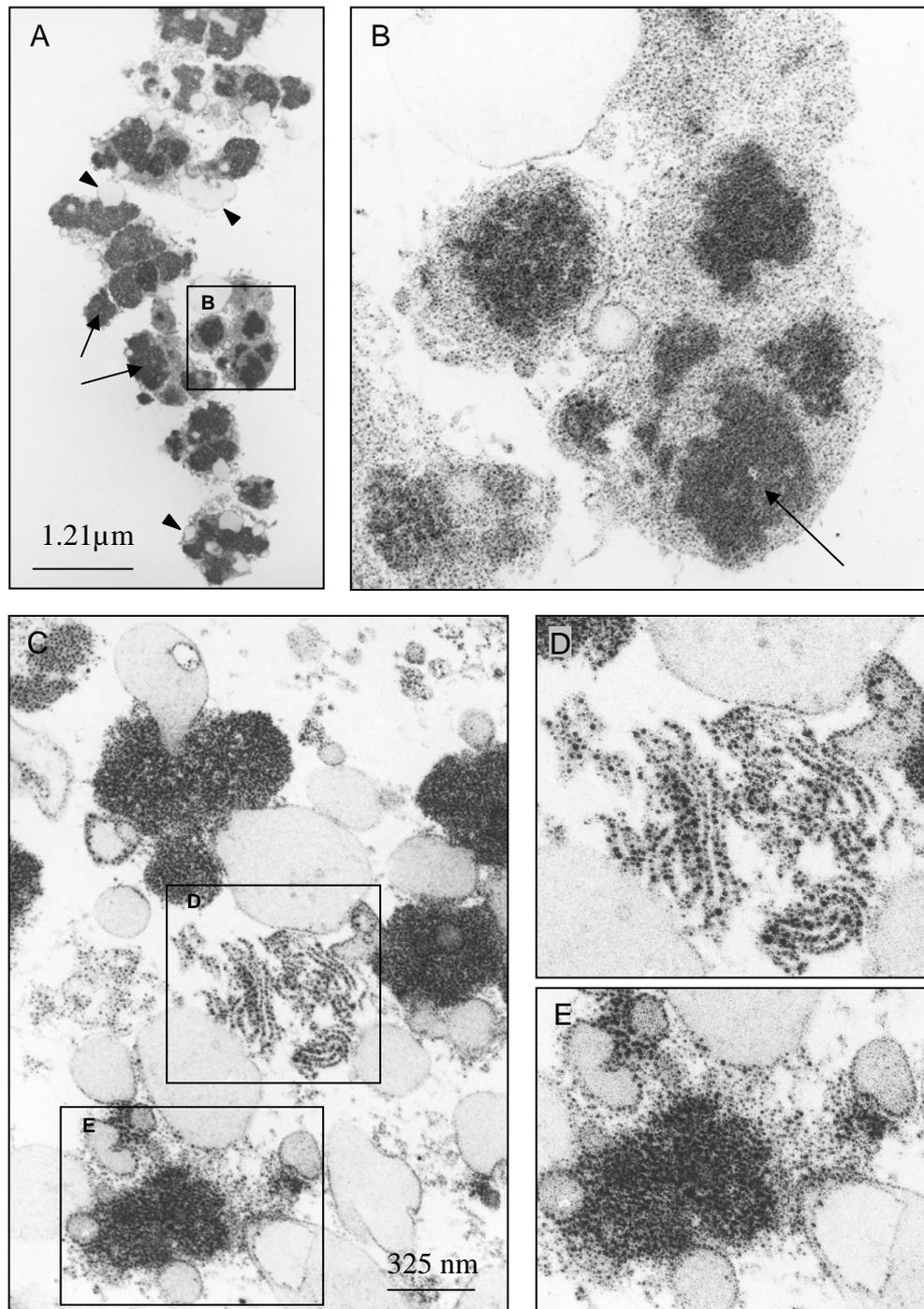


Abbildung 32: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Neuromelanin-Granula. (A, B, C, E) Die morphologischen Charakteristika von Neuromelanin-Granula sind nach der Isolierung gut erhalten. Die elektronendichten, dunklen Bereiche (Pfeile) repräsentieren das Pigment Neuromelanin. Selbst die als Lipidvakuolen beschriebenen Strukturen (Pfeilspitzen) sind nach Isolierung an die Organellen assoziiert. (C, D) Die beim mechanischen Aufschluss auftretenden Scherkräfte lassen fibrilläre Strukturen zu Tage treten (D), die große Ähnlichkeit mit bereits *in situ* beschriebenen Strukturen aufweisen. Diese Fibrillen könnten eine Proteinmatrix darstellen, auf der Neuromelanin gebildet wird.

Anteil der gesamten Granula dar (Abb. 32). Eine Membran im Sinne einer Lipiddoppelschicht, die diese Organellen umgibt, ist jedoch nicht erkennbar.

4.7.2 Qualitätskontrolle mit Hilfe von Western Blots

Eine weitere Qualitätsevaluierung der Isolierung erfolgte auf Proteinebene unter Anwendung von Western Blots, wobei mittels Detektion spezifischer Organell-Markerproteine die An- oder Abreicherung bestimmter Organellen in der Neuromelanin-Granula-Fraktion (NM) im Vergleich zu einem Homogenat aus gesamtem Substantia nigra-Gewebe (SN) verfolgt wurde (Abb. 33).

Als mögliche Verunreinigungen wurden folgende subzelluläre Kompartimente anhand ihrer Marker untersucht: der Golgi-Apparat (*cis*-Golgi-Matrixprotein; GM130) [a],

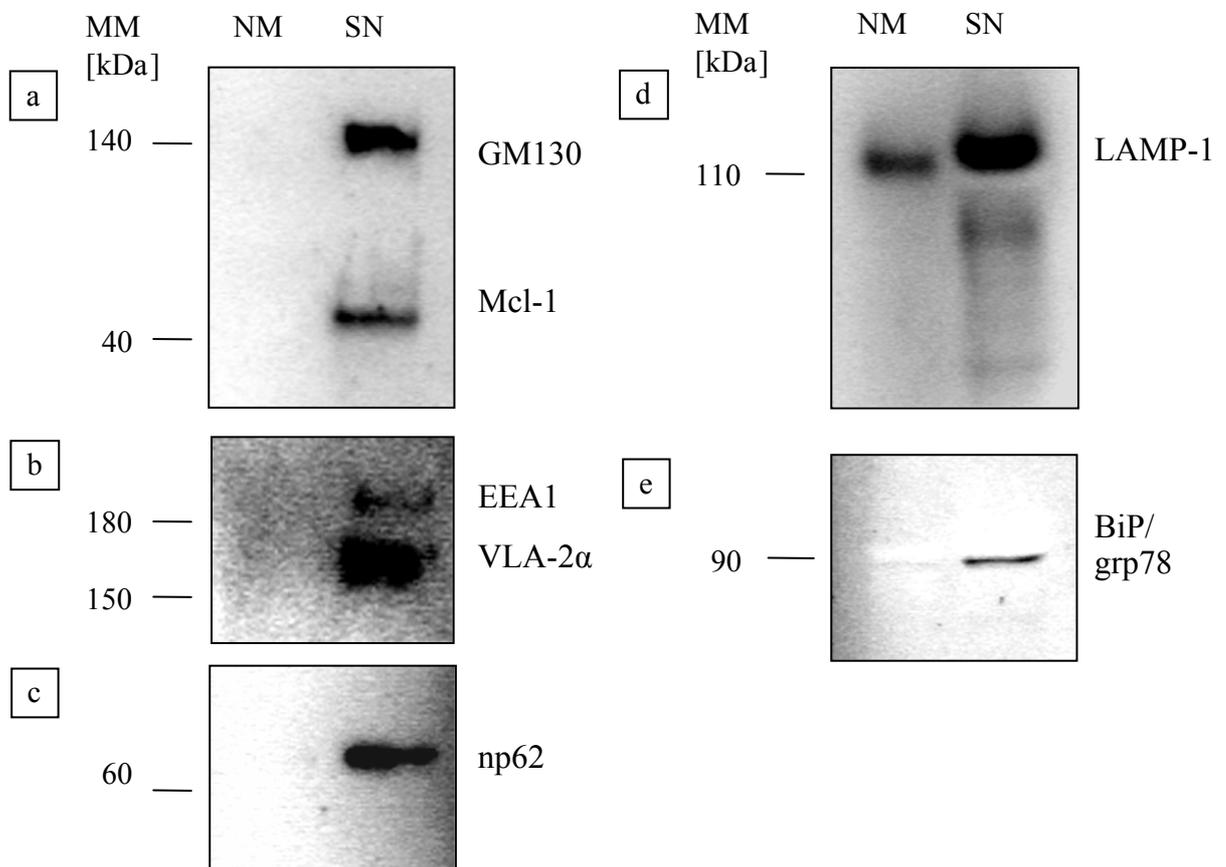


Abbildung 33: Qualitätskontrolle mittels Western Blots. Zur Bewertung der Effizienz der Isolierung von Neuromelanin-Granula wurden etwaige Organellenverunreinigungen auf molekularer Ebene mittels Immundetektion spezifischer Organell-Markerproteine untersucht. Dabei wurde die Neuromelanin-Granula-Fraktion (NM) mit Substantia-nigra-Homogenat (SN) verglichen. Präparationen der Neuromelanin-Granula sind dabei frei von Verunreinigungen durch den Golgi-Apparat (GM130), Mitochondrien (Mcl-1), frühe Endosomen (EEA-1), durch die Zellmembran (VLA-2α), den Zellkern (np62) und das Endoplasmatische Reticulum (BiP/grp78). Dagegen wurde LAMP-1 – ein Markerprotein für späte Endosomen, Lysosomen und Lysosomen-verwandte Organellen – detektiert.

Mitochondrien (Mcl-1, „myeloid cell leukemia-1“) [a], frühe Endosomen (EEA1, „early endosomal antigen 1“) [b], die Zellmembran (VLA-2 α , Integrin alpha 2) [b], der Zellkern (np62, Nucleoporin p62) [c], Lysosomen (LAMP-1, Lysosomen-assoziiertes Membranprotein) [d] und das Endoplasmatische Reticulum (BiP/grp78, Ca²⁺-bindendes Protein grp78) [e].

Die vergleichende Western-Blot-Analyse bestätigte durch die Abwesenheit der Markerproteine [a-c, e], dass aufgrund der Zentrifugation durch das 80 % (v/v) Percoll-Kissen eine gute Abtrennung weniger dichter Kompartimente und deren Membranen stattgefunden hatte.

Gleichzeitig wurde die Anwesenheit von LAMP-1 in den Isolaten gezeigt [d]. LAMP-1 ist ein Transmembranprotein, das in Lysosomen und deren Vorläuferkompartiment, den späten Endosomen, lokalisiert ist. Der Marker für frühe Endosomen, „early endosomal antigen 1“ (EEA1) [b], konnte allerdings nicht detektiert werden. Nach diesen ersten Befunden kann man Neuromelanin-Granula den lysosomalen Kompartimenten zuordnen. Die Abwesenheit von einem frühen endosomalen Marker (EEA1) zeigt, dass es sich nicht um frühe Übergangsstrukturen zu Beginn der Organellbiogenese von Lysosomen handelt, sondern eher um „späte“ Kompartimente dieser Entstehungslinie.

4.8 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteine von Neuromelanin-Granula

4.8.1 Isolierung und elektrophoretische Trennung der Proteine

Die Proteine wurden, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, mittels Detergentien extrahiert, durch eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1-D-SDS-PAGE) getrennt und nach einem mit massenspektrometrischen Untersuchungen kompatiblen Färbvorschriften mit CBB G-250 sichtbar gemacht (Abb. 34; A).

An der Eintrittsstelle in das Gel war ein Probenanteil erkennbar, der kaum in die Gelmatrix eingedrungen ist, wobei es sich um ein hochmolekulares Aggregat aus Neuromelanin oder daran quervernetzten Proteine handeln dürfte. Diskrete, teilweise gut aufgetrennte Proteinbanden waren etwa ab dem Massenbereich von 200 kDa erkennbar. Drei dominante Banden zwischen 65 kDa und 55 kDa waren charakteristisch für Proteinisolate aus Neuromelanin-Granula. Im Anschluss daran waren zwar einige markante Proteinbereiche erkennbar, jedoch war keine scharfe Auftrennung sichtbar. Dieses leichte „Schmier“ der Probe schien sich aus der Zusammensetzung der Probe ergeben und wurde aus Mangel an ausreichendem Probematerial nicht optimiert, da es vor allem für die anschließende massenspektrometrische Untersuchung belanglos war. Um möglichst alle aufgetrennte Proteine analysieren zu können, präparierte man nicht einzelne Proteinbanden aus dem Gel, sondern zerteilte den gesamten Trennbereich in 22 etwa 4 mm breite Gelstückchen.

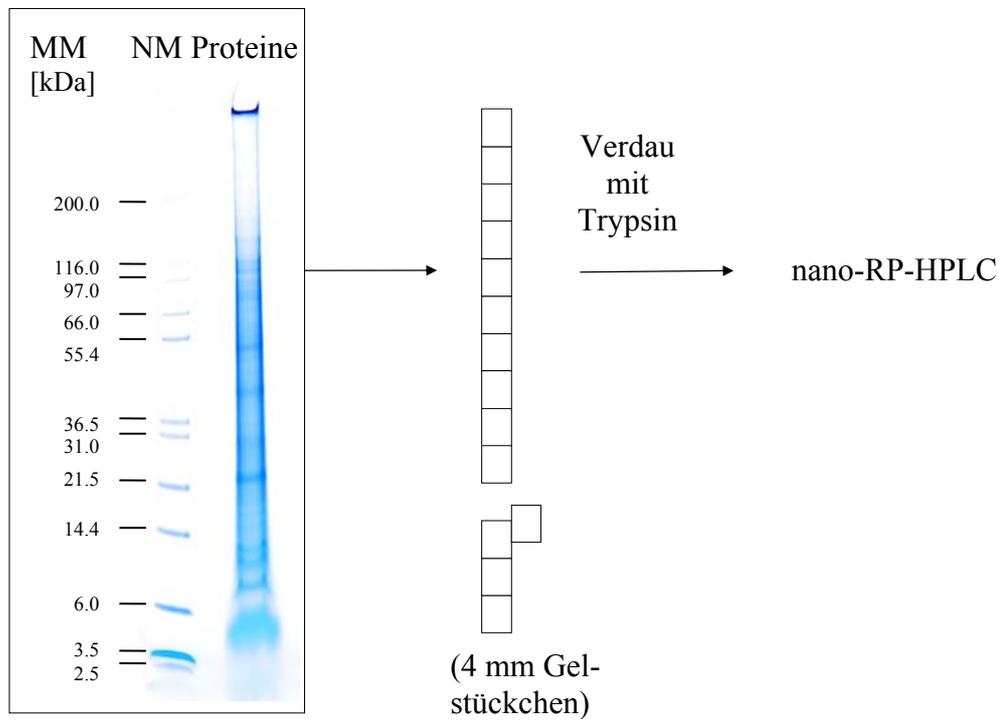
Die weitere Auftrennung der in den jeweiligen Gelstückchen tryptisch generierten Peptide erfolgte chromatographisch mittels einer nano-C₁₈-HPLC-Säule. Ein repräsentatives Basispeak-Chromatogramm zeigt die Trennung der Peptide durch den verwendeten Lösungsmittelgradienten über 110 Minuten (Abb. 34; B). Die Peptide wurden mittels der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.

4.8.2 Massenspektrometrische Untersuchung – Auswertung der Spektren

Die Interpretation der Spektren erfolgte zunächst automatisch unter Verwendung des SEQUESTTM-Algorithmus (Eng et al., 1994; Yates et al., 1995). Zusätzlich zu den von SEQUESTTM vorgeschlagenen Peptiddaten wurden die Spektren manuell evaluiert. Zur generellen Identifizierung eines Proteins wurden nur die Spektren von zweifach

A

Proteintrennung
mittels SDS-PAGE



B

Peptidtrennung mittels nano-RP-HPLC

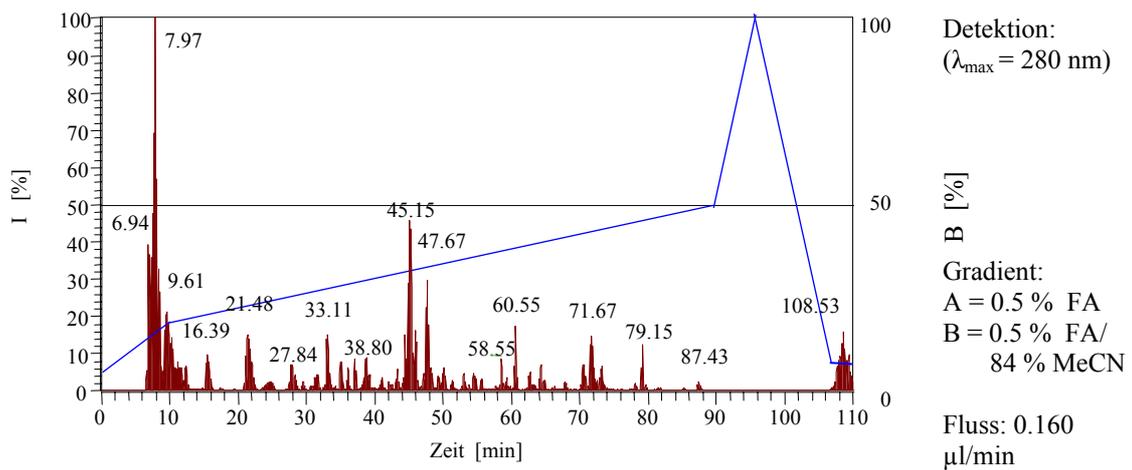


Abbildung 34: Analytischer Ansatz zur Proteomanalyse von Neuromelanin-Granula. (A) Proteine der Neuromelanin-Granula werden mit eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1-D-SDS-PAGE) bezüglich ihrer Molmasse (MM) aufgetrennt. Die Trennstrecke wird in etwa 4 mm große Gelstückchen zerteilt, welche anschließend separat mit Trypsin versehen wird. Dabei werden die Proteine direkt im Gel zu Peptiden verdaut. (B) Die Peptide werden durch nano-RP-HPLC chromatographisch separiert, ehe sie in das Massenspektrometer überführt wurden. Die Peptidtrennung erfolgt mittels eines Gradienten aus Ameisensäure (FA) und Acetonitril (MeCN) über 110 Minuten.

geladenen Peptidionen herangezogen, da bei diesen Spektren der Informationsgehalt am höchsten ist. Im Vergleich dazu sind Spektren einfach oder dreifach geladener Peptide nicht eindeutig interpretierbar.

Konkret wurde bei der manuellen Inspektion der Spektren das Fragmentierungsmuster hinsichtlich der Plausibilität bestimmter wahrscheinlicher Peptidbindungsbrüche überprüft. Obwohl keine generellen Richtlinien zur Beurteilung von Spektren existieren, sind etwa Brüche vor und nach Prolin sehr wahrscheinlich und führen meist zu dominierenden Fragmentmassen. Ähnliches gilt auch für Brüche der Peptidbindung nach Glycin.

Da zur automatischen Beurteilung lediglich Ionen der *b*- und der *y*-Ionenserie (Roepstorff und Fohlman, 1984; Biemann, 1990) herangezogen werden, konnten dabei nur einige Massenpeaks eines Spektrums erklärt werden. Zur verlässlicheren Beurteilung eines Spektrums wurden daher unter Verwendung der software „ProteinProspector“ (Version 4.0.5., <http://prospector.ucsf.edu>) weitere Peaks ermittelt, die beispielsweise aus Mehrfachladung eines Fragments, nach Abspaltung von H₂O oder NH₃ resultierten oder interne Fragmente darstellten.

Einige Beispiele repräsentativer Spektren sind in Abbildung 35 dargestellt. Die jeweiligen Peaks wurden mit den gemessenen Massen beschriftet und dem korrespondierenden Peptidfragment zugeordnet. Aus dieser Darstellungsweise wird ersichtlich, wie sich aus einem CID-Spektrum die exakte Abfolge der Aminosäuren eines Peptids ermitteln lässt.

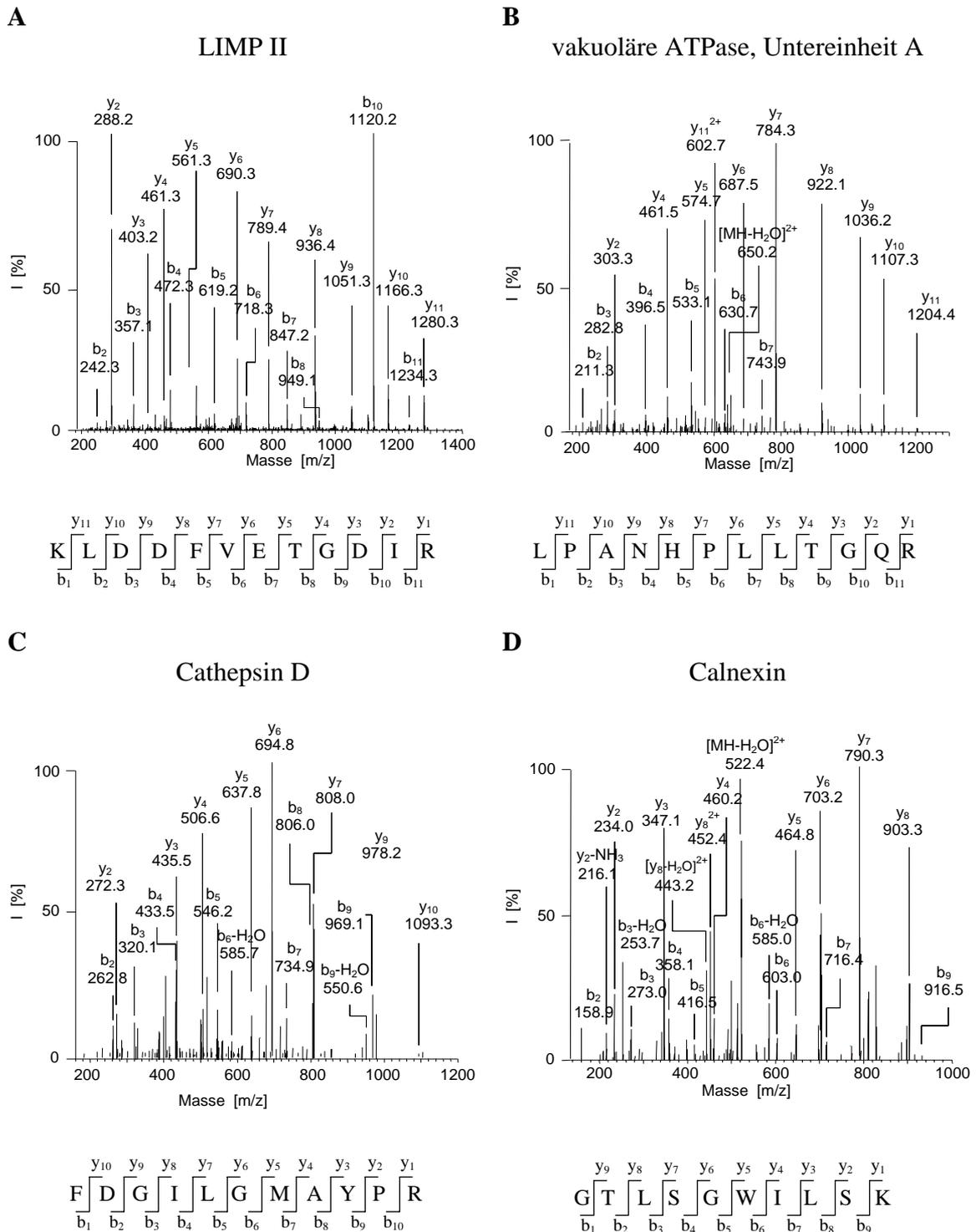


Abbildung 35: Fragmentspektren von ausgewählten Peptiden. Diese Peptidspektren werden mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) generiert, wobei die meisten Peaks anhand ihrer Masse einem bestimmten Peptidfragment zuordenbar sind. Derartige Peptidfragmente werden nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann als *b*- oder *y*-Ionen bezeichnet. Die Differenz zweier benachbarter Fragmentmassen der *b*- oder *y*-Ionenserie entsprechen der Masse einer bestimmten Aminosäure, so dass auf diese Weise die Sequenz des gesamten Peptids ermittelt werden kann. Auf Basis der hier abgebildeten Spektren können Peptidsequenzen ermittelt werden, die zur Identifizierung der Proteine (A) LIMP II, (B) die Untereinheit A der vakuolären ATPase, (C) Cathepsin B und (D) Calnexin führen.

Tabelle 4: Proteine der Neuromelanin-Granula. Diese Tabelle zeigt 73 Proteine, die in isolierten Neuromelanin-Granula identifiziert wurden. Die Identifizierung erfolgte über ESI-MS/MS der tryptisch generierten Peptide, wobei zur Auswertung nur die Spektren der zweifach geladenen Peptide herangezogen wurden.

#	Protein	SWISS-PROT Eintrag	MM [kDa]	Peptid ²⁺ Sequenz-Abdeckung	Lokalisierung	Kommentar
Lysosomale Membranproteine						
1	CD63 Antigen (Lysosomen-assoziiertes Membranglycoprotein 3, LAMP-3)	P08962	25.6	1; 4.2 %	Ly	Integrales Membranprotein (ocular melanoma-associated antigen)
2	Lysosomales Membranprotein II (LIMP II)	Q14108	54.3	3; 20.9 %	Ly	Typ II Membranprotein; fungiert möglicherweise als ein lysosomaler Rezeptor
3	Lysosomen-assoziiertes Membranglycoprotein 1 (LAMP-1, CD107a)	P11279	41.6	2; 7.1 %	Ly, E	Lysosomales und endosomales Membranprotein
4	V-ATPase, Untereinheit A1	P38606	68.2	2; 5.2 %	Ly	Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente
5	V-ATPase, Untereinheit B2	P21281	58.4	3; 14.8 %	Ly	Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente
6	V-ATPase, Untereinheit E	P36543	26.2	2; 12.0 %	Ly	Ansäuerung intrazellulärer Kompartimente
Proteasen						
7	Cathepsin B	P07858	28.8	10; 43.3 %	Ly	Thiolprotease; Peptidase-Familie C1
8	Cathepsin D	P07339	44.6	10; 34.2 %	Ly	Aspartylprotease; Peptidase-A1
9	Cathepsin Z (enthält Cathepsine X & P)	Q9UBR	33.8	2; 7.9 %	Ly	Peptidase-Familie C1
10	Tripeptidylpeptidase I (TPP-I, LIPC)	O14773	61.2	5; 16.3 %	Ly	Lysosomale Serinprotease; Peptidase-Familie S53; ceroide Lipofuszinose vom neuronalen, späten infantilen Typ 2 (CLN2)
11	γ -Glutamylhydrolase	Q92820	35.9	11; 52.1 %	Ly	Lysosomal oder sezerniert; Peptidase-Familie C26
12	Lysosomale Pro-X-carboxypeptidase (Angiotensinase C)	P42785	55.8	3; 9.0 %		Serincarboxypeptidase; Peptidase-Familie S28
13	Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase 5 (Isopeptidase T)	Q96J22	93.2	2; 5.3 %	Ly ?	Zink-hältige Ubiquitin-spezifische Protease; Peptidase-Familie C19
14	Dipeptidylpeptidase II (DPP II)	Q9UHL4	54.3	4; 17.8 %	Ly	In lysosomalen und intrazellulären Vesikel; Peptidase-Familie S28
(Glyco-)Lipid Metabolismus						
15	Saure Ceramidase (Acylsphingosine-deacylase)	Q13510	44.6	14; 46.2 %	Ly	Hydrolysiert Ceramide zu Sphingosine und freien Fettsäuren; Lipogranulomatose (Faber)

#	Protein	SWISS-PROT Eintrag	MM [kDa]	Peptid ²⁺ Sequenz-Abdeckung	Lokalisierung	Kommentar
16	Phospholipase D3	Q8IV08	54.7	7; 19.7 %	?	?
17	Palmitoylproteinthioesterase 1	P50897	34.2	5; 34.2 %	Ly	Entfernung von Fettsäuren, die kovalent über Cystein-Reste an Proteine gebunden sind; ceroide Lipofuszinose vom neuronalen, infantilen Typ 1 (CLN1) und vom neuronalen, adulten Typ 4 (CLN4)
18	β -Hexosaminidase (N-Acetyl- β -glucosaminidase)	P07686	63.1	4; 17.7 %	Ly	Abbau von GM2-Gangliosiden; Gangliosidose Typ II (Sandhoff)
19	Galactosylceramidase	P54803	75.1	2; 4.9 %	Ly	Lysosomaler Katabolismus von Galactosylceramiden, den Hauptlipiden in Myelin; Globoidzell-Leukodystrophie (Krabbe)
20	Proaktivator-Polypeptid (Cerebrosidsulfat-Aktivator-Protein)	P07602	58.5	3; 6.1 %	Ly	Enthält die Saposine A, B, C, D; Lipidbindung und Transport; Glycosphingolipid Metabolismus; an der Organisation und Biogenese von Lysosomen beteiligt
Glycoprotein Metabolismus						
21	Arylsulfatase B (ARSB)	P15848	59.7	1; 3.8 %	Ly	Katabolismus von Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, Mucopolysaccharosidose Typ VI (MPS-VI, Maroteaux-Lamy-Syndrom)
22	N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase (Chondroitinase)	P34059	58,0	4; 16,8 %	Ly	Katabolismus von Chondroitinsulfat und Dermatansulfat, Mucopolysaccharosidose Typ IVA (MPS-IVA, Morquio-A-Syndrom)
23	N-Sulfoglucosamin-sulfhydrolase (Sulfaminase)	P51688	56.7	3; 13.9 %	Ly	Katabolismus von Heparansulfat, Mucopolysaccharosidose Typ IIIA (MPS-IIIA, Sanfilippo-Syndrom A)
24	N ⁴ -(β -N-Acetylglucosaminyl)-L-asparaginase (AGA)	P20933	37.3	1; 9.0 %	Ly	Katabolismus von Glycoproteinen; spaltet GlcNAc-Asn-Bindungen
25	Lysosomale α -Glucosidase	P10253	105.3	1; 1.9 %	Ly	Essentiell zum Abbau von Glycogen in Lysosomen; Glycogenose (Pompe)

#	Protein	SWISS-PROT Eintrag	MM [kDa]	Peptid ²⁺ Sequenz-Abdeckung	Lokalisierung	Kommentar
Unbekannte Funktion						
26	„high-mobility-group“-Protein 1	P09429	24.7	9; 49.8 %	?	Sezerniert oder im Kern
27	R31109_1 (25kDa-Protein; „similar to high-mobility group 20B“)	Q9Y4A2	24.6	3; 22.5 %	?	Ähnlich dem „high-mobility-group“-Protein 1
28	Hypothetisches Protein LOC196463	Q8NHP8	65.5	3	?	
29	25 kDa Protein	O94811	23.7	13; 57.7 %	?	Gehirn-spezifische Expression; Glycogen-synthase-Kinase 3-(GSK3)-Inhibitor p24
Möglicherweise cytosolische Proteine						
30	„Mammalian ependymin related protein-1“ (MERP-1, UCC1 Protein)	Q9UM22	19.9	5; 55.0 %	?	Wird vermutlich sezerniert
31	Tyrosin-3-monooxygenase (Tyrosin-3-hydroxylase)	P07101	58.5	3; 12.3 %	Cytosol	Katalysiert den ersten Schritt der Catecholamin-Biosynthese; ist möglicherweise in die Synthese von Neuromelanin involviert
32	14-3-3-Protein ζ/δ	P29312	27.7	2; 12.7 %	Cytosol	Aktiviert Tyrosine-3-hydroxylase
33	14-3-3-Protein γ	P35214	28.3	3; 13.4 %	Cytosol	Aktiviert Tyrosine-3-hydroxylase
34	Peroxiredoxin 1	Q06830	22.1	3; 15.5 %	Ly, Cytosol	Antioxidative Protektion
35	Hitzeschock-71kDa-Protein	P11142	53.5	4; 10.4 %	Cytosol	Chaperon, Faltung von Proteinen
36	α-Crystallin-B-Kette	P02511	22.4	11; 76.8 %		Akkumuliert im Gehirn bei Alexander-Krankheit; HSP-20-Familie
37	Hitzeschock-70kDa-Protein 9B (Mortalin-2)	Q8N1C8	73.7	3; 7.4 %	?	Bindet Calcium und ATP
38	Hitzeschock-Protein 90 alpha	P07900	84.6	5; 7.5 %	Cytosol	ATPase Aktivität (nach Similarität)
39	Glycogenphosphorylase	P11216	96.7	5; 9.2 %	Cytosol	Metabolismus von Kohlenhydraten
40	6-Phosphofruktokinase	P78457	85.0	5; 9.9 %	Cytosol	Glycolyse
41	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH)	P04406	35.9	2; 9.6 %	Cytosol	Glycolyse
42	Ferritin, leichte Kette	P02792	19.9	3; 26.4 %	Cytosol	Bindung und Speicherung von Eisen

#	Protein	SWISS-PROT Eintrag	MM [kDa]	Peptid ²⁺ Sequenz-Abdeckung	Lokalisierung	Kommentar
Andere						
43	Ubiquitin	P02248	(8.6)n			Markierung von Proteinen zum Abbau durch das Proteasom oder das Lysosom; Protein-Transport zum Lysosom
44	Sialinsäure-9- <i>O</i> -acetyl-esterase	Q8IUT9	58.1	11; 38.8 %	Ly, E	9- <i>O</i> -Acetylierung von Sialinsäure
45	Myelin	P02686	21.5	17; 61.9 %		
46	Myelin-Proteolipid-Protein (PLP)	P60201	30.1	2; 8.7 %		Integrales Membranprotein; (Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit)
47	2',3'-cNucleotid-3'-phosphodiesterase	P09543	47.6	8; 20.7 %		An Membranstrukturen der Weißen Masse des Gehirns gebunden; Myelin-assoziiert
48	Na ⁺ /K ⁺ -transportierende ATPase, alpha-3 Kette	P1363	111.7	3; 6.0 %	PM, E	Austausch von Natrium und Kalium über die Plasmamembran; Expressionsregulation vermutlich durch Endocytose
49	Spannungsabhängiger Anionen-selektiver Kanal P (VDAC 1)	P21796	30.6	3; 18.1 %	Mt, E, Ly	Ermöglicht die Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen
50	Apolipoprotein D (apoD)	P05090	21.2	5; 21.2 %		Über Endocytose aufgenommen; Lipid-Metabolismus
51	Cystatin C	P01034	15.8	4; 40.9 %		Cysteinprotease Inhibitor mit amyloidogenen Eigenschaften
Mitochondriale Proteine						
52	mitochondriale ATP-synthase, F1-Komplex, α -Untereinheit	Q96FB4	59.8	4; 14.5 %	Mt	ATPase Untereinheit F1
53	mitochondriale ATP-synthase, F1-Komplex, β -Untereinheit	P06576	56.5	12; 42.9 %	Mt	ATPase-Untereinheit F1
54	ATP-Synthase, D-Kette	O5947	184	1; 12,4 %	Mt	ATPase-Untereinheit F1
55	ATP-Synthase, g-Kette	O7564	114	1; 14.6 %	Mt	ATPase-Untereinheit F1
56	Hitzeschock-60kDa-Protein (HSP-60)	P10809	61.1	2; 7.7 %	Mt	Mitochondriale Matrix; Faltung von Proteinen
57	Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx)	P36969	22.1	2; 13.2 %	Mt, Cytosol	Schutz vor oxidativer Schädigung und Toxizität durch aufgenommene Lipidhydroperoxide

#	Protein	SWISS-PROT Eintrag	MM [kDa]	Peptid ²⁺ Sequenz-Abdeckung	Lokalisierung	Kommentar
Vesikulärer Transport						
58	Tubulin α 6	Q9BQE3	49.9	4; 20.8 %		Hauptkomponente der Mikrotubuli
59	Tubulin β 2	P05217	49.8	5; 19.8 %		Hauptkomponente der Mikrotubuli
60	Microtubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2)	P11137	202.8	11; 10.0 %		Stabilisiert möglicherweise Mikrotubuli gg. Depolymerisierung
61	Microtubuli-assoziiertes Protein tau	P10636	78.7	2; 6.1 %		Zusammenbau von Mikrotubuli
62	Clathrin, schwere Kette	Q00610	191.6	1; 1.1 %		cytoplasmische Seite von 'coated pits' und Vesikeln
63	„phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein“ (CALM, AP 180-2)	Q13492	70.7	1; 3.4 %		Zusammenbau von Clathrin, Bildung von 'clathrin coated-vesicles'; Wieder- verwertung von Membranen
64	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-kinase II alpha	P48426	46.2	2; 8.1 %	E, Ly	An Membranen des späten Endocytose-Weges assoziiert
65	Alpha-SNAP („ α -soluble NSF attachment protein“)	P54920	33.2	3; 14.2 %	Vesikel	Beteiligung an mehreren endocytotischen Ereignissen und an vesikulärem Transport
66	Syntaxin-bindendes Protein (Hunc18)	P61764	67.6	3; 7.9 %	Vesikel	Beteiligung an mehreren endocytotischen Ereignissen und am vesikulären Transport
67	Dynamamin-1, neurale Isoform	Q05193	97.4	3; 3.5 %	E, Vesikel	Nimmt an sämtlichen endozytotischen Ereignissen sowie am vesikulären Transport teil
68	NipSnap1-Protein	Q9BPW8	33.3	3; 16.6 %	Vesikel ?	Möglicherweise am vesikulären Transport beteiligt
69	NipSnap2-Protein	O75323	33.8	4; 31.8 %	Vesikel ?	Transmembran-Domäne; möglicherweise am vesikulären Transport beteiligt
Endoplasmatisches Reticulum						
70	Calreticulin	P27797	46.8	2; 7.2 %	ER, Cytosol, ECM,	Chaperon zur Unterstützung der Faltung von Proteinen, Zusammenbau und Qualitätskontrolle von Proteinkomplexen im ER über den Calreticulin/Calnexin-Zyklus; an die Lytischen Granula assoziiert
71	Calnexin (p90)	P27824	67.6	4; 9.8 %	ER	Typ-I-Membranprotein; melanogenes Chaperon

#	Protein	SWISS-PROT Eintrag	MM [kDa]	Peptid ²⁺ Sequenz-Abdeckung	Lokalisierung	Kommentar
72	Dolichyl-diphospho-oligosaccharidproteinglycosyltransferase (ribophorin I)	P04843	68.6	3; 7.1 %	ER	Typ-I-Membranprotein; N-oligosaccharyltransferierendes Enzym (Transfer von Mannosehaltigen Oligosacchariden von einem Lipidanker an einen Asparagin-Rest)
73	Proteindisulfidisomerase A3 (ERp57)	P30101	54.3	4; 12.0 %	ER	Proteindisulfidisomerase-Familie

Verwendete Abkürzungen: **Ly**, Lysosomen; **E**, Endosomen; **Mt**, Mitochondrien; **ER**, Endoplasmatisches Reticulum; **ECM**, extrazelluläre Matrix; **PM**, Plasmamembran.

Nach den eingehenden Überprüfungen der Spektren wurden die korrespondierenden Proteine anhand einiger Peptide identifiziert, als positiv akzeptiert und aufgelistet (Tabelle 4). Dabei konnten bei fünf Parallelversuchen mit jeweils fünf individuellen Neuromelanin-Granula-Präparationen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Mit diesem Analyseansatz wurden insgesamt 73 Proteine identifiziert.

Die weiterführende Auswertung der Daten umfasste den Informationsgewinn bezüglich der Lokalisierung der identifizierten Proteine innerhalb der Zelle, der enzymatischen Funktionen oder der Beteiligung an biochemischen Prozessen, sowie an Krankheiten.

Übereinstimmend mit den bereits mittels Western Blots gewonnenen Daten (Kapitel 3.7.2, Abb. 33) bestätigte die massenspektrometrische Identifizierung zahlreicher lysosomaler Membranproteine und lysosomaler Hydrolasen die zuvor für Neuromelanin-Granula angenommene endosomal-lysosomale Entstehungslinie. So wurden für diese Kompartimente charakteristische Membranproteine gefunden, beispielsweise das lysosomale integrierte Membranprotein II (LIMP II) [#2] und das Lysosomen-assoziierte Membranprotein 1 (LAMP-1) [#3], aber auch Untereinheiten der vakuolären ATPase [#4-6] zur Erniedrigung des pH-Wertes solcher Organellen (Abb. 35 und Tabelle 4). LIMP II wurde als einziges lysosomales Marker- und Membranprotein mittels Massenspektrometrie durch eine hinreichende Anzahl an Peptiden eindeutig identifiziert. Zahlreiche Proteasen, die bekanntermaßen in Lysosomen lokalisiert sind, wurden identifiziert, z.B. Cathepsin B [#7] und Cathepsin D [#8], Dipeptidylpeptidase II (DPP II)

[#14] und Tripeptidylpeptidase I (TPP I) [#10]. Ebenso wurden Enzyme nachgewiesen, die den Abbau von Glycoproteinen (Chondroitinase) [#22] oder von Sphingolipiden bewerkstelligen, z.B. Saure Ceramidase [#15], Palmitylthioesterase 1 [#17], β -Hexosaminidase (*N*-Acetyl- β -glucosaminidase) [#18] oder die Galactosylceramidase [#19].

Funktion und Lokalisierung mancher dieser Proteine sind unbekannt. Dies gilt für die Proteine der „high-mobility-group“-Protein-Familie (HMG, „high mobility group“) [#26], [#27], sowie für Phospholipase D3 [#16] oder MERP-1 [#30].

Bestandteile des Cytoskeletts, wie das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP 2) [#60], das Tau Protein [#61] und α -/ β -Tubulin [#58, #59] spielen eine wichtige Rolle für den Transport von Vesikel innerhalb einer Zelle. Außerdem wurden mit Clathrin [#62] und Dynamin [#67] Proteine identifiziert, die sowohl für den vesikulären Verkehr von Bedeutung sind, aber auch an endosomale Membranen assoziiert sein dürften. Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase II alpha [#64], alpha-SNAP [#65] und Syntaxin-bindendes Protein (Hunc18) [#66] sind an verschiedenen endocytotischen Ereignissen beteiligt und spielen eine Rolle im vesikulären Transport.

Des Weiteren wurden mit der γ -Glutamylhydrolase [#11] (Peptidase-Familie C26) und der Sialinsäure-9-*O*-acetylerase [#44] Proteine identifiziert, von denen man mit großer Wahrscheinlichkeit eine Lokalisierung in Organellen des endosomal-lysosomalen Systems annehmen kann (Butor et al., 1993; Yao et al., 1996; Takematsu et al., 1999; Galivan et al., 2000).

Bemerkenswert ist allerdings die Anwesenheit von vier Proteinen, die klassischerweise dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) zugeschrieben werden [#70-73]. Mit dem Verweis auf die hohe Sauberkeit der Proben auf elektronenmikroskopischer Ebene und auf die Abwesenheit des Markerproteins für das ER (BiP/grp78) bei der Western-Blot-Analyse ist dieser Befund von großer Bedeutung (Kapitel 3.7.2; Abb. 33). Hervorzuheben ist dabei das Protein Calnexin, dessen mögliche Funktion als ein Chaperon zur Unterstützung melanogener Enzyme erst vor kurzem für die Melanosomen der Haut vorgeschlagen wurden (Jimbow et al., 2000).

4.8.3 Lokalisierungsüberprüfung mit Western Blot und Lectinblot

Nach Identifizierung zahlreicher Proteine mittels ESI-MS/MS wurde die Anwesenheit ausgewählter Proteine mit Hilfe der Western-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 36). In erster Linie galt es, mit Cathepsin B [a] und LAMP-1 [d] zwei charakteristische lysosomale Proteine zu überprüfen. Im Fall von Cathepsin B wurde im Neuromelanin-Granula-Homogenat auf der Höhe von etwa 25-30 kDa eine weitere Proteinbande detektiert, die mit der Prozessierung des inaktiven Präproteins Cathepsin B durch proteolytische Spaltung erklärt werden kann. Dynamin [b] und Clathrin [c] sind vorwiegend an Vesikel assoziierte Proteine, sind aber auch an endosomalen Membranen zu finden und konnten nach massenspektrometrischer Identifizierung mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Ergänzend zu den gemessenen Spektren konnte Calnexin [e] nun auch immunologisch nachgewiesen werden. Calnexin ist in erster Linie ein Transmembranprotein des Endoplasmatischen Reticulums (ER). Eine Verunreinigung durch endoplasmatische Membranen in den Neuromelanin-Granula-Präparationen konnte jedoch nach Überprüfung von BiP/grp78 [f], dem Markerprotein für das ER, nach Ablösen des Anti-Calnexin-Antikörpers ausgeschlossen werden, so dass von einer spezifischen Anwesenheit von Calnexin in Neuromelanin-Granula ausgegangen werden kann.

Weitere lysosomale Charakteristika von Neuromelanin-Granula konnten mit Hilfe spezifischer Detektion mannosylierter Proteine mittels Lectinblot gezeigt werden (Abb. 37). Zahlreiche Glycoproteine, die gezielt zu lysosomalen Kompartimenten transportiert werden, sind mit charakteristischen, phosphorylierten Mannose-Resten versehen. Nach Ankunft dieser Proteine in der Zielorganelle werden die Phosphatreste abgespalten, so dass die freien Mannose-Reste nun mit spezifisch Mannose-bindenden Proteinen detektiert werden können. An Stelle der oben verwendeten Antikörper zur Protein-Detektion erfolgte die Sichtbarmachung mannosylierter Proteine mit Hilfe des *Galanthus-nivalis*-Agglutinins (GNA), eines Lectins aus dem Schneeglöckchen (Shibuya et al., 1988).

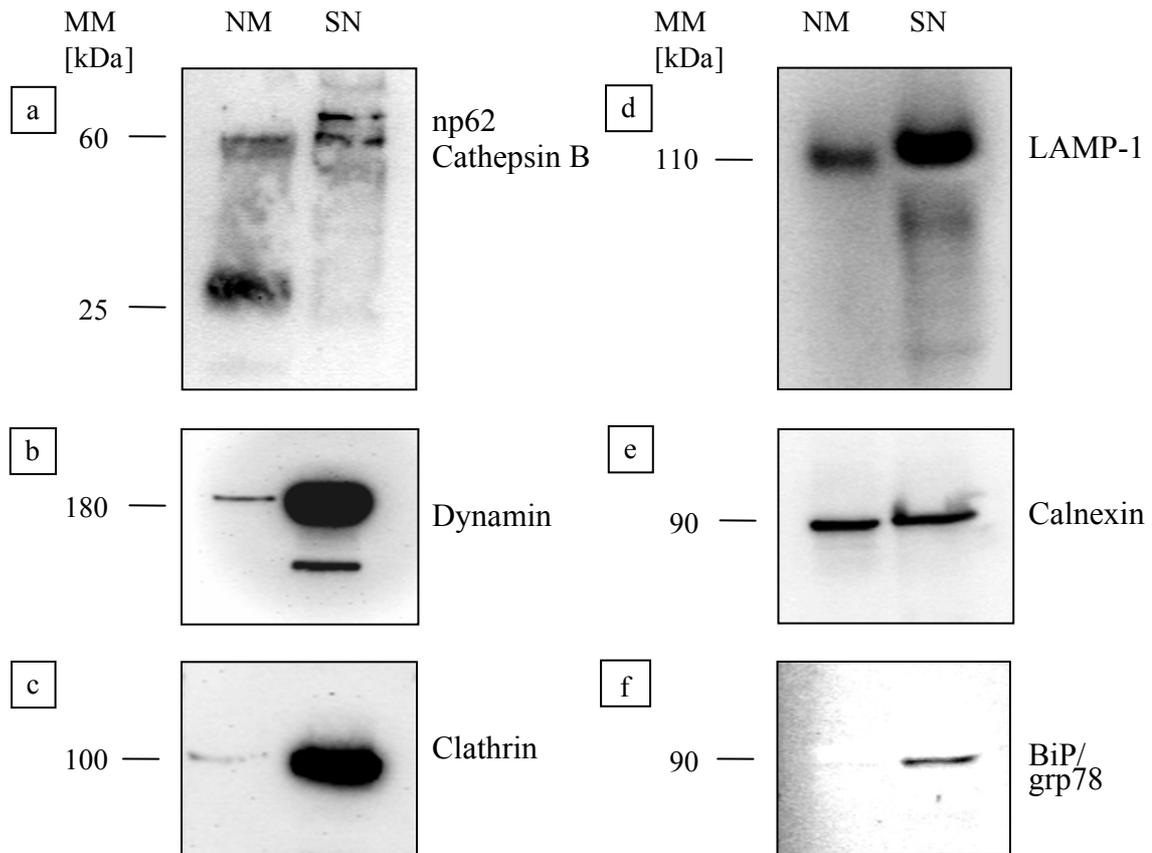


Abbildung 36: Validierung per Massenspektrometrie identifizierter Proteine durch Western-Blot-Analyse. Anhand der Western-Blot-Analyse sind mit Cathepsin B (a) und LAMP-1 (d) zwei lysosomale Proteine immunologisch nachweisbar. Auch die durch ESI-MS/MS identifizierte Proteine Dynamin (b) und Clathrin (c) werden auf diese Weise bestätigt. Der immunologische Nachweis von Calnexin (e), einem hauptsächlich im Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisierten Protein, unterstützt die massenspektrometrischen Daten. Gleichzeitig kann eine Verunreinigung durch endoplasmatische Membranen jedoch ausgeschlossen werden, da nach Ablösung des Anti-Calnexin-Antikörpers das ER Markerprotein BiP/grp78 (f) nicht nachgewiesen werden.

Das Homogenat aus Substantia-nigra-pars-compacta-Gewebe (SN, Positivkontrolle) zeigte eine Vielzahl an Proteinbanden unterschiedlicher Intensität. Dagegen waren in der Probe der isolierten Neuromelanin-Granula (NM) vergleichsweise wenige Banden zu sehen. Durch die Isolierung der Granula hatte eine deutliche Abreicherung mancher mannosylierter Proteine stattgefunden, die zur Isolierung der abgebildeten Unterpopulation mannosylierter Proteine geführt hatte.

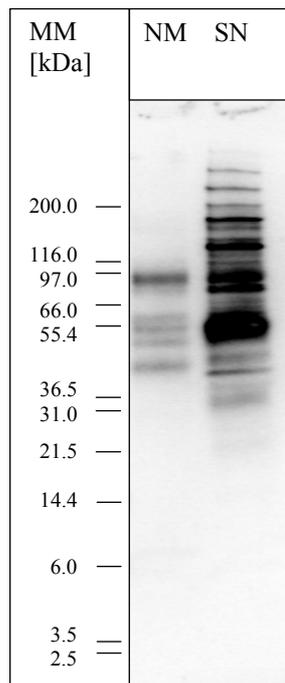


Abbildung 37: Lectinblot von Proteinen aus Neuromelanin-Granula. Mannosylierte Proteine wurden mit Hilfe des *Galanthus-nivalis*-Agglutinins (GNA) aus dem Schneeglöckchen sichtbar gemacht. Neuromelanin-Granula (NM) zeigen dabei im Vergleich zu Substantia-nigrapars-compacta-Gewebehomogenat (SN) deutlich weniger Proteinbanden. Die Anwesenheit von mannosylierten Proteinen bestätigen zwar die lysosomalen Charakteristika von Neuromelanin-Granula, die deutliche Abreicherung vieler mannosylierter Proteine durch die Organellenisolierung könnte aber auch Hinweis auf eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Lysosomenverwandten Organellen sein.

In Übereinstimmung mit den bereits durch Massenspektrometrie und Western-Blot-Analyse gewonnenen Erkenntnissen wurde auch aus diesem Ansatz eine Zugehörigkeit von Neuromelanin-Granula zu Organellen mit lysosomalen Charakteristika ersichtlich. Dennoch wurde deutlich, dass vor allem aufgrund der spezifischen Anwesenheit von Calnexin und der geringen Zahl an mannosylierten Proteinen eine Zugehörigkeit von Neuromelanin-Granula zur Gruppe der Lysosomenverwandten Organellen angenommen werden kann. Zu dieser Gruppe von Organellen zählen unter anderem Melanosome der Melanozyten, Autophagosome der Leukozyten, azurophile Granula, dichte Granula der Thrombozyten und MIIC-Kompartimente (Dell'Angelica et al., 2000). Wichtig ist, dass diese Organellen andere zelluläre Funktionen als ein konventionelles Lysosom haben, das hauptsächlich dem Abbau zellulärer Makromoleküle dient.

4.8.4 L-Ferritin ist in Neuromelanin-Granula lokalisiert

Anhand einer direkten Sequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie konnten anhand der CID-Spektren Peptidsequenzen abgeleitet werden, die das Protein L-Ferritin eindeutig identifizierten (Abb. 38; A-C). Allerdings gilt L-Ferritin in der Substantia nigra als ein Markerprotein für gliale Zellen und wird im Allgemeinen in den pigmentierten Neuronen immunhistochemisch nicht detektiert.

Zur Abklärung der Frage, ob L-Ferritin eine Verunreinigung aus Gliazellen oder tatsächlich an Neuromelanin-Granula assoziiert ist, wurden weiterführende Lokalisierungsstudien unter Anwendung einer Kombination aus immunologischer Detektion und Sichtbarmachung mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), der Immuno-TEM, angestellt.

Es ist bekannt, dass Ferritin als eisenspeichernder Proteinkomplex im Transmissionselektronenmikroskop anhand des elektronendichten Eisenkerns erkannt werden kann. Deshalb können auf elektronenmikroskopischer Ebene kationisiertes Ferritin zur ultrastrukturellen Darstellung von Membranen herangezogen werden (Danon et al., 1972). Ebenso finden in der Immuno-TEM Ferritin-konjugierte Antikörper analog zu Gold-markierten Antikörpern Verwendung zur Detektion von Proteinen (Rifkind et al., 1960). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an unkontrastierten Präparationen von isolierten Neuromelanin-Granula zeigten zwar derartige elektronendichte Körner. Eine eindeutige Zuordnung und Identifizierung von Ferritin konnte auf diese Weise allerdings nicht erfolgen (Abb. 39; A, B).

Der Nachweis von L-Ferritin in den Neuromelanin-Granula wurde jedoch mit der Methode der Immuno-TEM ermöglicht. Nach Inkubation mit einem Anti-L-Ferritin-Antikörper konnte dieser Immunkomplex mit Hilfe eines Gold-markierten Antikörpers detektiert werden. Die Lokalisierung von L-Ferritin in den Neuromelanin-Granula ist anhand der elektronendichten, diskret abgegrenzten Goldkörner auf den Schnitten erkennbar (Abb. 39; C, D).

Da Ferritin als ein Multiproteinkomplex aus mehreren L-Ferritin-Untereinheiten besteht, ist das Auftreten der Goldkörner in einer lokalen Häufung ein weiteres Indiz für die tatsächliche Lokalisation von L-Ferritin in Neuromelanin-Granula. Eine Bindung von L-Ferritin an Neuromelanin konnte anhand dieser Methode allerdings nicht sichtbar gemacht werden.

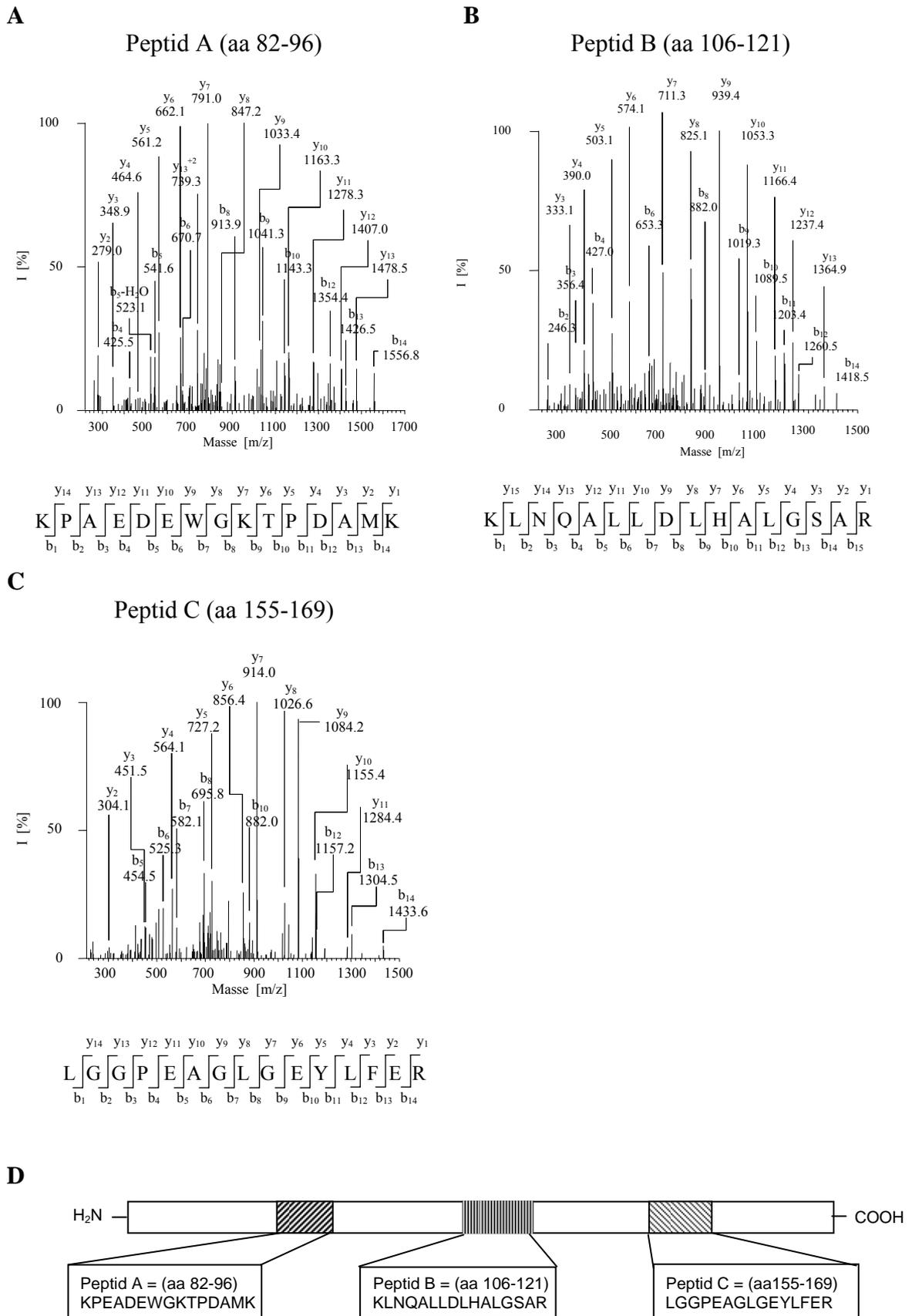


Abbildung 38: Identifizierung von L-Ferritin mittels Peptidspektren. (A-C) Anhand dieser Spektren werden die Sequenzen von drei Peptiden ermittelt, auf deren Basis das Protein L-Ferritin eindeutig identifiziert werden kann. (D) Schematische Anordnung der identifizierten Peptide in L-Ferritin.

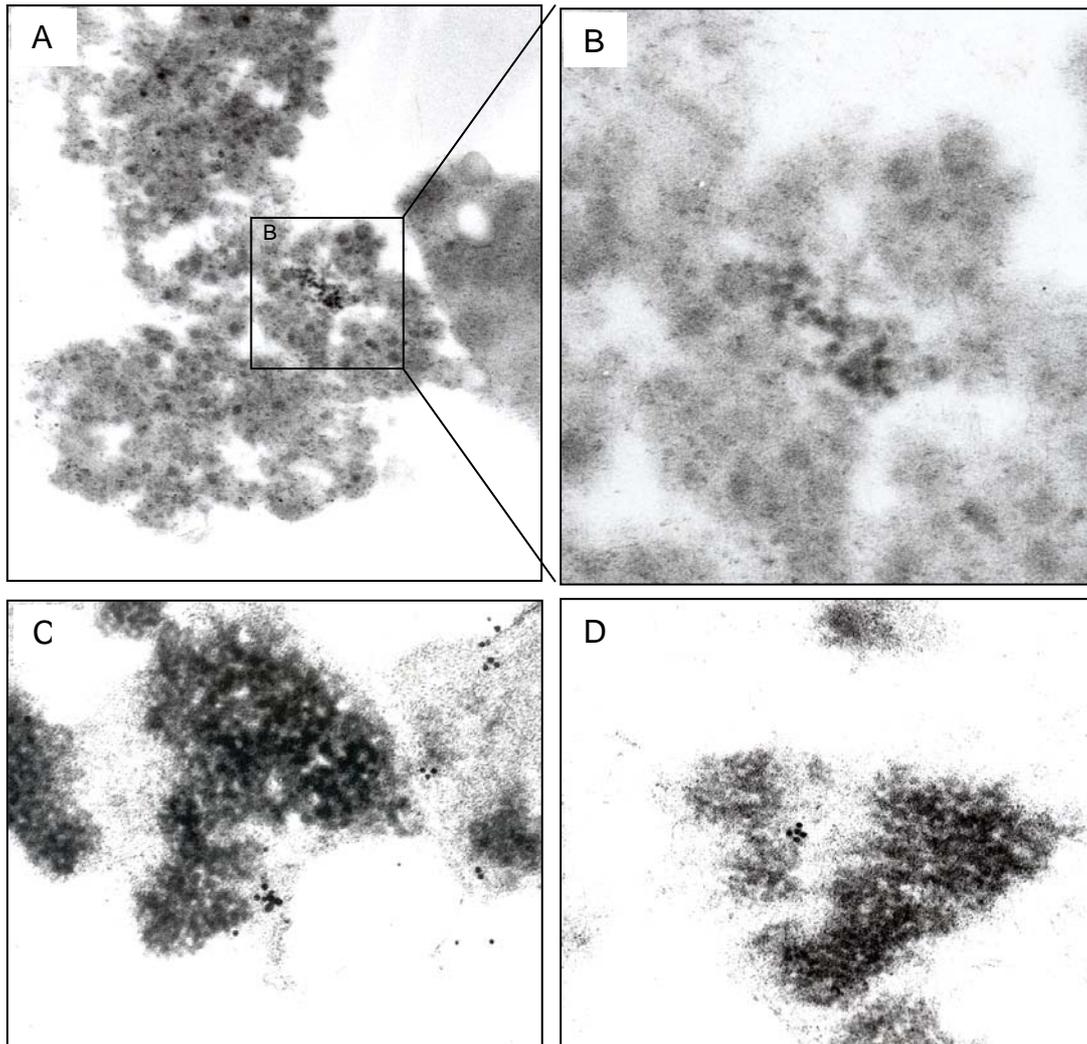


Abbildung 39: Lokalisierung von L-Ferritin in Neuromelanin-Granula. Ferritin dient als Multiproteinkomplex der Speicherung großer Mengen an Eisen. Der Eisenkern von Ferritin kann aufgrund seiner hohen Dichte im Transmissionselektronenmikroskop detektiert werden. **(A, B)** In den unkontrastierten Schnitten von isolierten Neuromelanin-Granula sind derartige Strukturen erkennbar. Allerdings ist die Identifizierung von Ferritin auf dieser Basis unzureichend. **(C, D)** Dagegen wird die Anwesenheit der Untereinheit L-Ferritin in Neuromelanin-Granula mittels immunologischer Detektion bestätigt. L-Ferritin wird anhand von 10 nm Goldpartikel sichtbar gemacht. Die lokale Anhäufung mehrerer Goldpartikel ist ein weiteres Indiz für die Anwesenheit von Ferritin.

5 DISKUSSION

Die Suche nach Antworten zur Biogenese von Neuromelanin in der humanen Substantia nigra pars compacta gestaltet sich aus mehreren Gründen besonders schwierig: es existieren zurzeit weder ein geeignetes zelluläres Testsystem, anhand dessen auf biologischer Ebene die Bildung von Neuromelanin beeinflusst und untersucht werden kann, noch sind pigmentierte neuronale Zellen, so wie Neurone generell, kultivierbar. Des Weiteren haben die gebräuchlichsten Labortiere eine unpigmentierte Substantia nigra. Aus diesen Gründen umfassen die Vorstellungen zur Entstehung von Neuromelanin mit der autoxidativen Bildung und dem „Tyrosinase-Konzept“ zwei konträre Ansätze, die mangels funktionaler Überprüfbarkeit weitgehend hypothetisch sind.

5.1 Untersuchungen zur autoxidativen Bildung von Neuromelanin

Der Hypothese der autoxidativen Polymerisation von Dopamin folgend wird Neuromelanin unter Einfluss redoxaktiver Metalle, wie Eisen, Kupfer etc. gebildet. Polymerisationsversuche mit 1 mM Dopamin in künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit zeigen jedoch keine signifikante Beteiligung derartiger Metalle an der autoxidativen Bildung von künstlichem Dopaminmelanin. Selbst in erhöhten Konzentrationen konnten diese Metalle keine gesteigerte Dopaminumsetzung bewirken. Diese Daten sind somit keine Bestätigung der zentralen Rolle eines vor allem Eisen-katalysierten Prozesses zur Bildung von Neuromelanin *in vivo*.

Des Weiteren schlägt diese Hypothese vor, dass Neuromelanin aus „überschüssigem, cytosolischem Dopamin“ gebildet wird (Sulzer et al., 2000). Die cytosolische Dopaminkonzentration sei dann erhöht, wenn Dopamin kaum über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) in synaptische Vesikel aufgenommen werden kann, oder wenn extrazelluläres Dopamin über den Dopamin-Transporter (DAT) in die Zelle zurückgepumpt wird. Aus immunhistochemischen Untersuchungen am menschlichen Hirnstamm wurde gefolgert, dass das jeweilige Expressionsverhältnis von VMAT2 und DAT den Grad der Pigmentierung einzelner Neuronengruppen bedingen würden. Demnach würden stark pigmentierte Neurone der Substantia nigra wenig VMAT2, jedoch viel DAT exprimieren (Liang et al., 2004).

Dieses Konzept von „überschüssigem, cytosolischem Dopamin“ als Ursache der Neuromelaninbildung ist kaum mit dem biochemischen Konzept des „steady state“ in Einklang zu bringen, da auch intrazelluläre Konzentrationsmessungen von Catecholaminen deren Homöostase belegen. Selbst pharmakologischer Einfluss auf den catecholaminergen Metabolismus verändert die cytosolische Catecholaminkonzentration kaum, führt jedoch längerfristig zu einer Erhöhung der Metaboliten (Mosharov et al., 2003).

Eine ausschließlich autoxidative Bildung von Neuromelanin aus Dopamin sollte demnach zu einem Polymerisationsprodukt führen, das erstens über die Artengrenzen hinweg in den meisten Tieren beobachtbar sein müsste, und zweitens strukturell sowie in seiner Zusammensetzung dem artifiziell herstellbaren Dopaminmelanin (DAM) entspricht. Ein Argument gegen die Hypothese der autoxidativen Bildung von Neuromelanin ist das phylogenetisch begrenzte Auftreten von Neuromelanin, des Weiteren zeigten strukturelle Untersuchungen am nativen Pigment keine Übereinstimmung mit DAM (Double et al., 2000; Dzierzega-Lecznar et al., 2004). Biologische und chemische Tatsachen dieser Art werden häufig übergangen, belegen jedoch eindeutig die Originalität von Neuromelanin.

5.2 Untersuchungen zum „Tyrosinase-Konzept“

Im Gegensatz zu einer rein autoxidativen Bildung von Neuromelanin bietet das Konzept einer enzymatisch ablaufenden Biogenese ein sinnvolles Spektrum an Möglichkeiten, die Unvereinbarkeiten von DAM mit Neuromelanin chemisch und biologisch zu erklären. Erst ein genetischer Hintergrund ermöglicht schlüssige Erklärungen der phylogenetischen Pigmentausprägung. Denkbare Regulierungsmöglichkeiten der Neuromelanin-Bildung böten sich auf genetischer Ebene zur zeitlich induzierbaren, Zell-spezifischen Expression, sowie auf Proteinebene zur Regulierung von Enzymaktivitäten.

Tyrosinase, welche als Schlüsselenzym in der Biogenese von okulokutanem Melanin involviert ist, wurde auf der Basis mehrerer widersprüchlicher Befunde (Marsden, 1961; Miranda et al., 1984; Ikemoto et al., 1998) als Kandidat für die Bildung von Neuromelanin in die engere Wahl gezogen, doch bestätigen immunhistochemische Untersuchungen nun eindeutig die Abwesenheit dieses Enzyms in den pigmentierten Kernen des humanen Hirnstamms.

Der Erfolg von Identifizierungsversuchen eines Neuromelanin-bildenden Proteins mit globaleren Methoden, wie der Bioinformatik, ist ungewiss. Bei einem derartigen Ansatz versucht man, anhand des Vergleichs (Alignment) orthologer oder paraloger Sequenzen Hinweise auf Funktionen nicht näher charakterisierter Sequenzen zu erhalten. Orthologe Sequenzen sind homologe Sequenzen, die über die Artgrenzen hinweg in vertikaler phylogenetischer Linie verwandt sind und meist die gleiche Funktion aufweisen. Paraloge Sequenzen sind ähnliche Sequenzen im selben Organismus, die nach Genduplikation horizontal verwandt sind. Im Gegensatz zur Interpretation von Alignments orthologer Sequenzen ist die Interpretation von Alignments paraloger Sequenzen problematisch, weil diese trotz großer Ähnlichkeiten meist andere Funktionen entwickelt haben. Als Beispiele derartiger paraloger Sequenzen können die Gene von TRP-1 und -2 (TRP, „tyrosinase related protein“) genannt werden, die ursprünglich nach Verdoppelung des Tyrosinase-Gens TYR weiterentwickelt wurden und nun für Proteine mit anderen katalytischen Funktionen als Tyrosinase kodieren (Jackson, 1994; Morrison et al., 1994; Sturm et al., 1995).

Auch TYRL ist eine zu TYR teilweise paraloge Sequenz. Aufgrund der besonders hohen Homologie zu Teilen des für Tyrosinase kodierenden Gens wurde die Sequenz TYRL trotz der Bezeichnung als Pseudogen für weitere Überlegungen ins Auge gefasst. TYRL wird anscheinend mangels detektierbarer Transkripte in melanisierten Zellen der Haut als ein Pseudogen bezeichnet (Takeda et al., 1991). Vor allem die Sequenzdaten zu TYRL, wie sie in Kapitel 4.4 beschrieben sind, lassen jedoch die Richtigkeit dieser Bezeichnung in Zweifel ziehen. Den Ausschlag, gegen derzeit geltende molekularbiologische Ansichten eine Hypothese für eine Neuromelanin-Bildung unter Beteiligung des „Pseudogens“ TYRL zu formulieren und diese zu überprüfen, gaben jedoch folgende Befunde und Überlegungen:

1. Die tatsächliche Möglichkeit der Transkription von TYRL ist aufgrund der Existenz von „expressed sequence tags“ (ESTs) evident.
2. Das phylogenetische Auftreten der Sequenz TYRL in Primaten trifft auch für Neuromelanin zu.
3. Auf Proteinebene führt die intakte ExxPLL-Erkennungssequenz generell zu einer subzellulären Lokalisierung eines Proteins in Lysosomen und Melanosomen

(Jimbow et al., 2000; Bonifacino and Traub, 2003). Diese Erkennungssequenz wäre auch in einem TYRL-abgeleiteten Protein vorhanden.

4. Der Aminosäure-Austausch 406-P→L vermindert bei Tyrosinase lediglich die enzymatische Aktivität (Giebel et al., 1991), so dass die Bildung von okulokutanem Melanin in der Kindheit verzögert einsetzt (okulokutaner Albinismus Typ IB, „yellow“) (Tripathi et al., 1992). Dieser Aminosäure-Austausch könnte auch die Aktivität eines TYRL-kodierten Proteins vermindern. Die Bildung von Neuromelanin in der Substantia nigra setzt erst ab dem dritten bis fünften Lebensjahr ein (Fenichel and Bazelon, 1968).
5. Anders als beim klassischen „Tyrosinase-Konzept“ ist die beschriebene Pigmentierung der Substantia nigra auch bei inaktiver Tyrosinase (Okulokutaner Albinismus) (Foley und Baxter, 1958) ein immanenter Bestandteil dieses Konzeptes.

Erst kürzlich veröffentlichte Daten unterstützen die Idee, dass viele ursprünglich als Pseudogene eingestufte Sequenzen tatsächlich transkribiert werden und Funktionen innerhalb einer Zelle ausüben könnten. So wurden beispielsweise Pseudogene von Protein-Tyrosin-Kinasen untersucht, wobei wider Erwarten ein analoges Phänomen zu Tage gefördert wurde: auch hier gab es neben „klassischen“, nicht transkribierbaren Sequenzen einige wenige, die tatsächlich als partiell sequenzierte cDNAs in EST-Datenbanken zu finden sind (Andersen et al., 2004). Neuere Schätzungen sprechen davon, dass etwa 2-3 % der rund 20.000 humanen Pseudogene transkribiert werden könnten (Yano et al., 2004). Über Funktionen derartiger Sequenzen wird zurzeit viel spekuliert, so dass das gesamte Spektrum ihrer Funktionen noch nicht abschätzbar ist. Eine mögliche Funktion dieser nun zur Gruppe der nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs) gezählten Transkripte dürfte die Stabilisierung der mRNA der homologen, kodierenden Gene sein (Hirotsume et al., 2003). Entgegen aller denkbaren Erwartungen konnte erst vor kurzem für das Pseudogen Cytochrom P4502D7 gezeigt werden, dass dieses nach Änderung des Leserasters durch Mutation sogar ein funktionelles Protein generierte, das im menschlichen Gehirn die Demethylierung von Codein zu Morphin katalysiert (Pai et al., 2004).

Die Expression eines von TYRL abgeleiteten Proteins in der humanen Substantia nigra pars compacta kann allerdings ausgeschlossen werden. Immunhistochemische Analysen

sowie die Suche nach Proteinen, die möglicherweise diese Sequenz als Modul integriert haben, blieben erfolglos.

Die Hypothesen-geleitete Suche nach Neuromelanin-bildenden Proteinen, die sich mangels zellulärer Testsysteme hauptsächlich auf immunhistochemische Untersuchungen beschränken, ist offensichtlich nicht von hoher Ausbeute und Effizienz geprägt. Eine effektivere Herangehensweise ist die Isolierung der Neuromelanin-haltigen Kompartimente zu einer globalen Untersuchung mittels massenspektrometrischer Methoden. Ein derartiger Ansatz eröffnet ein weitaus größeres Fenster, durch das der Blick auf die tatsächliche Proteinzusammensetzung dieser Strukturen ermöglicht wird.

5.3 Subzelluläre Fraktionierung von Neuromelanin-Granula

Neuromelanin-Granula-Isolierung

Neuromelanin ist nach direkter Isolierung aus einem Homogenat von Substantia-nigra-Gewebe für die Aufklärung vieler struktureller Aspekte geeignet. Dennoch konnte anhand derartiger Neuromelanin-Präparate nur aufgrund von Aminosäure-Hydrolysaten auf vermutlich assoziierte Proteine rückgeschlossen werden (Double et al., 2000). Eine in weiterer Folge mittels Massenspektrometrie angestrebte Identifizierung dieser Proteine konnte jedoch nicht realisiert werden. Gründe dafür sind in erster Linie in den Isolierungsbedingungen zu suchen, wie z.B. im Einsatz organischer Lösungsmittel (Methanol, Hexan) und Detergentien (SDS), so dass ein proteolytischer Verdau mit Trypsin kaum erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Der alternativ zu den existierenden Arbeitsvorschriften entwickelte Isolierungsansatz konzentrierte sich deshalb auf eine „subzelluläre Fraktionierung“, womit Neuromelanin-Granula als eine weitgehend komplette Einheit isoliert werden konnten. Isolierungen von Organellen sind allerdings überwiegend aus Einzelzellen beschrieben. Bei derartigen Isolierungen aus Gewebe, wie der Substantia nigra pars compacta, die aus vielen unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt ist, besteht die Gefahr der Verunreinigung durch Proteine und Zellorganellen aus den nicht pigmentierten Zellen, so dass viele Ergebnisse artifiziell sein könnten und so deren Plausibilität schwierig zu überprüfen wäre. Es wurde daher eine zweistufige Isolierung der Granula vorgenommen, die zuerst

die Anreicherung der pigmentierten Nervenzellkörper vorsieht, ehe aus diesen die Neuromelanin Granula gewonnen werden. Wenn man sich vor Augen führt, dass 1 g Substantia-nigra-Gewebe nur etwa 1 mg des Pigments Neuromelanin enthält, so war tatsächlich die Anreicherung der pigmentierten Zellen im ersten Fraktionierungsschritt entscheidend, da bereits so eine erste Anreicherung der Zielorganelle gelang.

Die nun vorliegende Isolierungsmethode war besonders schonend, da man weder auf enzymatische Hilfe zum Aufschluss des Gehirngewebes angewiesen war, noch Detergentien und organische Lösungsmittel zum Einsatz kamen. Wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, blieb dabei selbst die Morphologie dieser Organellen gut erhalten. Durch die beschriebene Herangehensweise an die Isolierung der Neuromelanin-Granula wurden die Isolate für massenspektrometrische Proteinanalysen zugänglich und waren darüber hinaus mit vorgelagerten methodischen Schritten kompatibel, wie der Gelelektrophorese oder dem proteolytischen Verdau.

Transmissionselektronenmikroskopie

Verglichen mit den in den 60-er Jahren *in situ* untersuchten Neuromelanin-Granula zeigen die isolierten Organellen generell eine gute Erhaltung der Morphologie (Kapitel 3.7.1; Abb. 32). Bei der Betrachtung transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen muss man sich allerdings der Tatsache bewusst sein, dass durch die methodische Abfolge von Fixierung, Einbettung und Kontrastierung des Probenmaterials strukturelle Veränderungen erfolgen können, die zu einem artifiziellen Erscheinungsbild führen. Daher ist es hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse sinnvoll, elektronenmikroskopische Proben als Artefakte hoher Präzision jedoch fraglicher Übereinstimmung mit dem Zustand *in vivo* zu betrachten (James, 1997).

Zur Fixierung des Probenmaterials wird bei der Elektronenmikroskopie im allgemeinen Glutaraldehyd eingesetzt. Da Glutaraldehyd, anders als Alkohole, nicht koagulierend wirkt, sondern Proteine quervernetzt, soll dabei die Struktur der Probe gut erhalten bleiben. Allerdings werden Lipidstrukturen nicht von Glutaraldehyd, sondern erst durch die anschließende Behandlung mit OsO_4 fixiert, wodurch Lipide in diesem ersten Fixierungsschritt sogar extrahiert werden können und sich zu artifiziellen Myelin-artigen Strukturen anlagern (Hunter, 1993). Im konkreten Fall der Neuromelanin-Granula ist es vor diesem Hintergrund schwierig, die Herkunft der beschriebenen vakuolären Lipid-Anlagerungen zu evaluieren. Es ist daher unklar, ob jene Lipid-Strukturen Artefakte der

Proben-Präparation für die elektronmikroskopischen Untersuchungen sind, oder ob sie in dieser Form bereits *in vivo* vorliegen. Um eine massive Extraktion der Lipide bei der Glutaraldehyd-Behandlung zu verringern, wurde im Fall der isolierten Neuromelanin-Granula an Stelle einer sequentiellen Abfolge von Fixierungsschritten eine gleichzeitige Applikation von Glutaraldehyd und OsO₄ vorgenommen. Dieses Verfahren hat sich besonders gut zur Fixierung und Darstellung von Leukozyten bewährt (Hunter, 1993).

Des Weiteren zeigen Neuromelanin-Granula bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen *in situ* meist keine umhüllende Membran. Eine Studie am Makaken-Gehirn zeigt deutlich eine Membran im Sinne einer Lipiddoppelschicht, die das Kompartiment komplett umgibt (Hirosawa, 1968). Auch belegen Aufnahmen von Neuromelanin-Granula des humanen Gehirns diese Membran (Moses et al., 1966). Ursachen dafür, dass bei den meisten Aufnahmen allerdings keine Membran erkennbar ist, könnten an den höheren *Post-mortem*-Zeiten liegen oder auch daran, dass die Perfusion von humanem Gewebe zur optimalen und sofortigen Fixierung aus ethischen Gründen ausgeschlossen ist und daher ultrastrukturelle Qualitätsverluste in Kauf zu nehmen sind. Anhand der massenspektrometrischen Untersuchungen konnten allerdings zahlreiche Transmembranproteine identifiziert werden (Kapitel 4.8.2; Tabelle 4; Abb. 35, 36), die Hinweis auf das Vorhandensein einer Membran um Neuromelanin-Granula geben.

Auf Basis der Morphologie sind Neuromelanin-Granula keiner Organellengruppe zuordenbar. Ebenso wenig kann anhand dieser elektronenmikroskopischen Aufnahmen über die Bildung von Neuromelanin eine endgültige Aussage gemacht werden. Auffallend ist aber, dass das Pigment als elektronendichter Bereich nicht innerhalb der gesamten Organelle verteilt ist, wie es beispielsweise in Phase-IV-Melanosomen der Haut der Fall ist (Kapitel 1.6.2; Abb. 4). Vielmehr ist das Pigment oftmals in kreisförmig abgegrenzten Bereichen hoher Elektronendichte erkennbar, die diesen Organellen ein „Maulbeeren-artiges“ Erscheinungsbild verleihen.

In intakten Neuromelanin-Granula ist auch nicht ersichtlich, ob Neuromelanin an geordneten Strukturen gebildet oder abgelagert sein könnte, die mit den von Glycoprotein gp100 (Pmel17) gebildeten Fibrillen in den Melanosomen der Reifungsstadien II und III vergleichbar wären (Berson et al., 2003). Filamentartige Strukturen in Neuromelanin-Granula kamen wahrscheinlich durch Einwirken von Scherkräften bei der Probenverarbeitung zum Vorschein (Kapitel 3.7.1; Abb. 32 C, D),

an denen Partikel mit hoher Elektronendichte angeordnet sind. Sowohl die Überprüfung, ob es sich dabei tatsächlich um Neuromelanin handelt, als auch die Benennung etwaiger strukturgebender Proteine entzieht sich den derzeitigen Untersuchungsmöglichkeiten.

5.4 Proteinanalysen und Massenspektrometrie

Die erfolgreiche Isolierung von Neuromelanin-Granula aus dem menschlichen Gehirn bot nun erstmals die Möglichkeit, die Proteinausstattung dieser Strukturen zu erschließen. Die Identifizierung dieser Proteine mittels Massenspektrometrie setzte allerdings mehrere Schritte voraus, um die Probe für eine massenspektrometrische Analyse aufzubereiten.

Probenvorbereitung

Bei Analysen, die eine umfassende Untersuchung der Proteinkomponenten eines bestimmten Systems zum Ziel haben, sieht man sich mit dem generellen Problem konfrontiert, dass die Proteine aus ihrer natürlichen Umgebung gelöst werden müssen. Die Isolierung möglichst aller Proteine kann sich wegen der großen Unterschiede ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften sehr schwierig gestalten. Proteine besitzen in wässrigen Puffersystemen unterschiedliche Löslichkeiten; während cytosolische Proteine in wässrigen Lösungsmitteln leicht in Lösung gebracht werden können, erfordern schwer lösliche Proteine einer komplexen Proteinmischung die Zugabe chaotroper Substanzen, z.B. Harnstoff oder Guanidiniumchlorid. Zusätzlich neigen hydrophobe Membranproteine in wässriger Lösung zur Bildung von Aggregaten, die meist nur unter Verwendung von Detergentien in Lösung gebracht werden können.

Die Wahl der Zusätze ist allerdings von der Kompatibilität mit den weiteren analytischen Methoden abhängig und somit entscheidend für die Durchführbarkeit der Analysen. So sind beispielsweise Salze und geladene Detergentien zur Solubilisierung von Proteinen eines komplexen Gemisches von Vorteil, sind jedoch nicht für eine Proteintrennung durch isoelektrische Fokussierung (IEF) geeignet (Chevallet et al., 1998; Santoni et al., 2000). Hinsichtlich solcher Inkompatibilitäten müssen bei der Probenvorbereitung

oftmals Einbußen hingenommen werden und erfordern bereits zu diesem Zeitpunkt eine genaue methodische Planung.

Die Probenvorbereitung zur zweidimensionalen Gelelektrophorese schließt eine Solubilisierung von Proteinen durch Detergentien mit Netto-Ladung, wie Sodiumdodecylsulfat (SDS), aber auch bereits geringe Salzkonzentrationen für den Schritt der IEF aus. Detergentien ohne Netto-Ladung, wie CHAPS, Nonidet P40, Triton-X-100, aber auch Octylglukosid, haben allerdings eine weit geringere Solubilisierungseffizienz als SDS.

Die Solubilisierung von Proteinen aus isolierten Neuromelanin-Granula erwies sich mit den für die IEF tolerierbaren Bedingungen als undurchführbar. Selbst bei Verwendung des zwitterionischen Detergens ASB-14 (Chevallet et al., 1998), dessen Solubilisierungseffizienz der von SDS am nächsten kommt, konnten mittels sensitiver Silberfärbung keine nennenswerten Proteinspots auf 2-D-Gelen festgestellt werden. Des Weiteren dürften selbst geringe Anteile des geladenen Pigments, die nur schwer durch Zentrifugation abtrennbar sind, bei der Auftrennung der Proteine im Ampholyten-Gradienten der IEF störend wirken. Als alternativer Ansatz wurde daher die weit effektivere Solubilisierung der Proteine mittels SDS vorgezogen und eine darauf folgende Trennung der Proteine mit Hilfe der 1-D-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1-D-SDS-PAGE) gewählt.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zeigen nach Färbung mit kolloidalem Coomassie-Brilliant-Blau G-250 nahezu über die gesamte Trennstrecke eine hohe Hintergrundfärbung, deren Ursachen bei diesen Proben nicht eindeutig geklärt sind. Es könnte angenommen werden, dass ein kovalent an Proteine gebundener Neuromelanin-Anteil durch Bindung des Coomassie-Farbstoffes dazu beiträgt. Des Weiteren fällt ein hochmolekularer Probenanteil auf, der kaum in die Gelmatrix eindringt und selbst nach Zentrifugation der Probe auftritt. Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um stark quervernetzte Proteine oder um anteiliges hochpolymeres Pigment handelt. Teilweise Proteinquervernetzung kann ebenfalls zum Verschwinden diskreter Proteinbanden führen. Oftmals werden hohe Detergens-Konzentrationen als mögliche Gründe genannt, was hier der Fall sein könnte.

Trotz vieler als getrennt erkennbarer Proteinbanden ist ersichtlich, dass das Auflösungsvermögen der 1-D-SDS-PAGE selbst für das „Subproteom“ der Neuromelanin-Granula nicht ausreichend ist. Anders als bei der höher auflösenden 2-D-

Gelelektrophorese ist mit einer 1-D-SDS-PAGE beispielsweise weder eine mengenmäßige Abschätzung eines Proteins glaubwürdig durchführbar, noch sind Hinweise auf etwaige posttranslationale Modifikationen direkt ersichtlich. Daher ist ein Vergleich der Proteome von Neuromelanin-Granula aus dem Gehirn von gesunden und von Parkinson-Patienten mit dieser Trennmethode nicht ratsam.

5.4.1 Modifizierung von Proteinen mittels Dopamin

Die Anwesenheit großer Mengen an Protein im Cytosol einer Zelle lässt die Frage aufkommen, inwiefern Dopamin in einer derartigen Umgebung tatsächlich mit sich selbst reagieren würde und so Neuromelanin bildet, sondern hauptsächlich Proteine kovalent modifizieren könnte. Die *in vitro* durchgeführten Untersuchungen mit Modellproteinen, wie Lysozym oder BSA, aber auch mit Substantia-nigra-Homogenat zeigen die rasche Modifizierbarkeit von Proteinen durch Dopamin. Das muss allerdings nicht unweigerlich zu einem unlöslichen Pigment führen, wie an BSA demonstriert werden konnte, kann jedoch zu einer Quervernetzung von Proteinen führen.

In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass α -Synuclein (Conway et al., 2001), Tyrosin-Hydroxylase (Kuhn et al., 1999), Neurofilament (Montine et al., 1995) und der Dopamin-Transporter (DAT) (Berman et al., 1996; Whitehead et al., 2001) durch Dopamin modifiziert werden können. Der dazu häufig eingesetzte NBT/Formazan-Assay zum Nachweis von *ortho*-Chinongruppen ist jedoch zu unspezifisch, um Dopaminylierung in Proteinhomogenaten untersuchen zu können. Dagegen schließt eine massenspektrometrische Analyse die prinzipielle Möglichkeit einer eindeutigen Aufklärung posttranslationaler Modifikationen nicht aus und bietet vor allem den Vorteil, die modifizierten Proteine charakterisieren zu können. So konnten nach der Inkubation von aus Ratten-Hirn isolierten Mitochondrien mit [³H]-Dopamin, elektrophoretischer Trennung und anschließender Radiographie zumindest vier Proteine als modifizierbar identifiziert werden, und mittels Massenspektrometrie anschließend die Proteine Aconitase und Neurofilament aufgeklärt werden (Kim et al., 2004).

In vivo kann eine derartige Dopaminylierung vermutet werden. Es ist hinlänglich bekannt, dass Dopamin *in vivo* mit reduzierten, nucleophilen Thiol-Gruppen von Cystein und Glutathion reagieren kann (Graham et al., 1978; Fornstedt et al., 1986). Eine erhöhte Konzentration solcher Addukte ist für die Parkinson-Krankheit beschrieben (Spencer et al., 1998), allerdings wurden dopaminylierte Proteine *in vivo* bislang nicht nachgewiesen.

Selbst an Proteinen der Neuromelanin-Granula konnten bei den massenspektrometrischen Untersuchungen keine derartigen Modifikationen identifiziert werden, obwohl sich bei diesen Proteinextrakten ein mit dem künstlich modifizierten Substantia-nigra-Homogenat vergleichbares elektrophoretisches Trennverhalten zeigte: in beiden Fällen ist ein hochmolekularer Probenanteil zu beobachten, der nicht ins Gel einwandert. Des Weiteren ist sowohl *in vitro* nach längerer Inkubation der Proben mit Dopamin, als auch bei den Proteinen aus Neuromelanin-Granula eine tendenzielle Schmierbildung einhergehend mit dem Verschwinden diskreter Proteinbanden zu verzeichnen. Dieses Phänomen ist *in vitro* als fortgeschrittene Proteinquervernetzungen mit einer möglicherweise parallel ablaufenden Dopaminpolymer-Bildung an Proteinen erklärbar. Quervernetzte Proteine in der Neuromelanin-Probe, sowie Addukte von Neuromelanin an Proteinen sind wahrscheinlich, eine massenspektrometrische Aufklärung ist allerdings in jedem Fall kaum durchführbar. Diese Schwierigkeiten dürften auch der Grund sein, weshalb mit etwa 70 Proteinen zahlenmäßig relativ wenige Proteine identifiziert wurden (Kapitel 4.8.2; Tab. 4). Mit analogen Analyseansätzen waren meist mehrere hundert Proteine identifiziert worden (Bell et al., 2001; Han et al., 2001; Pflieger et al., 2002; Taylor et al., 2003), dagegen waren in Phase-I- und -II-Melanosomen (Basrur et al., 2003), Chloroplasten (Peltier et al., 2002) und dem Golgi-Netzwerk (Bell et al., 2001) ebenfalls nur etwa 70-80 Proteine gefunden worden.

5.4.2 Identifizierte Proteine der Neuromelanin-Granula – Biochemische Diskussion

Auf der Basis der massenspektrometrisch analysierten Peptide konnten Proteine identifiziert werden, die Neuromelanin-Granula vorläufig als Organellen des endosomal-lysosomalen Kompartimentensystems eingrenzen lassen. In eukaryotischen Zellen gelten Lysosome als Kompartimente, in denen zelluläre Bestandteile abgebaut und beseitigt werden (de Duve, 1983; Kornfeld and Mellman, 1989). Zu diesem Zweck sind Lysosome mit mehr als 50 Säure-abhängigen Hydrolasen ausgestattet, die den Abbau von endogenen und exogenen Makromolekülen bewerkstelligen. Lysosome sind hoch dynamische, heterogene Organellen, die ausschließlich anhand der Morphologie nicht identifiziert werden können (Hunziker and Geuze, 1996; Luzio et al., 2000; Mullins and Bonifacino, 2001; Bagshaw et al., 2004). Eine spezifischere Beschreibung gelingt anhand der Anwesenheit von glycosylierten, integralen Membranproteinen, die als Lysosomen-

assoziierte Membranproteine (LAMPs), als Lysosomen-integrierte Membranproteine (LIMPs) und als lysosomale Membranglycoproteine (LMGs) bekannt sind. Im Gegensatz zu den lysosomalen Vorläufer-Organellen, den späten Endosomen, fehlen in Lysosomen die Mannose-6-phosphat-Rezeptoren. Lysosomen halten einen niedrigen pH-Wert (4.5-5.0) aufrecht, der für die luminalen, hydrolytisch wirksamen Enzyme benötigt wird. Die meisten dieser molekularen Charakteristika für Lysosomen werden allerdings auch mit speziellen, Zelltyp-spezifischen „Lysosomen-verwandten Organellen“ geteilt (Diment et al., 1995). Dazu gehören unter anderen Melanosomen, lytische Granula der T-Lymphozyten, die dichten Granula in Thrombozyten, sowie MHC-II-Kompartimente (MHC, „major histocompatibility complex“) (Neefjes, 1999) in Antigen-präsentierenden Zellen, die jeweils andere physiologische Aktivitäten als den Abbau von Biomolekülen wahrnehmen (Dell'Angelica et al., 2000). Tatsächlich wurden in zahlreichen Studien über genetisch bedingte Multiorganell-Erkrankungen Parallelen in der Entstehung von Lysosomen und „Lysosomen-verwandten Organellen“ aufgezeigt (Dell'Angelica et al., 2000).

Es existieren verschiedenste Erklärungsmodelle zur Entstehung von Lysosomen (Hunziker and Geuze, 1996; Mullins and Bonifacino, 2001), jedoch ist man sich in allen Fällen über die Beteiligung von sehr spezifisch ablaufenden Sortiermechanismen einig. Membranprotein wie LAMP-1 und LIMP II verlassen das *trans*-Golgi-Netzwerk auf einer sekretorischen Route in Richtung der endosomalen Kompartimente und werden dabei vom Adaptor-Komplex AP-3 (Dell'Angelica et al., 1999) anhand ihrer Tyrosin-(LAMP-1) und Di-Leucin-basierenden (LIMP II) Erkennungsmotive (Honing et al., 1998; Dell'Angelica et al., 1999; Obermuller et al., 2002; Bonifacino and Traub, 2003) geleitet. Dieser Adaptor Komplex AP-3 ist auch für die Biogenese der den Lysosomen sehr ähnlichen Melanosomen essentiell, indem AP-3 die Proteine der Tyrosinase-Familie aufgrund ihrer Di-Leucin-Motive zuordnet (Jimbow et al., 2000). Allerdings wurden bei den Untersuchungen der Neuromelanin-Granula keine melanogenen Enzyme, wie Tyrosinase und TRP-1 & -2 („tyrosinase-related proteins 1 & 2“) gefunden. Auch wenn geringe Mengen von Tyrosinase-mRNA in der humanen Substantia nigra nachgewiesen worden sind (Xu et al., 1997), scheint das zugehörige Protein dennoch nicht im menschlichen Gehirn exprimiert zu sein und dürfte folglich auch keine Rolle in der Biogenese von Neuromelanin spielen (Ikemoto et al., 1998). Dies schließt jedoch nicht aus, dass ein analoges Enzym kovalent an das Neuromelanin-Gerüst gebunden ist und dadurch für Detergentien nicht lösbar wird (Zeise et al., 1992; Orlow, 1995).

In Hinblick auf die Sortierungsmechanismen für lysosomale Membranproteine sei darauf hingewiesen, dass das klassische lysosomale Markerprotein „saure Phosphatase“ bei den massenspektrometrischen Untersuchungen nicht detektiert wurde. Saure Phosphatase wird vorübergehend als Typ-I-Membranprotein in die lysosomale Membran eingebaut, um anschließend proteolytisch prozessiert zu werden. Dabei wird auf der luminalen Seite der Membran der katalytisch aktive Teil des Proteins abgespalten und allmählich in die Matrix der Lysosomen freigesetzt (Waheed et al., 1988).

Eine andere Sortierungsrouten leitet saure Hydrolasen, die anhand von Mannose-6-phosphat-Resten markiert sind, in Clathrin-umhüllten Transportvesikel („clathrin-coated vesicles“) über Endosomen zu Lysosomen. Diese Transportvesikel knospen vom *trans*-Golgi-Netzwerk ab, sobald Mannose-6-phosphat-Rezeptoren an die phosphorylierten Mannosereste der Proteine binden. Dynamin wurde erst vor kurzem in Assoziation mit späten Endosomen, Tubulovesikel und Clathrin-umhüllten Transportvesikel gezeigt, und dürfte unter anderem an der Wiederverwertung der Mannose-6-phosphat-Rezeptoren nach Dissoziation der gebundenen Hydrolasen in der Ziel-Organellen beteiligt sein (Nicoziani et al., 2000). Interessanterweise konnte bei den Proteom-Analysen von Neuromelanin-Granula nur ein unerwartet geringer Anteil an mannosylierten lysosomalen Enzymen identifiziert werden, wie beispielsweise Glycosylhydrolasen (EC 3.2.1.) (Journet et al., 2002). Diese Situation spiegelt sich auch nach der Inkubation von Elektrobots mit *Galanthus-nivalis*-Agglutinin (GNA) wider.

Einige Proteine, wie beispielsweise die saure Ceramidase, die den Abbau von Glycosphingolipiden bewerkstelligen (Sandhoff et al., 1998), wurden identifiziert. Glycosphingolipide befinden sich vor allem in neuronalem Gewebe und könnten auch Bestandteile der lipidhaltigen Vakuolen der Neuromelanin-Granula sein. Mutierte Formen der Tripeptidyl-Peptidase I (Tabelle 4, #9) und der Dipeptidyl-Peptidase II (Tabelle 4, #13) sind ursächlich mit sämtlichen Typen der Neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL) verbunden, die sich durch eine charakteristische Akkumulation von autofluoreszenten Einschlusskörpern auszeichnen (Mole et al., 1999). Diese Formen neurodegenerativer Erkrankungen werden als lysosomale Speicherkrankheiten bezeichnet und scheinen auf einer defekten Proteolyse zu beruhen.

Die Lokalisierung von L-Ferritin in Neuromelanin-Granula

Im Rahmen der massenspektrometrischen Untersuchungen wurden Peptide nachgewiesen, deren Sequenz Hinweis auf die Anwesenheit von L-Ferritin gaben. Ferritin ist in den meisten Zellen der wichtigste Eisenspeicher, wobei schädliches cytosolisches Eisen in Form von Oxohydroxy-Komplexen im Inneren von Ferritin gebunden und unschädlich gemacht wird. Immunhistochemische Untersuchungen konnten Ferritin in den melanisierten Neuronen der Substantia nigra pars compacta kaum nachweisen, jedoch in den umliegenden Zellen, wie Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten (Jellinger et al., 1990; Zecca et al., 2001; Zecca et al., 2004). *In-situ*-Hybridisierungsstudien konnten keine nennenswerte Expression von L-Ferritin-mRNA in melanisierten Neuronen nachweisen (Faucheux et al., 2002). Ferritin wird wahrscheinlich dennoch, zwar in geringer Menge, in den pigmentierten Neuronen der Substantia nigra pars compacta exprimiert. Es gibt Hinweise darauf, dass diese vermutlich sehr niedrige Expression bei immunhistochemischen Untersuchungen als Hintergrundfärbung angesehen und daher vernachlässigt worden ist.

Über die Lokalisierung von Ferritin in Neuronen ist generell wenig bekannt (Berg et al., 2001). Allerdings nimmt man an, dass cytosolisches Ferritin von Lysosomen aufgenommen werden kann (Radisky and Kaplan, 1998). In zahlreichen Geweben mit hohem Eisengehalt, beispielsweise der Leber, findet man spezielle subzelluläre Organellen, sogenannte Siderosome, die offensichtlich der Speicherung großer Mengen an Eisen dienen (Richter, 1978, 1984). Diese Siderosome sind spezielle lysosomale Kompartimente, aus denen offensichtlich nach Proteolyse von Ferritin das amorphe Hämosiderin entsteht. Ähnlich wie Siderosome sind Neuromelanin-Granula eisenspeichernde Organellen, in denen Eisen auf vergleichbare Art wie in Ferritin oder Hämosiderin angeordnet ist (Gerlach et al., 1995). Der massenspektrometrische Nachweis von Ferritin gibt allerdings Hinweis darauf, dass die Akkumulation von Eisen in Neuromelanin-Granula nicht nur passiv stattfinden könnte, sondern wahrscheinlich auch über einen regulierten, Ferritin-vermittelten Prozess ablaufen könnte.

Die Parkinson-Krankheit ist von einer pathologisch erhöhten Eisenakkumulation begleitet, die spezifisch in Neuromelanin-Granula lokalisierbar ist (Jellinger et al., 1992). Obwohl mutiertes Ferritin zu vermehrter Eisenablagerung in den Basalganglien und einer extrapyramidalen Bewegungssymptomatik führen kann (Curtis et al., 2001), konnte bei der Parkinson-Krankheit keine Assoziation zwischen der erhöhten Eisenakkumulation

und genetischer Veränderungen von Ferritin nachgewiesen werden (Felleitschin et al., 2003). Auch geht die Akkumulation von Eisen bei der Parkinson-Krankheit nicht mit einer Hochregulierung von Ferritin einher (Connor et al., 1990; Dexter et al., 1991; Mann et al., 1994; Connor et al., 1995; Faucheux et al., 2002), noch mit einer Veränderung auf Ebene der „Eisen-regulierenden Proteine“, wie IRP2 (Deplazes et al., 2004). Wie dieser pathophysiologische Prozess tatsächlich abläuft, ist daher immer noch unklar. Es gibt allerdings Hinweise, dass die Ursache für die Aufnahme von Eisen in das Gehirn mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke begründet sein dürfte (Oestreicher et al., 1994).

Identifizierung von Proteinen aus dem Endoplasmatischen Reticulum

Zusätzlich zu den beschriebenen lysosomalen Proteinen konnten Proteine identifiziert werden, die in erster Linie dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) zugeordnet werden. Hauptbestandteile des ER, wie Cytochrom-P-450-Isoformen oder NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, wurden bei der massenspektrometrischen Protein-Analyse von Neuromelanin-Granula nicht identifiziert. Ebenso wenig konnte das ER-Markerprotein BiP/grp78 über MS oder Western-Immunoblotanalyse detektiert werden, so dass man eine spezifische Lokalisierung der ER-residenten Proteine in den Neuromelanin-Granula annehmen kann.

Eine direkte Beteiligung des ER an der Entstehung von subzellulären Kompartimenten wird für Autophagosomen vermutet, die nach derzeitigem Wissensstand aus der Vereinigung endoplasmatischer Membranen mit endosomalen Kompartimenten gebildet werden (Dunn, 1990a, 1990b; Liou et al., 1997). Ein ähnlich konvergierender Biogeneseweg wird auch für Melanosomen diskutiert (Basrur et al., 2003; Dell'Angelica, 2003). Trotz vieler Gemeinsamkeiten in der Biogenese von Lysosomen-verwandten Organellen und Lysosomen hinsichtlich der Beteiligung des *trans*-Golgi-Netzwerks, wurden für Lysosomen dagegen erst kürzlich durch subzelluläre Proteomanalyse der lysosomalen Membranproteine auch einige ER Proteine identifiziert (Bagshaw et al., 2004). Demnach würden Proteine des ER zur Etablierung früher endosomal-lysosomaler Strukturen, einschließlich der Phagosomen in Makrophagen (Garin et al., 2001) und der Phase-I-Melanosomen in Melanocyten (Basrur et al., 2003; Dell'Angelica, 2003), beitragen. Im Verlauf der Reifung von Phagosomen zu Phago-Lysosomen nimmt die Anzahl der dem ER zuordenbaren Proteine kontinuierlich ab, vor allem Calnexin

verschwindet rasch bei diesem Reifungsprozess (Gagnon et al., 2002). Während einige ER-residente Proteine noch in konventionellen Lysosomen auffindbar sind (Bagshaw et al., 2005), ist Calnexin in diesen Organellen abwesend, wird jedoch in Lysosomenverwandten Organellen, wie beispielsweise den Melanosomen, lokalisiert (Dakour et al., 1993; Salopek and Jimbow, 1996; Toyofuku et al., 1999; Basrur et al., 2003). Gleichzeitig mehren sich Hinweise auf die Funktion von Calnexin als einem melanogenen Chaperon (Jimbow et al., 1994; Jimbow et al., 2000), das nach derzeitiger Ansicht eine unterstützende Rolle zur korrekten Faltung und der Sortierung melanogener Enzyme, speziell der Tyrosinase-Gen-Familie, in Richtung der Ziel-Kompartimente hat (Toyofuku et al., 1999; Hasegawa et al., 2003).

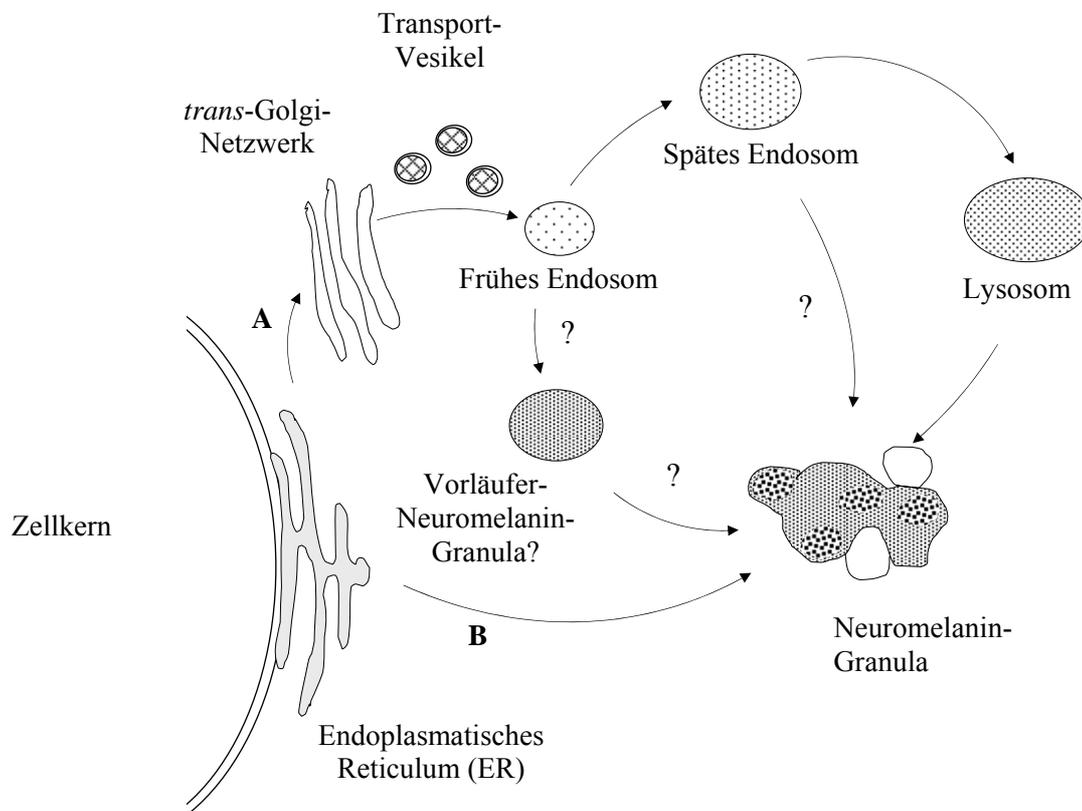


Abbildung 40: Modell der Biogenese von Neuromelanin-Granula.

Proteine des ER als Bestandteile von Neuromelanin-Granula sind demnach nicht verwunderlich, sondern vielmehr Indiz dafür, dass deren Bildung weitgehend analog der Biogenese von Lysosomen und Lysosomen-verwandten Organellen über das *trans*-Golgi-Netzwerk und diesem nachgelagerten endosomalen Kompartimenten ablaufen

dürfte (Abb. 40). Ob der Einfluss des ER über das *trans*-Golgi-Netzwerk (Abb. 40; A) oder auf direktem Weg (Abb. 40; B) stattfindet, ist jedoch unklar.

5.5 Neuromelanin-Granula – ein weiterer Vertreter der Lysosomen-verwandten Organellen

Wenn auch die Abfolge der komplexen dynamischen Prozesse zur Biogenese von Zellorganellen und konkret für Neuromelanin-Granula anhand ihres Proteoms kaum aufgeschlüsselt werden kann, so sind dennoch wichtige Hinweise auf die Entstehung ableitbar. Umso mehr liegt das Potenzial der subzellulären Proteom-Analyse darin, Organellen anhand ihrer Proteinzusammensetzung sehr detailliert charakterisieren und beschreiben zu können.

Durch die vermehrte Anwendung der subzellulären Proteom-Analyse zur Charakterisierung von Organellen stehen bereits einige umfangreiche Datensätze verschiedener subzellulärer Proteome zur Verfügung (Taylor et al., 2003). Dabei werden nicht nur neue Proteine identifiziert, sondern auch bekannte Proteine mit einer bestimmten Organelle in Verbindung gebracht, die man in dieser nicht vermutet hätte. So bringen derartige Analysen einerseits zum Vorschein, dass die große Vielfalt unterschiedlicher Organellen durch multitopologische Lokalisierung von Proteinen bedingt werden kann (Abb. 41).

Proteine des ER finden sich nicht nur in Lysosomen und Lysosomen-verwandten Organellen, sondern außerdem im Proteom von Peroxisomen. So ist die Aldehyd-Dehydrogenase zwar ein ER-Protein, jedoch gleichzeitig auch ein intrinsisches peroxisomales Protein (Kikuchi et al., 2004). Andererseits wird ersichtlich, dass die teilweise sehr unterschiedlichen Funktionen verwandter Organellen aus den Kombinationen offensichtlich weniger Proteine resultieren (Bagshaw et al., 2005).

Lange Zeit war die Diskussion über die Zugehörigkeit von Neuromelanin-Granula zu einer bestimmten Organellengruppe von Spekulationen geprägt, wobei unter anderem Lysosomen und Phagosomen als Bezeichnungen genannt wurden (Barden, 1969). Nun wurden mit 73 Proteinen zahlreiche lysosomale Membranproteine und hydrolytischwirkende Enzyme von Lysosomen als Bestandteile der Neuromelanin-Granula identifiziert. Obwohl diese Proteine auch für andere Organellen-Typen beschrieben sind, bezeichnet man diese Organellen dennoch nicht als Lysosome, sondern

als Lysosomen-verwandte Organellen. Diese unterscheiden sich von konventionellen Lysosomen meist in ihrer Morphologie, vor allem aber in ihrer speziellen Funktion, die sie in wenigen sehr spezialisierten Zelltypen ausüben. Es bleibt nun die Frage zu klären, welchem Organellen-Typ Neuromelanin-Granula anhand der identifizierten Proteine zugeordnet werden können.

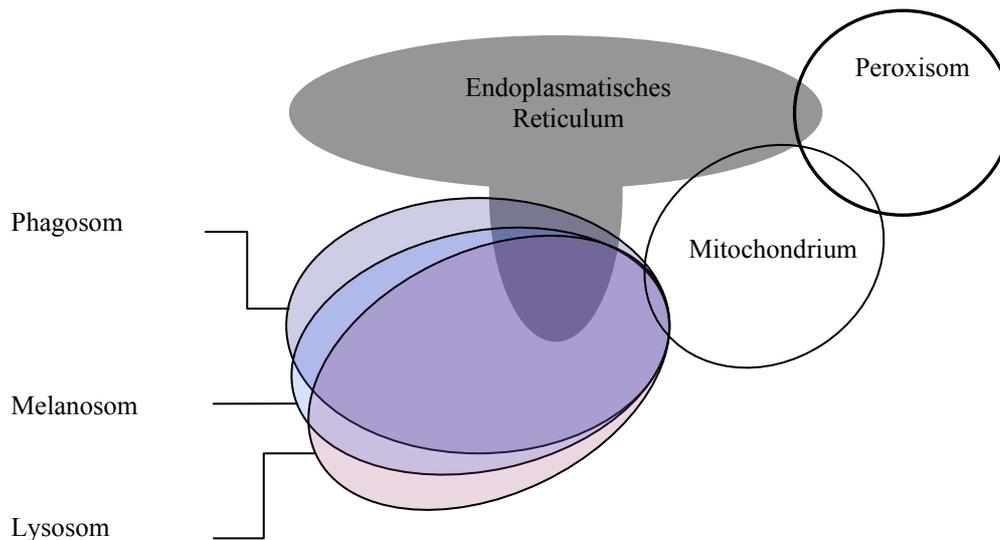


Abbildung 41: Multitopologische Lokalisierung von Proteinen. Organellen sind hier im mathematischen Sinn als „Mengen ihrer Proteine“ dargestellt. Im Rahmen von subzellulären Proteomanalysen verschiedener Organellen-Typen wird vermehrt zum Vorschein gebracht, dass manche Proteine in mehreren unterschiedlichen Organellen lokalisiert sein können. Inwiefern es sich dabei um die selben Isoformen handelt, ist kaum bekannt.

Neuromelanin-Granula sind rein morphologisch betrachtet keine Autophagosomen (autophagic vacuoles). Sie sind nicht von multilamellaren Membranen umgeben (Moses et al., 1966; Hiroswawa, 1968), die für Autophagosomen beschrieben sind (Fengsrud et al., 2000a). Des Weiteren fehlen Neuromelanin-Granula für Autophagosomen charakterisierte Proteine, wie Lactat-Dehydrogenase, Isoformen der Argininosuccinat-Synthase und der 2-Enolyl-CoA-Hydratase, oder BiP/grp78 (Fengsrud et al., 2000b), welches als ER-Protein auch in Lysosomen (Bagshaw et al., 2005) und den Lysosomen-verwandten Melanosomen (Basrur et al., 2003) zu finden ist.

Tabelle 5: Proteinvergleich der Neuromelanin-Granula mit Lysosomen und Lysosomen-verwandten Organellen. Vergleichende subzelluläre Proteomanalysen von konventionellen Lysosomen, Lysosomen-verwandten Organellen (Phagosomen, Phase-I- & -II-Melanosomen und Neuromelanin-Granula) zeigen die Gemeinsamkeiten dieser Organellen. Vor allem wird jedoch deutlich, dass die gravierenden morphologischen und funktionellen Unterschiede durch die An- oder Abwesenheit sehr weniger Proteine bedingt sein dürfte.

Protein	Lysosom	Phagosom	Phase-I- & -II-Melanosom	Neuromelanin-Granula
Lysosomale Proteine				
LAMP-1	✓	✓	✓	✓
LAMP2	✓	✓	✓	✓
LIMP II	✓	✓	—	✓
LAMP3	—	—	✓	✓
V-ATPase A	✓	?	✓	✓
V-ATPase B	✓	✓	✓	✓
V-ATPase D	✓	—	✓	—
V-ATPase E	✓	✓	✓	✓
Niemann-Pick C1	✓	—	✓	—
Cathepsin L	✓	✓	—	—
Cathepsin Z	✓	✓	—	✓
Cathepsin B	✓	?	✓	✓
Nicastrin	✓	—	✓	—
Prosaposin	✓	—	✓	✓
Tripeptidyl-peptidase I	?	—	✓	✓
Immunsystem				
MHC I alpha	✓	✓	—	—
Endoplasmatisches Reticulum				
BiP/grp78	✓	✓	✓	—
Protein Disulfidisomerase (ER60)	✓	✓	✓	—
Ribophorin I	✓	—	✓	✓
Calnexin	—	✓	✓	✓
ER59	—	✓	—	—
Cytochrom P450	—	✓	—	—
Calreticulin	—	✓	✓	✓

Andere				
Peroxiredoxin 1	✓	✓	—	✓
PI-4-K Typ 2	✓	—	✓	✓
Hsp60	?	✓	✓	✓
Prohibitin	✓	✓	—	—
Apoptose				
VDAC1	✓	✓	✓	✓
Alix	—	✓	—	—
TRAIL	—	✓	—	—
Annexin 5	—	✓	—	—
Transport				
SNAP alpha	✓	✓	—	✓
Rab7	✓	✓	✓	—
Rab2	✓	✓	—	—
Rab5C	✓	✓	—	—
Ubiquitin	✓	✓	✓	✓
NIPSNAP1	✓	—	—	✓
2',3'-cNucleotid-3-phosphodiesterase	—	—	✓	✓
Melanogenese				
Tyrosinase	—	—	✓	—
TRP1	—	—	✓	—
TRP2	—	—	✓	—
Tyrosin-Hydroxylase	—	—	—	✓
Insgesamt identifizierte Proteine	215	117	68	73

Adaptiert und erweitert nach Bagshaw et al., 2005, Garin et al., 2001 und Tribl et al., 2005.

Im direkten Vergleich des Proteoms von Neuromelanin-Granula mit den Proteomen von Lysosomen (Bagshaw et al., 2005), Phagosomen (Garin et al., 2001) und Phase-I- oder -II-Melanosomen (Basrur et al., 2003) (Tab. 5) wird deutlich, dass bereits anhand weniger Proteine nicht nur ein Verwandtschaftsverhältnis, sondern auch die Originalität der jeweiligen Organelle demonstriert werden kann. So sind Neuromelanin-Granula trotz der Anwesenheit vieler „lysosomaler“ Proteine dennoch keine konventionellen

Lysosomen. Viele dieser lysosomalen Proteine werden auch in Lysosomen-verwandten Organellen (z.B. Phagosomen und Melanosomen) exprimiert. Ähnliches gilt für die Proteine des ER. Obwohl in allen vier Organellen-Typen Proteine des ER lokalisiert sind, sind Unterschiede klar erkennbar. Neuromelanin-Granula sind demnach keine klassischen Lysosomen, aber auch keine Phagosomen oder Melanosomen. Mit großer Wahrscheinlichkeit stellen Neuromelanin-Granula einen separaten Organellen-Typ dar, den man der Gruppe der Lysosomen-verwandten Organellen zuordnen kann.

5.6 Ausblick

Nach der erfolgreichen Aufklärung der Proteinzusammensetzung von Neuromelanin-Granula der Substantia nigra pars compacta und ihrer Beschreibung als Lysosomen-verwandte Organellen ergeben sich weitere Fragestellungen bezüglich noch unbekannter Funktionen dieser Organellen, des Bildungsmechanismus von Neuromelanin und etwaiger Abbauwege dieses Pigments.

Der Proteinvergleich von gesundem und krankem Gewebe gut könnte interessante Einblicke in zelluläre Störungen, die mit Neuromelanin-Granula assoziiert sind, ermöglichen. So könnten derartige vergleichende Untersuchungen unter anderem Aufschluss darüber geben, (1) welche Proteine und Faktoren tatsächlich an der Bildung von Neuromelanin beteiligt sind, (2) die Menge an gebildetem Neuromelanin konstant halten, (3) welches genetische Programm der Bildung von Neuromelanin-Granula zugrunde liegt, so dass diese Organellen in manchen, jedoch nicht in allen catecholaminergen Neuronen gebildet werden, und (4) welche Faktoren für die spezifische Eisenakkumulation in Neuromelanin-Granula bei der Parkinson-Krankheit verantwortlich sind.

Speziell für die Parkinson-Krankheit ist ungeklärt, inwiefern Veränderungen der nun in Neuromelanin-Granula identifizierten Proteine auch eine Rolle bei patho-biochemischen Prozessen spielen und Risikofaktoren für diese Krankheit darstellen könnten. Des Weiteren ist unklar, ob es Abbauwege für Neuromelanin gibt, und inwiefern diese bei der Parkinson-Krankheit betroffen sind. Unverstanden ist außerdem die Rolle der Lipidvakuolen, die an Neuromelanin-Granula assoziiert sind.

Über die chemische Zusammensetzung von Neuromelanin, das in den noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus gebildet wird, sind besonders wenig bekannt. Da bei der Parkinson-Krankheit nicht nur die pigmentierten Neurone der Substantia nigra, sondern

auch des Locus coeruleus absterben, könnte ein Vergleich der beiden Neuromelanin-Typen sowohl hinsichtlich der chemischen Struktur, als auch auf Proteinebene wichtige Einblicke in Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Biogenese und bei neurodegenerativen Prozessen geben.

Ein limitierender Faktor für derartige Untersuchungen ist vermutlich der Mangel an ausreichendem Untersuchungsmaterial. Da Analysen an *Post-mortem*-Gewebe außerdem kaum funktionelle Studien zulassen, wird es in der Zukunft notwendig sein, kultivierbare zelluläre Testsysteme zu entwickeln, um viele dieser Fragen beantworten zu könnten.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen Untersuchungen zur Bildung des Pigments Neuromelanin, eines Polyphenols, das die Ursache für die dunkle Farbgebung der humanen Substantia nigra pars compacta ist. Eine Beteiligung von Neuromelanin an den pathobiochemischen Ereignissen bei Parkinson-Krankheit erklärt das klinische Interesse an Neuromelanin.

Die Untersuchungsmöglichkeiten von Neuromelanin sind limitiert: einerseits ist eine chemische Strukturaufklärung aufgrund der Unlöslichkeit dieses amorphen Polymers kaum zu bewerkstelligen, andererseits wird mangels geeigneter biologischer Testsysteme ein Einblick in die Biogenese von Neuromelanin verwehrt.

Zurzeit wird die Bildung von Neuromelanin anhand der beiden konkurrierenden Hypothesen als Autoxidation von Dopamin oder durch Beteiligung eines Enzyms („Tyrosinase-Konzept“) erklärt. In dieser Arbeit wurden beide hypothetischen Ansätze bearbeitet, wobei einer enzymatischen Biogenese von Neuromelanin die Präferenz gegeben wird.

So zeigten Versuche zur Metall-vermittelten Polymerisation von Dopamin unter physiologischen Bedingungen keine gesteigerte Bildung eines Dopaminmelanins. Dagegen wurde eine Modifizierung und Quervernetzung von Proteinen durch Dopamin am Beispiel BSA als ein alternativer Reaktionsweg bestätigt.

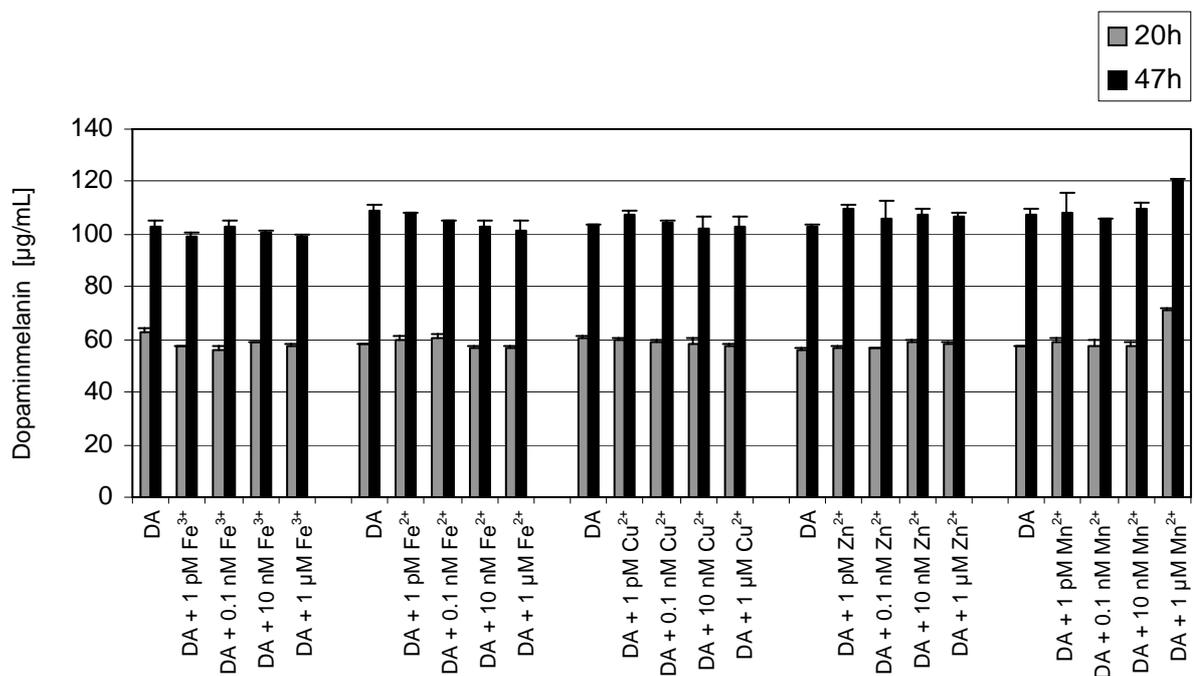


Abbildung 12.1: Einfluss von redoxaktiven Metallen auf die Bildung von Dopaminmelanin.

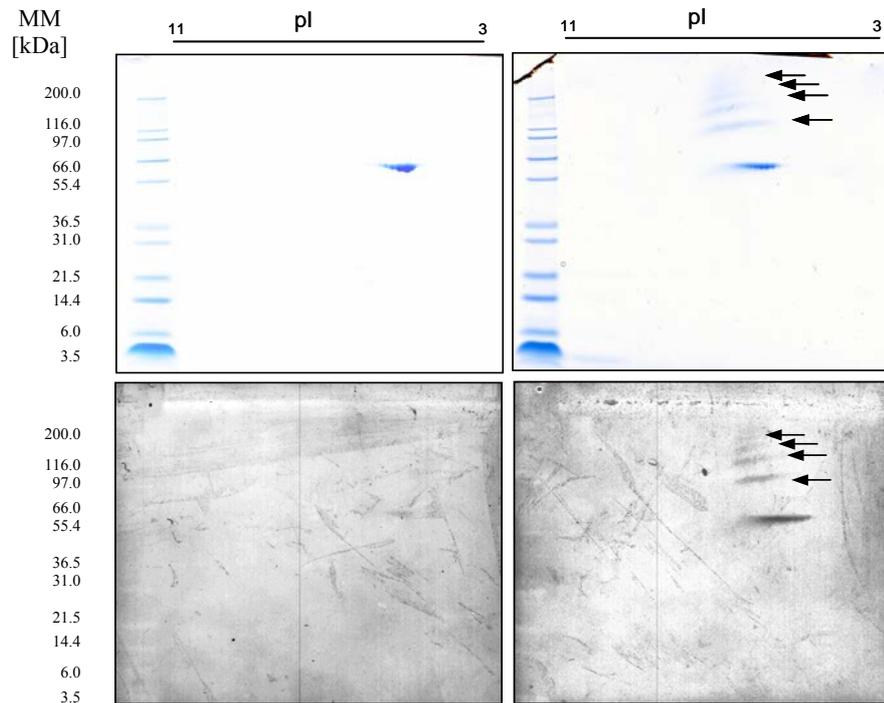


Abbildung 15.1: Untersuchungen zur Modifizierung von BSA durch Dopamin.

Hypothesen-geleitete Ansätze zur Untersuchung des „Tyrosinase-Konzepts“ mittels immunhistochemischer Methoden bestätigten die Abwesenheit von Tyrosinase, dem Schlüssel-Enzym der Biogenesekaskade von okulokutanem Melanin (A), im humanen Hirnstamm (C, D).

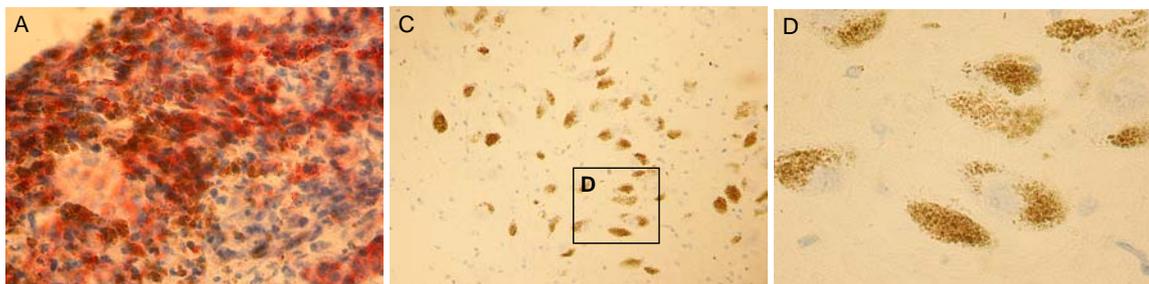


Abbildung 19.1: Immunhistochemische Färbung eines Melanoms und der Substantia nigra mit Anti-Tyrosinase-Antikörper.

Eine weiterführende Entwicklung zum „Tyrosinase-Konzept“ erfolgte dahingehend, dass mit bioinformatischen Lösungsansätzen im menschlichen Genom gezielt nach Tyrosinase-ähnlichen Gen-Sequenzen gesucht wurde und schliesslich für die Sequenz des vermeintlichen Pseudogens „TYRL“ (tyrosinase-like) drei „expressed sequence tags“

(ESTs) identifiziert wurden. Trotz prinzipieller Transkription dieser Sequenz trägt ein TYRL-abgeleitetes Protein allerdings nicht zur Pigmentierung der humanen Substantia nigra bei.

Tabelle 3.1: *Exprimierte TYRL-Sequenzen.*

TYRL-EST's	Sequenz (GenBank file acc. #)	Gewebe, cDNA-Bank	Übereinstimmung [bp]	Lücken [bp]	Score, [E-Wert]
EST (1)	gi: 7458229 (AW665590.1)	fötale Lunge, Hoden, Lymph-Knoten (B-Zellen), gepoolt	Exon 4: 54/57 (94 %)	0	91.7 bits (46), [9 ⁻¹⁵]
		<i>Homo sapiens, Soares_NFL_T_GBC_SI</i>	Exon 5: 532/532 (100 %)	0	1055 bits (532), [0.0]
EST (2)	gi: 3797932 (AI218117.1)	fötale Lunge, Hoden, Lymph-Knoten (BZellen), gepoolt	Exon 4: 145/149 (97 %)	4/149 (2 %)	232 bits (117), [4 ⁻⁵⁷]
		<i>Homo sapiens, Soares_NFL_T_GBC_SI</i>	Exon 5: 392/392 (100 %)	0	777 bits (392), [0.0]
EST (3)	gi: 3770763 (AI208821.1)	Hoden <i>Homo sapiens, Soares_testis_NHT</i>	Exon 4: 473/487 (97 %)	6/487 (1 %)	821 bits (414), [0.0]

Zur globalen Untersuchung von Neuromelanin-Granula wurde nun erstmals eine Isolierung der Pigment-haltigen Organelle vorgestellt, die die Basis für eine umfassende Proteomanalyse mittels 1-D-SDS-PAGE und ESI-Tandem-Massenspektrometrie bildete.

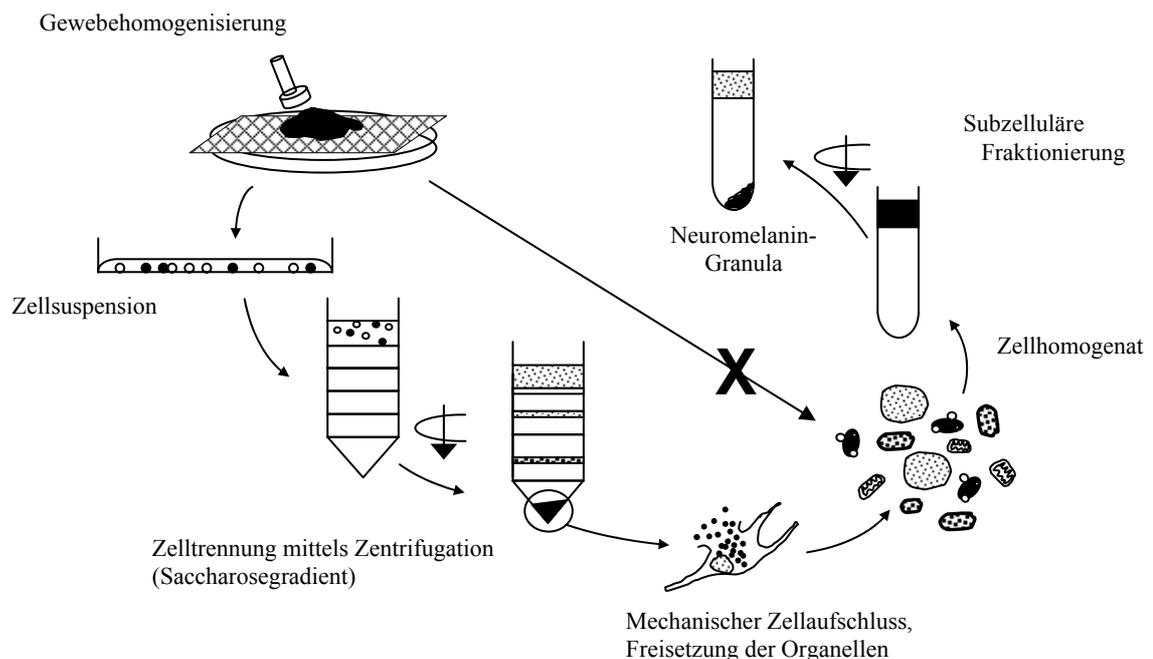
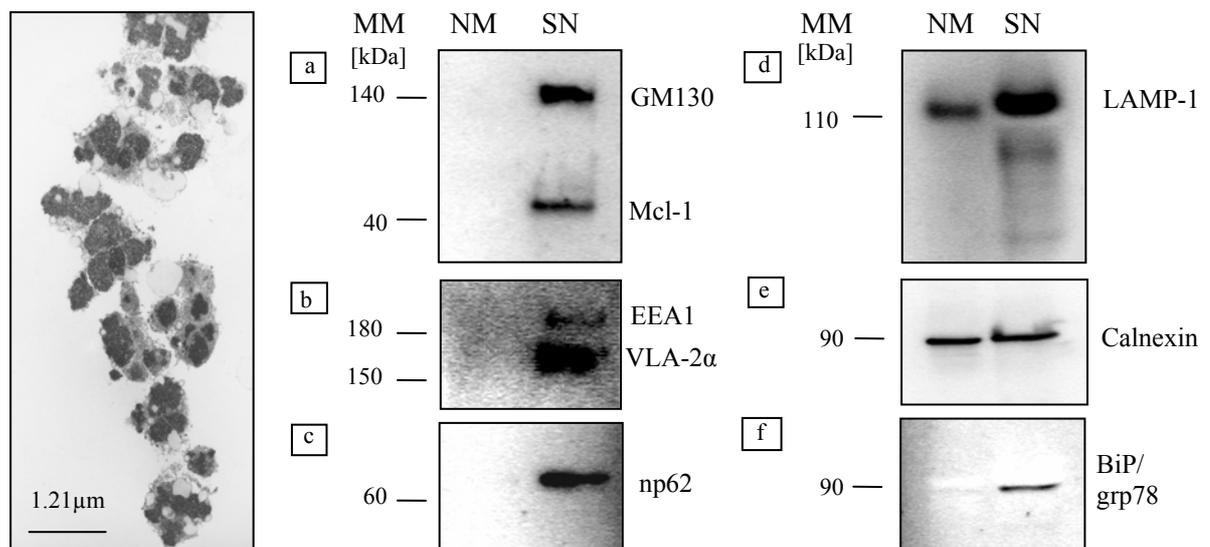


Abbildung 30.1: *Schema zur Isolierung von Neuromelanin-Granula aus Substantia-nigra-Gewebe.*

Die Isolierung von Neuromelanin-Granula aus humanem Substantia-nigra-pars-compacta-Gewebe gelang in einem zwei-stufigen Ansatz, wobei sich durch eine vorgelagerte Anreicherung der pigmentierten Neurone nicht nur die Probenkomplexität für die eigentliche Organellen-Isolierung erheblich verringerte, sondern auch Verunreinigungen aus anderen Zelltypen minimiert wurden.

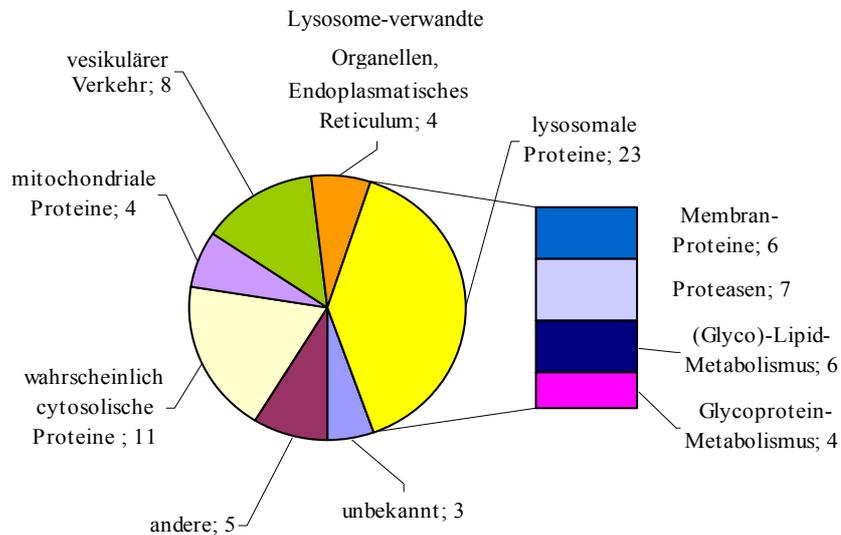
Die isolierten Neuromelanin-Granula wiesen auf morphologischer Ebene nach elektronenmikroskopischer Inspektion einen hohen Grad an struktureller Integrität auf, die durch die Anwesenheit sämtlicher Charakteristika, z.B. des elektronendichten Neuromelanins oder der assoziierten Lipidvakuolen, gekennzeichnet war. Auf molekularer Ebene spiegelten immunologische Western-Blot-Analysen die hohe Sauberkeit die Isolate wieder, die sich anhand spezifischer Marker-Proteine in der Abwesenheit sämtlicher zellulärer Strukturen, z.B. des Zellkerns, der Mitochondrien, des Golgi-Netzwerks, früher Endosomen, der Zellmembran oder des Endoplasmatischen Reticulums, ausdrückten.



Abbildungen 32.1, 33.1 und 36.1: Morphologische und molekulare Validierung der Isolate.

Die anschliessenden massenspektrometrischen Analysen dieser Organellen liessen die Identifizierung von insgesamt 73 Proteinen zu. Diese waren vor allem lysosomalen Proteinen zuordenbar, z.B. charakteristischen Membranproteinen (LAMP-1), sämtlichen Proteasen, Proteinen des Metabolismus von (Glyco-)Lipiden und Glycoproteinen, aber auch Proteinen des Cytosols und des vesikulären Verkehrs. Entscheidend war die Anwesenheit von Proteinen des Endoplasmatischen Reticulums (ER); Calnexin gilt als

ein melanogenes Chaperon, das nicht in Lysosomen vorkommt, dagegen aber in Lysosomen-verwandten Organellen.



Nach Tabelle 4: Proteine der Neuromelanin-Granula.

Das Proteinprofil von Neuromelanin-Granula deutete darauf hin, dass diese Organellen über einen endosomal-lysosomalen Biogeneseweg gebildet werden. Wie das unmittelbare Vorläufer-Kompartiment von Neuromelanin-Granula beschaffen ist, ließ sich daraus jedoch nicht ermitteln.

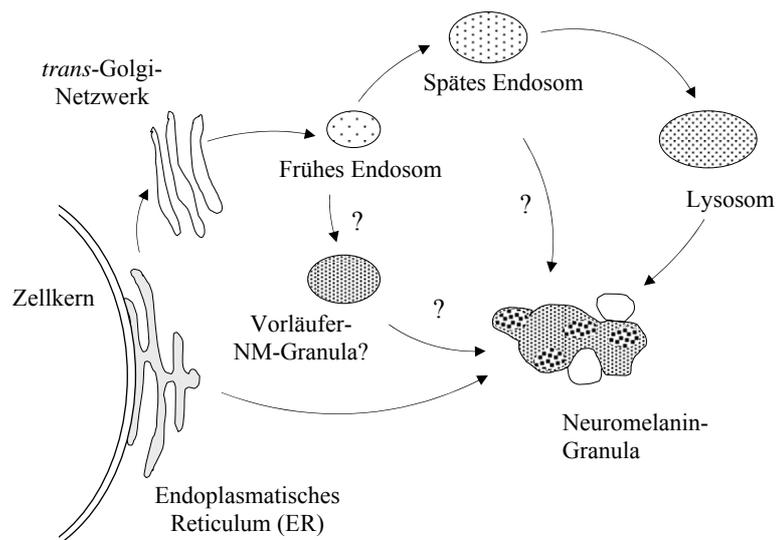


Abbildung 40.1: Modell der Biogenese von Neuromelanin-Granula.

Im Vergleich mit bereits existierenden Proteinprofilen von Lysosomen und Lysosomen-
verwandten Organellen zeigten die in Neuromelanin-Granula identifizierten lysosomalen
Proteine und Proteine des ER, dass diese Organellen der humanen Substantia nigra keine
konventionellen Lysosomen sind, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit der Gruppe der
Lysosomen-verwandten Organellen zuzuordnen sind.

SUMMARY

This work focusses on the formation of the polyphenolic pigment neuromelanin, which accounts for the dark colour of the human substantia pars compacta. A contribution of neuromelanin to the patho-biochemical events in Parkinson's disease is suggested, which is the reason for the clinical interest in this pigment.

The analytical approaches to investigate neuromelanin are limited: on the one hand, an elucidation of the chemical structure is hardly possible to accomplish due to the insolubility of this amorphous polymer, on the other hand, the lack of appropriate biological test systems prevents insight into the biogenesis of neuromelanin.

Currently the formation of neuromelanin is addressed by two competing hypotheses either by autoxidation of dopamine ("autoxidative concept"), or by contribution of an enzyme ("tyrosinase concept"). This work covered both hypothetical approaches, but the concept of an enzymatic biogenesis of neuromelanin is preferred.

Experiments monitoring the polymerisation of dopamine mediated by metals did not reveal an increased formation of dopamine melanin. As an alternative reaction pathway, however, the modification and cross-linking of proteins by dopamine, e.g. BSA, was confirmed.

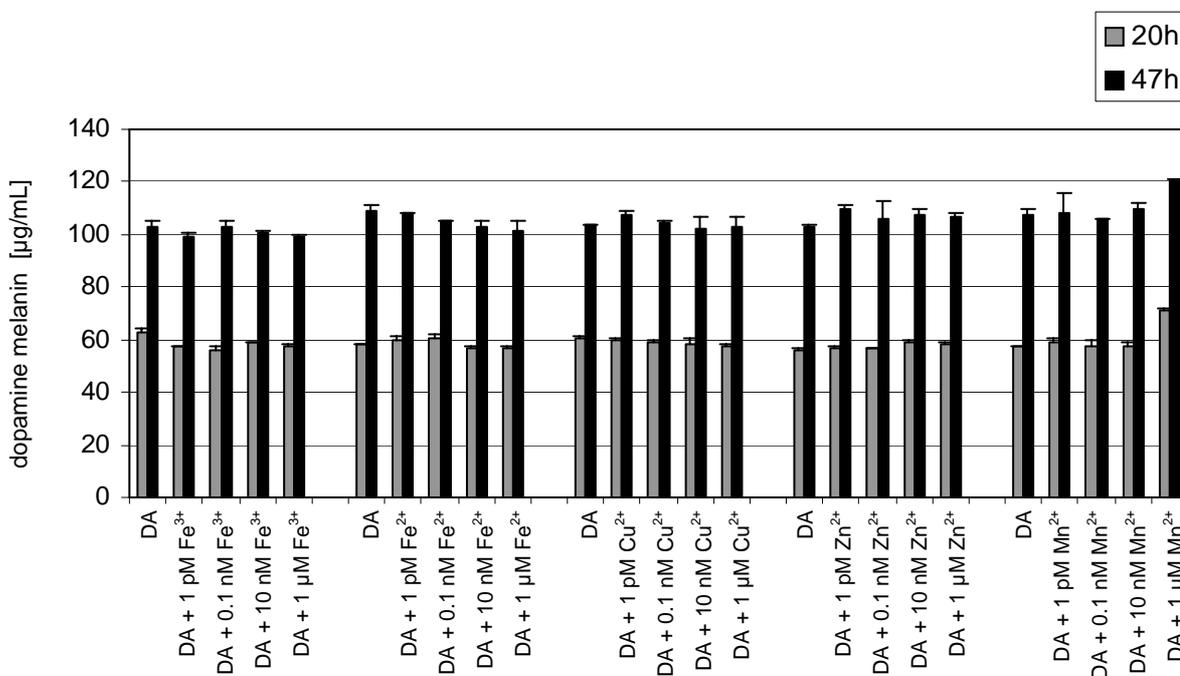


Figure 12.1: Influence of redoxactive metals on the formation of dopamine melanin.

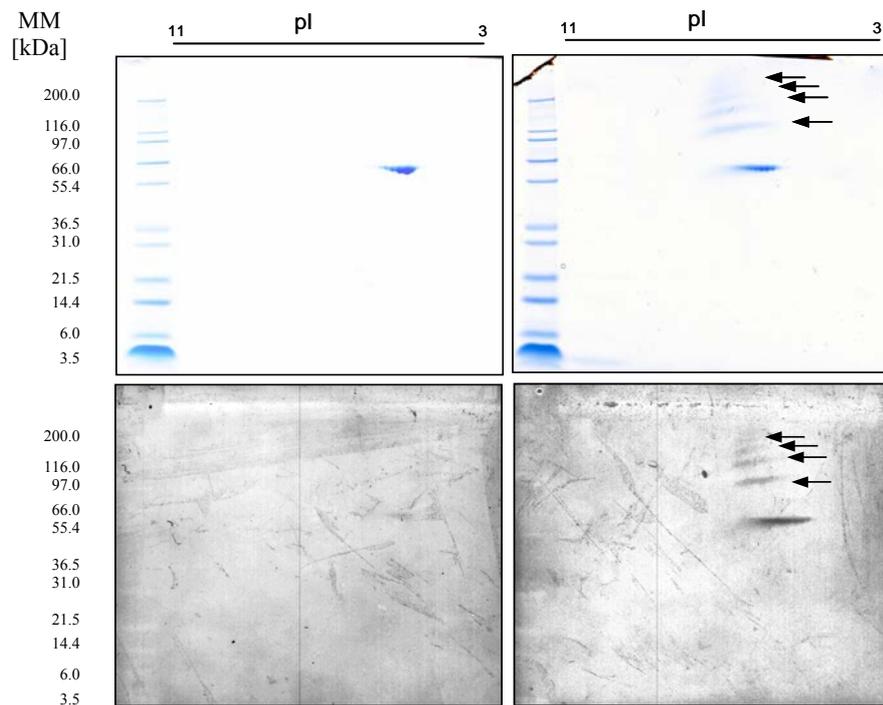


Figure 15.1: *Modification of BSA by dopamine.*

Hypotheses-guided approaches, which investigated the “tyrosinase concept” by immunohistochemistry confirmed the lack of expression of tyrosinase, the key enzyme in the formation cascade leading to oculocutaneous melanin, in the human brainstem.

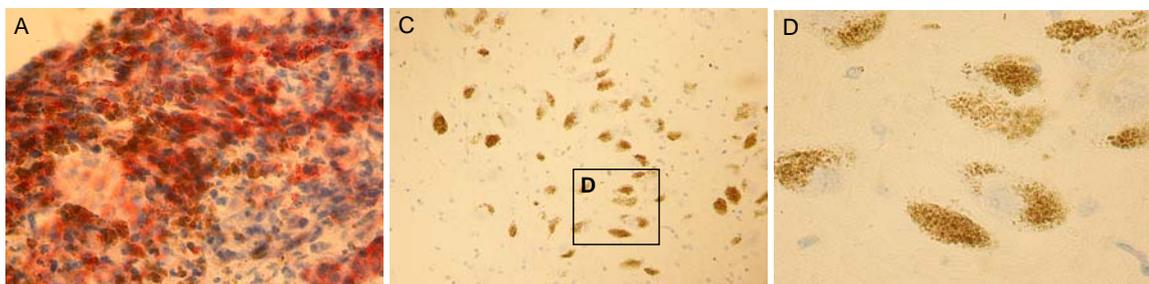


Figure 19.1: *Immunohistochemical staining of a melanoma and the substantia nigra with an antibody against tyrosinase.*

A refinement of the „tyrosinase concept“ was attempted by application of bioinformatics to screen the human genome for tyrosinase-related gene sequences. Thereby, the focus was laid on a supposed pseudogene TYRL (tyrosinas-like). Three expressed sequence

tags (ESTs) of TYRL, however, were identified which point at the possible transcription of this sequence. Nevertheless, a protein derived from TYRL does not account for the pigmentation of the human substantia nigra.

Table 3.1: *Expressed sequences of TYRL.*

TYRL EST's	sequence (GeneBank file acc. #)	tissue, cDNA-bank	identical overlap [bp]	gaps [bp]	score, [E-value]
EST (1)	gi: 7458229 (AW665590.1)	fetal lung, testis, lymph nodes (B cells), pooled	exon 4: 54/57 (94 %)	0	91.7 bits (46), [9 ⁻¹⁵]
		<i>Homo sapiens, Soares_NFL_T_GBC_S1</i>	exon 5: 532/532 (100 %)	0	1055 bits (532), [0.0]
EST (2)	gi: 3797932 (AI218117.1)	fetal lung, testis, lymph nodes (B cells), pooled	exon 4: 145/149 (97 %)	4/149 (2 %)	232 bits (117), [4 ⁻⁵⁷]
		<i>Homo sapiens, Soares_NFL_T_GBC_S1</i>	exon 5: 392/392 (100 %)	0	777 bits (392), [0.0]
EST (3)	gi: 3770763 (AI208821.1)	testis <i>Homo sapiens, Soares_testis_NHT</i>	exon 4: 473/487 (97 %)	6/487 (1 %)	821 bits (414), [0.0]

Aiming at a global analysis of these pigmented organelles, the isolation of neuromelanin granules was introduced for the first time, which formed the basis for an extensive proteomic

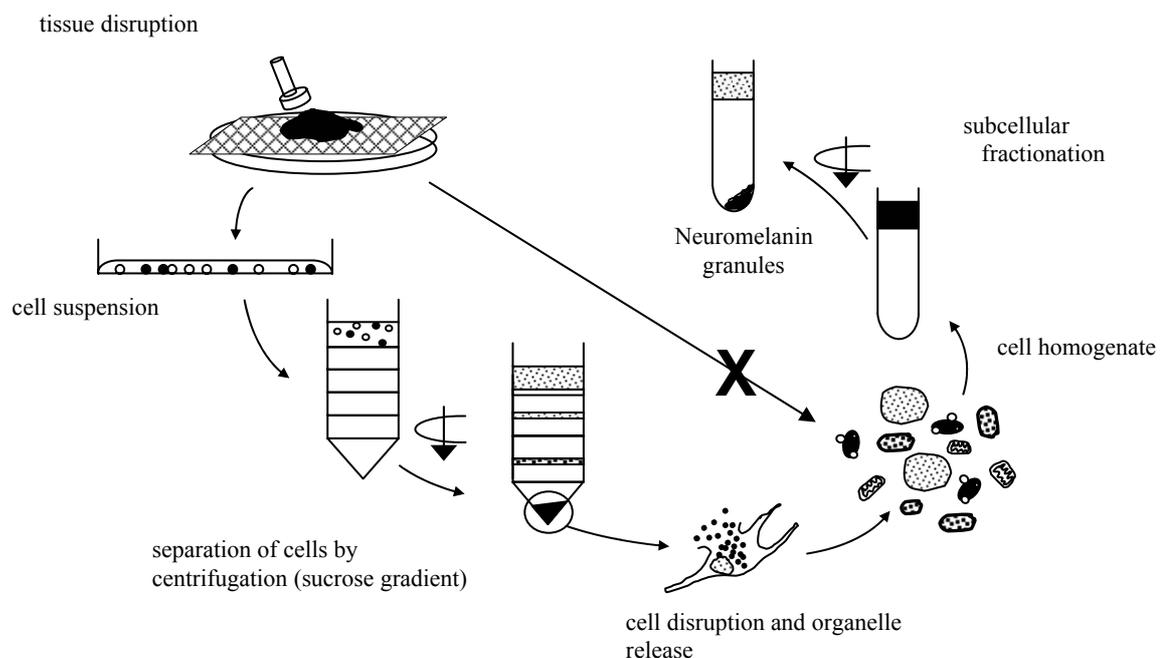
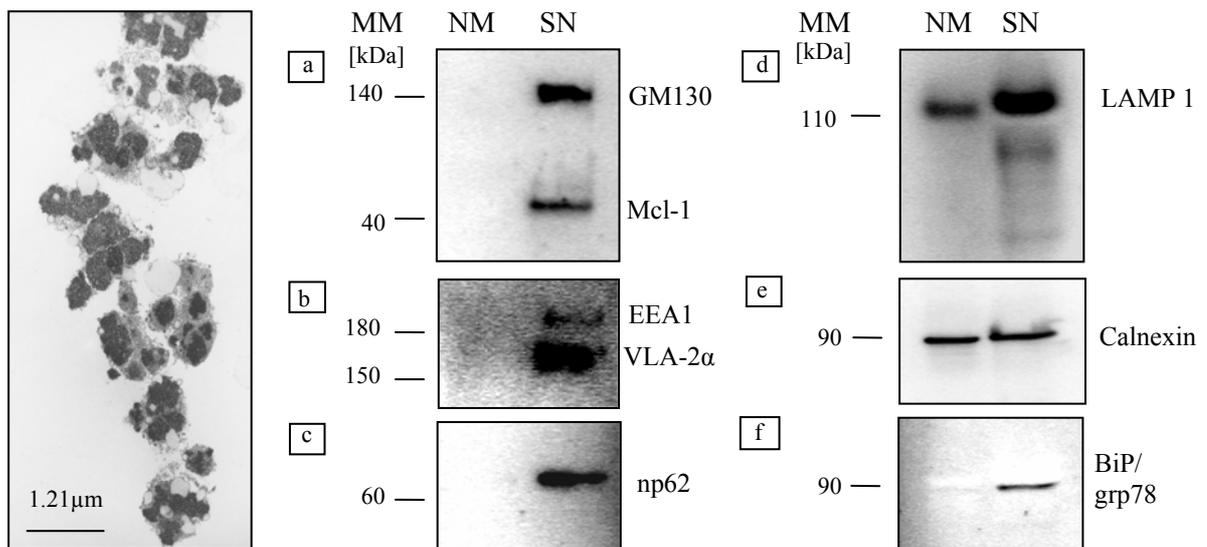


Figure 30.1: *Outline of the isolation of neuromelanin granules from human substantia nigra pars compacta.*

analysis by 1-D SDS-PAGE and ESI tandem mass spectrometry.

The isolation of neuromelanin granules from tissue of human substantia nigra pars compacta was achieved by a approach consisting of two consecutive steps. The enrichment of pigmented neurones preceding the actual isolation of the organelles not only tremendously reduced the sample's complexity but also significantly prevented contamination by neighbouring cell types.

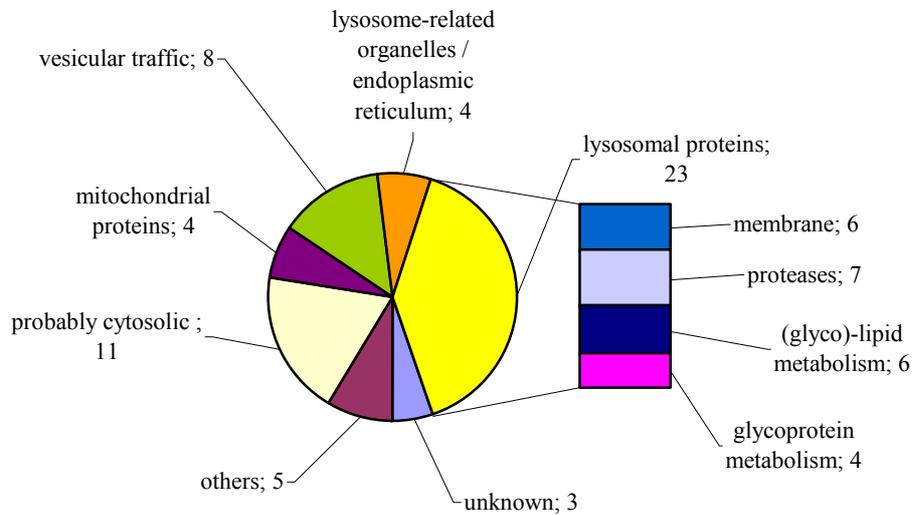
Based on inspection by electron microscopy, at the morphological level the isolated Neuromelanin granules exhibited a high degree of structural integrity, which was characterised by the preservation of the electron-dense neuromelanin and the associated lipidic bulbs. At the molecular level, Western immunoblot analyses mirrored the high purity of the isolates, which was demonstrated by the absence of organelle marker proteins of several cellular structures, such as the nucleus, mitochondria, the Golgi network, early endosomes, the cell membrane and the endoplasmic reticulum.



Figures 32.1, 33.1 und 36.1: *Morphologische und molekulare validation of the isolates.*

Subsequently, the analyses by mass spectrometry facilitated the identification of 73 proteins, most of which were attributable to lysosomal proteins, e.g. characteristical membrane proteins (LAMP-1), various proteases, proteins engaged in the metabolism of (glycol)-lipids and glycoproteins, but also cytosolic proteins and proteins involved in vesicular traffic. Intriguingly, there were proteins identified which originate from the

endoplasmic reticulum (ER), most notably calnexin, a melanogenic chaperone, which is not found in lysosomes but in lysosome-related organelles.



According to table 4: *Proteins of the neuromelanin granules.*

This first protein profile of neuromelanin granules pointed at a biogenic pathway of these organelles via the endosome-lysosomal pathway, however, the composition of the ultimate precursor compartment of neuromelanin granules remains elusive.

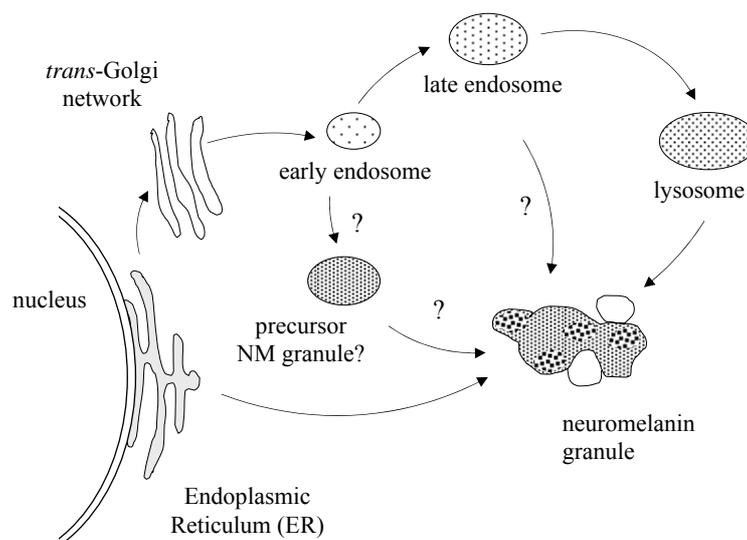


Figure 40.1: *Schematic model of a proposed biogenic pathway of neuromelanin granules.*

By comparison of yet existing protein profiles of lysosomes and lysosome-related organelles it became clear that neuromelanin granules from the human substantia nigra are no conventional lysosomes, but should rather be attributed to the group of lysosome-related organelles.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aebersold R, Goodlett DR. 2001. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* **101**:269-295.
- Ahlskog JE. 2005. Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. *Mov Disord* **20**:271-282.
- Aime S, Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L, Valente G. 1994. Evidence for a glycidic-lipidic matrix in human neuromelanin, potentially responsible for the enhanced iron sequestering ability of substantia nigra. *J Neurochem* **62**:369-371.
- Aime S, Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L, Quattrocchio G. 1996. Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization and iron content determination of human mesencephalic neuromelanin. *Adv Neurol* **69**:263-270.
- Aime S, Bergamasco B, Casu M, Digilio G, Fasano M, Giraudo S, Lopiano L. 2000. Isolation and ¹³C-NMR characterization of an insoluble proteinaceous fraction from substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* **15**:977-981.
- Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, Mortensen OH, Fukada T, Del Vecchio R, Tonks NK, Moller NP. 2004. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *Faseb J* **18**:8-30.
- Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW. 2004. A proteomics analysis of lysosomal integral-membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Mol Cell Proteomics*.
- Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW. 2005. A Proteomic Analysis of Lysosomal Integral Membrane Proteins Reveals the Diverse Composition of the Organelle. *Mol Cell Proteomics* **4**:133-143.
- Barden H. 1969. The histochemical relationship of neuromelanin and lipofuscin. *J Neuropathol Exp Neurol* **28**:419-441.
- Barton DE, Kwon BS, Francke U. 1988. Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14---q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics* **3**:17-24.
- Basrur V, Yang F, Kushimoto T, Higashimoto Y, Yasumoto K, Valencia J, Muller J, Vieira WD, Watabe H, Shabanowitz J, Hearing VJ, Hunt DF, Appella E. 2003. Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res* **2**:69-79.
- Bell AW, Ward MA, Blackstock WP, Freeman HN, Choudhary JS, Lewis AP, Chotai D, Fazel A, Gushue JN, Paiement J, Palcy S, Chevet E, Lafreniere-Roula M, Solari R, Thomas DY, Rowley A, Bergeron JJ. 2001. Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins. *J Biol Chem* **276**:5152-5165.
- Bennett DC, Lamoreux ML. 2003. The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* **16**:333-344.
- Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB. 1991. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* **57**:1609-1614.

- Berg D, Riederer P. 2004. Die Parkinson-Krankheit. In: D Ganten, K Ruckpaul (Hrsg.) gemeinsam mit A Ruiz-Torres. Molekularmedizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p 200-227.
- Berg D, Gerlach M, Youdim MB, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G. 2001. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* **79**:225-236.
- Berman SB, Zigmond MJ, Hastings TG. 1996. Modification of dopamine transporter function: effect of reactive oxygen species and dopamine. *J Neurochem* **67**:593-600.
- Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* **20**:415-455.
- Berson JF, Theos AC, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS. 2003. Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J Cell Biol* **161**:521-533.
- Biemann K. 1990. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol* **193**:886-887.
- Bogerts B. 1981. A brainstem atlas of catecholaminergic neurons in man, using melanin as a natural marker. *J Comp Neurol* **197**:63-80.
- Boldt P, Hermstedt E. 1967. Pyrrotricholes, a group of colored compounds from red human hair. *Z Naturforsch B* **22**:718-722.
- Bolzoni F, Giraud S, Lopiano L, Bergamasco B, Fasano M, Crippa PR. 2002. Magnetic investigations of human mesencephalic neuromelanin. *Biochim Biophys Acta* **1586**:210-218.
- Bonifacino JS, Traub LM. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**:395-447.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **24**:197-211.
- Bridelli MG. 1998. Self-assembly of melanin studied by laser light scattering. *Biophys Chem* **74**:227-239.
- Bringmann G, Feineis D, God R, Peters K, Peters EM, Scholz J, Riederer F, Moser A. 2002. 1-Trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline (TaClo) and related derivatives: chemistry and biochemical effects on catecholamine biosynthesis. *Bioorg Med Chem* **10**:2207-2214.
- Butor C, Higa HH, Varki A. 1993. Structural, immunological, and biosynthetic studies of a sialic acid-specific O-acetyltransferase from rat liver. *J Biol Chem* **268**:10207-10213.
- Carstam R, Brinck C, Hindemith-Augustsson A, Rorsman H, Rosengren E. 1991. The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochim Biophys Acta* **1097**:152-160.
- Charcot JM. 1869. De la paralysie agitante (leçon 5). *oeuvres complètes* **1**:161-188. Bureaux du progrès médical.
- Check E. 2002. Parkinson's patients show positive response to implants. *Nature* **416**:666.

- Cheng J, Moss SC, Eisner M. 1994a. X-ray characterization of melanins--II. *Pigment Cell Res* **7**:263-273.
- Cheng J, Moss SC, Eisner M, Zschack P. 1994b. X-ray characterization of melanins--I. *Pigment Cell Res* **7**:255-262.
- Chevallet M, Santoni V, Poinas A, Rouquie D, Fuchs A, Kieffer S, Rossignol M, Lunardi J, Garin J, Rabilloud T. 1998. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:1901-1909.
- Clancy CM, Simon JD. 2001. Ultrastructural organization of eumelanin from *Sepia officinalis* measured by atomic force microscopy. *Biochemistry* **40**:13353-13360.
- Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ. 1990. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* **27**:595-611.
- Connor JR, Snyder BS, Arosio P, Loeffler DA, LeWitt P. 1995. A quantitative analysis of isoferritins in select regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains. *J Neurochem* **65**:717-724.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT, Jr., 2001. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* **294**:1346-1349.
- Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ, Pavel S, Ramsden CA, Riley PA, Smit NP. 1997. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J Biol Chem* **272**:26226-26235.
- Curtis AR, Fey C, Morris CM, Bindoff LA, Ince PG, Chinnery PF, Coulthard A, Jackson MJ, Jackson AP, McHale DP, Hay D, Barker WA, Markham AF, Bates D, Curtis A, Burn J. 2001. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet* **28**:350-354.
- Dakour J, Vinayagamorthy T, Jimbow K, Chen H, Luo D, Dixon W, Munoz V. 1993. Identification of a cDNA coding for a Ca(2+)-binding phosphoprotein (p90), calnexin, on melanosomes in normal and malignant human melanocytes. *Exp Cell Res* **209**:288-300.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. 1999. The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain* **122** (Pt 8):1421-1436.
- Danon D, Goldstein L, Marikovsky Y, Skutelsky E. 1972. Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. *J Ultrastruct Res* **38**:500-510.
- de Duve C. 1983. Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* **137**:391-397.
- Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H. 2002. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* **61**:413-426.
- Dell'Angelica EC. 2003. Melanosome biogenesis: shedding light on the origin of an obscure organelle. *Trends Cell Biol* **13**:503-506.
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. 2000. Lysosome-related organelles. *Faseb J* **14**:1265-1278.

- Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. 1999. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell* **3**:11-21.
- Deplazes J, Schobel K, Hochstrasser H, Bauer P, Walter U, Behnke S, Spiegel J, Becker G, Riess O, Berg D. 2004. Screening for mutations of the IRP2 gene in Parkinson's disease patients with hyperechogenicity of the substantia nigra. *J Neural Transm* **111**:515-521.
- Dexter DT, Wells FR, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. 1987. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet* **2**:1219-1220.
- Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* **114** (Pt 4):1953-1975.
- Diment S, Eidelman M, Rodriguez GM, Orlow SJ. 1995. Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. *J Biol Chem* **270**:4213-4215.
- Double, Ben-Shachar D, Youdim M, Zecca L, Riederer P, Gerlach M. 2002. Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol* **24**:621.
- Double, Zecca L, Costi P, Mauer M, Griesinger C, Ito S, Ben-Shachar D, Bringmann G, Fariello RG, Riederer P, Gerlach M. 2000. Structural characteristics of human substantia nigra neuromelanin and synthetic dopamine melanins. *J Neurochem* **75**:2583-2589.
- Dreger M. 2003. Subcellular proteomics. *Mass Spectrom Rev* **22**:27-56.
- Duffy PE, Tennyson VM. 1965. Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus caeruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **24**:398-414.
- Dunn WA, Jr., 1990a. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**:1923-1933.
- Dunn WA, Jr., 1990b. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* **110**:1935-1945.
- Dzierzega-Leczna A, Kurkiewicz S, Stepień K, Chodurek E, Wilczok T, Arzberger T, Riederer P, Gerlach M. 2004. GC/MS analysis of thermally degraded neuromelanin from the human substantia nigra. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**:920-926.
- Earle KM. 1968. Trace metals in parkinsonian brains. *J Neuropathol Exp Neurol* **27**:1-14.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. 1960. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* **38**:1236-1239.
- Eng JK, McCormack AL, Yates 3rd JR. 1994. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* **5**:976-989.
- Enochs WS, Nilges MJ, Swartz HM. 1993a. Purified human neuromelanin, synthetic dopamine melanin as a potential model pigment, and the normal human

- substantia nigra: characterization by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Neurochem* **61**:68-79.
- Enochs WS, Nilges MJ, Swartz HM. 1993b. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment Cell Res* **6**:91-99.
- Enochs WS, Sarna T, Zecca L, Riley PA, Swartz HM. 1994. The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **7**:83-100.
- Fahn S, Cohen G. 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* **32**:804-812.
- Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hunot S, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. 2002. Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* **83**:320-330.
- Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. 2005a. Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **75**:109-124.
- Fedorow H, Pickford R, Hook JM, Double KL, Halliday GM, Gerlach M, Riederer P, Garner B. 2005b. Dolichol is the major lipid component of human substantia nigra neuromelanin. *J Neurochem* **92**:990-995.
- Felletschin B, Bauer P, Walter U, Behnke S, Spiegel J, Csoti I, Sommer U, Zeiler B, Becker G, Riess O, Berg D. 2003. Screening for mutations of the ferritin light and heavy genes in Parkinson's disease patients with hyperechogenicity of the substantia nigra. *Neurosci Lett* **352**:53-56.
- Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C, Seglen PO. 2000a. Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol* **79**:871-882.
- Fengsrud M, Raiborg C, Berg TO, Stromhaug PE, Ueno T, Erichsen ES, Seglen PO. 2000b. Autophagosome-associated variant isoforms of cytosolic enzymes. *Biochem J* **352 Pt 3**:773-781.
- Fenichel GM, Bazelon M. 1968. Studies on neuromelanin. II. Melanin in the brainstems of infants and children. *Neurology* **18**:817-820.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**:64-71.
- Foley JM, Baxter D. 1958. On the nature of pigment granules in the cells of the locus coeruleus and substantia nigra. *J Neuropathol Exp Neurol* **17**:586-598.
- Foppoli C, Coccia R, Cini C, Rosei MA. 1997. Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1334**:200-206.
- Fornstedt B, Carlsson A. 1989. A marked rise in 5-S-cysteinyl-dopamine levels in guinea-pig striatum following reserpine treatment. *J Neural Transm* **76**:155-161.
- Fornstedt B, Rosengren E, Carlsson A. 1986. Occurrence and distribution of 5-S-cysteinyl derivatives of dopamine, dopa and dopac in the brains of eight mammalian species. *Neuropharmacology* **25**:451-454.

- Friedman A, Bauminger ER, Galazka-Friedman J, Barcikowska M, Hechel D, Nowik I, Marczevska M. 1996. Is iron involved in pathogenesis of Parkinson's disease-- Mossbauer spectroscopy study of substantia nigra in control and disease brains. *Neurol Neurochir Pol* **30 Suppl 2**:95-103.
- Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJ, Desjardins M. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**:119-131.
- Galazka-Friedman J, Bauminger ER, Friedman A, Barcikowska M, Hechel D, Nowik I. 1996. Iron in parkinsonian and control substantia nigra--a Mossbauer spectroscopy study. *Mov Disord* **11**:8-16.
- Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D. 2000. Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther* **85**:207-215.
- Gallas JM, Zajac GW, Sarna T, Stotter PL. 2000. Structural differences in unbleached and mildly-bleached synthetic tyrosine-derived melanins identified by scanning probe microscopies. *Pigment Cell Res* **13**:99-108.
- Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**:165-180.
- Gasser T. 2001. Molecular genetics of Parkinson's disease. *Adv Neurol* **86**:23-32.
- Gerlach M, Riederer P, Youdim MB. 1996. Molecular mechanisms for neurodegeneration. Synergism between reactive oxygen species, calcium, and excitotoxic amino acids. *Adv Neurol* **69**:177-194.
- Gerlach M, Trautwein AX, Zecca L, Youdim MB, Riederer P. 1995. Mossbauer spectroscopic studies of purified human neuromelanin isolated from the substantia nigra. *J Neurochem* **65**:923-926.
- Giebel LB, Strunk KM, Spritz RA. 1991a. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics* **9**:435-445.
- Giebel LB, Tripathi RK, Strunk KM, Hanifin JM, Jackson CE, King RA, Spritz RA. 1991b. Tyrosinase gene mutations associated with type IB ("yellow") oculocutaneous albinism. *Am J Hum Genet* **48**:1159-1167.
- Good PF, Olanow CW, Perl DP. 1992. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res* **593**:343-346.
- Graham DG. 1979. On the origin and significance of neuromelanin. *Arch Pathol Lab Med* **103**:359-362.
- Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Jr., Gutknecht WF. 1978. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol* **14**:644-653.
- Grünblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amariglio N, Rechavi G, Li J, Ravid R, Roggendorf W, Riederer P, Youdim MB. 2004. 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* **111**:1543-1573.
- Gurevich T, Korczyn AD. 2005. Autonomic disturbances in Parkinson's disease. In: Gálvez-Jiménez N, editor. Scientific basis of the treatment of Parkinson's disease. London, New York: Taylor & Francis. p 333-347.
- Haavik J. 1997. L-DOPA is a substrate for tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* **69**:1720-1728.
- Hagell P, Brundin P. 2001. Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**:741-752.
- Han DK, Eng J, Zhou H, Aebersold R. 2001. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **19**:946-951.
- Hasegawa T, Matsuzaki M, Takeda A, Kikuchi A, Furukawa K, Shibahara S, Itoyama Y. 2003. Increased dopamine and its metabolites in SH-SY5Y neuroblastoma cells that express tyrosinase. *J Neurochem* **87**:470-475.
- Hassler R. 1938. Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol* **48**:387-476.
- Hastings TG. 1995. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem* **64**:919-924.
- Hearing VJ. 2005. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci* **37**:3-14.
- Hirosawa K. 1968. Electron microscopic studies on pigment granules in the substantia nigra and locus coeruleus of the Japanese monkey (*Macaca fuscata yakui*). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **88**:187-203.
- Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A. 2003. An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* **423**:91-96.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **334**:345-348.
- Hoehn MM, Yahr MD. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* **17**:427-442.
- Honing S, Sandoval IV, von Figura K. 1998. A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *Embo J* **17**:1304-1314.
- Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G. 2004. Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev* **46**:44-70.
- Huber LA, Pfaller K, Vietor I. 2003. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res* **92**:962-968.
- Hunter E. 1993. Practical Electron Microscopy - A Beginner's Illustrated Guide, 2nd ed: Cambridge University Press.
- Hunziker W, Geuze HJ. 1996. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* **18**:379-389.

- Ikemoto K, Nagatsu I, Ito S, King RA, Nishimura A, Nagatsu T. 1998. Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neurosci Lett* **253**:198-200.
- Ito S. 1986. Reexamination of the structure of eumelanin. *Biochim Biophys Acta* **883**:155-161.
- Jackson IJ. 1994. Evolution and expression of tyrosinase-related proteins. *Pigment Cell Res* **7**:241-242.
- James N. 1997. Electron Microscopy of Organelles. In: Rickwood D, editor. Subcellular Fractionation: A Practical Approach. IRL Press at Oxford University Press.
- Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. 1990. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **2**:327-340.
- Jellinger K, Kienzl E, Rumpelmair G, Riederer P, Stachelberger H, Ben-Shachar D, Youdim MB. 1992. Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. *J Neurochem* **59**:1168-1171.
- Jellinger KA. 2002. Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*:347-376.
- Jellinger KA. 2003. Rett Syndrome - an update. *J Neural Transm* **110**:681-701.
- Jenner P, Olanow CW. 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* **47**:S161-170.
- Jimbow K, Park JS, Kato F, Hirosaki K, Toyofuku K, Hua C, Yamashita T. 2000. Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res* **13**:222-229.
- Jimbow K, Hara H, Vinayagamoorthy T, Luo D, Dakour J, Yamada K, Dixon W, Chen H. 1994. Molecular control of melanogenesis in malignant melanoma: functional assessment of tyrosinase and lamp gene families by UV exposure and gene co-transfection, and cloning of a cDNA encoding calnexin, a possible melanogenesis "chaperone". *J Dermatol* **21**:894-906.
- Journet A, Chapel A, Kieffer S, Roux F, Garin J. 2002. Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* **2**:1026-1040.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**:2299-2301.
- Kastner A, Hirsch EC, Lejeune O, Javoy-Agid F, Rascol O, Agid Y. 1992. Is the vulnerability of neurons in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease related to their neuromelanin content? *J Neurochem* **59**:1080-1089.
- Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, Shimosawa N, Imanaka T, Taniguchi H. 2004. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyeme of Lon protease. *J Biol Chem* **279**:421-428.
- Kim SI, Voshol H, van Oostrum J, Hastings TG, Cascio M, Glucksman MJ. 2004. Neuroproteomics: expression profiling of the brain's proteomes in health and disease. *Neurochem Res* **29**:1317-1331.

- Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**:231-243.
- Kornfeld S, Mellman I. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* **5**:483-525.
- Kropf AJ, Bunker BA, Eisner M, Moss SC, Zecca L, Stroppolo A, Crippa PR. 1998. X-ray absorption fine-structure spectroscopy studies of Fe sites in natural human neuromelanin and synthetic analogues. *Biophys J* **75**:3135-3142.
- Kuhn DM, Arthur RE, Jr., Thomas DM, Elferink LA. 1999. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* **73**:1309-1317.
- Kushimoto T, Basrur V, Valencia J, Matsunaga J, Vieira WD, Ferrans VJ, Muller J, Appella E, Hearing VJ. 2001. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10698-10703.
- Liang CL, Nelson O, Yazdani U, Pasbakhsh P, German DC. 2004. Inverse relationship between the contents of neuromelanin pigment and the vesicular monoamine transporter-2: human midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol* **473**:97-106.
- Lillie RD. 1957a. Metal reduction reactions of the melanins: histochemical studies. *J Histochem Cytochem* **5**:325-333.
- Lillie RD. 1957b. Ferrous ion uptake; a specific reaction of the melanins. *AMA Arch Pathol* **64**:100-103.
- Linert W, Jameson GN. 2000. Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's Disease. *J Inorg Biochem* **79**:319-326.
- Linscheid M. 1990. Die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie. *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* **41**:125-133.
- Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. 1997. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* **136**:61-70.
- Littrell KC, Gallas JM, Zajac GW, Thiyagarajan P. 2003. Structural studies of bleached melanin by synchrotron small-angle X-ray scattering. *Photochem Photobiol* **77**:115-120.
- Lottspeich F. 1999. Ein Genom - verschiedene Proteome. *Angew. Chem.* **111**:2630-2647. [english version: Lottspeich F. 1999. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* **38**:2476-2492].
- Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. 2000. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* **113** (Pt 9):1515-1524.
- Mann DM, Yates PO. 1974. Lipoprotein pigments--their relationship to ageing in the human nervous system. I. The lipofuscin content of nerve cells. *Brain* **97**:481-488.
- Mann DM, Yates PO. 1983. Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev* **21**:193-203.
- Mann DM, Yates PO, Barton CM. 1977. Neuromelanin and RNA in cells of substantia nigra. *J Neuropathol Exp Neurol* **36**:379-383.

- Mann VM, Cooper JM, Daniel SE, Srai K, Jenner P, Marsden CD, Schapira AH. 1994. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol* **36**:876-881.
- Marsden CD. 1961a. Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals. *J Anat* **95**:256-261.
- Marsden CD. 1961b. Tyrosinase activity in the pigmented cells of the nucleus substantiae nigrae. I. Monophenolase and diphenolase activity. *Q Il microsc Sci* **102**:407-412.
- Marsden CD. 1961c. Tyrosinase activity in the pigmented cells of the nucleus substantiae nigrae. *Q Il microsc Sci* **102**:469-474.
- Marsden CD. 1983. Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **19**:121-141.
- Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. 1998. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev* **17**:1-35.
- Mason HS. 1948. The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J Biol Chem* **172**:83-92.
- Mason HS. 1967. The structure of melanin. In: Hu F, editor. The pigmentary system: advances in biology of skin. Oxford: Pergamon Press. p 293-312.
- Matsunaga J, Sinha D, Pannell L, Santis C, Solano F, Wistow GJ, Hearing VJ. 1999. Enzyme activity of macrophage migration inhibitory factor toward oxidized catecholamines. *J Biol Chem* **274**:3268-3271.
- Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH. 1995. Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease. *J Neurochem* **64**:1645-1654.
- Melchior JB, Ziegler DM. 1956. Fractionation of pituitary homogenates by differential centrifugation. I. Association of hormonal activity with subcellular fractions. *J Biol Chem* **222**:721-730.
- Miranda M, Botti D, Bonfigli A, Ventura T, Arcadi A. 1984. Tyrosinase-like activity in normal human substantia nigra. *Gen Pharmacol* **15**:541-544.
- Mole SE, Mitchison HM, Munroe PB. 1999. Molecular basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: mutations in CLN1, CLN2, CLN3, and CLN5. *Hum Mutat* **14**:199-215.
- Montine TJ, Farris DB, Graham DG. 1995. Covalent crosslinking of neurofilament proteins by oxidized catechols as a potential mechanism of Lewy body formation. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**:311-319.
- Morrison R, Mason K, Frost-Mason S. 1994. A cladistic analysis of the evolutionary relationships of the members of the tyrosinase gene family using sequence data. *Pigment Cell Res* **7**:388-393.
- Moses HL, Ganote CE, Beaver DL, Schuffman SS. 1966. Light and electron microscopic studies of pigment in human and rhesus monkey substantia nigra and locus coeruleus. *Anat Rec* **155**:167-183.
- Mosharov EV, Gong LW, Khanna B, Sulzer D, Lindau M. 2003. Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *J Neurosci* **23**:5835-5845.

- Mullins C, Bonifacino JS. 2001. The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* **23**:333-343.
- Mura CV, Becker MI, Orellana A, Wolff D. 2002. Immunopurification of Golgi vesicles by magnetic sorting. *J Immunol Methods* **260**:263-271.
- Napolitano A, Pezzella A, Vincensi MR, Prota G. 1995. Oxidative degradation of melanins to pyrrole acids: A model study. *Tetrahedron* **51**:5931-5920.
- Napolitano A, Pezzella A, d'Ischia M, Prota G. 1996a. New pyrrole acids by oxidative degradation of eumelanins with hydrogen peroxide. Further hints to the mechanism of pigment breakdown. *Tetrahedron* **52**:8775-8780.
- Napolitano A, Memoli S, Crescenzi O, Prota G. 1996b. Oxidative Polymerization of the Pheomelanin Precursor 5-Hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine: A New Hint to the Pigment Structure. *J Org Chem* **61**:598-604.
- Napolitano A, Vincensi MR, Di Donato P, Monfrecola G, Prota G. 2000. Microanalysis of melanins in mammalian hair by alkaline hydrogen peroxide degradation: identification of a new structural marker of pheomelanins. *J Invest Dermatol* **114**:1141-1147.
- Neefjes J. 1999. CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur J Immunol* **29**:1421-1425.
- Nicolaus RA, Piatelli M. 1962. Structure of melanins and melanogenesis. *J Pol Sci* **58**:1133.
- Nicoziani P, Vilhardt F, Llorente A, Hilout L, Courtoy PJ, Sandvig K, van Deurs B. 2000. Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Mol Biol Cell* **11**:481-495.
- Novellino L, Napolitano A, Prota G. 2000. Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides. *Biochim Biophys Acta* **1475**:295-306.
- Obermuller S, Kiecke C, von Figura K, Honing S. 2002. The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. *J Cell Sci* **115**:185-194.
- Odh G, Carstam R, Paulson J, Wittbjør A, Rosengren E, Rorsman H. 1994. Neuromelanin of the human substantia nigra: a mixed-type melanin. *J Neurochem* **62**:2030-2036.
- Oestreicher E, Sengstock GJ, Riederer P, Olanow CW, Dunn AJ, Arendash GW. 1994. Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study. *Brain Res* **660**:8-18.
- Oetting WS, King RA. 1999. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat* **13**:99-115.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**:4007-4021.
- Okun MR, Donnellan B, Lever WF, Edelstein LM, Or N. 1971. Peroxidase-dependent oxidation of tyrosine or dopa to melanin in neurons. *Histochemie* **25**:289-296.
- Orlow SJ. 1995. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* **105**:3-7.
- Pai HV, Kommaddi RP, Chinta SJ, Mori T, Boyd MR, Ravindranath V. 2004. A frameshift mutation and alternate splicing in human brain generate a functional

- form of the pseudogene cytochrome P4502D7 that demethylates codeine to morphine. *J Biol Chem* **279**:27383-27389.
- Patel RP, Okun MR, Edelstein LM, Epstein D. 1971. Biochemical studies of the peroxidase-mediated oxidation of tyrosine to melanin: demonstration of the hydroxylation of tyrosine by plant and human peroxidases. *Biochem J* **124**:439-441.
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk KJ. 2002. Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* **14**:211-236.
- Pezzella A, Napolitano A, d'Ischia M, Prota G, Seraglia R, Traldi P. 1997. Identification of partly degraded oligomers of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid in *Sepia* melanin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**:368-372.
- Pflieger D, Le Caer JP, Lemaire C, Bernard BA, Dujardin G, Rossier J. 2002. Systematic identification of mitochondrial proteins by LC-MS/MS. *Anal Chem* **74**:2400-2406.
- Piatelli M, Fattorusso E, Magno S, Nicolaus RA. 1962. The structure of melanins and melanogenesis. Nota II. Sepiomelanin and synthetic pigments. *Tetrahedron* **18**:941-949.
- Prota G. 1992. Melanins and Melanogenesis. San Diego, CA: Academic Press Inc.
- Prota G. 2000. Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Res* **13**:283-293.
- Prota G, Nicolaus RA. 1967. In: Hu F, editor. *Advances in Biology of Skin. The Pigmentary System*, vol. VIII. New York: Pergamon Press. p 323-328.
- Przuntek H, Muller T, Riederer P. 2004. Diagnostic staging of Parkinson's disease: conceptual aspects. *J Neural Transm* **111**:201-216.
- Rabey JM, Hefti F. 1990. Neuromelanin synthesis in rat and human substantia nigra. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **2**:1-14.
- Radisky DC, Kaplan J. 1998. Iron in cytosolic ferritin can be recycled through lysosomal degradation in human fibroblasts. *Biochem J* **336** (Pt 1):201-205.
- Raper HS. 1927. The tyrosinase-tyrosine reaction. VI. Production from tyrosine of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid the precursor of melanin. *Biochem J* **21**:89-96.
- Raper HS. 1928. The aerobic oxidases. *Physiol Rev* **8**:245-282.
- Richter GW. 1978. The iron-loaded cell--the cytopathology of iron storage. A review. *Am J Pathol* **91**:362-404.
- Richter GW. 1984. Studies of iron overload. Rat liver siderosome ferritin. *Lab Invest* **50**:26-35.
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Kruzik P, Youdim MBH. 1985. Dopaminforschung heute und morgen - L-Dopa in der Zukunft. In: Umek H, editor. *L-Dopa-Substitution der Parkinson-Krankheit: Geschichte - Gegenwart - Zukunft*. Wien, New York: Springer. p 127-144.

- Riederer P, Dirr A, Goetz M, Sofic E, Jellinger K, Youdim MB. 1992. Distribution of iron in different brain regions and subcellular compartments in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **32 Suppl**:S101-104.
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB. 1989. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* **52**:515-520.
- Rifkind RA, Hsu KC, Morgan C, Seegal BC, Knox AW, Rose HM. 1960. Use of ferritin-conjugated antibody to localize antigen by electron microscopy. *Nature* **187**:1094-1095.
- Rodgers AD, Curzon G. 1975. Melanin formation by human brain in vitro. *J Neurochem* **24**:1123-1129.
- Roepstorff P, Fohlman J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* **11**:601.
- Rosengren E, Aman P, Thelin S, Hansson C, Ahlfors S, Bjork P, Jacobsson L, Rorsman H. 1997. The macrophage migration inhibitory factor MIF is a phenylpyruvate tautomerase. *FEBS Lett* **417**:85-88.
- Salopek TG, Jimbow K. 1996. Induction of melanogenesis during the various melanoma growth phases and the role of tyrosinase, lysosome-associated membrane proteins, and p90 calnexin in the melanogenesis cascade. *J Invest Dermatol Symp Proc* **1**:195-202.
- Sandhoff K, Kolter T, Van Echten-Deckert G. 1998. Sphingolipid metabolism. Sphingoid analogs, sphingolipid activator proteins, and the pathology of the cell. *Ann N Y Acad Sci* **845**:139-151.
- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. 2000. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21**:1054-1070.
- Sarna T, Swartz HM. 1978. Identification and characterization of melanin in tissues and body fluids. *Folia Histochem Cytochem (Krakow)* **16**:275-286.
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-379.
- Schwyn RC, King JS, Fox CA. 1970. Pigments in the red nucleus and substantia nigra in man and in representative old and new world monkeys. *Bol Estud Med Biol* **26**:139-160.
- Segura-Aguilar J. 1996. Peroxidase activity of liver microsomal vitamin D 25-hydroxylase and cytochrome P450 1A2 catalyzes 25-hydroxylation of vitamin D3 and oxidation of dopamine to aminochrome. *Biochem Mol Med* **58**:122-129.
- Seiji M, Fitzpatrick TB, Birbeck MS. 1961. The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Dermatol* **36**:243-252.
- Seiji M, Shima K, Birbeck MS, Fitzpatrick TB. 1963. Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* **100**:497-533.
- Shibuya N, Goldstein IJ, Van Damme EJ, Peumans WJ. 1988. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem* **263**:728-734.

- Sih CJ, Takeguchi C, Foss P. 1970. Mechanism of prostaglandin biosynthesis. 3. Catecholamines and serotonin as coenzymes. *J Am Chem Soc* **92**:6670.
- Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB. 1991. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem* **56**:978-982.
- Spencer JP, Jenner P, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. 1998. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem* **71**:2112-2122.
- Sturm RA, O'Sullivan BJ, Box NF, Smith AG, Smit SE, Puttick ER, Parsons PG, Dunn IS. 1995. Chromosomal structure of the human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family. *Genomics* **29**:24-34.
- Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Krantz D, Edwards RH, Greene LA, Zecca L. 2000. Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11869-11874.
- Swan GA. 1974. Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. *Fortschr Chem Org Naturst* **31**:521-582.
- Takeda A, Matsunaga J, Tomita Y, Tagami H, Shibahara S. 1991. Nucleotide sequence of the putative human tyrosinase pseudogene. *Tohoku J Exp Med* **163**:295-297.
- Takematsu H, Diaz S, Stoddart A, Zhang Y, Varki A. 1999. Lysosomal and cytosolic sialic acid 9-O-acetylerase activities can be encoded by one gene via differential usage of a signal peptide-encoding exon at the N terminus. *J Biol Chem* **274**:25623-25631.
- Takimoto H, Suzuki S, Masui S, Shibata K, Tomita Y, Shibahara S, Nakano H. 1995. MAT-1, a monoclonal antibody that specifically recognizes human tyrosinase. *J Invest Dermatol* **105**:764-768.
- Taylor SW, Fahy E, Ghosh SS. 2003. Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol* **21**:82-88.
- Tief K, Schmidt A, Beermann F. 1998. New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain. *Brain Res Mol Brain Res* **53**:307-310.
- Tief K, Hahne M, Schmidt A, Beermann F. 1996. Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain. *Eur J Biochem* **241**:12-16.
- Tomita Y, Takeda A, Okinaga S, Tagami H, Shibahara S. 1989. Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem Biophys Res Commun* **164**:990-996.
- Toyofuku K, Wada I, Hirotsuki K, Park JS, Hori Y, Jimbow K. 1999. Promotion of tyrosinase folding in COS 7 cells by calnexin. *J Biochem (Tokyo)* **125**:82-89.
- Tripathi RK, Strunk KM, Giebel LB, Weleber RG, Spritz RA. 1992. Tyrosinase gene mutations in type I (tyrosinase-deficient) oculocutaneous albinism define two clusters of missense substitutions. *Am J Med Genet* **43**:865-871.
- Usunoff KG, Itzev DE, Ovtcharoff WA, Marani E. 2002. Neuromelanin in the human brain: a review and atlas of pigmented cells in the substantia nigra. *Arch Physiol Biochem* **110**:257-369.

- Vander Wende C, Spoerlein MT. 1963. Oxidation of dopamine to melanin by an enzyme of rat brain. *Life Sci* **6**:386-392.
- Vellodi A. 2005. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* **128**:413-431.
- Waheed A, Gottschalk S, Hille A, Krentler C, Pohlmann R, Braulke T, Hauser H, Geuze H, von Figura K. 1988. Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. *Embo J* **7**:2351-2358.
- Wakamatsu K, Ito S, Nagatsu T. 1991. Cysteinyl dopamine is not incorporated into neuromelanin. *Neurosci Lett* **131**:57-60.
- Weber G, Bocek P. 1998. Recent developments in preparative free flow isoelectric focusing. *Electrophoresis* **19**:1649-1653.
- Whitehead RE, Ferrer JV, Javitch JA, Justice JB. 2001. Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J Neurochem* **76**:1242-1251.
- Whittaker VP. 1965. The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain function. *Prog Biophys Mol Biol* **15**:39-96.
- Xu Y, Stokes AH, Freeman WM, Kumer SC, Vogt BA, Vrana KE. 1997. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Brain Res Mol Brain Res* **45**:159-162.
- Yano Y, Saito R, Yoshida N, Yoshiki A, Wynshaw-Boris A, Tomita M, Hirotsune S. 2004. A new role for expressed pseudogenes as ncRNA: regulation of mRNA stability of its homologous coding gene. *J Mol Med* **82**:414-422.
- Yao R, Schneider E, Ryan TJ, Galivan J. 1996. Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10134-10138.
- Yasumoto K, Watabe H, Valencia JC, Kushimoto T, Kobayashi T, Appella E, Hearing VJ. 2004. Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment. *J Biol Chem* **279**:28330-28338.
- Yates JR, 3rd, Eng JK, McCormack AL, Schieltz D. 1995. Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal Chem* **67**:1426-1436.
- Youdim MB, Riederer P. 1997. Understanding Parkinson's disease. *Sci Am* **276**:38-45.
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. 1989. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurol Scand Suppl* **126**:47-54.
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. 1994. The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra. *J Neural Transm Suppl* **43**:113-122.
- Zajac GW, Gallas JM, Cheng J, Eisner M, Moss SC, Alvarado-Swaisgood AE. 1994. The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results. *Biochim Biophys Acta* **1199**:271-278.
- Zecca L, Swartz HM. 1993. Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **5**:203-213.

- Zecca L, Mecacci C, Seraglia R, Parati E. 1992. The chemical characterization of melanin contained in substantia nigra of human brain. *Biochim Biophys Acta* **1138**:6-10.
- Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D. 2003. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* **26**:578-580.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. 2004a. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* **5**:863-873.
- Zecca L, Costi P, Mecacci C, Ito S, Terreni M, Sonnino S. 2000. Interaction of human substantia nigra neuromelanin with lipids and peptides. *J Neurochem* **74**:1758-1765.
- Zecca L, Tampellini D, Gerlach M, Riederer P, Fariello RG, Sulzer D. 2001a. Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol Pathol* **54**:414-418.
- Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, Tampellini D. 2002. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett* **510**:216-220.
- Zecca L, Gallorini M, Schunemann V, Trautwein AX, Gerlach M, Riederer P, Vezzoni P, Tampellini D. 2001b. Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem* **76**:1766-1773.
- Zecca L, Stroppolo A, Gatti A, Tampellini D, Toscani M, Gallorini M, Giaveri G, Arosio P, Santambrogio P, Fariello RG, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Hornykiewicz O, Zucca FA. 2004b. The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9843-9848.
- Zeise L. 1995. Analytical methods for characterization and identification of eumelanins. *In Melanin: Its Role in Human Photoprotection.*: Valdenmar Publishing Co., Overland Park, KS.
- Zeise L, Murr BL, Chedekel MR. 1992a. Melanin standard method: particle description. *Pigment Cell Res* **5**:132-142.
- Zeise L, Addison RB, Chedekel MR. 1992b. Bio-analytical studies of eumelanins. I. Characterization of melanin the particle. *Pigment Cell Res Suppl* **2**:48-53.

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1:	Der chemische Bildungsmechanismus von Melanin nach Raper und Mason.	3
Abbildung 2:	2';4''-Verknüpfung von Melanin nach Prota.	5
Abbildung 3:	Überblick über Subkompartimente des Mittelhirns.	12
Abbildung 4:	Reifungsstadien von Melanosomen.	19
Abbildung 5:	Proteomanalyse.	23
Abbildung 6:	Organellen einer Säugetierzelle.	24
Abbildung 7:	Laufmittel-Gradient zur Reinheitsüberprüfung von synthetischen Peptiden.	44
Abbildung 8:	Trennprinzip der 2D-Gelelektrophorese.	57
Abbildung 9:	Gießen der IEF-Röhrchen	61
Abbildung 10:	Nano-HPLC-Gradient.	72
Abbildung 11:	Quantifizierung von Dopaminmelanin.	77
Abbildung 12:	Einfluss von redoxaktiven Metallen auf die Bildung von Dopaminmelanin.	78
Abbildung 13:	Der Einfluss von Fenton-ähnlichen Bedingungen auf die Bildung von Dopaminmelanin.	79
Abbildung 14:	Einfluss von Modellproteinen auf die Bildung von Dopaminmelanin.	80
Abbildung 15:	Untersuchungen zur Modifizierung von BSA durch Dopamin.	82
Abbildung 16:	Detektion von Chinoproteinen nach Inkubation von Substantia-nigra-Homogenat mit Dopamin.	84-85
Abbildung 17:	Chromatogramme der ungereinigten Modellpeptide.	87
Abbildung 18:	FT-ICR-Messungen von modifizierten Peptiden.	88
Abbildung 19:	Immunhistochemische Färbung eines Melanoms und der Substantia nigra mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (Klon T311).	91
Abbildung 20:	Lokalisierung der Sequenzen TYR und TYRL auf Chromosom 11.	92
Abbildung 21:	Alignment der Exone 4 und 5 des Gens TYR mit der Sequenz TYRL.	93-95
Abbildung 22:	Multiple Alignment der Exone 4 und 5 der genomischen Sequenz TYRL mit homologen Sequenzen humaner ESTs.	98-99
Abbildung 23:	Immunhistochemische Färbung der Substantia nigra eines Kindes mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1).	102
Abbildung 24:	Immunhistochemische Färbung des Locus coeruleus eines Kindes mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1).	103
Abbildung 25:	Immunhistochemische Färbung der Substantia nigra eines Erwachsenen mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1).	104

Abbildung 26:	Immunhistochemische Färbung des Locus coeruleus eines Erwachsenen mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT-1).	105
Abbildung 27:	Immunhistochemische Färbung des Locus coeruleus eines Erwachsenen mit Anti-Tyrosinase-Antikörper (MAT).	106
Abbildung 28:	Untersuchung der Expression von Tyrosinase mittels Western Blot.	106
Abbildung 29:	Schema zur Isolierung von Neuromelanin-Granula aus Substantia-nigra-Gewebe.	108
Abbildung 30:	Isolierung melanisierter Zellkörper und Zellaufschluss.	109
Abbildung 31:	Qualitätskontrolle von isolierten Neuromelanin-Granula auf morphologischer Ebene.	111
Abbildung 32:	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Neuromelanin-Granula.	112
Abbildung 33:	Qualitätskontrolle mittels Western Blots.	113
Abbildung 34:	Analytischer Ansatz zur Proteomanalyse von Neuromelanin-Granula.	116
Abbildung 35:	Fragmentspektren von ausgewählten Peptiden.	118
Abbildung 36:	Validierung per Massenspektrometrie identifizierter Proteine durch Western-Blot-Analysen.	127
Abbildung 37:	Lectinblot von Proteinen aus Neuromelanin-Granula.	128
Abbildung 38:	Identifizierung von L-Ferritin mittels Peptidspektren	130
Abbildung 39:	Lokalisierung von L-Ferritin in Neuromelanin-Granula.	131
Abbildung 40:	Modell der Biogenese von Neuromelanin-Granula.	147
Abbildung 41:	Multitopologische Lokalisierung von Proteinen.	149
Tabelle 1:	Modellpeptide zur Untersuchung der Modifizierung durch Dopamin.	86
Tabelle 2:	Daten zu den Nucleotid-Sequenzen von TYR und TYRL.	93
Tabelle 3:	Exprimierte TYRL-Sequenzen.	97
Tabelle 4:	Proteine der Neuromelanin-Granula.	119-124
Tabelle 5:	Proteinvergleich der Neuromelanin-Granula mit Lysosomen und Lysosomen-verwandten Organellen.	150-151

LEBENS LAUF

Florian Tribl

Geboren am 2. 7. 1975 in Wien, Österreich

Schulbildung

1981 - 1985: Besuch der Volksschule in Wien
1985 - 1993: Bundesgymnasium BG XV, Wien, mit Matura (Abitur) abgeschlossen

Oktober 1993 – Mai 1994: Präsenzdienst**Universitäre Ausbildung**

Oktober 1994: Studium der Biochemie an der Universität Wien

Oktober 1998: Studienplanänderung, Fortsetzung des Studiums unter der Bezeichnung „Chemie, Schwerpunkt Biochemie“

Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema „Durchflusszytometrische Untersuchungen zur strukturellen Basis der Bindung von humanen LDL an Thrombozyten“, am Institut für Medizinische Physiologie der Universität Wien, unter der Betreuung von Prof. Dr. E. Koller.

Juli 2001: Diplom an der Universität Wien mit dem akademischen Grad Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Promotionsstudium

Oktober 2001 - Dezember 2004: Doktorarbeit bei Prof. Dr. G. Bringmann am Institut für Organische Chemie und bei Prof. Dr. Dipl.-Ing. P. Riederer, Klinische Neurochemie, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, zum Thema „Untersuchungen zur chemischen Struktur von Neuromelanin“

Oktober 2003 - Juni 2004: DOC-Promotionsstipendium der Österreichischen Akademie der Wissenschaften

Seit September 2004: Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Riederer.

Veröffentlichungen

1. Koutsilieri E, Scheller C, **Tribl F**, Riederer P. (2002). Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress--microglial contribution. *Parkinsonism Relat Disord.* **8**(6):401-6.
2. Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Akao Y, Osawa T, **Tribl F**, Gerlach M, Zucca FA, Zecca L, Riederer P, Naoi M. (2004). Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm.* **111**(10-11):1253-65.
3. Fedorow H, **Tribl F**, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. (2005). Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **75**:109-124.
4. **Tribl F**, Gerlach M, Marcus K, Tatschner T, Arzberger T, Asan E, Meyer HE, Bringmann G, Riederer P. (2005). ‚Subcellular Proteomics‘ of Neuromelanin Granules isolated from the Human Brain. *Mol Cell Proteomics* **4**(7):945-967.

Ausgewählte Vorträge

1. Subzelluläre Proteom-Analyse von Neuromelanin-Granula aus dem humanen Gehirn.
4. Deutscher Parkinson-Kongress, 3.-5. März, 2005, Frankfurt am Main, Deutschland
2. ‚Subcellular Proteomics‘ of neuromelanin granules isolated form the human brain.
16th International Congress on Parkinson’s Disease and Related Disorders, 5.-9. Juni 2005, Berlin, Deutschland

Ausgewählte Posterpräsentationen

1. Parkinsonian syndromes with retroviral etiology: acceleration of infection following dopaminergic treatments in rhesus monkeys.
NATIONAL PARKINSON FOUNDATION 8th International Symposium on Parkinson Research, 6.-8. November 2003, New Orleans, USA
2. ‚Subcellular Proteomics‘ of isolated Neuromelanin Granules.
Stipendiaten-Wochenende der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, 16.-17. April 2004, Wien, Österreich
3. Isolation of neuromelanin granules from the human brain for subsequent proteomic analysis.
The *Movement Disorder Society’s* (MDS) 8th International Congress of Parkinson’s Disease and Related Disorders, 13.-17. Juni 2004, Rom, Italien

4. 'Subcellular Proteomics' of neuromelanin granules isolated from the human brain.
4th FENS (Federation of European Neuroscience Societies) Forum of European Neuroscience, 10.-14. Juli 2004, Lissabon, Portugal
5. 'Subcellular Proteomics' of neuromelanin granules isolated from the human brain.
Neuroscience 2004, Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, 23.-27. Oktober 2004, San Diego, CA, USA
6. 'Subcellular Proteomics' of neuromelanin granules isolated from the human brain.
16th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, 5.-9. Juni 2005, Berlin, Deutschland

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Riederer danke ich ganz besonders für seine außerordentlich menschliche Unterstützung und die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu dürfen. Ich möchte Herrn Professor Riederer als meinem Mentor nicht nur für seinen wissenschaftlichen Rat danken, sondern auch für seine großzügige und exzellente Förderung, durch die ich vielfältige Möglichkeiten zur Weiterbildung hatte.

Nicht weniger danke ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Bringmann für die hervorragende Unterstützung dieser Arbeit. Ich danke Herrn Prof. Bringmann auch dafür, dass ich in seinem Arbeitskreis vielfältige analytische Arbeitsmethoden nutzen durfte.

Herrn Prof. Manfred Gerlach danke ich ganz besonders für seine großzügige Unterstützung meiner Lösungsansätze und seinen vielen Hilfestellungen zur Realisierung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Helmut E. Meyer vom Medizinischen Proteomzentrum, Bochum, danke für seine Zustimmung, die massenspektrometrischen Analysen an seinem Institut durchführen zu können. Herrn Prof. Meyer und seinen zahlreichen Mitarbeitern, vor allem Frau Jun.-Prof. Dr. Katrin Marcus, Dr. Heike Schäfer und Dr. Michael Hamacher, danke ich für die ausgezeichnete Kooperation, ihre Geduld, die guten Ratschläge und die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Untersuchungen.

Den Kollegen in der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Riederer, Dr. Edna Grünblatt und Dr. Eleni Koutsilieri, Manuela Schmidt und Miryame danke ich für ihre aufmunternden Worte und ihre Anteilnahme.

Frau Susanne Burns und Gerlinde Kerscher danke ich ganz besonders für die vielen organisatorischen Hilfestellungen und für reichlich Kaffee.

Den aus Japan, China, Australien und Italien angereisten Kollegen, Prof. Dr. Keinosuke Nara, Dr. Li Jie, danke ich für ihre Unterstützung, vor allem Heidi Potts, Dr. Kay Double und Dr. Luigi Zecca für die ausführlichen Diskussionen über Neuromelanin.

Meinen Kollegen im Arbeitskreis um Herrn Prof. Bringmann, vor allem Dr. Michael Dreyer, „dem Dänen“ Johan Faber, Tanja und Tobi Gulder, Inga Kajahn, Dr. Gerd Lang, Stefan Neumann, Torsten Noll und Melanie Steiner danke ich für ihre maßgebliche Unterstützung an den HPLC-Geräten, für die schöne Zeit und die rauschenden Feste.

Dr. Esther Asan und Siglinde Schenk danke ich für die großartige Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Dr. Thomas Arzberger und Dr. Thomas Tatschner danke ich für die Sektion der Gewebeprouben.

Meiner Freundin Astrid danke ich dafür, dass sie nicht nur von Wien mit nach Würzburg gekommen ist, sondern auch trotz langer Arbeitstage, arbeitsreicher Wochenenden und sämtlicher „auswärtiger“ Aufenthalte immer noch zu mir steht.

Der Österreichischen Akademie der Wissenschaften danke ich für die großzügige Unterstützung durch ein DOC-Stipendium, das mir ein unbeschwertes Arbeiten ermöglicht hat.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Isolierung und Charakterisierung Neuromelanin-assoziiierter Proteine aus Neuromelanin-Granula des menschlichen Gehirns mittels subzellulärer Proteomanalyse“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 15. Juli 2005

Mag. Florian Tribl